

**UNIVERSITÉ DU QUÉBEC**

**MÉMOIRE DE RECHERCHE PRÉSENTÉ À  
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES**

**COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE ET BIOLOGIE CELLULAIRES**

**PAR**

**MARIE-EVE ST-GERMAIN, B. Sc. (Biologie médicale)**

**LA RÉGULATION MOLÉCULAIRE DES PROSTAGLANDINES DANS LE  
CANCER ENDOMÉTRIAL HUMAIN : IMPLICATION DU SENTIER DE  
SURVIE CELLULAIRE PI 3-K/AKT**

**Avril 2004**

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

Je désire tout d'abord remercier mon directeur de recherche, Eric Asselin, de m'avoir permis de travailler dans son laboratoire sur un projet si intéressant. Aussi, je n'oublierai jamais les belles opportunités qu'il m'a offertes et les congrès auxquels j'ai pu participer. Également, il faut souligner le fait que sa grande disponibilité a toujours été très appréciée.

Je veux aussi remercier les amis du laboratoire : Carl, Isabelle, Marie-Claude, Sophie, Valérie et Véronique. Je remercie tout particulièrement Véronique Gagnon avec qui j'ai souvent travaillé et Marie-Claude Déry qui m'a initié au travail de laboratoire et avec qui j'ai développé une belle complicité.

Je remercie mes parents et amis pour leurs perpétuels encouragements. Leur présence a été importante et rassurante tout au long de mes études.

## AVANT-PROPOS

Ce mémoire est présenté sous forme d'articles, qui constituent les chapitres II et III du travail. Une vue globale du sujet de recherche est présentée par la revue de littérature au chapitre I.

Les auteurs du chapitre II (article sous presse pour la revue International Journal of Oncology) sont : moi-même (fait la majeure partie des expériences et traitements des données) ; Véronique Gagnon, étudiante à la maîtrise, a réalisé les manipulations des expériences de la figure 1 ; Isabelle Mathieu, étudiante à la maîtrise, a réalisé quelques manipulations nécessaires à l'acceptation définitive de l'article ; Sophie Parent, assistante de recherche, a participé à l'article par son aide et ses conseils techniques au niveau des expérimentations ; Eric Asselin, professeur au département de chimie-biologie de l'U.Q.T.R., et directeur de recherche, qui est intervenu au niveau de l'élaboration de la stratégie expérimentale, de la supervision des travaux et qui a rédigé ce premier article.

Les auteurs du chapitre III (article publié dans la revue Molecular Cancer 2004, 3 ; 7) sont : moi-même (majeure partie des expériences, traitements des données et rédaction de l'article) ; Véronique Gagnon, avec qui j'ai travaillé conjointement pour le maintien des cultures de cellules ; Sophie Parent, assistante de recherche, a participé à l'article par son aide et ses conseils techniques au niveau des expérimentations ; Eric Asselin, directeur de recherche (révision de l'article et élaboration des protocoles expérimentaux)

## TABLE DES MATIÈRES

<b>REMERCIEMENTS</b> .....	II
<b>AVANT-PROPOS</b> .....	III
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	IV
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	VIII
<b>LISTE DES ABBREVIATIONS</b> .....	X
<b>CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTÉRATURE</b> .....	1
<b>1.0 Introduction</b> .....	2
<b>1.1 Le cancer de l'endomètre</b> .....	2
1.1.1 Anatomie de l'utérus .....	2
1.1.2 Description de la maladie .....	4
1.1.3 Incidence .....	5
1.1.4 Causes .....	5
1.1.5 Diagnostic et stades de la maladie .....	6
1.1.6 Traitements .....	7
1.1.6.1 La chirurgie .....	7
1.1.6.2 La radiothérapie .....	8
1.1.6.3 L'hormonothérapie .....	8
1.1.6.4 La chimiothérapie .....	9
1.1.7 La recherche .....	9
<b>1.2 L'apoptose</b> .....	10
1.2.1 Les caspases .....	13

<b>1.3 Le sentier de signalisation et de survie cellulaire phosphatidylinositol</b>	
<b>3-kinase (PI 3-K) / Akt</b> . . . . .	13
<b>1.4 Les oncogènes et les gènes suppresseur de tumeur</b>	
<b>(ou anti-oncogènes)</b> . . . . .	14
1.4.1 La protéine P53 . . . . .	17
1.4.2 La protéine PTEN . . . . .	17
1.4.3 Akt . . . . .	18
1.4.3.1 Isoformes de Akt . . . . .	18
1.4.3.2 Activation de Akt . . . . .	19
1.4.3.3 Akt et le cancer . . . . .	19
<b>1.5 Le facteur de transcription nucléaire kappa-B (NF-κB)</b> . . . . .	21
1.5.1 Activation de NF-κB . . . . .	21
1.5.2 NF-κB et son implication dans le cancer . . . . .	21
<b>1.6 Les prostaglandines et les cyclo-oxygénases</b> . . . . .	22
1.6.1 Les prostaglandines . . . . .	22
1.6.2 Les protéines COX-1 et COX-2 . . . . .	25
1.6.3 Les récepteurs de la prostaglandine E <sub>2</sub> . . . . .	26
1.6.4 La relation entre COX-2 et Akt . . . . .	26
1.6.5 Les anti-inflammatoires non-stéroïdiens . . . . .	27
1.6.6 COX-2, PGE <sub>2</sub> et le cancer . . . . .	27
<b>1.7 Le but du travail</b> . . . . .	28

## CHAPITRE II : AKT REGULATES COX-2 mRNA AND PROTEIN

### EXPRESSION IN MUTATED-PTEN HUMAN ENDOMETRIAL CANCER

<b>CELLS</b> .....	29
<b>Résumé</b> .....	30
<b>Abstract</b> .....	32
<b>Introduction</b> .....	33
<b>Materials and Methods</b> .....	34
<b>Results</b> .....	38
<b>Discussion</b> .....	41
<b>Figures Legends</b> .....	45
<b>References</b> .....	56

## CHAPITRE III : REGULATION OF COX-2 PROTEIN EXPRESSION BY AKT

### IN ENDOMETRIAL CANCER CELLS IS MEDIATED THROUGH NF-

<b><math>\kappa</math>B/I<math>\kappa</math>B PATHWAY</b> .....	64
<b>Résumé</b> .....	65
<b>Abstract</b> .....	67
<b>Introduction</b> .....	68
<b>Materials and Methods</b> .....	70
<b>Results</b> .....	72
<b>Discussion</b> .....	75
<b>Legends to Figures</b> .....	78
<b>References</b> .....	86

## CHAPITRE IV : CONCLUSIONS GÉNÉRALES .....

90

<b>Discussion et perspectives</b> .....	91
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	99



## LISTE DES FIGURES

### CHAPITRE 1

<b>Figure 1A :</b>	Anatomie de l'appareil génital féminin . . . . .	3
<b>Figure 1B :</b>	Coupe histologique de l'utérus . . . . .	3
<b>Figure 2 :</b>	Représentation schématique et micrographie d'une cellule en apoptose . . . . .	11
<b>Figure 3 :</b>	Représentation schématique du sentier de signalisation et de survie cellulaire PI 3-K/Akt . . . . .	16
<b>Figure 4 :</b>	Schéma de la biosynthèse des prostaglandines . . . . .	24

### CHAPITRE II

<b>Figure 1 :</b>	Akt, Phospho-Akt PTEN protein and mRNA abundance ; Bad and Phospho- Bad activity in wild-type PTEN cells and mutated-PTEN cells . . . . .	48
<b>Figure 2 :</b>	Expression of COXs mRNA and protein in human endometrial cancer cells . . . . .	49
<b>Figure 3 :</b>	Effect of PI 3-K inhibitors in RL 95-2 cells . . . . .	50
<b>Figure 4 :</b>	Effect of PI 3-K inhibitors in Ishikawa cells . . . . .	51
<b>Figure 5 :</b>	Effect of PI 3-K inhibitors in RL 95-2 and Ishikawa cells on COX-2 protein expression . . . . .	52

<b>Figure 6 :</b>	Effect of dominant negative Akt on COX-2 mRNA and protein expression . . . . .	53
<b>Figure 7 :</b>	Effect of constitutively active Akt on COX-2 mRNA and protein expression . . . . .	54
<b>Figure 8 :</b>	Effect of NS-398 on human endometrial cancer cell proliferation . . . . .	55

### CHAPITRE III

<b>Figure 1 :</b>	I $\kappa$ B, Phospho-I $\kappa$ B and NF- $\kappa$ B (p65 and p50) protein abundance in endometrial cancer cells . . . . .	80
<b>Figure 2 :</b>	Effect of PI 3-K inhibitors on apoptosis in HEC 1-A, RL 95-2 and Ishikawa cells . . . . .	81
<b>Figure 3 :</b>	Effect of PI 3-K inhibitors on I $\kappa$ B expression and phosphorylation in HEC-1-A, RL-95-2 and Ishikawa cells . . . . .	82
<b>Figure 4 :</b>	NF- $\kappa$ B activity in response to Wortmannin . . . . .	83
<b>Figure 5 :</b>	Constitutively active Akt action on I $\kappa$ B activity and COX-2 protein expression . . . . .	84
<b>Figure 6 :</b>	Dominant negative Akt action on I $\kappa$ B activity . . . . .	85

**LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS**

$\alpha$	alpha
$\beta$	bêta
CA	actif-constitutif
cm <sup>2</sup>	centimètre carrée
CO <sub>2</sub>	dioxyde de carbone
COXs	cyclo-oxygénases
COX-1	cyclo-oxygénase 1
COX-2	cyclo-oxygénase 2
DAB	diamino-benzine
DMSO	dimethyl sulfoxide
DN	dominant-négatif
DNA	acide désoxyribonucléique
dNTPs	deoxynucleotide triphosphates
dT	deoxythymidine
DTT	dithiothreitol
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FBS	sérum bovin fœtal
Fig.	figure
G	gramme
HCl	acide chloridrique
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
hrs	heures
IgG	immunoglobuline de type G
$\kappa$	kappa
kDa	kilodalton
L	litre
M	molaire

μg	microgramme
MgCl <sub>2</sub>	chlorure de magnésium
μM	micromolaire
ml	millilitre
mM	milimolaire
min.	minute
MMLV-RT	muloney murine leukemia virus reverse transcriptase
mRNA	acide ribonucléique messenger
MTT	<i>(3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide)</i>
NaHCO <sub>3</sub>	bicarbonate de sodium
nm	nanomètre
NSAIDs	anti-inflammatoires non-stéroïdiens
PAGE	électrophorèse sur gel de polyacrylamide
PBS	tampon phosphate salin
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PI 3-K	phosphatidylinositol 3-kinase
PIP <sub>2</sub>	phosphatidylinositol 3,4,5-diphosphate
PIP <sub>3</sub>	phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate
PGs	prostaglandines
PGE <sub>2</sub>	prostaglandine E <sub>2</sub>
PTEN	<i>phosphatase tensin homologue</i>
RT	température pièce
RT-PCR	reverse transcriptase- <i>polymerase chain reaction</i>
SDS	dodécyl sulfate de sodium
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nick end-labeling</i>
V	volt
°C	degré Celcius
%	pourcentage

**CHAPITRE 1**

**REVUE DE LA LITTÉRATURE**

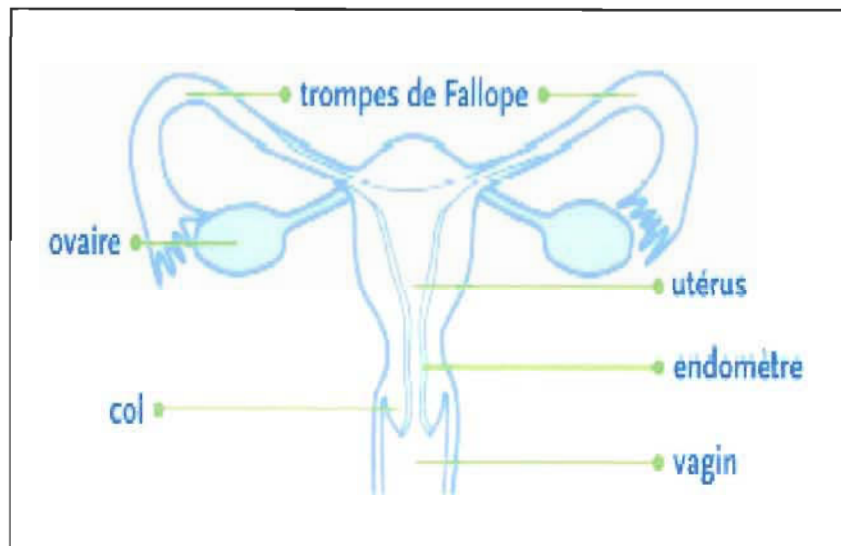
## 1. INTRODUCTION

Il est maintenant bien établi que la transformation de cellules humaines normales en cellules cancéreuses met en jeu plusieurs altérations géniques successives. Les modifications de l'expression de ces gènes ou de l'activité de leur produit peuvent résulter de modifications génétiques. Ces altérations géniques aboutissent à la sélection progressive de cellules qui acquièrent des capacités de prolifération, d'adaptation à l'environnement et de survie caractéristiques du phénotype tumoral. L'accumulation de ces lésions géniques dans une cellule s'explique par l'instabilité génétique des cellules cancéreuses qui permet la génération et la survie de cellules mutantes anormales présentant des avantages sélectifs de prolifération et de survie, puis d'angiogenèse, d'invasion et de métastase.

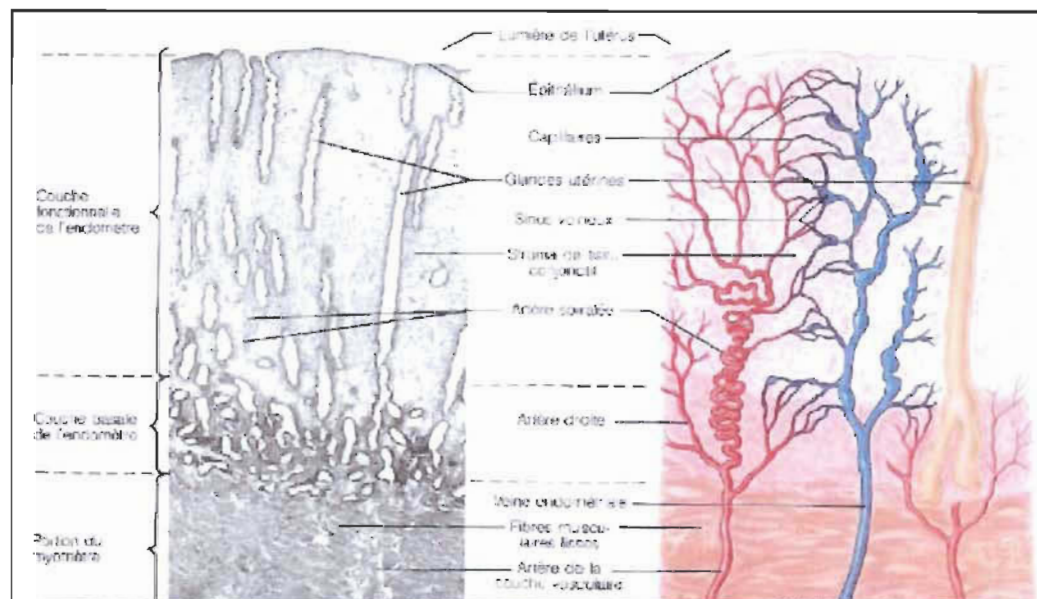
### 1.1 Le cancer de l'endomètre

#### 1.1.1 Anatomie de l'utérus

L'utérus est un petit organe en forme de poire (figure 1A), situé dans le petit bassin, dans lequel se développe le fœtus, lors d'une grossesse normale. Il comprend trois parties : le corps, l'isthme et le col. Bien que l'utérus soit composé de muscles (figure 1B) au niveau externe, sa paroi interne est recouverte d'une muqueuse, composée de tissus glandulaires, appelée endomètre. Au cours du cycle menstruel, les variations du taux et de la combinaison d'hormones sécrétées par les ovaires provoquent des modifications de l'endomètre. L'endomètre s'épaissit chaque mois en préparation d'une grossesse éventuelle et sa couche superficielle est par la suite évacuée au cours des menstruations en absence de signaux embryonnaires. Elle se reconstitue ensuite pendant la première moitié du cycle suivant. Les cellules épithéliales de l'endomètre humain sont hautement vulnérables aux transformations néoplasiques puisque celles-ci sont constamment en état de renouvellement et de multiplication pendant le cycle menstruel. Ainsi, le risque de mutations génétiques est grandement augmenté. Dans la plupart des cas, les tissus glandulaires sont le point d'origine du cancer de l'utérus, que l'on désigne alors sous le terme d'adénocarcinome.



**Figure 1A :** Anatomie de l'appareil génital féminin (Site Web Société canadienne du cancer, [www.cancer.ca](http://www.cancer.ca), 2003)



**Figure 1B :** Coupe histologique de l'utérus (Marieb, E.N. (1993) «Anatomie et physiologie humaines », Editions du Renouveau Pédagogique inc. Canada, p.951).

Presque tous les cancers de l'endomètre sont des adénocarcinomes mais pouvant être séparés en plusieurs types. Les adénocarcinomes endométrioïdes sont les plus répandus puisqu'ils représentent environ 80% des adénocarcinomes qui se développent dans l'épithélium formant la muqueuse de l'utérus. Les cancers endométrioïdes concernent les cellules glandulaires de l'utérus ainsi les cellules squameuses. Les adénocarcinomes avec différenciation malpighienne (longtemps appelés carcinomes adénosquameux (7% des adénocarcinomes)) sont caractérisés par des images de kératinisation ou de ponts cellulaires. Finalement, les derniers types d'adénocarcinomes de l'endomètre sont les adénocarcinomes séreux papillaires (environ 10% des cancers de l'endomètre) (Hendrickson, 1982) et les adénocarcinomes à cellules claires (moins de 5%) (Kurman, 1994). Ce sont les adénocarcinomes les moins répandus mais qui se développent et se propagent souvent rapidement.

Outre les adénocarcinomes, il existe d'autres formes de cancer de l'utérus, moins fréquentes, qu'on appelle également des sarcomes utérins, qui peuvent toucher l'endomètre : les sarcomes stromaux se développant aux dépens du tissu conjonctif de l'endomètre, les tumeurs mixtes mésodermiques malignes (carcinosarcomes) se développant à la fois aux dépens de l'épithélium ou du tissu glandulaire et du tissu conjonctif de l'endomètre, et finalement, les léiomyosarcomes prenant naissance dans le muscle de la paroi utérine.

### **1.1.2 Description de la maladie**

On parle de cancer de l'endomètre lorsqu'il y a prolifération et propagation incontrôlées de cellules anormales de la muqueuse tapissant la face interne de l'endomètre. Les symptômes du cancer de l'endomètre se manifestent généralement au début de la maladie.



Le symptôme classique du cancer de l'endomètre est une perte de sang chez la femme ménopausée ou par des règles abondantes ou des saignements irréguliers entre les règles chez la femme non ménopausée. Il peut également se manifester par des douleurs pelviennes, mais il s'agit d'un symptôme peu fréquent. La plupart des néoplasies endométriales sont diagnostiquées lorsqu'elles sont circonscrites à l'utérus. Cependant, les carcinomes de l'endomètre peuvent s'étendre le long de la cavité utérine jusqu'au col, pénétrer la paroi utérine ou s'étendre à travers les trompes de Fallope. Une fois dissimulés, ces carcinomes peuvent être aussi létaux que le cancer ovarien (Gurpide, 1991).

### **1.1.3 Incidence**

Au Canada et aux États-Unis, le cancer endométrial est le cancer gynécologique le plus fréquent (Canadian Cancer society and NIH USA statistics 2003). Il est aussi le quatrième en importance parmi tous les cancers chez la femme (après les cancers du sein, du colon et du poumon). On diagnostique un cancer de l'endomètre chez environ 3500 femmes canadiennes tous les ans. L'incidence du cancer endométrial a augmenté sans arrêt durant les 50 dernières années et est attribuable à l'augmentation de l'espérance de vie et aux méthodes de détection améliorées (Gordon, 1994 ; Mant, 1994).

### **1.1.4 Causes**

Le cancer endométrial survient le plus souvent après la ménopause, l'âge moyen au diagnostic étant de 60 ans. Le développement d'hyperplasies et de carcinomes endométriaux peut être lié à une exposition aux œstrogènes sans les effets de la progestérone (Kurman, 1997). En effet, une association entre une utilisation prolongée d'hormones ou des médicaments contenant des œstrogènes (sans progestérone) et le développement du cancer de l'utérus a été démontré (Grady, 1994). Ainsi, toute situation qui augmente l'exposition aux œstrogènes augmente

donc le risque de ce cancer comme un début précoce des règles ou une survenue tardive de la ménopause. Aussi, des études confirment que les femmes prenant du tamoxifène pour prévenir ou soigner un cancer du sein seraient deux à trois fois plus à risques (Mourits, 2001), ce qui peut être lié à l'effet du tamoxifène sur l'utérus, un effet qui ressemble à celui des œstrogènes tandis qu'il se manifeste par un effet anti-œstrogène au niveau du sein. En effet, le tamoxifène est un antiœstrogène synthétique (antagoniste œstrogénique) utilisé dans le traitement du cancer du sein mais présente également des effets œstrogéniques (agonistes) sur l'endomètre, augmentant les risques de cancer de l'endomètre (Fisher, 1994). Il a été démontré qu'après l'implantation de cellules cancéreuses du sein et de l'endomètre dans des souris athymiques, les deux types de tumeurs se développaient très bien. Lorsqu'on utilisait ensuite le tamoxifène comme traitement, les tumeurs provenant des cellules cancéreuses du sein étaient inhibées tandis que celles provenant de l'endomètre croissaient (Gottardis, 1998).

Parmi les autres facteurs de risques du cancer endométrial, citons le diabète, l'affection de la vésicule biliaire ou de la thyroïde, la nulliparité/infertilité, l'hypertension et l'obésité (Shoff, 1998). Par contre, la contraception orale semble avoir un effet protecteur contre le cancer de l'endomètre. En effet, jusque dans les années 1980, les œstrogènes étaient le composant dominant des pilules œstroprogestatives, et donc entraînaient un risque accru de cancer de l'endomètre. Cependant, depuis 1976, la progestérone est le composant dominant et la pilule œstroprogestative confère au contraire une production qui persiste au moins 10 ans après l'arrêt de cette contraception (The Centers for Disease Control Cancer and Steroid Hormone Study, 1983).

### **1.1.5 Diagnostic et stades de la maladie**

Un prélèvement d'un fragment de tissu endométrial et son examen au microscope doit être effectué pour savoir si l'on a affaire à un cancer ou si les saignements anormaux sont dus à d'autres causes bénignes. Ce prélèvement peut

s'effectuer par biopsie ou par curetage de l'utérus, après dilatation du col. En ce qui concerne l'examen du tissu endométrial, un pathologiste doit observer le tissu prélevé pour voir s'il contient des cellules cancéreuses. S'il y a cancer, on en détermine le type histologique et le stade clinique.

La détermination du stade du cancer indique son degré d'extension. Pour le cancer endométrial, le système mis au point par la Fondation Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique (FIGO) est utilisé. On parle de stade I lorsque le cancer est limité au corps de l'utérus ; de stade II lorsque que la tumeur envahie le col ; de stade III lorsque le cancer s'est propagé à l'extérieur de l'utérus et finalement de stade IV lorsqu'il s'agit d'une tumeur avec métastases à distance (vessie, rectum, foie, poumons ou os).

### **1.1.6 Traitements**

Il existe quatre types de traitements de base : le traitement chirurgical, la radiothérapie, l'hormonothérapie et la chimiothérapie. Il arrive qu'on en combine plusieurs.

#### **1.1.6.1 La chirurgie**

On a généralement recourt au traitement chirurgical dans les cas de cancer de l'endomètre. L'intervention la plus fréquente consiste à enlever l'utérus ainsi que les deux ovaires et les trompes de Fallope. Cette chirurgie se nomme hystérectomie totale avec salpingo-ovariectomie bilatérale et se pratique généralement par voie abdominale. Plus récemment, on a commencé à utiliser le laparoscope pour procéder au détachement des trompes et des ovaires afin de compléter l'hystérectomie par voie vaginale. Pour les cancers de stade I, la chirurgie est parfois la seule intervention nécessaire. On peut aussi procéder à l'exérèse de quelques ganglions situés à

proximité pour s'assurer qu'ils sont sains : une analyse en laboratoire sur ces ganglions révélera si le cancer s'est propagé.

#### **1.1.6.2 La radiothérapie**

La radiothérapie consiste en la destruction des cellules cancéreuses par des rayons X de haute énergie. Elle peut affecter les tissus sains entourant la tumeur mais ses effets secondaires peuvent généralement être maîtrisés. La radiothérapie peut s'administrer par l'introduction d'une source radioactive (curiethérapie) dans l'utérus ou dans le vagin. En radiothérapie externe, les rayons sont dirigés directement sur la tumeur de façon à épargner les tissus sains avoisinants. Chez la plupart des femmes dont le cancer a atteint les stades II, III ou IV, la chirurgie doit être accompagnée de radiothérapie afin de détruire les cellules cancéreuses qui ont essaimé. Il arrive plus rarement que la radiothérapie soit administrée avant la chirurgie afin de réduire la taille de la tumeur pour faciliter son excision.

#### **1.1.6.3 L'hormonothérapie**

L'hormonothérapie consiste généralement à administrer des comprimés ou des injections d'hormones (généralement de la progestérone) pour freiner la prolifération des cellules cancéreuses et permettre de réduire la taille d'une tumeur. Si les tests révèlent que le cancer est de type hormonodépendant, on peut choisir l'option d'administrer des progestatifs (acétate de mégestrol ou médroxyprogestérone) qui empêchera les récepteurs d'œstrogènes de s'approvisionner en œstrogènes (Moore, 1991). On y recourt pour traiter les cancers utérins récidivants ou ayant atteint un stade avancé.

#### **1.1.6.4 La chimiothérapie**

Elle consiste en l'administration de médicaments empêchant le développement et la propagation des cellules cancéreuses. Les molécules les plus actives en monothérapie sont les paclitaxel (36 %), les sels de platine (20-30%) et les anthracyclines (30%) (Ball, 1995). La chimiothérapie anticancéreuse associe souvent plusieurs médicaments et les taux de réponse sont meilleurs en association. Les plus actives sont les associations anthracycline-sel de platine et paclitaxel-sel de platine. Généralement, on utilise la doxorubicine seule ou associée au cisplatine. Par contre, la chimiothérapie peut affecter des cellules saines et provoquer des effets secondaires : nausées, vomissements, perte d'appétit, fatigue, perte des cheveux et risques accrus d'infection. Il arrive qu'on y recoure lorsque le cancer s'est propagé au-delà du bassin. Les médicaments sont administrés en injections intraveineuses pour permettre une diffusion dans tout l'organisme.

#### **1.1.7 La recherche**

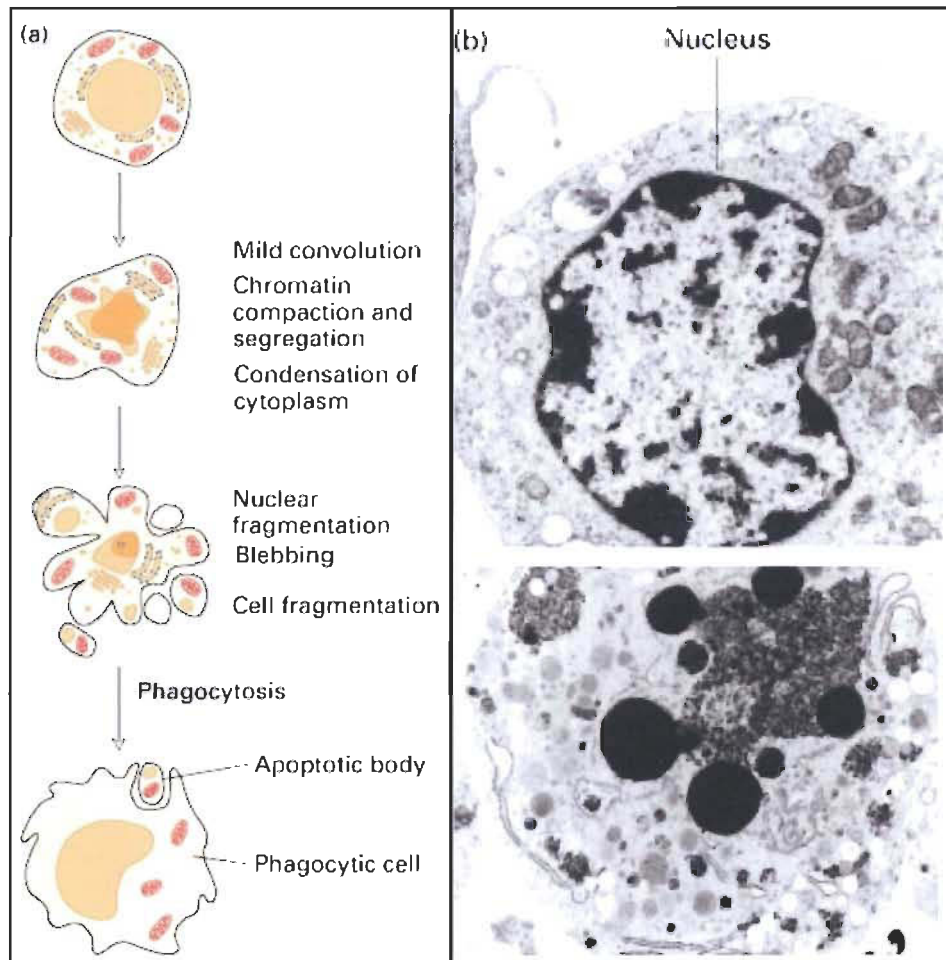
Des essais cliniques sont en cours pour évaluer l'effet de nouveaux médicaments dans le traitement de cancers récidivants. Des recherches sur la structure moléculaire du cancer endométrial pourraient déboucher sur de nouveaux moyens de dépistage, de traitement et de prévention. La grande majorité des cas de cancer de l'endomètre n'ont rien à voir avec l'hérédité mais sont le plus souvent causés par des mutations de gènes qui régulent la réparation de l'ADN ou la multiplication des cellules. Ainsi, l'activation de certains oncogènes et la perte de la fonction de suppresseur de tumeur (voir sections 1.4.1 et 1.4.2) que possède différents gènes (par exemple, p53 et PTEN) sont des événements qui peuvent causer des tumeurs (Esteller, 1999) .

## 1.2 L'apoptose

Le développement et la survie de tout organisme multicellulaire résultent d'un contrôle génétique précis du nombre de cellules grâce à un équilibre entre les phénomènes de prolifération et de mort cellulaire. Toutes les cellules ont la capacité de se détruire en activant un programme intrinsèque dont l'exécution conduit à une forme de mort cellulaire, l'apoptose (Kerr, 1972). Les cellules ont la capacité de répondre à des signaux très différents en activant un ensemble d'événements conduisant à leur mort par apoptose. L'apoptose, qui a été initialement décrit par Kerr en 1972, est un processus génétiquement contrôlé jouant un rôle fondamental dans le développement et l'homéostasie cellulaire (Evan, 1998). L'apoptose s'effectue selon un processus stéréotypé et conservé suggérant l'existence d'un mécanisme général de destruction.

Plusieurs étapes interviennent depuis le signal susceptible de déclencher le programme apoptotique jusqu'à la mort cellulaire. De nombreux signaux physiologiques ou pathologiques et intra ou extracellulaires ont été identifiés comme pouvant déclencher l'apoptose. Une carence en facteurs de croissance, l'activation de certains récepteurs membranaires (Fas, TNF) ou nucléaires (glucocorticoïdes) lorsqu'ils sont liés à leur ligands ou des dommages cellulaires (radiations ionisantes, agents cytotoxiques, chocs osmotiques, hyperthermie) sont tous des facteurs qui peuvent induire l'apoptose (Itoh, 1991 ; Nagata, 1995). Ces signaux sont intégrés par la cellule qui, en fonction de son génotype et de son état physiologique, orientera sa réponse soit vers l'apoptose, soit vers la différenciation ou la survie.

Ce programme met en œuvre l'interruption planifiée des processus biologiques et la destruction des macrostructures de manière à faciliter l'élimination de celles-ci. L'apoptose est un processus qui a été initialement décrit par ses caractéristiques morphologiques (figure 2) soit le rétrécissement cellulaire, les boursoufflements de la membrane plasmique, la condensation de la chromatine dans le noyau, la fragmentation cellulaire et la formation de corps apoptotiques (Kerr, 1972).



**Figure 2** : Représentation schématique et micrographie d'une cellule en apoptose (Molecular Cell biology, Fourth ed., Lodish et al., WH Freeman 2000).

De plus, lorsque la membrane cellulaire commence à bourgeonner, celle-ci exprime des signaux permettant la phagocytose ultérieure de la cellule. La fragmentation cellulaire est la conséquence d'une ou de plusieurs endonucléases. Les effecteurs contribuant à la destruction de la cellule sont les protéases à cystéine, appelées caspases (voir section 1.2.1). Au point de vue biochimique, les cellules apoptotiques sont caractérisées par une externalisation des phosphatidylsérines membranaires, une dégradation spécifique de l'ADN et une dégradation sélective de certaines protéines cellulaires (Hengartner, 2000).

Le dérèglement de la mort cellulaire par apoptose est impliqué dans la physiopathologie de nombreuses maladies. L'importance des processus d'apoptose en physiologie fait que toute dérégulation de ces processus peut être délétère pour l'organisme. En effet, un contrôle de l'apoptose inapproprié peut contribuer à certaines pathologies, telles que la maladie d'Alzheimer ou des maladies auto-immunes, alors qu'un défaut d'apoptose peut contribuer au développement d'un cancer. L'apoptose est la contrepartie de la prolifération et l'interruption de l'apoptose représente donc un élément-clé dans la tumorigenèse. L'expression de certains oncogènes ou anti-oncogènes (voir section 1.4) est corrélée à la sensibilité cellulaire à l'apoptose (Askew, 1991; Wang, 1993). De nombreuses observations montrent que la plupart des agents anticancéreux exercent leur action en induisant l'apoptose (Hickman, 1992). De plus, il semble que l'efficacité d'une thérapie soit corrélée à la capacité de la cellule tumorale cible de répondre à l'apoptose. Ainsi, la résistance cellulaire à certains traitements reflète une certaine incapacité à activer la cascade des événements de l'apoptose. Il est cependant crucial à la survie de l'organisme que cette mort cellulaire soit étroitement régulée. La régulation entre la balance entre les sentiers de survie cellulaire et de mort programmée est donc déterminante dans le destin cellulaire.



### 1.2.1 Les caspases

Jusqu'à présent, les seuls effecteurs identifiés contribuant à la destruction de la cellule sont les protéases à cystéine, appelées caspases (pour cysteine aspartate protease) (Alnemri, 1996) de la famille de ICE (interleukine-1 $\beta$  converting enzyme), et les nucléases. Les cibles des caspases sont des protéines dont la dégradation aboutit soit à la perte de leur fonction, soit à l'acquisition de nouvelles activités (Nicholson, 1999). L'activation de ces molécules effectrices est irréversible. Les caspases sont produites sous forme de précurseurs qui subissent une maturation par clivage au niveau de résidus aspartate présents sur la caspase elle-même. Cette maturation en deux sous-unités produit l'enzyme active.

Les caspases ont été divisées en deux sous-groupes basés sur leur position dans la cascade induisant l'apoptose. En amont, on retrouve les caspases initiatrices (caspase-2, -8, -9 et -10) qui sont généralement responsables de l'activation de la cascade des caspases durant l'apoptose. Le second groupe, en aval, se nomme les caspases effectrices (caspase-3, -6 et -7). Celles-ci sont responsables de la destruction de la cellule lors de l'apoptose (Muzio, 1996; Boldin, 1996 ; Srinivasula, 1996).

### 1.3 Le sentier de signalisation et de survie cellulaire phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-K)/Akt

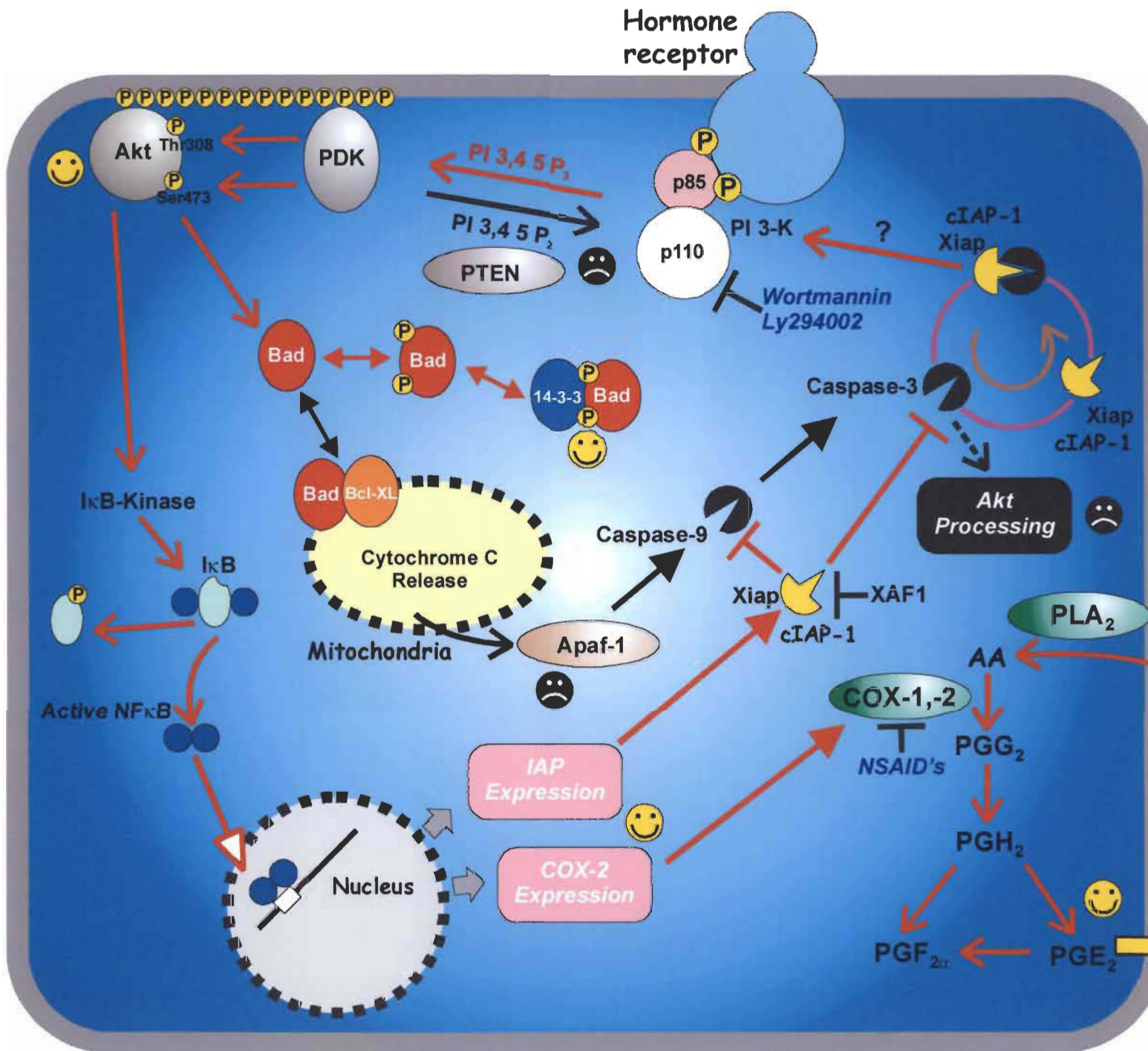
Les phosphatidylinositol 3-kinases (PI-3K) génèrent des lipides inositol spécifiques qui sont impliqués dans plusieurs processus cellulaires importants comme l'adhésion, la mobilité, la croissance, la prolifération, la survie et la différenciation cellulaire. PI 3-K est une molécule de signalisation importante (figure 3) pour divers facteurs de croissance (comme l'insuline) dans une variété de types cellulaires (Panayotou *et al.*, 1993).

Le second messenger lipidique formé par PI 3-K, le phosphatidylinositol 3-phosphate, joue un rôle important dans l'activation de Akt. Le sentier de signalisation PI 3-K est ainsi impliqué dans l'activation du facteur de transcription nucléaire pro-inflammatoire  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) et permet ainsi une régulation positive des gènes anti-apoptotiques et la survie cellulaire. PI 3-K a été impliqué pour la première fois dans la suppression de l'apoptose dans une étude réalisée par Yao et Cooper (1995). Celle-ci démontrait que l'inhibition de l'activité de PI 3-K diminuait l'habilité du *nerve growth factor* (NGF) à promouvoir la survie cellulaire. Certains inhibiteurs du phosphatidylinositol 3-kinase comme le LY 294002 et Wortmannin sont souvent utilisés en recherche pour vérifier l'importance de cette voie de signalisation. Il a été démontré que PI 3-kinase est activé dans diverses tumeurs humaines (Shayestch, 1999).











#### **1.4 Les oncogènes et les gènes suppresseur de tumeur (ou anti-oncogènes)**

Des altérations génétiques survenant sur des gènes critiques peuvent être à la base de la formation et de la progression de tumeurs cancéreuses. Certains de ces gènes sont impliqués dans d'importants processus comme la modulation transcriptionnelle et la régulation du cycle cellulaire. Les oncogènes stimulent la croissance chez les cellules normales tandis que les gènes suppresseurs de tumeur sont responsables de l'inhibition de la prolifération ou de l'induction de l'apoptose. Les mutations dans ces types de gènes amènent une augmentation de l'activité de croissance dans le premier type et une inactivation de l'inhibition dans le second, facilitant ainsi la transformation de la cellule normale en cellule cancéreuse. Les oncogènes peuvent être activés par des mutations ou par l'amplification et la surexpression de divers gènes alors que les gènes suppresseur de tumeurs peuvent être inactivés par la délétion de certains gènes, par des mutations, par des délétions partielles qui inhibe le produit du gène ou par un manque de transcription c'est-à-dire par hyperméthylation du promoteur (Esteller, 1999).

**Figure 3** : Représentation schématique du sentier de signalisation et de survie PI 3-K/Akt.



### Legend

-  Pro-apoptotic
-  Anti-apoptotic
-  Survival pathway
-  Death pathway
-  Activation
-  Production
-  Translocation
-  Caspase-mediated degradation
-  Inhibition
-  Gene expression

- PGE<sub>2</sub> properties:**
1. Vasodilatation
  2. Apoptosis inhibition
  3. Angiogenesis
  4. Immunosuppression
  5. Invasiveness
  6. Procarcinogens to carcinogens

### 1.4.1 La protéine P53

Le gène p53 est un des gènes les plus étudiés dans le cancer endométrial. La fonction principale de p53 est de réguler la transcription de nombreux gènes impliqués dans des mécanismes d'arrêt de la prolifération cellulaire et de mort cellulaire. En effet, p53 est une protéine nucléaire essentielle au contrôle de la progression dans le cycle cellulaire (arrêt du cycle en phase G1), de la réparation de l'ADN et de l'apoptose induite par divers stress cellulaires (Ko, 1996; Hansen, 1997).

Le gène suppresseur de tumeur p53 est muté dans la moitié des tumeurs humaines, ce qui souligne son importance dans de nombreux tissus. Effectivement, p53 est une des protéines clés qui protègent les tissus de la transformation tumorale (Levine, 1997). Le rétablissement de la fonction de p53 de type sauvage dans les cellules tumorales pourrait être utile pour potentialiser les effets des traitements conventionnels contre le cancer, et différents protocoles ont déjà été mis au point où la thérapie génique avec p53 est accompagnée par l'administration d'agents induisant l'apoptose (Yang, 1996).

### 1.4.2 La protéine PTEN

Récemment, un nouveau gène suppresseur de tumeur appelé PTEN/MMAC1 (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten/mutated in multiple advanced cancers) a été localisé sur le chromosome 10q23.3 (Li, 1997). PTEN est l'un des gènes suppresseur de tumeurs les plus mutés dans les différents cancers humains (Steck, 1997). Le gène PTEN humain encode un polypeptide de 403 acides aminés possédant une activité lipide phosphatase. PTEN est un régulateur négatif de PI 3-K et de Akt. L'inactivation du gène suppresseur de tumeur PTEN/MMAC1 a été démontré dans plusieurs types de cancers comme ceux du cerveau, du sein, de l'endomètre, du foie, et de la prostate (Li J, 1997 ; Steck, 1997 ; Li DM, 1997). Dans

la plupart des tumeurs associées à la mutation de PTEN, la protéine perd l'intégrité de son domaine phosphatase (Marsh, 1998 ; Rasheed, 1997).

La protéine PTEN déphosphoryle le phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP<sub>3</sub>) à la position D3 et génère la molécule PIP<sub>2</sub> (Maehama, 1998). La molécule PIP<sub>3</sub> est un produit direct de l'activité de PI 3-K et régule positivement PDK1 (phosphoinositide dependent kinase-1), une kinase connue pour phosphoryler et activer Akt. Ainsi, dans une situation où PTEN est présente sous forme sauvage et/ou surexprimée, le sentier de survie PI 3-K/Akt est bloqué et les processus apoptotiques peuvent être enclenchés. Il a été démontré dans un type de cellules cancéreuses endométriales connues pour avoir un gène PTEN muté, que la sur-expression de la protéine sauvage pouvait bloquer la prolifération cellulaire et induire l'apoptose (Sakurada, 1999). En plus, de réguler négativement Akt, cette protéine possède l'habilité de bloquer le cycle cellulaire en phase G1 (Ramaswamy, 1999).

### **1.4.3 Akt**

La protéine kinase Akt ou protéine kinase B (PKB) est l'une des cibles des produits lipidiques du PI 3-K les plus caractérisées. En 1991, deux lignes de recherches indépendantes convergent sur la découverte d'un ADNc qui encode une nouvelle sérine/thréonine kinase. Un groupe avait cloné l'homologue cellulaire normal de l'oncogène viral v-akt et son produit fût appelé c-Akt (Staal, 1987).

#### **1.4.3.1 Isoformes de Akt**

Trois isoformes de Akt ont été identifiés chez les mammifère mais leur niveau d'expression varie selon les tissus. Akt1 est la forme prédominante dans la plupart des tissus (Bellacosa, 1993). La plus grande expression de Akt2 est observée dans

les tissus répondant à l'insuline : muscle squelettique, cœur, foie et rein (Altomare, 1995). À l'instar des deux autres isoformes, Akt3 est exprimé de façon restreinte. De hauts niveaux d'expression de Akt3 ont été détectés dans les testicules et dans le cerveau et des niveaux faibles, dans le pancréas, le cœur et le rein (Nakatami, 1999). Cependant, la patron d'expression des trois isoformes ne reflète pas nécessairement leur activité. En effet, différents niveaux d'activités de ces trois isoformes ont été observés dans certains tissus mais ne sont pas nécessairement corrélés à leurs niveaux d'expression (Walker, 1998).

#### **1.4.3.2 Activation de Akt**

Akt est une sérine/thréonine kinase de 59 kDa qui est initialement une protéine cytosolique inactive recrutée à la membrane plasmique et qui est, par la suite, activée à la suite d'une phosphorylation en réponse à des facteurs de croissance ou des cytokines par l'intermédiaire d'un mécanisme impliquant la phosphoinositide 3-kinase (PI 3-K) (Stephens, 1998). Akt fournit un signal de survie qui protège les cellules contre l'apoptose induite par divers stress (Alessi, 1996 ; Ahmed, 1997 ; Kennedy, 1997; Kulik, 1993). La molécule responsable de l'activation et du recrutement de Akt à la membrane cellulaire est la lipide kinase PI 3-K. Akt est activée par un recrutement à la membrane plasmiques par les produits lipidiques de PI 3-K et par une phosphorylation au niveau de la thréonine 308 et de la sérine 473 par le 3'-phosphoinositide-dépendant kinase-1 (PDK-1). Akt à son tour phosphoryle et bloque l'action de Bad, une protéine pro-apoptotique appartenant à la famille de Bcl-2 (Datta, 1997), au niveau de la mitochondrie. De plus, Akt peut aussi altérer l'activité de plusieurs autres médiateurs pro-apoptotiques. Comme Akt peut induire la phosphorylation de pro-caspase-9, il est suggéré que l'activation/blocage des caspases et de l'apoptose peut-être régulé directement par la phosphorylation des protéines (Cardone, 1998). La sur-expression de Akt a des effets anti-apoptotiques dans plusieurs types cellulaires en retardant la mort cellulaire. De plus, cette sérine/thréonine kinase stimulerait l'activité du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Madrid, 2000).

### 1.4.3.3 Akt et le cancer

La première évidence que Akt pouvait être un proto-oncogène fut son identification comme étant une protéine de fusion d'un rétrovirus oncogénique. Des expériences ultérieures ont montré qu'une expression ectopique de Akt activé permettait une transformation cellulaire *in vitro* (Aoki, 1998). La découverte d'une sous-unité catalytique activé de PI 3-K dans un virus du sarcome aviaire (Chang, 1997) et les observations démontrant que le gène suppresseur de tumeur PTEN soit fréquemment muté ou délété dans de nombreux cancers ont mis Akt dans une position critique en ce qui concerne la tumorigénèse. La fréquence avec laquelle la voie de signalisation PTEN/PI 3-kinase/Akt est altérée suggère fortement que l'activation de celle-ci dans les tumeurs cancéreuses serait aussi commune que l'inactivation de p53.

Il a été démontré que dans plusieurs types de cancer humain (cancer de l'estomac, du pancréas, de l'ovaire, du sein et de la prostate), les protéines de la famille Akt sont souvent amplifiées ou leur activité kinase sont constitutionnellement plus élevées (Bellacosa, 1995 ; Cheng, 1992, 1995 ; Haas-Kogan, 1998; Li, 1997, Staal, 1987). Des amplifications de Akt1 ont été décelées dans des adénocarcinomes gastriques (Staal, 1987) tandis que Akt2 s'est trouvé amplifié et surexprimé dans les cancers du pancréas, de l'ovaire et du sein (Bellacosa, 1995 ; Cheng, 1996). En fait, la surexpression de Akt2 coïncide avec de mauvais pronostics et des durées de vie plus réduites chez les patientes atteintes de cancer de l'ovaire. Akt3 est surexprimé dans les cancers du sein et de la prostate (Nakatani, 1999). Toutes les lignées cellulaires cancéreuses dans lesquelles PTEN est inactivé démontrent une augmentation de l'activité de Akt. Ainsi, l'activation de ce proto-oncogène contribue à la genèse du cancer.



## **1.5 Le facteur de transcription nucléaire kappa-B (NF- $\kappa$ B)**

### **1.5.1 Activation de NF- $\kappa$ B**

NF- $\kappa$ B est un hétérodimère de deux sous-unités (p50 et p65) connu pour activer la transcription de plus de 150 gènes. Ce facteur de transcription est retenu dans le cytoplasme sous une forme latente et inactive avec son inhibiteur I $\kappa$ B. Sous l'influence de multiples facteurs, I $\kappa$ B est phosphorylé, ubiquitiné et dégradé par des protéasomes (Palombella, 1994). La dégradation de I $\kappa$ B est régulé par la phosphorylation des résidus sérine 32 et 36 par le complexe de deux kinases IKKs (I $\kappa$ B kinase- $\alpha$  et I $\kappa$ B kinase- $\beta$ ). La phosphorylation de ces résidus provoquent la dissociation de NF- $\kappa$ B avec son inhibiteur I $\kappa$ B lequel devient une cible pour l'ubiquitination et la dégradation. NF- $\kappa$ B est alors transloqué au niveau du noyau et il est alors capable d'activer la transcription de nombreux gènes (Baeuerle, 1988).

Notons que le gène suppresseur de tumeur PTEN supprime l'activation NF- $\kappa$ B puisqu'il a été démontré que le chemin de survie PI 3-kinase/Akt est impliqué dans l'activation de NF- $\kappa$ B (Kane, 1999). Akt stimulerait l'activité du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Madrid, 2000). Il a été établi que Akt augmente la dégradation de I $\kappa$ B et coopère avec d'autres facteurs pour induire l'activation de NF- $\kappa$ B (Kane, 1999). L'habilité de Akt à réguler l'activité de NF- $\kappa$ B peut être aussi due à son interaction directe avec les IKKs (I $\kappa$ B kinases). De plus, Akt peut phosphoryler et activer IKK $\alpha$  sur un site régulateur, la thréonine 23 (Ozes, 1999). Ainsi, ces données révèlent l'implication de Akt dans le chemin de signalisation le liant ainsi à NF- $\kappa$ B.

### **1.5.2 NF- $\kappa$ B et son implication dans le cancer**

Subissant une régulation complexe, l'activation de NF- $\kappa$ B est fréquemment observée dans les cellules tumorales. La présence d'une activité constitutive de NF-

$\kappa$ B dans de nombreuses cellules tumorales confère à celles-ci un potentiel de survie en s'opposant à l'apoptose. Par exemple, une localisation permanente de NF- $\kappa$ B dans le noyau a été détectée dans les cas de cancer du sein (Rayet, 1999), de l'ovaire (Dejardin, 1999), de la thyroïde (Visconti, 1997) et de la prostate (Herrmann, 1997). Dans les cellules du cancer du sein et de la prostate, l'activité constitutive de NF- $\kappa$ B est associée à des niveaux réduits de I $\kappa$ B dus à une hausse de la dégradation de cette protéine dans ces cellules (Gasparian, 2002). Une inhibition de NF- $\kappa$ B qui serait associée à des traitements chimiothérapeutiques pourrait fortement améliorer le potentiel apoptotique de la chimiothérapie.

Les gènes induits par NF- $\kappa$ B pour promouvoir la survie cellulaire ne sont pas tous encore identifiés, mais incluent Bfl-1/A1 (un membre de la famille Bcl-2) et des inhibiteurs d'apoptose, c-IAP1 et c-IAP-2 (Chu, 1997 ; You, 1997 ; Zong, 1999). En outre, des études indiquent que NF- $\kappa$ B contrôle la transcription du gène de COX-2 (Schmedtje, 1997). Récemment, il a été établi que l'activité de COX-2 pouvait aussi affecter NF- $\kappa$ B. Il pourrait s'agir d'un mécanisme de contrôle positif ou négatif dépendamment si COX-2 a un effet positif ou négatif sur l'activité de NF- $\kappa$ B (Jobin, 1998).

## **1.6 Les prostaglandines et les cyclo-oxygénases**

### **1.6.1 Les prostaglandines**

Les prostaglandines ont été identifiées pour la première fois en 1936 par Ulf Von Euler dans le plasma séminal humain (Von Euler, 1936). Elles font parties de la classe des éicosanoïdes qui inclue les thromboxanes et les leukotriènes. La phospholipase A<sub>2</sub> est l'enzyme qui libère le précurseur de l'acide arachidonique (figure 4) emmagasiné à l'intérieur des membranes phospholipidiques cellulaires. Ensuite, la cyclo-oxygénase transforme l'acide arachidonique en PGH<sub>2</sub> qui sera, par la suite, converti en prostaglandines par diverses enzymes dont l'isomérase endopéroxyde E en ce qui concerne la prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>).

**Figure 4** : Schéma de la biosynthèse des prostaglandines.

# Prostaglandines



Acide arachidonique

Cyclooxygénase 1 et 2  
(PGH synthase)

$PGI_2$

$PGG_2$

$PGH_2$

$PGD_2$

$PGE_2$

$PGF_{2\alpha}$



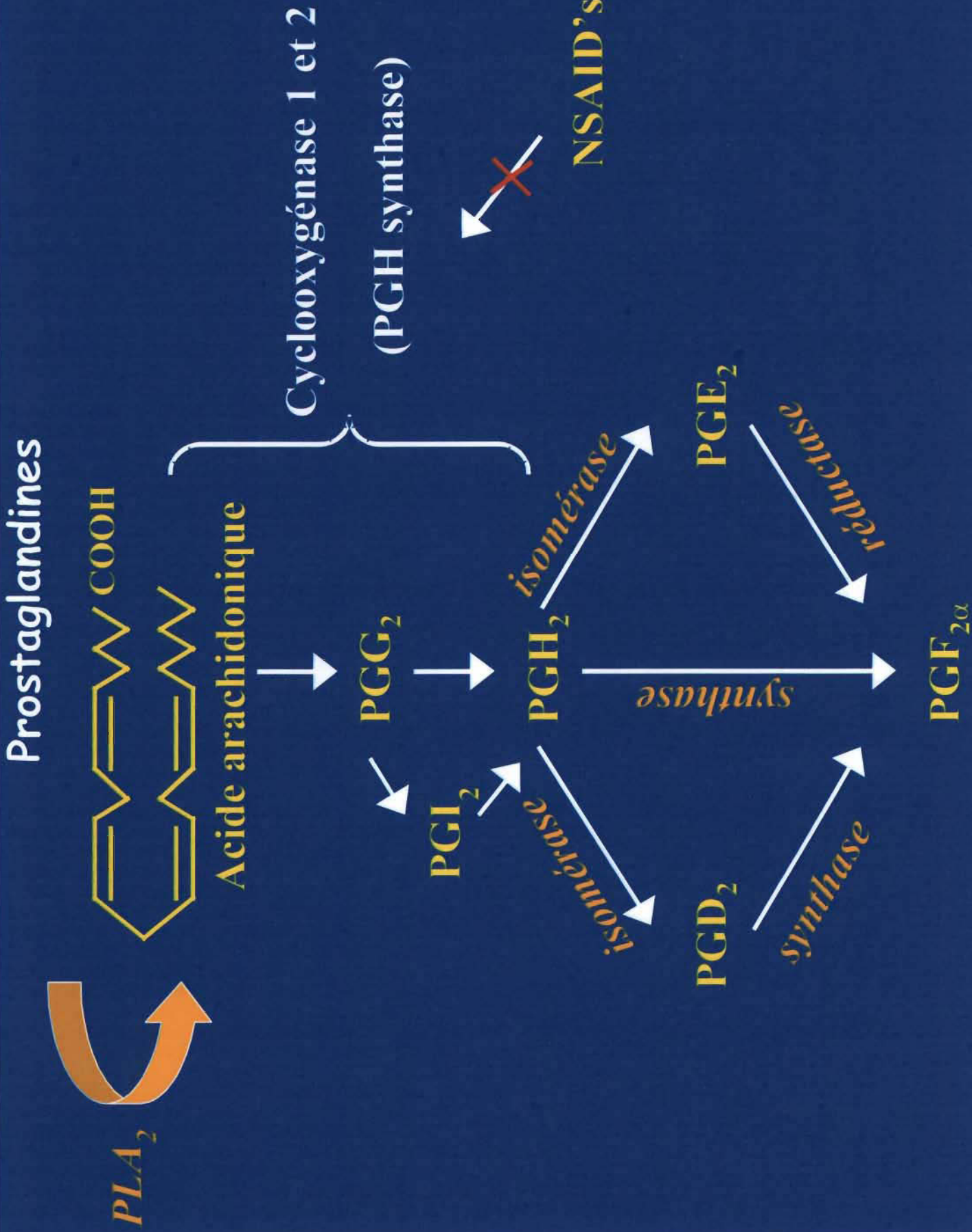
NSAID'S

*isomérase*

*synthase*

*Synthase*

*réductase*



Les prostaglandines en particulier la PGE<sub>2</sub>, sont de puissants médiateurs lipidiques impliqués dans une multitude de situations physiologiques telles que l'inflammation à différents niveaux. Au niveau de la reproduction, elles sont impliquées à tous les niveaux tels que l'augmentation de la perméabilité vasculaire et la décidualisation de l'endomètre au début de l'implantation embryonnaire, de la différenciation et prolifération endométriale, au niveau de l'ovulation, de la parturition et des menstruations (Kennedy, 1985 ; Tawfik, 1997). La production et la régulation des PGs se doit donc d'être contrôlée parfaitement dépendamment de la situation physiologique précise.

### **1.6.2 Les protéines COX-1 et COX-2**

Les cyclo-oxygénases (COXs) sont des enzymes de 72 kDa qui catalysent les étapes limitantes dans la conversion de l'acide arachidonique en prostanoides biologiquement actifs. La cyclo-oxygénase 1 (COX-1) est une enzyme constitutive s'exprimant dans l'ensemble de l'organisme à l'état physiologique tandis que la cyclo-oxygénase 2 (COX-2) est exprimée dans la plupart des tissus et des cellules à un niveau très faible et est induite par des substances mitogènes ou par des stimuli hormonaux (Smith, 1991 ; Xie, 1991 ; Kujubu, 1991; O'Bannion, 1991). Après stimulation, les cellules exprimant la COX-2 synthétisent et relâchent des niveaux plus élevés de prostanoides, le plus souvent des prostaglandines E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), dans le milieu extracellulaire.

La COX-1 et la COX-2 sont très similaires au point de vue de leur structure et partagent tous les acides aminés requis pour la synthèse de la prostaglandine H<sub>2</sub> à partir de l'acide arachidonique emmagasiné dans la membrane cellulaire. Dans leur formes purifiées, ces isoformes démontrent des propriétés catalytiques presque identiques envers le métabolisme de l'acide arachidonique (Barnett, 1994). Cependant, des générations de souris COX-1 et COX-2 déficientes démontrent que ces enzymes ont des rôles séparés et distincts et que ces souris mutantes diffèrent au point de vue de leur phénotype (Lagenbach, 1995 ; Morham, 1995). En effet, dans

les souris COX-2 déficientes (mais pas COX-1 déficientes), de multiples problèmes dans les processus reproducteurs sont observés au cours de l'ovulation, de la fécondation de l'implantation embryonnaire et de la décidualisation (Lim, 1997) indiquant que les PGs jouent un rôle indispensable dans tous ces processus.

### **1.6.3 Les récepteurs de la prostaglandine E<sub>2</sub>**

La PGE<sub>2</sub> engendre ses effets sur les cellules cibles par l'intermédiaire d'interaction avec différentes isoformes de récepteurs transmembranaires couplés à la protéine G. Quatre principaux récepteurs ont été identifiés (EP1, EP2, EP3 et EP4) et ceux-ci induisent parfois des signaux intracellulaires opposés. (Coleman, 1994). Ces récepteurs ayant une action opposée permettent un contrôle homéostatique sur l'action de PGE<sub>2</sub> qui est relâché en grandes concentrations près du site de sa synthèse (Ashby, 1998). Les récepteurs EP1 et EP3 sont couplés à une mobilisation du calcium et à une inhibition de l'adénylate cyclase, respectivement, tandis que EP2 et EP4 sont couplés à une stimulation de l'adénylate cyclase (Negishi, 1995). Actuellement, le rôle des différents récepteurs de la PGE<sub>2</sub> avec leurs effets intracellulaires divergents et leurs gènes cibles respectifs ne sont pas totalement élucidés.

### **1.6.4 La relation entre COX-2 et Akt**

Récemment, il a été démontré que la protéine Akt pouvait directement réguler la transcription du gène de COX-2 (Shao, 2000) suggérant ainsi que le sentier de survie PI 3-K/Akt pourrait directement agir sur la régulation moléculaire des prostaglandines. En effet, la COX-2 est un gène cible de la voie de Akt et il représente un médiateur en aval de cette voie de signalisation oncogénique. Egalement, il a été démontré que la PGE<sub>2</sub> puisse exercer un effet autocrine/paracrine sur les adénocarcinomes endométriaux par l'intermédiaire des récepteurs EP2/EP4 et par l'activation de Akt (Munir, 2000).

### 1.6.5 Les anti-inflammatoires non-stéroïdiens

Les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (NSAIDs) tels que l'aspirine et l'indométacine bloquent directement les COXs et sont utilisés abondamment pour l'étude de la régulation des PGs. De nouvelles molécules sont maintenant disponibles pour inhiber spécifiquement COX-2 (NS398 et SC-58125) (Asselin, 1997). Un dérèglement dans la régulation des PGs peut ainsi entraîner le mauvais fonctionnement cellulaire et mener à une croissance incontrôlée. De récentes études ont démontré que COX-2 était augmenté dans plusieurs types de cancers humains, tels que le cancer du colon, de la prostate, du pancréas, de l'estomac/œsophage, de la peau, des poumons, du col de l'utérus, et du sein (Howe, 2000). Des études épidémiologiques ont aussi démontré que l'utilisation de l'aspirine et autres NSAIDs réduirait l'incidence du cancer du colon de 40-50 % (Thun, 1991 ; Thun 1993 ; Giovannucci, 1995) et une réduction de 40 % des risques pour la cancer du sein (Schreinemachers, 1994 ; Harris, 1996).

### 1.6.6 COX-2, PGE<sub>2</sub> et le cancer

Des études *in vitro* supportent l'idée que la COX-2 et la PGE<sub>2</sub> soient impliquées dans la transformation cellulaire et la carcinogénèse. La surexpression de la COX-2 et la subséquente augmentation de la synthèse de PGE<sub>2</sub> sur des cellules épithéliales de l'intestin de rat ont augmentées leur niveau de prolifération, leur résistance à l'apoptose et leur capacité d'invasion par la suppression de la transcription de gènes cibles qui sont impliqués dans la croissance/transformation cellulaire et dans l'adhésion (Tsuji, 1995). Des études ont démontré que la synthèse et la sécrétion de PGE<sub>2</sub> sont élevées significativement dans des carcinomes utérins comparativement à un utérus normal (Willman, 1976). La COX-2 possède un rôle central en tant que molécule régulatrice de l'angiogénèse tumorale, de la propension métastatique et de l'adhésion cellulaire (Tsuji, 1995, 1998 ; Boolbol, 1996). En effet, il a été proposé que la COX-2 et la PGE<sub>2</sub> accroissent, le développement d'une tumeur et son pouvoir d'invasion en induisant la transcription de facteurs

angiogéniques qui permettent la migration cellulaire. De plus, la surexpression de COX-2 et la synthèse de PGE<sub>2</sub> induisent l'inhibition de l'apoptose et la prolifération cellulaire (Tsujji, 1996). Ainsi, l'augmentation de la COX-2 et la synthèse de PGE<sub>2</sub> peuvent induire des changements néoplasiques sur des cellules par l'intermédiaire de plusieurs voies biologiques. Finalement, des inhibiteurs de la COX-2 (et des oligodeoxynucléotides de COX-2 antisens) ont permis de démontrer qu'ils pouvaient agir contre la tumorigénèse et l'angiogénèse dans des modèles expérimentaux (Dempke, 2001). Ainsi, la COX-2 et ses produits métaboliques sont des cibles de choix pour l'élaboration de stratégies thérapeutiques et chimiopréventives chez les patientes atteintes de cancer.

### **1.7 Le but du travail**

Nous avons récemment développé un modèle original pour nous permettre l'étude de la régulation de PTEN et du chemin de survie PI 3-K/Akt : deux lignées cellulaires cancéreuses endométriales reconnues pour avoir le gène de PTEN muté (RL 95-2 et Ishikawa) et une autre lignée exprimant la protéine PTEN sauvage (HEC 1-A). Ces trois lignées cancéreuses sont comparées entre elles pour la première fois du point de vue de la régulation de PTEN et du chemin de survie PI 3-K/Akt. Dans cette étude, les quatre lignées cellulaires ont été utilisées et comparées pour déterminer l'implication de Akt dans la régulation des COXs et dans le contrôle de la synthèse des PGE<sub>2</sub> dans les cellules cancéreuses endométriales humaines. Ensuite, nous devons établir l'implication du facteur de transcription nucléaire NF- $\kappa$ B et de son inhibiteur I $\kappa$ B dans la régulation des COXs et de déterminer plus précisément les cibles de Akt impliquées dans ce processus.



## **CHAPITRE II**

### **AKT REGULATES COX-2 mRNA AND PROTEIN EXPRESSION IN MUTATED-PTEN HUMAN ENDOMETRIAL CANCER CELLS**

## RÉSUMÉ

Dans le cancer endométrial humain, le quatrième en importance chez la femme, le gène suppresseur de tumeur PTEN est fréquemment muté. Lorsque PTEN est muté, le niveau de phosphorylation de Akt est augmenté activant ainsi le chemin de survie PI 3-K/Akt. De nombreuses études ont démontré que COX-2 est induite de façon inappropriée dans un grand nombre de cancers. COX-2 joue un rôle important dans la tumorigenèse en prenant part à l'angiogenèse, particulièrement via la production de prostaglandines E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). Cette étude a été entreprise pour déterminer l'implication de PI 3-K/Akt dans la régulation des COXs et dans la synthèse de PGE<sub>2</sub>. Pour cette étude, trois lignées cancéreuses de l'endomètre humain ayant PTEN sauvage (HEC 1-A) ou ayant la protéine PTEN mutée inactive (RL 95-2) et Ishikawa) ont été utilisées. Les résultats démontrent que la phosphorylation de Akt est plus élevée dans les cellules ayant PTEN muté. Les études par RT-PCR ont révélé que Akt1 et Akt2 étaient des formes régulées tandis que l'ARN messager de Akt3 était presque indétectable. L'expression de l'ARN messager et les niveaux de protéines de COX-2 sont plus élevés dans les cellules PTEN muté que dans les cellules PTEN sauvages comme le démontrent les analyses par RT-PCR et par Western. La production de PGE<sub>2</sub> est plus importante dans les cellules PTEN mutées qui expriment phospho-Akt et COX-2 comparativement aux cellules PTEN sauvages. L'inhibition de PI 3-K par la Wortmannin et le LY294002 bloque la phosphorylation de Akt et inhibe l'expression de COX-2 dans les cellules ayant PTEN muté. L'inhibition de la phosphorylation de Akt avec des inhibiteurs de PI 3-K spécifiques et la régulation à la baisse de COX-2 augmentent l'apoptose dans les cellules cancéreuses de l'endomètre humain. De plus, les transfections des cellules PTEN mutées avec un vecteur dominant négatif de Akt permettent une régulation à la baisse de COX-2 et activent l'apoptose comme le démontre la coloration nucléaire au Hoechst. À l'opposée, l'activation de Akt en utilisant un vecteur d'expression actif constitutif de Akt permet d'augmenter l'expression de la protéine de COX-2. Une inhibition spécifique de COX-2 par le NS-398 induit l'apoptose dans les cellules exprimant COX-2. Les résultats démontrent que le chemin de signalisation cellulaire PI 3-K/Akt est directement impliqué dans la régulation de COX-2 et dans la synthèse de PGE<sub>2</sub> dans les cellules cancéreuses endométriales.

**AKT REGULATES COX-2 mRNA AND PROTEIN EXPRESSION IN  
MUTATED-PTEN HUMAN ENDOMETRIAL CANCER CELLS<sup>†</sup>**

Marie-Eve St-Germain, Veronique Gagnon, Isabelle Mathieu, Sophie Parent, and  
Eric Asselin\*

Department of Chemistry and Biology, Medical Biology Section, University of  
Quebec at Trois-Rivieres, C.P. 500, Trois-Rivieres, Quebec, Canada G9A 5H7

Short title: Akt and COX-2 in human endometrial cancer.

Key words: Akt, PTEN, apoptosis, prostaglandins, endometrial cancer.

\* Corresponding Author: Eric Asselin, Ph.D.  
Department of Chemistry and Biology  
Medical Biology Section  
University of Quebec at Trois-Rivieres, C.P. 500  
Trois-Rivieres, Quebec, Canada G9A 5H7  
E-mail: [Eric\\_Asselin@uqtr.ca](mailto:Eric_Asselin@uqtr.ca)

<sup>†</sup> This work has been supported by a grant from the Fond de la Recherche en Sante  
du Quebec (FRSQ). Eric Asselin is a FRSQ scholar.

## ABSTRACT

In human endometrial cancer, the fourth most common cancer in women, tumor suppressor phosphatase tensin homologue (PTEN) is frequently mutated. In the presence of a mutated PTEN protein, Akt phosphorylation levels are increased leading to the activation of this survival pathway. Numerous studies indicated that COX-2 is inappropriately induced and up-regulated in a number of malignant cancer cells. COX-2 plays an important role in tumor cell biology, taking part actively in angiogenesis particularly via the production of prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). The present study was undertaken to determine the involvement of PI 3-K/Akt pathway in the regulation of COXs expression and PGE<sub>2</sub> synthesis. Three different human endometrial cancer cell lines known to have wild type PTEN (HEC 1-A) or a mutated inactive PTEN protein (RL 95-2 and Ishikawa) were used for these studies. Results showed that Akt phosphorylation was high in mutated PTEN cells. RT-PCR studies revealed that Akt1 and Akt2 were the regulated forms whereas Akt3 mRNA was nearly undetectable. COX-2 mRNA expression and protein levels were high in these cells compared to wild-type PTEN cells as demonstrated by RT-PCR and Western analysis respectively. PGE<sub>2</sub> production was higher in mutated-PTEN expressing phospho-Akt and COX-2 compared to wild type PTEN cells. Inhibition of PI 3-K with Wortmannin and LY294002 blocked Akt phosphorylation and inhibited expression of COX-2 in mutated-PTEN cells. Inhibition of Akt phosphorylation with specific PI 3-K inhibitors and down-regulation of COX-2 increased apoptosis in human endometrial cancer cells. Likewise, transfection of mutated-PTEN cells with a dominant negative Akt vector, resulted in COX-2 down-regulation and activation of apoptosis, as demonstrated by Hoechst nuclear staining. On the opposite, activation of Akt using a constitutively active expression vector, resulted in the up-regulation of COX-2 protein expression. Specific inhibition of COX-2 with NS-398 induced apoptosis in COX-2 expressing human endometrial cancer cells. It is concluded that the PI 3-K/Akt survival pathway is involved in the regulation of COX-2 and PGE<sub>2</sub> synthesis in human endometrial cancer cells.

## INTRODUCTION

Cyclooxygenase (COX) is the rate-limiting enzyme involved in the biosynthesis of prostaglandins (PG) and exists in two isoforms: COX-1 (constitutively expressed) and COX-2 (the regulated isoform). Cyclooxygenase-2 (COX-2) up-regulation has been found in several type of cancers such as colon carcinomas (1), cervix (2), head and neck (3), bladder (4), pancreas (5), stomach (6), prostate (7) and breast (8). It is believed that COX-2 and PGs, particularly PGE<sub>2</sub>, may be key elements in the evolution of tumor transformation and malignancy. Epidemiological studies showed that nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) can be used for cancer prevention (9). There is a 40-50% reduction in the relative risk of colorectal cancer and colorectal cancer-associated mortality in individuals taking NSAIDs (10-12). Inhibition of COX-2 activity is thought to represent one of the mechanisms by which NSAIDs exert their anti-neoplastic effects (13). Additionally, it has been shown that COX-2 expression in colorectal carcinoma cells provides a growth and survival advantage and increases tumor cell invasiveness (see (8) for a review). In the endometrium, prostaglandins, particularly PGE<sub>2</sub>, are secreted locally in response to various stimuli and are responsible for decidualization processes occurring at the time of embryo implantation (14). During this physiologic situation, PGE<sub>2</sub> plays a key role by inducing vasodilatation, increasing vascular permeability and may be involved in immunosuppression processes (15). Recently, Uotila *et al.* have shown that the expression of the inducible COX-2 but not of COX-1 is stimulated in the glandular epithelium of proliferative endometrium and in cancer cells of human endometrial adenocarcinoma, in particular in cells surrounding carcinomas and spreading into lymphatic vessels (16). Additionally, more evidences suggest that COX-2 is highly express in a broad series of primary endometrial tumors and its expression may be associated closely with parameters of tumor aggressiveness (17).

Akt is a serine/threonine protein kinase originally discovered as the cellular counterpart of the v-Akt transforming protein of a retrovirus (AKT8) causing T cell lymphomas in mice (18) and is also known as protein kinase B or Rac (19-21). Akt is an inactive cytosolic protein recruited to the plasma membrane, and activated by phosphorylation at threonine 308 and serine 473 in response to growth factors or cytokines (22-24) via the product of phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-K), phosphatidylinositol 3,4,5-

triphosphate (PIP<sub>3</sub>). Upon phosphorylation, Akt 1) phosphorylates and blocks the action of several pro-apoptotic proteins such as Bad (23), and 2) blocks cytochrome C release from the mitochondria through the regulation of Bcl-2 (25). In a number of different cancers, the tumor suppressor phosphatase tensin homologue (PTEN, a lipid phosphatase) is frequently mutated. PTEN mutations have been found in several types of endometrial cancer (26-29). PTEN dephosphorylates PIP<sub>3</sub> into inactive PIP<sub>2</sub> which blocks Akt activation.

We have used an original model to study the regulation of PTEN and the PI 3-K/Akt survival pathway: two endometrial cancer cell lines known to have a mutated-PTEN gene (RL-95-2 (30) and Ishikawa (31)) and one cell line expressing a wild type PTEN protein (HEC 1-A(32)). In the present study, the three cell lines were used and compared to determine involvement of Akt in the regulation of COXs and PGE<sub>2</sub> synthesis in human endometrial cancer cells. Our results demonstrate that expression of COX-2 is up-regulated in human endometrial cancer cells expressing phospho-Akt.

## MATERIALS AND METHODS

**Reagents.** Wortmannin, LY294002, MTT (3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) and Hoechst 33258 were obtained from Sigma (St. Louis, MO). NS-398 was obtained from Cedarlane Laboratories (Hornby, ON). DMEM-F12, Mc Coy's, FBS serum and PCR primers were purchased from Invitrogen (Burlington, ON). Anti-human PhosphoPlus Akt (Ser473), Akt, PhosphoPlus Bad, Bad and cleaved caspase-3 antibodies were obtained from New England Biolabs (Mississauga, ON) and anti-human COX-1 and COX-2 were obtained from Cedarlane Laboratories (Hornby, ON). Secondary horse radish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit antibody was purchased from BioRad (Mississauga, ON). Dominant negative (DN) and constitutively active (CA) Akt vectors were generously provided by Dr Zhenguo Wu, Hong Kong University of Science and Technology.

**Cell culture.** Human endometrial cancer cells (HEC 1-A and RL 95-2) were obtained from ATCC. Ishikawa cells were generously provided by Dr Sylvie Mader, Université de Montréal, Canada and HeLa cells generously provided by Dr Michel Vincent,

Université Laval (QC, Canada). Cells were cultured in 75 cm<sup>2</sup> bottles at 37°C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. Ishikawa and HeLa cells were maintained in DMEM-F12 supplemented with 2.438 g/L of NaHCO<sub>3</sub>, FBS (10%) and gentamycin (50 µg/ml). HEC 1-A cells were grown in Mc Coy's supplemented with 2.2 g/L of NaHCO<sub>3</sub>, FBS (10%) and gentamycin (50 µg/ml). RL 95-2 were cultured in DMEM-F12 supplemented with 1.75 g/L of NaHCO<sub>3</sub>, HEPES (5 µM), insulin (2.5 µg/ml), FBS (10%) and gentamycin (50 µg/ml). 1x10<sup>6</sup> cells were plated in log growth phase onto 6 wells plates for 24 hrs in the above culture medium prior to initiation of treatment. Wortmannin and LY294002 doses (50 µg/ml) and 24 hours time were chosen following dose-responses and time-course preliminary studies.

**Transfections.** Cells were plated at a density of 4 X 10<sup>5</sup> cells/well in six-well plates 24 hours before transfection as shown previously (33). RL 95-2 cells were efficiently transfected with DN-Akt. However, RL 92-2 cells were difficult to transfect using CA-Akt vector and Hela cells (a well known and characterized type of uterine cervical cancer cell line) were used. Transient transfection of the cells was carried out with 1 µg of DNA/well using Effectene (Qiagen, Mississauga, ON), according to the protocol suggested by the manufacturer. Empty vector was used as the transfection control. Transfection efficiencies were determined by Western analysis using an anti-Akt antibody.

**MTT proliferation assay.** Cells were plated at a density of 2 X 10<sup>4</sup> cells/well in 96-wells plates 24 hours before the assay. Cells were cultured for 72 hrs in the presence of different concentrations of NS-398 (0; 1.5625; 3.125; 6.25; 12.5; 25; 50 and 100 µM in DMSO). At the end of the culture period, 10 µl of MTT (5 mg/ml) was added to each well. After 4 hours of incubation with MTT, 100 µl of solubilization solution was added (10% SDS in 0.01M HCl) and the microplate was incubated overnight (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). The OD was read with Microplate Manager (ELISA) between 550 and 600 nm.

**Hoechst staining.** Following treatment, both floating and attached cells were resuspended in PBS containing Hoechst 33258 for 24 hours at 4°C. Hoechst nuclear staining was viewed and photographed using a Olympus BX60 fluorescence microscope and a Coolsnap-Pro CF digital Camera (Carsen Group, ON). Cells with

typical apoptotic nuclear morphology (nuclear shrinkage, condensation and fragmentation) were identified and counted, using randomly selected fields on numbered photographic slides, of which the “counter” was not aware of the treatment, so as to avoid experimental bias. A minimum of 200 cells per treatment group were counted in each experiment and results are presented as a percentage of apoptotic cells/non-apoptotic cells.

#### **Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nick end-labeling (TUNEL)**

Cells (floating and attached) were pooled, placed on a positively charged microscope slide, dried and rinsed with PBS. Slides were incubated with proteinase K (20 µg/ml) for 30 min at room temperature. Slides were washed twice with PBS and endogenous peroxidase was inactivated with 0.3 % hydrogen peroxide in methanol for 30 min. Slides were rinsed with buffer and incubated with 10 mM citrate solution for two minutes on ice. Then, tissue sections were rinsed with PBS and incubated with TdT labelling reaction (In Situ Cell Death Detection, POD, Roche) for 30 min at 37 °C in humidified environment. Slides were washed three times in PBS and tissue sections were blocked with BSA 3% for 20 min at room temperature. Converter-POD solution was added and incubated 30 min at 37 °C in humidified environment. Slides were washed 5 min in PBS and color development was achieved by incubation using DAB substrate. Cells were finally counterstained with hematoxylin. Negative control was performed using the same protocol without TdT enzyme. TUNEL positive cells were counted as described with the Hoechst nuclear staining assay.

**Protein extraction and Western analysis.** Cells (both floating and attached) were trypsinized, lysed in lysis buffer (PBS 1X pH 7.4; 1% Nonidet P-40; 0.5% Sodium deoxycholate; 0.1% SDS; Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche)), frozen and thawed three times, and centrifuged (13000 X g, 20 min at 4°C) to remove insoluble material. Supernatant was recovered and stored at -20°C pending analysis. Protein content was determined with the Bio-Rad DC Protein Assay. Protein extracts (50 µg) were heated (95°C, 3 min), resolved by 10% SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and electro-transferred to nitrocellulose membranes (15 V, 30 min) using a semi-dry transfer (Bio-Rad, Mississauga, ON). Membranes were then blocked (2 hrs, RT) with PBS containing 5% milk powder, then incubated with anti-



COX-1 (1:1000), anti-COX-2 (1:1000), anti-Akt (1:1000), anti-Phospho-PKB/Akt (1:250), anti-Bad (1:500), or anti-Phospho-Bad (1:500) antibody (overnight, 4°C), and subsequently with Horse radish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit secondary antibody (1:3000; RT, 45 min) or with HRP-conjugated anti-Mouse secondary antibody for the anti-COX-1 antibody. Peroxidase activity was visualized with the ECL kit (Amersham, Arlington Heights, IL), according to the manufacturer's instructions.

**Semi-quantitative RT-PCR analyses.** In order to measure abundance of COX-1 and COX-2 mRNA, primers were chosen as described below and tested with different primer concentrations and different cycles to avoid mRNA amplification near plateau and saturation. Total RNA (0.2 µg/µl) was used for preparation of first strand cDNA by reverse transcriptase (RT). The RNA samples were incubated (65°C, 10 min) with 2 :l oligo dT (deoxythymidine) primers in a final volume of 10 :l. Samples were then incubated (37°C, 60 min) in 20:l of a reaction buffer (1X) containing dithiothreitol (DTT; 100 mM), deoxynucleotide triphosphates (dNTPs; 5 mM) and Muloney murine leukemia virus reverse transcriptase (MMLV-RT; 200 U). The reaction volumes were brought up to 60:l with autoclaved water. A negative control was also included, using the same reaction mixture but without MMLV-RT to show any contaminating genomic DNA in the RNA template.

Human COX-1 mRNA was amplified using sense primer 5'-TACTCACAGTGCGCTCCAAC-3' and antisense primer 5'-GCAGGAAATAGCCACTCAGC-3'. For COX-2 mRNA, primers sequences were 5'-TCCAGATCACATTTGATTGACA-3' (sense) and 5'-TCTTTGACTGTGGGATACA-3' (antisense). Each reaction mixture (final volume, 50 :l) contained 1X Buffer, RT template or negative control (5:l), MgCl<sub>2</sub> (50 mM), dNTPs (5 mM), primers (pM; 2,5 :l each) and Taq polymerase (5 U/µl). The PCR cycling conditions (30 cycles) chosen were 1 min at 94°C, 1 min at 65°C (COX-1) and 63°C (COX-2), and 1 min at 72°C, followed by a 5 min extension at 72°C. Reaction products were analysed on 1.0% agarose gels. Bands were visualized by ethidium bromide staining. PCR fragments were cloned and sequenced to confirm the corresponding sequence.

**PGE<sub>2</sub> enzyme immunoassay.** The procedures for PGE<sub>2</sub> EIA kit (Cayman) described by the manufacturer was followed. Briefly, a 50- $\mu$ l aliquot from culture medium obtained during experimentation is used for PGE<sub>2</sub> determination in a 96-well plate coated with goat anti-rabbit secondary antibody. A volume of 50  $\mu$ l of PGE<sub>2</sub> tracer and 50  $\mu$ l of the PGE<sub>2</sub> antibody were added to each sample and the plates were incubated overnight at 4°C. Then, wells were washed with 10 mM phosphate buffer (pH 7.4) containing Tween 20 (0,05%) at pH 7.4 ; 200  $\mu$ l of Ellman's reagent (69 mM acetylthiocholine and 54 mM 5,5'-dithio-bis[2-nitrobenzoic acid] in 10 mM phosphate buffer, pH 7.4) was added to each well, and samples were incubated in the dark at room temperature. This allows the bound enzyme tracer to react with Ellman's reagent to yield a yellow solution that can be measured photometrically with a microplate reader at 410 nm. A standard curve was developed simultaneously with standards ranging from 50 to 1000 pg/ml PGE<sub>2</sub>. The presence of PGE<sub>2</sub> was undetectable in the culture media in the absence of cells.

**Statistical analysis.** All experiments were repeated at least six times. Data were subjected to one-way ANOVA or student t test (PRISM software version 4.0; GraphPad, San Diego, CA). Differences between experimental groups were determined by the Tukey's test.

## RESULTS

**Akt is constitutively phosphorylated in mutated-PTEN human endometrial cancer cells.** Western blot analysis revealed and confirmed that PTEN was expressed predominantly in wild-type HEC 1-A cells (Fig.1). As hypothesized, Akt phosphorylation signal was strong in mutated-PTEN human endometrial cancer cells (33). Akt phosphorylation was absent in HEC 1-A cells. Further analysis revealed that Akt3 was not expressed in these cell lines whereas Akt1 and Akt2 were the regulated isoforms as demonstrated by RT-PCR studies (Fig.1B). In order to demonstrate and confirm the activity of Akt in mutated-PTEN cells, Bad protein, a well known Akt target following its activation, was analyzed by Western analysis using a phospho-specific antibody. Total Bad protein was present in the three cell lines studied (Fig.1C).

As hypothesized, Bad phosphorylation was observed only in mutated-PTEN cells expressing phospho-Akt.

**COX-2 gene and protein expression is elevated in phospho-Akt expressing cells.**

COX-2 mRNA expression and protein levels were high in mutated-PTEN human endometrial cancer cells compared to wild-type PTEN HEC 1-A cancer cell line (Fig.2). Interestingly, COX-1 protein level was opposite to levels of COX-2 where HEC 1-A showed a strong expression of COX-1 and low levels of COX-2. PGE<sub>2</sub> production was higher in cells expressing phospho-Akt and COX-2 when compared to wild-type PTEN human endometrial cancer cells (Fig.2C).

**Inhibition of Akt in mutated-PTEN human endometrial cancer cells causes a down-regulation of COX-2 gene and protein expression.**

Inhibition of PI 3-K activity with Wortmannin and LY294002 completely blocked Akt phosphorylation and decreased COX-2 mRNA and protein expression in mutated-PTEN cells (RL 95-2 and Ishikawa; Fig. 3 and Fig. 4 respectively). Furthermore, inhibition of Akt phosphorylation with specific PI 3-K inhibitors and the consequential down-regulation of COX-2 mRNA resulted in stimulation of apoptosis in human endometrial cancer cells as demonstrated by Hoechst nuclear staining and the presence of caspase-3 cleaved fragments (Fig. 3E and Fig. 4E). Interestingly, Akt protein was down-regulated in RL 95-2 cells only in the presence of PI 3-K inhibitors indicating that Akt may be a possible candidate for caspase cleavage as demonstrated previously in other cancer cell lines (34). To confirm that Akt phosphorylation is decreased before the initiation of apoptosis induction, the presence of cleaved caspase-3 fragments were measured by western analysis 6 hours after initiation of treatment with PI 3-K inhibitors (Fig.5). After 6 hours PI 3-K inhibitors treatment, cleaved caspase-3 fragments were almost not detectable when compared to the 24 hours treatment (Fig. 3 and Fig. 4).

**Dominant negative Akt transfection results in down-regulation of COX-2 gene expression and stimulation of apoptosis in mutated-PTEN human endometrial cancer cells.**

To further characterize the relationship between Akt and COX-2 gene/protein expression, dominant negative (DN) Akt expression vector was transfected in RL95-2 cell line expressing phospho-Akt (Fig. 6). Transfection of DN-Akt increased total Akt protein and decreased Akt phosphorylation. Decrease of Akt activity resulted

in the down-regulation of both COX-2 mRNA and protein. Furthermore, DN-Akt transfection induced apoptosis in RL95-2.

**Constitutively active Akt transfection up-regulates COX-2 expression.** To further confirm the relationship between Akt and COX-2 expression, a “gain-of-function” experiment was conducted using a constitutively active (CA) Akt expression vector which was transfected in the well known and characterized HeLa cell line (Fig. 7). CA-Akt transfection induced Akt phosphorylation and activity (which was confirmed by the increased Bad protein phosphorylation using a phospho-specific antibody and Western analysis). As hypothesized, CA-Akt transfection induced COX-2 expression.

**Specific inhibition of COX-2 induces apoptosis in human endometrial cancer cells expressing phospho-Akt.** To test if COX-2 is directly involved in the regulation of endometrial cell survival, phospho-Akt expressing human endometrial cancer cells (RL 95-2 and Ishikawa) and phospho-Akt negative cells (HEC 1-A) were cultured in the presence of different concentrations of specific COX-2 inhibitor (NS-398) for 72 hrs (Fig. 8). NS-398 significantly reduced cell proliferation in a concentration-dependent manner in the three cell lines studied. However, apoptosis was induced only in COX-2 expressing RL 95-2 and Ishikawa cells as demonstrated by Hoechst nuclear staining and TUNEL analysis. Western blot analysis of Akt phosphorylation confirmed that NS-398 reduced phospho-Akt in both mutated PTEN cell lines (Fig. 8D).

## DISCUSSION

Survival is one mechanism by which cancer cells exert their pleothropic properties. Activation of the PI 3-K/Akt pathway is one example of cell survival mechanism. Activation of Akt through PI 3-K leads to the activation of several proliferation and survival pathways such as eNOS (35,36), NF- $\kappa$ B (37), and/or the inhibition of different apoptotic mediators such as Bad (38), forkhead (39,40), GSK-3 $\beta$  (41,42), and caspase-9 (43). PTEN is a crucial phosphatase involved in the regulation of Akt phosphorylation: the presence of an active PTEN protein blocks Akt phosphorylation by the dephosphorylation of PI 3-K product, PIP3 (44). In the presence of a mutated-PTEN protein, activation of Akt generally occurs constitutively. We have demonstrated that Akt is constitutively phosphorylated/activated in two mutated-PTEN human endometrial cancer cell lines that have been used in the present study (RL 95-2 and Ishikawa). Whereas, phosphorylation of Akt was absent in one wild-type PTEN cell line (HEC 1-A).

The results of the present study clearly support our hypothesis in regard to Akt activity and COX-2 mRNA gene and protein expression and support the relation between Akt and COX-2 shown in recent studies using different cell types (45,46). Indeed, our results demonstrate that COX-2 mRNA and protein expression are elevated in mutated-PTEN human endometrial cancer cells and that levels of PGE<sub>2</sub> production are high in these two cell lines. On the opposite in wild-type PTEN HEC 1-A cells, Akt phosphorylation was absent and results showed that COX-2 expression and PGE<sub>2</sub> synthesis were low compared to mutated-PTEN cells. Interestingly, COX-1 mRNA and protein showed an opposite pattern of expression to the one observed with COX-2. Although COX-1 mRNA expression was observed in cell lines expressing phospho-Akt (RL 95-2 and Ishikawa), COX-1 protein was weakly detectable indicating that a possible regulation at the translational level may be involved. However, as opposed to COX-2 mRNA and protein, COX-1 was highly expressed in phospho-Akt negative and wild type-PTEN HEC 1-A cell line. These observations suggest that presence of active/phosphorylated Akt may directly or indirectly via other molecules or transcription factors regulate COX-2 gene expression, whereas phospho-Akt may exert inhibitory effects on COX-1 mRNA translation. The precise importance of Akt versus COX-1 regulation is currently under investigation.

To further demonstrate involvement of PI 3-K/Akt survival pathway in the regulation of COX-2 mRNA and protein expression, PI 3-K specific inhibition studies were carried out using cells expressing phospho-Akt (RL 95-2 and Ishikawa). As hypothesized, Akt phosphorylation decreased in RL 95-2 and Ishikawa in response to PI 3-K inhibitors, down-regulation of both COX-2 mRNA and protein expression. Furthermore, the presence of PI 3-K inhibitors in RL 95-2 and Ishikawa cells induced apoptosis. However, PI 3-K inhibitors had no effect in HEC 1-A cells suggesting that PI 3-K activity is directly responsible for Akt phosphorylation and regulation of COX-2 and PGE<sub>2</sub> production in RL 95-2 and Ishikawa cells. Although results demonstrate that PGE<sub>2</sub> accumulation after 72 hours of culture is higher in phospho-Akt expressing cells compared to HEC 1-A cells, levels remained relatively low. It was surprising to find such low levels in endometrial cancer cells and this may be due to a higher 15-prostaglandin dehydrogenase catabolism activity in these cells.

Recently, it has been shown that in contrast to Akt1 and Akt2, which bind to all members of the proto-oncogene TCL1 family, Akt3 specifically interacts with TCL1 but not with MTCPI or TCL1b (47) indicating that Akt3 phosphorylation may be regulated in a different fashion compared to Akt1 and Akt2. Because Akt3 was not expressed in these three cell lines, it is unlikely that Akt3 may be involved in COX-2 and prostaglandin biosynthesis. Because Akt1 and Akt2 are expressed in these cell lines, it is possible that members of the proto-oncogenes TCL1 family may be involved in this process and further analysis will be necessary to answer this specific question.

In order to determine a direct relationship between Akt and COX-2 gene expression, and to further confirm the importance of Akt in this process, transfection studies were carried out using dominant negative (DN) Akt and constitutively active (CA) expression vectors. As demonstrated with PI 3-K inhibition studies, DN-Akt transfections resulted in the down-regulation of COX-2 expression and stimulation of apoptosis in mutated-PTEN RL 95-2 cells indicating that Akt is responsible for the regulation of COX-2 gene expression. Unfortunately, Ishikawa cells were difficult to transfect using several transfection reagents and were not used for these studies. On

the opposite, because HEC 1-A cells were also difficult to transfect, the well known, characterized and easy to transfect HeLa cell were used to conduct the “gain-of-function” study using CA-Akt transfection vector. As hypothesized, CA-Akt transfection induced COX-2 expression and confirmed the results obtained with DN-Akt inhibition and PI 3-K inhibition studies. Overall, these studies demonstrate that high levels of phospho-Akt and COX-2 found in mutated-PTEN cell lines is not coincidental. These results further suggest that Akt may be a good target for gene therapy in endometrial cancers.

We have recently demonstrated that X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) over-expression induced Akt phosphorylation in human ovarian surface epithelial cancer cells (34) and rat granulosa cells (48) and a similar mechanism may be involved to bypass PI 3-K in the regulation of Akt phosphorylation. We have also showed that Akt is a direct target for caspase-3 degradation (34). Caspase-3 activation is a result of apoptosis triggering. A similar situation may be responsible in mutated-PTEN cells (Fig. 3 and 4) for the decrease of total Akt protein in the presence of PI 3-K inhibitors and induction of apoptosis. Whether unknown molecules or specific inhibitor of apoptosis proteins such as XIAP are involved in this process remain to be elucidated.

COX-2 gene has been shown to be regulated at the promoter level by NF- $\kappa$ B (49). Since Akt phosphorylation leads to activation of NF- $\kappa$ B (37), a similar situation may be responsible in phospho-Akt expressing RL 95-2 and Ishikawa human endometrial cancer cell lines used in the present study. Recent evidences also suggest that CCAAT/enhancer-binding protein beta (C/EBP $\beta$ ), a transcription factor, is involved downstream Akt activation pathway (50-52). Studies have demonstrated that C/EBP $\beta$  is an essential transcription factor for COX-2 gene regulation (53,54) indicating that activation of C/EBP $\beta$  by Akt may be in part responsible for COX-2 gene expression. Another study showed that inactivation of GSK-3 $\beta$  through activation of Akt plays an important role in the UVB induction of COX-2 transcription (55). Thereby, C/EBP $\beta$ , NF- $\kappa$ B and GSK-3 $\beta$  may be three different targets following Akt phosphorylation to activate cell survival through COX-2 gene expression and PGE<sub>2</sub> secretion.

Specific COX-2 inhibition with NS-398 significantly decreased proliferation of RL 95-2, Ishikawa and surprisingly, HEC 1-A cells. However, apoptosis was induced only in COX-2 and phospho-Akt expressing cells. It is possible that NS-398 concentration may have been sufficient to inhibit low levels of COX-2 in HEC 1-A cell line without inducing apoptosis. Celecoxib, a specific COX-2 inhibitor, has been shown also to induce apoptosis in a PI3-K/Akt dependent manner in colon (56) and prostate (57) cancers. The present study show that NS-398 also induce apoptosis in a PI 3-K/Akt dependent manner. In several animal models, treatments with selective COX-2 inhibitors result in a decrease in tumor growth (58-61). These observations suggest that COX-2 expression is a key element in tumor progression and proliferation. Furthermore, available results indicate that COX-2 may be an important target for prevention and/or therapy for endometrial cancers. COX-2 has been shown to contribute to tumorigenesis and the malignant phenotype of tumor cells by different mechanisms, including: (1) inhibition of apoptosis; (2) increased angiogenesis; (3) increased invasiveness; (4) modulation of inflammation/immuno-suppression; and (5) conversion of procarcinogens to carcinogens (see (13) for a review). A clear positive correlation between COX-2 expression and inhibition of apoptosis has been established, associated with increased PGE<sub>2</sub> levels resulting in modulation of pro- and anti-apoptotic factors such as Bcl-2 (62). Furthermore, PGE<sub>2</sub> treatment has been shown to induce Akt phosphorylation and COX-2 gene expression in a human endometrial cancer cell line HEC 1-B (63), indicating a possible double regulation at the PGE<sub>2</sub> receptor level and through the activation of PI 3-K/Akt survival pathway.

In summary, the present study demonstrates a crucial role for Akt in the regulation of COX-2 gene and protein expression in human endometrial cancer cells. Importance of COX-2 and PGE<sub>2</sub> in cancer cell transformation and tumor progression has been clearly demonstrated in several types of cancers and this study is the first to link Akt survival pathway to COX-2 expression in endometrial cancers. The present results further suggest that Akt and COX-2 may be excellent candidate for gene therapy in endometrial cancers. Further studies on NF- $\kappa$ B, GSK-3 $\beta$  and C/EBP $\beta$  activation/phosphorylation will provide more insight into the complex mechanisms by which Akt regulates COX-2 gene expression in human endometrial cancer cells.



## FIGURE LEGENDS

- Figure 1 Akt, Phospho-Akt PTEN protein and mRNA abundance in wild-type PTEN cells (HEC 1-A) and mutated-PTEN cells (RL 95-2, Ishikawa) as determined by Western analysis and RT-PCR respectively (panels A and B).  $\beta$ -actin was used as control to correct for loading. Blots are representative of 6 different experiments. C) Bad and Phospho-Bad activity. Results represent mean  $\pm$  SEM of 6 different experiments. Columns with different superscript are significantly different ( $p < 0.05$ ).
- Figure 2 Expression of COXs mRNA and protein in human endometrial cancer cells. A) RT-PCR analysis for COX-1 and COX-2 mRNAs in HEC 1-A, RL 95-2 and Ishikawa cells. B) Western analysis of COX-1 and COX-2 proteins.  $\beta$ -actin was used as control to correct for loading in each lane. Graphics represents RT-PCR and Western blots densitometrical analysis (mean  $\pm$  SEM of 6 different experiments). Densitometric analysis were performed using BIO RAD gel doc system and are presented as a ratio (value/ $\beta$ -actin). C) Level of PGE<sub>2</sub> as measured by enzyme immuno assay (EIA). Results represent mean  $\pm$  SEM of 8 different experiments. Columns with different superscript are significantly different ( $p < 0.05$ ).
- Figure 3 Effect of PI 3-K inhibitors in RL 95-2 cells. Effect of LY294002 and Wortmannin on Akt (A), Phospho-Akt (B) and COX-2 (C) protein abundance as determined by Western analysis. D) Effect of LY 294002 and Wortmannin on COX-2 mRNA expression as determined by RT-PCR. (A-D)  $\beta$ -actin was used as control to correct for loading. Densitometric analyses were performed using BIO RAD gel doc system and are presented as a ratio (value/ $\beta$ -actin). E) Effect of PI 3-K inhibitors in RL 95-2 cells apoptosis induction.  $2 \times 10^6$  cells were plated for 24 h and cultured in the presence of medium and LY294402 or Wortmannin. Cells were trypsinized, pooled with floating cells and collected for Hoechst

nuclear staining to count apoptotic cells. Data represent the mean  $\pm$  SEM of 4 independent experiments. Cleaved caspase-3 Western analysis appears on right. F) Representative micrographs showing Hoechst nuclear staining in response to treatments.

\*  $p < 0.05$  compared to control.

**Figure 4** Effect of PI 3-K inhibitors in Ishikawa cells. Effect of LY294002 and Wortmannin on Akt (A), Phospho-Akt (B) and COX-2 (C) protein abundance as determined by Western analysis. D) Effect of LY 294002 and Wortmannin on COX-2 mRNA expression as determined by RT-PCR. (A-D)  $\beta$ -actin was used as control to correct for loading. Densitometric analyses were performed using BIO RAD gel doc system and are presented as a ratio (value/ $\beta$ -actin). E) Effect of PI 3-K inhibitors in Ishikawa cells apoptosis induction.  $2 \times 10^6$  cells were plated for 24 h and cultured in the presence of medium and LY294402 or Wortmannin. Cells were trypsinized, pooled with floating cells and collected for Hoechst nuclear staining to count apoptotic cells. Data represent the mean  $\pm$  SEM of 4 independent experiments. Cleaved caspase-3 Western analysis appears on right. F) Representative micrographs showing Hoechst nuclear staining in response to treatments.

\*  $p < 0.05$  compared to control.

**Figure 5** Effect of PI 3-K inhibitors in RL 95-2 (A) and Ishikawa (B) cells on COX-2 protein expression.  $\beta$ -actin was used as control to correct for loading. Densitometric analyses were performed using BIO RAD gel doc system and are presented as a ratio (value/ $\beta$ -actin).  $2 \times 10^6$  cells were plated for 6 h and cultured in the presence of medium ("C" for control) and LY294402 (LY) or Wortmannin (W). Data represent the mean  $\pm$  SEM of 4 independent experiments. Cleaved caspase-3 Western analysis appears on right.

\*  $p < 0.05$  compared to control.

Figure 6 Effect of dominant negative Akt on COX-2 mRNA and protein expression. Mutated-PTEN RL 95-2 cells were transfected with Akt dominant negative (DN) vector or control vector and Akt protein (A), phospho-Akt (B), COX-2 protein (C) and mRNA (D) levels were measured by Western analysis and RT-PCR respectively. E) Cells were trypsinized, pooled with floating cells and collected for Hoechst nuclear staining to count apoptotic cells. F) Representative micrographs showing Hoechst nuclear staining in response to transfection. Data represent the mean  $\pm$  SEM of 4 independent experiments.

\*  $p < 0.05$  compared to control.

Figure 7 Effect of constitutively active Akt on COX-2 mRNA and protein expression. HeLa cells were transfected with Akt constitutively active (CA) vector or control vector and Akt protein (A), phospho-Akt (B), phospho-Bad (C) and COX-2 (D) protein levels were measured by Western analysis. Data represent the mean  $\pm$  SEM of 4 independent experiments.

\*  $p < 0.05$  compared to control.

Figure 8 Effect of NS-398 on human endometrial cancer cell proliferation.  $2 \times 10^4$  cells were plated for 24 h and cultured for 72 h in culture medium containing increasing doses of NS-398. A) MTT proliferation assay was performed and optical density were obtained using a microplate reader. B) Cells were trypsinized, pooled with floating cells and collected for Hoechst nuclear staining to count apoptotic cells. C) Cells were trypsinized, pooled with floating cells and collected for TUNEL assay to count apoptotic cells. Data represent the mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments. D) Western analysis representing Akt phosphorylation status in the presence of NS-398.  $\beta$ -actin was used as control to correct for loading.

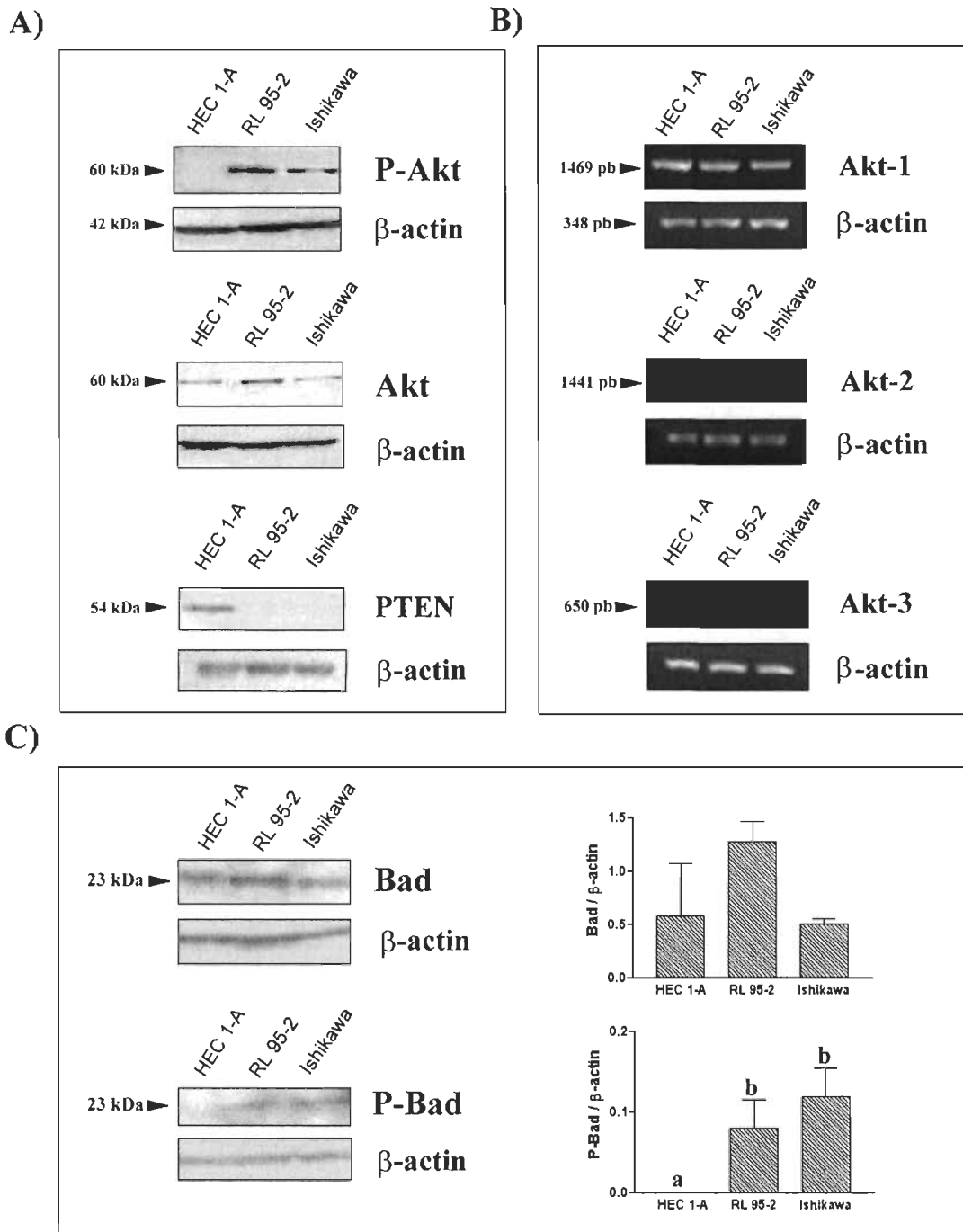
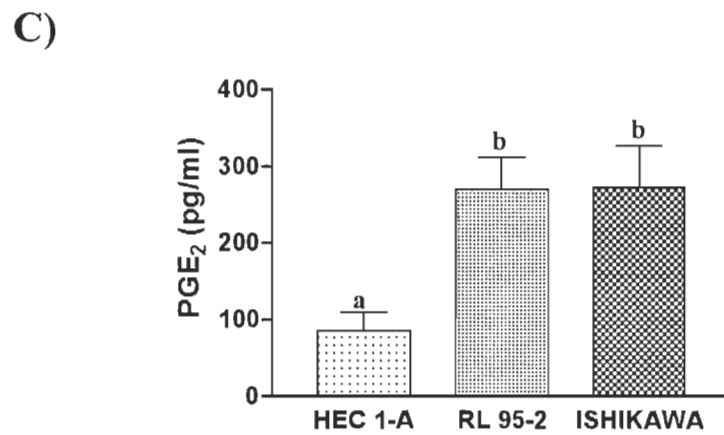
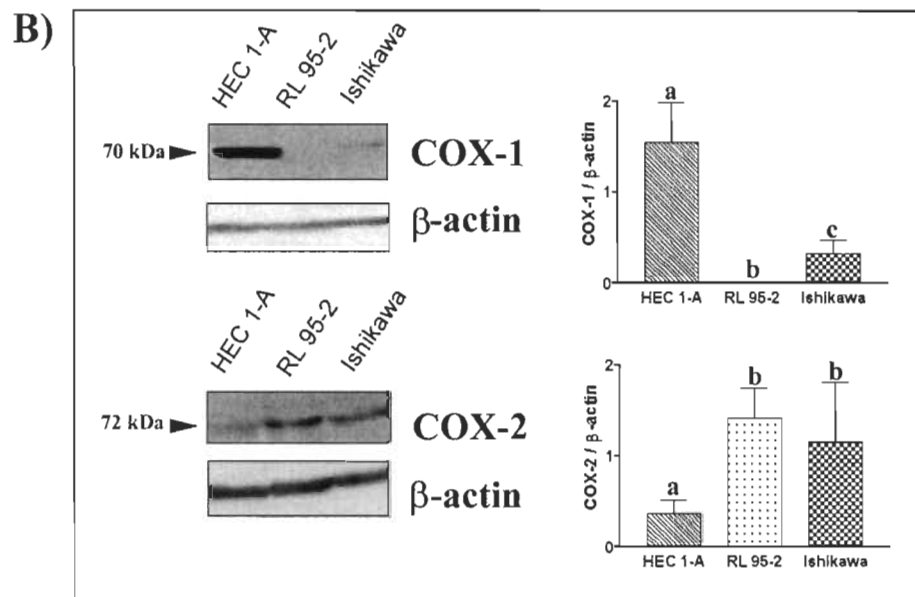
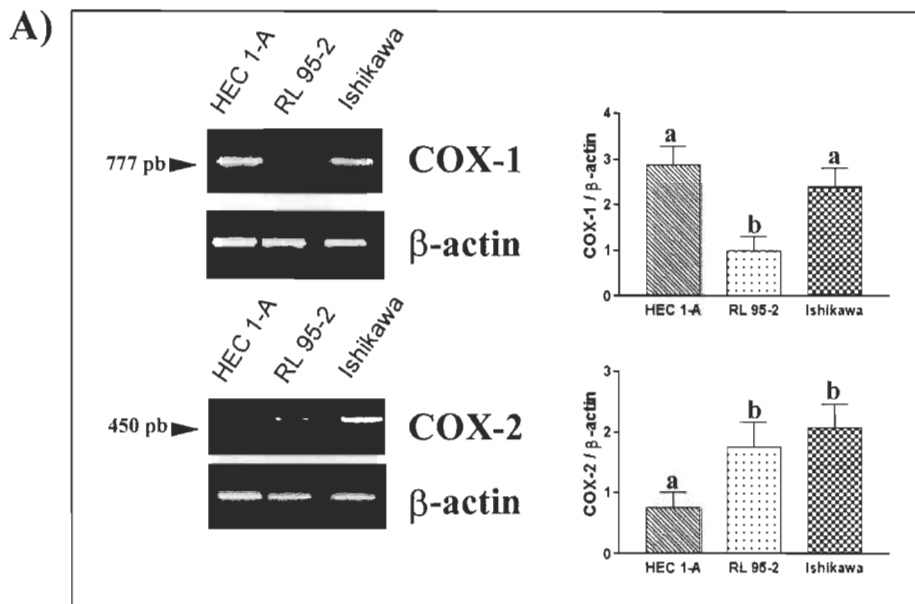


Figure 1



**Figure 2**

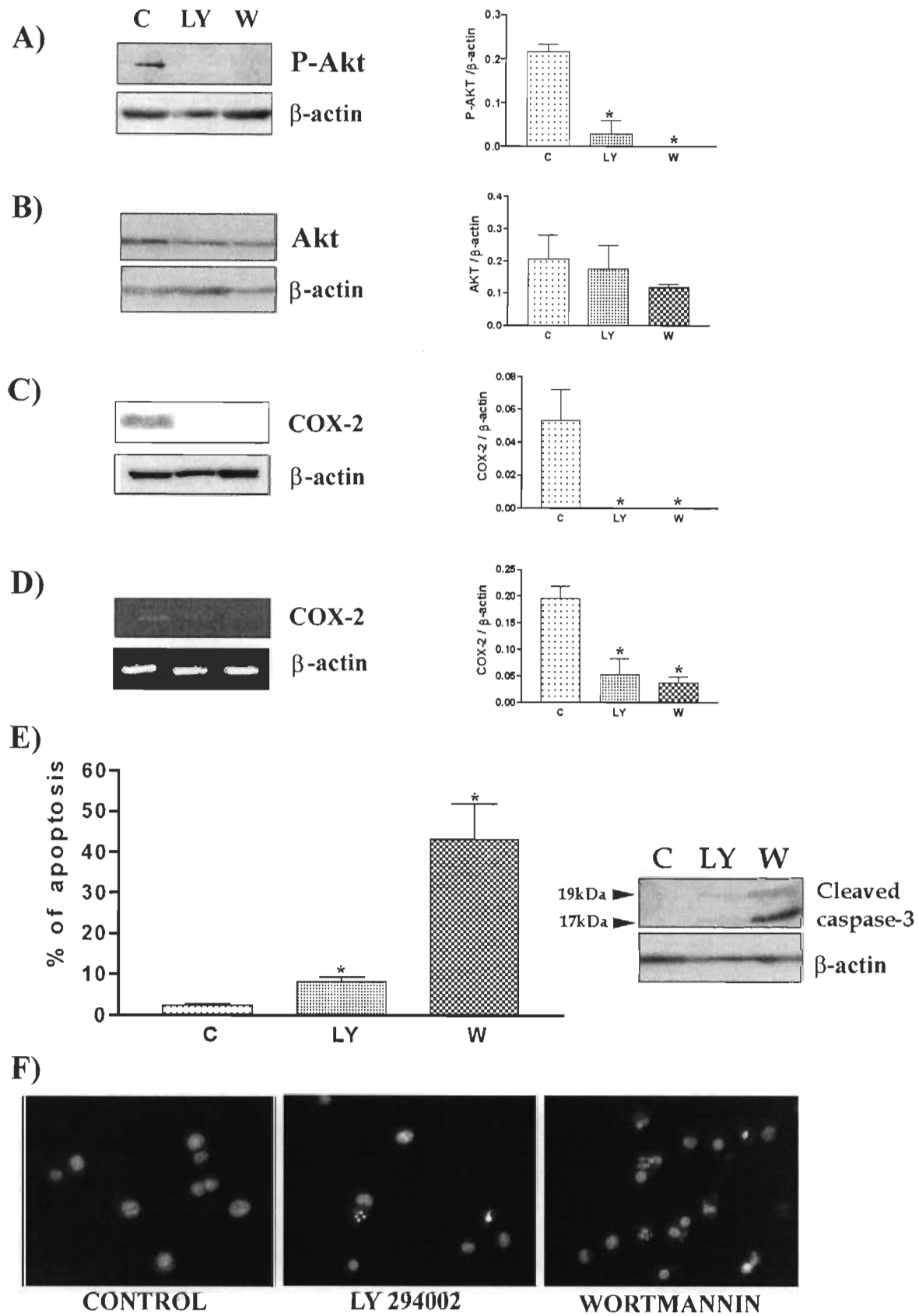


Figure 3

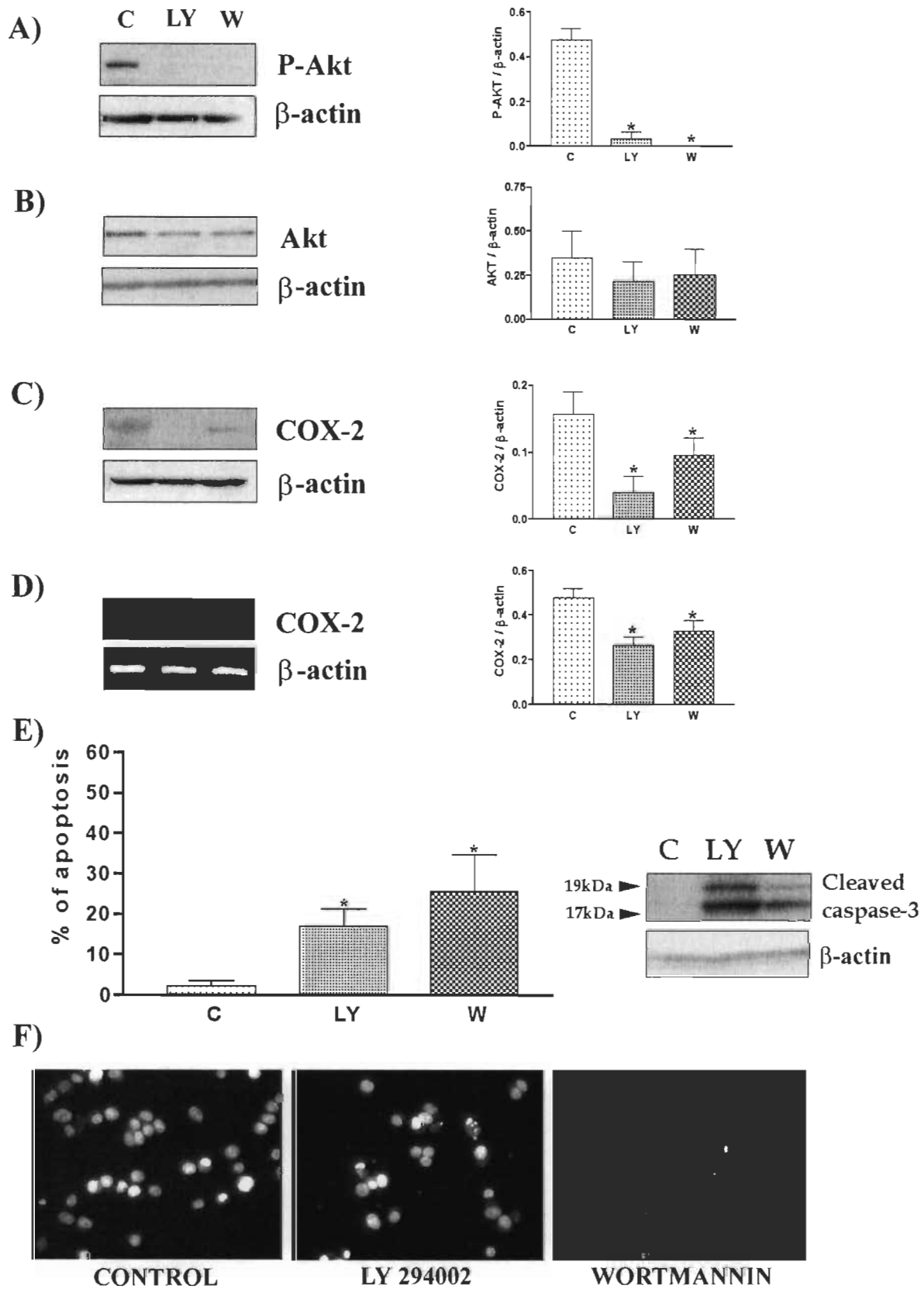


Figure 4

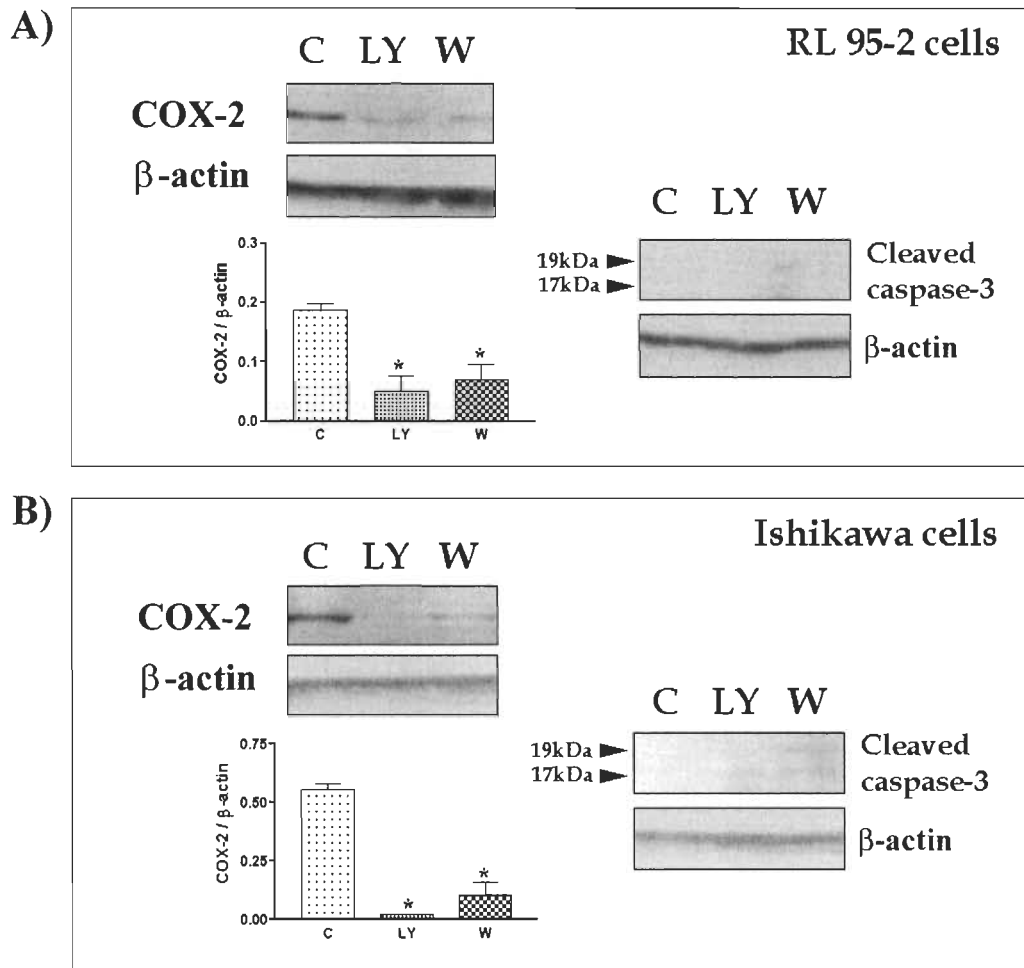


Figure 5



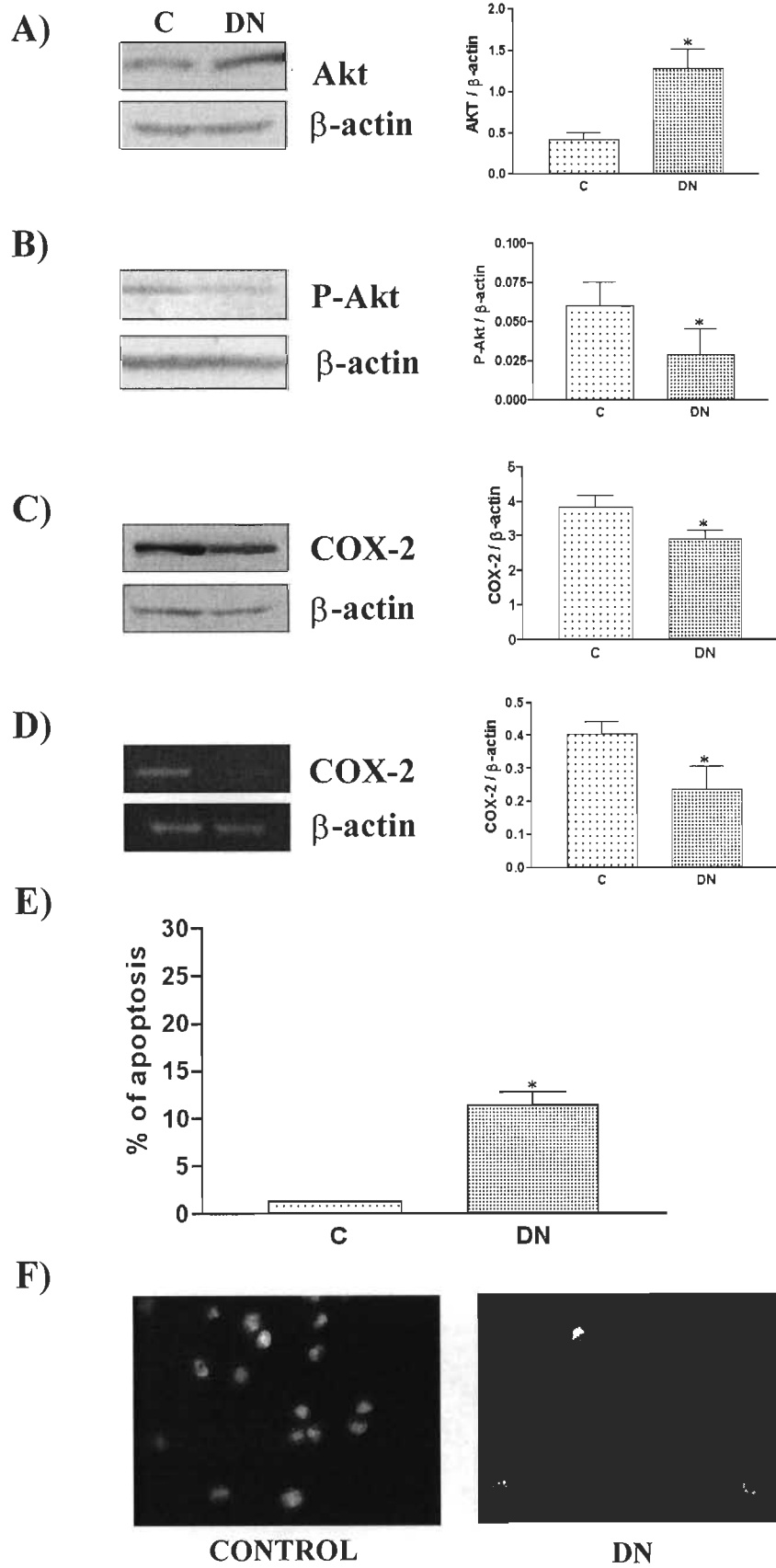


Figure 6

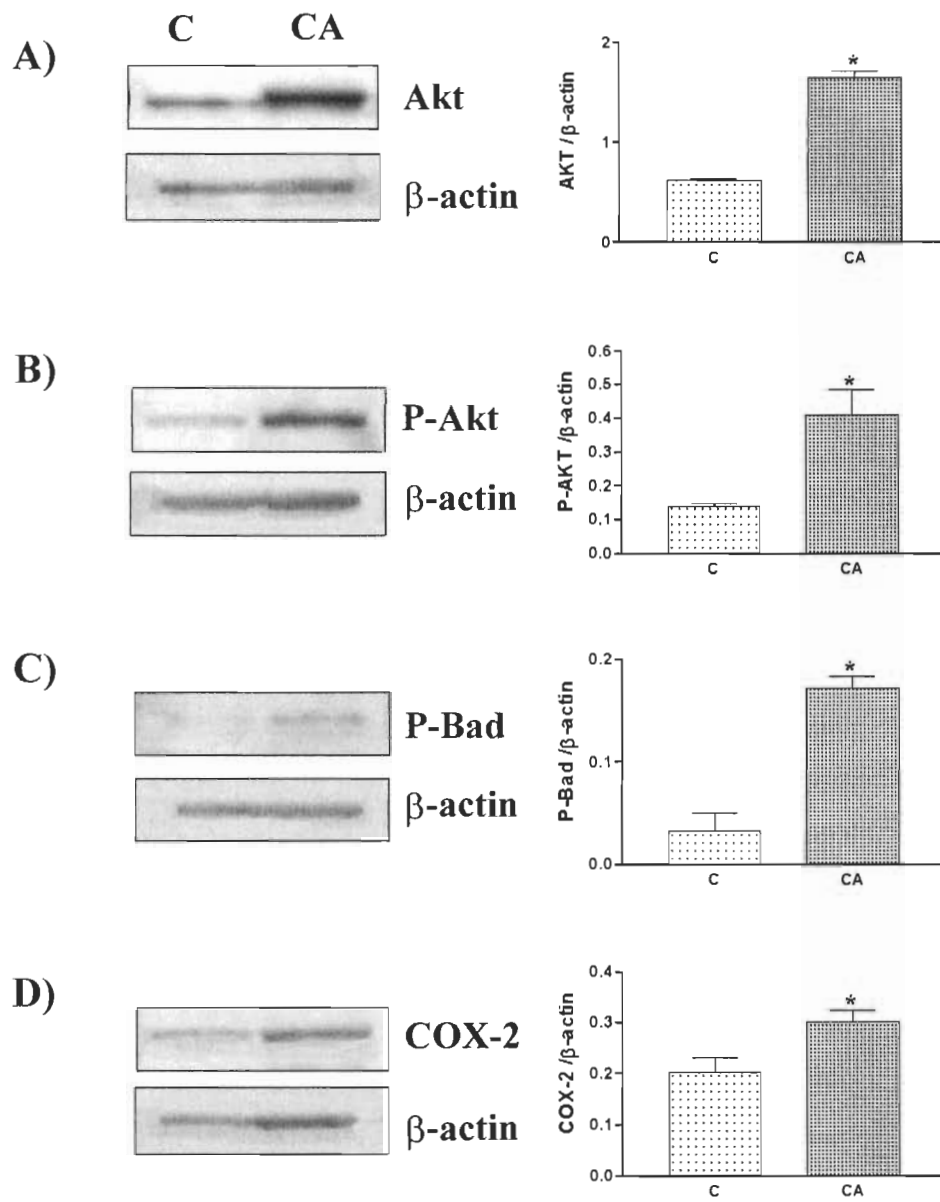
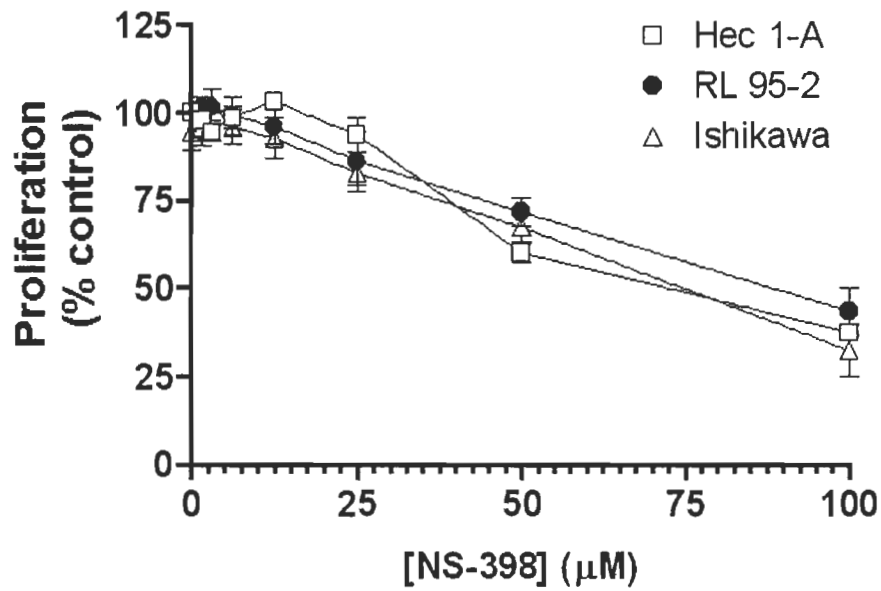
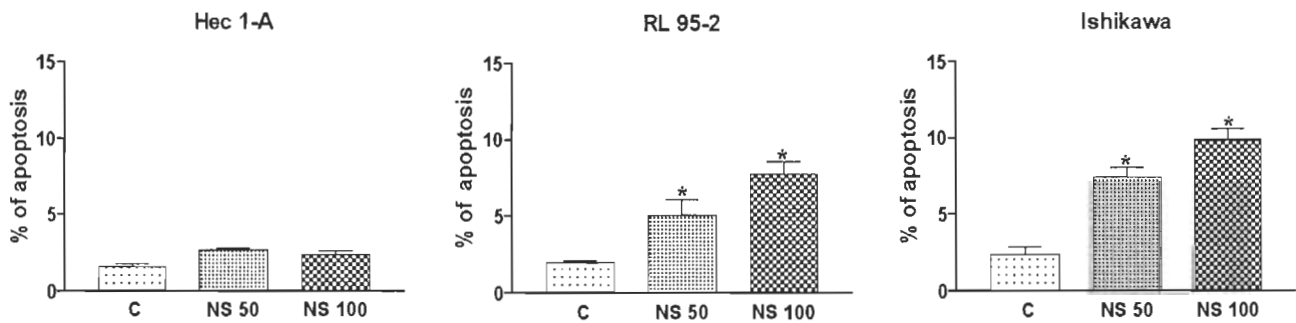


Figure 7

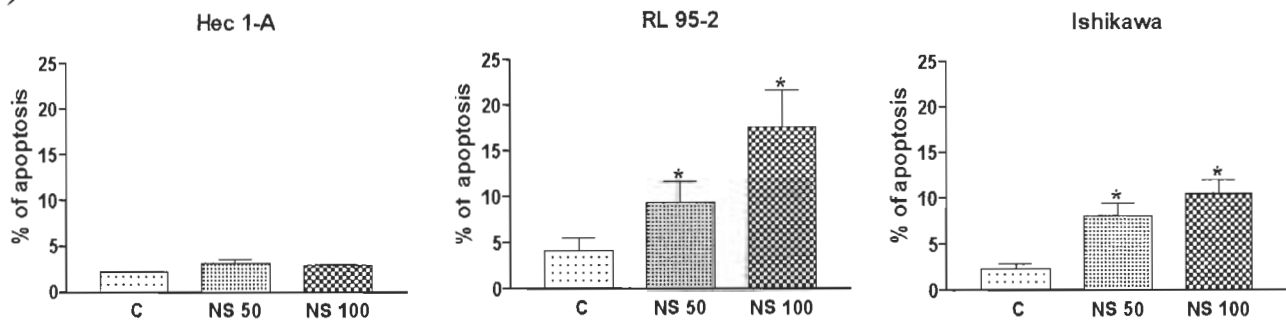
## A) MTT ASSAY



## B) Hoechst



## C) TUNEL



## D)

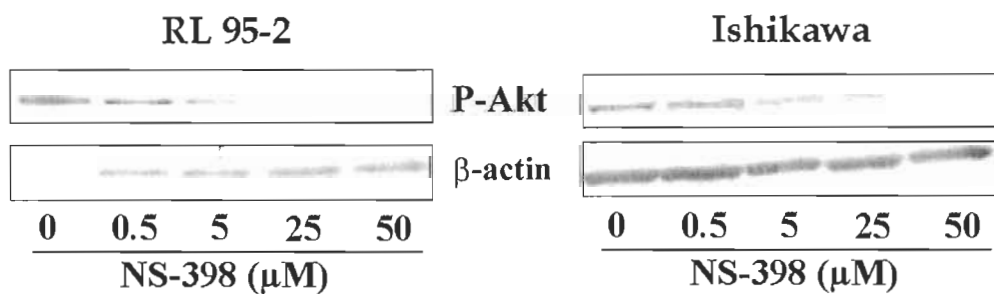


Figure 8

## REFERENCES

1. Shao J, Sheng H, Inoue H, Morrow JD and DuBois RN: Regulation of constitutive cyclooxygenase-2 expression in colon carcinoma cells. *J Biol Chem* 275: 33951-33956, 2000.
2. Kulkarni S, Rader JS, Zhang F, Liapis H, Koki AT, Masferrer JL, Subbaramaiah K and Dannenberg AJ: Cyclooxygenase-2 is overexpressed in human cervical cancer. *Clin Cancer Res* 7: 429-434, 2001.
3. Dannenberg AJ, Altorki NK, Boyle JO, Lin DT and Subbaramaiah K: Inhibition of cyclooxygenase-2: an approach to preventing cancer of the upper aerodigestive tract. *Ann N Y Acad Sci* 952: 109-115, 2001.
4. Bostrom PJ, Aaltonen V, Soderstrom KO, Uotila P and Laato M: Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in urinary bladder carcinomas in vivo and in vitro and prostaglandin E2 synthesis in cultured bladder cancer cells. *Pathology* 33: 469-474, 2001.
5. Kokawa A, Kondo H, Gotoda T, Ono H, Saito D, Nakadaira S, Kosuge T and Yoshida S: Increased expression of cyclooxygenase-2 in human pancreatic neoplasms and potential for chemoprevention by cyclooxygenase inhibitors. *Cancer* 91: 333-338, 2001.
6. Ristimaki A, Honkanen N, Jankala H, Sipponen P and Harkonen M: Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric carcinoma. *Cancer Res* 57: 1276-1280, 1997.
7. Gupta S, Srivastava M, Ahmad N, Bostwick DG and Mukhtar H: Over-expression of cyclooxygenase-2 in human prostate adenocarcinoma. *Prostate* 42: 73-78, 2000.
8. Howe LR, Subbaramaiah K, Brown AM and Dannenberg AJ: Cyclooxygenase-2: a target for the prevention and treatment of breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 8: 97-114, 2001.
9. Sandler RS: Epidemiology and risk factors for colorectal cancer.

Gastroenterol Clin North Am 25: 717-735, 1996.

10. Thun MJ, Namboodiri MM, Calle EE, Flanders WD and Heath CW, Jr.: Aspirin use and risk of fatal cancer. *Cancer Res* 53: 1322-1327, 1993.
11. Giovannucci E, Egan KM, Hunter DJ, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC and Speizer FE: Aspirin and the risk of colorectal cancer in women. *N Engl J Med* 333: 609-614, 1995.
12. Greenberg ER, Baron JA, Freeman DH, Jr., Mandel JS and Haile R: Reduced risk of large-bowel adenomas among aspirin users. The Polyp Prevention Study Group. *J Natl Cancer Inst* 85: 912-916, 1993.
13. Dempke W, Rie C, Grothey A and Schmol HJ: Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy? *J Cancer Res Clin Oncol* 127: 411-417, 2001.
14. Kennedy TG, Martel D and Psychoyos A: Endometrial prostaglandin E2 binding: characterization in rats sensitized for the decidual cell reaction and changes during pseudopregnancy. *Biol Reprod* 29: 556-564, 1983.
15. Kennedy TG: Prostaglandins and uterine sensitization for the decidual cell reaction. *Ann N Y Acad Sci* 476: 43-48, 1986.
16. Uotila PJ, Erkkola RU and Klemi PJ: The expression of cyclooxygenase-1 and -2 in proliferative endometrium and endometrial adenocarcinoma. *Ann Med* 34: 428-433, 2002.
17. Ferrandina G, Legge F, Ranelletti FO, Zannoni GF, Maggiano N, Evangelisti A, Mancuso S, Scambia G and Lauriola L: Cyclooxygenase-2 expression in endometrial carcinoma: correlation with clinicopathologic parameters and clinical outcome. *Cancer* 95: 801-807, 2002.
18. Staal SP: Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 5034-5037, 1987.
19. Bellacosa A, Testa JR, Staal SP and Tsichlis PN: A retroviral oncogene, akt,

- encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science* 254: 274-277, 1991.
20. 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* 201: 475-481, 1991.
  21. Jones PF, Jakubowicz T, Pitossi FJ, Maurer F and Hemmings BA: Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 4171-4175, 1991.
  22. Stephens L, Anderson K, Stokoe D, Erdjument-Bromage H, Painter GF, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, McCormick F, Tempst P, Coadwell J and Hawkins PT: Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B. *Science* 279: 710-714, 1998.
  23. Hayakawa J, Ohmichi M, Kurachi H, Kanda Y, Hisamoto K, Nishio Y, Adachi K, Tasaka K, Kanzaki T and Murata Y: Inhibition of BAD phosphorylation either at serine 112 via extracellular signal-regulated protein kinase cascade or at serine 136 via Akt cascade sensitizes human ovarian cancer cells to cisplatin. *Cancer Res* 60: 5988-5994, 2000.
  24. Suzuki Y, Nakabayashi Y and Takahashi R: Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 8662-8667, 2001.
  25. Davies MA, Koul D, Dhesi H, Berman R, McDonnell TJ, McConkey D, Yung WK and Steck PA: Regulation of Akt/PKB activity, cellular growth, and apoptosis in prostate carcinoma cells by MMAC/PTEN. *Cancer Res* 59: 2551-2556, 1999.
  26. Risinger JI, Hayes AK, Berchuck A and Barrett JC: PTEN/MMAC1 mutations in endometrial cancers. *Cancer Res* 57: 4736-4738, 1997.
  27. Risinger JI, Hayes K, Maxwell GL, Carney ME, Dodge RK, Barrett JC and

- Berchuck A: PTEN mutation in endometrial cancers is associated with favorable clinical and pathologic characteristics. *Clin Cancer Res* 4: 3005-3010, 1998.
28. Tashiro H, Blazes MS, Wu R, Cho KR, Bose S, Wang SI, Li J, Parsons R and Ellenson LH: Mutations in PTEN are frequent in endometrial carcinoma but rare in other common gynecological malignancies. *Cancer Res* 57: 3935-3940, 1997.
  29. Marsh DJ, Dahia PL, Caron S, Kum JB, Frayling IM, Tomlinson IP, Hughes KS, Eeles RA, Hodgson SV, Murday VA, Houlston R and Eng C: Germline PTEN mutations in Cowden syndrome-like families. *J Med Genet* 35: 881-885, 1998.
  30. Way DL, Grosso DS, Davis JR, Surwit EA and Christian CD: Characterization of a new human endometrial carcinoma (RL95-2) established in tissue culture. *In Vitro* 19: 147-158, 1983.
  31. Ishikawa S, Kaneko H, Sumida T and Sekiya M: Ultrastructure of mesodermal mixed tumor of the uterus. *Acta Pathol Jpn* 29: 801-809, 1979.
  32. Kuramoto H: Studies of the growth and cytogenetic properties of human endometrial adenocarcinoma in culture and its development into an established line. *Acta Obstet Gynaecol Jpn* 19: 47-58, 1972.
  33. Gagnon V, St-Germain ME, Parent S, Asselin E. Akt activity in endometrial cancer cells: regulation of cell survival through cIAP-1. *Int J Oncol* 23: 803-810, 2003.
  34. Asselin E, Mills GB and Tsang BK: XIAP regulates Akt activity and caspase-3-dependent cleavage during cisplatin-induced apoptosis in human ovarian epithelial cancer cells. *Cancer Res* 61: 1862-1868, 2001.
  35. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R and Zeiher AM: Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399: 601-605, 1999.

36. Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A and Sessa WC: Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 399: 597-601, 1999.
37. Kane LP, Shapiro VS, Stokoe D and Weiss A: Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase. *Curr Biol* 9: 601-604, 1999.
38. Pastorino JG, Tafani M and Farber JL: Tumor necrosis factor induces phosphorylation and translocation of BAD through a phosphatidylinositide-3-OH kinase-dependent pathway. *J Biol Chem* 274: 19411-19416, 1999.
39. Tang ED, Nunez G, Barr FG and Guan KL: Negative regulation of the forkhead transcription factor FKHR by Akt. *J Biol Chem* 274: 16741-16746, 1999.
40. Dijkers PF, Birkenkamp KU, Lam EW, Thomas NS, Lammers JW, Koenderman L and Coffey PJ: FKHR-L1 can act as a critical effector of cell death induced by cytokine withdrawal: protein kinase B-enhanced cell survival through maintenance of mitochondrial integrity. *J Cell Biol* 156: 531-542, 2002.
41. Pap M, Cooper GM: Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt cell survival pathway. *J Biol Chem* 273: 19929-19932, 1998.
42. van Weeren PC, de Bruyn KM, Vries-Smits AM, van Lint J and Burgering BM: Essential role for protein kinase B (PKB) in insulin-induced glycogen synthase kinase 3 inactivation. Characterization of dominant-negative mutant of PKB. *J Biol Chem* 273: 13150-13156, 1998.
43. Zhou H, Li XM, Meinkoth J and Pittman RN: Akt regulates cell survival and apoptosis at a postmitochondrial level. *J Cell Biol* 151: 483-494, 2000.
44. Maehama T, Dixon JE: The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* 273: 13375-13378, 1998.



45. Sheng H, Shao J and DuBois RN: K-Ras-mediated increase in cyclooxygenase 2 mRNA stability involves activation of the protein kinase B1. *Cancer Res* 61: 2670-2675, 2001.
46. Tang Q, Gonzales M, Inoue H and Bowden GT: Roles of Akt and glycogen synthase kinase 3beta in the ultraviolet B induction of cyclooxygenase-2 transcription in human keratinocytes. *Cancer Res* 61: 4329-4332, 2001.
47. Laine J, Kunstle G, Obata T and Noguchi M: Differential regulation of Akt kinase isoforms by the members of the TCL1 oncogene family. *J Biol Chem* 277: 3743-3751, 2002.
48. Asselin E, Wang Y and Tsang BK: X-linked inhibitor of apoptosis protein activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in rat granulosa cells during follicular development. *Endocrinology* 142: 2451-2457, 2001.
49. Schmedtje JF, Jr., Ji YS, Liu WL, DuBois RN and Runge MS: Hypoxia induces cyclooxygenase-2 via the NF-kappaB p65 transcription factor in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 272: 601-608, 1997.
50. Piwien-Pilipuk G, Van Mater D, Ross SE, MacDougald OA and Schwartz J: Growth hormone regulates phosphorylation and function of CCAAT/enhancer-binding protein beta by modulating Akt and glycogen synthase kinase-3. *J Biol Chem* 276: 19664-19671, 2001.
51. Guo S, Cichy SB, He X, Yang Q, Ragland M, Ghosh AK, Johnson PF and Unterman TG: Insulin suppresses transactivation by CAAT/enhancer-binding proteins beta (C/EBPbeta). Signaling to p300/CREB-binding protein by protein kinase B disrupts interaction with the major activation domain of C/EBPbeta. *J Biol Chem* 276: 8516-8523, 2001.
52. Wang L, Shao J, Muhlenkamp P, Liu S, Klepcyk P, Ren J and Friedman JE: Increased insulin receptor substrate-1 and enhanced skeletal muscle insulin sensitivity in mice lacking CCAAT/enhancer-binding protein beta. *J Biol Chem* 275: 14173-14181, 2000.
53. Gorgoni B, Caivano M, Arizmendi C and Poli V: The transcription factor

C/EBPbeta is essential for inducible expression of the cox-2 gene in macrophages but not in fibroblasts. *J Biol Chem* 276: 40769-40777, 2001.

54. Reddy ST, Wadleigh DJ and Herschman HR: Transcriptional regulation of the cyclooxygenase-2 gene in activated mast cells. *J Biol Chem* 275: 3107-3113, 2000.
55. Tang Q, Gonzales M, Inoue H and Bowden GT: Roles of Akt and glycogen synthase kinase 3beta in the ultraviolet B induction of cyclooxygenase-2 transcription in human keratinocytes. *Cancer Res* 61: 4329-4332, 2001.
56. Arico S, Pattingre S, Bauvy C, Gane P, Barbat A, Codogno P and Ogier-Denis E: Celecoxib induces apoptosis by inhibiting 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 activity in the human colon cancer HT-29 cell line. *J Biol Chem* 277: 27613-27621, 2002.
57. Hsu AL, Ching TT, Wang DS, Song X, Rangnekar VM and Chen CS: The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib induces apoptosis by blocking Akt activation in human prostate cancer cells independently of Bcl-2. *J Biol Chem* 275: 11397-11403, 2000.
58. Rioux N, Castonguay A: Prevention of NNK-induced lung tumorigenesis in A/J mice by acetylsalicylic acid and NS-398. *Cancer Res* 58: 5354-5360, 1998.
59. Nakatsugi S, Fukutake M, Takahashi M, Fukuda K, Isoi T, Taniguchi Y, Sugimura T and Wakabayashi K: Suppression of intestinal polyp development by nimesulide, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, in Min mice. *Jpn J Cancer Res* 88: 1117-1120, 1997.
60. Kawamori T, Rao CV, Seibert K and Reddy BS: Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, against colon carcinogenesis. *Cancer Res* 58: 409-412, 1998.
61. Sheng H, Shao J, Kirkland SC, Isakson P, Coffey RJ, Morrow J, Beauchamp RD and DuBois RN: Inhibition of human colon cancer cell growth by selective inhibition of cyclooxygenase-2. *J Clin Invest* 99: 2254-2259, 1997.

62. Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD and DuBois RN: Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Res* 58: 362-366, 1998.
63. Munir I, Fukunaga K, Kanasaki H, Miyazaki K, Ohba T, Okamura H and Miyamoto E: Expression of cyclooxygenase 2 by prostaglandin E(2) in human endometrial adenocarcinoma cell line HEC-1B. *Biol Reprod* 63: 933-941, 2000.

### **CHAPITRE III**

## **REGULATION OF COX-2 GENE EXPRESSION AND APOPTOSIS IN ENDOMETRIAL CANCER CELLS IS MEDIATED THROUGH NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B PATHWAY**

## RÉSUMÉ

Il a été démontré que la cyclooxygénase-2 (COX-2) est surexprimée dans plusieurs types de tumeurs endométriales et que son expression peut être liée avec les paramètres d'agressivité tumorale. Dans le cancer endométrial humain, le suppresseur de tumeur PTEN est fréquemment muté. Lorsque la protéine PTEN est mutée, les niveaux de phosphorylation de Akt augmentent activant ainsi le chemin de survie cellulaire. Le facteur de transcription nucléaire  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) est un régulateur de gènes qui encode des cytokines, des récepteurs de cytokines et des molécules d'adhésion cellulaire qui induisent des réponses immunes et inflammatoires. Récemment, l'activation de NF- $\kappa$ B a été liée à plusieurs aspects de l'oncogenèse comme le contrôle de l'apoptose, du cycle cellulaire, de la différenciation et de la migration cellulaire. On sait que Akt prend part à l'activation de NF- $\kappa$ B et que le gène de COX-2 est régulé au niveau du promoteur par NF- $\kappa$ B. Il a été démontré que Akt régulait le gène COX-2 et que l'expression de sa protéine était augmentée dans les cellules cancéreuses endométriales exprimant phospho-Akt. La présente étude a été entreprise pour déterminer l'implication de NF- $\kappa$ B et de son inhibiteur I $\kappa$ B dans la régulation de l'expression de COX-2 et pour déterminer plus précisément les cibles de Akt impliquées dans ce processus. Trois lignées cellulaires différentes connues pour avoir PTEN sauvage (HEC-1A) ou la protéine PTEN mutée active (RL 95-2 et Ishikawa) ont été utilisées pour ces études. L'expression de NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B et Phospho- I $\kappa$ B a été évaluée grâce à des analyses par Western. La présence de phosphorylation de I $\kappa$ B a été trouvée dans toutes les lignées cellulaires étudiées. Aucune différence n'a été trouvée entre les lignées cancéreuses en ce qui concerne les niveaux de NF- $\kappa$ B. L'inhibition par la Wortmannin et le LY294002 bloque la phosphorylation de I $\kappa$ B, réduit l'activité nucléaire de NF- $\kappa$ B, réduit l'expression de COX-2 et induit l'apoptose. Les transfection effectuées avec un vecteur dominant négatif bloquent la phosphorylation de I $\kappa$ B et réduisent l'expression de COX-2. Cependant, les transfusions effectuées avec le vecteur actif constitutif de Akt induisent la phosphorylation de I $\kappa$ B et augmentent l'expression de COX-2. Finalement, nos résultats démontrent que Akt, par l'intermédiaire de NF- $\kappa$ B/ I $\kappa$ B, induit l'expression du gène et de la protéine de COX-2.

**REGULATION OF COX-2 PROTEIN EXPRESSION BY AKT IN  
ENDOMETRIAL CANCER CELLS IS MEDIATED THROUGH NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B  
PATHWAY<sup>†</sup>**

Marie-Eve St-Germain, Veronique Gagnon, Sophie Parent and Eric Asselin<sup>\*</sup>

Department of Chemistry and Biology, Research Group in Molecular and Cellular  
Biopathology, Medical Biology Section, University of Quebec at Trois-Rivieres,  
C.P. 500, Trois-Rivieres, Quebec, Canada G9A 5H7

Short title: Akt regulates COX-2 through NF- $\kappa$ B

Key words: Akt, NF- $\kappa$ B, apoptosis, cell survival, PI 3-K/Akt pathway, uterus,  
cyclooxygenases, endometrial cancer.

\* Corresponding Author: Eric Asselin, Ph.D.  
Department of Chemistry and Biology  
Medical Biology Section  
University of Quebec at Trois-Rivieres, C.P. 500  
Trois-Rivieres, Quebec, Canada G9A 5H7  
E-mail: [Eric\\_Asselin@uqtr.ca](mailto:Eric_Asselin@uqtr.ca)

<sup>†</sup> This work has been supported by a grant from the Fond de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) and the Canadian Institute of Health Research (CIHR). Eric Asselin is a recipient of a fellowship from FRSQ. Veronique Gagnon is a recipient of a FRSQ scholarship.

## ABSTRACT

Cyclooxygenase-2 (COX-2) has been shown to be highly expressed in a broad series of primary endometrial tumors and its expression may be closely associated with parameters of tumor aggressiveness. In human endometrial cancer, tumor suppressor phosphatase tensin homologue (PTEN) is frequently mutated. In the presence of a mutated PTEN protein, Akt phosphorylation levels increase leading to the activation of this survival pathway. The nuclear transcription factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) is a well established regulator of genes encoding cytokines, cytokine receptors, and cell adhesion molecules that drive immune and inflammatory responses. More recently, NF- $\kappa$ B activation has been connected with multiple aspects of oncogenesis, including the control of apoptosis, cell cycle, differentiation, and cell migration. It is known that Akt may act through NF- $\kappa$ B pathway and that COX-2 gene has been shown to be regulated at the promoter level by NF- $\kappa$ B. Recently, we showed that Akt regulates COX-2 gene and protein expressions in phospho-Akt expressing endometrial cancer cells. The present study was undertaken to determine the involvement of NF- $\kappa$ B pathway and I $\kappa$ B (an inhibitor of NF- $\kappa$ B) in the regulation of COX-2 expression and to determine more precisely the downstream targets of Akt involved in this process. Three different human endometrial cancer cell lines known to have wild type PTEN (HEC-1A) or a mutated inactive PTEN protein (RL-95-2 and Ishikawa) were used for these studies. Expression of NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B and Phospho-I $\kappa$ B were evaluated by Western analysis. The presence of I $\kappa$ B phosphorylation was found in all cell lines studied. There was no difference between cell lines in term of NF- $\kappa$ B abundance. Inhibition of PI 3-K with Wortmannin and LY294002 blocked I $\kappa$ B phosphorylation, reduced NF- $\kappa$ B nuclear activity, reduced COX-2 expression and induced apoptosis. Transfection studies with a dominant negative Akt vector blocked I $\kappa$ B phosphorylation and reduced COX-2 expression. On the opposite, constitutively active Akt transfections resulted in the induction of I $\kappa$ B phosphorylation and up-regulation of COX-2. The results demonstrate that Akt signals through NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B pathway to induce COX-2 expression.

## INTRODUCTION

The phosphoinositide 3-kinase (PI 3-kinase) pathway has been implicated in the activation of the proinflammatory transcription factor nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). The NF- $\kappa$ B transcription factor is a pleiotropic activator that participates in the induction of a wide variety of cellular genes. In addition to its role in inflammation and immune response, NF- $\kappa$ B has also been implicated in the suppression of apoptosis [1], cellular survival, transformation, and oncogenesis [2]. Predominantly a heterodimeric complex of two polypeptides (p65/RelA and p50), NF- $\kappa$ B lies dormant in the cytoplasm through the binding I $\kappa$ B inhibitory proteins. When phosphorylated on serine 32 and serine 36, I $\kappa$ B $\alpha$  is targeted and degraded by ubiquitin/26 S proteasome pathway liberating the NF- $\kappa$ B heterodimer so that it may translocate to the nucleus and bind DNA. NF- $\kappa$ B binds to *cis*-acting  $\kappa$ B in the promoters and enhancers of key cellular genes. Active, DNA-binding forms of NF- $\kappa$ B are dimeric complexes, composed of various combinations of members of the Rel/NF- $\kappa$ B family of polypeptides (p50, p52, c-Rel,  $\nu$ -Rel, RelA (p65), and RelB). Recently, a large-molecular weight complex was identified that is responsible for phosphorylating I $\kappa$ B $\alpha$  and I $\kappa$ B $\beta$ . Two key catalytic sub-units of the I $\kappa$ B kinase (IKK) complex were identified as IKK $\alpha$  and IKK $\beta$  [3]. Constitutive NF- $\kappa$ B activation appears to have an important role in tumorigenesis. For example, persistent nuclear NF- $\kappa$ B localization and NF- $\kappa$ B-dependent transcription is detected in breast [4], ovarian [5], colon [6], thyroid [7] and prostate [8] tumors. In breast and prostate tumor cells, constitutive NF- $\kappa$ B activity is associated with reduced levels of I $\kappa$ B $\alpha$  that appears related to increased degradation of I $\kappa$ B proteins in these cells [9].

Previous reports indicate that the transcription factor NF- $\kappa$ B can function upstream of cyclooxygenase-2 (COX-2) to control transcription of this gene [10]. Cyclooxygenase (COX) is the rate-limiting enzyme involved in the biosynthesis of prostaglandins (PG) and exists in two isoforms: COX-1 (constitutively expressed) and COX-2 (the regulated isoform). Cyclooxygenase-2 (COX-2) up-regulation has been found in several type of cancers such as colon carcinomas [10], cervix [11], head and neck [12], bladder [13], pancreas [14], stomach [15], prostate [16] and breast [17]. It is believed that COX-2 and PGs, particularly PGE<sub>2</sub>, may be key elements in the evolution



of tumor transformation and malignancy. Epidemiological studies showed that nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) can be used for cancer prevention [18]. It has been shown that COX-2 expression in colorectal carcinoma cells provides a growth and survival advantage and increases tumor cell invasiveness (see [17] for a review). Additionally, more evidences suggest that COX-2 is highly express in a broad series of primary endometrial tumors and its expression may be associated closely with parameters of tumor aggressiveness [19].

Akt is a serine/threonine protein kinase also known as protein kinase B or Rac [20-22]. Akt is an inactive cytosolic protein recruited to the plasma membrane, and activated by phosphorylation at threonine 308 and serine 473 in response to growth factors or cytokines [23-25] via the product of phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-K), phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP<sub>3</sub>). Upon phosphorylation, Akt has been shown to phosphorylate and to block the action of several pro-apoptotic proteins such as Bad [24]. Akt also blocks cytochrome C release from the mitochondria through the regulation of Bcl-2 [26] and regulates expression of cIAP-1 [27]. In a number of different cancers, the tumor suppressor phosphatase tensin homologue (PTEN, a lipid phosphatase) is frequently mutated. PTEN mutations have been found in several types of endometrial cancer [28-31]. PTEN dephosphorylates PIP<sub>3</sub> into inactive PIP<sub>2</sub> which blocks Akt activation. Moreover, we have previously shown that Akt regulates COX-2 gene and protein expressions.

We have demonstrated recently that Akt directly regulates COX-2 gene and protein expression in endometrial cancer cells [32]. The present study was undertaken to determine the involvement of NF- $\kappa$ B pathway and I $\kappa$ B in the regulation of COX-2 expression and to determine more precisely the downstream targets of Akt involved in this process. We hypothesized that PTEN mutation increase Akt activity which may, in turn, be involved in the activation of NF- $\kappa$ B. Our results demonstrate that activity of NF- $\kappa$ B is up-regulated in human endometrial cancer cells expressing phospho-Akt and is responsible for the increase of COX-2 gene expression.

## MATERIALS AND METHODS

**Reagents.** Wortmannin, LY294002, MTT (3-(4, 5-dimethylthiazolyl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) and Hoechst 33258 were obtained from Sigma (St. Louis, MO). DMEM-F12, Mc Coy's, FBS serum and PCR primers were purchased from Invitrogen (Burlington, ON). Anti-human PhosphoPlus Akt (Ser473), Akt antibodies were obtained from New England Biolabs (Mississauga, ON), NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$  and Phospho-I $\kappa$ B $\alpha$  were obtained from Cell Signaling Technology and anti-human COX-2 were obtained from Cedarlane Laboratories (Hornby, ON). Secondary horse radish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit antibody was purchased from BioRad (Mississauga, ON). Dominant negative (DN) and constitutively active (CA) Akt vectors were generously provided by Dr Zhenguo Wu, Hong Kong University of Science and Technology.

**Cell culture.** Human endometrial cancer cells (HEC 1-A and RL 95-2) were obtained from ATCC. Ishikawa cells were generously provided by Dr Sylvie Mader, Université de Montréal, Canada. Cells were cultured in 75 cm<sup>2</sup> bottles at 37°C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. Ishikawa cells were maintained in DMEM-F12 supplemented with 2.438 g/L of NaHCO<sub>3</sub>, FBS (10%) and gentamycin (50  $\mu$ g/ml). HEC 1-A cells were grown in Mc Coy's supplemented with 2.2 g/L of NaHCO<sub>3</sub>, FBS (10%) and gentamycin (50  $\mu$ g/ml). RL 95-2 were cultured in DMEM-F12 supplemented with 1.75 g/L of NaHCO<sub>3</sub>, HEPES (5  $\mu$ M), insulin (2.5  $\mu$ g/ml), FBS (10%) and gentamycin (50  $\mu$ g/ml).  $1 \times 10^6$  cells were plated in log growth phase onto 6 wells plates for 24 hrs in the above culture medium prior to initiation of treatment. Wortmannin dose (50  $\mu$ g/ml) and 24 hours time were chosen following dose-responses and time-course preliminary studies.

**Transfections.** Cells were plated at a density of  $4 \times 10^5$  cells/well in six-well plates 24 hours before transfection. RL 95-2 cells were transfected with DN-Akt and CA-Akt vectors. Transient transfection of the cells was carried out with 1  $\mu$ g of DNA/well using Effectene (Qiagen, Mississauga, ON), according to the protocol suggested by the manufacturer. Empty vector was used as the transfection control. Transfection efficiencies were determined by Western analysis using an anti-Akt antibody.

**NF- $\kappa$ B chemiluminescent assay.** The BIOXYTECH NF- $\kappa$ B Chemiluminescent Assay employs an oligonucleotide containing the DNA binding NF- $\kappa$ B consensus sequence bound to a 96-well plate. NF- $\kappa$ B present in the sample binds specifically to the oligonucleotide coated on the plate. The DNA bound NF- $\kappa$ B is selectively recognized by the primary antibody (p50 and p105 specific). A secondary antibody-alkaline phosphatase conjugate binds to the primary antibody. Then, we can measure the Relative Light Units (RLU) by a chemiluminescence detector after addition of alkaline phosphatase substrate.

**Hoechst staining.** Following treatment, both floating and attached cells were resuspended in PBS containing Hoechst 33258 for 24 hours at 4°C. Hoechst nuclear staining was viewed and photographed using a Olympus BX60 fluorescence microscope and a Coolsnap-Pro CF digital Camera (Carsen Group, ON). Cells with typical apoptotic nuclear morphology (nuclear shrinkage, condensation and fragmentation) were identified and counted, using randomly selected fields on numbered photographic slides, of which the “counter” was not aware of the treatment, so as to avoid experimental bias. A minimum of 200 cells per treatment group were counted in each experiment and results are presented as a percentage of apoptotic cells/non-apoptotic cells.

**Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nick end-labeling (TUNEL)**  
Cells (floating and attached) were pooled, placed on a positively charged microscope slide, dried and rinsed with PBS. Slides were incubated with proteinase K (20  $\mu$ g/ml) for 30 min at room temperature. Slides were washed twice with PBS and endogenous peroxidase was inactivated with 0.3 % hydrogen peroxide in methanol for 30 min. Slides were rinsed with buffer and incubated with 10 mM citrate solution for two minutes on ice. Then, tissue sections were rinsed with PBS and incubated with TdT labelling reaction (In Situ Cell Death Detection, POD, Roche) for 30 min at 37 °C in humidified environment. Slides were washed three times in PBS and tissue sections were blocked with BSA 3% for 20 min at room temperature. Converter-POD solution was added and incubated 30 min at 37 °C in humidified environment. Slides were washed 5 min in PBS and color development was achieved by incubation using DAB substrate. Cells were finally counterstained with hematoxylin. Negative control

was performed using the same protocol without TdT enzyme. TUNEL positive cells were counted as described with the Hoechst nuclear staining assay.

**Protein extraction and Western analysis.** Cells (both floating and attached) were trypsinized, lysed in lysis buffer (PBS 1X pH 7.4; 1% Nonidet P-40; 0.5% Sodium deoxycholate; 0.1% SDS; Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche)), frozen and thawed three times, and centrifuged (13000 X g, 20 min at 4°C) to remove insoluble material. Supernatant was recovered and stored at -20°C pending analysis. Protein content was determined with the Bio-Rad DC Protein Assay. Protein extracts (50 µg) were heated (95°C, 3 min), resolved by 10% SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and electro-transferred to nitrocellulose membranes (15 V, 30 min) using a semi-dry transfer (Bio-Rad, Mississauga, ON). Membranes were then blocked (2 hrs, RT) with PBS containing 5% milk powder, then incubated with anti-COX-2 (1:1000), anti-Akt (1:1000), anti-Phospho-PKB/Akt (1:250), anti-NF-κB (1:1000), anti-IκBα (1:1000), anti-Phospho-IκBα (1:500) (overnight, 4°C), and subsequently with Horse radish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit secondary antibody (1:3000; RT, 45 min). Peroxidase activity was visualized with the ECL kit (Amersham, Arlington Heights, IL), according to the manufacturer's instructions.

**Statistical analysis.** All experiments were repeated at least three times. Data were subjected to one-way ANOVA or student t test (PRISM software version 4.0; GraphPad, San Diego, CA). Differences between experimental groups were determined by the Tukey's test.

## RESULTS

**Expression of IκB and NF-κB proteins.** To first determine the basal levels of NF-κB and IκB proteins, Western blot analysis were performed on cell lysate of untreated cells and revealed that the presence of IκB protein and its phosphorylated state was found in all cell lines (Fig. 1). There was no significant difference between cell lines in term of IκB and phospho-IκB abundance. As observed with IκB, p50 subunit of NF-κB was found in all cell lines but its p65 subunit was found only in RL 95-2 and in Ishikawa cells.

**Inhibition of PI 3-K blocked I $\kappa$ B phosphorylation, reduced COX-2 expression and induced apoptosis.** We have showed previously that Akt inhibition in mutated PTEN endometrial cancer cells results in inhibition of Akt phosphorylation, downregulation of COX-2 gene and protein expression and stimulation of apoptosis [32]. The present results confirm that PI 3-K inhibition with Wortmannin and LY294002 induce apoptosis (Fig. 2). Furthermore, these results demonstrate that apoptosis is induced in a time-dependent manner in mutated PTEN cells (RL 95-2 and Ishikawa) as demonstrated by Hoechst and TUNEL analyses (Fig. 2). However, PI 3-K inhibitors had no effect in HEC 1-A cells suggesting that PI 3-K activity is important in the control and inhibition of apoptosis.

**Inhibition of the PI 3-kinase/Akt signaling pathway reduces phosphorylation of I $\kappa$ B and activates NF- $\kappa$ B translocation into the nucleus.** As we showed previously, mutated PTEN endometrial cancer cell lines (RL 95-2 and Ishikawa) expressed high levels of Akt phosphorylation which was concomitant with the presence of high levels of COX-2 mRNA and protein [32]. In the latter study, there was no Akt phosphorylation found and nearly undetectable COX-2 protein in the wild-type cell line (HEC 1-A). PI 3-K inhibition in RL 95-2 and Ishikawa cells directly blocked Akt phosphorylation and caused a reduction of COX-2 mRNA and protein [32]. We wanted to further investigate the involvement NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B pathway in the regulation of COX-2 by Akt. As hypothesized, the results demonstrate that PI 3-K inhibition results in the reduction I $\kappa$ B phosphorylation in mutated PTEN RL 95-2 and Ishikawa cells (Fig. 3). There was no effect of PI 3-K inhibitors in I $\kappa$ B phosphorylation in HEC 1-A wild-type cells. To further confirm that inhibition of I $\kappa$ B phosphorylation leads to the activation and translocation of NF- $\kappa$ B to the nucleus, a NF- $\kappa$ B Chemiluminescent Assay was used to measure NF- $\kappa$ B activity in the nucleus (Fig. 4). The activity of NF- $\kappa$ B was high in mutated-PTEN human endometrial cancer cells compared to wild-type PTEN HEC 1-A cancer cell line. PI 3-K/Akt inhibition with Wortmannin significantly decreased NF- $\kappa$ B activity in both RL 95-2 and Ishikawa and inhibition had no effect in HEC 1-A cells.

**Constitutively active Akt transfections resulted in the induction of I $\kappa$ B phosphorylation and up-regulation of COX-2 expression.** To prove further the relationship between Akt, I $\kappa$ B and COX-2 expression, a “gain-of-function” experiment

was conducted using a constitutively active (CA) Akt expression vector which was transfected in the RL 95-2 cell line (Fig. 5). CA-Akt transfection induced Akt and I $\kappa$ B phosphorylation and activity, and decreased total I $\kappa$ B protein. As shown previously [32], CA-Akt transfection induced COX-2 expression.

**Dominant negative Akt vector blocked I $\kappa$ B phosphorylation which lead to the activation of apoptosis.** Finally, to confirm that Akt regulates COX-2 gene expression through the NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B pathway, a dominant negative (DN) Akt expression vector was used and transfected in the mutated-PTEN RL95-2 cell line expressing phospho-Akt (Fig. 6). As demonstrated previously, transfection of RL95-2 cells with the DN-Akt decreased Akt phosphorylation and caused a reduction of COX-2 expression [32]. The current study further confirm these observations and demonstrate that transfection with DN-Akt increased total I $\kappa$ B protein and decreased I $\kappa$ B phosphorylation (Fig. 6). In addition, DN-Akt transfection caused an induction of apoptosis in RL 95-2 as observed with the PI 3-K inhibition experiments.

## DISCUSSION

The ability of NF- $\kappa$ B to promote cell proliferation, to suppress apoptosis, to promote cell migration, and to suppress differentiation apparently have been co-opted by cellular and viral oncoproteins to promote oncogenesis. It is known that Akt may act through NF- $\kappa$ B pathway [33] and that COX-2 gene has been shown to be regulated at the promoter level by NF- $\kappa$ B [34]. The activity of NF- $\kappa$ B is tightly controlled by inhibitory I $\kappa$ B proteins that bind to NF- $\kappa$ B complexes and thus sequester NF- $\kappa$ B in the cytoplasm. Stimuli such as cytokines promote the serine phosphorylation of I $\kappa$ B and its polyubiquitination and proteasome-mediated degradation and thereby induce NF- $\kappa$ B translocation to the nucleus. Since Akt phosphorylation leads to activation of NF- $\kappa$ B, a similar situation may be responsible in phospho-Akt expressing RL 95-2 and Ishikawa human endometrial cancer cell lines used in the present study. PTEN is a crucial phosphatase involved in the regulation of Akt phosphorylation: the presence of an active PTEN protein blocks Akt phosphorylation by the dephosphorylation of PI 3-K product, PIP3 [35]. In the presence of a mutated-PTEN protein, activation of Akt generally occurs constitutively. We have demonstrated previously that Akt is constitutively phosphorylated/activated in two mutated-PTEN human endometrial cancer cell lines that have been used in the present study (RL 95-2 and Ishikawa) [27,32]. Whereas, phosphorylation of Akt was absent in one wild-type PTEN cell line (HEC 1-A).

Indeed, our results demonstrate that the presence of I $\kappa$ B phosphorylation was found in all cell lines studied. There was no difference between cell lines in term of NF- $\kappa$ B abundance indicating that NF- $\kappa$ B expression is not involved in the regulation of COX-2 gene expression. However, NF- $\kappa$ B was shown to be activated and present in the nucleus of the two mutated-PTEN endometrial cancer cells (RL 95-2 and Ishikawa) expressing phospho-Akt. Thus, the presence of a wild-type PTEN protein results in the reduction of Akt activity/phosphorylation leading to the inhibition of I $\kappa$ B phosphorylation and the sequestration of NF- $\kappa$ B. On the opposite, the presence of a mutated PTEN protein enable Akt phosphorylation which in turn may phosphorylated I $\kappa$ B allowing NF- $\kappa$ B to be translocated to the nucleus to induce transcription of gene involved in cell survival. These results demonstrate that the

ability of PTEN to negatively regulate the PI 3-K/Akt/NF- $\kappa$ B pathway may be important to its role of tumor suppressor protein.

In the present study, we have investigated the role of PI 3-kinase in NF- $\kappa$ B activation. Various PI 3-kinase inhibitors such as Wortmannin, LY294002 and dominant-negative of Akt were used to fully prove the involvement of PI 3-K/Akt pathway in the regulation of NF- $\kappa$ B activity. Inhibition of PI 3-K with Wortmannin and LY294002 blocked Akt and I $\kappa$ B phosphorylation and reduced COX-2 expression in RL 95-2 and Ishikawa cells. However, PI 3-K inhibitors had no effect in HEC 1-A cells (a cell line with non detected Akt phosphorylation and no detectable level of COX-2) confirming that COX-2 is a targeted gene downstream of Akt. Transfection studies with a dominant negative Akt vector mutated-PTEN RL 95-2 cells blocked I $\kappa$ B phosphorylation, increased I $\kappa$ B expression and led to the activation of apoptosis. These PI 3-K/Akt inhibition studies demonstrate that PI 3-K and Akt are required for NF- $\kappa$ B activation.

To further confirm the involvement of Akt and NF- $\kappa$ B /I $\kappa$ B pathway in the control of COX-2 expression, transfections with a constitutively active (CA) Akt expression vector were carried out using RL 95-2 cells. As hypothesized, CA-Akt transfection induced COX-2 expression and confirmed the results obtained with DN-Akt inhibition and PI 3-K inhibition studies. Moreover, these transfections resulted in the induction of I $\kappa$ B phosphorylation. The subsequent degradation of I $\kappa$ B allows the release and translocation of the NF- $\kappa$ B to the nucleus. Recent evidences also suggest that CCAAT/enhancer-binding protein beta (C/EBP $\beta$ ), a transcription factor, is involved downstream Akt activation pathway [36-38]. Studies have demonstrated that C/EBP $\beta$  is an essential transcription factor for COX-2 gene regulation [39,40] indicating that activation of C/EBP $\beta$  by Akt may be in part responsible for COX-2 gene expression. Another study showed that inactivation of GSK-3 $\beta$  through activation of Akt plays an important role in the UVB induction of COX-2 transcription [41]. Thereby, C/EBP $\beta$  and GSK-3 $\beta$  may be other different targets following Akt phosphorylation to activate cell survival through COX-2 gene expression and PGE<sub>2</sub> secretion.



COX-2 has been shown to contribute to tumorigenesis and the malignant phenotype of tumor cells by different mechanisms, including: (1) inhibition of apoptosis; (2) increased angiogenesis; (3) increased invasiveness; (4) modulation of inflammation/immuno-suppression; and (5) conversion of procarcinogens to carcinogens (see [42] for a review). An evident correlation between COX-2 expression and inhibition of apoptosis has been established, associated with increased PGE<sub>2</sub> levels resulting in modulation of pro- and anti-apoptotic factors such as Bcl-2 [43]. We have showed previously that COX-2 inhibition with NS-398 in RL 95-2 and Ishikawa cells results in the inhibition of Akt phosphorylation and induction of apoptosis suggesting that the Akt/NF-κB/COX-2 pathway is an important point of control of cell survival.

In summary, the present study demonstrates a crucial role for Akt in the regulation of NF-κB expression through the phosphorylation of IκB in human endometrial cancer cells. The results demonstrate that Akt signals through NF-κB/IκB pathway to induce COX-2 gene and protein expression. There is compelling evidence that NF-κB is dysregulated in many forms of cancer and its inhibition is a logical therapy for certain cancers and for adjuvant approaches to cancer therapy. Indeed, this study shows that NF-κB/IκB pathway could be a good target for gene therapy in endometrial cancers. Further studies on other signaling factors/transcription factors such as GSK-3β and C/EBPβ activation/phosphorylation will provide more insight into the complex mechanisms by which Akt regulates COX-2 gene expression in human endometrial cancer cells.

## FIGURE LEGENDS

Figure 1 I $\kappa$ B, Phospho-I $\kappa$ B and NF- $\kappa$ B (p65 and p50) protein abundance in wild-type PTEN (HEC 1-A) and mutated-PTEN (RL 95-2 and Ishikawa) endometrial cancer cells as determined by Western analysis.  $\beta$ -actin was used as control to correct for loading. Blots are representative of 4 different experiments. Results represent mean  $\pm$  SEM of 4 different experiments.

Figure 2 Effect of PI 3-K inhibitors on apoptosis in HEC 1-A, RL 95-2 and Ishikawa cells. Control (■), LY294002 (○) and Wortmannin (▲).  $2 \times 10^6$  cells were plated for 0, 6, 12, 24 h and cultured in the presence of medium and LY294402 or Wortmannin. Cells were trypsinized, pooled with floating cells and collected for Hoechst nuclear staining (right panel) or TUNEL analysis (left panel) to count apoptotic cells. Data represent the mean  $\pm$  SEM of 4 independent experiments.

Figure 3 Effect of PI 3-K inhibitors on I $\kappa$ B expression and phosphorylation in HEC-1-A, RL-95-2 and Ishikawa cells. Western analysis were performed on cell protein lysate from pooled attached and floating cells.  $\beta$ -actin was used as control to correct for loading. Densitometric analyses were performed using BIO RAD gel doc system and are presented as a ratio (value/ $\beta$ -actin).  $2 \times 10^6$  cells were plated for 24 h and cultured in medium in the presence or absence of LY294402 or Wortmannin. Data represent the mean  $\pm$  SEM of 4 independent experiments.

\*  $p < 0.05$  compared to control.

Figure 4 NF- $\kappa$ B activity in response to Wortmannin. HEC 1-A, RL 95-2 and Ishikawa cells were treated with Wortmannin for 24 hours and cell were recovered and lysed. Nuclear cell lysate were recovered and NF- $\kappa$ B activity was measured using the Chemiluminescent NF- $\kappa$ B Assay. Data represent the mean  $\pm$  SEM of 4 independent experiments.

\*  $p < 0.05$  compared to control.

Figure 5 Constitutively active Akt action on I $\kappa$ B activity and COX-2 protein expression. RL 95-2 cells were transfected with constitutively active (CA) Akt expression vector or control vector and (A) Akt protein, (B) phospho-Akt, (C) COX-2, (D) Phospho-I $\kappa$ B et (E) I $\kappa$ B protein levels were measured by Western analysis.  $\beta$ -actin was used as control to correct for loading. Densitometric analyses were performed using BIO-RAD gel doc system and are presented as a ratio (value/ $\beta$ -actin). Data represent the mean  $\pm$  SEM of 4 independent experiments. \*  $p < 0.05$  compared to control.

Figure 6 Dominant negative Akt action on I $\kappa$ B activity. RL 95-2 expressing phospho-Akt cells were transfected with Akt dominant negative (DN) vector or control vector and (A) phospho-I $\kappa$ B and (B) I $\kappa$ B protein levels were measured by Western analysis.  $\beta$ -actin was used as control to correct for loading. Densitometric analyses were performed using BIO-RAD gel doc system and are presented as a ratio (value/ $\beta$ -actin). (C) Cells were trypsinized, pooled with floating cells and collected for Hoechst nuclear staining to count apoptotic cells. Data represent the mean  $\pm$  SEM of 4 independent experiments.

- $p < 0.05$  compared to control

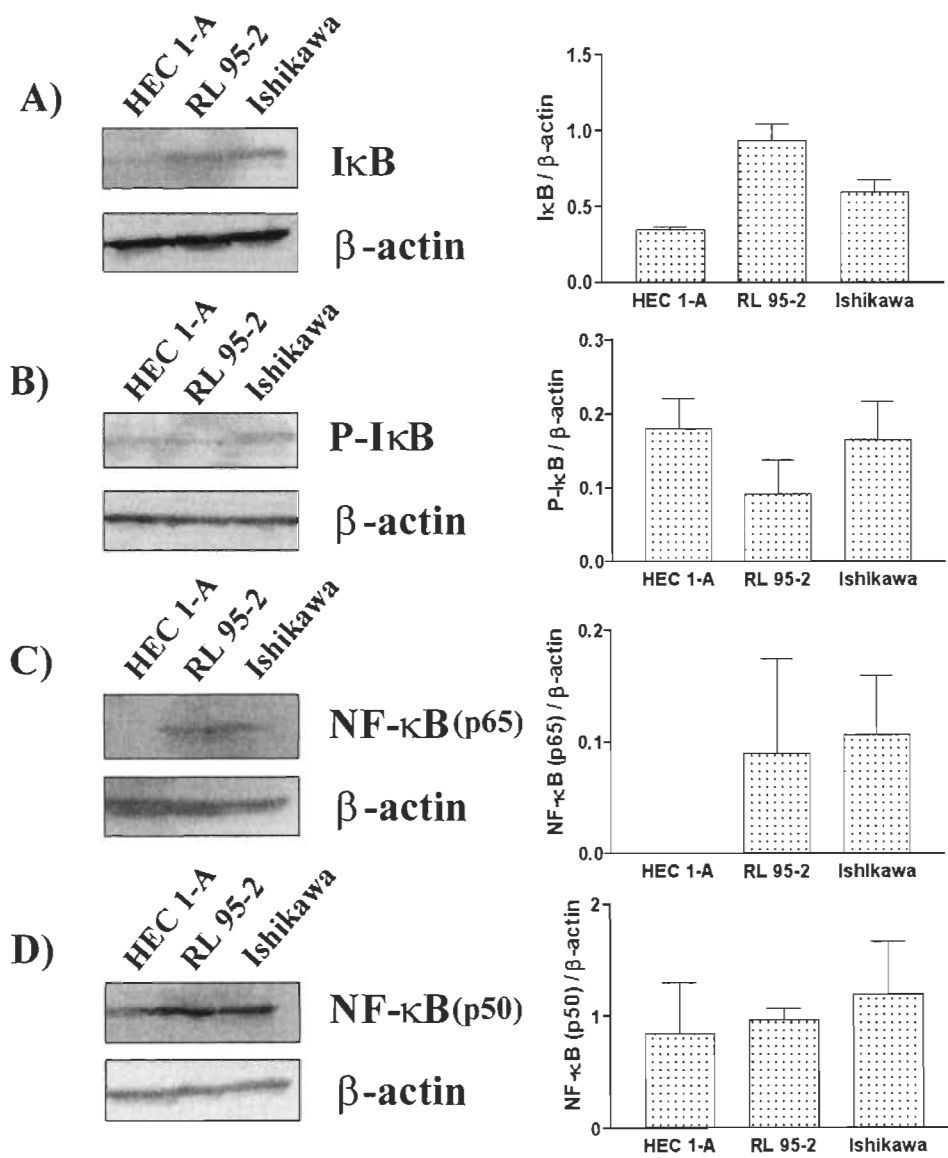
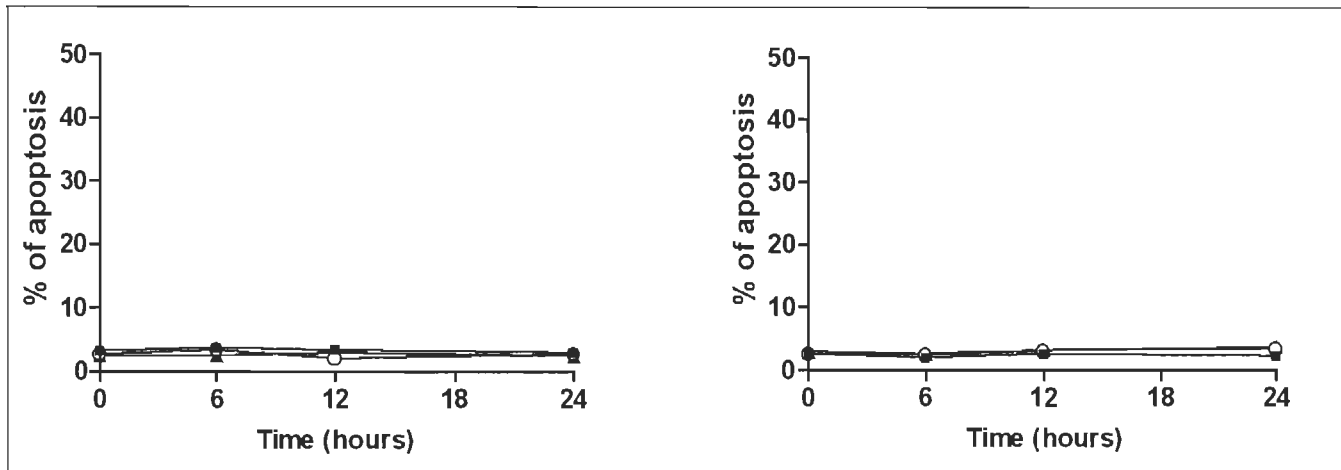


Figure 1

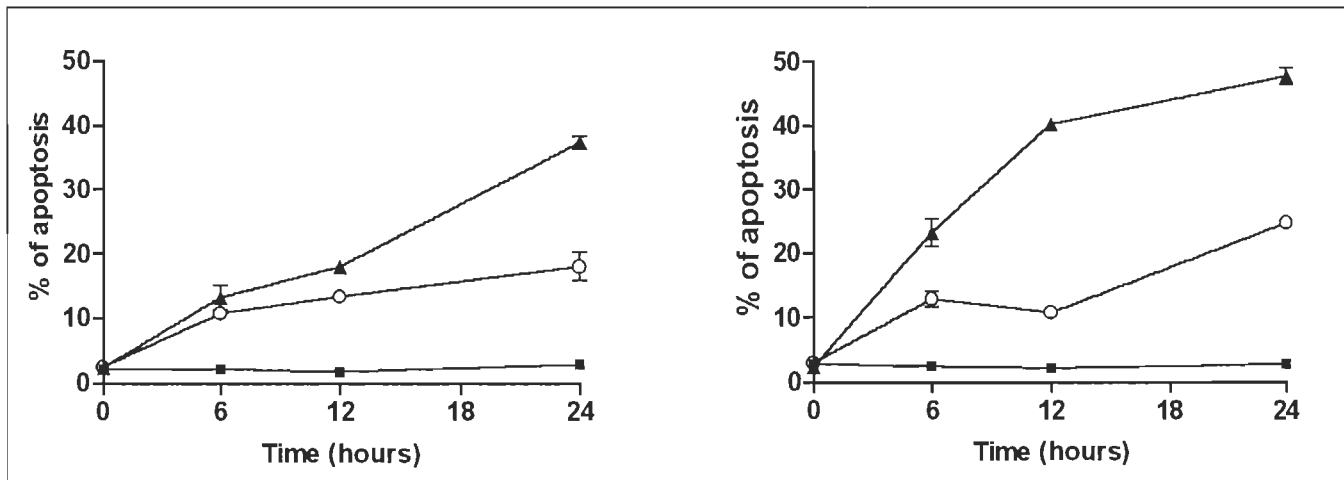
TUNEL

Hoechst

## A) HEC 1-A



## B) RL 95-2



## C) Ishikawa

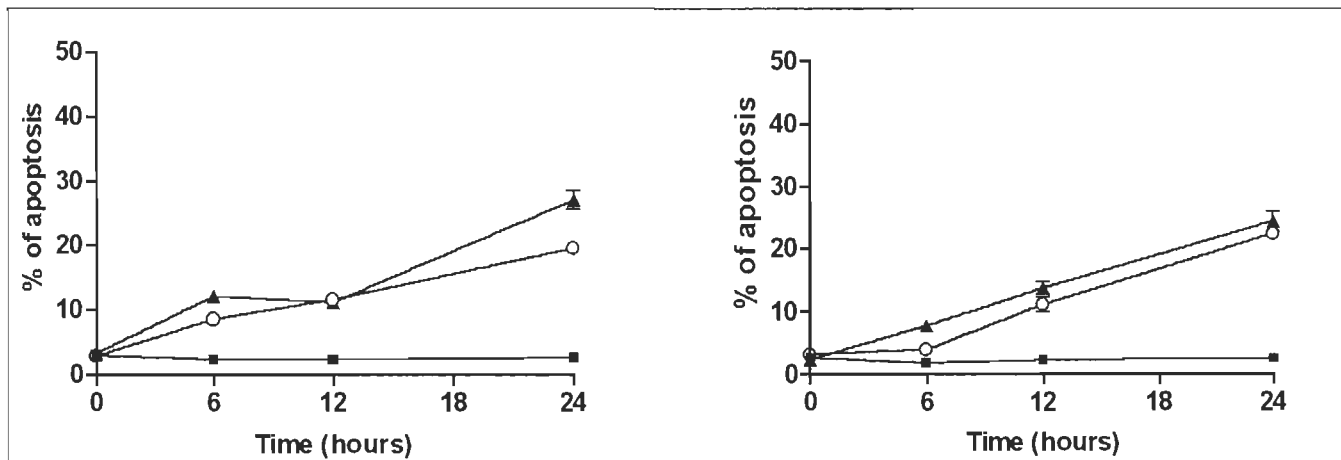
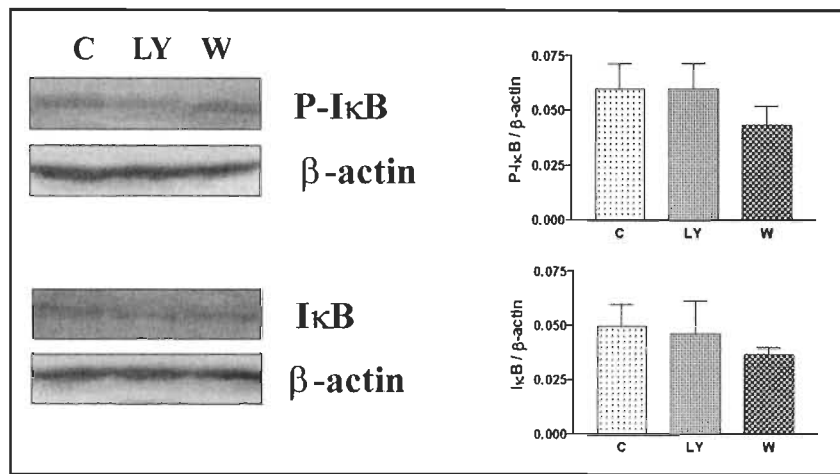
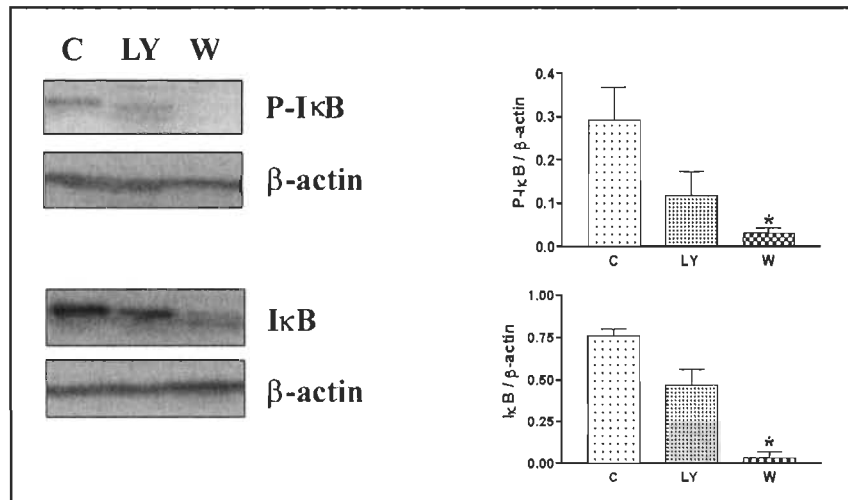


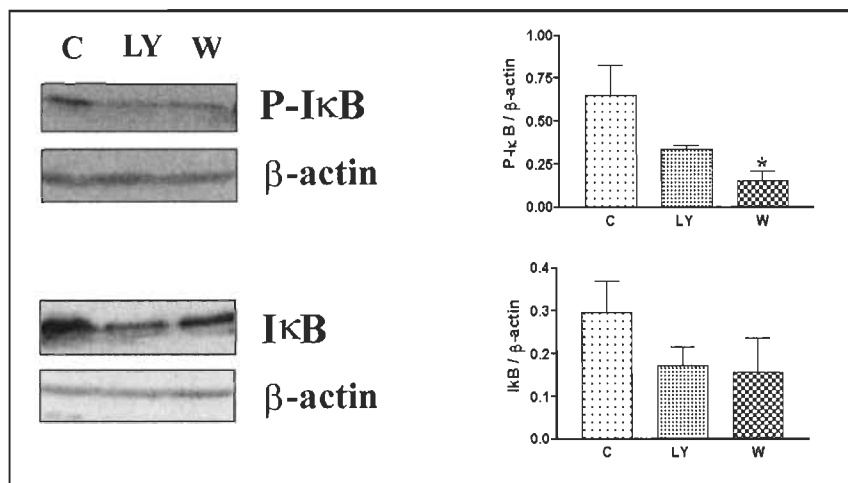
Figure 2



## B) RL-95-2



## C) Ishikawa



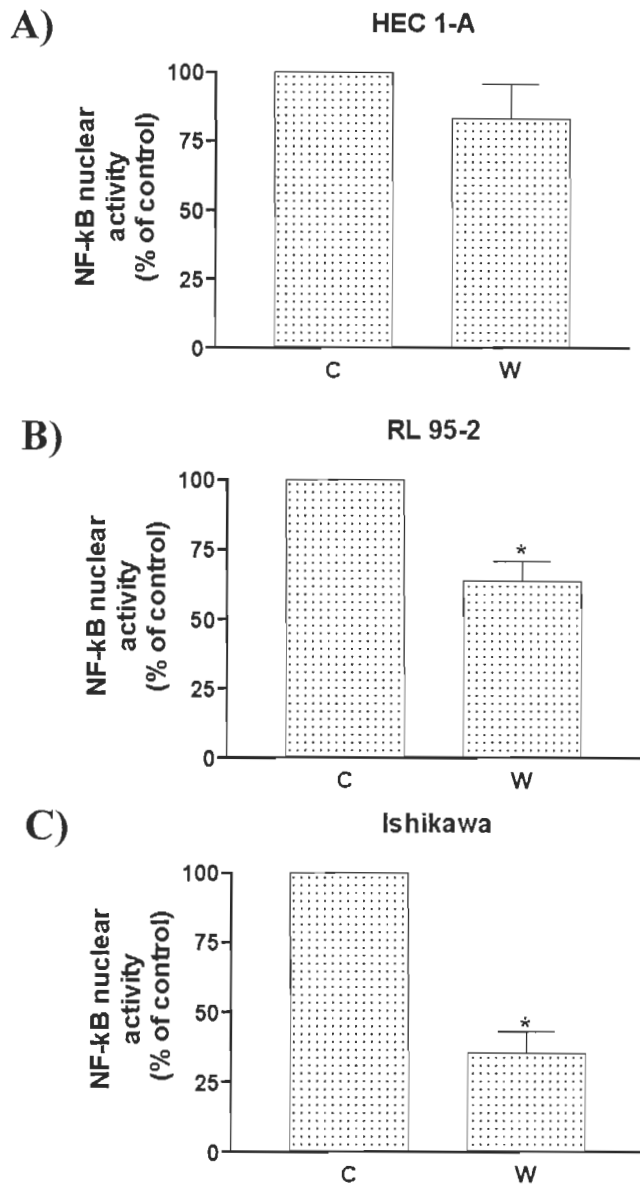


Figure 4

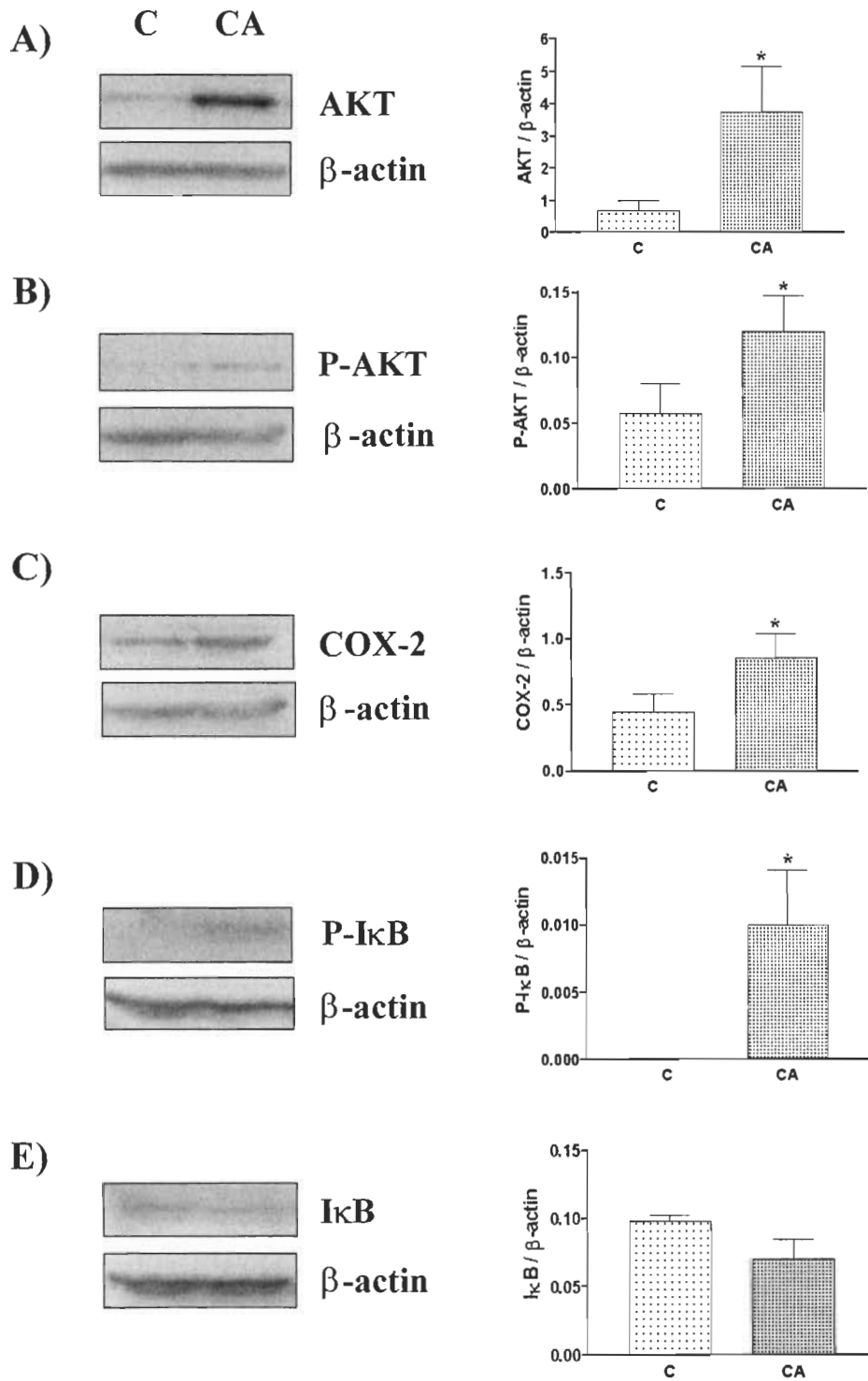


Figure 5



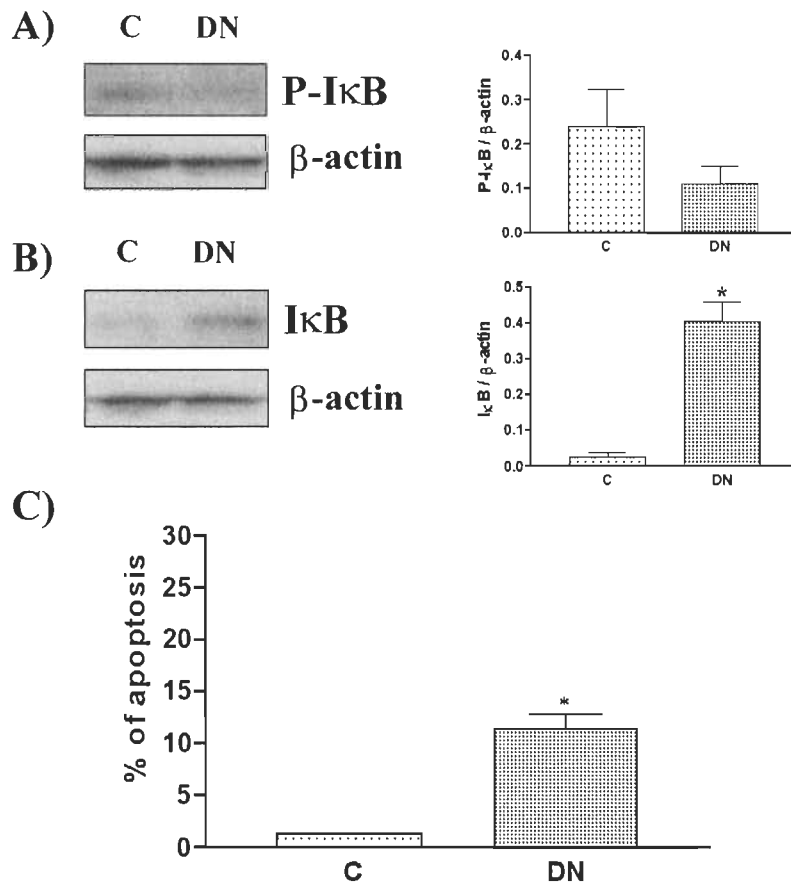


Figure 6

## REFERENCES

1. Wang CY, Mayo MW, Baldwin AS, Jr. TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science* 1996; 274:784-787.
2. Mercurio F, Manning AM. Multiple signals converging on NF-kappaB. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11:226-232.
3. Zandi E, Rothwarf DM, Delhase M, Hayakawa M, Karin M. The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. *Cell* 1997; 91:243-252.
4. Rayet B, Gelinas C. Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene* 1999; 18:6938-6947.
5. Bours V, Dejardin E, Goujon-Letawe F, Merville MP, Castronovo V. The NF-kappa B transcription factor and cancer: high expression of NF-kappa B- and I kappa B-related proteins in tumor cell lines. *Biochem Pharmacol* 1994; 47:145-149.
6. Dejardin E, Deregowski V, Chapelier M, Jacobs N, Gielen J, Merville MP, Bours V. Regulation of NF-kappaB activity by I kappaB-related proteins in adenocarcinoma cells. *Oncogene* 1999; 18:2567-2577.
7. Visconti R, Cerutti J, Battista S, Fedele M, Trapasso F, Zeki K, Miano MP, de Nigris F, Casalino L, Curcio F, Santoro M, Fusco A. Expression of the neoplastic phenotype by human thyroid carcinoma cell lines requires NFkappaB p65 protein expression. *Oncogene* 1997; 15:1987-1994.
8. Herrmann JL, Beham AW, Sarkiss M, Chiao PJ, Rands MT, Bruckheimer EM, Brisbay S, McDonnell TJ. Bcl-2 suppresses apoptosis resulting from disruption of the NF-kappa B survival pathway. *Exp Cell Res* 1997; 237:101-109.
9. Gasparian AV, Yao YJ, Kowalczyk D, Lyakh LA, Karseladze A, Slaga TJ, Budunova IV. The role of IKK in constitutive activation of NF-kappaB transcription factor in prostate carcinoma cells. *J Cell Sci* 2002; 115:141-151.
10. Shao J, Sheng H, Inoue H, Morrow JD, DuBois RN. Regulation of constitutive cyclooxygenase-2 expression in colon carcinoma cells. *J Biol Chem* 2000; 275:33951-33956.
11. Kulkarni S, Rader JS, Zhang F, Liapis H, Koki AT, Masferrer JL, Subbaramaiah K, Dannenberg AJ. Cyclooxygenase-2 is overexpressed in human cervical cancer. *Clin Cancer Res* 2001; 7:429-434.
12. Dannenberg AJ, Altorki NK, Boyle JO, Lin DT, Subbaramaiah K. Inhibition of cyclooxygenase-2: an approach to preventing cancer of the upper aerodigestive tract. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 952:109-115.
13. Bostrom PJ, Aaltonen V, Soderstrom KO, Uotila P, Laato M. Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in urinary bladder carcinomas in vivo and in vitro and

- prostaglandin E2 synthesis in cultured bladder cancer cells. *Pathology* 2001; 33:469-474.
14. Kokawa A, Kondo H, Gotoda T, Ono H, Saito D, Nakadaira S, Kosuge T, Yoshida S. Increased expression of cyclooxygenase-2 in human pancreatic neoplasms and potential for chemoprevention by cyclooxygenase inhibitors. *Cancer* 2001; 91:333-338.
  15. Ristimaki A, Honkanen N, Jankala H, Sipponen P, Harkonen M. Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric carcinoma. *Cancer Res* 1997; 57:1276-1280.
  16. Gupta S, Srivastava M, Ahmad N, Bostwick DG, Mukhtar H. Over-expression of cyclooxygenase-2 in human prostate adenocarcinoma. *Prostate* 2000; 42:73-78.
  17. Howe LR, Subbaramaiah K, Brown AM, Dannenberg AJ. Cyclooxygenase-2: a target for the prevention and treatment of breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2001; 8:97-114.
  18. Sandler RS. Epidemiology and risk factors for colorectal cancer. *Gastroenterol Clin North Am* 1996; 25:717-735.
  19. Ferrandina G, Legge F, Ranelletti FO, Zannoni GF, Maggiano N, Evangelisti A, Mancuso S, Scambia G, Lauriola L. Cyclooxygenase-2 expression in endometrial carcinoma: correlation with clinicopathologic parameters and clinical outcome. *Cancer* 2002; 95:801-807.
  20. Bellacosa A, Testa JR, Staal SP, Tsichlis PN. A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science* 1991; 254:274-277.
  21. 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; 201:475-481.
  22. 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; 88:4171-4175.
  23. Stephens L, Anderson K, Stokoe D, Erdjument-Bromage H, Painter GF, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, McCormick F, Tempst P, Coadwell J, Hawkins PT. Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B. *Science* 1998; 279:710-714.
  24. Hayakawa J, Ohmichi M, Kurachi H, Kanda Y, Hisamoto K, Nishio Y, Adachi K, Tasaka K, Kanzaki T, Murata Y. Inhibition of BAD phosphorylation either at serine 112 via extracellular signal-regulated protein kinase cascade or at serine 136 via Akt cascade sensitizes human ovarian cancer cells to cisplatin. *Cancer Res* 2000; 60:5988-5994.

25. Suzuki Y, Nakabayashi Y, Takahashi R. Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:8662-8667.
26. Davies MA, Koul D, Dhesi H, Berman R, McDonnell TJ, McConkey D, Yung WK, Steck PA. Regulation of Akt/PKB activity, cellular growth, and apoptosis in prostate carcinoma cells by MMAC/PTEN. *Cancer Res* 1999; 59:2551-2556.
27. Gagnon V, St-Germain ME, Parent S, Asselin E. Akt activity in endometrial cancer cells: regulation of cell survival through cIAP-1. *Int.J.Oncol.* 23, 803-810. 2003.
28. Risinger JI, Hayes AK, Berchuck A, Barrett JC. PTEN/MMAC1 mutations in endometrial cancers. *Cancer Res* 1997; 57:4736-4738.
29. Risinger JI, Hayes K, Maxwell GL, Carney ME, Dodge RK, Barrett JC, Berchuck A. PTEN mutation in endometrial cancers is associated with favorable clinical and pathologic characteristics. *Clin Cancer Res* 1998; 4:3005-3010.
30. Tashiro H, Blazes MS, Wu R, Cho KR, Bose S, Wang SI, Li J, Parsons R, Ellenson LH. Mutations in PTEN are frequent in endometrial carcinoma but rare in other common gynecological malignancies. *Cancer Res* 1997; 57:3935-3940.
31. Marsh DJ, Dahia PL, Caron S, Kum JB, Frayling IM, Tomlinson IP, Hughes KS, Eeles RA, Hodgson SV, Murday VA, Houlston R, Eng C. Germline PTEN mutations in Cowden syndrome-like families. *J Med Genet* 1998; 35:881-885.
32. St-Germain ME, Gagnon V, Mathieu I, Parent S, Asselin E. Akt regulates COX-2 mRNA and protein expression in mutated-PTEN human endometrial cancer cells. *Int J Oncol* 2004; In press.
33. Kane LP, Shapiro VS, Stokoe D, Weiss A. Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase. *Curr Biol* 1999; 9:601-604.
34. Schmedtje JF, Jr., Ji YS, Liu WL, DuBois RN, Runge MS. Hypoxia induces cyclooxygenase-2 via the NF-kappaB p65 transcription factor in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1997; 272:601-608.
35. Maehama T, Dixon JE. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* 1998; 273:13375-13378.
36. Piwien-Pilipuk G, Van Mater D, Ross SE, MacDougald OA, Schwartz J. Growth hormone regulates phosphorylation and function of CCAAT/enhancer-binding protein beta by modulating Akt and glycogen synthase kinase-3. *J Biol Chem* 2001; 276:19664-19671.

37. Guo S, Cichy SB, He X, Yang Q, Ragland M, Ghosh AK, Johnson PF, Unterman TG. Insulin suppresses transactivation by CAAT/enhancer-binding proteins beta (C/EBPbeta). Signaling to p300/CREB-binding protein by protein kinase B disrupts interaction with the major activation domain of C/EBPbeta. *J Biol Chem* 2001; 276:8516-8523.
38. Wang L, Shao J, Muhlenkamp P, Liu S, Klepcyk P, Ren J, Friedman JE. Increased insulin receptor substrate-1 and enhanced skeletal muscle insulin sensitivity in mice lacking CCAAT/enhancer-binding protein beta. *J Biol Chem* 2000; 275:14173-14181.
39. Gorgoni B, Caivano M, Arizmendi C, Poli V. The transcription factor C/EBPbeta is essential for inducible expression of the cox-2 gene in macrophages but not in fibroblasts. *J Biol Chem* 2001; 276:40769-40777.
40. Reddy ST, Wadleigh DJ, Herschman HR. Transcriptional regulation of the cyclooxygenase-2 gene in activated mast cells. *J Biol Chem* 2000; 275:3107-3113.
41. Tang Q, Gonzales M, Inoue H, Bowden GT. Roles of Akt and glycogen synthase kinase 3beta in the ultraviolet B induction of cyclooxygenase-2 transcription in human keratinocytes. *Cancer Res* 2001; 61:4329-4332.
42. Dempke W, Rie C, Grothey A, Schmoll HJ. Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy? *J Cancer Res Clin Oncol* 2001; 127:411-417.
43. Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD, DuBois RN. Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Res* 1998; 58:362-366.

## **CHAPITRE IV**

### **CONCLUSIONS GÉNÉRALES**

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

La survie cellulaire est un mécanisme par lequel les cellules cancéreuses exercent leurs propriétés pléothropiques. L'activation du chemin de survie PI 3-K/Akt est un exemple de mécanisme de survie cellulaire. L'activation de Akt par PI 3-K/Akt amène l'activation de quelques voies de survie et de prolifération comme NF- $\kappa$ B (Kane, 1999) et l'inhibition de différents médiateurs apoptotiques comme caspase-9 (Zhou, 2000). D'autre part, PTEN est une phosphatase de lipide importante et impliquée dans la régulation de la phosphorylation de Akt : la présence de la protéine inactive PTEN de type sauvage bloque la phosphorylation de Akt par la déphosphorylation d'un produit de PI 3-K, PIP<sub>3</sub> (Maehama, 1998). En présence de la protéine PTEN mutée, l'activation/phosphorylation se produit de façon constitutive. Dans un premier temps, nous avons démontré que Akt est constitutivement phosphorylée/activée dans les deux lignées cancéreuses ayant PTEN muté (RL 95-2 et Ishikawa). Cependant, la phosphorylation de Akt était absente dans une des deux lignées exprimant PTEN sauvage (HEC 1-A).

Les résultats de cette étude supportent clairement notre hypothèse liant l'activité de Akt avec l'expression de COX-2. Ainsi, nos résultats démontrent que l'expression de l'ARN messager et de la protéine de COX-2 est plus élevée dans les cellules exprimant PTEN muté et que les niveaux de PGE<sub>2</sub> synthétisé est supérieur dans ces deux lignées. À l'opposé, dans les cellules HEC 1-A qui expriment PTEN sauvage, la phosphorylation de Akt est absente et les résultats démontrent que l'expression de COX-2 et la synthèse des PGE<sub>2</sub> sont faibles comparées à celles observées dans les lignées cancéreuses ayant PTEN muté.

Cependant, l'ARN messager et la protéine de COX-1 montrent une expression opposée à celle observée avec COX-2. Bien que l'expression de l'ARN messager de COX-1 a été observée dans les lignées cellulaires exprimant phospho-Akt (RL 95-2 et Ishikawa), la protéine de COX-1 n'a été que faiblement détectée. Ainsi, une régulation possible à un niveau transcriptionnel pourrait être impliquée. Toutefois,

contrairement au gène et à la protéine de COX-2, COX-1 est exprimé fortement dans les cellules phospho-Akt négatives, HEC 1-A. Ces observations suggèrent que la présence de Akt actif/phosphorylé peut réguler de façon directe ou indirecte via d'autres molécules ou facteurs de transcription l'expression du gène de COX-2 tandis que phospho-Akt exerce ses effets inhibiteurs sur la transcription de l'ARN messager de COX-1. L'importance de Akt dans la régulation de COX-1 est présentement sous investigation.

Dans le but de démontrer l'implication du chemin de survie PI 3-K/Akt dans la régulation de COX-2, les cellules exprimant phospho-Akt (RL 95-2 et Ishikawa) ont été traitées avec des inhibiteurs spécifiques de PI 3-K (LY 294002 et Wortmannin). En réponse à ces inhibiteurs, la phosphorylation de Akt diminue dans les cellules RL 95-2 et Ishikawa et il en résulte une réduction de l'expression de l'ARN messager et de la protéine de COX-2. De plus, la présence des inhibiteurs de PI 3-K dans les cellules RL 95-2 et Ishikawa a provoqué la stimulation de l'apoptose. Cependant, ces inhibiteurs n'ont pas d'effet sur les cellules HEC 1-A suggérant que l'activité de PI 3-K est directement responsable de la phosphorylation de Akt, de la régulation de COX-2 et de la production de PGE<sub>2</sub> dans les cellules RL 95-2 et Ishikawa. Même si les résultats démontrent que l'accumulation de PGE<sub>2</sub> après 72 heures de culture est plus importante dans les cellules exprimant phospho-Akt que dans les cellules HEC 1-A, les niveaux demeurent relativement faibles. Il est surprenant de trouver de si faibles niveaux de PGE<sub>2</sub> dans des cellules cancéreuses endométriales mais ceci peut être dû à une plus grande activité catabolique de l'enzyme *15-prostaglandin dehydrogenase*, enzyme qui catabolise les prostaglandines, dans ces cellules. Il est aussi possible que ces cellules doivent se retrouver dans une situation *in vivo* (tumeur) pour récupérer ce caractère. Des études *in vivo* plus approfondies seront donc nécessaires pour vérifier ces hypothèses.

Récemment, il a été démontré que contrairement à Akt1 et Akt2, qui lient tous les membres de la famille de proto-oncogènes TCL1, Akt3 interagit spécifiquement avec TCL1 et non avec MTCPI ou TCL1b (Laine, 2002) suggérant que la phosphorylation de Akt3 s'effectue d'une façon différente de Akt1 et Akt2. Puisque



Akt3 n'est pas exprimé dans les trois lignées de cellules étudiées, il est peu probable que cet isoforme soit impliqué dans la régulation de COX-2 et dans la biosynthèse des prostaglandines. Comme Akt1 et Akt2 sont exprimés dans ces lignées cellulaires, il est possible que les membres de la famille des proto-oncogènes TCL1 puissent aussi être impliqués dans ces processus. Des analyses plus spécifiques devront être réalisées pour répondre à cette question.

Pour déterminer la relation directe entre Akt et l'expression du gène de COX-2, et pour plus tard confirmer l'importance de Akt dans ce processus, des transfections ont été effectuées en utilisant des vecteurs d'expression possédant des ADNc de Akt dominant négatif (DN) ou de Akt actif constitutif (CA). Comme démontré avec les inhibiteurs de PI 3-kinase, les transfections réalisées avec Akt-DN ont permis une diminution de la phosphorylation de Akt, une diminution de l'expression de COX-2 et une induction de l'apoptose dans les cellules PTEN muté RL 95-2. Ces résultats confirment donc que Akt est directement responsable de la régulation de l'expression de COX-2. Il est à noter que les cellules Ishikawa n'ont pas été utilisées dans cette études puisqu'elles étaient difficiles à transfecter même en utilisant différents agents de transfections. À l'opposé, puisque les cellules HEC 1-A étaient aussi difficiles à transfecter, les cellules HeLa, (cellules provenant du cancer d'une malade américaine, Henrietta Lacks – morte en 1951 – qui leur a donné leur nom (à partir des deux premières lettres de ses prénom et nom)) qui sont bien connues, caractérisées et faciles à transfecter, ont été utilisées pour les transfections avec le vecteur Akt-CA. Ainsi, nous avons pu démontrer que les transfections avec le vecteur Akt-CA induisent l'expression de COX-2 et confirment les résultats obtenus par l'inhibition avec le vecteur Akt-DN et les inhibiteurs de PI 3-K. De façon globale, ces études ont permises de démontrer que les hauts niveaux de phospho-Akt et de COX-2 retrouvés dans les lignées cellulaires PTEN muté ne sont pas des coïncidences. Ces résultats suggèrent aussi que Akt pourrait être une cible pour la thérapie génique dans le traitement du cancer endométrial. La thérapie génique consiste en l'introduction dans une cellule d'une séquence d'information génétique permettant au sein de cette cellule, soit la synthèse d'une protéine, soit une modification spécifique de l'expression du programme génétique de cette cellule.

Il a été récemment démontré que la surexpression de XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein) induit la phosphorylation de Akt dans les cellules épithéliales cancéreuses de l'ovaire humain (Asselin, 2001) ainsi que dans les cellules granulosa chez le rat (Asselin, 2001). Un mécanisme similaire pourrait se produire dans le cas de la régulation de la phosphorylation de Akt dans les cellules cancéreuses endométriales. Il a aussi été montré que Akt est une cible directe de la caspase-3 (Asselin, 2001). L'activation de la caspase-3 est une conséquence du déclenchement de l'apoptose. Une situation similaire pourrait être en cause dans la diminution de la protéine totale de Akt par la présence d'inhibiteurs de PI 3-K dans les cellules PTEN muté. Ce sont peut-être des molécules inconnues ou des protéines inhibitrices d'apoptose tel XIAP qui pourraient être impliquées dans ce processus.

L'inhibition spécifique de COX-2 par le NS-398 diminue de façon significative la prolifération des cellules RL 95-2, Ishikawa et de façon surprenante, HEC 1-A. Cependant, l'apoptose est induite seulement dans les cellules exprimant phospho-Akt et COX-2. Il est possible que la concentration de NS-398 ait été suffisante pour inhiber la faible concentration de COX-2 dans les cellules HEC 1-A mais sans induire l'apoptose. Dans plusieurs modèles animaux, le traitement avec des inhibiteurs sélectifs de COX-2 diminue la croissance tumorale (Rioux, 1998 ; Nakatsugi, 1997 ; Kawamori, 1998 ; Sheng, 1997). Ces observations suggèrent que l'expression de COX-2 est un élément-clé dans la progression de la tumeur et dans la prolifération. De plus, nous démontrons pour la première fois que COX-2 pourrait être une cible considérable pour la prévention et/ou la thérapie dans le cas de cancers endométriaux. Il a été établi que COX-2 contribuait à la tumorigénèse par différents mécanismes tels que : 1) l'inhibition de l'apoptose ; 2) l'augmentation de l'angiogénèse ; 3) l'augmentation du potentiel invasif des tumeurs ; 4) la modulation de l'inflammation / immunosuppression ; et 5) la conversion de procarcinogènes en carcinogènes (Dempke, 2001). Une corrélation positive entre l'expression de COX-2 et l'inhibition de l'apoptose a été établie. Celle-ci a aussi été associée à une augmentation des niveaux de PGE<sub>2</sub> qui permet une modulation des facteurs pro- et anti-apoptotiques comme Bcl-2 (Sheng, 1998). De plus, des traitements à la PGE<sub>2</sub> ont permis d'induire la phosphorylation de Akt et l'expression du gène de COX-2

dans les cellules cancéreuses HEC 1-B (Munir, 2000) suggérant une régulation double au niveau du récepteur de PGE<sub>2</sub> et par l'activation du chemin de survie PI 3-K/Akt.

Nous savons que Akt est impliqué dans l'activation du facteur nucléaire NF- $\kappa$ B (Kane, 1999), un régulateur de la transcription de gènes aussi impliqué dans la régulation de COX-2 (Schmedtje, 1997 ; Jobin,1998). NF- $\kappa$ B est un facteur de transcription impliqué plus particulièrement dans l'activation de nombreux gènes intervenant dans la croissance cellulaire (cytokines et leur récepteur), dans l'immunosuppression, l'inflammation et la morphogenèse (Baeuerle, 1988), alors que son mécanisme d'action n'est pas totalement élucidé.

Les habilités de NF- $\kappa$ B pour promouvoir la prolifération et la migration cellulaire, à supprimer l'apoptose sont étroitement liées à la formation tumorale. Il a été démontré que Akt pouvait agir par l'intermédiaire de NF- $\kappa$ B (Shao, 2000) et que COX-2 serait régulé au niveau du promoteur par NF- $\kappa$ B (Schmedtje, 1997). L'activité de NF- $\kappa$ B est étroitement contrôlée par les protéines inhibitrices I $\kappa$ B qui lient NF- $\kappa$ B, forment avec lui un complexe et ainsi, le séquestrent dans le cytoplasme. Certains stimuli comme les cytokines favorisent la phosphorylation de I $\kappa$ B, sa polyubiquitination et sa dégradation qui induisent la translocation de NF- $\kappa$ B vers le noyau. La phosphorylation de Akt induisant l'activation de NF- $\kappa$ B (Kane, 1999), une situation similaire pourrait être responsable dans les deux lignées cellulaires cancéreuses qui expriment phospho-Akt (RL 95-2 et Ishikawa).

Ainsi, les résultats de la seconde étude démontrent la présence de phospho-I $\kappa$ B dans les trois lignées cellulaires. Il n'y a aucune différence en ce qui concerne l'abondance de NF- $\kappa$ B. Cependant, il a été démontré que NF- $\kappa$ B est activé et présent dans le noyau dans les deux lignées cellulaires PTEN mutée exprimant phospho-Akt (RL 95-2 et Ishikawa). Ainsi, PTEN réduit l'activité de Akt et les niveaux de liaison NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B démontrant que l'habilité de PTEN de réguler de

façon négative le chemin PI 3-K/Akt/NF- $\kappa$ B est importante pour son rôle de suppresseur de tumeur.

Nous avons étudié le rôle de PI 3-K dans l'activation de NF- $\kappa$ B. Quelques inhibiteurs de PI 3-K, le LY 294002, la Wortmannin et un vecteur dominant négatif de Akt, ont été utilisés pour déterminer l'implication de PI-3 kinase dans l'activation de NF- $\kappa$ B. L'inhibition de PI 3-K par la Wortmannin et le LY 2940002 bloque la phosphorylation de Akt et de I $\kappa$ B, réduit l'expression de COX-2, active la caspase-3 et induit l'apoptose dans les cellules RL 95-2 et Ishikawa. On sait que Akt est une cible directe de la dégradation par la caspase-3 (Asselin, 2001). Un phénomène semblable pourrait causer la diminution de la protéine totale de Akt et de l'induction de l'apoptose dans les cellules PTEN mutée en présence d'inhibiteurs de PI 3-K. Cependant, les inhibiteurs de PI 3-K n'ont aucun effet sur les cellules HEC 1-A. Les études de transfections effectuées avec le vecteur dominant négatif de Akt bloque la phosphorylation de I $\kappa$ B, augmente l'expression de I $\kappa$ B et résulte à l'activation de l'apoptose. L'utilisation de ces inhibiteurs de PI 3-kinase démontre que PI 3-K et Akt sont requis dans l'activation de NF- $\kappa$ B.

Pour démontrer l'implication de Akt et NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B dans le contrôle de l'expression de COX-2, des transfections ont été effectuées à l'aide d'un vecteur d'expression Akt actif constitutif sur les cellules RL 95-2. Ces transfections ont induit l'expression de COX-2 et confirmé les résultats obtenus dans les études d'inhibition avec le vecteur Akt dominant négatif et avec les inhibiteurs de PI 3-K. De plus, les transfections avec le vecteur Akt actif constitutif ont induit la phosphorylation de I $\kappa$ B. La dégradation subséquente de I $\kappa$ B permet le relâchement et la translocation de NF- $\kappa$ B vers le noyau.

Plusieurs recherches ont suggérées que *CCAAT/enhancer-binding protein beta* (C/EBP $\beta$ ), un facteur de transcription, serait impliqué dans l'activation de Akt (Piwien-Pilipuk, 2001 ; Guo, 2001 ; Wang, 2000). Des études ont démontré que

C/EBP $\beta$  est un facteur de transcription essentiel dans la régulation du gène de COX-2 (Gorgoni, 2001 ; Reddy, 2000). Par conséquent, l'activation de C/EBP $\beta$  par Akt pourrait être responsable de l'expression du gène de COX-2 (Gorgoni, 2001; Reddy, 2000) suggérant que l'activation de C/EBP $\beta$  par Akt pourrait être partiellement responsable de l'expression du gène.

D'autres études montrent que l'inactivation de GSK-3 $\beta$  par l'activation de Akt joue un rôle important dans l'induction de la transcription de COX-2 (Tanq, 2001). GSK-3 $\beta$  a été initialement identifiée comme étant un enzyme régulant la synthèse de glycogène en réponse à l'insuline. Cette kinase phosphoryle et inactive la glycogène synthétase. GSK-3 $\beta$  est un élément critique dans le chemin de survie en aval de Akt. Ainsi, C/EBP $\beta$  et GSK-3 $\beta$  pourraient être deux différentes cibles de la phosphorylation de Akt qui permettent l'activation de la survie cellulaire par l'expression de COX-2 et par la sécrétion de PGE<sub>2</sub>.

Ainsi, des analyses supplémentaires concernant l'activation/phosphorylation de GSK-3 $\beta$  et C/EBP $\beta$  permettront de comprendre davantage les mécanismes complexes par lesquels Akt régule l'expression du gène de COX-2 dans les cellules cancéreuses endométriales humaines.

Aussi, l'utilisation des souris nu/nu a été envisagée pour des études ultérieures. En effet, des cellules cancéreuses endométriales seront injectées dans le dos de ces souris. Après deux à trois semaines suivant l'inoculation, les souris seront euthanasiées et les tumeurs formées seront excisées et traitées spécifiquement pour de futures analyses histologiques pour confirmer la régulation de certaines protéines étudiées. De plus, des biopsies physiologiques et pathologiques de patientes atteintes de cancer endométrial seront également utiles pour déterminer l'incidence de COX-2 dans la progression de la tumeur.

En résumé, les découvertes majeures que nous avons réalisées dans ces études ont contribué à une percée dans le domaine de la signalisation cellulaire et de l'apoptose dans les cellules cancéreuses endométriales. La présente étude démontre le rôle crucial de Akt dans la régulation de COX-2 et dans la sécrétion de PGE<sub>2</sub> dans les cellules cancéreuses endométriales humaines. L'importance de COX-2 et de PGE<sub>2</sub> dans le processus de cancérisation et dans la progression des tumeurs a été démontré dans plusieurs types de cancer. Ici, nous établissons l'importance de ces médiateurs dans les cellules cancéreuses endométriales.

De plus, le rôle important de Akt dans la régulation de l'expression de NF-κB dans les cellules cancéreuses endométriales humaines a été démontré. Les résultats démontrent que Akt induit le gène de COX-2 et l'expression de sa protéine par l'intermédiaire du chemin NF-κB/IκB. Plusieurs études ont démontré que NF-κB est dysrégulé dans plusieurs types de cancer et que son inhibition serait une thérapie logique ou un traitement adjuvant dans la cure de certains cancers.

**BIBLIOGRAPHIE**

Ahmed, N.N., Grimes, H.L., Bellacosa, A., Chan, T.O., Tsiichlis, P.N. (1997) "Transduction of interleukin-2 antiapoptotic and proliferative signals via Akt protein kinase", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 : 3627-3632.

Alessi, D.R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P., Hemmings, B.A. (1996) "Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1" *EMBO J.* 15 : 6541-51.

Almog, N. and Rotter, V. (1997) "Involvement of p53 in cell differentiation and development", *Biochim. Biophys. Acta.* 1333 : 1-27.

Alnemri, E.S. , Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W., Yuan, J. (1996) "Human ICE/CED-3 protease nomenclature", *Cell* 87-171.

Altomare, D.A., Guo, K., Cheng, J.Q., Sonoda, G., Walsh, K. and Tets, J.R. (1995) "Cloning, chromosomal localization and expression analysis of the mouse Akt oncogene", *Oncogene* 11 : 1055-1060.

Aoki, M., Batista, O., Bellacosa, A., Tsiichlis, P. and Vogt, P.K. (1998) "The Akt kinase : Molecular determinants of oncogenicity", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 : 14950-14955.

Asselin, E., Drolet, P., Fortier, M.A. (1997) "Cellular mechanisms involved during oxytocin-induced prostaglandin F2 alpha production in endometrial epithelial cells in vitro: role of cyclooxygenase-2", *Endocrinology* 138 : 4798-805.

Asselin, E., Mills, G.B. and Tsang, B.K. (2001) "XIAP regulates Akt activity and caspase-3-dependent cleavage during cisplatin-induced apoptosis in human ovarian epithelial cancer cells", *Cancer Res.* 61 : 1862-1868.

Asselin, E., Wang, Y. and Tsang, B.K. (2001) "X-linked inhibitor of apoptosis protein activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in rat granulosa cells during follicular development", *Endocrinology* 142 : 2451-2457.

Ashby, B. (1998) "Co-expression of prostaglandin receptors with opposite effects : a model for homeostatic control of autocrine and paracrine signaling", *Biochem. Pharmacol.* 55 : 239-246.

Askew, D.A., Ashmun, R.A., Simmonds, B.C., Cleveland, J.L. (1991) "Constitutive c-myc and IL-3 dependent myeloid cell line suppresses cell cycle arrest and accelerates apoptosis", *Oncogene* 6 : 1915-22.

Baeuerle, P.A., and Baltimore, D. (1988) "Activation of DNA-binding activity in an apparently cytoplasmic precursor of the NF-kappa B transcription factor", *Cell* 53 : 211-217.

Barnett, J., Chow, J., Ives, D., Chiou, M., Mackenzie, R., Osen, E., Nguyen, B., Tsing, S., Bach, C., Sigal, E. and Ramesha, C. (1994) "Purification, characterization and selective inhibition of human prostaglandin G/H synthase 1 and 2 expressed in the baculovirus system", *Biochim. Biophys. Acta* 1209, 130-139.

Bellacosa, A., Franke, T.F., Portal, E.G., Datta, K., Taguchi, T., Gardner, J., Cheng, J.Q., Testa, J.R. and Tsichlis, P.N. (1993) "Structure, expression and chromosomal mapping of c-akt : Relationship to  $\gamma$ -akt and its implications", *Oncogenes* 8 : 745-754.

Bellacosa, A., Feo, D.D., Godwin, A.K., Bell, D.W., Cheng, J.Q., Altomare, D.A., Wan, M., Dubeau, L., Scambia, G., Masciullo, V., Ferrandina, G., Panici, P.B., Mancuso, S., Neri, G. and Testa, J.R. (1995) "Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas", *Int. J. Cancer.* 64 : 280-285.

Boldin, M.P., Goncharov, T.M., Goltsev, Y.V. and Wallach, D. (1996) "Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1 and TNF receptor-induced cell death", *Cell* 85 : 803-815.



Boolbol, S.K., Dannenberg, A.J., Chadburn, A., Martucci, C., Guo, X.J., Ramonetti, J.T., Abreu-Goris, M., Newmark, H.L., Lipkin, M.L., DeCosse, J.J. and Bertagnolli, M.M. (1996) "Cyclooxygenase-2 overexpression and tumor formation are blocked by sulindac in a murine model of familial adenomatous polyposis", *Cancer Res.* 56 : 11 :2556-2560.

Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J., Greenberg, M.E. (1999) "Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor", *Cell* 96 : 857.

Cardone, M.H., Roy, N., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., Franke, T.F., Stanbridge, E., Frisch, S., Reed, J.C. (1998) "Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation", *Science* 282 : 1318.

Chang, H.W., Aoki, M., Fruman, D., Auger, K.R., Bellacosa, A., Tsihchlis, P.N., Cantley, L.C., Roberts, T.M. and Vogt, P.K. (1997) "Transformation of chicken cells by the gene encoding the catalytic subunit of PI 3-kinase", *Science.* 276 : 1848-1850.

Cheng, J.Q., Godwin, A.K., Bellacosa, A., Taguchi, T., Frank, T.P., Hamilton, T.C., Tsihchlis, P.N., Testa, J.R. (1992) "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 USA* 89 : 9267-9271.

Cheng, J.Q., Ruggeri, B., Klein, W.M., Sonoda, G., Altomare, D.A., Watson, D.K. and Testa, J.R. (1996) "Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93 : 3636-3641.

Coleman, R.A., Smith, W.L. and Narumiya, S. (1994) "Pharmacology classification of prostanoid receptors : properties, distribution and structure of the receptors and their subtypes", *Pharmacol. Rev.* 46 : 205-229.

Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., Greenberg, M.E. (1997) "Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery", *Cell* 91 : 231.

Dejardin, E., Deregowski, V., Chapelier, M., Jacobs, N., Gielen, J., Merville, M.P., Bours, V. (1999) "Regulation of NF-kappaB activity by I kappaB-related proteins in adenocarcinoma cells", *Oncogene* 18 : 2567-2577.

Del, P.L., Gonzalez-Garciam, M., Page, C., Herrera, R., Nunez, G. (1997) "Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt", *Science* 278 : 687.

Dempke, W., Rie, C., Grothey, A., Schmoll, H.J. (2001) "Cyclooxygenase-2 : a novel target for cancer chemotherapy ? ", *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 127: 411-417.

Dijkers, P.F., Birkenkamp, K.U., Lam, E.W., Thomas, N.S., Lammers, J.W., Koenderman, L., and Coffey, P.J. (2002) "FKHR-L1 can act as a critical effector of cell death induced by cytokine withdrawal: protein kinase B-enhanced cell survival through maintenance of mitochondrial integrity", *J.Cell Biol.* 156 : 531-542.

Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R., and Zeiher, A.M. (1999) "Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation", *Nature* 399: 601-605.

Esteller, M., Xercavins, J. and Reventos, J. (1999) "Advances in the molecular genetics of endometrial cancer", *Oncology Reports* 6 : 1377-1382.

Evan, G, and Littlewood, T.(1998) "A matter of life and cell death", *Science* 281 : 1317-1322.

Fisher, B., Costantino, J.P., Redmond, C.K., Fisher, E.R., Wickerman, D.L., Cronin, W.M. (1994) "Endometrial cancer in tamoxifen-treated breast cancer patients : findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) B-14", *J. Natl Cancer Inst.* Apr. 6 ; 86 (7) : 527-37.

Fulton, D., Gratton, J.P., McCabe, T.J., Fontana, J., Fujio, Y., Walsh, K., Franke, T.F., Papapetropoulos, A., and Sessa, W.C. (1999) "Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt", *Nature* 399 : 597-601.

Gasparian, A.V., Yao, Y.J., Kowalczy, D., Lyakh, L.A., Karseladze, A., Slaga, T.J., and Budunova, I.V. (2002) "The role of IKK in constitutive activation of NF-kappaB transcription factor in prostate carcinoma cells", *J. Cell Sci.* 115 : 141-151.

Giovannucci, E., Egan, K.M., Hunter, D.J., Stampfer, M.J., Colditz, G.A., Willett, W.C., Speizer, F.E. (1995) "Aspirin and the risk of colorectal cancer in women", *N. Engl. J. Med.* 333 : 609-14.

Gordon, M.D. and Ireland, K. (1994) "Pathology of hyperplasia and carcinoma of the endometrium", *Semin. Oncol.* 21 : 64-70.

Gorgoni, B., Caivano, M., Arizmendi, C. and Poli, V. (2001) "The transcription factor C/EBPbeta is essential for inducible expression of the COX-2 gene in macrophages but not in fibroblasts", *J. Biol. Chem.* 276 : 40769-40777.

Gottardis, M.M., Robinson, S.P., Satyaswaroop, P.G., Jordan, V.C., (1998) "Contrasting actions of tamoxifen on endometrial and breast tumor growth in the athymic mouse. ", *Cancer Res.* 48: 812-815.

Grady, D. and Ernster, V.L. (1997) "Hormone replacement therapy and endometrial cancer : are current regimens safe ? ", *J. Nat. Cancer Inst.* 89 : 1110-1116.

Guo, S., Cichy, S.B., He, X., Yang, Q., Ragland, M., Ghosh, A.K., Johnson, P.F. and Unterman, T.G. (2001) "Insulin suppresses transactivation by CAAT/enhancer-binding proteins beta (C/EBPbeta). Signaling to p300/CREB-binding protein by protein kinase B disrupts interaction with the major activation domain of C/EBPbeta", *J. Biol. Chem.* 276 : 8516-8523.

Gurpide, E. (1991) : "Endometrial cancer : biochemical and clinical correlates", J Natl Cancer Inst 20 : 405-416.

Haas-Kogan, D., Shalev, N., Wong, M., Mills, G., Yount, G., Stokoe, D. (1998) "Protein kinase B (PKB/Akt) activity is elevated in glioblastoma cells due to mutation of the tumor suppressor PTEN/MMAC", Curr. Biol. 8 : 1195-8.

Hansen, R. and Oren, M. (1997) "p53 : from inductive signal to cellular effect", Curr. Opin. Genet. Dev. 7 : 46-51.

Harris, R.E., Namboodiri, K.K., Farrar, W.B. (1996) "Nonsteroidal antiinflammatory drugs and breast cancer", Epidemiology 2 : 203-5.

Hengartner, O.M. (2000) "The biochemistry of apoptosis", Nature 407 : 770-771.

Hendrickson, M., Ross, J., Eifel, P., Martinez, A., Kempson, R. (1982) "Uterine papillary serous carcinoma : a highly form of endometrial adenocarcinoma ", Am. J. Surg. Pathol. Mar ; 6(2) : 93-108.

Herrmann, J.L, Beham, A.W., Sarkiss, M., Chiao, P.J., Rands, M.T. (1997) "Bcl-2 suppresses apoptosis resulting from disruption of the NF-kappa B survival pathway", Exp. Cell Res. 237 : 101-109.

Hickman, J.A. (1992) "Apoptosis induced by anticancer drugs", Cancer Metas. Rev. 11 :121-39.

Howe, L.R., Subbaramaiah, K., Brown, A.M., Dannenberg, A.J.. (2000) "Cyclooxygenase-2: a target for the prevention and treatment of breast cancer", Endocr. Relat. Cancer 8 : 97-114.

Itoh, N., Yonehara, S., Ishii, A., Mizushima, S.I., Samejima, M., Hase, A., Seto, Y., Nagata, S.. (1991) "The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis", Cell 66 : 233-243.

Jobin, C., Morteau, O., Han, D.S., and Balfour Sartor, R. (1998) " Specific NF-kappaB blockade selectively inhibits tumour necrosis factor-alpha-induced COX-2 but not constitutive COX-1 gene expression in HT-29 cells", *Immunology* 95 : 537-543.

Kane, L.P., Shapiro, V.S., Stokoe, D., Weiss, A. "Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase", *Curr Biol* 1999; 9:601-604.

Kawamori, T., Rao, C.V., Seibert, K. and Reddy, B.S. (1998) "Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, against colon carcinogenesis", *Cancer Res.* 58 : 409-412.

Kennedy, S.G., Wagner, A.J., Conzen, S.D., Jordan, J., Bellacosa, A., Tsichlis, P.N., Hay. (1997) "The PI 3-kinase/Akt signaling pathway delivers an anti-apoptotic signal", *Genes Dev.* 11 : 701-713.

Kennedy, T.G. (1985) "Evidence for the involvement of prostaglandins throughout the decidual cell reaction in the rat", *Biol. Reprod.* 33 : 140.

Kerr, J.F., Winterford, C.M., Harmon, B.V. (1994) "Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy", *Cancer* 73 : 2013-2026.

Kerr, J.F.R, Wyllie, A.H., Currie, A.R. (1972) "Apoptosis : a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics", *Br J Cancer* 26 : 239-57.

Ko, L.J. and Prives, C. (1996) "p53 : puzzle and paradigm", *Genes Dev.* 10 : 1054-1072.

Kujubu, D.A., Fletcher, B.S., Varnum, B.C., Lim, R.W. and Herschman, H.R. (1991) "TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3

cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue", *J. Biol. Chem.* 266, 12866-12872.

Kulik, G., Klippel, A., Weber, M.J. (1997) "Antiapoptotic signalling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt", *Mol. Cell Biol.* 17 : 1595-1606.

Kurman, R.J., Zaino, R.J. and Norris, H.J. (1994) "Endometrial carcinoma. In : Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract", Kurman RJ (ed). Springer-Verlag, New York, USA pp 439-486.

Laine, J., Kunstle, G., Obata, T., Noguchi, M. (2002) "Differential regulation of Akt kinase isoforms by the members of the TCL1 oncogene family", *J Biol Chem* 277:3743-3751.

Lang, D., Miknyoczki, S.J., Huang, L. and Ruggeri, B.A. (1998) "Stable reintroduction of wild-type p53 causes the induction of apoptosis and neuroendocrine-like differentiation in human ductal pancreatic carcinoma cells", *Oncogene* 16 : 1593-1602.

Langenbach, R., Morham, S.G., Tiano, H.F., Loftin, C.D., Ghanayem, B.I., Chylada, P.C., Mahler, J.F., Lee, C.A., Goulding, E.H., Kluckman, K.D., Kim, H.S. and Smithies, O. (1995) "Prostaglandin synthase I gene disruption in mice reduces arachidonic acid-induced inflammation and indomethacin-induced gastric ulceration", *Cell* 83, 483-492.

Levine, A.J. (1997) "p53, the cellular gatekeeper for growth and division". *Cell* 88 : 323-331.

Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podsypanina, K., Bose, S., Wang, S.I., Puc, J., Miliaresis, C., Rodgers, L., McCombie, R., Bigner, S.H., Giovanella, B.C., Ittmann, M., Tycko, B., Hibshoosh, H., Wigler, M.H., Parson, R.. (1997) "PTEN, a putative protein

tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer", *Science* 275 : 1943-7.

Lim, H., Paria, B.C., Das, S.K., Dinchuk, J.E., Langenbach, R., Trzaskos, J.M., Dey, S.K. (1997) "Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice", *Cell* 91 : 197.

Madrid, L.V., Wang, C.Y., Guttridge, D.C., Schottelius, A.J., Baldwin, A.S., Mayo, M.W. (2000) "Akt suppresses apoptosis by stimulating the transactivation potential of the RelA/p65 subunit of NF-kappaB", *Mol. Cell. Biol.* 20 : 1626-1638.

Maehama, T. and Dixon, J.E. (1998) "The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate", *J. Biol. Chem.* 273 : 13375.

Mant, J.W. and Vessy, M.P. (1994) "Ovarian and endometrial cancers", *Cancer Surv.* 20 : 287-307.

Marsh, D.J., Dahia, P.L., Caron, S., Kum, J.B., Frayling, I.M., Tomlinson, I.P., Hughes, K.S., Eeles, R.A., Hodgson, S.V., Murday, V.A., Houlston, R., Eng, C. (1998) "Germline PTEN mutations in Cowden syndrome-like families", *J. Med. Genet.* 35 : 881.

Morham, S.G., Langenbach, R., Loftin, C.D., Tiano, T.F., Vouloumanos, N., Jennette, J.C., Mahler, J.F., Kluckman, K.D., Ledford, A., Lee, C.A. and Smithies, O. (1995) "Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse", *Cell* 83, 473-482.

Mourits, M.J., De Vries, E.G., Willemse, P.H., Ten Hoor, K.A., Hollema, H, Van der Zee, A.G. (2001) Tamoxifen treatment and gynecologic side effects : a review", *Obstet Gynecol.* 97 : 855-66.

Munir, I., Fukunaga, K., Kanasaki, H., Miyazaki, K., Ohba, T., Okamura, H. and Miyamoto, E. (2000) " Expression of cyclooxygenase 2 by prostaglandin E2 in

human endometrial adenocarcinoma cell line HEC 1-B", *Biology of reproduction*. 63 : 933-941.

Muzio, M., Chinnaiyan, A.M., Kischkel, F.C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J.D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Krammer, P.H., Peter, M.E. and Dixit, V.M. (1996) "FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex", *Cell* 85 : 817-827.

Nakatami, K., Sakaue, H., Thompson, D.A., Weigel, R.J. and Roth, R.A. (1999) "Identification of a human Akt3 which contains the regulatory serine phosphorylation site", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257 : 906-910.

Nakatami, K., Thompson, D.A., Barthel, A., Sakaue, H., Liu, W., Weigel, R.J. and Roth, R.A. (1999) "Up-regulation of Akt3 in estrogen receptor-deficient breast cancers and androgen-independent prostate cancer lines", *J. Biol. Chem.* 274 : 21528-21532.

Nakatsugi, S., Fukutake, M., Takahashi, M., Fukuda, K., Isoi, T., Taniguchi, Y., Sugimura, T. and Wakabayashi, K. (1997) "Suppression of intestinal polyp development by nimesulide, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, in Min mice", *Jpn.J.Cancer Res.* 88, 1117-1120.

Nagata, S. and Golstein, P. (1995) "The Fas death factor", *Science* 267 : 1449-1456.

Negishi, M., Sugimoto, Y., Ichikawa, A. (1995) "Molecular mechanisms of diverse actions of prostanoid receptors", *Biochim. Biophys Acta.* 1259 : 109-119.

Nicholson, D.W. (1999) "Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death", *Cell Death Differ.* 6 : 1028-1042.

O'Banion, M., Sadowski, H.B., Winn, V. and Young, D.A. (1991) "A serum- and glucocorticoid-regulated 4-kilobase mRNA encodes a cyclooxygenase-related protein", *J. Biol. Chem.* 266, 23261-23267.



Palombella, V.J., Rando, O., Goldberg, A. and Maniatis, T. (1994) "The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B", *Cell* 78 : 773-785.

Panayotou, G., Waterfield, M.D. (1993) "The assembly of signalling complexes by receptor tyrosine kinases", *Bioessays* 15 : 171.

Pap, M. and Cooper, G.M. (1998) "Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt cell survival pathway", *J.Biol.Chem.* 273 : 19929-19932.

Pastorino, J.G., Tafani, M. and Farber, J.L. (1999) "Tumor necrosis factor induces phosphorylation and translocation of BAD through a phosphatidylinositide-3-OH kinase-dependent pathway", *J.Biol.Chem.* 274 : 19411-19416.

Piwien-Pilipuk, G., Van Mater, D., Ross, S.E., MacDougald, O.A. and Schwartz, J. (2001) "Growth hormone regulates phosphorylation and function of CCAAT/enhancer-binding protein beta by modulating Akt and glycogen synthase kinase-3", *J.Biol.Chem.* 276 : 19664-19671.

Ramaswamy, S., Nakamura, N., Vasquez, F., Batt, D.B., Perera, S., Roberts, T.M., Sillers, W.R. (1999) "Regulation of G1 progression by the PTEN tumor suppressor protein is linked to inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 : 2110-5.

Rasheed, B.K., Stenzel, T.T., McLendon, R.E., Parsons, R., Friedman, A.H., Friedman, H.S., Bigner, D.D., Bigner, S.H. (1997) "PTEN gene mutations are seen in high-grade but not in low-grade gliomas", *Cancer Research* 57 : 4187.

Rayet, B. and Gelinas, C. (1999) "Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer", *Oncogene*, 18 : 6938-6947.

Reddy, S.T., Wadleigh, D.J. and Herschman, H.R. (2000) "Transcriptional regulation of the cyclooxygenase-2 gene in activated mast cells", *J.Biol.Chem.* 275 : 3107-3113.

Rioux, N. and Castonguay, A. (1998) "Prevention of NNK-induced lung tumorigenesis in A/J mice by acetylsalicylic acid and NS-398", *Cancer Res.* 58 : 5354-5360.

Sakurada, A., Hamada, H., Fukushige, S., Yokoyama, T., Yoshinaga, K., Furukawa, T., Sato, S., Yajima, A., Sato, M., Fujimura, S., Horii, A. (1999) "Adenovirus-mediated delivery of the PTEN gene inhibits cell growth by induction of apoptosis in endometrial cancer", *Int. J. Oncol.* 15 : 1069.

Schmedtje, J.F., Ji, Y.S., Liu, W., DuBois, R.N., and Runge, M.S. (1997) "Hypoxia induces cyclooxygenase-2 via the NF-kappaB p65 transcription factor in human vascular endothelial cells", *J. Biol.Chem.* 272 : 601-608.

Schreinemachers, D.M. and Everson, R.B. (1994) "Aspirin use and lung, colon, and breast cancer incidence in a prospective study", *Epidemiology* 5 : 138-46.

Shayesteh, L., Lu, Y., Kuo, W.L., Baldocchi, R., Godfrey, T., Collins, C., Pinket, D., Powell, B., Mills, G.B. and Gray, J.W. (1999) "PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer", *Nat. Genet.* 21 : 99-102.

Shao, J., Sheng, H., Inoue, H., Morrow, J.D., DuBois, R.N. (2000) "Regulation of constitutive cyclooxygenase-2 expression in colon carcinoma cells", *J. Biol. Chem.* 275 : 33951-6.

Sheng, H., Shao, J., Kirkland, S.C., Isakson, P., Coffey, R.J., Morrow, J., Beauchamp, R.D. and DuBois, R.N. (1997) "Inhibition of human colon cancer cell growth by selective inhibition of cyclooxygenase-2", *J.Clin.Invest* 99 : 2254-2259.

Sheng, H., Shao, J., Morrow, J.D., Beauchamp, R.D. and DuBois, R.N. (1998) "Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells", *Cancer Res.* 58 : 362-366.

Shoff, S.M. and Newcomb, P.A. (1998) "Diabetes, body size, and risk of endometrial cancer". *Am. J. Epidemiol.* 148 : 234-240.

Smith, W.L. and Marnett, L.J. (1991) " Prostaglandin endoperoxide synthase: structure and catalysis", *Biochim. Biophys. Acta* 1083, 1-17.

Soddu, S., Blandino, G., Scardigli, R., Coen, S., Marchetti, A., Rizzo, M.G., Bossi, G., Cimino, L., Crescenzi, M. and Sacchi, A. (1996) "Interference with p53 protein inhibits hematopoietic and muscle differentiation", *J. Cell Biol.* 134 : 193-204.

Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T., Litwack, G. and Alnemri, E.S. (1996) "Molecular ordering of the Fas-apoptotic pathway: the Fas/APO-1 protease Mch5 is a CrmA-inhibitable protease that activates multiple Ced-3/ICE-like cysteine proteases", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93 : 14486-14491.

Staal, S.P. (1987) "Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: Amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84 : 5034-5037.

Steck, P.A., Pershouse, M., Jasser, S.A., Yung, W.K., Lin, H., Ligon, A., Langford, L.A., Baumgard, M.L., Hattier, T., Davis, T., Frye, C., Hu, R., Swedlund, B., Teng, D.H., Tavtigian, S.V. (1997) "Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers", *Nature Genet.* 15 : 365-62.

Stephens, L., Anderson, K., Stokoe, D., Erdjument-Bromage, H., Painter, G.F., Holmes, A.B., Gaffney, P.R., Reese, C.B., McCormick, F., Tempst, P., Coadwell, J., Hawkins, P.T. (1998) "Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B", *Science* 279 : 710.

Tang, E.D., Nunez, G., Barr, F.G., and Guan, K.L. (1999) "Negative regulation of the forkhead transcription factor FKHR by Akt", *J.Biol.Chem.* 274: 16741-16746.

Tang, Q., Gonzales, M., Inoue, H., Bowden, G.T. "Roles of Akt and glycogen synthase kinase 3beta in the ultraviolet B induction of cyclooxygenase-2 transcription in human keratinocytes", *Cancer Res* 2001; 61:4329-4332.

Tawfik, O.W, Sagrillo, C., Johnson, D.C., Dey, S.K. (1987) "Decidualization in the rat: role of leukotrienes and prostaglandins" *Prostaglandins Leukot. Med.* 29 : 221.

The Centers for Disease Control Cancer and Steroid Hormone Study. (1983) "Oral contraceptive use and the risk of endometrial cancer", *JAMA.* Mar. 25 ; 249 (12) :1600-4.

Thun, M.J., Namboodiri, M.M., Heath, C.W. Jr. (1991) "Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer", *N. Engl. J. Med.* 325 : 1593-6.

Thun, M.J., Namboodiri, M.M., Calle, E.E., Flanders, W.D., Heath, C.W. Jr. (1993) "Aspirin use and risk of fatal cancer", *Cancer Res.* 53 : 1322-7.

Tsujji, M. and DuBois, R.N. (1995) "Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2", *Cell.* 83 : 493-501.

Tsujji, S., Kawano, S., Sawaoka, H., Takei, Y., Kobayashi, I., Nagano, K., Fusamoto, H. and Kamada, T. (1996) "Evidences for involment of cyclooxygenase-2 in proliferation of two gastrointestinal cancer cell lines", *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 55 : 179-183.

Tsujji, M., Kawano, S., Tsujji, S., Sawaoka, H., Hori, M. and DuBois, R.N. (1998) "Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells", *Cell* 93 : 705-716.

Van Weeren, P.C., de Bruyn, K.M, Vries-Smits, A.M., van Lint, J.. and Burgering,

B.M. (1998) "Essential role for protein kinase B (PKB) in insulin-induced glycogen synthase kinase 3 inactivation. Characterization of dominant-negative mutant of PKB", *J.Biol.Chem.* 273 : 13150-13156.

Visconti, R., Cerutti, J., Battista, S., Fedele, M., Trapasso, F., Zeki, K., Miano, M.P., de Nigris, F., Casalino, L., Curcio, F., Santoro, M., and Fusco, A. (1997) "Expression of the neoplastic phenotype by human thyroid carcinoma cell lines requires NFkappaB p65 protein expression", *Oncogene* 15 : 1987-1994.

Von Euler, U.S. (1936) " On the specific vasodilating and plain muscle stimulating substances from accessory genital glands in man and in certain animals", *Journal of Physiology* 88: 213-234.

Xie, W., Chipman, J.G., Robertson, D.L. and Simmons, D.L. (1991) "Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing", *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 88, 2692-2696.

Yang, B., Eshelman, J., Berger, N., Markowitz, S.. (1996) "Wild-type p53 protein potentiates cytotoxicity of therapeutic agents in human colon cancer cells", *Clin. Cancer Res.* 2 : 1647-1657.

Yao, R., Cooper, G.M. (1995) "Requirements for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor", *Science.* 237 : 2003-2006.

Walker, K.S., Deak, M., Paterson, A., Hudson, K., Cohen, P. and Alessi, D.R. (1998) "Activation of protein kinase B beta and gamma isoforms by insulin in vivo and by 3-phosphoinositide-dependant protein kinase-I in vitro : Comparison with protein kinase B alpha", *Biochem. J.* 331, 299-308.

Wang, L., Shao, J., Muhlenkamp, P., Liu, S., Klepcyk, P., Ren, J. and Friedman, J.E. (2000) "Increased insulin receptor substrate-1 and enhanced skeletal muscle insulin sensitivity in mice lacking CCAAT/enhancer-binding protein beta", *J.Biol.Chem.* 275 : 14173-14181.

Wang, Y., Ramquist, T., Szekely Laxelson, H., Klein, G., Wiman, K.G. (1993) "Reconstitution of wild-type p53 expression triggers apoptosis in a p53 negative c-myc retrovirus-induced T-cell lymphoma line", *Cell Growth Diff.* 4 : 467-73.

Willman, E.A, Collins, W.P. and Clayton, S.G. (1976) "Studies in the involvement of prostaglandins in uterine symptomatology and pathology", *BR. J. Obstet. Gynaecol.* 83 : 337-341.

Zhou, H., Li, X.M., Meinkothm J., and Pittman, R.N. (2000) "Akt regulates cell survival and apoptosis at a postmitochondrial level", *J.Cell Biol.* 151 : 483-494.

Zong, W.X., Edelstein, L.C., Chen, C., Bash, J. and Gelinas, C. (1999) "The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF- $\kappa$ B that blocks TNF $\alpha$ -induced apoptosis", *Genes & Dev.* 13 : 382-387.