

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

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

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

PAR
STEVE TURNER

XIAP ET AKT : DEUX PROTÉINES ANTI-APOPTOTIQUES IMPLIQUÉES DANS
LA CHIMIORÉSISTANCE DES CELLULES DU CANCER DE L'ENDOMÈTRE
HUMAIN

MAI 2009

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, le Dr. Éric Asselin, qui m'a donné ma chance dans ce domaine qu'est la recherche scientifique. Il m'a permis de travailler dans un environnement fort enrichissant sur des sujets d'actualité avec toute son expérience et son expertise. Il m'a aussi permis de participer à des congrès internationaux de grande envergure qui furent pour moi des expériences exceptionnelles autant sur le plan scientifique que professionnelle. Merci beaucoup.

Je tiens aussi à remercier chaleureusement tous mes collègues de laboratoire pour leur gentillesse et leur esprit d'équipe. Plus particulièrement, je voudrais remercier Sophie Parent pour m'avoir accueilli le jour de mon arrivé et m'avoir permis de si bien m'intégrer en peu de temps. À Valérie Leblanc, qui a été d'une aide inestimable. À Céline Van Themsche, qui a su répondre à toutes mes questions. À Véronique Gagnon, qui m'a beaucoup donné en me transmettant ses connaissances scientifiques et professionnelles. À Marie-Claude Déry, qui m'a beaucoup appris sur le milieu scientifique. Et enfin, à mes autres collègues, Geoffroy Bélanger, Isabelle St-Louis et Lyne Lafontaine. Travailler avec vous fut pour moi, un réel plaisir.

Finalement, merci à ma mère, Lucie Lessard, qui m'a toujours encouragé dans mes projets et qui a cru en moi dès le début. Tu as toujours été là pour moi et c'est, en partie, grâce à toi que ceci a pu être accompli. Merci à monoureuse, Martine Denis qui m'a, elle aussi, encouragé dans ce dernier droit et qui m'a fait découvrir une nouvelle facette de la vie.

Merci à tous!

RÉSUMÉ

En Amérique du Nord, le cancer endométrial est le plus fréquent des cancers gynécologiques et le quatrième en importance chez tous les types de cancers féminins. En clinique, trois différentes méthodes sont employées pour traiter ce type de cancer: la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie. Le phénomène de chimiorésistance est un fait encore inexpliqué et trop souvent rencontré lors du traitement d'un cancer par chimiothérapie. À ce jour, l'implication des voies de signalisation anti-apoptotiques des cellules chimiorésistantes semble être la plus plausible. Voilà le sujet sur lequel va porter cette étude. Premièrement, nous avons induit une diminution de l'expression de XIAP (X-Linked inhibitor of apoptosis protein), une protéine de la famille des IAPs (Inhibitor Apoptosis Proteins) par la méthode des ARN interférence (siRNA) dans différentes lignées cellulaires du cancer endométrial, soit les lignées KLE et Ishikawa. Ensuite, nous les avons traitées avec trois agents chimiothérapeutiques employés en clinique: le cisplatine, la doxorubicine et le taxol. Nous avons démontré que XIAP était impliqué dans le phénomène de chimiorésistance dans ces deux lignées. En effet, dans les cellules où nous avons effectué un siRNA de XIAP, nous avons noté une augmentation de la sensibilité au traitement par les agents chimiothérapeutiques, cisplatine et doxorubicine dans la lignée cellulaire KLE et seulement à la doxorubicine dans la lignée cellulaire Ishikawa. Deuxièmement, nous avons étudié les différents rôles des trois isoformes connus à ce jour de la molécule Akt; Akt1, Akt2 et Akt3. Akt est une protéine centrale d'une voie de signalisation cellulaire connue sous le nom de PI3K/Akt. Cette voie, lorsqu'elle est activée, prône la survie cellulaire. Nous avons transfecté une lignée cellulaire du cancer de l'endomètre, les cellules HeLa, avec différents plasmides surexprimant la forme active de chaque isoforme d'Akt. Nous avons ensuite traité nos cellules avec les trois agents chimiothérapeutiques: cisplatine, doxorubicine et taxol. Nous avons obtenu comme résultat une augmentation de la résistance au taxol chez les cellules HeLa surexprimant les 3 isoformes d'Akt. Nos résultats suggèrent que XIAP et Akt jouent un rôle dans la chimiorésistance des cellules cancéreuses et nous dotent de nouveaux outils pour mieux comprendre le phénomène de chimiorésistance.

Mots clés : chimiorésistance, cancer endométrial, Akt, XIAP, cisplatine, doxorubicine et taxol.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	ii
RÉSUMÉ.....	iii
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES SYMBOLES ET DES ABRÉVIATIONS.....	xi
CHAPITRE I INTRODUCTION.....	1
1.1 Problématique.....	1
1.2 L'utérus.....	2
1.2.1 La physiologie de l'utérus.....	2
1.2.2 Particularités du col de l'utérus.....	4
1.2.3 Le cycle menstruel.....	4
1.3 La carcinogenèse.....	6
1.3.1 Le déséquilibre d'un tissu sain.....	6
1.3.2 Le développement d'un cancer.....	8
1.4 Le cancer de l'utérus.....	10
1.4.1 Généralités.....	10
1.4.2 Étiologie et facteur de risque.....	12
1.4.3 Histologie.....	13
1.4.4 Manifestation et diagnostic.....	13
1.4.5 La stadification.....	14

1.5	Les traitements.....	16
1.5.1	Nos armes contre le cancer.....	16
1.5.2	Le cisplatine.....	19
1.5.3	La doxorubicine.....	20
1.5.4	Le taxol.....	21
1.5.5	La chimiorésistance.....	22
1.6	La voie de signalisation de la PI3-K.....	27
1.6.1	Généralités.....	27
1.6.2	Les différents isoformes d'Akt.....	29
1.6.2.1	Akt1.....	29
1.6.2.2	Akt2.....	30
1.6.2.3	Akt3.....	31
1.7	L'apoptose.....	32
1.7.1	Apoptose vs nécrose.....	32
1.7.2	Protéines impliquées dans l'apoptose.....	34
1.7.2.1	Les caspases.....	34
1.7.2.2	XIAP.....	36
1.7.2.3	PARP.....	37
1.8	But de l'étude.....	37
CHAPITRE II	MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	39
2.1	Matériel.....	39
2.2	Culture cellulaire.....	39
2.3	Extraction protéique et analyse par immuno-buvardage.....	40

2.4	Construction plasmidique.....	40
2.5	Construction plasmidique d'Akt3.....	41
2.6	Transfection des plasmides.....	41
2.7	siRNA XIAP.....	42
2.8	Coloration des cellules au Hoechst.....	42
2.9	Analyse statistique.....	42
CHAPITRE III	RÉSULTATS.....	43
3.1	Introduction aux résultats.....	43
3.2	Effet de la surexpression d'Akt CA sur la chimiorésistance chez les cellules HeLa.....	44
3.3	Effets de la diminution du niveau d'expression de XIAP sur la chimiorésistance chez les cellules KLE et Ishikawa.....	53
CHAPITRE IV	DISCUSSION ET CONCLUSION.....	57
4.1	Discussion.....	57
4.2	Conclusion.....	61
BIBLIOGRAPHIE.....		62

LISTE DES TABLEAUX

1.1	Classification histoclinique des cancers de l'endomètre de l'utérus.....	15
1.2	Classification histoclinique des cancers du col de l'utérus.....	16

LISTE DES FIGURES

1.1	Localisation de l'utérus.....	3
1.2	Schématisation de l'utérus.....	3
1.3	Changement de la couche fonctionnelle de l'endomètre en fonction de la phase du cycle menstruel chez la femme.....	6
1.4	Invasivibilité des cellules cancéreuses.....	9
1.5	Activité des agents chimiothérapeutiques sur le cycle.....	18
1.6	Schématisation du cisplatine.....	19
1.7	Schématisation de la molécule de doxorubicine	20
1.8	Schématisation de la molécule de taxol	21
1.9	Voie de signalisation intracellulaire de la PI 3-K.....	28
1.10	Différence entre apoptose et nécrose.....	34
1.11	Voie de signalisation cellulaire des caspases.....	35
3.1	Effets de la transfection de Akt1 CA chez les cellules HeLa sur le niveau d'expression de Akt1, P-Akt, caspases-3 clivé et PARP clivé, en présence ou en absence de cisplatine.....	45
3.2	Effets de la transfection de Akt2 CA chez les cellules HeLa sur le niveau d'expression de Akt2, P-Akt, caspases-3 clivé et PARP clivé, en présence ou en absence de cisplatine.....	45
3.3	Effets de la transfection de Akt3 CA chez les cellules HeLa sur le niveau d'expression de Akt3, P-Akt, caspases-3 clivé et PARP clivé, en présence ou en absence de cisplatine.....	46
3.4	Effets de la transfection de Akt1 CA chez les cellules HeLa sur le niveau d'expression de Akt1, P-Akt, caspases-3 clivé et PARP clivé, en présence ou en absence de doxorubicine.....	46
3.5	Effets de la transfection de Akt2 CA chez les cellules HeLa sur le niveau d'expression de Akt2, P-Akt, caspases-3 clivé et PARP clivé, en présence ou en absence de doxorubicine.....	47

3.6	Effets de la transfection de Akt3 CA chez les cellules HeLa sur le niveau d'expression de Akt3, P-Akt, caspases-3 clivé et PARP clivé, en présence ou en absence de doxorubicine.....	47
3.7	Effets de la transfection de Akt1 CA chez les cellules HeLa sur le niveau d'expression de Akt1, P-Akt, caspases-3 clivé et PARP clivé, en présence ou en absence de taxol.....	48
3.8	Effets de la transfection de Akt2 CA chez les cellules HeLa sur le niveau d'expression de Akt2, P-Akt, caspases-3 clivé et PARP clivé, en présence ou en absence de taxol.....	48
3.9	Effets de la transfection de Akt3 CA chez les cellules HeLa sur le niveau d'expression de Akt3, P-Akt, caspases-3 clivé et PARP clivé, en présence ou en absence de taxol.....	49
3.10	Mesure du taux d'apoptose des cellules HeLa transfectées avec l'un des trois isoformes d'Akt en présence ou en absence de cisplatine.....	50
3.11	Mesure du taux d'apoptose des cellules HeLa transfectées avec l'un des trois isoformes d'Akt en présence ou en absence de doxorubicine.....	51
3.12	Mesure du taux d'apoptose des cellules HeLa transfectées avec l'un des trois isoformes d'Akt en présence ou en absence de taxol.....	52
3.13	Effets de la transfection d'un siRNA de XIAP chez les cellules KLE sur le niveau d'expression de P-Akt, caspases-3 clivé et PARP clivé, en présence ou en absence de cisplatine, de doxorubicine ou de taxol.....	54
3.14	Effets de la transfection d'un siRNA de XIAP chez les cellules Ishikawa sur le niveau d'expression de P-Akt, caspases-3 clivé et PARP clivé, en présence ou en absence de cisplatine, de doxorubicine ou de taxol.....	54
3.15	Mesure du taux d'apoptose des cellules KLE transfectées avec un siRNA de XIAP en présence ou en absence de cisplatine, de doxorubicine ou de taxol.....	55
3.16	Mesure du taux d'apoptose des cellules Ishikawa transfectées avec un siRNA de XIAP en présence ou en absence de cisplatine, de doxorubicine ou de taxol.....	56

LISTE DES SYMBOLES ET DES ABRÉVIATIONS

α	Alpha
β	Béta
γ	Gamma
ABC	ATP-binding cassette proteins
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
Caspase	CysteinyI-aspartate-cleaving proteases
CMV	CytomégaloVirus
ER	Récepteur aux estrogènes
FIGO	Fédération internationale de gynécologie obstétrique
GST	Glutation-S-transférase
HPV	Papillomavirus humain
IAP	Inhibitor of apoptosis protein
IGF	Insulin-like growth factors
MDR	Multi drug resistance
NF κ B	Nuclear factor-kappa B
IRM	Imagerie par résonance magnétique
PARP	Poly(adenoside diphosphate[ADP]-ribose)polymerase
PDK1	Phosphoinositide-dependent kinase 1
PI3-K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol 3,4 bisphosphate
PIP3	Phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate
PKB	Protéine kinase B
PTEN	Phosphatase tensine homologue
RTK	Récepteurs tyrosine kinase
SIL	Lésion intra-épithélial
siRNA	short interference ribonucleic acid
TNF	Facteur de nécrose tumoral
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Problématique

Le cancer est, sans aucun doute, le mal du siècle. C'est lui qui a suscité le plus d'études et de travaux de la communauté scientifique en ce début de millénaire. Petit à petit, la médecine moderne se dote de moyens pour enrayer cette maladie. Jusqu'à maintenant, la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie sont les principales armes contre le cancer. Alors que la chirurgie et la radiothérapie sont qualifiées de traitements locaux, la chimiothérapie nous permet de traiter les cellules cancéreuses qui auraient pu quitter le lieu d'origine d'où dérive la tumeur. Cependant, beaucoup de traitements de chimiothérapie échouent puisque les cellules cancéreuses sont devenues résistantes aux traitements. C'est ce qu'on appelle le phénomène de chimiorésistance. Ce phénomène survient dans tous les types de cancer, incluant le cancer de l'utérus. Depuis quelques années, ce phénomène et les mécanismes cellulaires impliqués sont de mieux en mieux compris. De nouvelles protéines ainsi que leurs rôles sont identifiés et sont mis à l'étude pour qu'un jour, nous ayons la possibilité de contourner ce problème. C'est pourquoi nous avons décidé de porter ce sujet à l'étude, pour en augmenter la compréhension et ainsi, pouvoir développer une stratégie pour vaincre tous types de cancers qui étaient initialement résistants aux traitements ou non. Le document que vous vous apprêtez à lire renferme les résultats obtenus lors de mon passage à la maîtrise. Mes travaux concernent la chimiorésistance des cellules du cancer de l'utérus.

1.2 L'utérus

1.2.1. La physiologie de l'utérus

Les organes génitaux de la femme sont composés d'une partie interne et d'une partie externe. La partie interne est composée d'une paire de gonades (les ovaires) ainsi qu'un système de conduits et de cavités permettant le passage des gamètes et l'entreposage de l'embryon et du fœtus (l'utérus). L'utérus se situe dans le bassin entre la vessie et le rectum (Fig.1.1) (Campbell 1995). Il a la forme et la grosseur d'une poire renversée (Fig.1.2) (Campbell 1995). Cet organe est épais et est constitué, en grande partie, de muscles lisses. Sa muqueuse interne, l'endomètre, procure un environnement propice au développement du fœtus tandis que sa paroi musculaire épaisse, le myomètre, assure la protection du fœtus et son expulsion lors de l'accouchement (Heath 2001). Histologiquement parlant, l'endomètre est constitué d'un épithélium cylindrique cilié pseudo-stratifié et repose sur un stroma cellulaire. Sous l'influence des oestrogènes ainsi que de la progestérone, l'endomètre va subir des variations cycliques régulières afin de constituer un environnement favorable à l'implantation d'un ovule fécondé. Chez la femme, ce phénomène est appelé cycle menstruel et il est d'une durée moyenne de vingt-huit jours. On remarque deux couches distinctes de l'endomètre : la couche fonctionnelle et la couche basale. La couche qui tapisse la cavité interne de l'utérus se nomme couche fonctionnelle et est appelée à être éliminée lors des menstruations. La couche basale est, quant à elle, permanente et régénère la couche fonctionnelle éliminée à la suite des menstruations (Tortora 2001). Le myomètre est constitué de trois feuillets de fibres musculaires lisses. Finalement, l'utérus est recouvert d'une couche séreuse appelée périmétrium. Le périmétrium fait partie intégrante du péritoine viscéral et est composé d'un épithélium pavimenteux simple ainsi que de tissu conjonctif aréolaire.

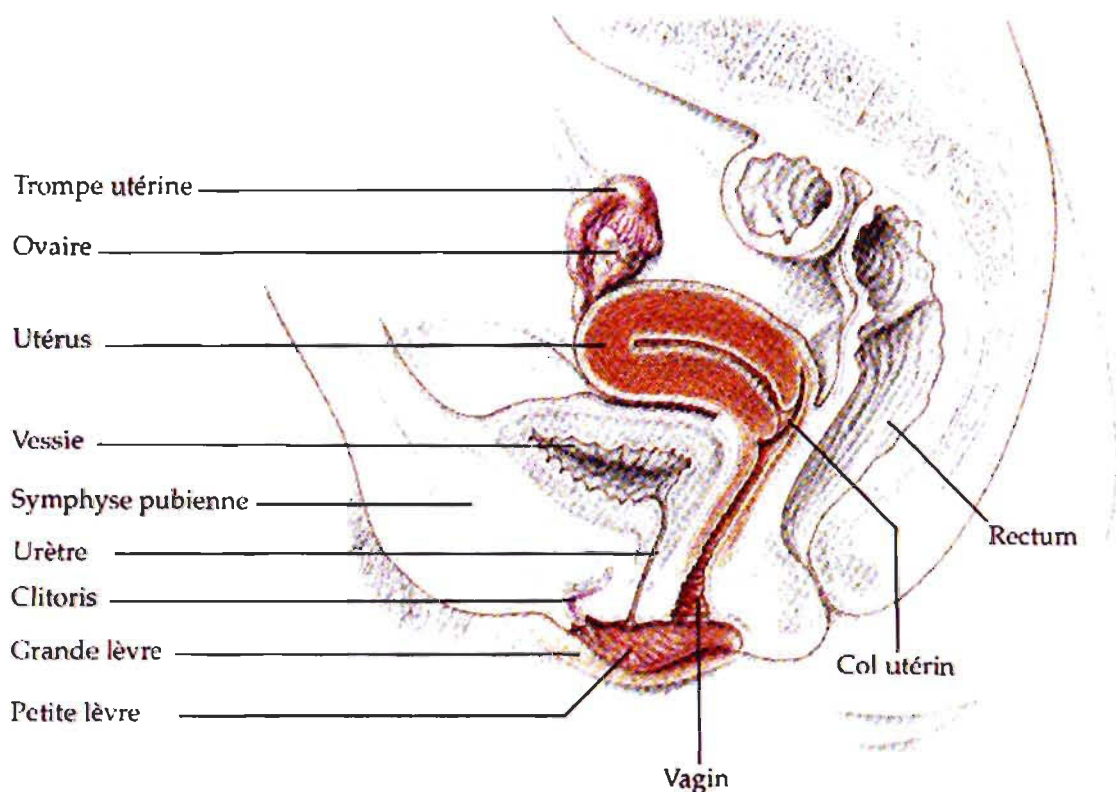


FIGURE 1.1 : Localisation de l'utérus, tiré de Campbell, N. A., Mathieu, R. "Biologie", Les éditions du Renouveau Pédagogique, Saint-Laurent, CAN. : 1180 pages (1995).

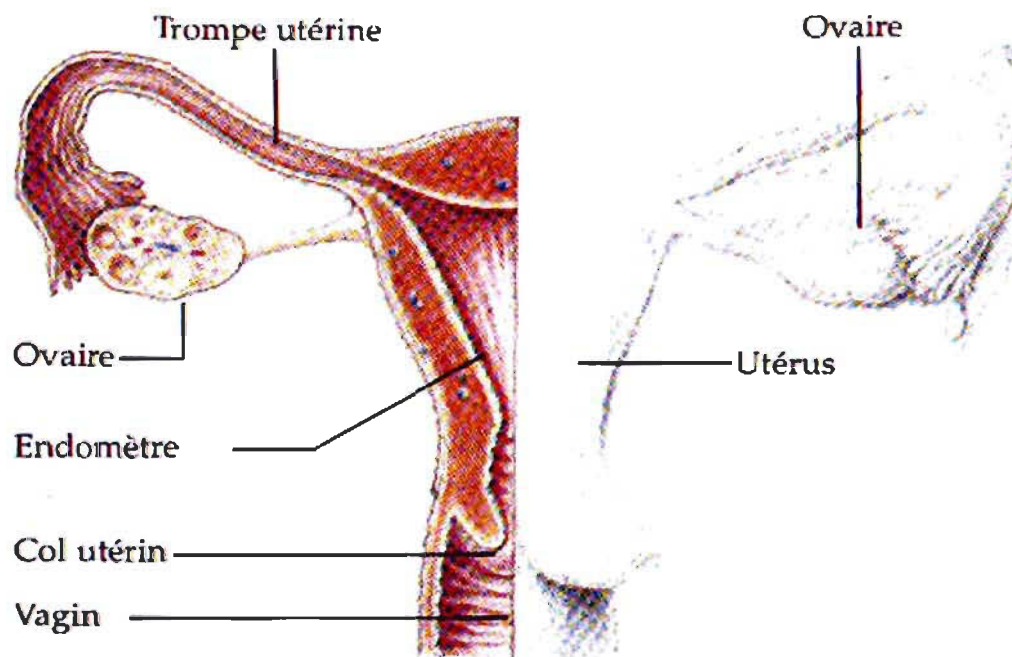


FIGURE 1.2 : Schématisation de l'utérus, tiré de Campbell, N. A., Mathieu, R. "Biologie", Les éditions du Renouveau Pédagogique, Saint-Laurent, CAN. : 1180 pages (1995).

1.2.2. Particularités du col de l'utérus

Le col de l'utérus désigne l'orifice étroit de l'utérus qui communique avec la lumière du vagin. Sa fonction est de laisser passer les spermatozoïdes vers les voies génitales lorsque la fécondation est possible, c'est-à-dire juste avant l'ovulation. Au cours des autres périodes du cycle menstruel, son rôle est de protéger l'utérus contre les infections bactériennes. Il crée une barrière physique, que l'on nomme bouchon muqueux, à l'aide de ses multiples glandes et qui empêchent le passage des bactéries. À la naissance, les fortes contractions de l'utérus expulsent le fœtus à travers le col dans le vagin. Contrairement à l'endomètre utérin, le col de l'utérus est pauvre en muscles. Sa muqueuse ne se détache pas lors des menstruations. Il possède deux types de cellules, soit des cellules sécrétrices et des cellules ciliées. Son épithélium est cylindrique simple. L'orifice externe du col correspond avec le passage à l'épithélium pavimenteux simple non kératinisé du vagin. La limite entre ces deux types d'arrangements est variable. Sous l'influence des oestrogènes, l'épithélium cervical vient tapisser la portion vaginale du cervix (terme latin pour col) (Ulfig 2006).

1.2.3. Le cycle menstruel

Le cycle de modification de l'endomètre comporte trois phases distinctes, une phase proliférative, une phase sécrétoire et une phase menstruelle. Pendant la phase proliférative, le stroma endométrial prolifère et devient plus épais et plus vascularisé. Les glandes tubuleuses simples qui le composent se développent et forment de nombreuses glandes dont la sécrétion débutera au moment de l'ovulation. La phase proliférative est enclenchée et maintenue jusqu'à l'ovulation par l'apport croissant d'oestrogène en provenance des follicules ovariens en développement. Suite à l'ovulation, la production de progestérone par le corps jaune entraîne la phase sécrétoire. À moins qu'il y ait implantation d'un ovule fécondé, la production continue de progestérone est inhibée par un rétro-contrôle négatif de l'antéhypophyse et conduit ainsi à la dénaturation de la source de progestérone que l'on nomme le corps jaune. L'endomètre qui est privé de progestérone ne peut plus persister et est presque

totallement éliminé par saignement (les règles). Durant la phase sécrétoire, il se produit une sécrétion épaisse, riche en glycogène par les glandes endométriales. Étant donné que la première journée des menstruations est facilement identifiable, elle correspond à la première journée du cycle menstruel. La menstruation dure environ 5 jours et est suivie de la phase proliférative jusqu'au quatorzième jour approximativement. L'ovulation entraîne alors la phase sécrétoire jusqu'au vingt-huitième jour où commenceront les menstruations (Campbell 1995).

L'endomètre peut être divisé en trois couches. La première, appelée couche basale, est en contact avec le myomètre. Elle ne présente peu ou pas de changements au cours du cycle menstruel et n'est pas éliminée lors des règles. La seconde, appelée couche spongieuse, est caractérisée par un stroma d'aspect spongiforme. Alors que la couche superficielle, ou couche compacte, doit son nom à l'aspect de son stroma. Ses deux dernières couches sont aussi réunies sous le nom de couche fonctionnelle (Fig.1.3) (Campbell 1995). La disposition de la vascularisation artérielle joue un rôle important dans le cycle menstruel. En effet, il existe deux types d'artères dans l'endomètre utérin, soit les artères droites et les artères spiralées. Les artères droites sont courtes et ne parcourent qu'une petite distance pour irriguer la couche basale. Les artères spiralées sont longues et se dirigent vers la surface de l'endomètre en se divisant en de nombreuses branches pour irriguer la couche compacte. Contrairement aux artères droites, les artères spiralées sont influencées par les fluctuations hormonales du cycle menstruel. L'arrêt de la sécrétion de progestérone, à la fin du cycle, provoque une vasoconstriction des artères spiralées induisant une phase ischémique qui survient juste avant les menstruations (Campbell 1995).

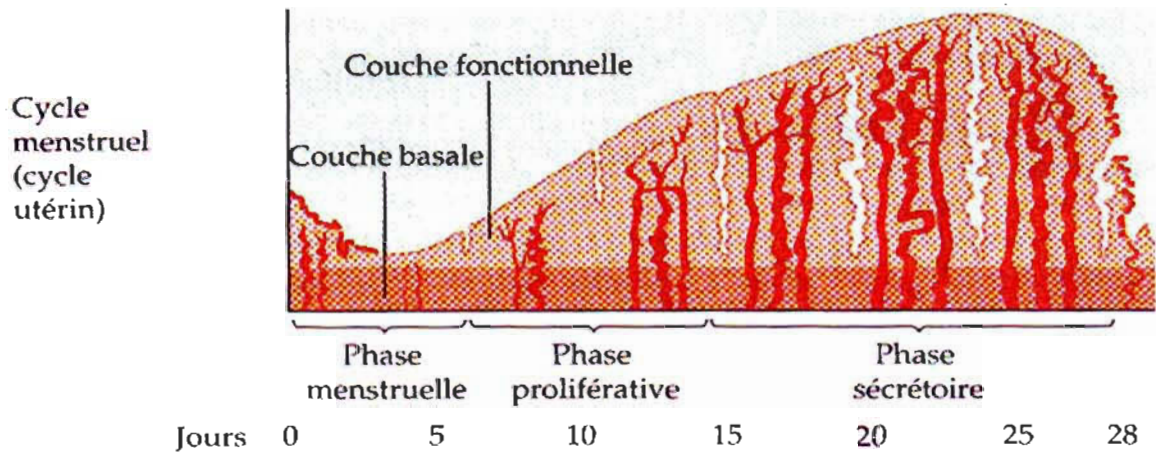


FIGURE 1.3 : Changement de la couche fonctionnelle de l'endomètre en fonction de la phase du cycle menstruel chez la femme tirée de Campbell, N. A., Mathieu, R. "Biologie", Les éditions du Renouveau Pédagogique, Saint-Laurent, CAN. : 1180 pages (1995).

1.3 La carcinogenèse

1.3.1. Le déséquilibre d'un tissu sain

On sait maintenant que le cancer est une maladie génétique (Weinberg 2007). Il faut savoir, que dans un organisme sain, il existe un équilibre entre le niveau de mort et de survie cellulaire. Lors d'un cancer, les mécanismes qui régulent cet équilibre sont altérés et les cellules cancéreuses prolifèrent de façon incontrôlée, ce qui entraîne un déséquilibre dans l'architecture cellulaire normale d'un organisme sain. Il y a deux types de mutations qui peuvent enclencher la transformation d'une cellule saine en cellule cancéreuse : les mutations oncogènes et les mutations dans les gènes suppresseurs de tumeurs. Les oncogènes sont des gènes qui codent pour des oncoprotéines. Les oncoprotéines sont des protéines mutées de façon à suractiver leur activité normale. Normalement, ces protéines ont un rôle, soit dans le contrôle positif du cycle cellulaire, soit dans le contrôle négatif de l'apoptose. Lorsque l'un de ces deux phénomènes est amplifié, il en résulte un déséquilibre de la balance entre la mort et la survie cellulaire en faveur de la survie. Une mutation dans un gène suppresseur de tumeur survient à un gène qui code pour une protéine dont le rôle normal aurait été d'inhiber le cycle

cellulaire, soit en inhibant les protéines impliquées dans l'activation du cycle cellulaire, soit par activation de l'apoptose. Les mutations de type oncogène qui engendrent des augmentations de la survie cellulaire ou augmentent le rendement d'inhibition de l'apoptose portent le nom de mutation gain-de-fonction. Dans le cas contraire, les mutations dans des gènes suppresseurs de tumeur qui, normalement, diminueraient le cycle cellulaire ou augmenteraient l'apoptose, portent le nom de mutation perte-de-fonction (Griffiths 2002). Les mécanismes d'épigénétiques ont aussi un rôle à jouer dans la transformation d'une cellule saine en une cellule cancéreuse. Il faut savoir que l'expression génique est gouvernée par deux choses : la génétique et l'épigénétique. On peut définir l'épigénétique comme étant l'ensemble des phénomènes gouvernant l'expression génique qui répondent aux deux critères suivants : le caractère doit être transmissible pendant la division cellulaire et l'absence de modification dans la séquence d'acide nucléique. Pour mieux comprendre ce qu'est l'épigénétique, il faut savoir que l'état local de la chromatine influence l'efficacité des signaux cellulaires et environnementaux à induire l'expression génique. Lorsque la chromatine est condensée, on dit de l'état du gène qu'il est réprimé. Lorsque la chromatine est ouverte, on dit alors que l'état du gène est induit. Il y a trois mécanismes qui peuvent influencer l'état des gènes : la modification des histones, la méthylation de l'ADN et la répression génique par micro ARN. Dans les cancers, une hypométhylation globale de l'ADN engendre une augmentation de l'expression de gènes due au relâchement de la chromatine. Si ces gènes sont des oncogènes, il y aura donc une augmentation de l'expression d'oncoprotéines et, par le fait même, une augmentation du contrôle positif sur le cycle cellulaire ou une augmentation du contrôle négatif de l'apoptose. L'hyperméthylation de l'ADN engendre l'effet contraire. S'il y a hyperméthylation localisée d'un promoteur qui code pour un gène suppresseur de tumeur, on observe alors une diminution de son expression génique et, par le fait même, ce gène ne pourra plus exercer son rôle d'inhibiteur sur le cycle cellulaire ou d'activateur de l'apoptose (Gronbaek 2007). Pour terminer, il faut savoir que le cancer n'apparaît généralement pas à la suite d'une seule mutation. En effet, une cellule se transforme le plus souvent à la suite d'une multitude de mutations en ce sens, c'est-à-dire, prônant la survie cellulaire (Griffiths 2002).

1.3.2. Le développement d'un cancer

Lorsque survient un tel déséquilibre dans la balance entre la survie et la mort cellulaire dans un organisme, les cellules se mettent à croître de façon incontrôlée et peuvent alors conduire à la formation d'une tumeur. Une tumeur qui n'est pas capable de croître indéfiniment et qui n'envahit pas largement les tissus sains environnants est qualifiée de tumeur bénigne (Fig.1.4) (Goldsby 2003). D'autre part, une tumeur qui continue à croître et devient progressivement invasive est qualifiée de tumeur maligne. En général, le terme cancer désigne toujours des tumeurs malignes. En plus d'une croissance incontrôlée, les tumeurs malignes peuvent produire ce qu'on appelle des métastases. Ce sont en fait quelques cellules cancéreuses qui atteignent la circulation sanguine, soit par les capillaires, soit par les vaisseaux lymphatiques et qui peuplent d'autres endroits dans le corps de l'hôte dans le but d'y proliférer. Autrement dit, une tumeur primaire dans un site quelconque peut engendrer des tumeurs secondaires dans un tout autre site (Goldsby 2003).

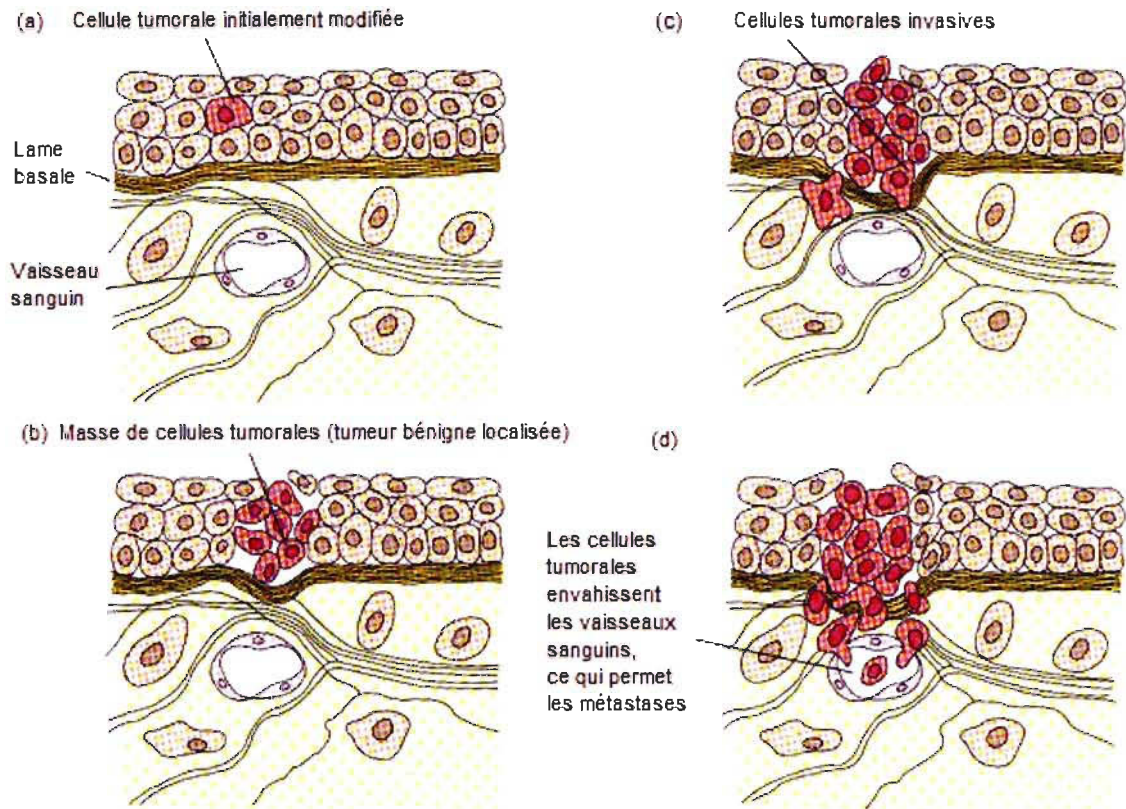


FIGURE 1.4 : Invasivité des cellules cancéreuses tiré de Goldsby, R. A., Kindt, Thomas J., Osborne, Barbara A. (2003). *Immunologie*. New York, Freeman and company.

Les cancers sont classés selon leur lieu d'origine d'où dérive la tumeur. La plupart des tumeurs malignes sont des carcinomes (environ 80%). Le terme carcinome signifie que le cancer s'est développé à partir des tissus épithéliaux. On distingue trois types de carcinomes. Les carcinomes épidermoïdes dont les cellules forment une structure qui ressemble à l'épiderme. Les carcinomes glandulaires, aussi appelés adénocarcinome dont les cellules forment des tubes glandulaires ou sécrètent du mucus. Finalement, les carcinomes indifférenciés qui ne reproduisent aucune structure tissulaire reconnaissable. Il s'agit là, en général, des plus graves en terme de mortalité (Lemaire 2003).

1.4 Le cancer de l'utérus

1.4.1. Généralités

Nous traiterons de deux types de cancer de l'utérus dans le présent ouvrage, soit le cancer de l'endomètre de l'utérus ou le cancer du col de l'utérus. Lorsque le terme « cancer de l'utérus » sera utilisé, cela désignera les deux types de cancers réunis, mentionnés ci-dessus.

En ce qui concerne le cancer de l'endomètre de l'utérus, on estime que 4100 nouveaux cas ont été répertoriés au Canada en 2008. La société canadienne du cancer estime que le nombre de décès du cancer de l'endomètre de l'utérus sera de 740 au Canada pour l'année 2008 (Société canadienne du cancer 2007). Le nombre relativement bas de décès par année, comparativement au cancer du poumon par exemple, est dû à un dépistage plus fréquent et à de meilleurs tests, ainsi que des traitements plus efficaces. Cependant, lorsque celui-ci est découvert à un stade plus avancé ou à un grade plus agressif, il devient l'un des cancers utérins des plus meurtriers (Rosenberg 2005). Environ 90% des tumeurs utérines se développent à partir de l'épithélium et sont donc reconnues comme étant des carcinomes. De ce groupe, environ 90% seront des adénocarcinomes. Le carcinome endométrial typique peut être subdivisé en 3 différents grades qui représentent le pourcentage de tumeur. Le grade 1, étant le moins dangereux, désigne que moins de 5% des cellules de l'endomètre utérin se sont différenciées. Le grade 2 désigne une proportion de différenciation des cellules entre 6% et 50%. Alors que le grade 3, qui est le plus agressif, désigne que plus de 50% des cellules se sont différenciées (Miaskowski 1999). En plus du grade, le carcinome endométrial est classé en 4 stades. Il s'agit d'un système de mesure évaluant la taille de la tumeur, ainsi que sa progression au delà de son site d'origine. Un cancer de l'utérus de stade 1, est un cancer qui est uniquement localisée dans l'utérus. Alors qu'un cancer de stade 4, correspond à un cancer qui s'est aussi développé à l'extérieur du bassin, dans une autre partie du corps (Société canadienne du cancer 2007).

En ce qui concerne le cancer du col de l'utérus, on estime que 1350 nouveaux cas ont été répertoriés au Canada en 2008. La société canadienne du cancer estime aussi que le nombre de décès suite au cancer du col de l'utérus a été de 390 au Canada pour l'année 2007 (Société canadienne du cancer 2007). Mentionnons ici que le cancer du col de l'utérus représente la seconde cause de décès par cancer chez les femmes âgées entre vingt et trente-neuf ans (Rosenberg 2005). Comme pour le cancer de l'endomètre, le taux de mortalité du cancer du col de l'utérus est devenu très bas avec les années et cela est dû, entre autres, à la mise en place d'un test de dépistage annuel systématique (le Pap test). Le test de Pap (cytologie) est une technique utilisée pour détecter des changements qui peuvent se produire dans les cellules du col (Monsonégo 2006). Bien que le cancer du col de l'utérus soit bien contrôlé dans les pays industrialisés, il demeure une cause de mortalité importante dans d'autres pays moins développés. Des études épidémiologiques et moléculaires ont démontré que le papillomavirus (HPV) joue un rôle dans le développement du carcinome invasif du col de l'utérus. Ce virus, qui affecte les muqueuses du col de l'utérus et de l'appareil génital, provoque parfois des lésions qui peuvent dégénérer en cancer (Monsonégo 2006). Les HPV sont la cause unique, non suffisante, mais nécessaire, pour le développement de précancers et de cancers du col de l'utérus. Depuis une trentaine d'années environ, les tests de dépistages ont permis de transformer cette maladie mortelle en maladie rare. Néanmoins, elle provoque le décès de près de 400 femmes chaque année au Canada. Comme il s'agit d'un virus, un vaccin pourrait, au cours des années à venir, éradiquer le virus et par conséquent, le cancer du col de l'utérus. Des tests concluants ont déjà été effectués. Ces tests ont démontré une protection efficace contre l'infection du virus des cellules du col de l'utérus. Donc, la solution serait de vacciner toutes les jeunes femmes avant même qu'elles soient exposées au virus, c'est-à-dire avant leurs premières relations sexuelles (Monsonégo 2006).

1.4.2. Étiologie et facteur de risque

Les hormones comme les œstrogènes influencent le développement d'un cancer de l'endomètre en contrôlant le taux de division cellulaire ainsi que la différenciation cellulaire. Les oestrogènes augmentent le taux de mitose chez les cellules endométriales alors que la progestérone joue le rôle contraire en diminuant l'expression des récepteurs à l'œstrogène (Key 1995). Le risque de développer un cancer augmente donc dans une relation de dose-réponse en fonction du taux d'œstrogène présent en absence de progestérone (Key 1995). L'obésité post-ménopause est aussi un facteur de risque. L'obésité augmente la production et la disponibilité des oestrogènes. Les cellules adipeuses sont, en effet, d'excellents entrepôts à œstrogène et le relargage chronique d'œstrogène de ces cellules contribue à augmenter le risque de développement d'un cancer (Miaskowski 1999). Le tamoxifène fait aussi partie des facteurs de risques. Le tamoxifène est un antagoniste synthétique des oestrogènes utilisé depuis le milieu des années 1970 pour le traitement du cancer du sein. Il agit comme compétiteur des récepteurs à l'œstrogène. Cependant, il agit aussi comme agoniste au niveau de l'endomètre utérin et est considéré comme un facteur de risque important après cinq ans d'utilisation (Seoud 1993). La précocité des ménarches, l'apparition tardive de la ménopause et la nulliparité sont également des facteurs de risque. La précocité des ménarches et la ménopause tardive sont des facteurs de risque puisqu'ils occasionnent une exposition à plus long terme aux oestrogènes. La nulliparité est souvent associée avec des mauvais fonctionnements endocrines causant l'anovulation et l'absence de progestérone pour contrer les effets des oestrogènes (Miaskowski 1999). Environ cinquante pourcents des carcinomes endométriaux se sont développés chez des femmes présentant au moins un de ces facteurs de risque (Rose 1996).

En ce qui concerne le cancer du col de l'utérus, c'est le virus du papillome humain (HPV) qui représente le plus grand facteur de risque. Plus de soixante-dix types de HPV ont été identifiés dont vingt types ont été caractérisés comme ayant la capacité d'infecter la muqueuse épithéliale (Birley 1995). Le *Trichomonas vaginalis*, un pathogène transmissible sexuellement joue aussi un rôle dans le développement du

cancer cervical. Il a été démontré qu'une corrélation existe entre les hôtes de cette bactérie et le développement d'un cancer du col de l'utérus (Zhang 1995). L'herpès simplex virus, un cytomégalovirus (CMV), est aussi associé avec le développement du cancer cervical. Des études *in vitro* ont démontré une interaction entre les CMV et le HVP. Le rôle exact de cette interaction est encore mal compris (Koffa 1995). Un nombre élevé de partenaires sexuels engendre aussi une augmentation du risque de développer un cancer du col de l'utérus puisqu'il multiplie les chances de contracter un HPV (Buckley 1981). Le tabagisme est aussi un facteur de risque. Des métabolites de la nicotine ont été retrouvés dans la muqueuse cervicale de la fumeuse. Le mécanisme d'un effet direct des métabolites de la nicotine sur la muqueuse cervical n'a jamais été démontré. Cependant, une corrélation entre l'apparition de ce genre de cancer chez les fumeuses vs les non-fumeuses a été démontrée (Lovejoy 1994).

1.4.3. Histologie

Macroscopiquement, les cancers de l'endomètre apparaissent au voisinage de la lumière de la cavité utérine. Histologiquement, il s'agit généralement d'adénocarcinomes à différents stades de différenciation. On observe un regroupement dense de glandes tumorales sur très peu de tissu conjonctif (Ulfig 2006). La disparition du stroma entre ces regroupements denses de glandes est aussi une caractéristique de ce type de cancer. L'architecture cellulaire y est désordonnée et les cellules possèdent un noyau élargi. On peut aussi y observer différents degrés de mitose, de nécrose et d'hémorragies.

1.4.4. Manifestation et diagnostic

Dans le cas du cancer de l'endomètre, le symptôme prédominant est l'apparition de métrorragies (saignements vaginaux survenant en dehors des règles) avant ou après la ménopause. Des douleurs pelviennes et lombo-sacrées peuvent aussi être en premier plan de cette pathologie. La biopsie de l'endomètre confirme le diagnostic dans quatre-vingt-dix pourcents des cas. En l'absence de résultats par cette technique, un curetage

utérin sera fait et analysé au microscope par un anatomopathologiste à la recherche de cellules cancéreuses. L'échographie transvaginale en combinaison avec le Doppler couleur et l'IRM (imagerie par résonance magnétique) peuvent préciser le degré d'invasion et préciser la nature de la masse (Aguerri 2000).

Le cancer du col est souvent asymptomatique dans sa phase pré invasive. Dans certains cas, les patientes remarquent des leucorrhées (pertes vaginales blanchâtres) abondantes (Aguerri 2000). À ce stade, la lésion est découverte par des frottis cervicaux vaginaux réalisés au cours d'une consultation de routine. Les symptômes plus tardifs sont les saignements postcoïtaux, les saignements intermenstruels ou les ménorragies. Des signes associés à une anémie peuvent aussi se joindre aux symptômes s'il y a une perte de sang importante. D'autres symptômes peuvent survenir à un stade plus avancé de la maladie : des leucorrhées nauséabondes, des douleurs pelviennes hypogastriques, iliaques ou des membres inférieures (Aguerri 2000). À un stade terminal, des hémorragies vaginales, un œdème des membres inférieurs et une insuffisance rénale sont le plus souvent au premier plan. Les frottis cervicaux vaginaux sont un instrument efficace et fiable pour le dépistage du cancer du col de l'utérus. Lorsque l'on détecte une lésion intra-épithéliale lors des frottis cervicaux vaginaux, la patiente doit être référée pour une colposcopie et une biopsie (Aguerri 2000).

1.4.5. La stadification

Les facteurs pronostiques du cancer de l'endomètre sont le type et la différenciation histologique, la taille de l'utérus, le stade, le degré d'invasion du myomètre, la cytologie péritonéale, les métastases ganglionnaires lymphatiques ainsi que les métastases annexielles. La stadification du cancer de l'endomètre est basée sur une nouvelle charte depuis 1989 de la Fédération internationale de gynécologie obstétrique (FIGO) (tableau 1.1). Elle repose sur des constatations histopathologiques lors de la chirurgie de la patiente.

La stadification du cancer du col repose sur un examen clinique avant tout. Le cancer du col est stadifié localement avec la confirmation obtenue lors d'un l'examen par IRM. La stadification permet d'évaluer le pronostic de survie à cinq ans ou encore de déterminer le stade de la maladie (tableau 1.2). Cet examen peut-être une biopsie ganglionnaire, une cystoscopie, une sigmoïdoscopie, une radiographie pulmonaire, une urographie intraveineuse ou une mesure tumorale par IRM.

Stage	Histo-pathologie
• Stade 1 - IA G123: non infiltrant, limité à l'endomètre - IB G123 : infiltration < 1/2 épaisseur myomètre - IC G123: infiltration > 1/2 épaisseur myomètre • Stage II - IIA G123 : invasion des glandes endocervicales - IIB G123 : invasion du stroma cervical • Stage III - IIIA G123 : atteinte séreuse, et/ou de l'annexe, et/ou cytologie péritonéale positive - IIIB G123 : métastase(s) vaginale(s) - IIIC G123 : métastase(s) ganglionnaire(s) pelvienne(s) ou paraaortique(s) • Stage IV - IVA G123 : atteinte vessie ou rectum - IVB : métastase(s) abdominale(s) et/ou à distance et/ou métastases ganglionnaires inguinales	Les carcinomes du corps de l'utérus doivent être classés en fonction du degré de différenciation de l'adénocarcinome suivant G1: moins de 5% du contingent solide en élément non morulaire ou non glandulaire G2 : 6% à 50% de ce même contingent G3 : plus de 50%

Tableau.1.1 Classification histoclinique des cancers de l'endomètre de l'utérus (FIGO 1989) tiré de Aguerri, M. F., Berger, C., Cabrol, M., Clavero-Fabri, M.-C., Delogne, A., Espié, M., Herbrecht, R., Lanvin, D., Laurence, V., Lefeuvre, M., Pech-Gourg, E., Pichard-Léandri, E., Pigneux, A., Vedrenne, J.-B., Westeel, V. (2000). Pratique des soins ambulatoires en cancérologie. Montrouge.

Stade	Définition
0	Tumeur intra-épithéliale (carcinome <i>in situ</i>)
I	Tumeur limitée au col
IA	Carcinome micro-invasif préclinique (diagnostique histologique)
IA1	Invasion du stroma moins de 3mm de profondeur et moins de 7mm de largeur
IA2	Invasion du stroma plus de 3 mm et moins de 5mm de profondeur et moins de 7mm de largeur
de	
IB	Tumeur limité au col plus étendue que le stade IA2
IB1	Lésion clinique dont le diamètre est ≤ 40 mm
IB2	Lésion clinique dont le diamètre est ≥ 40 mm
II	Tumeur dépassant l'utérus mais sans atteindre la paroi pelvienne ou le tiers inférieur du vagin
IIA	Sans atteinte du paramètre
IIB	Avec atteinte du paramètre
III	Tumeur étendue à la paroi pelvienne et/ou au tiers inférieur du vagin et/ou entraînant un retentissement sur le haut appareil urinaire
IIIA	Extension au tiers inférieur du vagin sans atteinte de la paroi pelvienne
IIIB	Extension à la paroi pelvienne et/ou retentissement sur le haut appareil urinaire
IV	Tumeur dépassant le pelvis ou envahissant la muqueuse vésicale ou rectale
IVA	Envahissement de la muqueuse vésicale ou rectale
IVB	Métastases à distance: extension au-delà du pelvis

Tableau 1.2 Classification histoclinique des cancers du col de l'utérus (FIGO 1995) tiré de Aguerri, M. F., Berger, C., Cabrol, M., Clavero-Fabri, M.-C., Delogne, A., Espié, M., Herbrecht, R., Lanvin, D., Laurence, V., Lefeuvre, M., Pech-Gourg, E., Pichard-Léandri, E., Pigneux, A., Vedrenne, J.-B., Westeel, V. (2000). Pratique des soins ambulatoires en oncologie. Montrouge.

1.5 Les traitements

1.5.1. Nos armes contre le cancer

Le but de cette étude est de mieux comprendre le phénomène de chimiorésistance rencontré lors de traitements par chimiothérapie. Dans cette section, il sera question des différentes tactiques employées pour vaincre le cancer comme la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. En raison de la nature du présent ouvrage, une plus grande emphase sera mise sur la chimiothérapie et ses composés.

La chirurgie est utilisée pour enlever la tumeur primaire. Elle est, ce que l'on nomme, un traitement local. Il s'agit ici d'un des traitements majeurs dans bien des cancers. On considère que sur cent cancers guéris, soixante-dix le sont par chirurgie (Delehedde 2006). Le cancer de l'utérus fait parti des cancers se soignant très bien par chirurgie. De façon générale, si le cancer n'a pas encore fait de métastase, la chirurgie a de très bonnes chances de guérison (environ 90%) (Olry 2003). Cependant, pour pallier au problème de micrométastase (très petite métastase, quelques cellules seulement) qui pourrait survenir, la chimiothérapie ou la radiothérapie sont souvent utilisées de façon complémentaire à la chirurgie. Il est très important d'enlever toutes les cellules cancéreuses pour éviter les risques de rechute (Delehedde 2006).

La radiothérapie en cancérologie a vu le jour en même temps que la découverte des rayons X à la fin du XIX^e siècle. Tout comme la chirurgie, la radiothérapie est un traitement local. Elle repose sur l'action des rayons (X, alpha, bêta ou gamma) que l'on dit ionisants. Ces rayons agissent sur la cellule en rompant les liaisons entre les atomes des molécules et, en particulier, celle des protéines et de l'eau. Cela entraîne une destruction immédiate ou retardée des cellules par altération des chromosomes, empêchant ainsi la division cellulaire. Plus le taux de division cellulaire est grand, plus l'action des rayons X est importante. Un inconvénient de ce type de traitement résulte dans la force de rayonnement qui pénètre l'organisme. De plus, ce type de traitement ne règlera pas le problème s'il y a présence de métastases (Delehedde 2006).

La chimiothérapie peut être définie comme l'utilisation de composés naturels ou issus de synthèse chimique, visant à bloquer la prolifération cellulaire dans une phase du cycle cellulaire, à empêcher la progression dans le cycle (cytostatique) ou à tuer les cellules (cytotoxique). La chimiothérapie utilise de très nombreux produits différents que l'on regroupe en plusieurs familles (Fig.1.5) (Delehedde 2006). Il y a les agents alkylants qui agissent directement au niveau de l'ADN en créant des liaisons fortes par l'intermédiaire de groupements alkyls très réactifs. On dit de ces produits qu'ils sont cycle-indépendants, car ils sont actifs pendant toute la durée du cycle cellulaire. Ensuite, il y a les agents antimétabolites qui agissent, soit en inhibant des enzymes impliqués

dans la synthèse de l'ADN, soit en s'incorporant au sein de l'ADN. Ces derniers ne sont actifs qu'au cours de la phase S, c'est pourquoi ils sont qualifiés de phase S dépendants. Il y a aussi les agents de la famille des antibiotiques antinéoplasiques, qui sont extraits de micro-organismes. Une autre famille est constituée par des substances qui interfèrent avec le fuseau mitotique. Lors de la mitose, les chromosomes doivent être séparés de façon hautement régulée par un fuseau de microtubule mis en place spécialement pour la phase de mitose. C'est ce qu'on appelle le fuseau mitotique (Rosenberg 2005). Les alcaloïdes agissent en inhibant la polymérisation des microtubules de ce fuseau mitotique. À l'inverse, les taxanes stabilisent de manière irréversible l'assemblage des microtubules empêchant ainsi la poursuite du cycle cellulaire. On dit de ces deux dernières classes qu'elles sont phase M dépendantes. La dernière famille d'agent chimiothérapeutique est celle des inhibiteurs de la topoisomérase, qui se fixe sur la tubuline et inhibe leur polymérisation en microtubule, empêchant ainsi la progression du cycle cellulaire (Rosenberg 2005).

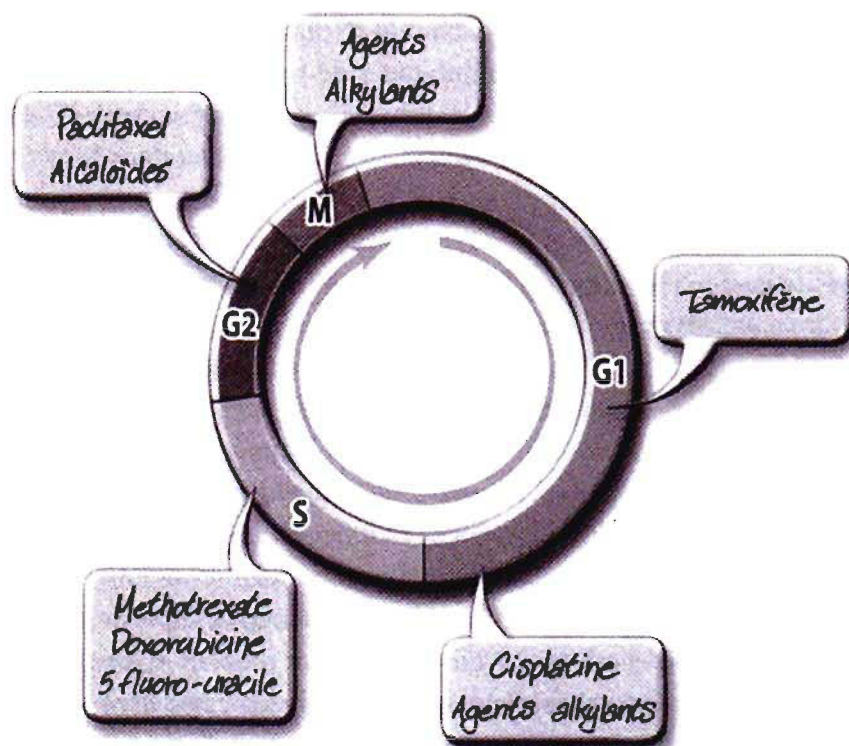


FIGURE 1.5 : Activité des agents chimiothérapeutiques sur le cycle tiré de Delehedde, M. (2006). Que sait-on du cancer?, EDP science.

1.5.2. Le cisplatine

Le cisplatine est un agent chimiothérapeutique qui fait partie de la famille des alkylants. Il s'agit en fait d'un noyau de platine avec deux atomes de chlores et deux atomes de nitrates en position « cis » (Fig.1.6) (Rabik 2007). Il s'agit d'un des produits majeurs employés en chimiothérapie. Les sels de platines forment des liens très forts entre les différents brins d'ADN et même à l'intérieur de ceux-ci. L'action alkylant du cisplatine engendre un pontage intrabrin ou interbrin entre deux guanines adjacentes, empêchant ainsi la séparation des deux brins d'ADN. Ceci prévient la réplication de l'ADN et donc, les cellules cessent de se diviser. Le cisplatine nécessite une hydratation pour réagir avec les bases. La position en « cis » des radicaux chlores et nitrates sont essentiels à l'action du cisplatine, car elle confère une certaine planéarité à la molécule. Les autres formes (forme trans-) ne possèdent aucune activité antiproliférative. Le cisplatine est habituellement utilisé en association avec d'autres agents chimiothérapeutiques (Rosenberg 2005). La toxicité reliée à l'utilisation de cette molécule est multiple. Le cisplatine cause, entre autres, une toxicité digestive (Deo 2005). Ce composé est, en effet, très émétique, c'est-à-dire qu'il cause des vomissements. La toxicité rénale est aussi quasi constante (Prozialeck 2007; Rabik 2007). L'utilisation du cisplatine nécessite une forte hydratation par voie intraveineuse allant jusqu'à deux litres par jour. On observe aussi une toxicité neurologique. On observe des paresthésies (sensation anormale, non douloureuse, mais désagréable, ressentie sur la peau) des extrémités (pieds, mains) avec fourmillements plus ou moins permanents (Lokich 1998). Certains patients se plaignent aussi de bourdonnements d'oreille et de difficultés majeures à s'orienter selon la source de bruit.

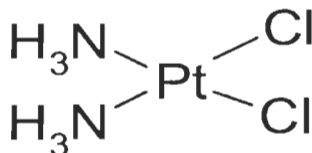


FIGURE 1.6 : Schématisation du cisplatine tiré de Rabik, C. A., Dolan, M.E. (2007). "Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents." *Cancer Treat Rev.* 33(1): 9-23.

1.5.3. La doxorubicine

La doxorubicine est un agent chimiothérapeutique de la famille des antibiotiques antinéoplasiques (Miaskowski 1999). Il s'agit d'une molécule de la famille des anthracyclines d'origine fongique (Fig.1.7) (Munnier 2007). Cette molécule s'intercale entre deux paires de bases azotées de l'ADN et réagit avec la topoisomérase II (enzyme qui contrôle la structure dans l'espace de l'ADN). Il se forme des complexes tertiaires ADN-Topoisomérase II-doxorubicine qui fixent les coupures de l'ADN, bloquent ses fonctions et entraînent la mort cellulaire. Elle peut également entraîner des altérations membranaires, car la doxorubicine favorise la formation de radicaux libres. Son mode d'administration se fait par intraveineuse, généralement par perfusion. Les principaux effets secondaires de cet agent chimiothérapeutique sont l'alopecie, les problèmes cardiaques, l'anémie ainsi que des nausées et vomissements (Garcia-Giralt 1994). Elle peut également entraîner des troubles veineux et cutanés, car la doxorubicine est très toxique pour le système veineux. Elle est éliminée surtout par voie biliaire sous forme de produit inchangé et de divers métabolites.

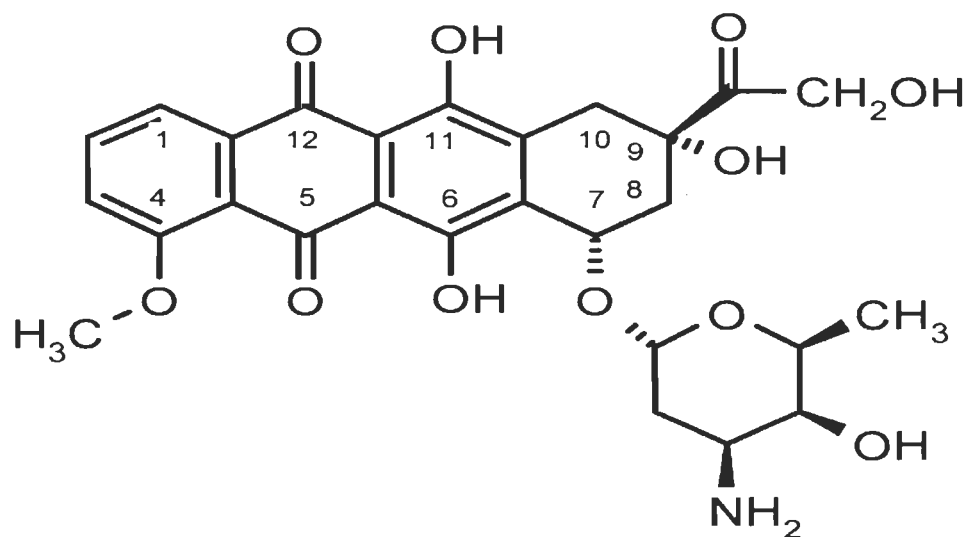


FIGURE 1.7 : Schématisation de la molécule de doxorubicine tiré de Munnier, E., Tewes, F., Cohen-Jonathan, S., Linassier, C., Douziech-Eyrolles, L., Marchais, H., Soucé, M., Hervé, K., Dubois, P., Chourpa, I. (2007). "On the interaction of doxorubicin with oleate ions: fluorescence spectroscopy and liquid-liquid extraction study." *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. **55(7)**: 1006-1010.

1.5.4. Le taxol

Le taxol (paclitaxel) fait partie de la classe des taxanes qui sont des agents chimiothérapeutiques de la famille des alcaloïdes (Fig.1.8)(Marcel Musteata 2006). Il s'agit ici de l'un des agents chimiothérapeutiques les plus utilisés. Il donne de très bons résultats chez les patients atteints du cancer des ovaires ou du cancer du sein (Henderson 2003). Ce composé est souvent prescrit en combinaison avec le cisplatine (McGuire 1996). Le taxol inhibe le cycle cellulaire en causant une hyper polymérisation du système de microtubule nécessaire à la mitose lors du partage des chromosomes. Le taxol se fixe à la surface des microtubules sur des sites d'ancrage. Il s'accroche à l'extrémité N-terminal et aux résidus 217 à 233 de la sous-unité des microtubules, la β -tubuline (Rao 1994; Rao 1995; Rao S 1995). Le taxol s'accroche avec un haut niveau d'affinité et de façon réversible (Díaz 1993). Le taxol perturbe la dynamique des microtubules en les stabilisant contre la dépolérisation (Ringel 1991). Puisque la cellule n'est plus capable de dépolymériser le réseau de microtubules, le cycle cellulaire ne peut plus progresser. La neutropénie (diminution dans le sang du nombre des polynucléaires neutrophiles) est la principale toxicité du taxol (Eisenhauer 1994). Mais il peut aussi causer des symptômes neurologiques d'ordre sensoriel, des problèmes cardiaques ainsi que des problèmes d'ordre gastrique (Chaudhry 1994; Wilson 1994; Markman 1998).

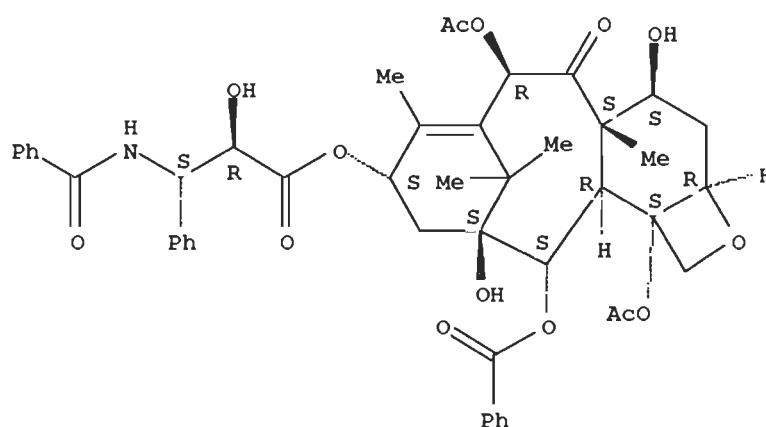


FIGURE 1.8 : Schématisation de la molécule de taxol tiré de Marcel Musteata, F., Pawliszyn, J. (2006). "Determination of free concentration of Paclitaxel in liposome formulation." *J Pharm Pharm Sci* **9(2)**: 231-237.

1.5.5. La chimiorésistance

La chimiorésistance est le phénomène observé lorsque les drogues chimiothérapeutiques ont une action nulle ou moindre sur les cellules cancéreuses. En fait, pour ce genre de cancer, les produits les plus efficaces sont le cisplatine ou la doxorubicine qui obtiennent un rendement d'environ 25-35% d'efficacité. L'habileté d'un cancer à développer une résistance aux drogues chimiothérapeutiques est similaire à un organisme infecté qui développerait une résistance aux antibiotiques. Le phénomène de chimiorésistance est un sérieux problème et il est l'une des causes majeures d'échec lors de traitement chimiothérapeutique. La chimiorésistance peut être de type naturelle ou acquise en réponse au traitement. On peut catégoriser la résistance aux drogues chimiothérapeutiques en trois catégories : cinétique, pharmacologique et biochimique.

La chimiorésistance de type cinétique est un phénomène qui survient lorsque la tumeur se développe à un cycle spécifique du cycle cellulaire. Autrement dit, si un patient reçoit un traitement chimiothérapeutique qui exerce son activité à la phase S du cycle cellulaire mais que le type de cancer ne passe pas par cette phase, il n'y aura bien sûr aucun effet de la drogue en question. De plus, si la tumeur a atteint un plateau de croissance et qu'elle ne croît donc plus, ce même agent chimiothérapeutique sera inefficace (Goldie 1996). Dans ce genre de cas, la chirurgie ou la radiothérapie combinée avec un agent chimiothérapeutique non dépendant d'un cycle cellulaire particulier est conseillée.

La chimiorésistance de type pharmacologique est due au mauvais transport des drogues à travers certains tissus ou types de tumeurs. Par exemple, le système nerveux central est un site que la plupart des drogues n'arrivent pas à atteindre à cause de la barrière hémato-encéphalique..

La chimiorésistance de type biochimique concerne la plupart des mécanismes impliqués dans le développement d'une chimiorésistance. Règle générale, une drogue

doit traverser la membrane cellulaire pour pouvoir y exercer son activité intracellulaire. Si une drogue est capable d'engendrer des dommages sérieux à une cellule, cela dépend aussi de la capacité de la cellule de réparer ces dommages et de circonscrire la drogue pour éviter qu'elle n'exerce son activité. Voici maintenant une énumération des principaux mécanismes de chimiorésistance de nature biochimique.

Le premier est l'incapacité de l'agent chimiothérapeutique à traverser la membrane cellulaire. Deux types de mécanismes peuvent être impliqués dans ce genre de résistance. Tout d'abord, plusieurs agents chimiothérapeutiques, comme le méthotrexate entrent dans la cellule via des mécanismes de transport transmembranaire facilité. Dans plusieurs cas, ce processus implique l'ancrage de la drogue chimiothérapeutique à une protéine exprimée à la surface de la membrane cellulaire. Ensuite, le complexe composé du récepteur et de l'agent chimiothérapeutique est translocalisé à travers la membrane cellulaire où il sera relargué dans le cytoplasme pouvant ainsi exercer sa cytotoxicité. Plusieurs cellules tumorales deviennent résistantes aux agents chimiothérapeutiques en altérant la structure de ces récepteurs membranaires ou en réduisant le nombre de ces mêmes récepteurs exprimés à leurs surfaces. Le résultat est une diminution de la concentration intracellulaire de la drogue chimiothérapeutique et par le fait même, une diminution de son effet cytotoxique (Goldenberg 1980). Le second type d'altération du transport transmembranaire concerne des protéines transmembranaires qui ont comme rôle la désintoxication du milieu intracellulaire. Dans certains cancers, le niveau d'expression de ces protéines est grandement augmenté. Ces protéines sont de véritables pompes qui rejettent la drogue hors de la cellule en diminuant ainsi grandement son efficacité (Gerlach 1986).

Un second mécanisme de chimiorésistance est la diminution de l'activation intracellulaire de l'agent chimiothérapeutique. La plupart des agents chimiothérapeutiques qui sont des analogues de purines ou de pyrimidines doivent être convertis, à l'intérieur de la cellule, en nucléoside ou en nucléotide approprié pour produire leur effet cytotoxique. La conversion d'un agent chimiothérapeutique en un métabolite cytotoxique requiert la participation d'une enzyme. Un changement

biochimique qui surviendrait dans une cellule cancéreuse et qui aurait comme conséquence la transformation de cette cellule en cellule chimiorésistante serait la perte d'une ou de plusieurs de ces enzymes.

Un autre mécanisme de chimiorésistance est l'altération ou l'augmentation de la cible intracellulaire de la drogue chimiothérapeutique. Plusieurs agents chimiothérapeutiques exercent leur activité cytotoxique en s'accrochant à une enzyme cellulaire normale, causant ainsi la désactivation de cette enzyme. Prenons exemple sur le méthotrexate. Le méthotrexate exerce son activité en s'accrochant à une enzyme appelée la dihydrofolate réductase et en bloquant son activité. Il en résulte une diminution de l'efficacité de la biosynthèse des bases purines et, subséquemment, une perturbation de la synthèse de l'ADN. Les cellules tumorales qui sont résistantes au méthotrexate peuvent être le résultat d'une augmentation intracellulaire de dihydrofolate réductase ou encore, de la production d'un variant du dihydrofolate réductase qui n'est aucunement inhibée par le méthotrexate (Williams 1980; Goldie 1996).

Il y a aussi un mécanisme d'augmentation intracellulaire de désintoxication des drogues chimiothérapeutiques. Le glutathion-S-transférase (GST) est un système qui est capable de générer une panoplie d'enzymes de désintoxication. Ces enzymes ont la capacité de réduire de façon significative la cytotoxicité des agents chimiothérapeutiques. Ce mécanisme joue un rôle important dans le développement de la chimiorésistance envers de nombreux agents alkylants (Goldie 1996).

Un autre mécanisme consiste à augmenter l'efficacité de réparation de l'ADN. Plusieurs agents chimiothérapeutiques exercent leurs actions en attaquant directement la structure de l'ADN. Certaines cellules tumorales évoluent en un complexe ou en une machinerie ayant une très grande efficacité pour réparer les segments endommagés de l'ADN. Certaines enzymes détachent le groupement alkyle fixé sur la base azotée de l'ADN. D'autres excisent la base modifiée en la remplaçant et refont la ligature de l'ADN. Un exemple spécifique de l'augmentation de l'efficacité de la machinerie de réparation de l'ADN est observé dans les cellules tumorales résistantes aux agents

alkylants. Cette résistance aux agents alkylants est associée avec une haute activité de réparation méthyle transférase. Pour leur part, les cellules cancéreuses possédant un faible niveau d'activité de réparation méthyl transférase sont très vulnérables aux dommages engendrés par des agents alkylants (Roberts 1971; Goldie 1996).

Finalement, le développement d'un phénotype appelé résistance multidrogues (MDR) peut survenir. Un important mécanisme de biologie générale de résistance aux drogues a été identifié. Dans les années 1970, un bon nombre de chercheurs (Biedler 1970; Ling 1974) ont démontré que dans les cellules tumorales rendues résistantes à une classe d'agent chimiothérapeutique comme les vinca alcaloïdes, possèdent également la tendance à être résistantes à un bon nombre d'agents chimiothérapeutiques d'une autre classe : les anthracyclines. Ce phénomène a été appelé résistance pléiotropique aux drogues. En 1976, il a été démontré par l'équipe du Dr. Juliano que la résistance pléiotropique aux drogues est médiée, en partie, par une glycoprotéine de surface membranaire de 170 kilodaltons appelée la P-glycoprotéine (Juliano 1976). Cette protéine de surface membranaire fonctionne comme une pompe transmembranaire qui expulse les molécules toxiques de l'intérieur de la cellule vers l'environnement extracellulaire (Miaskowski 1999). Depuis, d'autres protéines ont été mises en évidence. On les rencontre chez tous les êtres vivants où elles exercent non seulement leur rôle physiologique, mais aussi leur rôle protecteur contre les molécules toxiques présentes dans l'environnement cellulaire (métaux lourds, médicaments, insecticides). La P-glycoprotéine associée avec la MDR est codée par un gène appelé *MDR-1* ou *ABCB1* (ATP-binding cassette, sub-family B, member 1). Il s'agit là, d'une des membres d'une super-famille de protéines appelées ABC (ATP-binding cassette proteins) qui possèdent un haut niveau d'homologie et dont la plupart jouent un rôle dans la résistance aux drogues. L'expression de la P-glycoprotéine peut être mesurée dans les cellules tumorales. Plusieurs études démontrent qu'il y a une association entre l'expression de la P-glycoprotéine et le pronostic de survie à un cancer. Par exemple, un patient atteint d'un cancer ayant une haute proportion de P-glycoprotéine à la surface de ses cellules cancéreuses possède un moins bon pronostic qu'un patient ayant une faible proportion de ces mêmes protéines exprimées à la surface membranaire (Chan 1991). Prenez note

que la relation entre l'expression de la P-glycoprotéine et un mauvais pronostic est très complexe (Miaskowski 1999). La surexpression de la P-glycoprotéine doit être accompagnée par d'autres marqueurs de chimiorésistance ou par d'autres changements biologiques (par exemple une mutation dans le gène p53) pour que celle-ci engendre le mauvais pronostic (Miaskowski 1999).

Théoriquement, lorsque les mécanismes de la MDR seront compris, il sera relativement simple de développer et de tester des stratégies pour vaincre ce phénomène. Bien que plusieurs approches en laboratoire pour vaincre la MDR se soient avérées prometteuses, aucune n'a été totalement efficace en clinique. La raison commune à ce fait, est que les mécanismes qui régissent la MDR sont multifactoriels. Plusieurs méthodes actuellement à l'étude pour vaincre la MDR utilisent des drogues qui inhibent l'influx de calcium (par exemple le verapamil). D'autres méthodes tentent d'utiliser des drogues qui inhibent l'activation de protéines capables de lier le calcium comme la calmoduline ou encore, utilisent des drogues qui peuvent stabiliser la membrane comme la quinidine. Jusqu'à ce que ces méthodes aient passé par les essais cliniques, plusieurs autres stratégies tentent de contourner la MDR. Ces stratégies incluent la prise d'agents chimiothérapeutiques en combinaison (ex: cispaltine et doxorubicine, paclitaxcel et carboplatine). Dans un premier temps, la prise d'un agent chimiothérapeutique le plus tôt possible, c'est-à-dire en adjuvant (terme désignant la prise d'agent chimiothérapeutique sur un cours instant, mais à une concentration très élevée) pour éliminer toutes cellules cancéreuses résiduelles et, dans un second temps, la prise d'un nouvel agent chimiothérapeutique. Celui-là, dans le but d'éliminer toutes cellules qui auraient pu développer une résistance contre le premier agent chimiothérapeutique. Une autre stratégie utilisée pour contourner la MDR est d'augmenter la dose administrée, petit à petit, de l'agent chimiothérapeutique dans le but d'augmenter la concentration intracellulaire de la drogue en question jusqu'à ce qu'elle dépasse la valeur de résistance. C'est-à-dire, jusqu'à ce que les mécanisme de résistance de la cellule soient dépassés et ne suffisent plus à éliminer la drogue (Miaskowski 1999).

1.6 La voie de signalisation de la PI3-K

1.6.1. Généralités

La voie de signalisation intracellulaire de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-K) est impliquée dans des processus de prolifération, de survie, de différenciation cellulaire ainsi que de mobilisation du glucose (Héron-Milhavet 2006). Elle est activée par les hormones de croissance, l'insuline (insulin-like growth factors, IGFs) et les cytokines (St-Germain 2004). La suractivation de cette voie est un événement fréquent lors de l'apparition de tumeurs (Gagnon 2003). Lorsque la PI 3-K est activée par une protéine de la famille des récepteurs tyrosine kinase (RTKs), elle catalyse la transformation du phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate (PIP3) à partir du phosphatidylinositol 3,4 bisphosphate (PIP2) (Easton 2005). Une des cibles du PIP3 est la PDK1 (phosphoinositide-dependent kinase 1). Cette protéine ira ensuite phosphoryler l'un des constituants majeurs de la voie de la PI 3-K, c'est-à-dire Akt, aussi connu sous le nom de protéine kinase B (PKB) (Downward 2004). Akt est une protéine jouant un rôle central dans la voie de signalisation de la PI3-K. Une fois activé, Akt peut jouer un rôle anti-apoptotique soit en inhibant l'apoptose ou en activant la transcription de protéines de survie cellulaire. Akt activé peut phosphoryler et bloquer les actions de plusieurs protéines pro-apoptotiques comme la protéine Bad (Fig.1.9) (Downward 2004). Il empêche aussi le relargage du cytochrome C des mitochondries par la régulation de la protéine pro-apoptotique Bcl-2. Akt peut aussi activer une protéine du nom de NFkB (nuclear factor-kappa B), qui ira agir à l'intérieur du noyau en tant que facteur de transcription, permettant ainsi la transcription de plusieurs protéines de survie cellulaire ou anti-apoptotiques telles les protéines de la famille des IAPs (inhibitors of apoptosis proteins) ou des MDR-1 (multidrug resistance protein 1). Une des protéines de la famille des IAPs est la protéine XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein). XIAP est un inhibiteur direct des caspases-3 et -7 (Takahashi 1998) et il module la voie de signalisation Bax/cytochrome C en inhibant la caspase-9 (Dan 2004).

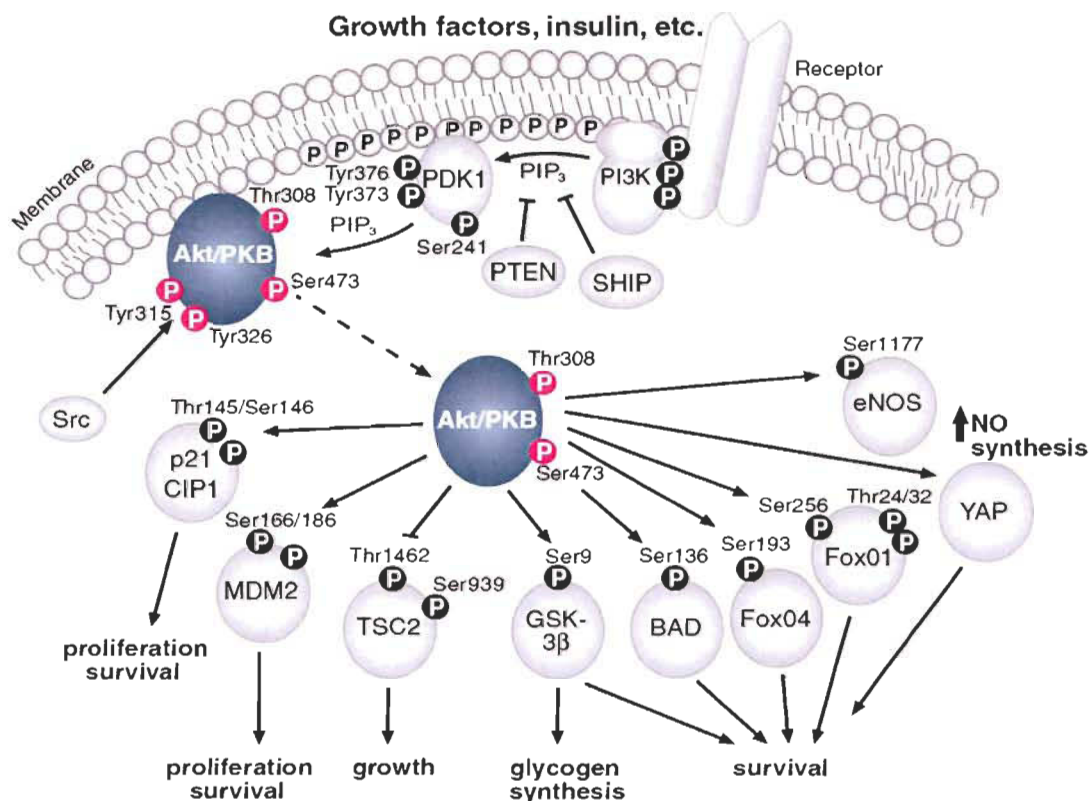


FIGURE 1.9 : Voie de signalisation intracellulaire de la PI 3-K tiré de Cell Signaling. (2007). "Akt pathway." from <http://www.cellsignal.com/>.

Akt est une protéine de type sérine/thréonine kinase et il existe 3 isoformes de la protéine connues à ce jour, Akt1, Akt2 et Akt3, aussi connues sous le nom PKB α , PKB β et PKB γ . Les 3 isoformes ne jouent pas le même rôle mais ont conservé un haut niveau d'homologie concernant leurs acides aminés. Akt1 et Akt2 sont ubiquitaires, c'est-à-dire qu'on les retrouve presque partout dans le corps humain, tandis que Akt3 se retrouve seulement à quelques endroits spécifiques comme le cerveau, le cœur et les reins (Gagnon 2004). Akt atténue principalement l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose, en empêchant le relargage du cytochrome C via Bad et Bcl-2, ce qui entraîne l'inhibition de la cascade des caspases. Cependant, Akt peut aussi freiner l'apoptose une fois enclenchée puisqu'elle peut aussi phosphoryler la caspase-9, atténuant ainsi son activité (Downward 2004). Cette voie de signalisation est régulée par un lipide phosphatase nommé PTEN (phosphatase and tensin homolog). Il empêche l'activation

constitutive de la voie de la PI 3-K en transformant le PIP3 en PIP2. C'est pourquoi PTEN est qualifié de suppresseur de tumeurs. Une mutation de PTEN est souvent observée dans certains types de cancers du cerveau, du sein, de l'utérus et de la prostate (Tamura 1999; Gagnon 2004). Depuis quelque temps, cette voie de signalisation a fait l'objet de plusieurs études dans le but de se servir de ses propriétés dans un éventuel traitement contre le cancer. En effet, quelques inhibiteurs d'Akt comme le Périfosine sont présentement en phase clinique pour tester leur efficacité (Bailey 2006).

1.6.2. Les différents isoformes d'Akt

1.6.2.1. Akt1

Plusieurs études ont suggéré que la PI3-K régule l'activation d'Akt1 par l'ancrage du PIP3 sur une région bien précise de la protéine appelée le domaine d'homologie pleckstrine (Easton 2005). Par la suite, un changement configurationnel de la protéine permet aux résidus thréonine 308 et sérine 473 d'être phosphorylés. L'activation complète d'Akt1 requiert deux événements, dont le premier est la phosphorylation du résidu thréonine 308 par une protéine kinase spécifique, la PDK-1 (Walker 1998). Cependant, pour être complètement activé, Akt1 requiert aussi la phosphorylation du résidu sérine 473 par une protéine nommée mTOR (mammalian target of rapamycin) (LoPiccolo 2008). Ce n'est qu'une fois ses deux sites de phosphorylations phosphorylés, que la molécule d'Akt1 est dite activée. Par la suite, elle pourra exercer son action de protéine kinase sur de multiples cibles intracellulaires. Des études *in vivo* ont démontré qu'une mutation de la protéine d'Akt1 entraînait un retard de croissance des organes de l'organisme en question (Schmidt 2002). Dans l'une des études en question, il s'agissait de souris qui n'exprimaient pas le gène d'Akt1, mais qui exprimaient les autres isoformes, c'est-à-dire Akt2 et Akt3. Chez ces souris invalidées pour Akt1, le métabolisme du glucose n'est pas modifié, mais les animaux sont de petite taille, démontrant le rôle d'Akt1 dans la croissance tissulaire (Schmidt 2002). Plusieurs cibles d'Akt1 ont été identifiées, démontrant ainsi les mécanismes possibles par lesquels

Akt1 prône la survie cellulaire et bloque l'apoptose. Il a été démontré que Akt1 phosphoryle la protéine pro-apoptotique Bad sur la sérine 136, la pro-caspase-9 ainsi que le facteur de transcription FKHRL1 (forkhead in rhabdomyosarcoma-like 1) (Schmidt 2002). Ceci ayant pour résultat une diminution de l'ancrage de Bad sur Bcl-X_L, une inhibition de l'activité protéase de la caspase-9 et la transcription du Fas-ligand. Akt1 a souvent aussi été associé à l'apparition de cancers. En effet, il a été démontré que la surexpression d'Akt1, chez des souris transgéniques, induit des lésions prostatiques précancéreuses et accélère la formation de tumeurs mammaires dites oncogènes dépendantes (Crowell 2007). Il a aussi été démontré qu' Akt1 joue un rôle prééminent dans l'angiogénèse des tumeurs. Les cellules endothéliales normales avec une activation soutenue d'Akt1 développent des complexes structuraux et fonctionnels correspondants aux caractéristiques anormales des réseaux de vaisseaux sanguins de tumeurs (Phung 2006). Finalement, Akt1 est aussi un acteur critique pour le développement de tumeurs induites par une perte de PTEN chez les souris (Crowell 2007). De plus, il a été démontré que l'augmentation de l'activité d'Akt1 est reconnue pour engendrer une protection cellulaire contre une variété de stress comme l'hyperglycémie (Ido 2002), l'hypoxie (Chong ZZ 2002; Scott 2002), l'exposition aux radicaux libres (Yamaguchi 2001; Chong ZZ 2003), l'exposition aux radiations ionisantes (Edwards 2002) ainsi qu'au stress oxydatif (Ikeyama 2002).

1.6.2.2. Akt2

Tout comme son homologue Akt1, Akt2 est régulé par la PI3-K qui permet l'ancrage du PIP3 au domaine d'homologie pleckstrine d'Akt2. Ceci entraînera un changement configurationnel de la protéine permettant la phosphorylation des résidus thréonine 309 et sérine 474 par les protéines PDK-1 et mTOR respectivement (Walker 1998; LoPiccolo 2008). Avec ses deux sites de phosphorylations phosphorylés, Akt2 est maintenant activé et peut exercer son activité de protéine kinase. Akt2 est une protéine essentielle pour la maintenance d'une bonne homéostasie du glucose (Lawlor 2001). Des études ont été réalisées chez des souris qui n'exprimaient pas la protéine Akt2 mais qui exprimaient des niveaux normaux d'Akt1 et d'Akt3 (Easton 2005). Ces souris ne

démontraient peu ou pas de retard de croissance, mais développaient un diabète lié à une résistance à l'insuline, démontrant ainsi, le rôle plus spécifique d'Akt2 au niveau de la voie de signalisation de l'insuline. Mais il faut garder en tête qu'Akt2 possède de multiples cibles intracellulaires. En ce qui concerne le cancer, il a déjà été démontré qu'une augmentation de l'expression d'Akt2 a été observée chez certains cancers du sein et des ovaires (Toker 2006). De plus, Akt2 jouerait un rôle dans la survie cellulaire ainsi que dans la prolifération de certaines cellules du cancer des ovaires (Nakayama 2006). Il a aussi été démontré qu'une surexpression d'Akt2 transforme certains fibroblastes et augmente aussi l'invasivité et/ou la capacité métastatique de cellules cancéreuses humaines *in vitro* et *in vivo*. Récemment, une amplification d'Akt2 a été démontrée chez 18,2% des cancers des ovaires (Crowell 2007). D'autre part, certaines études ont démontré qu'un apport exogène d'Akt2 sur des cellules fibroblastiques augmentait la transformation tumorigénique et que l'expression d'ARN antisense d'Akt2 empêchait la formation des tumeurs chez les souris nudes (Chau 2004).

1.6.2.3. Akt3

Finalement, Akt3 est régulé par la PI3-K qui permet l'ancrage du PIP3 au domaine d'homologie pleckstrine d'Akt3. Ceci entraînera un changement configurationnel de la protéine permettant la phosphorylation des résidus thréonine 305 et la sérine 472 qui seront ensuite phosphorylés par les protéines PDK-1 et mTOR respectivement (Walker 1998; LoPiccolo 2008). Ce n'est qu'une fois ses deux sites de phosphorylations phosphorylés, que la molécule d'Akt3 est dite activée. Par la suite elle pourra exercer son action de protéine kinase sur de multiples cibles intracellulaires. Des études *in vivo* chez des souris transgéniques pour le gène d'Akt3 mais qui exprimaient des niveaux normaux d'Akt1 et d'Akt2 ont démontré que la perte d'Akt3 engendrait un retard de croissance chez différents organes comme le cœur, les reins et le cerveau, c'est-à-dire, aux endroits où Akt3 est normalement exprimé (Easton 2005). Bien peu de choses sont connues sur le rôle spécifique d'Akt3 puisqu'il a été le dernier isoforme à être identifié. Il a déjà été démontré qu'une diminution de l'expression d'Akt3 sélectivement, inhibe le développement de mélanome induit par une perte de PTEN

(Crowell 2007). Une étude récente a démontré une implication d'Akt3 dans le phénotype agressif du cancer du sein et de la prostate. Une autre étude a permis d'identifier une activation sélective d'Akt3 dans 43 à 60% des mélanomes sporadiques (Stahl 2004). *In vivo*, il a déjà été démontré que l'augmentation de l'expression d'Akt3 a un effet oncogénique (Mende 2001). Une autre étude a réussi à démontrer une augmentation de l'activité enzymatique d'Akt3 ainsi que d'une augmentation de son expression du niveau d'ARNm dans des lignées cellulaires du cancer du sein n'exprimant pas le récepteur aux estrogènes (ER) et dans des lignées cellulaires du cancer de la prostate qui sont insensibles à l'androgène. Cette étude a donc permis de démontrer une contribution d'Akt3 dans l'augmentation de l'agressivité des tumeurs de type carcinomes, de cancers du sein ou de prostate qui sont insensibles aux hormones (Nakatani 1999).

1.7 L'apoptose

1.7.1. Apoptose vs nécrose

Dans cette section, il sera question du phénomène de l'apoptose versus la nécrose cellulaire pour bien comprendre les différents processus impliqués dans une mort cellulaire programmée et une mort cellulaire accidentelle.

On peut qualifier la nécrose de mort cellulaire accidentelle qui survient suite à un dommage tissulaire et qui concerne un groupe de cellules. Lors de la nécrose, la cellule se gonfle puis éclate, déversant ainsi son contenu cellulaire dans les tissus environnants et engendrant ainsi une réaction inflammatoire. Les mitochondries et le noyau ne jouent aucun rôle lors de ce type de mort cellulaire (Goldsby 2003).

L'apoptose, ou la mort cellulaire programmée, est un processus réglé et ordonné, dans lequel, la cellule participe à sa propre destruction. Il s'agit là, d'un phénomène essentiel pour la régulation homéostatique de nombreux types de populations cellulaires (Goldsby 2003). Normalement, les cellules d'organismes multicellulaires s'autodétruisent lorsque celles-ci ne sont plus utiles, endommagées ou trop vieilles. Ce

phénomène implique naturellement des cellules individuelles et n'engendre pas de réactions inflammatoires. Il existe principalement deux voies qui enclenchent l'apoptose dans la cellule : la voie mitochondriale est induite par la relâche de protéines mitochondriales et la voie des récepteurs de mort cellulaire qui sont situés sur la membrane plasmique. Dans le phénomène de l'apoptose, les cellules sont d'abord modifiées au niveau physiologique. L'événement central de l'apoptose induite par la voie mitochondriale est la relâche du cytochrome C de la mitochondrie dans le cytoplasme et la dégradation du potentiel membranaire mitochondrial (Griffiths 2002). Les caspases sont ensuite activées et provoquent le clivage des protéines impliquées dans le processus de l'apoptose. Les phosphatidylsérines peuvent ensuite être transloquées de la face interne vers la face externe de la membrane cellulaire. Les caractéristiques morphologiques de l'apoptose sont une diminution du volume cellulaire, une modification du cytosquelette, une condensation de la chromatine et une dégradation de l'ADN en petits fragments. À la suite de ces changements, la cellule libère de petites particules de membranes plasmiques contenant les organelles, souvent intactes, de la cellule. Ces particules seront ensuite phagocytées par les macrophages. En plus des organelles, ces particules contiennent des enzymes protéolytiques et les autres enzymes lytiques, les protéines cationiques et les molécules oxydantes (Goldsby 2003).

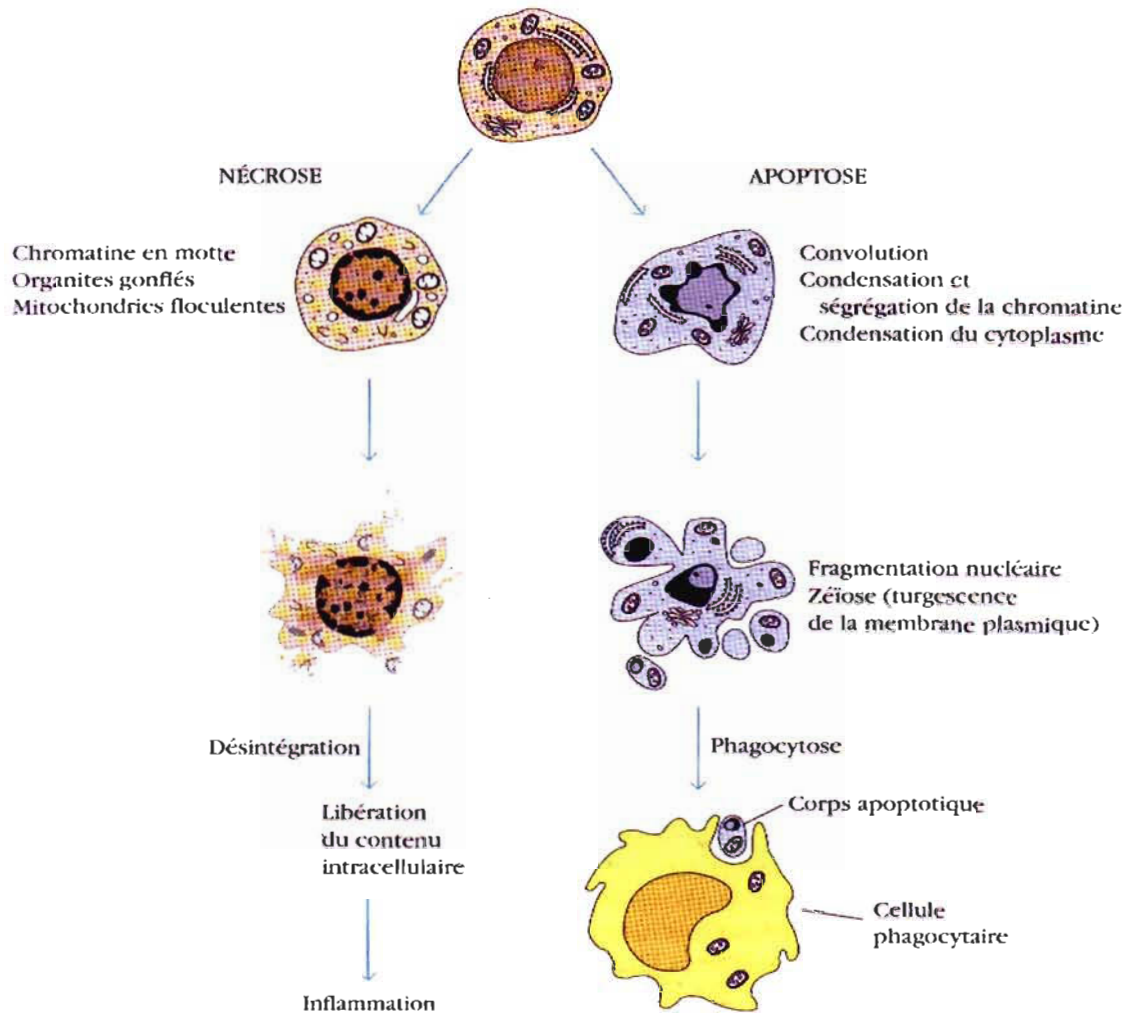


FIGURE 1.10 : Différence entre apoptose et nécrose tiré de Goldsby, R. A., Kindt, Thomas J., Osborne, Barbara A. (2003). *Immunologie*. New York, Freeman and company.

1.7.2. Protéines impliquées dans l'apoptose

1.7.2.1. Les caspases

Une des caractéristiques de la mort cellulaire par apoptose est l'implication des caspases (cysteinyl-aspartate-cleaving proteases). Ils sont, ce que nous pourrions appeler, un groupe de protéase à cystéine. Les caspases se retrouvent dans le cytoplasme sous forme inactive : les procaspases. Les procaspases sont ensuite clivées et dimérisées

pour former les caspases actives. Leur rôle est de cliver d'autres protéines à des sites précis. Une caspase active est capable d'activer les autres caspases (Fig.1.11) (Nuñez 1998). Elles sont activées par différents signaux extrinsèques comme les membres de la famille du TNF ou le récepteur Fas. Elles peuvent aussi être activées via des signaux intrinsèques comme par la protéine p53 ou le relargage de cytochrome C par les mitochondries (Goldsby 2003). Les caspases sont de plus en plus étudiées dans le domaine du cancer à cause de leur rôle sur le cycle cellulaire. De plus, il a été démontré qu'Akt interagit directement avec la caspase-9, atténuant ainsi son activité (Chong 2004). Akt, qui est une kinase, phosphoryle la sérine 196 de la procaspase-9 ayant pour conséquence la perte de la fonction protéase de la caspase-9 et ayant pour résultat, l'inhibition du processus d'apoptose (Cardone 1998).

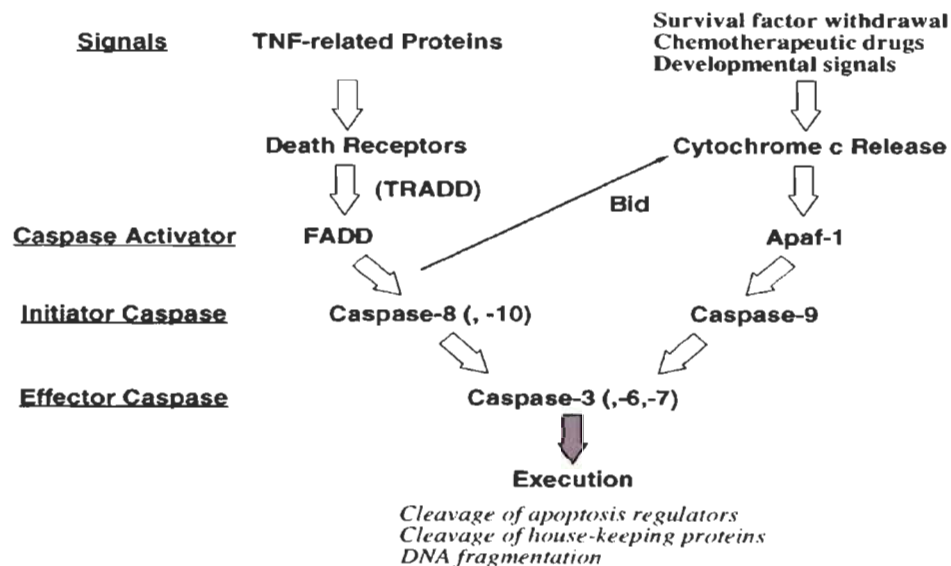


FIGURE 1.11 : Voie de signalisation cellulaire des caspases tiré de Nuñez, G., Benedict, M.A., Hu, Y., Inohara, N. (1998). "Caspases: the proteases of the apoptotic pathway." *Oncogene* **17(25)**: 3237-3245.

1.7.2.2. XIAP

XIAP fait partie de la famille des IAPs (inhibitor of apoptosis proteins) qui jouent un rôle clé dans la survie cellulaire en modulant les signaux de mort cellulaire à des niveaux postmitochondriaux. XIAP est une protéine de 57 KDa et, comme tous les membres de la famille des IAPs, il est caractérisé par la présence d'un domaine de recrutement des caspases. XIAP contient trois domaines BIR (baculovirus IAP repeat) amino-terminal et un domaine de structure d'anneaux en doigts de zinc (RING-zinc finger) à son extrémité C-terminal (Mufti 2007). Comme il a déjà été mentionné, il existe deux voies qui peuvent initier l'apoptose: la voie intrinsèque et la voie extrinsèque. Ces deux voies convergent en activant les caspases-3 et -7, qui sont nommées des caspases exécutrices et qui sont responsables de la mort cellulaire. XIAP est impliqué dans la régulation de ces deux voies puisqu'il a la capacité de lier et d'inhiber les caspases-3, -7 et -9 (Dan 2004). L'initiation de l'apoptose implique l'inactivation de XIAP engendrée par la libération de protéines mitochondriales dans le cytoplasme où ces mêmes protéines se lieront à XIAP au niveau des domaines qui interagissent avec les caspases. XIAP est un inhibiteur direct de la caspase-3 via son domaine BIR2 qui se lie au site de liaison du substrat de la caspase-3, conduisant à une occlusion stérique du site actif. Le domaine BIR2 est aussi responsable de l'inhibition directe de la caspase-7. XIAP est aussi responsable de l'inactivation de la caspase-9 via son domaine BIR3. XIAP empêche la dimérisation de la caspase-9 et, par conséquent, inhibe l'activité protéolytique de la caspase-9 (Eckelman 2006). Par l'intermédiaire de ces structures d'anneaux en doigts de zinc, XIAP favorise l'ubiquitination et la dégradation subséquente, des caspases actives -3 et -9. XIAP contribue aussi à inhiber l'apoptose par l'activation de NF- κ B, qui est un facteur de transcription qui prône la survie cellulaire, engendrant, entre autre, la transcription des protéines de la famille des IAPs. Puisque XIAP est une protéine inhibitrice de l'apoptose, elle est considérée comme une cible très intéressante pour le développement d'agents chimiothérapeutiques pour le traitement des tumeurs. Trois caractéristiques connues de XIAP font de lui une cible intéressante pour le traitement du cancer. Il a déjà été démontré que la surexpression de XIAP dans des cellules de cancer ovarien en culture engendre la

chimiorésistance, entre autre, en augmentant le niveau de pAkt (Asselin 2001). Il a aussi été démontré que la diminution de l'expression de XIAP par siRNA restaure la chimiosensibilité d'une multitude de cellules malignes (Schimmer 2006). Et finalement, la perte de fonction de XIAP n'est pas fatale pour la cellule (Cummins 2004). Ce sont ces trois conditions réunies qui font de XIAP un candidat de premier choix dans le développement de nouvelles molécules contre le cancer.

1.7.2.3. PARP

PARP (poly(adenoside diphosphate[ADP]-ribose)polymerase) se lie à l'ADN endommagé et facilite sa réparation (Eberhart 2003). PARP est activé par la voie intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose. Lorsque la cascade des caspases est enclenchée, les caspases régulatrices comme les caspases-8 et -9 activent les caspases effectrices comme les caspases -3, -6 et -7. L'activation des caspases effectrices engendre le clivage de plusieurs structures et de protéines régulatrices comme PARP (Holleman 2005). PARP est clivé en un fragment de 89 kDa qui est souvent utilisé comme indicateur d'apoptose (Tesauro 2006). Dans un organisme, la perte de PARP engendre une déficience sévère de la capacité de réparation des bases nucléotidiques ainsi qu'une instabilité génomique (Muñoz-Gámez 2005).

1.8 But de l'étude

Le phénomène de chimiorésistance est un problème grave qu'il faut contourner si nous voulons un jour, réussir à vaincre le cancer. Bien que les mécanismes mis en branle par la cellule cancéreuse pour se défendre contre les agents chimiothérapeutiques sont de mieux en mieux compris, beaucoup reste à faire avant de pouvoir contourner ce problème. Quelques études antérieures ont mis en évidence le rôle de certaines protéines dans le phénomène de chimiorésistance, notamment XIAP et Akt pour ne nommer que ceux-là. Notre étude a donc comme but premier d'étudier le rôle de XIAP dans le phénomène de chimiorésistance dans des cellules de cancer de l'utérus. Nous allons soumettre nos cellules contrôles (avec du XIAP endogène) et nos cellules traitées à

l'antisense de XIAP (interférence ARN) à la présence ou à l'absence d'agents chimiothérapeutiques tels le cisplatine, la doxorubicine et le taxol. Nous allons aussi porter à l'étude le rôle des différents isoformes d'Akt, soit Akt1, Akt2 et Akt3, dans le phénomène de chimiorésistance. Pour ce faire, nous allons transfecter nos cellules avec trois différents plasmides, soit Akt1 CA, Akt2 CA ou Akt3 CA. Chacun de ces plasmides surexprime la forme active d'un des isoformes d'Akt. Nous allons comparer ces cellules avec des cellules contrôles (contenant un plasmide vide) en présence ou en absence d'agents chimiothérapeutiques tels le cisplatine, la doxorubicine et le taxol. Dans un avenir rapproché, nous espérons que ces connaissances pourront servir à l'élaboration de nouvelles molécules ayant pour cible ces protéines et qui, espérons-le, contribuera à la résolution du phénomène de chimiorésistance trop souvent rencontré lors de traitement de chimiothérapie.

CHAPITRE II

MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Matériel

Le cisplatine et le Hoechst 33258 ont été obtenus chez Sigma (St-Louis, MO). La doxorubicine est un cadeau de Farmitalia Carlo Erba (Milan, Italie). Le taxol a été acheté de chez Acros Organics N.V. (Fair Lawn, NJ). Le milieu nutritif DMEM-F12, le sérum BGS et FBS ont été obtenus de chez HyClone (South Logan, Utah). Tous les anticorps ont été achetés chez Cell Signaling Technology (Beverly, MA) à l'exception de l'anticorps anti-Akt3/PKB γ (Upstate cell signaling solution, Lake Placid, NY). Les anticorps secondaires anti-mouse et anti-rabbit couplés à la HRP ont été achetés chez Bio-Rad (Mississauga, ON, Canada). Le plasmide Akt1 CA (Constitutively active) nous a généreusement été donné par le Dr. Zhenguo Wu (Université des sciences et des technologies de Hong Kong, Kowloon, Hong Kong). Le plasmide Akt2 CA nous a généreusement été donné par le Dr. Joseph R. Testa (Fox Chase Cancer Center, Philadelphie, PEN). Le siRNA de XIAP a été acheté chez Invitrogen (Burlington, ON).

2.2 Culture cellulaire

Les cellules de cancer endométrial humains KLE ont été obtenues de l'ATCC (American Type Culture Collection). Les cellules de cancer endométrial humains Ishikawa nous ont généreusement été données par le Dr. Sylvie Mader (Université de Montréal, Qc, Canada) et les cellules de cancer du cervix HeLa nous ont généreusement été données par le Dr. Michel Vincent (Université Laval, Qc, Canada). Les cellules sont cultivées dans des boîtes 75cm² à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO₂. Les cellules HeLa et Ishikawa sont cultivées dans un milieu nutritif DMEM-F12 enrichi à l'HEPES avec 2% de BGS et de la gentamicine à une concentration de 50 µg/ml. Les cellules KLE sont cultivées dans un milieu nutritif DMEM-F12 sans HEPES avec 10% de FBS et de la gentamicine à une concentration de 50 µg/ml.

2.3 Extraction protéique et analyse par immuno-buvardage

Les cellules sont trypsinisées, lysées dans un tampon de lise RIPA (pH 7.4, NaCl 150 nM, SDS 0.1%, desoxycholate de sodium 0.5%, PBS avec du NP-40 1%, un inhibiteur complet des protéases; Roche), congelées et décongelées à 3 reprises puis centrifugées à 13000 g pendant 20 minutes à 4°C pour enlever le matériel insoluble. Le surnageant est récolté et entreposé à -20°C. La concentration protéique est déterminée à l'aide de la trousse de Bio-Rad, le « DC Protein Assay ». 50 µg de protéines sont chauffées (95°C pendant 3 minutes), séparées par électrophorèse dans un gel de SDS-Polyacrylamide 10% et transférées sur une membrane de nitrocellulose (15V, 30min) à l'aide d'un appareil de transferts semi sec (BioRad). Les membranes sont bloquées avec du lait en poudre 5% et Tween 0.05% dans du PBS. Elles sont ensuite incubées toute la nuit à 4°C avec soit l'anticorps anti-Akt1 (1 :5000), anti-Akt2 (1 :2000), anti-Akt3 (1 :1500), anti P-Akt (1 :1500), anti-caspases-3 clivées (1 :1500), anti-PARP clivées (1 :2000), anti-XIAP (1 :2000) et subséquemment avec soit les anticorps anti-lapin couplés à la HRP (1 :3000) ou les anticorps anti-souris couplés à la HRP (1 :2000) pendant quarante-cinq minutes à température pièce. L'activité de la peroxydase est visualisée à l'aide du « Super signal® West Femto Maximum sensity substrate » de Pierce (Arlington Heights, IL), suivant les instructions du manufacturier. L'activité de la peroxydase est ensuite quantifiée puis enregistrée dans un fichier numérique.

2.4 Construction plasmidique

Trois différents plasmides furent utilisés pour la surexpression de chacun des trois isoformes d'Akt, soit Akt1 CA, Akt2 CA et Akt3 CA. Puisque nous voulions surexprimer Akt sous sa forme activée (pAkt), nous devons utiliser une construction plasmidique orientée en ce sens. C'est pourquoi, nous avons utilisé des plasmides qui expriment des protéines dites : « constitutivement actives » ou Akt1 CA. Tout d'abord, pour être activé, Akt doit être phosphorylé directement à la membrane cellulaire. Pour nous assurer qu'Akt serait dirigé vers la membrane, nous avons utilisé des plasmides

contenant une séquence de myristoylation. Les protéines exprimées par ces plasmides sont donc myristoylées et sont, par conséquent, envoyées directement à la membrane plasmique où elles seront phosphorylées.

2.5 Construction plasmidique d'Akt3

Une réaction de polymérase en chaîne fut utilisée pour la construction du plasmide Akt3 CA. L'ARNm d'Akt3 a été amplifié par PCR à l'aide d'une amorce sens 5'-CTCAGAGGGGAGTCATCATGAGCGATGTTACC-3' et une amorce anti-sens 5'-AGAATGAAAGAGACTTATTCTCGTCCACTTGC-3'. Ensuite, à l'extrémité 5' des amorces sens et anti-sens, une séquence pour les enzymes de restrictions Xba I et BamH I fut incluse respectivement. L'absence de mutation fut confirmée par séquençage dans les deux sens. Ensuite, le vecteur pUSEamp contenant une séquence de myristoylation à son extrémité N-terminal (Upstate, Lake Placid, NY) et les produits du PCR d'Akt3 ont été coupés à l'aide d'enzymes de restriction BamH I et Xba I et lié à l'aide de la T4 DNA Ligase (New England, Biolabs Mississauga, ON). À la fin, le nouveau plasmide contenant l'ARNm d'Akt3 ainsi que la séquence de myristoylation, a été coupé avec d'autres enzymes de restriction, soit Hind III et BamH I et la séquence d'Akt3 CA fut cloné dans un vecteur d'expression appelé le pcDNA3.1/V5-His TOPO TA de Invitrogen (Burlington, ON).

2.6 Transfection des plasmides

Les cellules HeLa ont étéensemencées au nombre de 2×10^6 cellules dans des pétris de 100 mm x 20 mm, 24 heures avant la transfection. La transfection transitoire des cellules fut effectuée avec 5 µg de plasmides Akt1 CA, Akt2 CA ou Akt3 CA à l'aide de l'agent de transfection Superfect (Quiagen, Mississauga, ON), suivant le protocole du manufacturier. Des plasmides vides ont été utilisés comme contrôle de transfection.

2.7 siRNA XIAP

Les cellules KLE et Ishikawa furentensemencées et cultivées vingt-quatre heures à l'avance de façon à atteindre une confluence de 70% lors du traitement. Ils ont été transfectés avec 100nM de siRNA XIAP ou de siRNA contrôle (scrambled) utilisant l'agent de transfection Trans-it TKO de Mirus (Mississauga, ON) suivant les instructions du manufacturier.

2.8 Coloration des cellules au Hoechst

À la fin des traitements, les cellules flottantes et les cellules encore adhérentes sont resuspendues dans une solution 10% de formaline contenant 10 µg/ml de Hoechst 33258 pendant 24 heures à 4°C. La coloration des noyaux au Hoechst fut visualisée à l'aide d'un microscope à fluorescence (Olympus BX60). Les noyaux cellulaires ayant la morphologie typique d'un noyau en apoptose (présence de corps apoptotiques, de condensation et de fragmentation) sont comptés par lecture de champs aléatoire et les échantillons sont comptés à l'aveugle pour éviter tout biais expérimental. Un minimum de 200 cellules sont comptées par traitement.

2.9 Analyse statistique

Toutes les expériences sont répétées un minimum de trois fois. Les données sont soumises au test de « one-way ANOVA » du logiciel PRISM (PRISM software version 4.0; GraphPad, San Diego, CA). La différence entre les groupes expérimentaux sont déterminés par le test de Tukey.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1 Introduction aux résultats

Ce chapitre sera divisé en deux parties. La première partie se consacrera aux résultats des tests obtenus sur l'impact des différents isoformes d'Akt sur la chimiorésistance des cellules HeLa. Tout d'abord, les résultats de l'analyse des membranes de type immuno-buvarage ainsi que le décompte des cellules apoptotiques au Hoechst nous laisse envisager un rôle des 3 isoformes d'Akt dans la chimiorésistance des cellules HeLa face au taxol. Nos expériences ont, en effet, démontré une amplification du phénomène de chimiorésistance lorsque des isoformes constitutivement actifs d'Akt sont surexprimés chez les cellules HeLa en présence de taxol. La deuxième partie se consacrera aux résultats des tests obtenus sur l'impact de la diminution de l'expression de XIAP chez les cellules KLE et Ishikawa. Les résultats de l'analyse des membranes de type immuno-buvarage ainsi que le décompte des cellules apoptotiques au Hoechst nous laisse envisager un rôle de XIAP dans la chimiorésistance des cellules KLE et Ishikawa. En effet, nos résultats nous permettent d'affirmer que la diminution du niveau d'expression de XIAP à l'intérieur des cellules KLE diminue le phénomène de chimiorésistance au cisplatine. D'autres résultats nous permettent d'affirmer que la diminution du niveau d'expression de XIAP chez les cellules Ishikawa diminue le phénomène de chimiorésistance à la doxorubicine.

Enfin, les résultats qui vous seront présentés ici démontrent l'implication de ces deux protéines dans le phénomène de chimiorésistance et l'intérêt que la communauté scientifique devra porter envers ces participants au phénomène de la chimiorésistance. De plus, ces quelques données apportent de nouvelles connaissances à la compréhension et au fonctionnement d'un tel mécanisme. Veuillez prendre note que la totalité de ces résultats ont été publiés dans la revue *Apoptosis* du mois de février 2008 (Gagnon 2008).

3.2 Effet de la surexpression d'Akt CA sur la chimiorésistance chez les cellules HeLa

Les figures 3.1 à 3.9 sont tirées d'analyses par immuno-buvardage. Elles démontrent l'expression de quatre protéines (Akt1-2-3, P-Akt, caspase-3 clivé et PARP clivé) lorsque Akt1, Akt2 ou Akt3 sont surexprimés de façon constitutivement active dans les cellules HeLa en présence ou en absence de cisplatine, de doxorubicine ou de taxol. Ces images révèlent que la transfection de chacun des isoformes a bien fonctionné. Nous pouvons confirmer cette affirmation en comparant l'expression de Akt1, Akt2 ou Akt3 des cellules transfectées aux cellules contrôles non transfectées. De plus, ces images nous permettent de constater que la transfection des trois isoformes d'Akt CA chez les cellules HeLa ne déséquilibre pas le niveau d'expression de caspase-3 clivé ni de PARP clivé de façon significative des cellules traitées au cisplatine, à la doxorubicine ou au taxol comparativement aux cellules traitées et transfectées. Nous avons aussi remarqué une diminution de l'intensité de P-Akt chez les cellules transfectées lorsque celles-ci sont en présence de cisplatine et de doxorubicine (figure 3.1 à 3.6). Ce n'est toutefois pas le cas pour les cellules traitées au taxol puisque nous avons mesuré une légère augmentation du niveau de pAkt (figures 3.7 à 3.9).

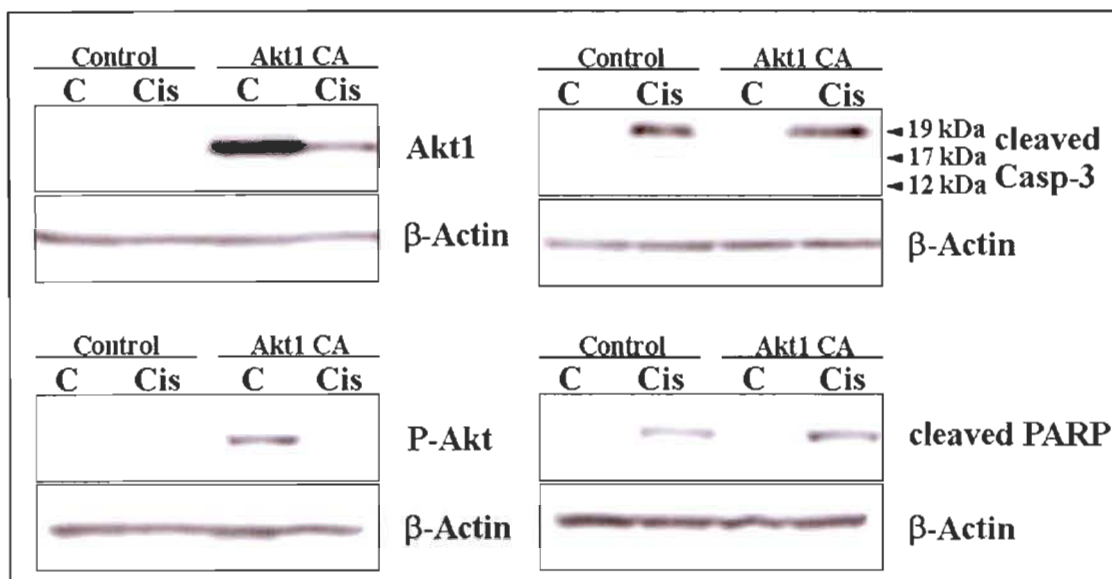


Figure 3.1 Effets de la transfection de Akt1 CA chez les cellules HeLa sur le niveau d'expression de Akt1, P-Akt, caspases-3 clivé et PARP clivé, en présence ou en absence de cisplatine.

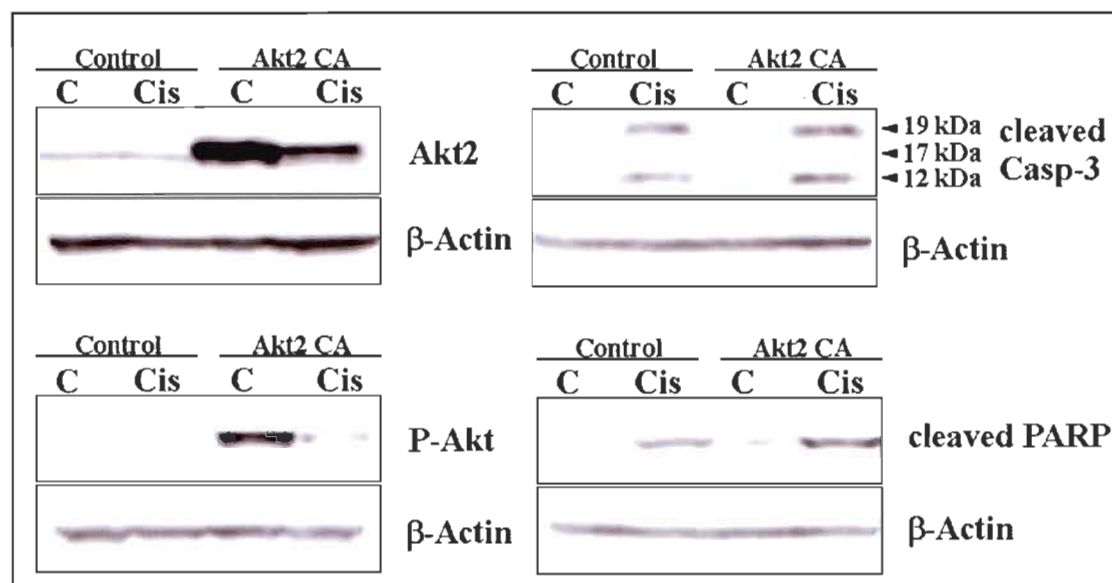


Figure 3.2 Effets de la transfection de Akt2 CA chez les cellules HeLa sur le niveau d'expression de Akt2, P-Akt, caspases-3 clivé et PARP clivé, en présence ou en absence de cisplatine.

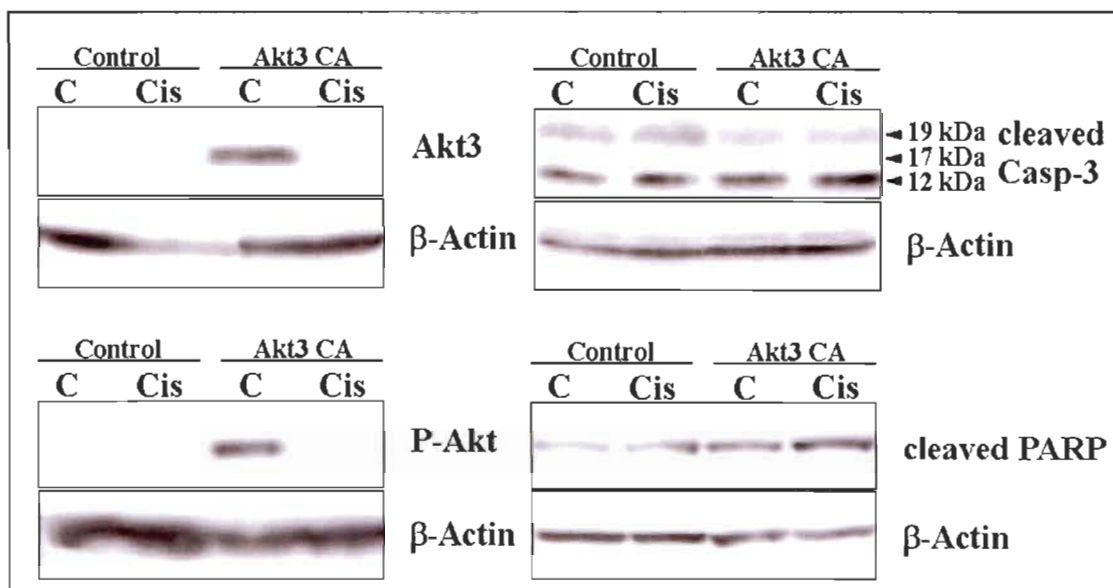


Figure 3.3 Effets de la transfection de Akt3 CA chez les cellules HeLa sur le niveau d'expression de Akt3, P-Akt, caspases-3 clivé et PARP clivé, en présence ou en absence de cisplatine.

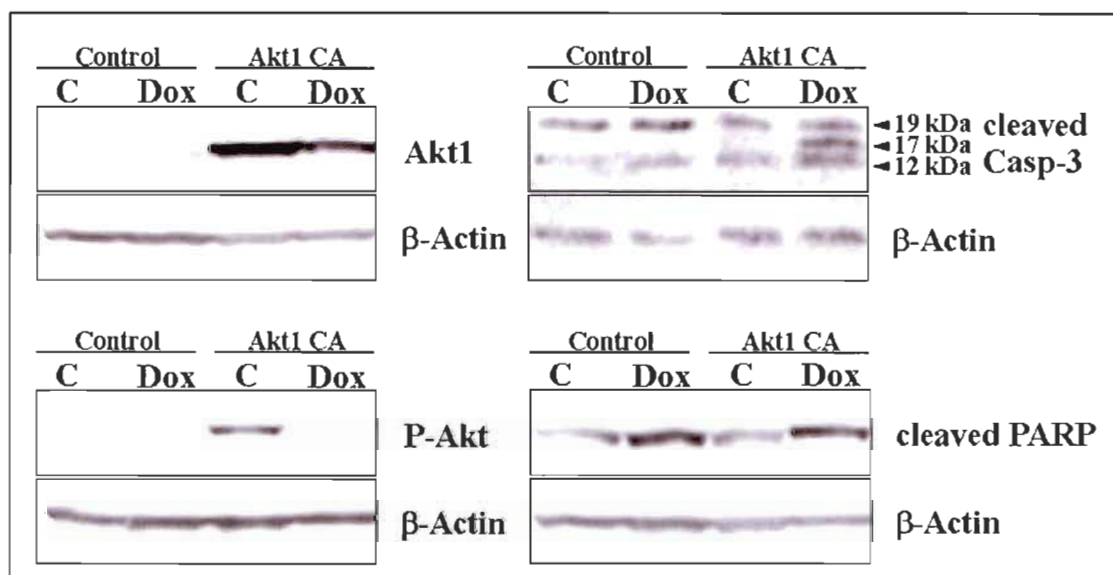


Figure 3.4 Effets de la transfection de Akt1 CA chez les cellules HeLa sur le niveau d'expression de Akt1, P-Akt, caspases-3 clivé et PARP clivé, en présence ou en absence de doxorubicine.

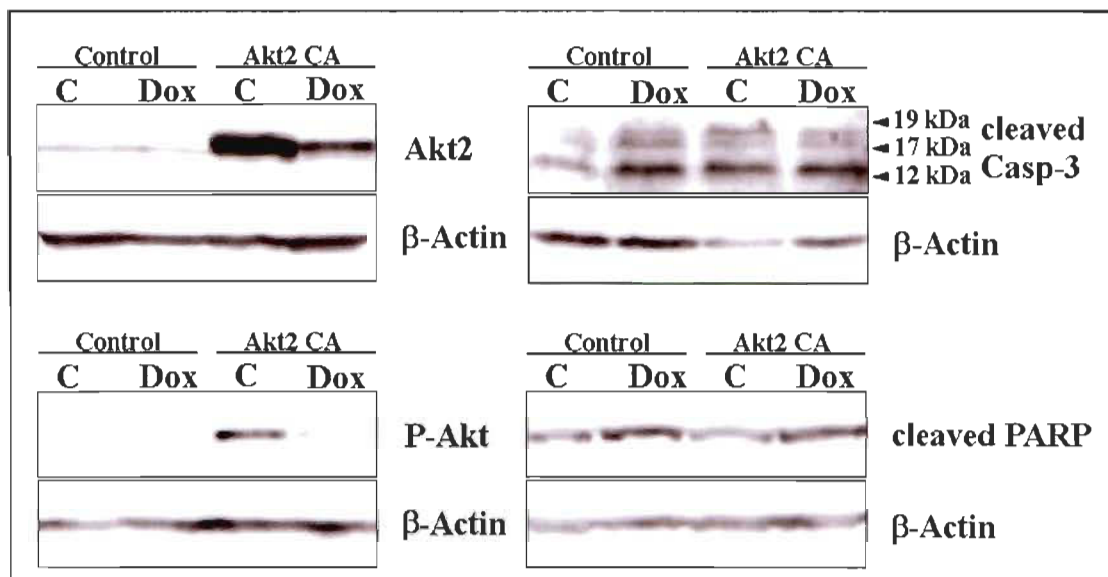


Figure 3.5 Effets de la transfection de Akt2 CA chez les cellules HeLa sur le niveau d'expression de Akt2, P-Akt, caspases-3 clivé et PARP clivé, en présence ou en absence de doxorubicine.

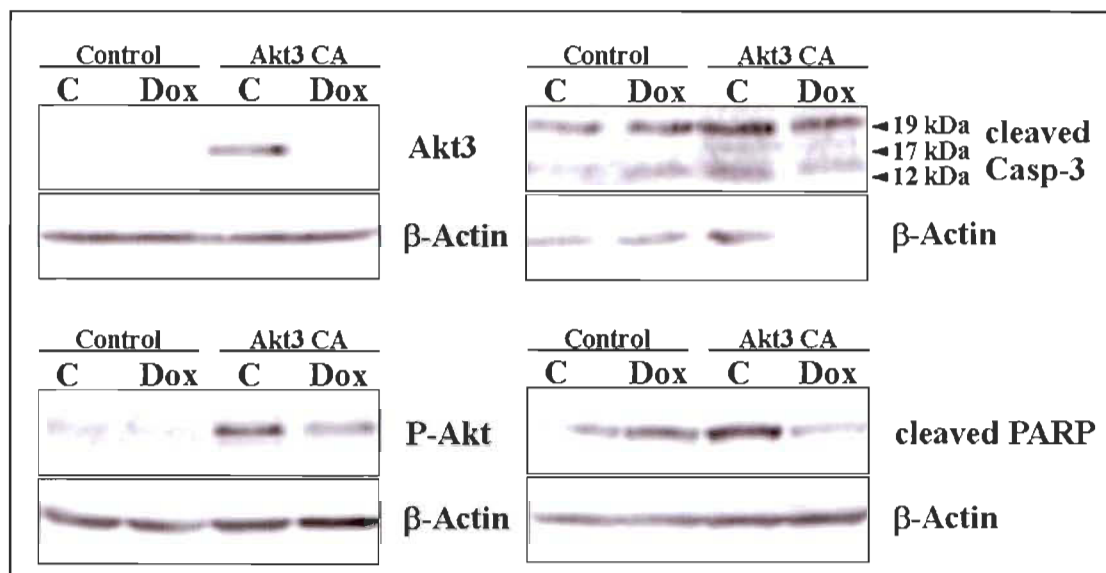


Figure 3.6 Effets de la transfection de Akt3 CA chez les cellules HeLa sur le niveau d'expression de Akt3, P-Akt, caspases-3 clivé et PARP clivé, en présence ou en absence de doxorubicine.

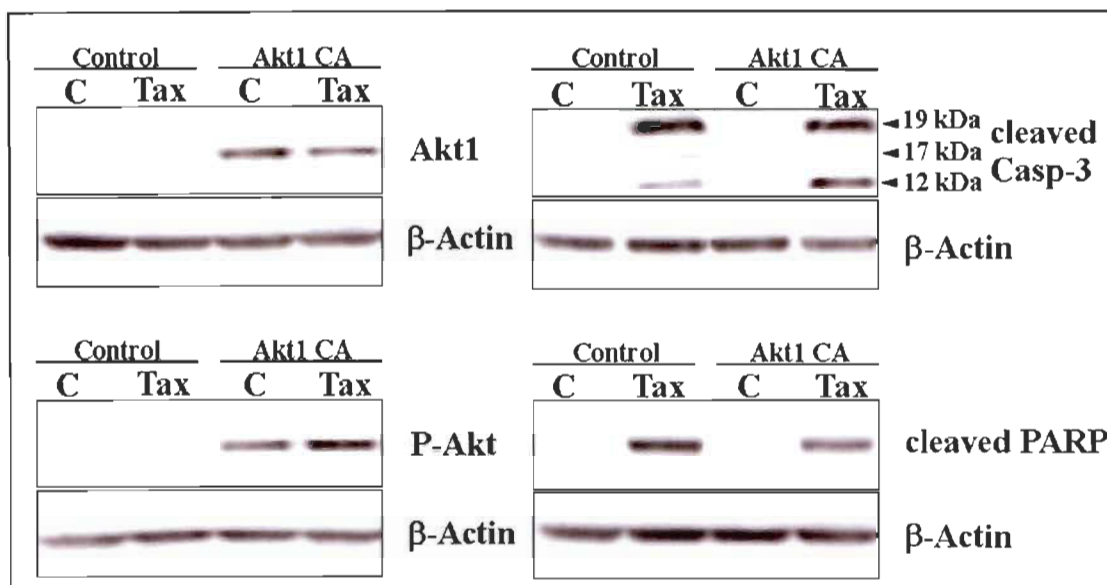


Figure 3.7 Effets de la transfection de Akt1 CA chez les cellules HeLa sur le niveau d'expression de Akt1, P-Akt, caspases-3 clivé et PARP clivé, en présence ou en absence de taxol.

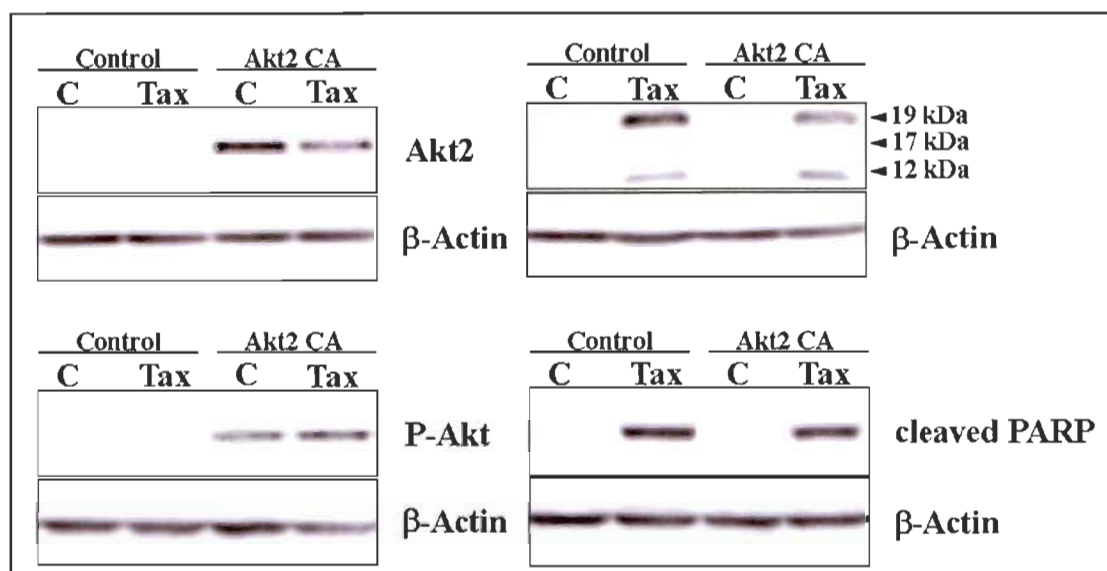


Figure 3.8 Effets de la transfection de Akt2 CA chez les cellules HeLa sur le niveau d'expression de Akt2, P-Akt, caspases-3 clivé et PARP clivé, en présence ou en absence de taxol.

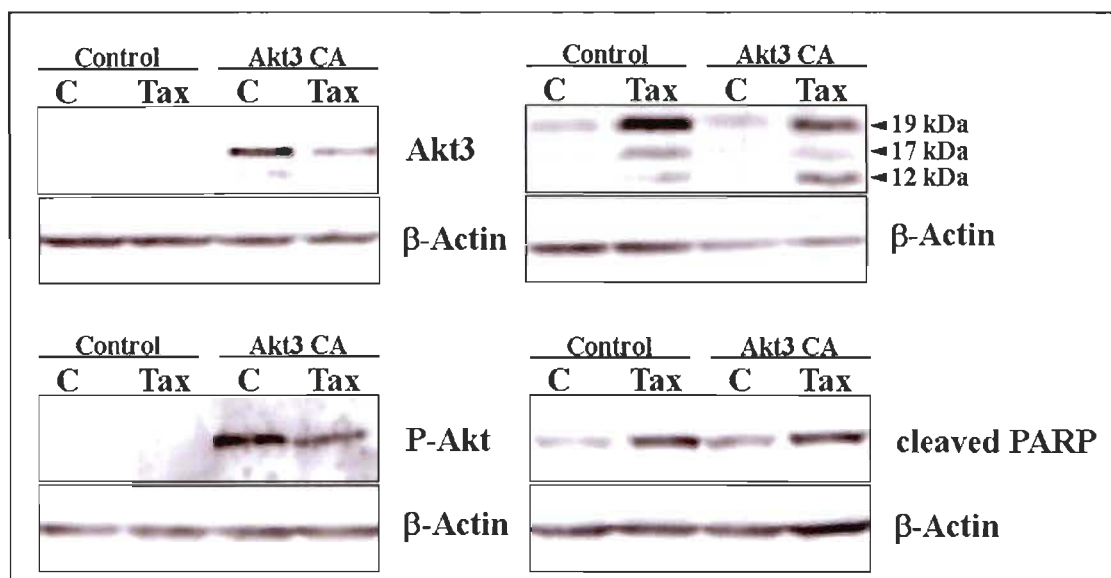


Figure 3.9 Effets de la transfection de Akt3 CA chez les cellules HeLa sur le niveau d'expression de Akt3, P-Akt, caspases-3 clivé et PARP clivé, en présence ou en absence de taxol.

Les figures 3.10 à 3.12 représentent graphiquement le pourcentage de mort cellulaire par apoptose des cellules lors des différents traitements. Le décompte des cellules apoptotiques a été fait à l'aide d'une coloration des noyaux au Hoechst. On y compare les trois isoformes d'Akt CA qui ont été transfectées chez les cellules HeLa en présence ou en absence de cisplatine, de doxorubicine et de taxol.

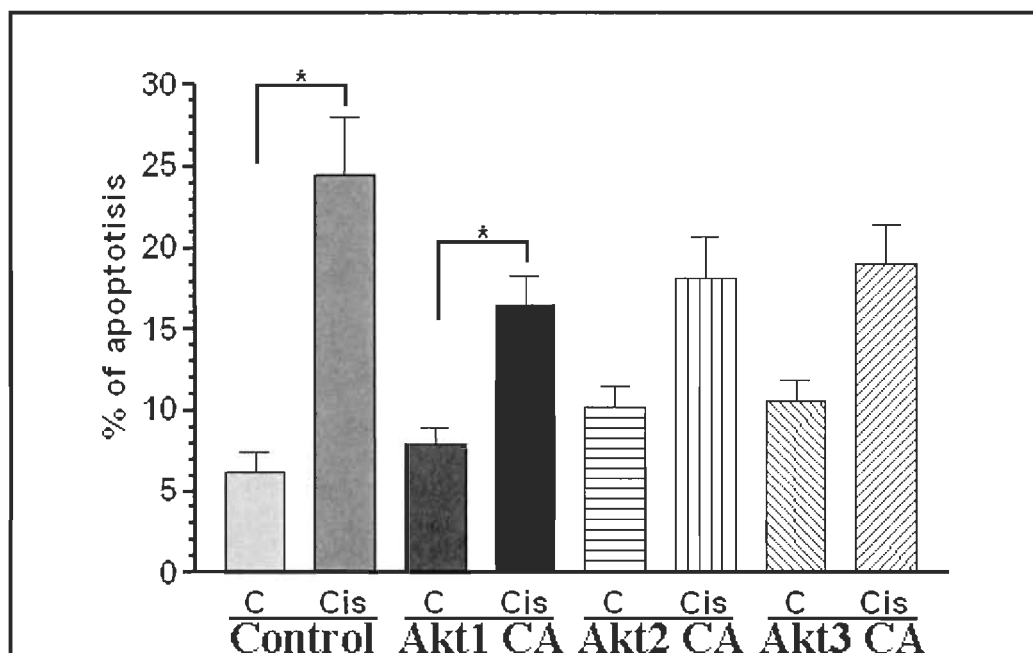


Figure 3.10 Mesure du taux d'apoptose des cellules HeLa transfectées avec l'un des trois isoformes d'Akt en présence ou en absence de cisplatine. Ces résultats démontrent que la surexpression de chacun des trois isoformes d'Akt combinés au cisplatine chez les cellules HeLa n'engendrent pas de changements au niveau de la chimiorésistance qui puissent être considérés statistiquement significatifs comparativement aux cellules traitées seulement au cisplatine.

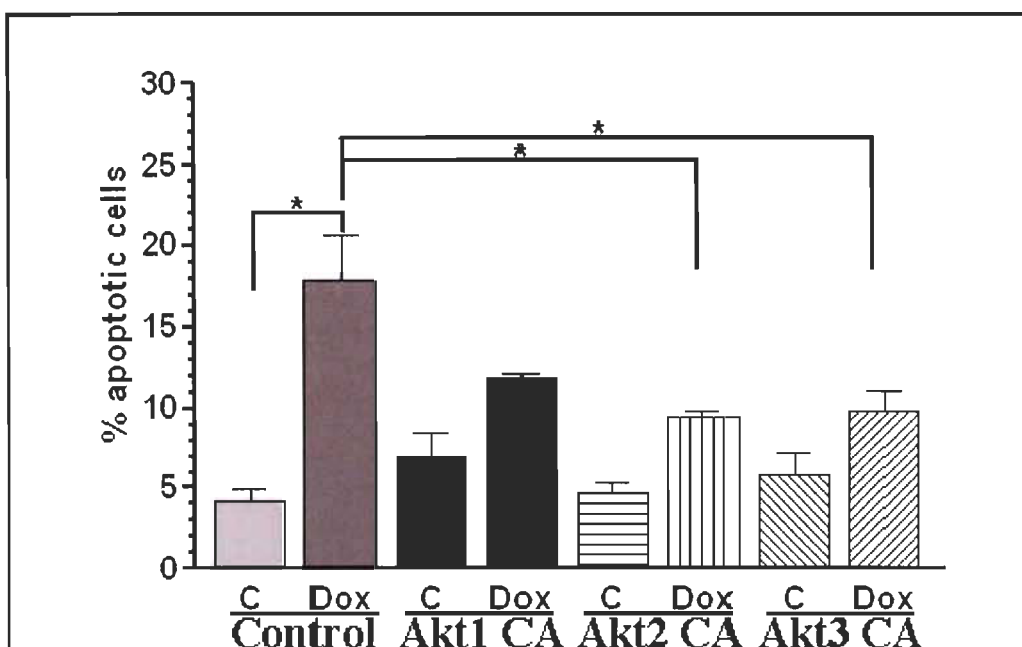


Figure 3.11 Mesure du taux d'apoptose des cellules HeLa transfectées avec l'un des trois isoformes d'Akt en présence ou en absence de doxorubicine. Encore une fois, ces résultats démontrent que la surexpression des trois isoformes d'Akt combinés à la doxorubicine chez les cellules HeLa n'engendrent pas de changements statistiquement significatifs au niveau de la chimiorésistance comparativement aux cellules traitées à la doxorubicine seule.

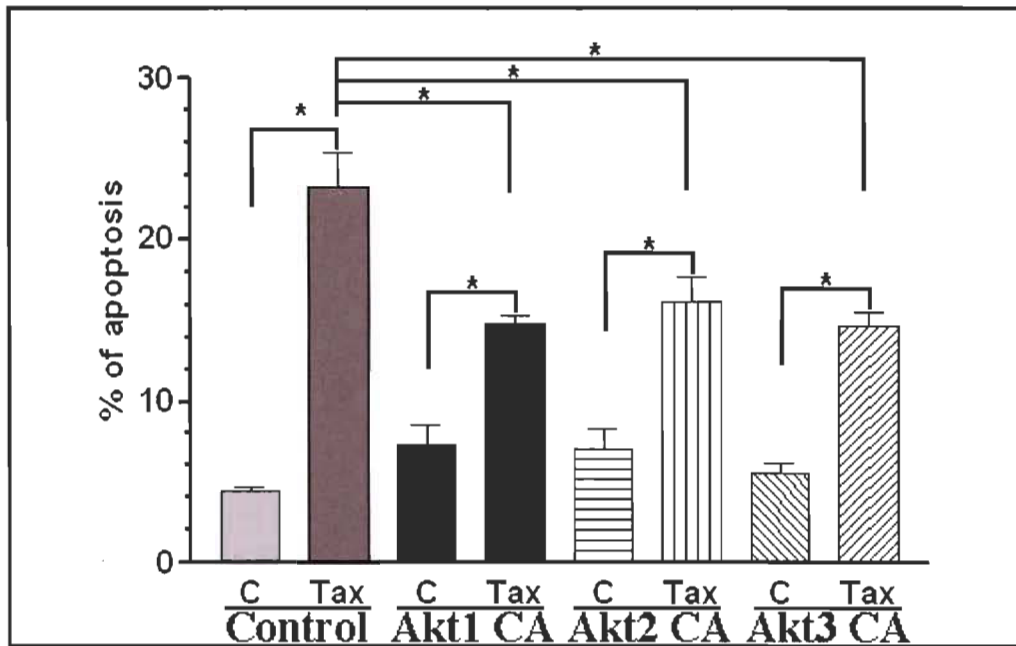


Figure 3.12 Mesure du taux d'apoptose des cellules HeLa transfectées avec l'un des trois isoformes d'Akt en présence ou en absence de taxol. Les résultats obtenus ci-dessus démontrent que la surexpression des trois isoformes d'Akt combinées au taxol chez les cellules HeLa engendrent une augmentation de la chimiorésistance statistiquement significative des cellules HeLa comparativement aux cellules traitées seulement avec le taxol.

3.3 Effets de la diminution du niveau d'expression de XIAP sur la chimiorésistance chez les cellules KLE et Ishikawa

Les figures 3.13 et 3.14 sont tirées d'analyses par immuno-buvardage des tests de siRNA XIAP sur les cellules KLE et Ishikawa respectivement. Elles permettent de vérifier le niveau d'expression de XIAP selon les différents traitements et, par le fait même, l'efficacité du siRNA de XIAP. Les taux de P-Akt, de caspase-3 clivé ainsi que de PARP clivé y sont également représentés. Vous pourrez remarquer une augmentation de caspases-3 clivé et de PARP clivé dans le traitement siRNA XIAP combiné au cisplatine comparativement à lorsque le cisplatine est employé seul chez les cellules KLE (figure 3.13). Cependant, ce n'est qu'en comparant le niveau de mort cellulaire par comptage des noyaux apoptotiques par coloration au Hoechst que l'on peut en tirer des conclusions (Fig.3.15). Nous pouvons donc en conclure que, chez les cellules KLE, le siRNA de XIAP engendre une diminution du phénomène de chimiorésistance lorsque le traitement est combiné au cisplatine. Dans la même optique, vous pourrez remarquer une augmentation de caspases-3 clivé et de PARP clivé dans le traitement siRNA XIAP combiné à la doxorubicine comparativement à lorsque la doxorubicine est employée seule chez les cellules Ishikawa (figure 3.14). Le décompte des cellules à noyaux apoptotiques colorées au Hoechst vient appuyer cette observation (figure 3.16). Nous pouvons donc en conclure que, chez les cellules Ishikawa, le siRNA de XIAP engendre une diminution du phénomène de chimiorésistance lorsque le traitement est combiné à la doxorubicine.

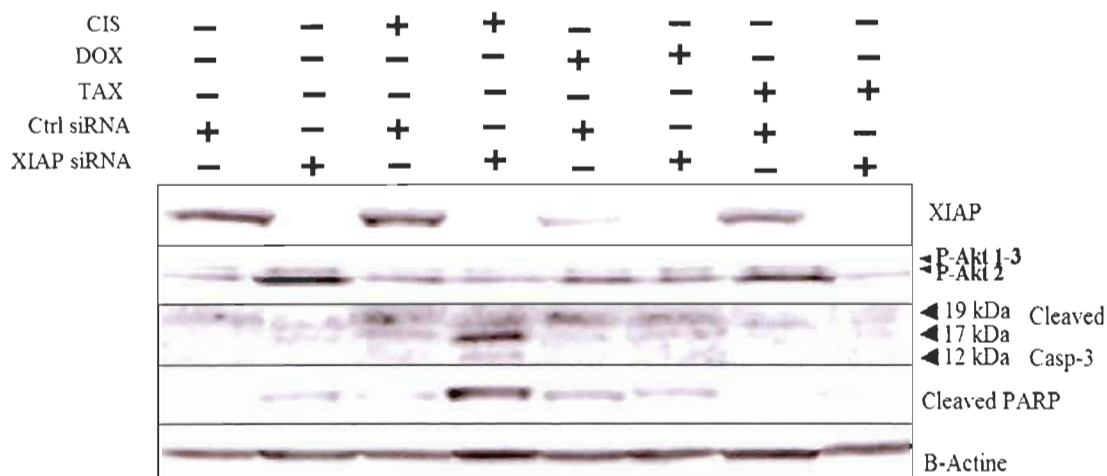


Figure 3.13 Effets de la transfection d'un siRNA de XIAP chez les cellules KLE sur le niveau d'expression de P-Akt, caspases-3 clivé et PARP clivé, en présence ou en absence de cisplatine, de doxorubicine ou de taxol.

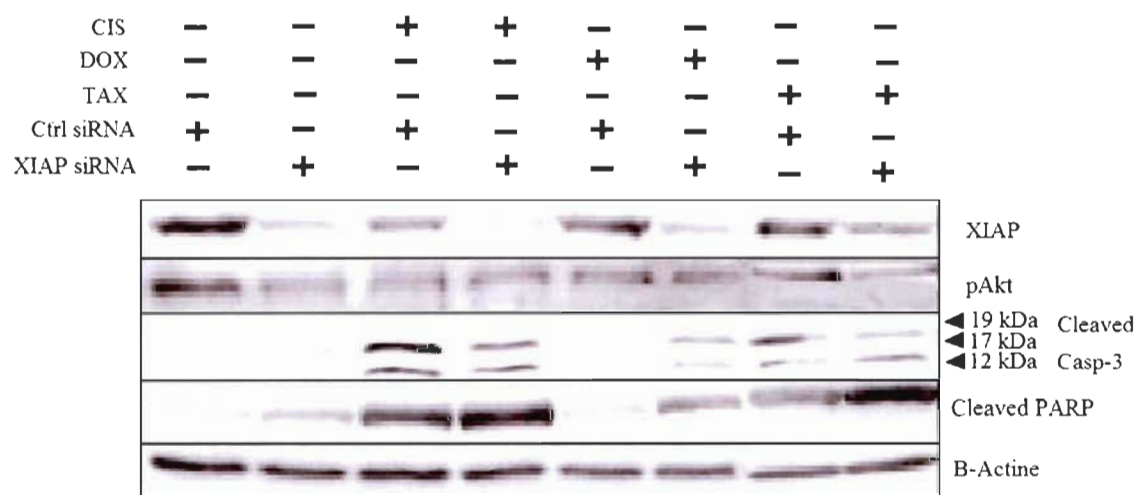


Figure 3.14 Effets de la transfection d'un siRNA de XIAP chez les cellules Ishikawa sur le niveau d'expression de P-Akt, caspases-3 clivé et PARP clivé, en présence ou en absence de cisplatine, de doxorubicine ou de taxol.

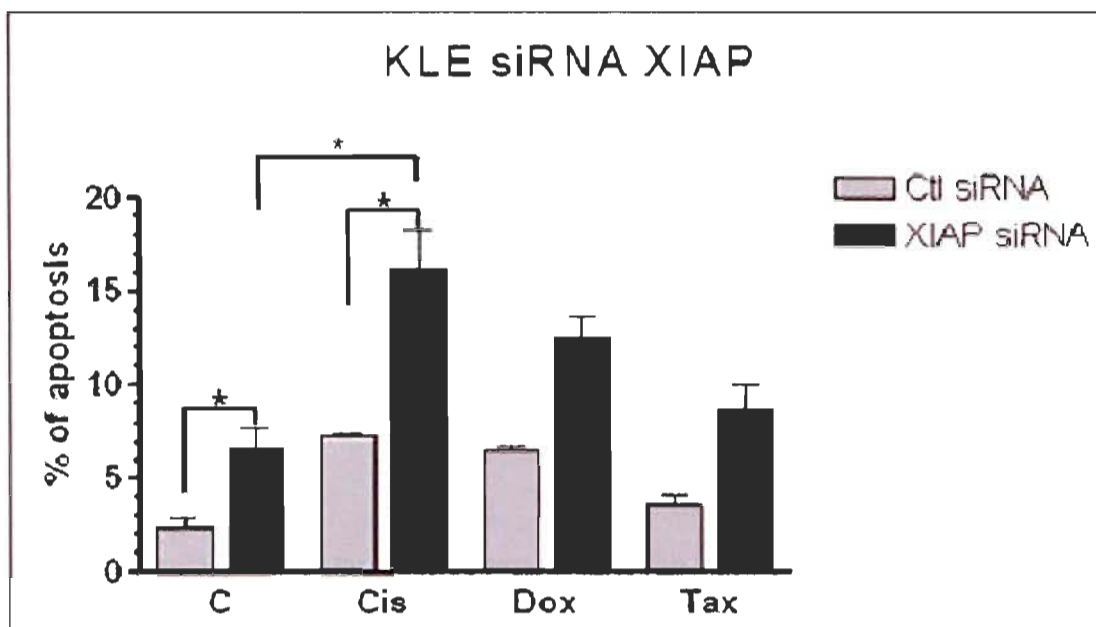


Figure 3.15 Mesure du taux d'apoptose des cellules KLE transfectées avec un siRNA de XIAP en présence ou en absence de cisplatine, de doxorubicine ou de taxol. Ces résultats démontrent une diminution de la chimiorésistance statistiquement significative des cellules KLE traitées au cisplatine et combinées à l'ARN interférence de XIAP comparativement aux cellules traitées au cisplatine seul.

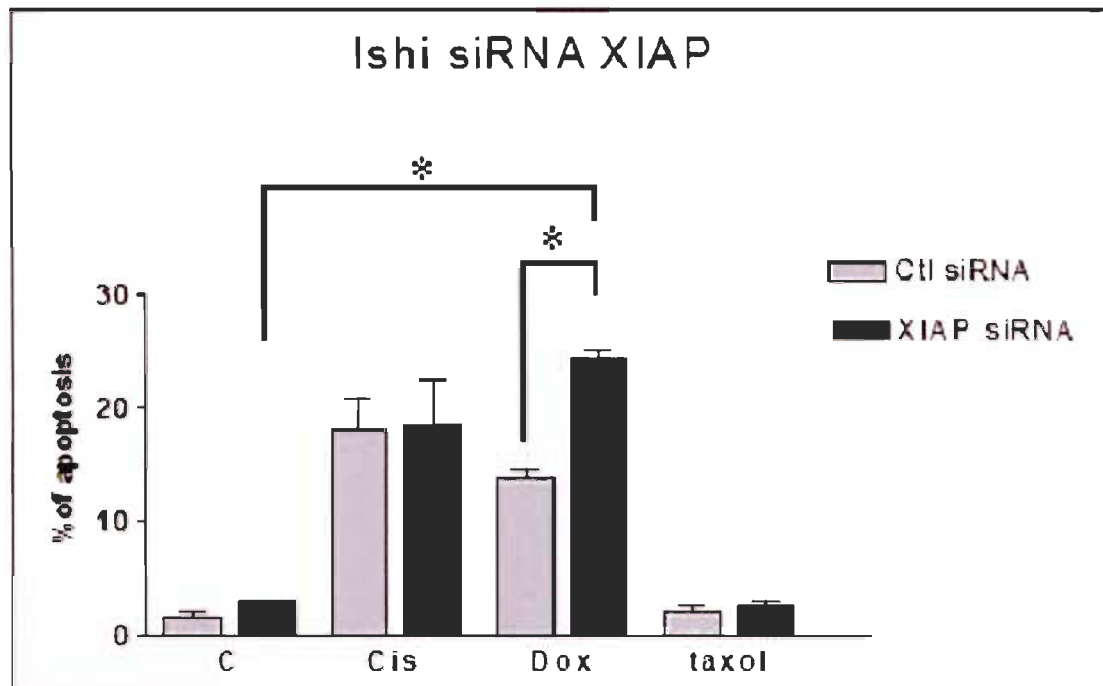


Figure 3.16 Mesure du taux d'apoptose des cellules Ishikawa transfectées avec un siRNA de XIAP en présence ou en absence de cisplatine, de doxorubicine ou de taxol. Cette figure démontre une diminution statistiquement significative de la chimiorésistance des cellules Ishikawa traitées à la doxorubicine en combinaison avec de l'ARN interférence de XIAP comparativement aux cellules traitées seulement à la doxorubicine.

CHAPITRE IV

DISCUSSION ET CONCLUSION

Dans cette section, nous tenterons de démontrer que les résultats obtenus au cours de notre cheminement permettent de jeter une certaine lumière sur le phénomène de chimiorésistance des cellules du cancer endométrial humain. Nous tenterons par la suite d'identifier les mécanismes impliqués dans les nouveaux résultats que nous avons obtenus.

4.1 Discussion

Avec une espérance de vie de plus en plus élevée, il n'est pas étonnant de constater que le cancer est devenu une maladie très présente dans notre société. Même si les mécanismes de cette maladie sont de mieux en mieux compris, nos armes contre le cancer restent limitées. La chimiothérapie fait partie de ces armes. Bien que très utile dans les cas de cancer avec métastases ou comme prévention aux métastases, elle demeure imparfaite. En effet, certains types de cancers ne répondent pas bien aux traitements de chimiothérapie. Les scientifiques ne comprennent toujours pas pourquoi, dans certains cas, les agents chimiothérapeutiques réussissent à exercer leurs effets, alors que dans d'autres cas, les cellules cancéreuses développent une résistance envers ces mêmes agents chimiothérapeutiques. C'est ce qu'on appelle le phénomène de chimiorésistance.

Lors de mon cheminement à la maîtrise, nous avons tenté de trouver quelques réponses sur ce phénomène encore très obscur. Notre objectif de recherche était de déterminer par quels mécanismes les cellules cancéreuses de l'utérus devenaient résistantes aux traitements chimiothérapeutiques. Pour ce faire, nous avons étudié deux protéines étroitement liées à la mort cellulaire. Premièrement, nous savions que la voie de signalisation de la PI3-K/Akt était souvent suractivée lors du développement d'un cancer (Downward 2004). Nous voulions savoir si cette voie de signalisation jouait un

rôle dans le phénomène de chimiorésistance des cellules de cancer utérin. Deuxièmement, nous connaissons les propriétés d'une des protéines de la famille des IAPs nommée XIAP. Cette protéine interagit directement avec Akt, d'où notre intérêt à étudier cette protéine dans un phénomène tel que la chimiorésistance (Asselin 2001).

Les cellules KLE constituent un excellent modèle d'étude des mécanismes impliqués dans la chimiorésistance. En effet, comme le démontre la figure 3.15, ces cellules sont hautement résistantes face aux trois agents chimiothérapeutiques utilisés lors de cette étude. En comparaison, nous avons utilisé les cellules chimiosensibles Ishikawa, qui eux sont, comme le démontre la figure 3.16, sensibles aux traitements au cisplatine et à la doxorubicine. Nous avons démontré que la diminution du niveau d'expression de XIAP, par ARN interférence, augmente la sensibilité des cellules KLE face au cisplatine ainsi que la sensibilité des cellules Ishikawa face à la doxorubicine. Ces résultats permettent de mettre en évidence l'implication de XIAP dans la protection cellulaire ainsi qu'un rôle clé dans l'inhibition de l'induction de l'apoptose induite par ces drogues. XIAP a déjà démontré son interaction ainsi que son rôle inhibiteur de l'activité des caspases-3 (Takahashi 1998). Dans les cellules KLE traitées à l'ARN interférence de XIAP, une augmentation marquée du niveau de PARP ainsi que du niveau de caspases-3 clivé, face au traitement au cisplatine, indique un rôle clé de XIAP dans l'induction de l'apoptose face à cette drogue (figure 3.13). Alors que, dans les cellules Ishikawa traitées à l'ARN interférence de XIAP, une augmentation marquée du niveau de PARP ainsi que du niveau de caspases-3 clivé, face au traitement à la doxorubicine, indique un rôle clé de XIAP dans l'induction de l'apoptose face à cette drogue (figure 3.14). Fait intéressant, le rôle protecteur de XIAP dans les cellules de cancers utérins est spécifique à certaines drogues comme dans les cellules KLE qui sont sensibles à l'apoptose induite par le cisplatine, alors que les cellules Ishikawa sont sensibles à l'apoptose induite par la doxorubicine lors d'une diminution du niveau d'expression de XIAP. Ce phénomène peut être la résultante du différent mode d'action de ces trois drogues: le cisplatine inhibe la réplication des liaisons avec l'ADN causant l'arrêt de la phase G1 (Un 2007); la doxorubicine inhibe la réplication en jouant un rôle sur les complexes de la topoisomérase-II et génère des radicaux libres ainsi que du peroxyde d'oxygène qui

active l'apoptose via les mitochondries (Mizutani 2005); alors que le taxol inhibe la réplication cellulaire en déstabilisant le faisceau mitotique normal (Schiff 1980). Bien sûr, en plus de XIAP, d'autres facteurs cellulaires peuvent être influencés par ces drogues, engendrant une réponse cellulaire sélective.

Dans nos recherches pour de tels facteurs, nous avons trouvé qu'Akt et XIAP sont fonctionnellement rattachés dans les cellules de cancers utérins sous des conditions basales (Gagnon 2008). Il a aussi été récemment démontré qu'Akt interagit directement avec et phosphoryle XIAP, engendrant une inhibition de l'ubiquitination et la dégradation induite par le cisplatine (Dan 2004). Donc, en absence d'Akt activé pour stabiliser la protéine, les drogues peuvent induire plus facilement la dégradation du facteur protecteur nommé XIAP. Pour étudier ce phénomène chez les cellules de cancers utérins, nous avons décidé d'utiliser les cellules HeLa, qui possèdent peu ou pas de pAkt endogène. Nous avons démontré que la surexpression de chacun des isoformes d'Akt activés augmentait la chimiorésistance des cellules HeLa face au taxol (figure 3.12). Ces résultats permettent de démontrer l'implication des trois isoformes d'Akt dans la protection contre l'apoptose générée par le taxol dans les cellules HeLa. Fait intéressant, la protection contre l'apoptose conféré par Akt activé semble être spécifique à certaines drogues. En effet, la surexpression des trois isoformes d'Akt activé n'a pas réussi à augmenter, de façon significative, la chimiorésistance des cellules HeLa face au cisplatine et à la doxorubicine comme le démontrent les figures 3.10 et 3.11. Ces résultats peuvent, en partie, être expliqués par le fait que ces trois drogues n'utilisent pas le même mécanisme d'action pour engendrer l'apoptose. Pour appuyer cette théorie, nous avons remarqué que le taxol ne réussit pas à diminuer le niveau de pAkt chez les cellules HeLa (figures 3.7 à 3.9) contrairement au cisplatine et à la doxorubicine qui, eux, engendrent une diminution du niveau de pAkt chez les cellules HeLa traitées (figures 3.1 à 3.6). Il est possible que le niveau de pAkt restant dans les cellules HeLa traitées au taxol soit suffisant pour phosphoryler XIAP et ainsi inhiber sa dégradation et diminuer, par le fait même, l'action apoptotique du taxol.

Nos résultats appuient ceux obtenus par Shrikhande de l'équipe du Dr. Friess qui avait observé que la réduction du niveau endogène de XIAP, par siRNA, diminuait la chimiorésistance chez les lignées cellulaires cancéreuses pancréatiques, Capan-1 et T3M4 (Shrikhande 2006). De plus, l'implication de la protéine Akt, dans la chimiorésistance, avait déjà été observée chez les cellules cancéreuses endométriales KLE par l'équipe du Dr. Asselin. En effet, ils ont observé que la réduction du niveau d'expression d'Akt, par siRNA, diminuait la chimiorésistance chez les cellules KLE (Gagnon 2004).

Ces travaux ont maintenant confirmé la participation de nouveaux joueurs dans le phénomène de chimiorésistance des cellules endométriales. Ils permettent d'inclure XIAP et Akt comme étant des participants majeurs au processus de chimiorésistance des cancers endométriaux. Les experts ont maintenant de nouveaux indices leur permettant de dessiner un schéma plus clair du mécanisme de chimiorésistance. Dans un avenir rapproché, il serait intéressant de faire ces mêmes expériences, mais au sein d'organismes vivants tels des souris nues. Imaginons un modèle animal à qui l'on injecterait des cellules cancéreuses humaines d'un cancer de l'endomètre. Nous pourrions transformer de façon permanente cette lignée pour qu'elle n'exprime pas de XIAP ou pour qu'elle surexprime Akt de façon constitutivement activée. Nous pourrions nous servir des lignées non transfectées comme lignées contrôles. Ensuite, il suffirait de traiter les souris avec les différents agents chimiothérapeutiques utilisés lors de nos expériences. Nous pensons qu'il serait très intéressant de confirmer nos observations dans un modèle *in vivo*. Si ce genre d'expérience donnait des résultats positifs, il serait intéressant d'imaginer, dans un avenir rapproché, une nouvelle génération de molécules qui cibleraient des protéines comme XIAP ou Akt, augmentant ainsi l'efficacité des traitements chimiothérapeutiques des cancers endométriaux. Ce type de molécule est déjà porté à l'étude, notamment, dans le traitement des myélomes multiples. Une équipe de chercheurs a récemment démontré l'efficacité du HHT (homoharringtonine), un inhibiteur de la phosphorylation d'Akt, à diminuer la chimiorésistance des cellules cancéreuses face à un agent chimiothérapeutique chez ce type de cancer (Meng 2008).

4.2 Conclusion

En somme, ces travaux de recherches ont permis de confirmer la participation de deux nouveaux joueurs dans le phénomène de chimiorésistance, soit XIAP et Akt. Nous avons démontré qu'une diminution du niveau d'expression de XIAP engendrait, chez les cellules KLE, une diminution du phénomène de chimiorésistance, lorsque traité avec le cisplatine. Nous avons aussi démontré ce même effet chez les cellules Ishikawa avec la doxorubicine. De plus, nous avons démontré que le fait de surexprimer Akt de façon constitutivement active entraîne une augmentation de la chimiorésistance des cellules HeLa face au taxol.

Ces nouvelles données pourront servir à résoudre le casse-tête du mécanisme de la résistance des cellules cancéreuses face à leur traitement. De plus, ils ouvrent la voie sur de nouvelles études et, qui sait, sur la possibilité de confection de nouvelles molécules ciblant XIAP ou Akt lors d'un traitement de chimiothérapie.

BIBLIOGRAPHIE

Aguerri, M. F., Berger, C., Cabrol, M., Clavero-Fabri, M.-C., Delogne, A., Espié, M., Herbrecht, R., Lanvin, D., Laurence, V., Lefeuvre, M., Pech-Gourg, E., Pichard-Léandri, E., Pigneux, A., Vedrenne, J.-B., Westeel, V. (2000). Pratique des soins ambulatoires en cancérologie. Montrouge.

Asselin, E., Mills, G.B., 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(5)**: 1862-8.

Bailey, H. H., Mahoney, M.R., Ettinger, D.S., Maples, W.J., Fracasso, P.M., Traynor, A.M., Erlichman, C., Okuno, S.H. (2006). "Phase II study of daily oral perifosine in patients with advanced soft tissue sarcoma." Cancer Nov **15;107(10)**: 2462-7.

Biedler, J. L., Riehm, H. (1970). "Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies." Cancer Res. **30(4)**: 1174-84.

Birley, H. (1995). "Human papillomaviruses, cervical cancer and the developing world." Ann Trop Med Parasitol **89(5)**: 453-63.

Buckley, J. D., Harris, R.W., Doll, R., Vessey, M.P., Williams, P.T. (1981). "Case-control study of the husbands of women with dysplasia or carcinoma of the cervix uteri." Lancet **7;2(8254)**: 1010-5.

Campbell, R. M. e. N. A. (1995). Biologie, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.

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(5392)**: 1318-21.

Chan, H. S., Haddad, G., Thorner, P.S., DeBoer, G., Lin, Y.P., Ondrusek, N., Yeger, H., Ling, V. (1991). "P-glycoprotein expression as a predictor of the outcome of therapy for neuroblastoma." N Engl J Med. **325(23)**: 1608-14.

Chau, N. M., Ashcroft, M. (2004). "Akt2: a role in breast cancer metastasis." Breast Cancer Res **6(1)**: 55-7.

Chaudhry, V., Rowinsky, E.K., Sartorius, S.E., Donehower, R.C., Cornblath, D.R. (1994). "Peripheral neuropathy from taxol and cisplatin combination chemotherapy: clinical and electrophysiological studies." Ann Neurol **35(3)**: 304-11.

Chong, Z. Z., Kang, J.Q., Maiese, K. (2004). "AKT1 drives endothelial cell membrane asymmetry and microglial activation through Bcl-xL and caspase 1, 3, and 9." Exp Cell Res **296**(2): 196-207.

Chong ZZ, K. J., Maiese K (2002). "Erythropoietin is a novel vascular protectant through activation of Akt1 and mitochondrial modulation of cysteine proteases." Circulation **106**(23).

Chong ZZ, K. J., Maiese K (2003). "Erythropoietin fosters both intrinsic and extrinsic neuronal protection through modulation of microglia, Akt1, Bad, and caspase-mediated pathways." Br J Pharmacol **138**(6): 1107-18.

Crowell, J. A., Steele, V.E., Fay, J.R. (2007). "Targeting the AKT protein kinase for cancer chemoprevention." Mol Cancer Ther. **6**(8): 2139-48.

Cummins, J. M., Kohli, M., Rago, C., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Bunz, F. (2004). "X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) is a nonredundant modulator of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated apoptosis in human cancer cells." Cancer Res. **1;64**(9): 3006-8.

Dan, H. C., Sun, M., Kaneko, S., Feldman, R.I., Nicosia, S.V., Wang, H.G., Tsang, B.K., Cheng, J.Q. (2004). "Akt phosphorylation and stabilization of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP)." J Biol Chem **279**(7): 5405-12.

Delehedde, M. (2006). Que sait-on du cancer?, EDP science.

Deo, S. V., Shukla, N.K., Raina, V., Mohanti, B.K., Sharan, R., Kar, M., Rath, G.K. (2005). "Organ-preserving multimodality management of squamous cell carcinoma of anal canal." Indian J Gastroenterol **24**(5): 201-4.

Díaz, J. F., Andreu, J.M. (1993). "Assembly of purified GDP-tubulin into microtubules induced by taxol and taxotere: reversibility, ligand stoichiometry, and competition." Biochemistry **32**(11): 2747-55.

Downward, J. (2004). "PI 3-kinase, Akt and cell survival." Semin Cell Dev Biol **15**(2): 177-82.

Easton, R. M., Cho, H., Roovers, K., Shineman, D.W., Mizrahi, M., Forman, M.S., Lee, V.M., Szabolcs, M., de Jong, R., Oltersdorf, T., Ludwig, T., Efstratiadis, A., Birnbaum, M.J. (2005). "Role for Akt3/protein kinase Bgamma in attainment of normal brain size." Mol Cell Biol **25**(5): 1869-78.

Eberhart, C. G. (2003). "Medulloblastoma in mice lacking p53 and PARP: all roads lead to Gli." Am J Pathol **162**(1): 7-10.

Eckelman, B. P., Salvesen, G.S., Scott, F.L. (2006). "Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family." EMBO Rep. **7**(10): 988-94.

Edwards, E., Geng, L., Tan, J., Onishko, H., Donnelly, E., Hallahan, D.E. (2002). "Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling in the response of vascular endothelium to ionizing radiation." Cancer Res **62(16)**: 4671-7.

Eisenhauer, E. A., ten Bokkel Huinink, W.W., Swenerton, K.D., Gianni, L., Myles, J., van der Burg, M.E., Kerr, I., Vermorken, J.B., Buser, K., Colombo, N. (1994). "European-Canadian randomized trial of paclitaxel in relapsed ovarian cancer: high-dose versus low-dose and long versus short infusion." J Clin Oncol. **12(12)**: 2654-66.

Gagnon, V., Mathieu, I., Sexton, E., Leblanc, K., Asselin, E. (2004). "AKT involvement in cisplatin chemoresistance of human uterine cancer cells." Gynecol Oncol **94(3)**: 785-95.

Gagnon, V., St-Germain, M.E., Parent, S., Asselin, E. (2003). "Akt activity in endometrial cancer cells: regulation of cell survival through cIAP-1." Int J Oncol **23(3)**: 803-10.

Gagnon, V., Van Themsche, C., Turner, S., Leblanc, V., Asselin, E. (2008). "Akt and XIAP regulate the sensitivity of human uterine cancer cells to cisplatin, doxorubicin and taxol." Apoptosis **Feb;13(2)**: 259-71.

Garcia-Giralt, E., Omodei Zorini, C., Ferri, L., Jouve, M., Dorval, T., Beuzeboc, P., Palangie, T., Livartowski, A., Scholl, S., Pouillart, P. (1994). "Continuous infusion of doxorubicin for 10 days as third-line chemotherapy in metastasized breast tumors. Initial observations." Clin Ter **144(5)**: 425-30.

Gerlach, J. H., Kartner, N., Bell, D.R., Ling, V. (1986). "Multidrug resistance." Cancer Surv **5(1)**: 25-46.

Goldenberg, G. J., Begleiter, A. (1980). "Membrane transport of alkylating agents." Pharmacol Ther **8(2)**: 237-74.

Goldie, J. H. (1996). Drug resistance : The cancer chemotherapy sourcebook. Baltimore, In M.C. Perry.

Goldsby, R. A., Kindt, Thomas J., Osborne, Barbara A. (2003). Immunologie. New York, Freeman and company.

Griffiths, A. J. F., Miller, Jeffrey, H., Suzuki, David T., Lewontin, Richard C., Gelbart, William M. (2002). Introduction à l'analyse génétique. New York, W.H. Freeman and company.

Gronbaek, K., Hother, C., Jones, P.A. (2007). "Epigenetic changes in cancer." Apmis **115(10)**: 1039-59.

Heath, J. W., Young, Barbara., Wheeler, Paul Richard. (2001). Histologie fonctionnelle. Paris, Harcourt Publishers Limited 2000.

Henderson, I. C., Berry, D.A., Demetri, G.D., Cirrincione, C.T., Goldstein, L.J., Martino, S., Ingle, J.N., Cooper, M.R., Hayes, D.F., Tkaczuk, K.H., Fleming, G., Holland, J.F., Duggan, D.B., Carpenter, J.T., Frei, E. 3rd., Schilsky, R.L., Wood, W.C., Muss, H.B., Norton, L. (2003). "Improved outcomes from adding sequential Paclitaxel but not from escalating Doxorubicin dose in an adjuvant chemotherapy regimen for patients with node-positive primary breast cancer." J Clin Oncol **15;21(6)**: 976-83.

Héron-Milhavet, L., Franckhauser, C., Rana, V., Berthenet, C., Fisher, D., Hemmings, B.A., Fernandez, A., Lamb, N.J. (2006). "Only Akt1 is required for proliferation, while Akt2 promotes cell cycle exit through p21 binding." Mol Cell Biol **26(22)**: 8267-80.

Holleman, A., den Boer, M.L., Kazemier, K.M., Beverloo, H.B., von Bergh, A.R., Janka-Schaub, G.E., Pieters, R. (2005). "Decreased PARP and procaspase-2 protein levels are associated with cellular drug resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia." Blood **106(5)**: 1817-23.

Ido, Y., Carling, D., Ruderman, N. (2002). "Hyperglycemia-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: inhibition by the AMP-activated protein kinase activation." Diabetes **51(1)**: 159-67.

Ikeyama, S., Kokkonen, G., Shack, S., Wang, X.T., Holbrook, N.J. (2002). "Loss in oxidative stress tolerance with aging linked to reduced extracellular signal-regulated kinase and Akt kinase activities." FASEB J **16(1)**: 114-6.

Juliano, R. L., Ling, V. (1976). "A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants." Biochim Biophys Acta **11;455(1)**: 152-62.

Key, T. (1995). "Hormones and cancer in humans." Mutat Res **333(1-2)**: 59-67.

Koffa, M., Koumantakis, E., Ergazaki, M., Tsatsanis, C., Spandidos, DA. (1995). "Association of herpesvirus infection with the development of genital cancer." Int J Cancer **27;63(1)**: 58-62.

Lawlor, M. A., Alessi, D.R. (2001). "PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses?" J Cell Sci **114(Pt 16)**: 2903-10.

Lemaire, V. (2003). Larousse médical. Larousse médical. Paris: 1215.

Ling, V., Thompson, L.H. (1974). "Reduced permeability in CHO cells as a mechanism of resistance to colchicine." J Cell Physiol. **83(1)**: 103-16.

Lokich, J., Anderson, N. (1998). "Carboplatin versus cisplatin in solid tumors: an analysis of the literature." Ann Oncol **9(3)**: 341.

LoPiccolo, J., Blumenthal, G.M., Wendy, B., Bernstein W.B., Dennis. P.A. (2008). "Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations." Drug Resist Updat **11(1-2)**: 32-50.

Lovejoy, N. C. (1994). "Precancerous and cancerous cervical lesions: the multicultural "male" risk factor." Oncol Nurs Forum **21(3)**: 497-504.

Marcel Musteata, F., Pawliszyn, J. (2006). "Determination of free concentration of Paclitaxel in liposome formulation." J Pharm Pharm Sci **9(2)**: 231-7.

Markman, M., Kennedy, A., Webster, K., Kulp, B., Peterson, G., Belinson, J. (1998). "Paclitaxel administration to gynecologic cancer patients with major cardiac risk factors." J Clin Oncol **16(11)**: 3483-5.

McGuire, W. P., Hoskins, W.J., Brady, M.F., Kucera, P.R., Partridge, E.E., Look, K.Y., Clarke-Pearson, D.L., Davidson, M. (1996). "Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in patients with stage III and stage IV ovarian cancer." N Engl J Med **334(1)**: 1-6.

Mende, I., Malstrom, S., Tschlis, P.N., Vogt, P.K., Aoki, M. (2001). "Oncogenic transformation induced by membrane-targeted Akt2 and Akt3." Oncogene **20(32)**: 4419-23.

Meng, H., Yang, C., Jin, J., Zhou, Y., Qian, W. (2008). "Homoharringtonine inhibits the AKT pathway and induces in vitro and in vivo cytotoxicity in human multiple myeloma cells." Leuk Lymphoma. **49(10)**: 1954-62.

Miaskowski, C., Buchsel, Patricia., (1999). Oncology nursing.
washington, Mosby.

Mizutani, H., Tada-Oikawa, S., Hiraku, Y., Kojima, M., Kawanishi, S. (2005). "Mechanism of apoptosis induced by doxorubicin through the generation of hydrogen peroxide." Life Sci. **76(13)**: 1439-53.

Monsonégo, J. (2006). La fin d'un cancer? Paris, Grasset.

Mufti, A. R., Burstein, E., Duckett, C.S. (2007). "XIAP: cell death regulation meets copper homeostasis." Arch Biochem Biophys. **463(2)**: 168-74.

Munnier, E., Tewes, F., Cohen-Jonathan, S., Linassier, C., Douziech-Eyrolles, L., Marchais, H., Soucé, M., Hervé, K., Dubois, P., Chourpa, I. (2007). "On the interaction of doxorubicin with oleate ions: fluorescence spectroscopy and liquid-liquid extraction study." Chem Pharm Bull (Tokyo). **55(7)**: 1006-10.

Muñoz-Gámez, J. A., Martín-Oliva, D., Aguilar-Quesada, R., Cañuelo, A., Nuñez, M.I., Valenzuela, M.T., Ruiz de Almodóvar, J.M., De Murcia, G., Oliver, F.J. (2005). "PARP

inhibition sensitizes p53-deficient breast cancer cells to doxorubicin-induced apoptosis." Biochem J **386**(Pt 1): 119-25.

Nakatani, K., Thompson, D.A., Barthel, A., Sakaue, H., Liu, W., Weigel, R.J., Roth, R.A. (1999). "Up-regulation of Akt3 in estrogen receptor-deficient breast cancers and androgen-independent prostate cancer lines." J Biol Chem **274**(31): 21528-32.

Nakayama, K., Nakayama, N., Kurman, R.J., Cope, L., Pohl, G., Samuels, Y., Velculescu, V.E., Wang, T.L., Shih, IeM. (2006). "Sequence mutations and amplification of PIK3CA and AKT2 genes in purified ovarian serous neoplasms." Cancer Biol Ther **5**(7): 779-85.

Núñez, G., Benedict, M.A., Hu, Y., Inohara, N. (1998). "Caspases: the proteases of the apoptotic pathway." Oncogene **17**(25): 3237-45.

Olry, R. (2003). Introduction à la médecine humaine.

Phung, T. L., Ziv, K., Dabydeen, D., Eyiah-Mensah, G., Riveros, M., Perruzzi, C., Sun, J., Monahan-Earley, R.A., Shiojima, I., Nagy, J.A., Lin, M.I., Walsh, K., Dvorak, A.M., Briscoe, D.M., Neeman, M., Sessa, W.C., Dvorak, H.F., Benjamin, L.E. (2006). "Pathological angiogenesis is induced by sustained Akt signaling and inhibited by rapamycin." Cancer cell **10**: 159-70.

Prozialeck, W. C., Edwards, JR. (2007). "Cell adhesion molecules in chemically-induced renal injury." Pharmacol Ther **114**(1): 74-93.

Rabik, C. A., Dolan, M.E. (2007). "Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents." Cancer Treat Rev **33**(1): 9-23.

Rao, S., Krauss, N.E., Heerding, J.M., Swindell, C.S., Ringel, I., Orr, G.A., Horwitz, S.B. (1994). "3'-(p-azidobenzamido)taxol photolabels the N-terminal 31 amino acids of beta-tubulin." J Biol Chem **269**(5): 3132-4.

Rao S, O. G., Chaudhary AG, Kingston DG, Horwitz SB (1995). "Characterization of the taxol binding site on the microtubule. 2-(m-Azidobenzoyl)taxol photolabels a peptide (amino acids 217-231) of beta-tubulin." J Biol Chem **270**(35): 20235-8.

Rao, S., Orr, G.A., Chaudhary, A.G., Kingston, D.G., Horwitz, S.B. (1995). "Characterization of the taxol binding site on the microtubule. 2-(m-Azidobenzoyl)taxol photolabels a peptide (amino acids 217-231) of beta-tubulin." J Biol Chem **270**(35): 20235-8.

Ringel, I., Horwitz, S.B. (1991). "Studies with RP 56976 (taxotere): a semisynthetic analogue of taxol." J Natl Cancer Inst **83**(4): 288-91.

Roberts, J. J., Brent, T.P., Crathorn, A.R. (1971). "Evidence for the inactivation and repair of the mammalian DNA template after alkylation by mustard gas and half mustard gas." Eur J Cancer **7(6)**: 515-24.

Rose, P. (1996). "Endometrial carcinoma." N Engl J Med **335(9)**: 640-9.

Rosenberg, S. A., Hellman, Samuel., Devita Jr, Vincent T. (2005). Principles and Praticce of oncology, Lippincott, Williams and Wilkins.

Schiff, P. B., Horwitz, S.B. (1980). "Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells." Proc Natl Acad Sci U S A. **77(3)**: 1561-5.

Schimmer, A. D., Dalili, S., Batey, R.A., Riedl, S.J. (2006). "Targeting XIAP for the treatment of malignancy." Cell Death Differ **13(2)**: 179-88.

Schmidt, M., Hövelmann, S., Beckers, T.L. (2002). "A novel form of constitutively active farnesylated Akt1 prevents mammary epithelial cells from anoikis and suppresses chemotherapy-induced apoptosis." Br J Cancer **87(8)**: 924-32.

Scott, B. A., Avidan, M.S., Crowder, C.M. (2002). "Regulation of hypoxic death in *C. elegans* by the insulin/IGF receptor homolog DAF-2." Science **296(5577)**: 2388-91.

Seoud, M., Johnson, J., Weed, J.C. Jr. (1993). "Gynecologic tumors in tamoxifen-treated women with breast cancer." Obstet Gynecol **82(2)**: 165-9.

Shrikhande, S. V., Kleeff, J., Kayed, H., Keleg, S., Reiser, C., Giese, T., Büchler, M.W., Esposito, I., Friess, H. (2006). "Silencing of X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) decreases gemcitabine resistance of pancreatic cancer cells." Anticancer Res **26(5A)**: 3265-73.

Société canadienne du cancer, e. I. n. d. c. d. C. (2007) Statitiques canadiennes sur le cancer 2007. DOI: <http://www.cancer.ca>

St-Germain, M. E., Gagnon, V., Mathieu, I., Parent, S., Asselin, E.. (2004). "Akt regulates COX-2 mRNA and protein expression in mutated-PTEN human endometrial cancer cells." Int J Oncol **24(5)**: 1311-24.

Stahl, J. M., Sharma, A., Cheung, M., Zimmerman, M., Cheng, J.Q., Bosenberg, M.W., Kester, M., Sandirasegarane, L., Robertson, G.P. (2004). "Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma." Cancer Res **64(19)**: 7002-10.

Takahashi, R., Deveraux, Q., Tamm, I., Welsh, K., Assa-Munt, N., Salvesen, G.S., Reed, J.C. (1998). "A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases." J Biol Chem **3;276(14)**: 7787-90.

Takahashi, R., Deveraux, Q., Tamm, I., Welsh, K., Assa-Munt, N., Salvesen, G.S., Reed, J.C. (1998). "A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases." J Biol Chem **273**(14): 7787-90.

Tamura, M., Gu, J., Takino, T., Yamada, K.M. (1999). "Tumor suppressor PTEN inhibition of cell invasion, migration, and growth: differential involvement of focal adhesion kinase and p130Cas." Cancer Res **59**(2): 442-9.

Tesauro, M., Thompson, W.C., Moss, J. (2006). "Effect of staurosporine-induced apoptosis on endothelial nitric oxide synthase in transfected COS-7 cells and primary endothelial cells." Cell Death Differ **13**(4): 597-606.

Toker, A., Yoeli-Lerner, M. (2006). "Akt signaling and cancer: surviving but not moving on." Cancer Res **66**(8): 3963-6.

Tortora, G. j., Grabowsky, S.R. (2001). Principe d'anatomie et de physiologie. Saint-Laurent, CAN.

Ulfig, N. (2006). Précis d'histologie. Paris, Édition Maloine.

Un, F. (2007). "G1 arrest induction represents a critical determinant for cisplatin cytotoxicity in G1 checkpoint-retaining human cancers." Anticancer Drugs. **18**(4): 411-7.

Walker, K. S., Deak, M., Paterson, A., Hudson, K., Cohen, P., Alessi, D.R. (1998). "Activation of protein kinase B beta and gamma isoforms by insulin in vivo and by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 in vitro: comparison with protein kinase B alpha." Biochem J **331** (Pt 1): 299-308.

Weinberg, A. R. (2007). The biology of cancer, Garland science, Taylor & Francis group, LLC.

Williams, J. W., Duggleby, R.G., Cutler, R., Morrison, J.F. (1980). "The inhibition of dihydrofolate reductase by folate analogues: structural requirements for slow- and tight-binding inhibition." Biochem Pharmacol **29**(4): 589-95.

Wilson, W. H., Berg, S.L., Bryant, G., Wittes, R.E., Bates, S., Fojo, A., Steinberg, S.M., Goldspiel, B.R., Herdt, J., O'Shaughnessy, J. (1994). "Paclitaxel in doxorubicin-refractory or mitoxantrone-refractory breast cancer: a phase I/II trial of 96-hour infusion." J Clin Oncol **12**(8): 1621-9.

Yamaguchi, A., Tamatani, M., Matsuzaki, H., Namikawa, K., Kiyama, H., Vitek, M.P., Mitsuda, N., Tohyama, M. (2001). "Akt activation protects hippocampal neurons from apoptosis by inhibiting transcriptional activity of p53." J Biol Chem **276**(7): 5256-64.

Zhang, Z. F., Begg, C.B. (1995). "Is *Trichomonas vaginalis* a cause of cervical neoplasia? Results from a combined analysis of 24 studies." Int J Epidemiol **23**(4): 682-90.