



HAL
open science

Study of oxaliplatin resistance mechanisms in colorectal cancer : involvement of NOX1/calpains pathway

Mathieu Chocry

► To cite this version:

Mathieu Chocry. Study of oxaliplatin resistance mechanisms in colorectal cancer : involvement of NOX1/calpains pathway. Life Sciences [q-bio]. Aix-Marseille Université, 2017. English. NNT : 2017AIXM0001 . tel-04832668

HAL Id: tel-04832668

<https://hal.science/tel-04832668v1>

Submitted on 12 Dec 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE D'AIX-MARSEILLE

ED 62 – SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

INSERM UMR911 / CRO2

Thèse présentée pour obtenir le grade universitaire de docteur

Discipline : Pathologie Humaine

Spécialité : Oncologie

Mathieu CHOCRY

Étude des mécanismes de résistance à l'oxaliplatine dans le cancer
colorectal : rôle des voies NOX1/calpaïnes



Study of oxaliplatin resistance mechanisms in colorectal cancer:
involvement of NOX1/calpains pathway

Soutenue le 22/12/2017 devant le jury :

Corinne DUPUY	Directrice de recherche (INSERM U1009)	Rapportrice
Céline GONGORA	Directrice de recherche (INSERM U896)	Rapportrice
Laetitia DAHAN	Professeur des hôpitaux (AP-HM)	Examinatrice
François PEYRON	Directeur de recherche (INSERM U1065)	Examineur
Ludovic LELOUP	Maître de conférences (INSERM U911)	Co-directeur de thèse
Hervé KOVACIC	Professeur des universités (INSERM U911)	Directeur de thèse

Numéro national de thèse/suffixe local : 2017AIXM0001/001ED62

Table des matières

Introduction.....	8
Préambule	
1 GENERALITES SUR LE CANCER :	9
2 HISTOIRE DU CANCER :	10
2.1 L'ANTIQUITE :	10
2.2 LE MOYEN-ÂGE :	10
2.3 L'EPOQUE CONTEMPORAINE.....	12
2.4 ÉPIDEMIOLOGIE ET SANTE PUBLIQUE	12
Chapitre 1 : Le cancer colorectal	
1 DESCRIPTION ET HISTOLOGIE.....	14
1.1 HISTOLOGIE	14
1.2 LES FACTEURS DE RISQUE DE TRANSFORMATION MALIGNE	15
1.2.1 <i>Le degré de dysplasie</i>	15
1.2.2 <i>L'architecture</i>	16
1.2.3 <i>La taille</i>	16
2 LES STADES DU CANCER COLORECTAL :	16
3 ÉPIDEMIOLOGIE	18
4 LES FACTEURS DE RISQUE	19
4.1 L'AGE	19
4.2 LES MUTATIONS GENETIQUES.....	19
4.3 LES MALADIES INFLAMMATOIRES DU COLON.....	20
4.4 LES ANTECEDENTS.....	21
4.4.1 <i>Antécédent familial de cancer colorectal</i>	21
4.4.2 <i>Antécédent familial d'adénome colorectal</i>	21
4.4.3 <i>Antécédent personnel de cancer colorectal</i>	21
4.5 LE MODE DE VIE.....	21
4.5.1 <i>La consommation d'alcool</i>	21
4.5.2 <i>Le tabagisme</i>	21
4.5.3 <i>Le surpoids et l'obésité</i>	22
4.5.4 <i>La consommation de viande rouge et de charcuterie</i>	22
5 LES TRAITEMENTS DU CANCER COLORECTAL	22
5.1 HISTORIQUE DES CHIMIOThERAPIES.....	22
5.2 LES CHIMIOThERAPIES DU CANCER COLORECTAL	24
5.2.1 <i>5-fluoro-uracile</i>	24
5.2.1.1 Pharmacocinétique.....	25
5.2.1.2 Effets indésirables	25
5.2.1.3 Capécitabine	26
5.2.2 <i>Acide folinique</i>	28
5.2.3 <i>Irinotécan</i>	28
5.2.3.1 Pharmacocinétique.....	29
5.2.3.2 Effets indésirables	30
5.2.4 <i>Les anticorps monoclonaux</i>	31
5.2.4.1 Bevacizumab.....	31
5.2.4.2 Cetuximab	31
5.2.4.3 Panitumumab	31
5.2.5 <i>Oxaliplatine</i>	31
5.3 LES PRINCIPAUX SCHEMAS DE CHIMIOThERAPIES :	32

5.3.1	Schémas à base de fluoro-uracile	32
5.3.2	Schémas à base d'oxaliplatine.....	33
5.3.3	Schémas à base d'irinotecan	33
5.3.4	Schémas à base d'irinotecan et d'oxaliplatine	34
5.4	ARBRE DECISIONNEL DU TRAITEMENT	35
5.4.1	Définitions.....	35
5.4.2	Selon le stade d'avancement du cancer colorectal.....	35
Chapitre 2 : L'oxaliplatine		
1	HISTORIQUE.....	37
2	STRUCTURE & MODE D'ACTION	37
2.1	MECANISME D'ACTION	38
2.2	REPOSE CELLULAIRE	39
2.2.1	Conséquences structurales sur l'ADN	39
2.2.2	Effets sur la transcription.....	39
2.2.3	Effets sur la réplication	40
2.2.4	Effets sur l'apoptose	40
2.3	PHARMACOCINETIQUE ET EFFETS INDESIRABLES	42
3	RESISTANCE A L'OXALIPLATINE	43
3.1	INFLUX ET EFFLUX CELLULAIRES	43
3.1.1	Les transporteurs du cuivre.....	43
3.1.2	Les transporteurs de soluté.....	45
3.1.3	Les transporteurs ABC.....	45
3.1.4	Le système glutathion.....	46
3.2	LES VOIES DE SURVIE	47
3.2.1	La voie PI3K/Akt.....	47
3.2.2	La voie p38 MAPK	49
3.2.3	La voie NF- κ B.....	50
3.3	MODIFICATIONS DES MECANISMES DE MORT CELLULAIRE	51
3.3.1	L'apoptose	51
3.3.2	La nécroptose.....	52
3.3.3	L'autophagie.....	53
3.3.4	La sénescence	54
3.4	LES MECANISMES EPIGENETIQUES.....	54
3.4.1	Méthylation de l'ADN et modifications des histones.....	54
3.4.2	Les micro-ARNs	55
3.5	MECANISMES DE REPARATION DES ADDUITS.....	56
3.5.1	Le système MMR.....	56
3.5.2	Le système NER.....	56
3.5.3	Le système BER	57
Chapitre 3 : Les espèces réactives de l'oxygène et les NADPH oxydases		
1	DEFINITION ET PROPRIETES DES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE.....	59
2	LE METABOLISME DES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE	59
3	LES FONCTIONS DES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE DANS L'ORGANISME	61
3.1	ROLES DES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE.....	61
3.2	MECANISMES D'ACTION DES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE	62
3.2.1	La spécificité du rôle des espèces réactives de l'oxygène	62
3.2.1.1	La quantité.....	62
3.2.1.2	La nature	62
3.2.1.3	La localisation	62
3.2.1.4	Exemple : le peroxyde d'hydrogène	63

3.3	CIBLES MOLECULAIRES DES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE.....	64
3.3.1	<i>Effets des espèces réactives de l'oxygène sur les kinases et les phosphatases</i>	64
3.3.2	<i>Effets des espèces réactives de l'oxygène sur les facteurs de transcription</i>	64
4	ROLES DES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE DANS LE CANCER.....	65
4.1	INITIATION DE LA CARCINOGENESE	65
4.2	L'ANGIOGENESE	65
4.3	LA PROLIFERATION CELLULAIRE.....	66
4.4	MIGRATION & INVASION	67
4.5	LA MODULATION DES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE	68
4.5.1	<i>Diminution de la production de ROS</i>	68
4.5.2	<i>Augmentation de la production de ROS</i>	68
5	LES SOURCES CELLULAIRES DES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE.....	69
6	LES NADPH OXYDASES.....	70
6.1	HISTOIRE DES NADPH OXYDASES.....	70
6.2	FAMILLE DES NADPH OXYDASES.....	72
6.2.1	<i>NOX1</i>	73
6.2.2	<i>NOX2</i>	73
6.2.3	<i>NOX3</i>	74
6.2.4	<i>NOX4</i>	74
6.2.5	<i>NOX5</i>	75
6.2.6	<i>Les DUOX1 et 2</i>	76
6.3	STRUCTURE ET COMPOSANTS DES NADPH OXYDASES.....	77
6.3.1	<i>Le cytochrome b₅₅₈ ou partie transmembranaire</i>	77
6.3.1.1	La gp91 ^{phox}	77
6.3.1.2	La p22 ^{phox}	79
6.3.2	<i>Les facteurs cytosoliques</i>	80
6.3.2.1	p47 ^{phox}	80
6.3.2.2	p67 ^{phox}	82
6.3.2.3	NOXO1.....	83
6.3.2.4	NOXA1	84
6.3.2.5	p40 ^{phox}	85
6.3.2.6	Rac1 & Rac2.....	86
6.3.2.7	Rap1A	86
6.4	NOX1	87
6.4.1	<i>Distribution</i>	87
6.4.2	<i>Régulation</i>	88
6.4.2.1	Phosphorylations de NOXA1	89
6.4.2.2	Phosphorylation de NOX1	90
6.4.2.3	Phosphorylations de NOXO1	90
6.4.2.4	Dégradation de NOXO1	91
6.4.2.5	Régulation par les autres facteurs cytosoliques	92
6.4.3	<i>Rôles physiologiques et pathologiques de NOX1 dans le colon</i>	92
6.4.3.1	Immunité innée	92
6.4.3.2	Prolifération cellulaire	93
Chapitre 4 : Les calpaïnes		
1	GENERALITES	95
1.1	HISTOIRE DES CALPAÏNES.....	95
2	CLASSIFICATION & NOMENCLATURE DES CALPAÏNES.....	96
3	LA FAMILLE DES CALPAÏNES	97
3.1	LES CALPAÏNES UBIQUITAIRES.....	97
3.2	LES CALPAÏNES TISSU-SPECIFIQUES	98

4	STRUCTURE DES CALPAÏNES.....	99
4.1	LES CALPAÏNES 1 & 2	100
4.2	LES SOUS-UNITES REGULATRICES 1 ET 2.....	102
5	ACTIVATION & REGULATIONS DES CALPAÏNES 1 ET 2.....	103
5.1	MODELE D'ACTIVATION PAR AUTOLYSE.....	103
5.2	MODELE D'ACTIVATION PAR DISSOCIATION	104
5.3	REGULATION DE L'ACTIVITE DES CALPAÏNES	105
5.3.1	<i>Le calcium</i>	105
5.3.2	<i>L'autolyse</i>	105
5.3.3	<i>Les phospholipides</i>	105
5.3.4	<i>Les phosphorylations</i>	105
5.3.5	<i>La calpastatine</i>	106
6	ROLES PHYSIOLOGIQUES ET PATHOLOGIQUES DES CALPAÏNES 1 ET 2	107
6.1	LES SUBSTRATS DES CALPAÏNES.....	107
6.1.1	<i>La séquence cible</i>	107
6.1.2	<i>Les substrats principaux</i>	107
6.2	ROLES PHYSIOLOGIQUES DES CALPAÏNES	108
6.3	ROLES PATHOLOGIQUES DES CALPAÏNES.....	108
6.3.1	<i>Pathologies diverses</i>	108
6.3.2	<i>Le cancer</i>	109
6.3.2.1	La prolifération cellulaire.....	109
6.3.2.2	La migration cellulaire & l'invasion tumorale	110
6.3.2.3	L'apoptose	110
	Résultats.....	112
	Chapitre 5 : Reversion of resistance to oxaliplatin by inhibition of p38 MAPK in colorectal cancer cells lines: Involvement of calpain/NOX1 pathway	
1	INTRODUCTION.....	113
2	DANS DES LIGNEES CELLULAIRES PRESENTANT LA MUTATION BRAF V600E	114
2.1	INTRODUCTION	114
2.2	ARTICLE 1 (PUBLIE DANS ONCOTARGET 2017).....	115
3	DANS DES LIGNEES CELLULAIRES EXPRIMANT BRAF SAUVAGE	157
3.1	INTRODUCTION	157
3.2	RESULTATS	157
3.2.1	<i>Sélection des cellules résistantes</i>	157
3.2.2	<i>Implication des ROS et des calpaïnes dans la résistance à l'oxaliplatine</i>	158
3.2.3	<i>Implication de Nox5 dans la production de ROS</i>	159
3.2.4	<i>Étude de l'activité des calpaïnes</i>	160
4	CONCLUSION DE LA PREMIERE PARTIE	162
	Chapitre 6 : Gemcitabine : an alternative for patients with oxaliplatin resitant colorectal cancer	
1	INTRODUCTION.....	165
2	ARTICLE 2 (EN PREPARATION).....	166
3	CONCLUSION DE LA DEUXIEME PARTIE	185
	Conclusions & perspectives.....	187
	Références.....	193

Tables des illustrations

➤ **Figures :**

Figure 1 : Caractéristiques des cellules tumorales	9
Figure 2 : Les différents stades du cancer colorectal	17
Figure 3 : Structure du 5-fluoro-uracile	24
Figure 4 : Mécanisme d'action du 5-fluoro-uracile	25
Figure 5 : Structure du 5-fluoro-uracile et de la capécitabine	27
Figure 6 : Mécanisme de transformation de la capécitabine en 5-fluoro-uracile	27
Figure 7 : Mécanisme d'action de l'acide folinique	28
Figure 8 : Métabolisme de l'irinotecan	28
Figure 9 : Mécanisme d'action de l'irinotecan	29
Figure 10 : Structure détaillée de l'oxaliplatine faisant apparaître ses composants	37
Figure 11 : Biotransformation de l'oxaliplatine	39
Figure 12 : L'apoptose	41
Figure 13 : Mécanisme de fonctionnement des transporteurs ATP7A/B	44
Figure 14 : Mécanisme de fonctionnement du hCTR1	45
Figure 15 : Mécanisme de fonctionnement des MRPs	46
Figure 16 : Implication des GST dans l'efficacité de l'oxaliplatine	47
Figure 17 : Mécanisme d'activation de la voie PI3K/Akt	48
Figure 18 : Mécanisme d'activation de la voie p38 MAPK	50
Figure 19 : Mécanisme d'action de la voie NF-κB	51
Figure 20 : Mécanismes de contournement de l'apoptose	52
Figure 21 : Mécanisme de contournement de la nécroptose	53
Figure 22 : Mécanisme d'activation de l'autophagie	53
Figure 23 : Mécanisme d'activation de la senescence	54
Figure 24 : Mécanisme d'action des miRNA dans la résistance à l'oxaliplatine	55
Figure 25 : Régulation de l'angiogenèse par les ROS	66
Figure 26 : Prolifération cellulaire induite par les ROS	67
Figure 27 : Régulation de la migration par les ROS	68
Figure 28 : La famille des NOXs	73
Figure 29 : Structure schématique de la gp91^{phox}	78
Figure 30 : Structure schématique de la p22^{phox}	80

Figure 31 : Structure schématique de la p47^{phox}	81
Figure 32 : Structure schématique de la p67^{phox}	83
Figure 33 : Comparaison des structures schématiques de NOXO1 et de p47^{phox}	84
Figure 34 : Comparaison des structures schématiques de NOXA1 et de p67^{phox}	85
Figure 35 : Structure schématique de p40^{phox}	86
Figure 36 : Représentation schématique de l'activation de NOX1	89
Figure 37 : Phosphorylations de NOX1, de NOXA1, de NOXO1 et de p22^{phox}	90
Figure 38 : Implication de la dégradation de NOXO1 dans la régulation de la production de ROS	91
Figure 39 : Structures schématiques des différentes calpaïnes	100
Figure 40 : Structure schématique de la μ-calpaïne (A) et de la m-calpaïne (B)	101
Figure 41 : Les différents modes d'activation des calpaïnes	103
Figure 42 : Structure schématique de la calpastatine	106
Figure 43 : Hypothèse initiale de notre étude	114
➤ Tableaux :	
Tableau 1 : Degré de dysplasie dans le cancer colorectal	15
Tableau 2 : Effets indésirables du 5-FU	26
Tableau 3 : Effets indésirables de l'irinotécan	30
Tableau 4 : Protocoles de chimiothérapie à base de 5-FU	32
Tableau 5 : Protocoles de chimiothérapie à base d'oxaliplatine	33
Tableau 6 : Protocoles de chimiothérapie à base d'irinotécan	34
Tableau 7 : Protocoles de chimiothérapie à base d'oxaliplatine et d'irinotecan	34
Tableau 8 : Effets indésirables de l'oxaliplatine	43
Tableau 9 : Tableau représentant les différentes calpaïnes et les deux sous-unités régulatrices	96

Tables des abréviations

AD	<i>Activation domain</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
AIR	<i>Auto inhibitory region</i>
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATP	Adénosine triphosphate
BER	<i>Base excision repair</i>
CANP	<i>Calcium-activated neutral protease</i>
Capn	Calpaïnes
CNHIM	Centre national hospitalier d'information sur le médicament
Css	<i>Calpain small subunit</i>
DACH	1,2 diaminocyclohexane
DPD	<i>Dihydropyrimidine dehydrogenase</i>
DUOX	<i>Dual oxydase</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
ERK	<i>Extracellular signal regulated kinase</i>
FBAL	Fluoro bêta-alanine
FOXO3a	<i>Forkhead box O3</i>
GSK3	<i>Glycogen synthase kinase 3</i>
HIF	<i>Hypoxia inductible factor</i>
HNPCC	<i>hereditary non polyposis colorectal cancer</i>
IAP	<i>Inhibitors of apoptosis proteins</i>
IFN	Interféron
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
IgG	Immunoglobuline G
Iκ-B	<i>Inhibitor of kappa B</i>
IMC	Indice de masse corporelle
INCa	Institut national du cancer
IV	Intra-veineuse

JAK	Janus kinase
JNK	c-Jun N-terminal kinases
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
MICI	Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
miRNA	<i>micro-Ribonucleic acid</i>
MMR	<i>Mismatch repair</i>
MPT	<i>Mitochondrial permeability transition pore</i>
MRP	<i>Multidrug resistance-associated proteins</i>
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphatate
NER	<i>Nucleotide excision repair</i>
NF-κB	<i>Nuclear transcription factor-kappa B</i>
NOX	NADPH oxidase
NOXA1	NADPH oxidase activator 1
NOXO1	NADPH oxidase organizer 1
OMS	Organisation mondiale de la santé
PAF	Polypose adénomateuse familiale
PB1	<i>Phox and Bem1</i>
PDGFR	<i>Platelet-derived growth factor recpetor</i>
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PKC	<i>Protein kinase C</i>
PMA	<i>Phorbol myristate acetate</i>
PRR	<i>Prolin rich region</i>
PX	<i>Phox domain</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SH3	<i>SRC homology 3</i>
SOD	<i>Superoxydase dismutase</i>
STAT	<i>Signal transducteur and activators of transcription</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TS	<i>Thymidylate synthase</i>
UICC	Union internationale contre le cancer
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
WHO	<i>World health organisation</i>
5-FU	5-fluoro-uracile

Préambule

1 Généralités sur le cancer :

Le terme cancer regroupe un ensemble de pathologies se caractérisant par la multiplication et la propagation anarchique de cellules anormales, souvent liées à un échappement aux mécanismes de régulation. Cette multiplication anarchique va à l'opposé de la prolifération harmonieuse et contrôlée des tissus, de telle manière que cette prolifération désordonnée va nuire à ce tissu.

Biologiquement, les cellules tumorales se caractérisent par différents points caractéristiques qui sont : l'induction de l'angiogenèse, l'instabilité génomique, la résistance à la mort cellulaire, la dérégulation des systèmes énergétiques de la cellule, la signalisation proliférative soutenue, l'évasion aux suppresseurs de croissance, l'évitement de la destruction par les cellules immunitaires, l'immortalité réplivative, l'inflammation favorisant la progression tumorale, la valorisation de l'invasion et de la prolifération métastatique (Figure 1).



Figure 1 : Caractéristiques des cellules tumorales.

Ce cycle représente les caractéristiques des cellules tumorales décrites dans Hanahan and Weinberg 2011

Nous commencerons par un petit historique sur le cancer, suivi de chapitres sur le cancer colorectal et son traitement, l'oxaliplatine, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les NOXs et pour finir les calpaïnes.

2 Histoire du cancer :

2.1 L'antiquité :

Contrairement à ce que de nombreuses personnes pensent, le cancer n'est pas une maladie récente, en effet des scientifiques ont pu observer la présence de tumeurs sur des momies de l'Égypte antique. Ces tumeurs ont été retrouvées notamment au niveau des os (ostéosarcomes). Certains papyrus datant de 2 000 à 3 000 ans avant J.-C. décrivaient également des tumeurs et des ulcères au niveau du sein. Un autre papyrus traitant de médecine et datant de 1 552 avant J.-C. déconseille de retirer des tumeurs au niveau de la jambe cela risquant d'être fatal pour le malade. Ce sont les plus anciennes descriptions que nous ayons à l'heure actuelle, il nous faudra attendre la Grèce Antique pour en avoir plus (Mandal 2009a).

Dans la Grèce antique, Hippocrate, connu comme le père de la médecine moderne, a réalisé de nombreuses descriptions de différentes maladies et notamment des cancers. Il décrit ainsi très bien des lésions de types cancéreuses au niveau de la peau, du sein, de l'estomac, du col de l'utérus et du rectum, ce qui lui a permis de réaliser une première classification. Cependant comme les moyens de traitements (cautérisation et divers onguents) n'étaient que peu efficaces, il décida qu'il ne valait mieux pas traiter les patients. Son observation sur divers mélanomes en forme de crabe ou *karkinos* en grec, a donné son nom actuel au cancer. Malgré ces descriptions, aucune avancée majeure ne fut réalisée pendant trois siècles et il faut attendre la Rome Antique pour voir des progrès (Mandal 2009a).

Dans la Rome Antique, le médecin Aulus Cornelius Celsus, inspiré par les médecines grecque et égyptienne, indiqua que le cancer ne se localisait que dans les parties du corps dites supérieures, c'est-à-dire dans les régions du visage (nez, lèvres, oreilles), au niveau des seins et de la rate. Il est le premier à décrire différents stades (ou degrés) de l'évolution de la maladie. Le premier degré correspond à une tumeur sans ulcération appelé *cacoethes*, les patients atteints d'un cancer à ce stade pouvaient être soignés grâce à une excision. Le degré suivant était généralement l'apparition de lésions exubérantes que Celsus déconseillait de traiter : ni onguents, ni cautérisation, ni excision. Nous pouvons donc voir que le traitement du cancer selon son état d'avancement ne date pas d'aujourd'hui (Mandal 2009a).

2.2 Le Moyen-Âge :

Le monde Arabe se distingua à cette période dans bien des domaines et notamment en médecine. Avicenne de Bagdad, observa que le cancer progressait de manière lente jusqu'à envahir et détruire les tissus avoisinants, aboutissant à une absence de sensation dans la partie

atteinte. À cette époque le traitement était toujours le même, reposant sur l'excision de la lésion. Albucasis de Cordoue, conseillait de retirer la tumeur quand celle-ci était en début d'évolution et surtout située dans une partie accessible. Il était également recommandé de cautériser les tissus avoisinants. Il y avait quand même un traitement préopératoire, le patient devait être purgé de façon à retirer la bile noire, il ne subissait l'opération qu'une fois les veines suffisamment dilatées. Comme Galien, Albucasis ne préconisait aucun traitement pour les lésions avancées (InfoCancer 2017).

La guerre de Cent Ans fût l'une des étapes les plus meurtrières de l'Europe médiévale, cependant elle permit aux médecins de faire des avancées sur le traitement du cancer et notamment en chirurgie. Ce fut notamment le cas pour John of Arderne qui décrivit durant cette guerre les symptômes du carcinome colorectal. Malgré une très bonne description des symptômes (obstruction et les hémorragies) il ne put jamais soigner un patient. À cette même période le français Guy de Chauliac fit de grands progrès en chirurgie. Comme ses prédécesseurs, il pratiqua de larges excisions pour les lésions débutantes et utilisa des onguents de manière palliatif pour les lésions les plus graves (InfoCancer 2017).

À la renaissance, les changements ne touchèrent pas seulement les Arts et la politique, la médecine s'améliora également, notamment en anatomie, l'Église n'interdisant plus les autopsies. Le système lymphatique fut ainsi découvert par Gaspare Aselli et cette avancée permit à Henri François le Dran de décrire les étapes de la dissémination du cancer. Il comprit ainsi que le cancer débutait localement et allait s'étendre vers les ganglions par les canaux lymphatiques. Il préconisait donc l'excision de la tumeur mais aussi des ganglions lymphatiques axillaires. Xavier Bichat comprit qu'un seul et même cancer pouvait avoir différentes localisations, la maladie se développant dans un organe avant de se disséminer dans différents tissus. Cependant, n'ayant pas de méthodologie dans la recherche expérimentale du cancer, son étude n'avança que peu. De plus le manque d'instruments chirurgicaux et de notions en matière de stérilité ne permit pas de progresser rapidement (InfoCancer 2017).

Plus tard, de nombreux livres sur les descriptions détaillées d'opérations de cancer furent édités. Fabricius Hildanus et Johann Schultes s'illustrent notamment sur la description de la chirurgie du cancer du sein. Le premier décrivit la dissection des ganglions axillaires lymphatiques de patientes atteintes de cancer du sein tandis que le second s'illustra par ses dessins chirurgicaux et des instruments chirurgicaux. Il publia notamment les différentes étapes d'une mastectomie, en dessin, dans « *Armamentarii Chirurgici* ». Parmi ces livres on

peut retenir aussi celui de Marco Aurelio Severini, permettant une première différenciation et classification des tumeurs (InfoCancer 2017).

2.3 L'époque contemporaine

Les progrès technologiques ont permis de développer une nouvelle discipline : la recherche. Des premières études épidémiologiques furent ainsi réalisées. La première mis en évidence dès 1907 un lien entre l'exposition au soleil et le cancer de la peau. Puis des études lièrent le tabagisme et le cancer du poumon en 1950. Cependant ces études épidémiologiques ne suffisaient pas, il fallait trouver de nouvelles techniques pour l'étude du cancer. On voit apparaître, en 1910, les premières cultures de cellules cancéreuses, l'étude sur l'animal sert énormément aussi à la compréhension des cancers. La compréhension du rôle des hormones dans le cancer du sein se fait ainsi grâce aux souris en 1916. D'autres études montrent notamment que les nitrosamines du tabac sont liées au développement des cancers de la bouche et des poumons. Une étude de 1940 réalisée sur des souris démontra qu'une diminution de l'apport calorique permettait de réduire le développement tumoral. Les drosophiles (mouches à fruit) furent utilisées pour démontrer que les rayons X étaient mutagènes (Société de recherche sur le cancer 2017).

En 1914, des chercheurs émettent l'hypothèse que ce ne sont plus seulement des virus qui provoquent le cancer mais aussi des mutations, cela sera confirmé 14 ans plus tard grâce à l'expérimentation animale. En 1930, le benzopyrène, ingrédient actif du goudron, est le premier produit décrit comme cancérigène. L'identification de l'ADN comme étant le matériel génétique de la cellule en 1944 par Avery poussa les chercheurs à regarder du côté de la transmission de mutations. Knudson montra ainsi en 1971 qu'au moins deux mutations étaient nécessaires au développement d'un cancer. Trois ans plus tard, des chercheurs découvrent que les erreurs de réplication sont également impliquées dans l'apparition des cancers. L'implication des mutations de deux gènes majeurs (parmi tant d'autres) est découverte : il s'agit des gènes p53 en 1979 et de BRCA1 en 1990 (Société de recherche sur le cancer 2017).

2.4 Épidémiologie et santé publique

L'épidémiologie commence véritablement, quand elle devient un champ d'étude à part entière, à partir de 1854. L'épidémiologie est l'étude des facteurs influant sur la santé et les maladies des populations. Elle va ainsi étudier la répartition et les déterminants des

événements de santé et ainsi permettre des interventions faites dans l'intérêt de la santé publique et de la médecine préventive (Dupont 2007).

Les premières étapes de l'enregistrement du cancer se font en Europe. En effet le premier registre du cancer est établi à Hambourg, en Allemagne, dès 1927. Entre les années 1940-50, d'autres initiatives similaires sont entreprises et notamment en 1942 lorsque le registre national du cancer est créé au Danemark. Aux États-Unis, l'enregistrement des cas de cancer débute dès 1940 dans le Connecticut et dans l'État de New York. En 1950, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) constitue une sous-commission sur l'enregistrement des cas de cancer et leur présentation statistique (Dupont 2007).

Ces registres vont avoir trois fonctions particulières, tout d'abord permettant de décrire l'étendue et la nature du fardeau du cancer dans la population. Ensuite elles permettent de constituer une source de données pour les études épidémiologiques sur l'étiologie des cancers, utile à la prévention. Et enfin, elles permettent de surveiller et d'évaluer les activités de lutte contre le cancer (Dupont 2007).

Les données actuelles montrent que le cancer est la deuxième cause de décès dans le monde en faisant 8,8 millions de morts en 2015 (GBD 2015 Mortality and Causes of Death Collaborators 2016). Cela représente un décès sur six dans le monde. Les principaux types de cancer sont les suivants (WHO 2017):

- Cancer du poumon (1,69 million de décès)
- Cancer du foie (788 000 décès)
- Cancer colorectal (774 000 décès)

Selon les données de l'INCa, il y a eu 385 000 nouveaux cas de cancer en France métropolitaine en 2015 et 149 500 décès. Les cancers de la prostate et du sein sont les plus fréquents chez l'homme et la femme respectivement. Le cancer du poumon, bien que n'étant pas le plus fréquent, présente la plus forte mortalité avec près de 30 000 décès. En France, le cancer colorectal est le deuxième plus fréquent chez la femme et le troisième chez l'homme. Il représente le deuxième cancer en termes de mortalité avec 17 500 décès en 2015 (INCa 2017).

Chapitre 1

Le cancer colorectal

1 Description et histologie

Comme son nom l'indique, le cancer colorectal touche le colon et le rectum. Les tumeurs bénignes sont couramment appelées polypes. Ces polypes sont généralement de petite taille, il forme une lésion en relief dans la paroi du côlon ou du rectum. Le polype peut être de trois morphologies différentes : sessile, décrit comme le sommet d'une colline posé sur la paroi colique ; pédiculé, comparé à un « champignon » (une tige et une tête) ; ou encore plan lorsqu'il y a peu ou pas de relief. Le terme polypose est utilisé lorsqu'il y a plus de 10 polypes.

Toutes les données présentées dans ce paragraphe ont été obtenues à partir des différentes fiches mis à disposition par la Haute Autorité de Santé.

1.1 Histologie

Il existe quatre variétés histologiques de polypes colorectaux bénins :

- ❖ Hyperplasique : il s'agit d'un simple allongement des cryptes glandulaires. Ces polypes se situent essentiellement dans le colon distal et le rectum. Leur prévalence augmente avec l'âge, elle est de l'ordre de 20-30% à 50 ans (Jass 1999).
- ❖ Juvéniles : les polypes sont formés de tubes kystiques. Ils restent sporadiques, rares, et sont le plus souvent observés chez les enfants de moins de sept ans.
- ❖ Pseudo-polype inflammatoire : ce sont des muqueuses et des tissus de granulation. Ces polypes sont généralement retrouvés après cicatrisation d'ulcérations ou de la maladie de Crohn.
- ❖ Adénome : ils résultent de la prolifération de cellules des glandes de Lieberkühn (glandes sécrétoires de mucus et d'eau pour le transport des fèces). Ils sont de nature néoplasique, c'est à dire que selon un temps variable, ils sont susceptibles d'évoluer en tumeur invasive. La prévalence des adénomes est variable selon l'âge, elle reste cependant élevée à l'échelle mondiale de 12%. La classification OMS distingue trois sous-types histologiques :

- Tubuleux : il représente 65 à 87 % des adénomes, il aura un contingent vilieux inférieur à 25%.
- Tubullo-villeux : il représente 8 à 25 % des adénomes, son contingent vilieux aura une proportion comprise entre 25 et 75%.
- Villeux : il représente 5 à 10 % des adénomes, la portion du contingent vilieux sera supérieure à 75 %.

1.2 Les facteurs de risque de transformation maligne

Le type majoritaire des cancers colorectaux est l'adénocarcinome, se développant le plus souvent à partir d'un adénome. Le risque de cancer croît avec le degré de dysplasie, le nombre de polype, la taille du polype et de son contingent vilieux (Compton 2003).

1.2.1 Le degré de dysplasie

Tous les adénomes sont, par définition, dysplasiques. Dans un but de classification, les critères histologiques sont observés et les atypies cytonucléaires (noyaux polymorphes, inégaux) et architecturales sont prises en compte. La classification actuellement utilisée est celle de Vienne (Schlemper et al, Gut 2000) :

Catégorie 1	Pas de néoplasie/dysplasie
Catégorie 2	Indéfini pour néoplasie/dysplasie
Catégorie 3	Néoplasie non invasive de bas grade
Catégorie 4	Néoplasie non invasive de haut grade : 4.1 Adénome/dysplasie de haut grade 4.2 Carcinome non invasif 4.3 Suspicion de carcinome invasif
Catégorie 5	Néoplasie invasive : 5.1 Carcinome intra-muqueux 5.2 Carcinome sous-muqueux

Tableau 1 : Degré de dysplasie dans le cancer colorectal

1.2.2 L'architecture

La présence d'un foyer cancéreux diffère grandement en fonction du sous-type histologique des adénomes : il sera ainsi de 1% pour les adénomes tubuleux, de 12% pour les adénomes tubulo-villeux et de 15% pour les adénomes villosités (Compton 2003).

1.2.3 La taille

La taille de l'adénome joue un rôle important dans sa transformation maligne, en effet pour une taille inférieure à 1 cm, le risque que la lésion devienne cancéreuse est inférieur à 5%, cependant quand cette taille est supérieure à 2 cm, le risque est lui supérieur à 40%. La probabilité cumulative lorsque le diamètre est supérieur ou égal à 1 cm est de 4% à 5 ans et elle passe à 37% à 20 ans pour un adénome villosités (Compton 2003).

2 Les stades du cancer colorectal :

Le système de stadification du cancer colorectal est la classification TNM. Il s'agit d'une classification internationale utilisée par l'Union Internationale Contre le Cancer (UICC) et l'American Joint Committee on Cancer (AJCC) permettant de décrire l'étendue des tumeurs solides chez un patient (Edge and Compton 2010).

Le T indique jusqu'où la tumeur a envahi le colon ou le rectum. Il est généralement classé de 1 à 4. Le N indique le nombre de ganglions touchés par le cancer. Le M quant à lui indique si le cancer est métastatique ou pas.

Cependant il est plutôt d'usage d'utiliser le terme de stade allant de 0 à IV en fonction de l'avancée du cancer (Figure 2). Pour cette raison, notre description des différents stades se fera en concomitance avec les stades TNM (Edge and Compton 2010).

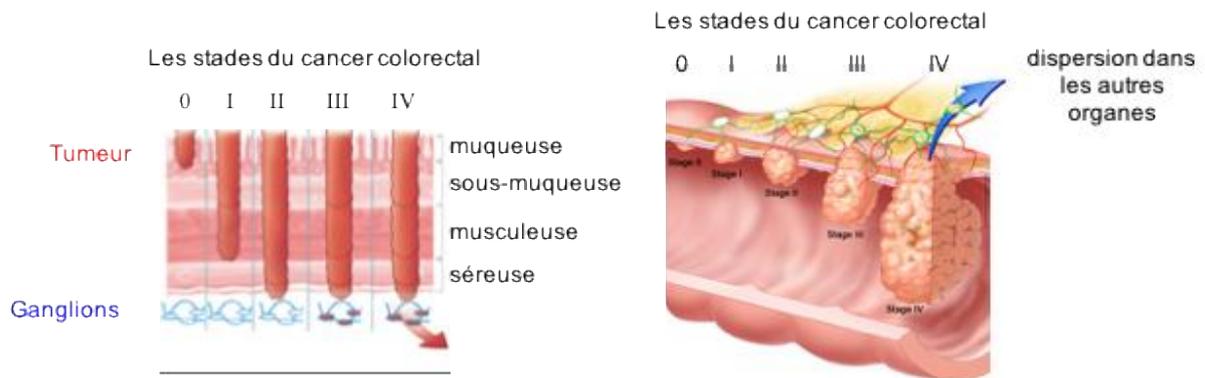


Figure 2 : Les différents stades du cancer colorectal

Nous pouvons voir ici les différents stades du cancer colorectal, caractérisés par des différences d'invasion tissulaire schématisées ici

Le stade 0 ou TisN0M0 correspond au cancer *in situ*. Les cellules cancéreuses sont au niveau du revêtement interne. Elles sont localisées c'est à dire qu'elles ne se sont pas développées au-delà de la couche musculieuse.

Le stade I ou T1/2N0M0 : la tumeur a envahi le tissu conjonctif, allant de la muqueuse jusqu'à la musculieuse.

Le stade II peut être sous-divisé en trois sous-stades :

- II A qui correspond au T3N0M0, la tumeur a envahi la sous-séreuse, elle peut avoir atteint le tissu mou (péri-colorectal).
- II B qui correspond au T4aN0M0, la tumeur a traversé le péritoine viscéral.
- II C qui correspond au T4bN0M0, la tumeur touche d'autres organes ou structures à proximité immédiate du colon.

Le stade III qui peut être lui aussi divisé en trois sous-stades :

- Le stade III A qui peut lui même être sous-divisé en deux :
 - T1/2N1M0 la tumeur a atteint la musculieuse ainsi que 1 à 3 ganglions lymphatiques régionaux.
 - T1N2aM0 la tumeur a envahi le tissu conjonctif ainsi que 4 à 6 ganglions lymphatiques régionaux.
- Le stade III B qui peut lui aussi être sous-divisé en trois :
 - T3/4N1M0 la tumeur a envahi soit la sous-séreuse, soit les tissus mous ou les tissus péri-colorectaux mais aussi 1 à 3 ganglions lymphatiques régionaux.

- T2/3N2aM0 la tumeur a envahi soit la musculuse, soit la sous-séreuse ou les tissus péri-colorectaux mais aussi 4 à 6 ganglions lymphatiques régionaux.
- T1/2N2bM0 la tumeur a envahi le tissu conjonctif et au moins 7 ganglions lymphatiques régionaux.
- Le stade III C qui peut lui aussi être sous-divisé en trois
 - T4aN2aM0 la tumeur a envahi le péritoine viscéral ainsi que 4 à 6 ganglions lymphatiques régionaux.
 - T3/4aN2bM0 la tumeur a envahi soit la sous-séreuse, soit les tissus péri-colorectaux ou le péritoine viscéral et plus de 7 ganglions lymphatiques régionaux.
 - T4bN1/2M0 la tumeur a traversé la paroi du côlon jusqu'à d'autres organes ainsi que des ganglions lymphatiques régionaux.

Le stade IV qui correspond au stade métastatique peut être divisé en deux sous stades :

- Le stade IV A TxNxM1a la tumeur a envahi n'importe quelles couches, des métastases sont observées au niveau des ganglions lymphatiques régionaux et au niveau d'un seul organe (foie, poumon ou ganglions éloignés).
- Le stade IV B TxNxM1b la tumeur a envahi n'importe quelles couches et des métastases sont observées au niveau des ganglions lymphatiques régionaux ainsi que dans plusieurs organes (foie, poumon ou ganglions éloignés).

3 Épidémiologie

La France est l'un des pays où l'incidence du cancer colorectal est la plus forte, en effet son incidence était estimée en 2012 à 42 000 nouveaux cas (Binder-Foucard n.d.). Il s'agit du 3^{ème} cancer le plus fréquent, après le cancer du sein ou de la prostate, respectivement premier et second. Son taux de mortalité est important avec environ 17 500 décès par an, ce qui représente la deuxième cause des décès par cancer (Binder-Foucard 2013).

Le taux relatif de survie à 5 ans a été estimé 56%, cependant son pronostic dépend grandement du stade au moment du diagnostic. Le cancer colorectal est un cancer de bon pronostic lorsqu'il est diagnostiqué à un stade précoce, ainsi au stade I le taux de survie à 5 ans est à 91%. Il est d'environ 70% pour les stades avec des envahissements régionaux, cependant la survie à 5 ans tombe à environ 11% lorsque le cancer est métastatique (stade IV), or 25% des patients sont à ce stade lors du diagnostic (Grosclaude 2013).

Dans la grande majorité des cas (70%) ce cancer est sporadique, dans 25% des cas le cancer est lié à des antécédents familiaux, et enfin dans 5% des cas, il est lié à une maladie génétique. Nous allons donc nous intéresser maintenant aux facteurs de risque du cancer colorectal.

4 Les facteurs de risque

4.1 L'âge

En classant les nouveaux cas en fonction de leur âge, nous pouvons observer une forte incidence de ce cancer pour des âges supérieurs à 50 ans. En effet, 90% des patients atteints d'un cancer colorectal ont plus de 50 ans. L'âge est donc un facteur de risque important (*Projection de l'incidence et de la mortalité par cancer en France en 2010 ; fiche « Côlon-Rectum »*).

4.2 Les mutations génétiques

Le syndrome de Lynch ou HNPCC (Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer) est une maladie génétique autosomique dominante. Elle est due à des anomalies sur les gènes codant pour les protéines de réparation de mésappariements (MMR) et des erreurs de réplication de l'ADN (Fleming et al. 2012). Ces protéines sont MSH2 (2p22-p21), MLH1 (3p21.3), MSH6 (2p16) et PMS2 (7p22). Ce syndrome est défini par la présence de l'ensemble des critères d'Amsterdam (Olschwang et al. 2005) :

- Au moins trois membres d'une même famille atteints de cancers du spectre HNPCC (côlon-rectum, endomètre, ovaire, grêle, uretère ou cavités excrétrices rénales)
- Un des cancers diagnostiqués avant l'âge de 50 ans
- Les sujets doivent être liés deux à deux par un lien de parenté au premier degré sur deux générations

Pour les personnes atteintes par le syndrome de Lynch, le risque de développer un cancer colorectal est de 80%, c'est la forme la plus fréquente des cancers colorectaux héréditaires.

La polypose adénomateuse familiale (PAF) est caractérisée par la présence de centaines ou de milliers d'adénomes au niveau du colon et du rectum. Elle est caractérisée par deux types de transmissions :

- Une transmission autosomique dominante d'une mutation du gène *APC* (5q21-q22 (Half, Bercovich, and Rozen 2009). Elle représente 90% des cas de PAF.

Cette mutation va conduire à l'inactivation d'un gène suppresseur de tumeur et donc conduire à la prolifération incontrôlée de cellules.

→ Une transmission autosomique récessive de la mutation du gène *MUTYH* (1q34.1). Les mutations de ce gène vont affecter les capacités de correction des erreurs faites durant la réplication.

4.3 Les maladies inflammatoires du côlon

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) sont caractérisées par une inflammation chronique d'une partie de l'intestin évoluant par poussées. Les deux MICI principales sont la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique. Ces maladies touchent environ une personne sur mille avec une incidence de 5 cas pour 100 000 habitants.

La maladie de Crohn se caractérise principalement par des douleurs abdominales et des diarrhées pouvant durer jusqu'à plusieurs mois. Elle peut être due à des facteurs génétiques, des facteurs auto-immuns qui seraient la cause de l'inflammation du tube digestif, mais aussi des facteurs environnementaux avec des incidences plus importantes dans les pays industrialisés. Cependant aucun facteur spécifique n'a encore été mis en évidence. L'augmentation du risque de cancer colorectal est observée après sept à dix ans d'évolution. Il augmente avec l'âge de déclenchement de la maladie de Crohn, le risque est ainsi augmenté de 3% si la maladie se déclare à 30 ans et de 10% si celle-ci se manifeste à 40 ans (Fleming et al. 2012).

La rectocolite hémorragique se caractérise principalement par des douleurs abdominales et des diarrhées plus ou moins sanglantes pouvant durer jusqu'à plusieurs mois. Il est très difficile de différencier la rectocolite hémorragique de la maladie de Crohn car la seule différence est la localisation. En effet la rectocolite hémorragique se limite seulement au gros intestin et au rectum. L'augmentation du risque de développer un cancer colorectal est évolutive selon le temps, elle est de 2% à 10 ans et passe à 18% à 30 ans (Fleming et al. 2012).

4.4 Les antécédents

4.4.1 Antécédent familial de cancer colorectal

Comme nous avons pu le voir pour les facteurs génétiques, les antécédents familiaux sont importants. Le risque de développer un cancer colorectal dépend du nombre de parents touchés, de l'âge des cas indexés et du degré de parenté avec ce ou ces derniers.

4.4.2 Antécédent familial d'adénome colorectal

Malgré le faible nombre d'études, il semble exister un risque plus important de développement d'un cancer colorectal lorsqu'un parent proche a développé un adénome colorectal avec un diamètre supérieur à 1 cm ou un contingent vilieux.

4.4.3 Antécédent personnel de cancer colorectal

Le risque de contracter un nouvel adénocarcinome après une résection totale d'un cancer colorectal est significativement élevé les 5 premières années suivant le traitement du cancer initial. Le risque d'un nouvel adénome colorectal, chez un patient ayant une résection d'un adénome initial dépend de la structure vilieuse, du diamètre et du nombre. En effet si l'adénome avait une structure vilieuse ou d'un diamètre supérieur à 1 cm le risque est multiplié par quatre, il est multiplié par sept si les adénomes étaient multiples.

4.5 Le mode de vie

4.5.1 La consommation d'alcool

L'alcool est un agent potentiellement cancérigène du fait de sa transformation en acétaldéhyde, molécule cancérigène, par le microbiote intestinal. Le risque de cancer colorectal est augmenté avec la quantité totale d'alcool consommée, ce risque est augmenté de 9 % lorsque la consommation est d'un verre par jour (Potter et al. 1993).

4.5.2 Le tabagisme

Le tabac est bien connu pour être cancérigène, le risque de développer un cancer augmente en fonction du nombre d'années de tabagisme et du nombre de cigarettes fumées par jour. L'*odds ratio*, rapport de risque relatif rapproché, est compris entre 1,08 et 1,44 (Liang, Chen, and Giovannucci 2009).

4.5.3 Le surpoids et l'obésité

L'obésité entraîne l'augmentation des taux endogènes de certaines hormones et de certains facteurs de croissance impliqués dans la prolifération, la différenciation et le métabolisme des cellules, et ainsi conduire à la carcinogenèse. L'obésité conduit également à un état inflammatoire chronique ce qui augmente les taux sanguins de facteurs pro-inflammatoires et donc favorise la prolifération cellulaire. Une personne obèse (IMC > 30 kg/m²) a 33% de risque de contracter un cancer colorectal par rapport à une personne ayant un IMC compris dans les normes (18 kg/m² < IMC < 25 kg/m²) (Potter et al. 1993).

4.5.4 La consommation de viande rouge et de charcuterie

Des études récentes ont montré que la consommation de viande rouge et de charcuteries pourrait accroître les risques de développer un cancer colorectal du fait de la présence de nitrite, un agent cancérigène, dans ces aliments. Cette présence de nitrite peut être due tout d'abord aux sels nitrités utilisés dans la charcuterie ou à la présence de fer hémique dans les viandes rouges qui augmenterait la production de composés N-nitrosés, de radicaux libres et de cytokines pro-inflammatoires. Le risque de développer un cancer serait augmenté de 29% par portion de 100 grammes de viande rouge consommée par jour et de 21% par portion de 50 grammes de charcuterie consommée par jour (Turner and Lloyd 2017).

Vu les nombreux risques, la prévalence et le caractère asymptomatique des tumeurs colorectales aux stades précoces, les autorités de santé publique ont mis l'accent sur le dépistage.

5 Les traitements du cancer colorectal

Le traitement du cancer colorectal repose tout d'abord, lorsque c'est possible, sur l'exérèse de la tumeur et sur le retrait des parties du colon et du rectum au contact de la tumeur. Lorsque le cancer est à un stade avancé, des protocoles de chimiothérapie sont également utilisés pour traiter les patients.

5.1 Historique des chimiothérapies

L'histoire de la chimiothérapie en cancérologie est liée à la première guerre mondiale. Elle commence en 1917 lorsque les scientifiques ont observé que les gens exposés au gaz moutarde avaient des taux de globules blancs sensiblement réduits. Des chercheurs de Yale,

Alfred Gilman et Louis Goodman, ont alors examiné les effets thérapeutiques potentiels des agents moutarde pour traiter le lymphome (Mandal 2009b).

Dans un premier temps, ils ont réalisé leurs travaux sur des souris et ont réussi à prouver que le lymphome pourrait être traité avec des agents moutarde. En 1943, ils ont réalisé avec le chirurgien Gustav Linskog des tests sur des patients atteints de lymphomes non Hodgkiniens avec une forme moins volatile appelé moutarde azotée avec de très bons résultats. Les scientifiques ont constaté que les masses tumorales des patients étaient sensiblement réduites pendant quelques semaines après traitement. L'utilisation des moutardes azotées pour traiter les lymphomes a augmenté aux États-Unis après la publication de l'article en 1946. Les moutardes azotées sont des agents alkylants ce qui signifie qu'elles sont capables d'alkyler les molécules d'ADN et ARN. Ceci a marqué le début de l'utilisation des agents cytotoxiques pour le traitement du cancer. D'autres molécules chimiothérapeutiques sont alors découvertes avec divers effets sur le cancer (DeVita and Chu 2008).

Après la deuxième guerre mondiale, Sidney Farber, un pathologiste de la faculté de médecine d'Harvard, a étudié les effets anticancéreux de l'acide folique, une vitamine essentielle dans le métabolisme d'ADN (vitamine B9). Ses recherches ont permis de développer des analogues foliques tels que le méthotrexate. En 1948, ces agents sont devenus les premiers à entraîner une rémission chez les enfants atteints de leucémie aiguë lymphoblastique, prouvant que les antifolates ont permis de restaurer la moelle osseuse normale (DeVita and Chu 2008).

Dans les années 1950, Eli Lilly montra que les alcaloïdes étaient efficaces pour le traitement des leucémies. Ceci a mené à l'introduction des vinca-alcaloïdes, tels que la vincristine et la vinblastine, comme médicaments anticancéreux (Mandal 2009b).

Pendant les deux décennies suivantes, les régimes de poly-chimiothérapie ont commencé à gagner en popularité. L'usage simultané de plusieurs drogues ayant des mécanismes d'action différents a amélioré l'efficacité des traitements et les taux de survie. On observe notamment des diminutions des taux de mortalité tous les ans à partir de 1990 jusqu'à nos jours. Pour autant cette diminution des taux de mortalité n'est pas uniquement due aux poly-chimiothérapies mais aussi au dépistage précoce (Mandal 2009b).

5.2 Les chimiothérapies du cancer colorectal

5.2.1 5-fluoro-uracile

Le 5-fluoro-uracile (5-FU) est un médicament faisant partie des anti-métabolites. Ces médicaments sont des substances chimiques qui empêchent l'utilisation dudit métabolite. Ils ont généralement des structures similaires à celle du métabolite avec lequel ils interfèrent.

Le 5-fluoro-uracile est un précurseur de la thymine ou de l'uracile, il fait partie de la sous-classe des analogues de la pyrimidine. Comme la thymine et l'uracile, le 5-FU est une molécule hétérocyclique aromatique comportant deux atomes d'azote, il possède une double liaison entre ses carbones 5 et 6, ainsi que deux groupements carbonyles sur les carbones 2 et 4. Il comporte un fluor en position 5 qui remplace le méthyl de la base thymine (Figure 3) (Pubchem n.d.).

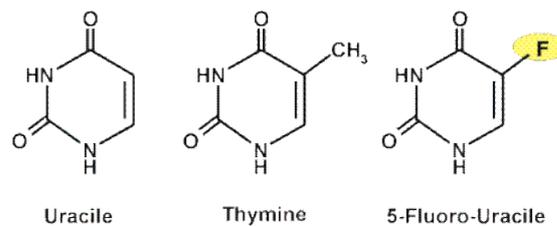


Figure 3 : Structure du 5-fluoro-uracile

Comparaison des structures du 5-FU, de la thymine et de l'uracile.

Sa structure chimique nous permet de mieux appréhender son mécanisme d'action. En effet le 5-FU va être réduit en 5-fluorodéoxyridine 5'-monophosphate (FdUMP) qui va se lier à la thymidilate-synthétase, et ainsi bloquer la formation de la déoxythymine. De plus, le 5-FU peut être phosphorylé et transformé en 5-fluoro-uracile triphosphate et ainsi s'incorporer dans l'ARN messager à la place de l'uracile (Figure 4) (Wigmore et al. 2010).

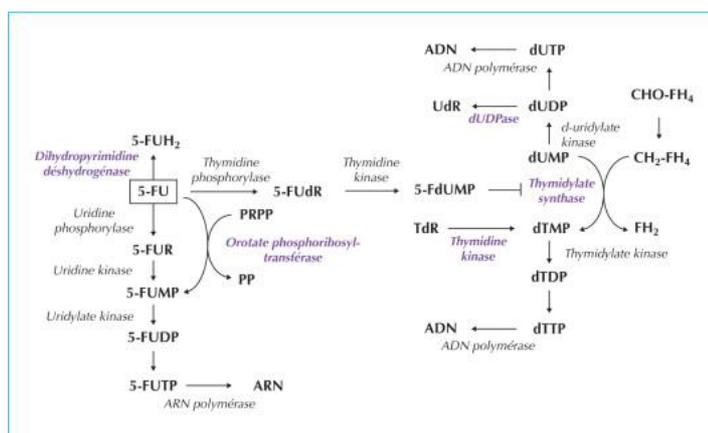


Figure 4 : Mécanisme d'action du 5-fluoro-uracile

Schéma représentant les différentes transformations chimiques du 5-FU pour son activation et son effet sur ses différentes cibles.

5.2.1.1 Pharmacocinétique

L'élimination est principalement urinaire sous forme inchangée pour 10% de la dose et sous forme de métabolites principalement le FBAL (fluoro-béta-alanine) pour 60 à 90% de la dose. L'élimination se fait aussi par voie respiratoire sous forme de CO₂.

Sa demi-vie d'élimination est très rapide, comprise entre 6 et 15 minutes (Wigmore et al. 2010).

Une déficience dans l'activité de la DPD (dihydropyrimidine déshydrogénase) entraîne des modifications majeures du métabolisme du 5-FU et provoque des toxicités sévères voire fatales. L'étude du polymorphisme du gène de la DPD avant toute administration de 5-FU est préconisée afin d'éviter des toxicités majeures (Ciccolini 2015).

5.2.1.2 Effets indésirables

Le 5-FU a des effets indésirables différents selon les patients et avec des fréquences variables. Les effets secondaires les plus fréquemment observés sont d'ordre digestif, avec notamment des nausées, des vomissements et des diarrhées. Les principaux effets secondaires sont répertoriés dans le tableau 2 (Fluorouracil Side Effects in Detail n.d.).

Toxicité	Implication	Importance
Hématologique	Leucopénie Thrombopénie Anémie	Modérée
Digestive	Nausées vomissements Diarrhées, ulcération gastro-intestinale Stomatite Hémorragies digestives	Très fréquent Tolérable Modérée Rare
Alopécie		Modérée
Locale	Photosensibilisation Veinite, thrombophlébite	
Neurologique	Ataxie cérébelleuse Encéphalite Myélopathie	
Oculaire	Conjonctivite Hypersécrétion lacrymale	
Cutanée	Desquamation palmoplantaire Hyperpigmentation Photosensibilisation Rash, urticaire	
Cardiaque	Angor, douleurs angineuses Arythmie ventriculaire ou auriculaire Insuffisance cardiaque Nécrose myocardique, infarctus	Fréquent

Tableau 2 : Effets indésirables du 5-FU

5.2.1.3 Capécitabine

La capécitabine est un carbamate de la fluoropyrimidine non cytotoxique dont la structure est présentée dans la Figure 5 (Pubchem n.d.). Précurseur du 5-FU (prodrogue), il

fait donc partie des médicaments anti-métabolites de la sous-classe des analogues de la pyrimidine. Il est administré par voie orale (Walko and Lindley 2005).

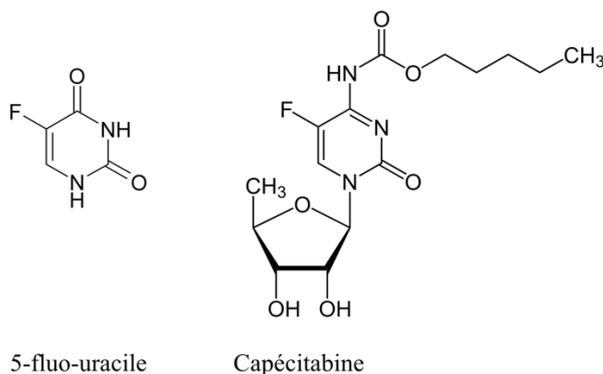


Figure 5 : Structure du 5-fluorouracile et de la capécitabine

Schéma comparant les structures chimiques du 5-FU et de la capécitabine.

L'activation de la capécitabine suit trois étapes enzymatiques (Figure 6), premièrement la capécitabine est métabolisée par une carboxy-esterase du foie en 5'-désoxy-5-fluoro-cytidine (5'-DFCR). La cytidine déaminase, enzyme présente dans toutes les cellules mais plus particulièrement dans les cellules cancéreuses et hépatiques, va transformer le 5'-DFCR en 5'-désoxy-5-fluoro-uridine (5'-DFUR). Puis le 5'-DFUR va être converti en 5-FU par la thymidyle phosphorylase au niveau des tumeurs (Figure 6) (Walko and Lindley 2005).

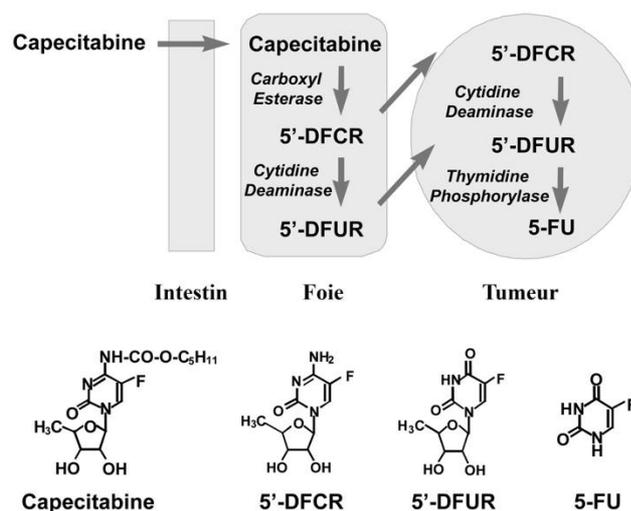


Figure 6 : Mécanisme de transformation de la capécitabine en 5-fluorouracile

Schéma représentant les différentes transformations chimiques de la capécitabine en 5-FU pour son activation et son effet anti-tumoral.

5.2.2 Acide folinique

L'acide folinique est un dérivé de l'acide glutamique fréquemment utilisé dans la modulation biochimique du 5-fluoro-uracile pour augmenter son activité cytotoxique. Le 5-FU inhibe la thymidilate synthase (TS), une enzyme clef impliquée dans la biosynthèse des pyrimidines. L'acide folinique favorise l'inhibition de la TS en augmentant le pool de folate intracellulaire, stabilisant ainsi le complexe 5-FU-TS et augmentant l'efficacité du 5-FU (Figure 7) (Fischel et al. 2002).

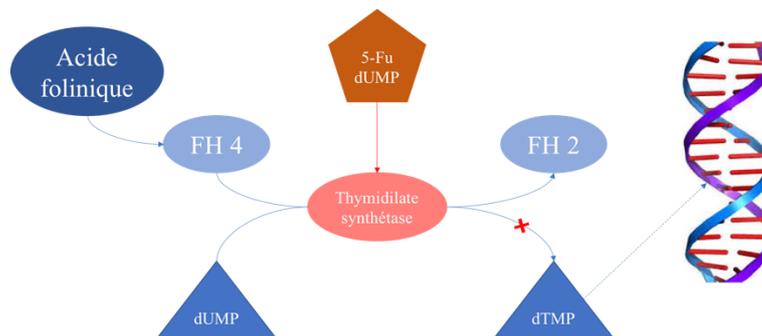


Figure 7 : Mécanisme d'action de l'acide folinique

Schéma représentant les mécanismes d'action de l'acide folinique et du 5-FU.

5.2.3 Irinotécan

L'irinotécan est un agent antinéoplasique dérivé hémisynthétique de la camptothécine, appelé également CPT-11 (pour camptothécine-11). L'irinotécan est une prodrogue qui est métabolisé en SN38, son métabolite actif, grâce à une carboxylestérase, préférentiellement dans les cellules tumorales (Figure 8) (Pubchem n.d.).

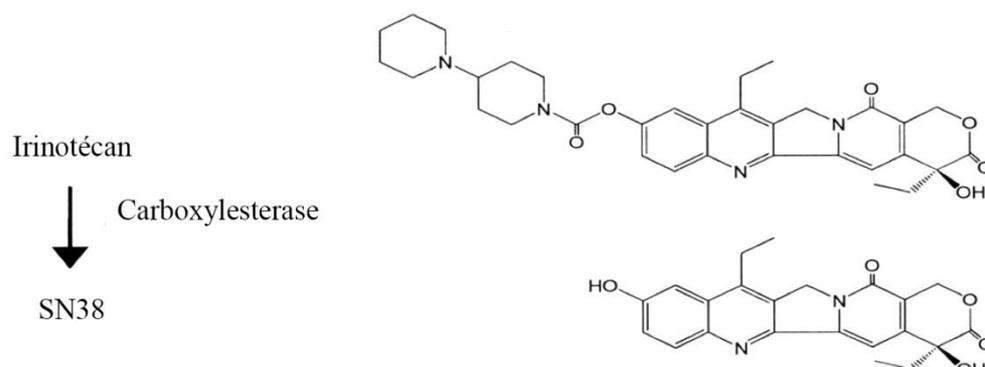


Figure 8 : Métabolisme de l'irinotécan

Schéma représentant l'irinotécan et son métabolite actif, le SN38.

Bien que le SN38 soit plus actif que l'irinotécan, c'est ça prodrogue qui est administrée du fait de sa plus grande hydrosolubilité.

Le SN38 est un inhibiteur de la topoisomérase I, enzyme nucléaire responsable de la relaxation de l'ADN super-enroulé permettant le passage des polymérase utile à la réplication et à la transcription. La topoisomérase I coupe transitoirement un brin de l'ADN permettant ainsi sa détorsion. En se fixant aux complexes topoisomérase I-ADN, le SN38 va inhiber l'enzyme ce qui va avoir deux conséquences : d'une part le brin d'ADN coupé par l'enzyme ne sera pas suturé et d'autre part l'ADN ne sera pas déenroulé, l'enzyme étant inactivée (Figure 9). En conséquence l'ADN ne pourra pas être répliqué ce qui inhibe la prolifération et les coupures de l'ADN induiront l'apoptose (Wiseman and Markham 1996).

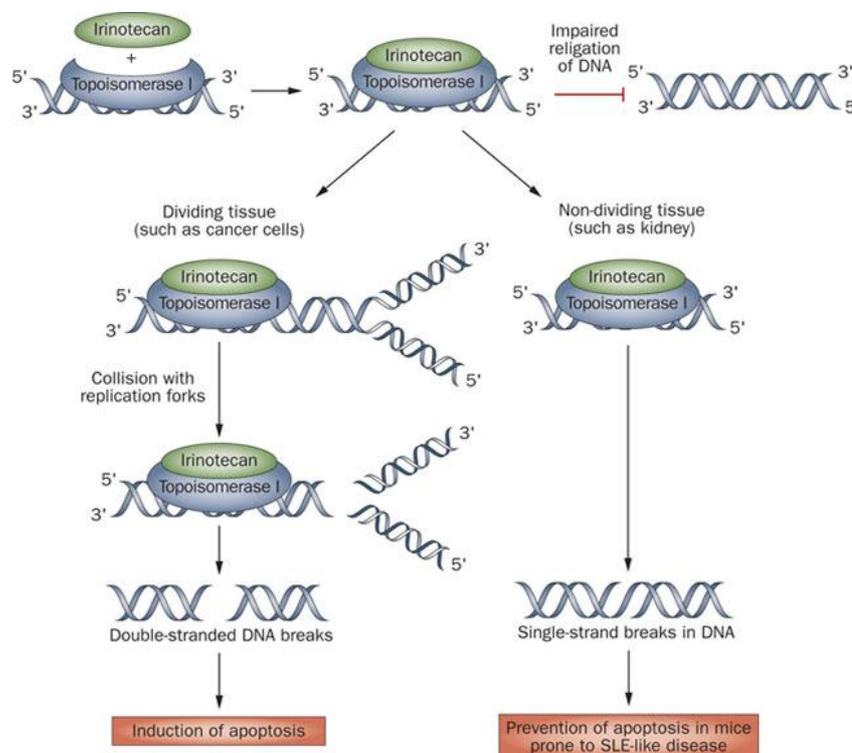


Figure 9 : Mécanisme d'action de l'irinotecan

Schéma représentant les mécanismes d'action de l'irinotecan (de Frese and Diamond, 2011).

5.2.3.1 Pharmacocinétique

L'élimination peut se faire de deux manières soit urinaire, elle est dose dépendante mais sous forme d'irinotécan pour moins de 20%, soit par les fèces *via* des transporteurs hépatiques (ABCB1 et ABCC2).

Le polymorphisme de l'UGT (UDP-glycosyl transférase) a été impliqué dans des modifications du métabolisme du SN-38, provoquant l'augmentation de la toxicité notamment au niveau hématologique (Wiseman and Markham 1996).

5.2.3.2 Effets indésirables

Les principaux effets indésirables sont répertoriés dans le tableau suivant (Irinotecan Side Effects in Detail n.d.):

Toxicité	Implication	Importance
Hématologique	Leucopénie Thrombopénie Anémie	Fréquent
Digestive	Nausées vomissements Diarrhées, ulcération gastro-intestinale Stomatite Crampe abdominale	Nécessitant de la médication
Alopécie		Fréquente
Syndrome cholinergique	Larmes, conjonctivite, rhinite, hyper salivation Trouble de l'accommodation Hypotension, hypersudation, malaise	Fréquente
Asthénie		Fréquente
Cardiaque	Infarctus du myocarde	Rare
Pulmonaire	Pneumopathie	Parfois sévère
Autres	Dyspnée, contractions musculaires, crampes, paresthésie	Peu fréquente

Tableau 3 : Effets indésirables de l'irinotécan

La diarrhée est un des effets secondaires limitant l'utilisation de l'irinotécan. Deux types de diarrhées ont été décrits :

- La diarrhée précoce ne dépend pas de la dose. Elle semble être liée au syndrome cholinergique. Elle se caractérise par une simple accélération du transit. Elle va être soignée avec du sulfate d'atropine.
- La diarrhée retardée apparaît chez 80% des malades et se révèle sévère dans 20% des cas. Elle est totalement imprévisible et dépendante de la dose. Elle apparaît plus de 24 heures après la perfusion. Elle se caractérise par un nombre important d'épisode diarrhéique (environ 4 par jour).

5.2.4 Les anticorps monoclonaux

5.2.4.1 Bevacizumab

Cet anticorps IgG1 va se fixer sur le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) et ainsi en inhiber l'activité biologique. La réduction de cette activité biologique réduit la vascularisation de la tumeur (Ellis 2006).

5.2.4.2 Cetuximab

Cet anticorps chimérique (humain/murin) IgG1 va se fixer sur le récepteur à l'EGF (EGFR, *Endothelial Growth Factor Receptor*) et ainsi entrer en inhibition compétitive avec ce dernier. La réduction de la liaison EGF-EGFR bloque l'activité biologique du récepteur, réduit l'activation de survie cellulaire et conduit à l'induction de l'apoptose (Lenz 2007).

5.2.4.3 Panitumumab

Cet anticorps IgG1 totalement humanisé va se fixer sur le récepteur à l'EGF et avoir ainsi les mêmes effets que le cetuximab (Dubois and Cohen 2009).

5.2.5 Oxaliplatine

L'oxaliplatine (ou L-OHP) est un agent alkylant dérivé du platine dont le nom complet est (trans-R,R)1,2-diaminocyclohexaneoxalatoplatine(II). Cette molécule de chimiothérapie, utilisée pour traiter le cancer colorectal, a été au cœur de l'étude réalisée au cours de ma thèse. L'oxaliplatine est donc plus particulièrement présenté et décrit dans le **chapitre 2** de ce manuscrit.

5.3 Les principaux schémas de chimiothérapies :

Lorsqu'elles sont utilisées séparément, les molécules de chimiothérapie peuvent avoir une efficacité très limitée. L'utilisation de protocoles de poly-chimiothérapie où plusieurs molécules aux modes d'action différents sont administrées ensemble a permis de grandement améliorer l'efficacité des traitements. Le taux de réponse objective de l'oxaliplatine passe ainsi d'à peine 10% lorsque la molécule est utilisée seule, à 58% lorsqu'elle est administrée avec de l'acide folinique et du 5-FU (FOLFOX ; Kelland, 2007).

Il existe plusieurs types de schémas de chimiothérapie utilisés pour traiter les cancers colorectaux selon différents critères que le praticien doit prendre en compte avant de traiter les patients. Nous allons ici en faire la liste.

Toutes ces données ont été tirées du dossier de Centre National Hospitalier d'Information sur le Médicament (CNHIM, Anticancéreux : Utilisation pratique).

5.3.1 Schémas à base de fluoro-uracile

Le 5-fluoro-uracile est un médicament prescrit pour les adénocarcinomes ovariens, carcinomes épidermoïdes des voies aérodigestives supérieures et œsophagienne, les adénocarcinomes mammaires et les adénocarcinomes digestifs métastatiques. Ici, certains protocoles de chimiothérapies à base de 5-fluoro-uracile sont présentés :

Protocole	Acide folinique	5-FU/Capécitabine	Fréquence
Capécitabine	∅	2 500 mg/m ² en deux prises pendant deux semaines	Toutes les trois semaines
LV5FU2 simplifié	400 mg/m ² sur deux heures le 1 ^{er} jour	Le premier jour un bolus de 5-FU 400 mg/m ² , suivi d'une infusion de 1200 mg/m ² pendant 22 heures	Toutes les deux semaines

Tableau 4 : Protocoles de chimiothérapie à base de 5-FU

Ces traitements étaient de référence pour le cancer colorectal, cependant des études complémentaires ont montré que les associations avec l'oxaliplatine ou l'irinotécan étaient plus efficaces.

5.3.2 Schémas à base d'oxaliplatine

L'oxaliplatine est un médicament prescrit pour les carcinomes des voies biliaires ou du pancréas, cancer gastrique (localisé ou métastatique), cancer bronchique non à petites cellules, carcinome hépatocellulaire avancé, cancer de l'œsophage et les adénocarcinomes digestifs métastatiques. Certains de ces protocoles sont présentés dans le tableau 5.

Il est à noter que ces schémas de chimiothérapie peuvent être également couplés à des anticorps monoclonaux, soit le cétixumab (Erbitux®) en deux perfusions de 400 mg /m² puis une dose d'entretien hebdomadaire la deuxième semaine avec une perfusion de 250 mg /m², soit le panitumumab (Vectibix®) en une perfusion en IV de 6 mg/kg ou le bévacicumab (Avastin®) en une perfusion en IV de 5 mg/kg.

Protocole	Oxaliplatine	Acide folinique	5-FU/Capécitabine	Fréquence
FOLFOX 6 simplifié	85 mg/m ² en deux heures le premier jour	400 mg/m ² sur deux heures le premier jour	Le premier jour un bolus de 5-FU 400 mg/m ² , suivi d'une infusion de 1200 mg/m ² pendant 22 heures	Toutes les deux semaines
FOLFOX 6	100 mg/m ² en deux heures le premier jour	400 mg/m ² sur deux heures le premier jour	Le premier jour un bolus de 5-FU 400 mg/m ² , suivi d'une infusion de 1200 mg/m ² pendant 22 heures	Toutes les deux semaines
FOLFOX7 ou XELOX	130 mg/m ² en deux heures le premier jour	400 mg/m ² sur deux heures le premier jour	Le premier jour un bolus de 5-FU 400 mg/m ² , suivi d'une infusion de 1200 mg/m ² pendant 22 heures 2 500 mg/m ² de capécitabine en 2 prises pendant 2 semaines	Toutes les deux semaines

Tableau 5 : Protocoles de chimiothérapie à base d'oxaliplatine

5.3.3 Schémas à base d'irinotecan

L'irinotecan est un médicament essentiellement prescrit pour les adénocarcinomes digestifs métastatiques. Certains de ces protocoles sont présentés dans le tableau suivant :

Protocole	Irinotecan	Acide folinique	5-FU/Capécitabine	Fréquence
FOLFIRI	180 mg/m ² en une heure et demi le premier jour	400 mg/m ² sur deux heures le premier jour	Le premier jour un bolus de 5-FU 400 mg/m ² , suivi d'une infusion de 1200 mg/m ² pendant 22 heures	Toutes les deux semaines
FOLFIRI fort ou XELIRI	240 mg/m ² en une heure et demi le premier jour	400 mg/m ² sur deux heures le premier jour	Le premier jour un bolus de 5-FU 400 mg/m ² , suivi d'une infusion de 1200 mg/m ² pendant 22 heures 2 500 mg/m ² de capécitabine en deux prises pendant deux semaines	Toutes les deux semaines

Tableau 6 : Protocoles de chimiothérapie à base d'irinotécan

5.3.4 Schémas à base d'irinotécan et d'oxaliplatine

Protocole	Irinotecan	Oxaliplatine	Acide folinique	5-FU	Fréquence
FOLFOXIRI	Première : 165 mg/m ² en une heure et demi le premier jour	Seconde : 130 mg/m ² en 2 heures le 1 ^{er} jour	400 mg/m ² sur deux heures le premier jour	Le premier jour un bolus de 5-FU 400 mg/m ² , suivi d'une infusion de 1200 mg/m ² pendant 22 heures	Toutes les 2 semaines
FOLFIRINOX	Seconde : 130 mg/m ² en une heure et demi le premier jour	Première : 85 mg/m ² en 2 heures le 1 ^{er} jour	400 mg/m ² sur deux heures le premier jour	Le premier jour un bolus de 5-FU 400 mg/m ² , suivi d'une infusion de 1200 mg/m ² pendant 22 heures	Toutes les 2 semaines

Tableau 7 : Protocoles de chimiothérapie à base d'oxaliplatine et d'irinotécan

5.4 Arbre décisionnel du traitement

5.4.1 Définitions

La chimiothérapie néo-adjuvante est donnée avant tout autre traitement. Elle a pour but de diminuer la taille de la tumeur. Elle est utilisée notamment avant la chirurgie.

La chimiothérapie adjuvante est donnée quand on a eu recours à un retrait total ou partiel de la tumeur par la chirurgie ou la radiothérapie. Elle est prescrite quand il y a une possibilité de récurrence, que la taille de la tumeur est trop importante, quand le cancer est à un stade avancé ou encore s'il est chimio-sensible. Elle a pour but de diminuer le risque de récurrence et la formation de métastases.

La chimiothérapie de première ligne, qu'elle soit néo-adjuvante ou adjuvante, est délivrée lors de la première phase de traitement. La chimiothérapie de seconde ligne est délivrée en cas de récurrence ou de non-réponse à la chimiothérapie de première ligne.

5.4.2 Selon le stade d'avancement du cancer colorectal

Pour le stade I ou T1-T2-N0, la chirurgie seule est préconisée. En effet il ne s'agit que d'une exérèse endoscopique (T Lecomte, T André, Y Panis, P Laurent-Puig, F Bibeau, J Taieb. « du côlon». Thésaurus National de Cancérologie Digestive, 11-2016)

Le stade II ou T3-T4-N0 représente un groupe très hétérogène de par l'anatomopathologie mais aussi par son pronostic. En effet, le taux de survie à 5 ans de 87,5% au stade IIa chute drastiquement à 58,4% au stade IIc. C'est pourquoi malgré de nombreuses cohortes IMPACT-B2, QUASAR et MOSAIC, aucun bénéfice n'a été montré pour les chimiothérapies adjuvantes à ce stade. Ainsi, une étude pluridisciplinaire étudie au cas par cas les patients pour évaluer le rapport bénéfice – risque (Lecomte et al 2016)

Pour le stade III ou Tx-N1 ou 2, généralement le plus représenté, les chimiothérapies adjuvantes ont montré leur efficacité. En effet, il a été observé dès 1990 une efficacité des traitements de chimiothérapie à base de fluoropyrimidines sur les cancers du stade III. De plus la cohorte MOSAIC a montré une efficacité accrue de cette chimiothérapie à base de fluoropyrimidines couplés avec de l'oxaliplatine. Cependant les combinaisons irinotecan et 5-FU n'ont pas montré d'efficacité particulière tout comme le raltitrexed (Lecomte et al 2016).

Pour ce stade particulier trop de facteurs rentrent en jeu pour décider de la bonne approche. En effet, la localisation le nombre et la résecabilité des tumeurs doivent être pris en compte pour choisir parmi les différents protocoles décrits plus haut (T Lecomte, T André, Y Panis, P Laurent-Puig, F Bibeau, J Taieb. « du côlon». Thésaurus National de Cancérologie Digestive, 11-2016).

Chapitre 2 L'oxaliplatine

1 Historique

L'oxaliplatine est un agent dérivé du platine de troisième génération. Les deux premières générations sont respectivement le cisplatine et le carboplatine. En 1845, le chimiste italien M. Peyrone a réalisé la première synthèse du diaminocyclohexane ou cisplatine. Sa structure chimique a été établie par les travaux du suisse A. Werner. Il faut attendre les années 1960 – 1970, pour observer les propriétés cytotoxiques de ces sels de platine, tout d'abord sur des bactéries par l'équipe de B. Rosenberg, puis sur divers modèles tumoraux. En 1976, l'oxaliplatine est découvert par l'équipe du professeur Y. Kidani, puis malheureusement relégué au panthéon des drogues inutiles jusqu'à ce que Depiopharm rachète la licence et montre une efficacité sur les cancers à des stades avancés. Ils vendent la licence à Sanofi-Aventis en 1994, qui va ensuite le mettre sur le marché en 1996 en France (sous le nom d'Eloxatine®) puis en 2002 au États Unis et en 2005 au Japon.

2 Structure & mode d'action

Le nom chimique complet de l'oxaliplatine est le (trans-R,R)1,2-diaminocyclohexaneoxalatoplatine (II), et comme ce nom l'indique, le platine est couplé avec un ligand trans-1,2-DACH (diaminocyclohexane) et un ligand oxalate (Chaney 1995). Le ligand diaminocyclohexane le distingue des deux anciennes générations et est responsable de son activité pharmacologique plus importante (Raymond et al. 1998; Lebwohl and Canetta 1998) (Figure 10).

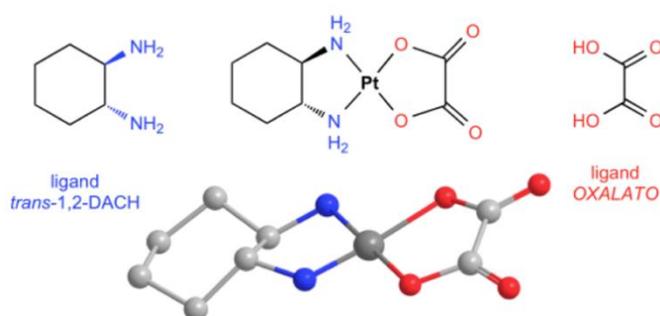


Figure 10 : Structure détaillée de l'oxaliplatine faisant apparaître ses composants

2.1 Mécanisme d'action

L'oxaliplatine va agir principalement sur l'ADN. En effet il va induire la formation d'adduits ou de lésions primaires dans la molécule d'ADN conduisant à un blocage de sa réplication et de sa transcription en ARNm (ARN messenger). Les adduits sont souvent intra- ou inter-brins, réalisant des liaisons covalentes sur deux résidus guanines. Cependant des études ont montré une prédominance pour les adduits intra-brins (Faivre et al. 2003; Woynarowski et al. 2000; Woynarowski et al. 1998; Reardon et al. 1999). Des liaisons aux protéines satellites de l'ADN ont également été observées.

Les adduits faits par l'oxaliplatine sont d'un point de vue quantitatif minoritaires comparés à ceux formés par le cisplatine, cependant ils ont un potentiel cytotoxique supérieur (Faivre et al. 2003; Woynarowski et al. 2000; Woynarowski et al. 1998; Hector et al. 2001). Ceci peut être expliqué par le fait que l'oxaliplatine est plus hydrophobe que le cisplatine mais aussi par le groupement DACH qui induit une distorsion plus importante de la double hélice de l'ADN conduisant à un blocage plus efficace de la réplication mais aussi du recrutement des protéines de réparation de l'ADN (Scheeff, Briggs, and Howell 1999).

Les adduits formées sont souvent des pontages entre deux guanines adjacentes dits 1,2-GG, entre une guanine et une adénine dits 1,2-GA ou encore sur deux guanines séparées par une base dits 1,3-GXG (Faivre et al. 2003; Woynarowski et al. 2000; Woynarowski et al. 1998; Reardon et al. 1999).

Une fois administré en IV, l'oxaliplatine doit subir des transformations chimiques pour être actif. Il interagit fortement avec les ions chlorure et est très rapidement activé en DACH-dichloroplatine après élimination du complexe oxalate (Figure 11). Une fois rentré dans la cellule, il subit deux hydrolyses qui vont permettre la perte des deux chlores et la transformation du DACH-dichloroplatine en un aqua-complexe électrophile qui va pouvoir attaquer la molécule d'ADN. *In vitro*, l'oxaliplatine va directement subir ces hydrolyses (Pendyala et al. 1995; Graham et al. 2000). Une fois libéré, le platine va attaquer de manière nucléophile l'azote en 7 d'une guanine (Kweekel, Gelderblom, and Guchelaar 2005).

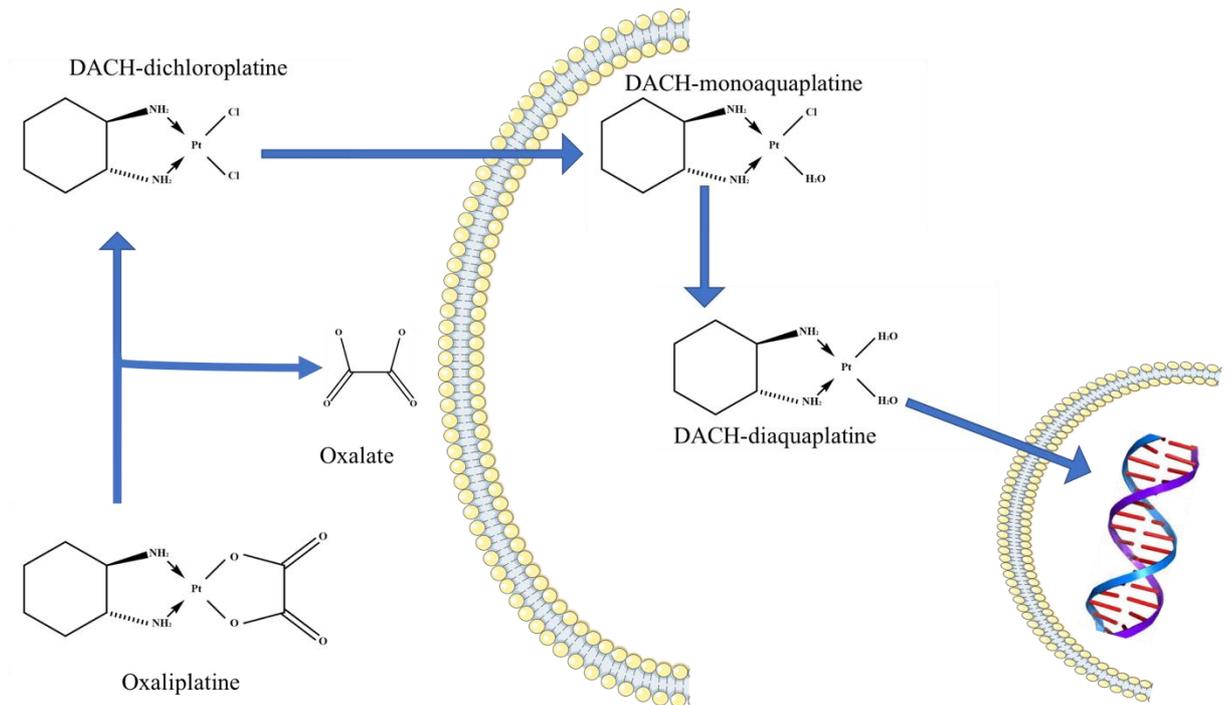


Figure 11 : Biotransformation de l'oxaliplatine

Schéma montrant les biotransformations que subit l'oxaliplatine dans le système sanguin et dans les cellules tumorales.

2.2 Réponse cellulaire

2.2.1 Conséquences structurales sur l'ADN

Les adduits de platine formé par l'oxaliplatine ne vont pas affecter l'appariement en hélice de type B de l'ADN décrit par Watson et Crick. Les perturbations se font au niveau des sites de la flexibilité de l'ADN, la présence des adduits va rendre la molécule d'ADN plus rigide, au niveau de la courbure de la chaîne nucléotidique, conduisant à une forte déformation au niveau de l'adduit (60 à 80° de courbure) et enfin à une torsion de la double hélice (torsion de 20 à 25°) (Barbic and Crothers 2003).

2.2.2 Effets sur la transcription

La déformation de l'ADN provoquée par les adduits va conduire à une impossibilité pour l'ARN polymérase II de progresser le long de la molécule d'ADN et ainsi conduire à une inaptitude de celle-ci à transcrire la molécule d'ADN en ARN messager.

La rigidité de l'ADN perturbe la mobilité de la chromatine, cette mobilité étant indispensable à la libération de la séquence d'ADN à transcrire.

De plus, les facteurs de transcription ont une affinité forte pour les sels de platine. Cette affinité conduit à la séquestration de ces facteurs et donc à une inhibition de la transcription (Malina et al. 2007).

2.2.3 Effets sur la réplication

Comme pour l'ARN polymérase II, la déformation de la molécule d'ADN va inhiber l'activité des ADN polymérases. Deux types de polymérases sont affectées, les ADN polymérases réplcatives et les ADN polymérases translésionnelles (Lange, Takata, and Wood 2011).

Les ADN polymérases réplcatives (ADN pol δ et l'ADN pol ϵ) vont être bloquées par les adduits de platine, ces derniers conduisant donc à un empêchement de la réplication de la molécule d'ADN (Hoffmann et al. 1995). Cependant les autres polymérases, les polymérases translésionnelles vont réussir à répliquer l'ADN en passant par-dessus les adduits mais cela va conduire à un mésappariement de bases entre brins complémentaires et donc à une mauvaise copie du matériel génétique.

2.2.4 Effets sur l'apoptose

Les mécanismes de mort cellulaire par apoptose sont hautement complexes et sophistiqués. La mort cellulaire apoptotique se fait par le biais de voies de signalisation qui sont de deux types : les voies intrinsèques *via* la mitochondrie et les voies extrinsèques *via* les récepteurs de mort. Cependant, il y a une voie supplémentaire impliquant la perforine et les granzymes (figure 12).

Les voies de signalisation intrinsèques qui initient l'apoptose impliquent un ensemble varié de stimuli non médiés par les récepteurs, ces stimuli sont généralement les radiations, les toxines, l'hypoxie, l'hyperthermie, les infections virales et les radicaux libres. Tous ces stimuli provoquent des changements dans la membrane mitochondriale interne qui entraînent une ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale (MPT) et la libération de deux groupes principaux de protéines pro-apoptotiques (Saelens et al. 2004). Le premier groupe comprend le cytochrome c, le Smac / DIABLO et la sérine protéase HtrA2 / Omi (Du et al. 2000). Ces protéines activent la voie mitochondriale dépendante de la caspase. Le cytochrome c se lie et active l'Apaf-1 ainsi que la procaspase-9, formant un «apoptosome» (Rios-Doria et al. 2003; Hill et al. 2004).

Les voies de signalisation extrinsèques qui initient l'apoptose impliquent des interactions induites par des récepteurs transmembranaires. Ces récepteurs de mort sont membres de la superfamille du gène du *tumor necrosis factor* (TNF) (Locksley, Killeen, and Lenardo 2001). Ils partagent des domaines extracellulaires similaires riches en cystéine et ont un domaine cytoplasmique d'environ 80 acides aminés appelé "domaine de la mort" (Ashkenazi and Dixit 1998). Ce domaine de mort joue un rôle critique dans la transmission du signal de mort de la surface cellulaire vers les voies de signalisation intracellulaires. À ce jour, les ligands les mieux caractérisés et les récepteurs de mort correspondants comprennent FasL / FasR, TNF- α / TNFR1, Apo3L / DR3, Apo2L / DR4 et Apo2L / DR5 (Chicheportiche et al. 1997; Ashkenazi and Dixit 1998; Peter and Krammer 1998; Rubio-Moscardo et al. 2005). La liaison du ligand Fas à FasR entraîne la liaison de la protéine adaptatrice FADD qui s'associe ensuite à la procaspase-8 par dimérisation du domaine effecteur de la mort (Wajant 2002). À ce stade, un complexe de signalisation induisant la mort (DISC) est formé, entraînant l'activation auto-catalytique de la procaspase-8 (Kischkel et al. 1995).

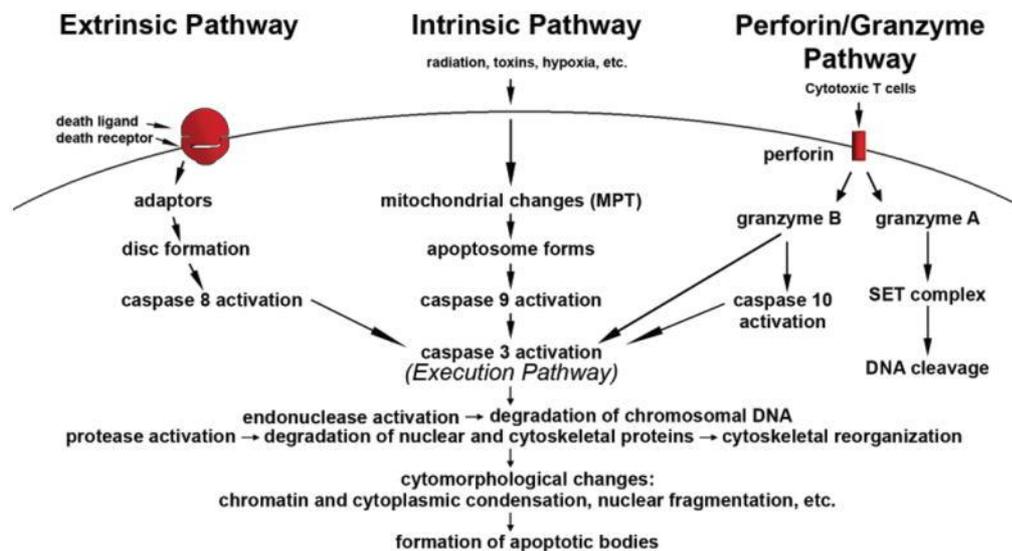


Figure 12 : L'apoptose

Schéma montrant les évènements apoptotiques des trois voies de signalisation (Elmore 2007)

Des travaux ont montré que les différents sels de platine, dont l'oxaliplatine, induisent l'apoptose *via* l'activation des caspases (Tao et al. 2007). L'oxaliplatine va activer les deux voies majeures de l'apoptose. En effet, l'oxaliplatine va activer la voie des caspases liées à la voie intrinsèque qui commence par la caspase-9 *via* une dépolarisation de la membrane

mitochondriale, mais aussi, en activant la voie extrinsèque, en augmentant l'expression de récepteur Fas et son ligand et activant la caspase-8 (Marchetti et al. 2004).

2.3 Pharmacocinétique et effets indésirables

La pharmacocinétique de l'oxaliplatine est très complexe comme celle de son ancêtre le cisplatine. L'oxaliplatine va s'accumuler de manière très importante dans les érythrocytes comparé au cisplatine. Cette fixation érythrocytaire est élevée et irréversible, elle représente 37% de l'oxaliplatine et possède une élimination très lente. L'oxaliplatine se fixe également aux protéines plasmatiques.

L'élimination est urinaire (50% en 48 heures), avec une demi-vie d'élimination plasmatique de 40 heures, et une phase d'élimination prolongée jusqu'à 250 heures.

Contrairement à l'irinotecan et au 5-FU, l'oxaliplatine a rarement des effets secondaires d'ordre digestif et entraîne rarement une perte des cheveux. Par contre, cette molécule étant neurotoxique, des effets neurologiques et d'hypersensibilité sont fréquemment observés. Les neuropathies périphériques représentent les effets secondaires limitants les plus fréquents. Ces effets peuvent persister après l'arrêt du traitement à l'oxaliplatine.

Les principaux effets indésirables sont répertoriés dans le tableau 8 (Oxaliplatin Side Effects in Detail n.d.).

Toxicité	Implication	Importance
Hématologique	Neutropénie Thrombopénie Anémie	Fréquent
Digestive	Nausées, vomissements Diarrhées Mucite	Nécessitant de la médication Rare Rare
Alopécie		Rare
Hypersensibilité	Frisson, céphalée, rougeur, prurit, tachycardie, dyspnée, vertiges, œdème Choc, hypotension	Fréquente

Neurologie	Dysesthésies et paresthésies distales périphériques Trimus, contractures et crampes musculaires, priapisme Faiblesse musculaire	Très fréquente
Rénale		Rare
Hépatique	Pneumopathie	Parfois sévère
Autres	Dyspnée, contractions musculaires, crampes, paresthésie	Peu fréquente

Tableau 8 : Effets indésirables de l'oxaliplatine

3 Résistance à l'oxaliplatine

Il existe de nombreux mécanismes de résistance aux chimiothérapies, certains sont spécifiques à chaque molécule, et d'autres sont communs à toutes les chimiothérapies. Parmi les mécanismes communs, nous pouvons citer ceux qui vont limiter la disponibilité de la drogue. Ils peuvent se caractériser par des influx ou efflux de ces molécules *via* des transporteurs par exemple. Il existe également des mécanismes mis en place par la cellule tumorale pour résister au processus apoptotique induit par la chimiothérapie. Il peut y avoir par exemple dérégulation des mécanismes apoptotiques de la cellule.

3.1 Influx et efflux cellulaires

Les mécanismes d'influx et d'efflux pour l'oxaliplatine ne sont connus que depuis peu de temps. En effet pendant longtemps l'incorporation passive de la molécule dans les cellules semblait évidente. Cependant des travaux récents ont décrit de nombreux transporteurs actifs que nous allons présenter maintenant. La plupart de ces transporteurs actifs fonctionnent pour l'ensemble des sels de platine.

3.1.1 Les transporteurs du cuivre

Comme leur nom l'indique ces transporteurs vont permettre le transport du cuivre dans la cellule ou au contraire l'excréter.

Le cuivre est indispensable à la cellule pour son bon fonctionnement métabolique. Il sert notamment de cofacteur au cytochrome C, permettant ainsi le bon fonctionnement de la voie respiratoire de la mitochondrie. Une bonne régulation de celle-ci est nécessaire pour avoir une bonne homéostasie.

Des études ont montré que ces transporteurs sont impliqués dans l'accumulation des sels de platine dans la cellule, notamment pour les sels de platine (Andrews and Howell 1990). Cela a été confirmé par des études plus récentes (Katano et al. 2002). Deux transporteurs, ATP7A et ATP7B, ont été décrits comme des exportateurs des sels de platine. Le groupe de Howell a montré que ces deux transporteurs ATP7A et ATP7B pouvaient être impliqués dans la résistance aux sels de platine. En effet ils ont observé qu'une sur-activation de ATP7A, notamment par le knock-down de sa protéine régulatrice Sec61 β (Abada et al. 2012), conduisait à une réduction de l'efficacité de l'oxaliplatine. Une étude récente a montré qu'un haut niveau d'expression de la protéine ATP7B était associé avec un mauvais pronostic pour le patient (Martinez-Balibrea et al. 2009). Une augmentation de l'expression de ces deux protéines conduit à une sortie plus forte de l'oxaliplatine de la cellule et donc à une mauvaise cytotoxicité (Figure 13).

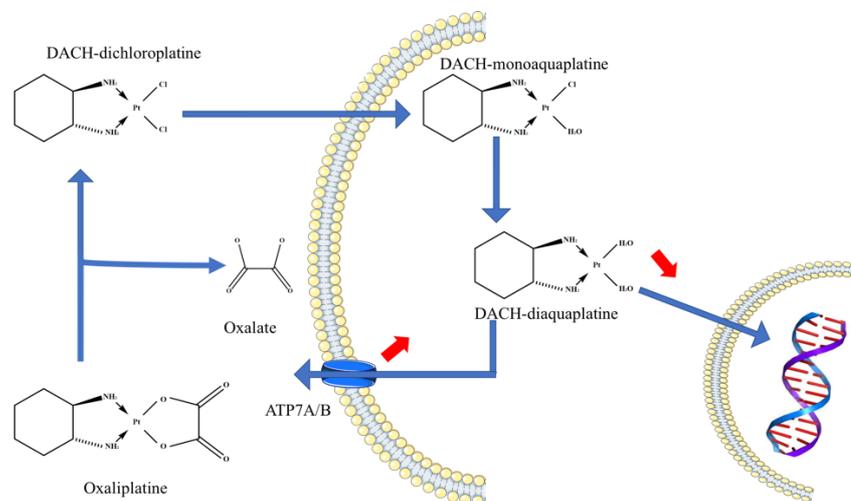


Figure 13 : Mécanisme de fonctionnement des transporteurs ATP7A/B

Schéma de l'exportation de l'oxaliplatine par les transporteurs ATP7A/B.

Un autre transporteur, le hCTR1, a été mis en évidence comme pouvant être impliqué dans la résistance au cisplatine (Ishida et al. 2002). Le transporteur hCTR1 est impliqué dans l'absorption de l'oxaliplatine dans les cellules cancéreuses, cependant son implication dans la résistance à ce sel de platine n'est pas aussi clair que pour les autres sels de platine (Howell et

al. 2010). Une diminution de l'expression de ce transporteur peut conduire à une diminution de l'absorption de l'oxaliplatine et donc à une résistance à ce traitement (Figure 14).

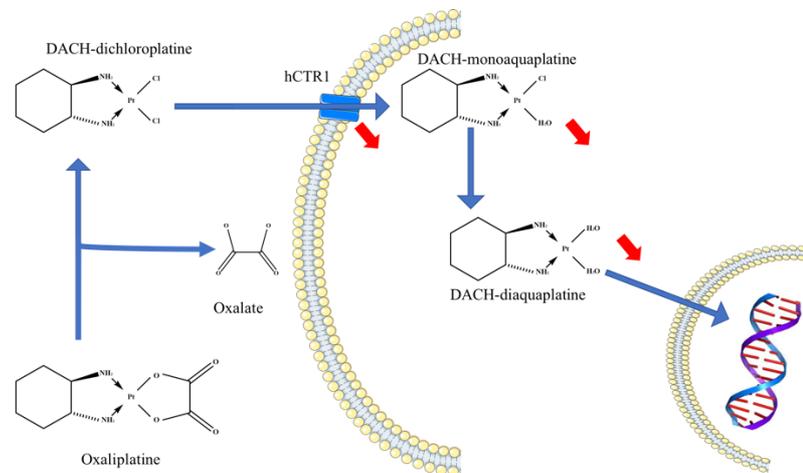


Figure 14 : Mécanisme de fonctionnement du hCTR1

Schéma de l'importation de l'oxaliplatine par le transporteur hCTR1.

3.1.2 Les transporteurs de soluté

Les transporteurs de soluté jouent un rôle important dans l'absorption physiologique ou l'excrétion des chimiothérapies notamment dans l'intestin (Burger et al. 2011). Il a été montré que parmi les 55 sous-familles existantes, la sous-famille des transporteurs des cations organiques (OCT) participait à la détoxification des chimiothérapies.

Dans cette sous-famille, c'est la protéine OCT2 qui a été la plus clairement associée à l'absorption et à la cytotoxicité à l'oxaliplatine (Burger et al. 2011). En effet la transfection de cette protéine dans des cellules HEK 293 entraîne une sensibilité accrue à l'oxaliplatine. L'ARNm de OCT2 n'a pas été détecté dans neuf lignées cellulaires de tumeurs colorectales (Burger et al. 2010). Une diminution de l'expression de cette protéine pourrait donc conduire à une augmentation de la résistance à l'oxaliplatine. Cependant une autre étude a observé la présence de l'ARN messager d'OCT2 dans 50% des tumeurs de patients (Zhang et al. 2006), c'est pourquoi des études complémentaires devront être réalisées.

3.1.3 Les transporteurs ABC

Les transporteurs ABC (ou ATP Binding Cassette) sont un ensemble de protéines transmembranaires responsables du transport unidirectionnel à travers la membrane cytoplasmique de diverses substances dont les macromolécules et notamment certaines

chimiothérapies. Une sous-famille de transporteurs ABC, les transporteurs ABCC, dont font partie notamment les MRP (multidrug resistance-associated proteins), sont particulièrement impliqués dans le phénomène de résistance aux sels de platine (Suzuki, Nishio, and Tanabe 2001). Les transporteur MRP1 et MRP4 ont plus particulièrement été identifiés comme étant impliqués dans la résistance à l'oxaliplatine. Une augmentation de l'expression de ces protéines est associée à une diminution d'accumulation de l'oxaliplatine et à la résistance à cette chimiothérapie (Beretta et al. 2010). Cependant le rôle joué par MRP1 dans le transport et la résistance à l'oxaliplatine doit être approfondi car il est encore mal compris. En effet une surexpression de MRP1 à la membrane induit une résistance à l'oxaliplatine (Figure 15), alors qu'il n'y a aucun changement d'activité de ce transporteur dans les cellules sur-exprimant cette protéine par rapport aux cellules contrôle (Ekblad, Kjellström, and Johnsson 2010). Des études récentes ont par ailleurs montré en utilisant des coupes cliniques qu'il n'y a pas de lien marqué entre ces transporteurs et la résistance à l'oxaliplatine (Helleman et al. 2006; Lee et al. 2012). Des études complémentaires sont là aussi nécessaires.

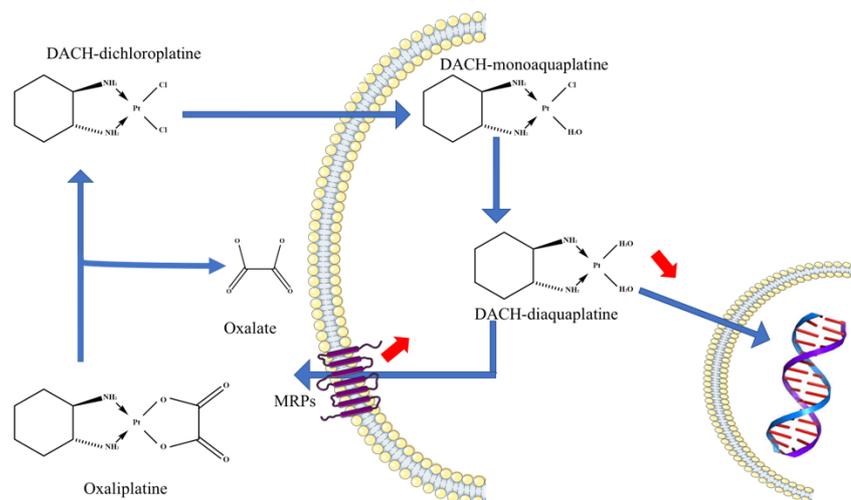


Figure 15 : Mécanisme de fonctionnement des MRPs

3.1.4 Le système glutathion

Le glutathion est un tripeptide qui peut être oxydé ou réduit. Les glutathion S-transférases (GST) ont pour rôle de détoxifier les xénobiotiques dont les métaux lourds et les chimiothérapies, notamment les sels de platine. Les glutathion S-transférases vont catalyser la détoxification de ces molécules pour éviter les dommages cellulaires (Tsuchida and Sato 1992).

Cette famille est composée de différentes sous-classes et il a été démontré que la sous-famille GSTP1 pouvait être associée avec la résistance au cisplatine (Goto et al. 1999; Ban et al. 1996), cependant la détoxification de l'oxaliplatine n'a pas été mise en évidence. En effet, de nombreux articles montrent qu'une augmentation de l'expression ou de l'activité de GSTP1 n'a pas de corrélation directe avec la résistance à l'oxaliplatine (Arnould et al. 2003 ; Pendyala et al. 1995 ; Ozawa et al. 2008). Cependant d'autres articles montrent un lien possible entre les variants génétiques de *GSTP1* et l'efficacité de l'oxaliplatine. Ainsi la présence de la mutation I105V qui diminue l'activité enzymatique de GSTP1 entraîne une meilleure efficacité de l'oxaliplatine pour des patients atteints d'un cancer colorectal (Stoehlmacher et al. 2002; Huang, Hua, and Du 2009) (Figure 16). D'autres articles réfutant cette implication, ce système, complexe, nécessitera donc encore d'autres études (Le Morvan et al. 2007; Kweekel et al. 2009).

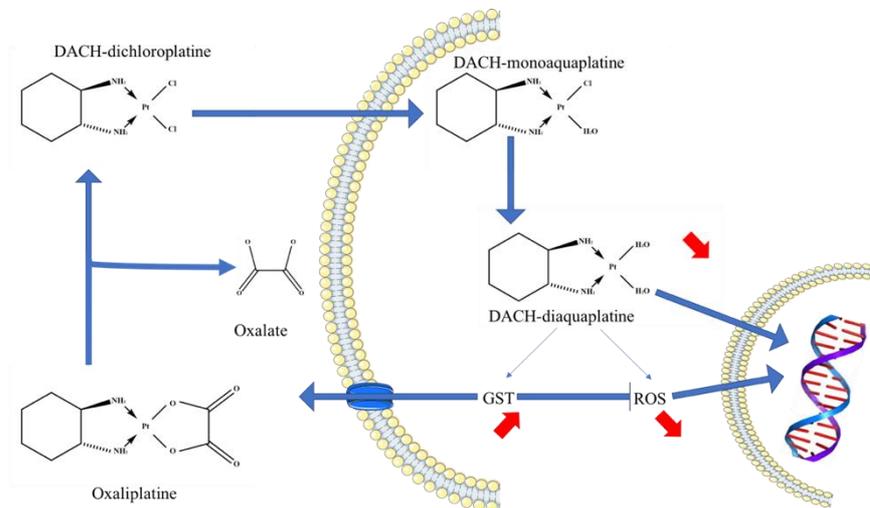


Figure 16 : Implication des GST dans l'efficacité de l'oxaliplatine

3.2 Les voies de survie

3.2.1 La voie PI3K/Akt

La voie PI3K/Akt est une voie de signalisation intracellulaire impliquée dans la régulation de la croissance et de la prolifération cellulaires. Elle est une voie d'intérêt dans l'étude de l'oncogenèse puisque la plupart des protéines la constituant sont des suppresseurs de tumeurs ou des proto-oncogènes dont la mutation peut favoriser le développement d'un processus tumoral.

L'activation d'Akt (ou PKB) nécessite d'abord la liaison d'un récepteur à activité tyrosine kinase (RTK) avec son ligand (incluant IGF-1, EGF et l'insuline), ce qui permet la dimérisation du RTK et le déclenchement de son activité de kinase. L'autophosphorylation du

RTK crée un site de fixation pour la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), une enzyme qui transfère un phosphate de l'ATP sur le carbone 3' de l'inositol des phosphatidylinositides membranaires (ptdIns). La génération des PtdIns3P, PtdIns (3,4) P2 et PtdIns (3,4,5) P3 (PIP3) permet le recrutement membranaire de protéines possédant des domaines spécifiques, tel que le domaine PH (pour *plecstrin homology*) présent dans la séquence d'Akt. C'est à la membrane plasmique que se produit l'activation d'Akt, suite à sa phosphorylation sur un résidu thréonine du domaine catalytique par la kinase PDK1 (Alessi et al. 1997) et sur un résidu sérine du domaine C-terminal à la fois par autophosphorylation et par l'action d'autres kinases telles que mTORC2, ILK et PKC (Lynch et al. 1999). Akt est ensuite relocalisée, par un mécanisme inconnu, dans différents compartiments intracellulaires où ses substrats sont situés. La production de PIP3 et l'activation d'Akt sont inhibés par la phosphatase PTEN. La voie Akt activée va conduire à une inhibition de l'apoptose, en inhibant Bad *via* des phosphorylations et modulant l'expression de FasL *via* l'activation de la voie de signalisation Forkhead (figure 17). Cette voie de signalisation induit aussi la survie cellulaire en activant NF- κ B et la prolifération cellulaire.

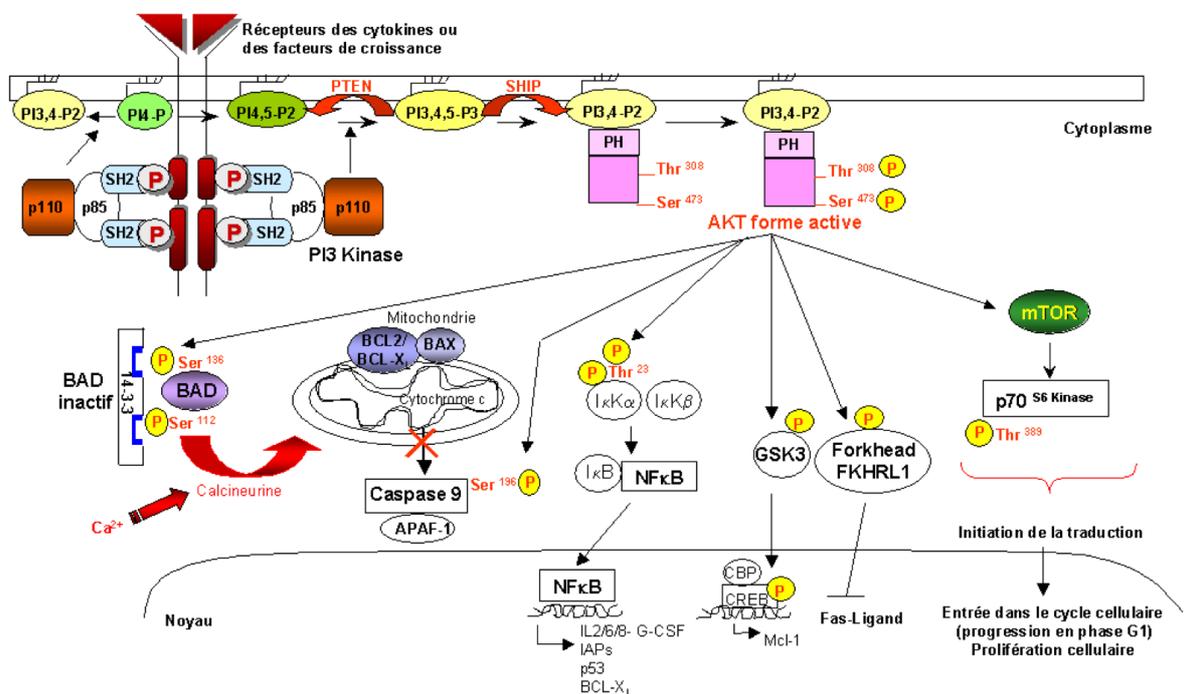


Figure 17 : Mécanisme d'activation de la voie PI3K/Akt

Schéma montrant les différentes actions de la voie PI3K/Akt

L'une des complications majeures de l'obésité est l'augmentation de la concentration sanguine de l'insuline. De plus, on estime que l'obésité est responsable de 30% des cancers colorectaux (Larsson and Wolk 2007). L'insuline *via* l'activation de la voie de signalisation Akt va conduire à une augmentation de la résistance à l'oxaliplatine de ces cancers colorectaux (Chen et al. 2011). Des inhibiteurs de cette voie de signalisation inhibent ces chimiorésistances (Zhang et al. 2014; Hua et al. 2013).

3.2.2 La voie p38 MAPK

La voie p38 MAPK est une voie de signalisation intracellulaire impliquée dans la régulation de l'inflammation, de l'apoptose et du cycle cellulaire, dans le développement, la différenciation cellulaire et dans la senescence et la suppression tumorale (Zarubin and Han 2005).

Comme pour beaucoup d'autres protéines kinases, l'activation des MAPKs nécessite une phosphorylation sur la boucle d'activation. Ces phosphorylations induisent des réorganisations conformationnelles qui soulagent le blocage stérique et stabilisent la boucle d'activation dans une conformation ouverte, facilitant la liaison au substrat. Les p38 MAPK sont activées par une double phosphorylation dans la séquence de la boucle d'activation Thr-Gly-Tyr. En réponse à des stimuli appropriés, les résidus de thréonine et de tyrosine peuvent être phosphorylés par trois kinases MKK / MAP2K à double spécificité (MAPK kinases). MKK6 peut phosphoryler les quatre membres de la famille p38 MAPK, alors que MKK3 active p38 α , p38 γ et p38 δ , mais pas p38 β . MKK3 et MKK6 sont toutes les deux très spécifiques pour les p38 MAPK (Enslen, Raingeaud, and Davis 1998; Alonso et al. 2000). En outre, p38 α peut également être phosphorylée par MKK4, un activateur de la voie JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) (Cuadrado and Nebreda 2010; Doza et al. 1995) (Figure 18).

On pense généralement que p38 MAPK est une kinase qui intervient dans la mort cellulaire. Cependant, bien que cette hypothèse soit correcte dans la plupart des cas, des études de cause à effet ont également montré que l'activation de p38 MAPK par des stimuli de stress ne favorise pas nécessairement la mort, mais améliore la survie cellulaire. En effet, la p38 MAPK va activer le cycle cellulaire ce qui va amener à la réparation de l'ADN, elle va réguler les voies de signalisation soit en inhibant la *glycogen synthase kinase 3 bêta* (GSK3 β) ou en activant le *myocyte enhancer factor-2* (MEF2). Toutes ces régulations vont conduire à la survie cellulaire (Thornton and Rincon 2008) (Figure 18).

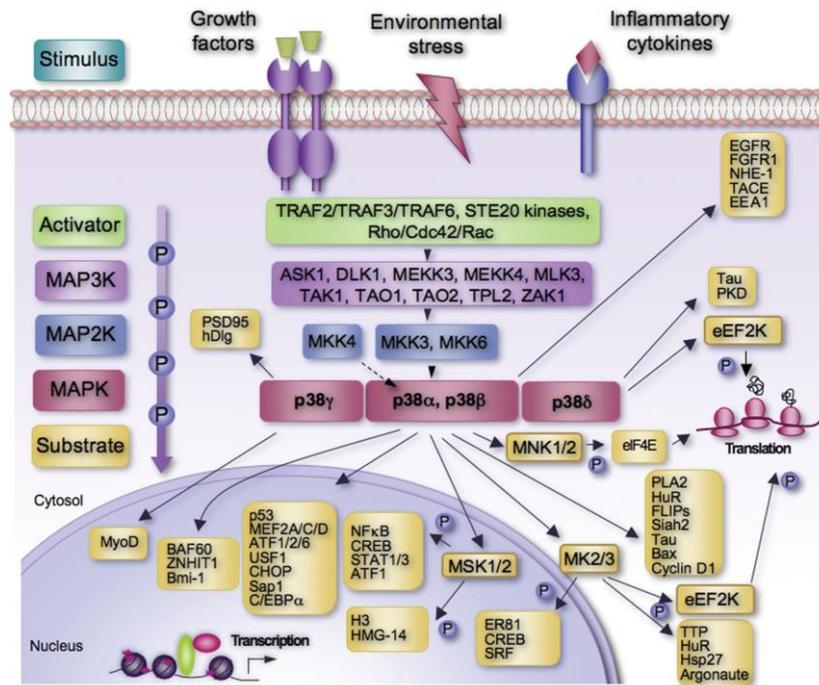


Figure 18 : Mécanisme d'activation de la voie p38 MAPK

Schéma montrant les différentes actions de la voie p38 MAPK d'après (Cuadrado and Nebreda 2010)

L'activation de p38 MAPK dans la résistance à l'oxaliplatine semble avoir des rôles antinomiques, en effet on peut voir que l'inhibition de p38 MAPK soit par miRNA (micro ARN) (miR-625-3p) soit de manière protéique (*via* le RGMb) va conduire à une augmentation de l'apoptose des cellules tumorales colorectales en réponse à l'oxaliplatine (Rasmussen et al. 2016; Shi et al. 2016). Cependant, on peut voir qu'une inhibition d'un activateur de p38 MAPK, MK2, augmente la mortalité déclenchée par les sels de platine (Reinhardt et al. 2007).

3.2.3 La voie NF- κ B

La voie de signalisation NF- κ B joue un rôle essentiel dans la progression et le développement de certains cancers et notamment du cancer colorectal.

En effet plusieurs articles ont montré un lien entre l'augmentation de l'activité de NF- κ B et la résistance aux traitements (Rakitina, Vasilevskaya, and O'Dwyer 2003), notamment lorsque l'activité de la sous-unité p65 est augmentée (Martinez-Cardús et al. 2009). Cette augmentation d'activité peut être expliquée par la transition épithélio-mésenchymateuse (Yang et al. 2006). Ainsi des thérapies visant cette voie de signalisation ont été proposées

pour pouvoir augmenter l'activité anti-tumorale de l'oxaliplatine (Jani et al. 2010) (Figure 19).

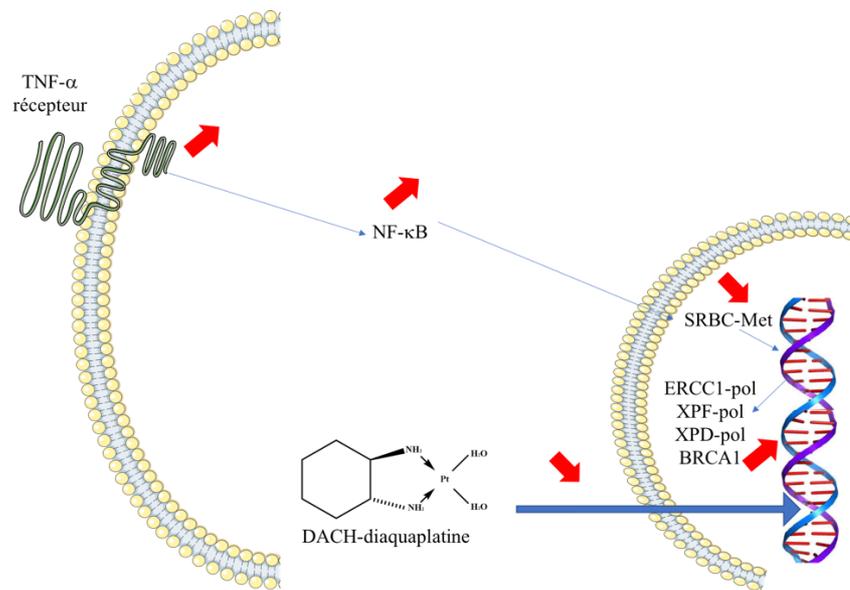


Figure 19 : Mécanisme d'action de la voie NF-κB

Schéma montrant l'inhibition des effets de l'oxaliplatine par la voie NF-κB.

3.3 Modifications des mécanismes de mort cellulaire

Comme nous l'avons vu précédemment, les sels de platine vont former des adduits dans la molécule d'ADN qui vont conduire à la mort de la cellule. Cette mort cellulaire se fait généralement par le biais de la protéine p53 qui conduit à l'activation de différentes voies de mort cellulaire. Cependant ces voies de signalisation peuvent être touchées et donc être impliquée dans la résistance à l'oxaliplatine.

3.3.1 L'apoptose

La protéine p53 joue un rôle clef dans la mise en place de ces voies apoptotiques en reconnaissant les dommages à l'ADN. Une altération de cette protéine peut donc conduire à la mort ou à la survie des cellules. Ainsi des mutations de gain ou de perte de fonction peuvent conduire à une résistance à l'oxaliplatine, en effet 50% des tumeurs colorectales présentent une mutation sur cette protéine ce qui va conduire à un défaut de la voie apoptotique intrinsèque et donc conduire à la résistance aux traitements (Toscano et al. 2007).

Les inhibiteurs de l'apoptose (IAP) vont agir, comme leur nom l'indique, en inhibant les voies apoptotiques. L'augmentation de l'expression de deux IAP, la survivine et BIRC6, va ainsi conduire à une résistance à l'oxaliplatine dans le cancer colorectal (Wen et al. 2013;

Van Houdt et al. 2011). Les régulateurs de la voie apoptotique intrinsèque, qu'ils soient pro-apoptotiques comme Bad, Bak et Bax, ou anti-apoptotiques comme Bcl-2, Bcl-xl et Mcl-1, peuvent aussi jouer un rôle dans la résistance aux traitements. Une perte de la protéine Bax induira ainsi une plus grande résistance (Gourdier et al. 2002), tandis qu'il y aura une sensibilisation accrue lorsque Bcl-2 et de Bcl-xl sont sous-régulées (Hayward et al. 2004) (Figure 20). Les régulateurs de la voie apoptotique extrinsèque peuvent aussi être impliqués, c'est le cas des récepteurs de mort TNFR1, Fas/CD95, TRAIL, DR4 et DR5, et de la protéine Bid. Une diminution de l'expression de la protéine Bid va ainsi conduire une forte résistance à l'oxaliplatine (Köhler et al. 2008). À l'inverse l'inhibition de MMP7 qui conduit à une augmentation de l'expression du récepteur Fas re-sensibilise les cellules cancéreuses (Almendro et al. 2009) (Figure 20). La résistance à l'oxaliplatine peut aussi être due à la sur-expression de c-FLIP qui va conduire à l'activation de la protéine XIAP et de la voie Akt (Kim et al. 2008) (Figure 20).

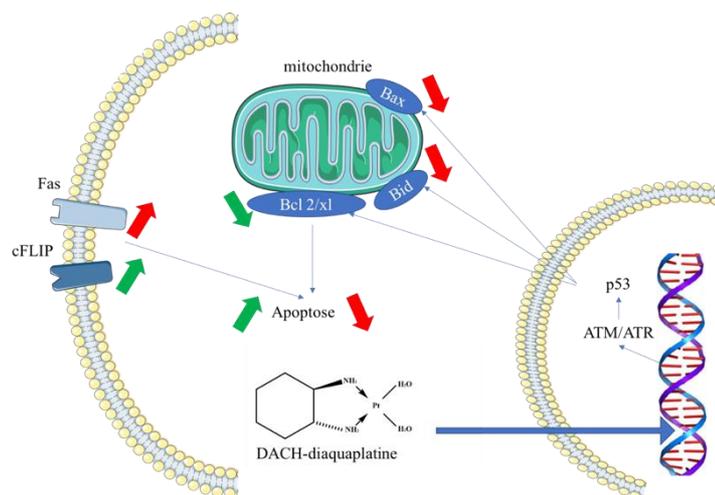


Figure 20 : Mécanismes de contournement de l'apoptose

Les flèches vertes représentent une activation, les rouges une inhibition.

3.3.2 La nécroptose

Depuis plusieurs années, des études montrent que la nécrose pourrait ne pas être un processus totalement aléatoire et non régulé, divers articles montrent qu'il peut être amené par des stress aussi bien physiologiques que pathologiques mais aussi par des stress génotoxiques tels que les chimiothérapies. On parle alors de nécrose régulée, ou de nécroptose. Ainsi les agents alkylants et bien d'autres pourraient conduire à une nécrose régulée (Vanden Berghe et al. 2014). L'oxaliplatine peut aussi bien activer la voie apoptotique que nécroptotique dans différents modèles cellulaires (Lim et al. 2010). Bien qu'il y ait encore peu de données sur cette voie de mort cellulaire, il a été montré récemment que l'activation de la protéine GSK3,

activée dans 50% des tumeurs, peut induire une résistance à l'oxaliplatine en inhibant la nécroptose (Grassilli et al. 2013) (Figure 21).

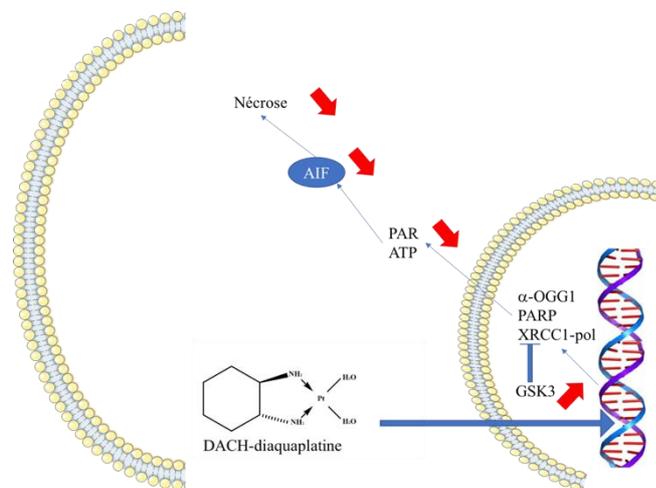


Figure 21 : Mécanisme de contournement de la nécroptose

3.3.3 L'autophagie

L'autophagie désigne une dégradation de la cellule par ces propres lysosomes qui va conduire à la mort de la cellule. Cette autophagie est active dans de nombreuses tumeurs, son inhibition peut conduire à une augmentation de la mort cellulaire ou au contraire à la survie en fonction de plusieurs facteurs impliqués (Eskelinen 2011). La protéine HMGB1 (*High Mobility Group Box 1*) pourrait être impliquée dans la chimiorésistance. En effet une réduction de l'expression de cette protéine conduit à une activation de la bécline 1 qui va elle-même conduire à l'autophagie et à la résistance à l'oxaliplatine (Tang et al. 2010) (Figure 22). D'autres auteurs montrent aussi que le traitement à l'oxaliplatine peut conduire à une induction de l'autophagie et ainsi à une augmentation de la résistance à l'oxaliplatine (Shi et al. 2012; Ding et al. 2011).

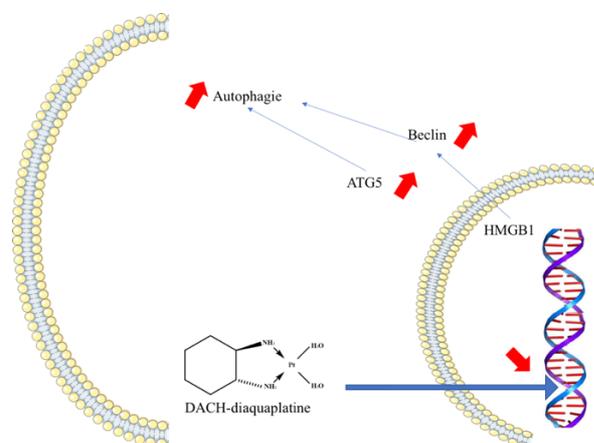


Figure 22 : Mécanisme d'activation de l'autophagie

3.3.4 La sénescence

La sénescence est fortement augmentée quand la tumeur est exposée à des sels de platine (Gewirtz, Holt, and Elmore 2008). Les cellules présentant une expression augmentée de FoxM1 vont avoir une tendance à rentrer plus facilement en sénescence lorsqu'elles sont exposées à l'oxaliplatine et donc être plus résistantes à cette chimiothérapie (Qu et al. 2013) (Figure 23).

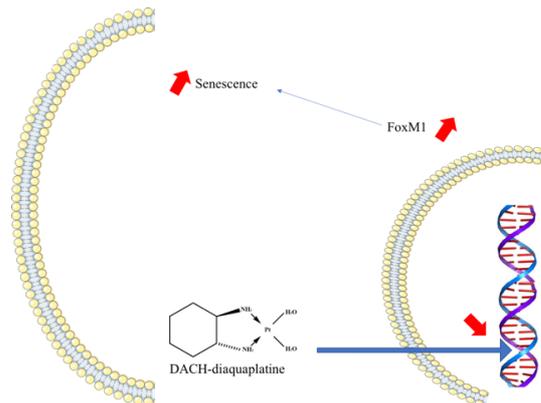


Figure 23 : Mécanisme d'activation de la sénescence

3.4 Les mécanismes épigénétiques

De nombreuses études ont montrés une corrélation entre l'épigénétique et la chimiorésistance, notamment *via* des dérégulations des gènes impliquées dans la réponse aux dommages à l'ADN, à la réparation de l'ADN et bien d'autres. Néanmoins, bien qu'il y ait peu d'information sur les mécanismes épigénétiques et la réponse à la chimiothérapie (Crea et al. 2011) nous allons essayer d'en faire une liste la plus précise possible.

3.4.1 Méthylation de l'ADN et modifications des histones

La méthylation de l'ADN correspond à l'ajout d'un groupement méthyl sur le carbone 5 d'une cytosine conduisant à des modifications de la transcription de l'ADN. Des études ont montrées que certaines tumeurs présentent des hyper-méthylations de l'ADN conduisant à des inactivations de gènes importants (Esteller 2008).

Il a ainsi été montré une résistance accrue à l'oxaliplatine lorsque le gène *SRBC* est inactivé par une hyper-méthylation (Moutinho et al. 2014). Cette inactivation de *SRBC* va conduire à une activation de *BRCA1*, protéine associé à la réparation des cassures de l'ADN provoquées notamment par les sels de platine (Xu et al. 2001).

La modification des histones va également conduire à l'inactivation ou à l'activation de certains gènes (Portela and Esteller 2010). Cependant aucun lien n'est actuellement connu entre la modification des histones et la réponse à l'oxaliplatine.

3.4.2 Les micro-ARNs

Les miRNA sont des petits ARNs non-codants, d'une vingtaine de bases, qui vont se fixer sur des ARN messagers cibles grâce à des séquences complémentaires. Cette fixation va conduire à une répression et/ou à une dégradation des ARN messagers. L'implication des miRNA dans diverses pathologies et notamment dans le cancer reste encore mal connue (Haenisch and Cascorbi 2012).

Il a cependant été montré que la sur-expression des miRNA-153, -203 et -143 modulait l'expression de FOXO3a, de l'ATM kinase et de l'IGF-1R respectivement, induisant ainsi la résistance à l'oxaliplatine (Qian et al. 2013 ; Zhang et al. 2013 ; Zhou et al. 2014). La sur-expression des miRNA-27b, -148a et -326 est également associée à une mauvaise réponse aux traitements (Kjersem et al. 2014) (Figure 24). Les miRNA pouvant être détectés dans le sang des patients, ils pourraient être utilisés pour prédire la réponse de ces derniers aux différents traitements.

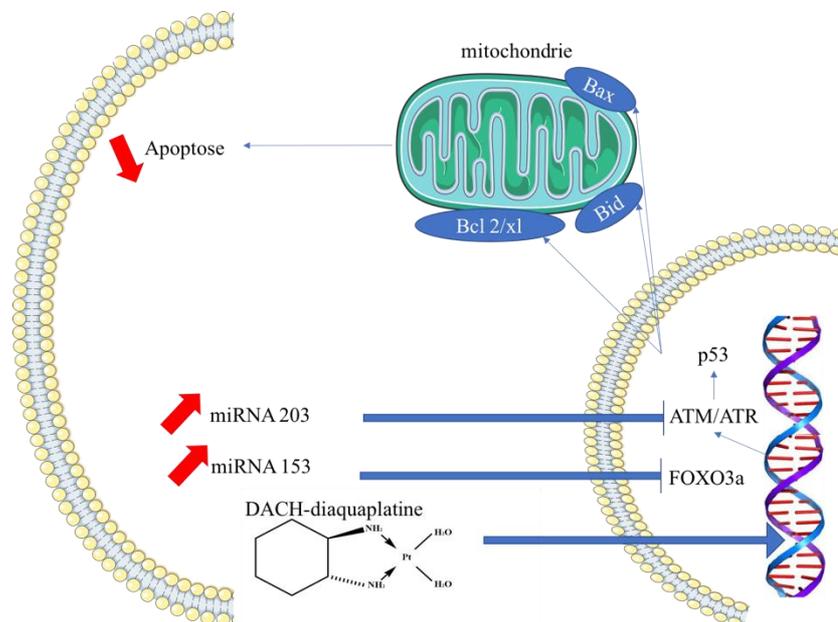


Figure 24 : Mécanisme d'action des miRNA dans la résistance à l'oxaliplatine

3.5 Mécanismes de réparation des adduits

La formation des ponts inter- et intra-brins dans la molécule d'ADN est au cœur de l'activité cytotoxique des sels de platine. Les systèmes de reconnaissance des adduits et de réparation de l'ADN sont donc très impliqués dans la réponse à l'oxaliplatine et dans la résistance à cette molécule.

3.5.1 Le système MMR

Le système MMR (*mismatch repair*) est une ligne de défense contre le mésappariement de la molécule d'ADN, il va ainsi éviter les erreurs de réplication.

À la différence des autres sels de platine, ce système ne reconnaît pas les adduits formés par l'oxaliplatine (Ahmad 2010). Pour cette raison des tumeurs déficientes en ce système de réparation seront résistantes au cisplatine mais au contraire sensibles à l'oxaliplatine (Cassidy 2000).

3.5.2 Le système NER

Le système NER est un système de réparation par excision de nucléotides, il va réparer l'ADN dégradé lorsque le système MMR n'est pas efficace. Il va corriger les lésions étendues et les déformations de l'ADN. Ce système est généralement mis en place lors d'exposition aux ultraviolets et aux chimiothérapies.

Ce système, à la différence du système MMR, reconnaît aussi bien les lésions induites par le cisplatine que par l'oxaliplatine. C'est le cas du système ERCC1 et de son partenaire XPF qui sont fortement impliqués dans la résistance à l'oxaliplatine. En effet des études précliniques montrent qu'un faible taux d'expression de ces protéines est associé à une sensibilité accrue à l'oxaliplatine (Boyer et al. 2004 ; Hatch et al. 2014 ; Bohanes, Labonte, and Lenz 2011). De plus, la mutation de *KRAS* va conduire à une induction plus forte d'ERCC1 et donc à une plus grande résistance à l'oxaliplatine (Orlandi et al. 2015). Des études précliniques montrent une relation entre l'expression d'ERCC1 et le devenir des patients traités à l'oxaliplatine (Shirota et al. 2001 ; Uchida et al. 2008 ; Li et al. 2013 :1).

D'autres protéines du système NER ont également un rôle dans la résistance. Les protéines XPF et XPG sont elles aussi impliquées dans la résistance à l'oxaliplatine, une diminution de l'expression de ces protéines conduisant à une re-sensibilisation des cellules tumorales (Graf et al. 2011).

3.5.3 Le système BER

Le système BER est un système de réparation par excision de base, il va lui aussi réparer l'ADN de manière à retrouver l'intégrité de la molécule. Il est généralement utilisé pour réparer les modifications sur une seule base.

Les ADN polymérase β , γ et η sont largement impliquées dans ce système de réparation. Des études ont montré qu'une augmentation de l'expression de l'ADN polymérase β ou encore de la polymérase η est accompagnée par une augmentation de la résistance à l'oxaliplatine (Yang et al. 2010; Teng et al. 2010). De plus, des travaux récents montrent que d'autres polymérase, notamment la polymérase ζ , et des protéines associées telles que REV1 sont impliquées dans la résistance à l'oxaliplatine (Sharma et al. 2012).

Il est communément admis que les sels de platine induisent une augmentation de la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS, *reactive oxygen species*) pour conduire à des dommages plus importants sur la molécule d'ADN. Ces dommages peuvent être réparés par le système BER. Ainsi une augmentation de l' α -OGG1 diminue la mort cellulaire induite par la production de ROS induite par ces sels de platine (Preston et al. 2009).

Chapitre 3

Les espèces réactives de l'oxygène et les NADPH oxydases

Les chimiothérapies conduisent à des stress cellulaires qui peuvent se traduire par de fortes augmentations de la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Le stress est à la base une perturbation de l'équilibre cellulaire. L'étude de ces phénomènes commence véritablement au début du 19^{ème} siècle avec le physiologiste français Claude Bernard.

Le stress oxydant est un de ces phénomènes, défini comme une incapacité pour l'organisme de se défendre contre les ROS (Halliwell 1999b). Dans ces espèces réactives de l'oxygène, nous trouvons majoritairement les espèces radicalaires ou radicaux libres ainsi que des espèces nitrés générées par l'organisme (Miller, Buettner, and Aust 1990).

Le phénomène de stress oxydatif est de plus en plus étudié car il se trouve impliqué dans de nombreuses pathologies dont le cancer mais aussi parce qu'il représente un potentiel outil thérapeutique. En effet, il existe une production physiologique de ROS dans les cellules saines, notamment *via* la chaîne mitochondriale. La mitochondrie sert au mammifère à catalyser la respiration qui est primordiale pour la cellule. Au cours du processus de respiration une faible quantité d'eau (environ 2%) est transformée en espèces réactives de l'oxygène, ces ROS servant à différentes voies de signalisation. Cette production est régulée par de nombreux systèmes enzymatiques de défense (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase...) (Diplock 1996) ainsi que par des petites molécules anti-oxydantes telles que le glutathion.

Dans le laboratoire, nous avons montré précédemment que les espèces réactives de l'oxygène sont indispensables aux effets cytotoxiques de l'oxaliplatine (Dahan et al. 2009). Comme nous avons pu le voir dans le chapitre précédent, les ROS sont majoritairement impliqués dans deux mécanismes antagonistes qui sont la mort cellulaire via la nécrose (Vanden Berghe et al. 2014) et la survie cellulaire via l'autophagie (Shi et al. 2012; Ding et al. 2011).

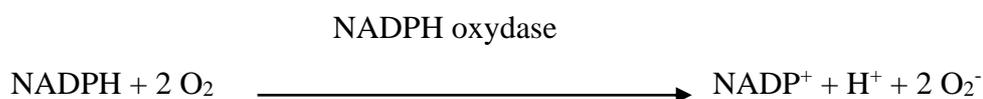
1 Définition et propriétés des espèces réactives de l'oxygène

Par définition, les espèces réactives de l'oxygène sont des dérivés de l'oxygène qui de part se fait vont être très réactifs vis-à-vis des composés organiques. Les ROS sont de deux types principaux : les radicalaires, qui possèdent un électron non apparié sur leur orbite la plus externe, et les non-radicalaires qui possèdent tous leurs électrons. Dans les espèces réactives de l'oxygène radicalaires on distingue les ions superoxyde et les ions hydroxyde respectivement O_2^- et HO^- . Les espèces réactives de l'oxygène non-radicalaires sont composées du peroxyde d'hydrogène et de l'oxygène dit singulet, se caractérisant par une configuration électronique particulière puisque deux électrons de spins opposés se trouvent sur une orbite particulière, respectivement H_2O_2 et 1O_2 (Halliwell 1999a).

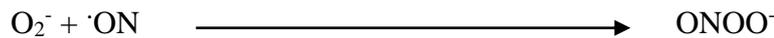
En 1956, les espèces réactives de l'oxygène sont associées au vieillissement cellulaire grâce aux travaux de Harman, débute alors l'ère de l'étude de la régulation physiologique des espèces réactives de l'oxygène (Harman 1956). Les travaux sur ces espèces ont donc augmenté de manière significative permettant la mise en évidence du rôle des ROS dans la protection des cellules contre les agents pathogènes, leur conférant un rôle bactéricide. Les années passant le rôle des ROS ne s'est plus seulement limité à ce rôle, de nombreux articles montrant que ces espèces pouvaient interagir avec la signalisation cellulaire, à des concentrations cependant bien inférieures à celles du stress oxydatif.

2 Le métabolisme des espèces réactives de l'oxygène

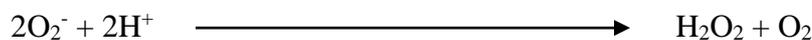
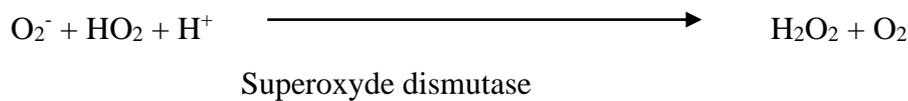
Le système enzymatique NADPH oxydase va induire une oxydation aboutissant à la formation de l'anion superoxyde à partir d'un donneur d'électron, le NADPH, et d'un accepteur, l'oxygène (Lambeth 2004).



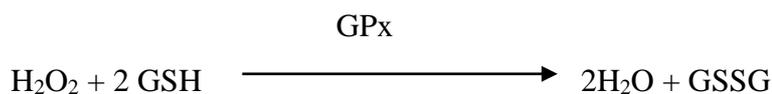
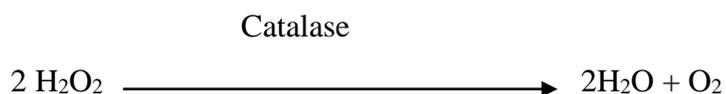
L'anion superoxyde n'a pas une toxicité directe mais plutôt indirecte. L'anion superoxyde va réagir de manière très rapide avec de l'eau oxygénée (réaction de Haber Weiss) ou des radicaux $\cdot\text{NO}$, ces réactions vont conduire à l'apparition du radical hydroxyl ($\cdot\text{OH}$) et des peroxynitrites (ONOO^-) respectivement qui ont pour leur part une toxicité avérée.



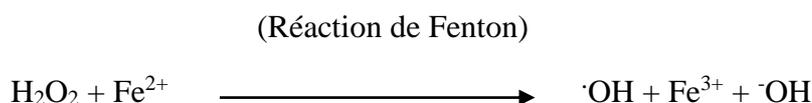
L'anion superoxyde peut être dismuté en eau oxygénée soit de manière spontanée soit grâce à des enzymes, les superoxyde dismutases. Les superoxyde dismutases sont des metalloprotéines. Elles sont au nombre de trois et se caractérisent par le métal qui est contenu dans leur site actif : le cuivre (Cu) et zinc (Zn), le manganèse (Mn) et le fer (Fe) ou le nickel (Ni) (McCord and Fridovich 1969).



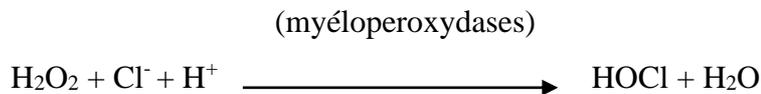
L'eau oxygénée ou peroxyde d'hydrogène est une espèce réactive de l'oxygène non radicalaire qui est relativement toxique. Cette espèce est généralement régulée par deux enzymes en particulier qui sont la catalase et les glutathion peroxydases, localisées dans les peroxysomes et le cytosol respectivement. Le peroxyde d'hydrogène va être dismuté en oxygène et en eau par la catalase, tandis que la glutathion peroxydase (GPx) va oxyder le glutathion en disulfure de glutathion en réduisant l'eau oxygénée en eau.



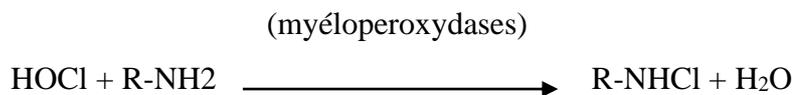
Le peroxyde d'hydrogène va pouvoir traverser les membranes et peut-être le précurseur d'autres espèces radicalaires avec un haut potentiel oxydatif. En présence de cations métalliques comme le fer, il va être transformé en radical hydroxyle ($\cdot\text{OH}$) par la réaction de Fenton.



En présence de myéloperoxydases, le peroxyde d'hydrogène va être transformé en acide hypochloreux (HOCl) notamment dans les granules azurophiles des neutrophiles.



L'acide hypochloreux est un acide extrêmement toxique car il réagit de manière forte avec les amines pour donner les chloramines (Valko et al. 2007).



En résumé, l'ion superoxyde va être produit par les différents systèmes décrits dans le paragraphe 5 et va être dismuté permettant la production de peroxyde d'hydrogène. Ce dernier va être pris en charge par la glutathion peroxydase ou par la catalase dans un but détoxifiant. Mais il peut être pris en charge par des métaux ou la myéloperoxydase, il va alors être transformé en ions encore plus toxiques. La voie utilisée va dépendre de la localisation des ions en question et bien sûr de la disponibilité des cellules en NADPH, catalase et glutathion.

3 Les fonctions des espèces réactives de l'oxygène dans l'organisme

3.1 Rôles des espèces réactives de l'oxygène

De nombreux processus physiologiques et physiopathologiques sont régulés par les espèces réactives de l'oxygène, leurs rôles pouvant être aussi bien délétères que bénéfiques. Dans les effets délétères, on retrouve le vieillissement cellulaire (Harman 1956; Balaban, Nemoto, and Finkel 2005) avec les dégradations de nombreux composants cellulaires tels que les protéines, les lipides et l'ADN. Leurs rôles bénéfiques sont souvent cantonnés dans la défense des cellules face aux agents pathogènes. Les ROS ont également toutes les caractéristiques biochimiques des seconds messagers intracellulaires, puisqu'ils ont des caractéristiques de formation et de dégradation enzymatique, leur concentration augmente de manière transitoire et ont des actions spécifiques. Ainsi ils jouent un rôle important dans la signalisation cellulaire (Finkel 2003) et peuvent ainsi être impliqués dans de nombreuses fonctions physiologiques fondamentales dont la régulation du tonus vasculaire, dans le

contrôle de la ventilation (Prabhakar and Overholt 2000), dans l'adhésion cellulaire (Roy, Sen, and Packer 1999), dans l'apoptose (Dumont et al. 1999) et bien d'autres mécanismes.

3.2 Mécanismes d'action des espèces réactives de l'oxygène

3.2.1 La spécificité du rôle des espèces réactives de l'oxygène

Le rôle et le mécanisme d'action des espèces réactives de l'oxygène dépendent de trois caractéristiques : leur quantité, leur nature et leur localisation. L'adéquation des trois critères fait que les espèces réactives de l'oxygène vont être des bons messagers d'une voie de signalisation spécifique. Les radicaux libres vont avoir un rôle important dans la régulation de divers processus biologiques comme le transport de glucose, l'activité ATPasique, la régulation du calcium ou encore la différenciation musculaire (Ji 2007; Taylor and Starnes 2003; Veal, Day, and Morgan 2007).

3.2.1.1 La quantité

La quantité cellulaire d'espèces réactives de l'oxygène est dépendante de l'équilibre entre enzymes productrices et système antioxydant nommé plus communément système RedOx. Lorsque la production de ROS est modérée et cadrée, généralement stimulée par des facteurs de croissance ou des cytokines, ils ont des effets ciblés permettant une signalisation localisée et spécifique. Cependant dans le contexte d'un stress oxydatif, la production d'espèces réactives de l'oxygène surpasse le système antioxydant conduisant à des effets non localisés. Cette production exagérée de ROS va entraîner une réponse cellulaire conduisant à des oxydations lipidiques et donc à une fragilisation de la membrane cellulaire, mais aussi à des dégradations de protéines et de l'ADN, tous ces phénomènes pouvant déclencher la mort cellulaire.

3.2.1.2 La nature

Comme nous avons pu le voir les espèces réactives de l'oxygène ont des potentiels oxydatifs différents, les ions superoxydes et les radicaux hydroxyles étant plus réactifs que les peroxydes d'hydrogène. Leurs demi-vies et leurs diffusions sont différentes tout comme la réponse qu'ils vont déclencher. Par exemple, le radical hydroxyle possède une durée de vie très courte (9 à 10 secondes) et un haut potentiel oxydatif lui permettant d'avoir un effet ciblé et fort sur les cascades de signalisation cellulaire (Pastor et al. 2000).

3.2.1.3 La localisation

Les espèces réactives de l'oxygène peuvent être produits au niveau du réticulum endoplasmique, de la membrane cytoplasmique, de la mitochondrie, au niveau du cytoplasme

et enfin dans les endosomes ou les phagosomes. Ces diverses localisations conditionnent, avec leurs natures, leur spécificité d'action. Leur nature joue aussi sur leur localisation, les ions superoxydes et le radical hydroxyle vont être plus compartimentalisés alors que le peroxyde d'hydrogène, qui traverse facilement les membranes, n'aura pas de compartimentalisation. Les molécules présentes dans le même compartiment cellulaire que l'ion superoxyde, les protéines par exemple, subiront alors des modifications (Korshunov and Imlay 2002).

3.2.1.4 Exemple : le peroxyde d'hydrogène

La réduction partielle de l'oxygène à la suite d'une exposition cellulaire à des agents physiques, chimiques ou biologiques, favorise la formation d'anion superoxyde. Par la suite, la dismutation catalytique ou spontanée de l'anion superoxyde semble être la source biologique principale de production du peroxyde d'hydrogène. La grande stabilité du peroxyde d'hydrogène de par sa structure non polaire, comparativement à l'anion superoxyde, va lui donner les caractéristiques typiques d'un second messenger lui permettant d'induire diverses réponses biologiques par diffusion spontanée à travers les membranes (Giorgio et al. 2007). Pour que le peroxyde d'hydrogène se comporte comme une molécule signal, il doit d'abord échapper à son élimination par les antioxydants, puis influencer l'activité de protéines cibles. De plus, ce ne sont que certaines caractéristiques des protéines qui les rendent sensibles à l'oxydation par le peroxyde d'hydrogène. Il est reconnu que l'oxydation par le peroxyde d'hydrogène des cystéines est un processus majeur de signal cellulaire (Janssen-Heininger et al. 2008). Les résidus cystéines de nombreuses protéines cytosoliques sont protonés du fait d'un pH cytosolique faible et ne peuvent pas réagir avec le peroxyde d'hydrogène. Néanmoins, des groupes thiols déprotonés sont utilisés comme espèces réactives dans le mécanisme catalytique de nombreuses enzymes. Pour que l'exposition aux ROS mène à l'oxydation réversible de groupe thiols de résidus cystéine clefs de certaines protéines comme les régulateurs transcriptionnels, les kinases ou phosphatases, les protéines de structures et les enzymes métaboliques, il est donc nécessaire que l'environnement local des cystéines (pH, proximité d'antioxydant, proximité d'autres protéines sensibles au peroxyde d'hydrogène) et la constante de dissociation acide (pKa) soient favorables (Veal, Day, and Morgan 2007). Il a été montré que le peroxyde d'hydrogène participe au processus de signalisation intracellulaire et intercellulaire. Cependant, une concentration d' H_2O_2 intracellulaire proche de $1 \mu\text{M}$ est toxique pour la cellule et ne peut alors être utile pour la signalisation (Giorgio et al. 2007). La concentration d' H_2O_2 utilisée par la cellule pour les

processus de régulation est comprise dans une gamme allant de 1 à 700 nM (Antunes and Cadenas 2001).

3.3 Cibles moléculaires des espèces réactives de l'oxygène

Le peroxyde d'hydrogène, étant l'espèce réactive de l'oxygène la plus stable et ayant une demi-vie assez importante, est la plus facile à étudier et à analyser. Sa concentration *in vivo* est d'environ 10^{-7} M, ce qui va permettre d'activer des boucles de régulation permettant l'activation des processus fondamentaux tels que la prolifération cellulaire (Foreman et al. 2003), la différenciation cellulaire (Li et al. 2006:4), la migration (Ushio-Fukai 2006) ou encore l'apoptose lorsque la concentration est importante (Cai 2005).

3.3.1 Effets des espèces réactives de l'oxygène sur les kinases et les phosphatases

Les voies de signalisation sont généralement régulées par des cascades de phosphorylations/dé-phosphorylations au niveau des sérines, thréonines ou encore tyrosines. C'est le cas notamment pour les voies de signalisation MAP kinases (*Mitogen-Activated Protein*) comprenant p38 MAPK ou encore JNK, de la voie de signalisation PI3K /Akt (phosphatidylinositol 3-kinase) qui sont généralement associées comme des voies de signalisation pro-survie ou pro-proliférative.

Toutes les tyrosines phosphatases possèdent une séquence peptidique commune dans leurs sites actifs contenant une cystéine et une arginine (Cys-X₅-Arg). La cystéine doit être à l'état réduit pour pouvoir être fonctionnel. La voie oxydative va inhiber les sites catalytiques de deux manières possibles, la première en formant un pont disulfure entre la cystéine du site catalytique et une autre cystéine, inhibant ainsi son activité (Barrett et al. 1999) ou en oxydant la cystéine passant d'une cys-SH à une cys-SOH (groupement sulfénique) (Denu and Tanner 1998).

3.3.2 Effets des espèces réactives de l'oxygène sur les facteurs de transcription

Les espèces réactives de l'oxygène peuvent activer des voies de signalisation, comme vu précédemment, cependant elles peuvent aussi agir en inhibant la fixation des facteurs de transcription sur leur séquence génomique (Thannickal and Fanburg 2000). Les facteurs de transcription possédant de nombreuses cystéines sont susceptibles de subir des oxydations. Ces oxydations vont provoquer des changements conformationnels et donc un défaut de liaison à leur séquence au niveau de l'ADN (Barouki and Morel 2001). Les facteurs de transcriptions ont donc une sensibilité aux variations de concentration des ROS. Par exemple,

les mécanismes d'action des facteurs de transcription NF- κ B et AP-1 sont généralement modifiés lors de stress oxydant (Zhou, Johnson, and Rando 2001).

Le facteur de transcription NF- κ B est lié à la voie de signalisation de l'apoptose induite par le stress, l'inflammation ou encore en réponse au système immunitaire. Son mécanisme d'action est régulé par la phosphorylation ou l'ubiquitination de son facteur répressif I κ B- α permettant la translocation de NF- κ B dans le noyau et l'activation de transcription de gènes cibles. Le facteur de transcription NF- κ B possède deux niveaux de régulation par les ROS. En effet, les ROS peuvent activer les kinases chargées de phosphoryler I κ B- α , et ainsi activer le facteur de transcription (Schreck, Rieber, and Baeuerle 1991). Ils peuvent également oxyder les nombreuses cystéines présentes dans la séquence du facteur de transcription conduisant ainsi à son inactivation. Le complexe AP-1 (*Activator Protein-1*) fait partie du dimère Jun/Fos-Jun, activé lors de divers stress pour activer des gènes précoces ou dit de réponse immédiate (Guyton et al. 1996). La voie Jun kinase est activée rapidement par le peroxyde d'hydrogène, cependant la cystéine 252, situé dans son domaine de liaison à l'ADN, peut-être victime d'oxydation qui empêche alors la liaison du facteur à l'ADN (Abate and Curran 1990).

4 Rôles des espèces réactives de l'oxygène dans le cancer

4.1 Initiation de la carcinogénèse

Il est largement acquis que les cellules cancéreuses présentent un taux de ROS plus élevé que les cellules normales (Federico et al. 2007). Il semble maintenant évident que les ROS jouent un rôle important dans les trois stades de la carcinogénèse : l'initiation, la promotion et la progression (Weitzman and Gordon 1990).

L'initiation de la carcinogénèse est caractérisée par des mutations dans la molécule d'ADN ce qui conduira à une instabilité génomique (Bakhoun and Compton 2012). Les ROS vont promouvoir la formation de ponts sur les pyrimidines en C5 et C6 ainsi que la formation de radicaux alkyl sur les thymidines (Cooke et al. 2003), ce qui va conduire à des cassures mono ou double brin. Ces effets vont conduire à des réarrangements chromosomiques et à des mutations (Ameziane-El-Hassani et al. 2010).

4.2 L'angiogénèse

La tumeur a besoin d'un apport important de nutriments et d'oxygène pour croître ce qui est nécessaire la formations de nouveaux vaisseaux sanguins ou angiogénèse (Hanahan and

Weinberg 2011). L'hypoxie, due à une prolifération excessive des cellules tumorales, va entraîner la production de facteurs angiogéniques. Lors de phases d'hypoxie, la protéine HIF-1 α , qui joue un rôle clef dans ce processus, est stabilisée par la suppression de sa dégradation. Elle va se fixer à la sous-unité HIF-1 β , permettant la transcription de facteurs angiogéniques, telle que le VEGF (Niecknig et al. 2012) (Figure 25). Cette stabilisation peut être assurée par les ROS (Gao et al. 2002; Chandel et al. 2000; Comito et al. 2011).

Les ROS peuvent également réguler les récepteurs et les métalloprotéases de manière à entraîner un remodelage de l'espace pour la formation des futurs vaisseaux (Arbiser et al. 2002).

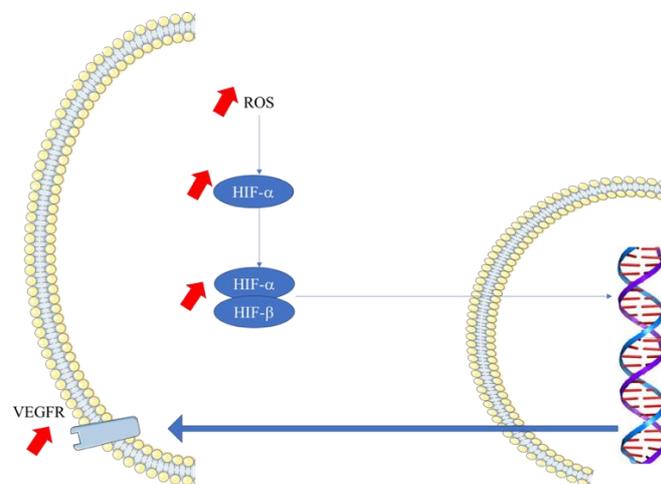


Figure 25 : Régulation de l'angiogenèse par les ROS

4.3 La prolifération cellulaire

Les ROS, comme on a pu voir plus haut, peuvent agir sur les phosphatases ou les kinases des voies de signalisation.

Différents articles montrent que les faibles doses de peroxyde d'hydrogène sont capables de stimuler la prolifération cellulaire dans diverses lignées cellulaires (Stone and Yang 2006). Les effets des ROS sur les voies de signalisation peuvent être directs ou indirects sur les voies de signalisation de prolifération cellulaire comme la voie p38 MAPK (Gao et al. 2002), la p70S6kinase (Bae et al. 1999), la voie JAK/STAT (Simon et al. 1998) mais aussi les voies JNK et ERK/MAPK (Chen et al. 2008) (Figure 26).

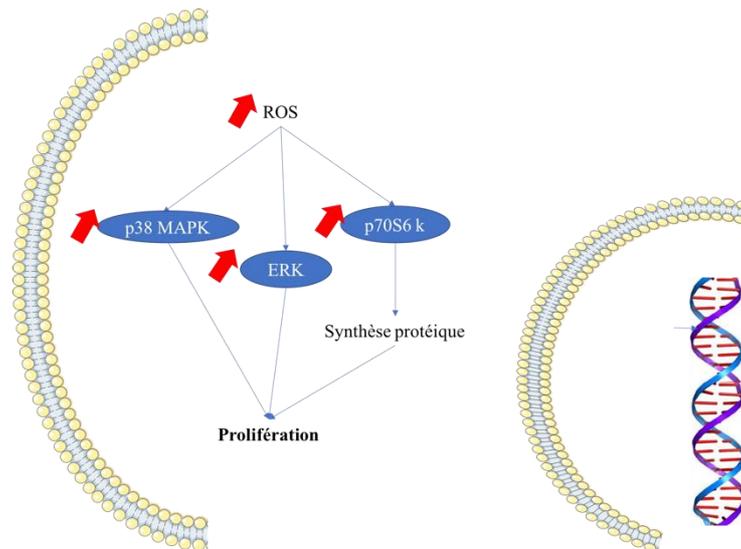


Figure 26 : Prolifération cellulaire induite par les ROS

4.4 Migration & invasion

L'angiogenèse permet la migration des cellules cancéreuses et ainsi la formation de métastases. Le remodelage extracellulaire (grâce aux métalloprotéases) et la transition épithélio-mésenchymateuse sont nécessaires à la propagation des métastases (Chiang and Massagué 2008).

Les ROS vont réguler divers facteurs de transcription dont notamment un régulateur de cette transition épithélio-mésenchymateuse, le facteur de transcription SNAIL via la voie de signalisation ERK/MAPK (Ho et al. 2011) (Figure 27). Les ROS vont également modifier structurellement la cellule en lui permettant de former des invadopodes (Díaz and Courtneidge 2012) et ainsi envahir les tissus. Les ROS vont réguler la migration des cellules cancéreuses et donc encourager l'invasion (Sadok et al. 2008) (Figure 27).

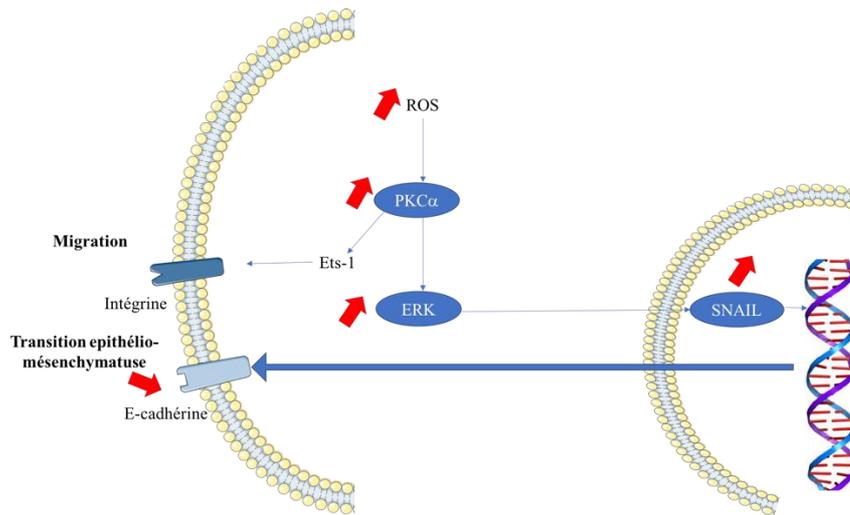


Figure 27 : Régulation de la migration par les ROS

4.5 La modulation des espèces réactives de l'oxygène

La production de ROS étant impliquée dans toutes les étapes de la carcinogenèse, mais aussi dans la prolifération et dans la migration/invasion, les scientifiques ont cherché à moduler la production des ROS pour contrecarrer leurs effets néfastes.

4.5.1 Diminution de la production de ROS

L'utilisation d'un traitement antioxydant sur un lymphome de type B induit par la mutation Myc a montré des résultats très intéressants. En effet un traitement avec de la vitamine C permet de diminuer la tumorigenèse grâce à une dégradation de HIF-1 α (Gao et al. 2007).

Les études cliniques ont donc été menées avec différentes molécules antioxydantes, cependant les résultats n'ont pas été concluants, les effets étant même négatifs (Vincent et al. 2013). Les effets néfastes de ces antioxydants pourraient être expliqués par un besoin de ROS pour l'efficacité des chimiothérapies (Dahan et al. 2009) notamment pour l'induction de la mort cellulaire comme nous l'avons vu plus haut.

4.5.2 Augmentation de la production de ROS

La production de ROS pouvant entraîner une augmentation d'efficacité de certaines chimiothérapies, la recherche de molécules pro-oxydantes est devenue un phénomène en pleine expansion. En effet plusieurs chimiothérapies montrent une activation de la production de ROS qui va permettre leur efficacité telles que l'oxaliplatine (Dahan et al. 2009) et la doxorubicine (Wagner et al. 2005).

5 Les sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygène

Les espèces réactives de l'oxygène sont produites par une multitude de systèmes enzymatiques. La chaîne respiratoire, les cytochromes P450, les lipoxigénases, les cyclo-oxygénases, la gamma glutamyl-transpeptidase et la xanthine oxydase sont quelques sources de ROS. La formation de ROS est une résultante de la production d'énergie et donc de l'utilisation de l'oxygène.

La majeure partie de l'oxygène consommé par l'organisme est utilisé par la mitochondrie pour la production de l'ATP. Incontestablement, la chaîne respiratoire de la mitochondrie est une source majeure de la production de ROS dans de nombreux organes (Balaban, Nemoto, and Finkel 2005). Les ROS sont alors des 'déchets' de l'oxydation phosphorylante. Environ 1 à 3% de l'oxygène utilisé pour la production d'ATP n'est pas complètement transformé et est donc dirigé vers la production d'espèces réactives de l'oxygène radicalaires (Boveris and Chance 1973).

Les cytochromes P450 se trouvant dans le réticulum endoplasmique ou encore la membrane interne de la mitochondrie, vont catalyser la formation d'oxygène moléculaire à partir des électrons du NADPH et donc produire des ROS comme intermédiaires réactionnels (Lewis and Sheridan 2001).

Les lipoxigénases comme leur nom l'indique vont avoir pour rôle de catalyser l'oxydation des acides gras et d'autres alcènes (Brash 1999). Il y a lors de cette oxydation un rejet de ROS (Bazan 1989) qui peut conduire à des nombreux effets biologiques (Blokhina, Virolainen, and Fagerstedt 2003).

La xanthine oxydase va quant à elle produire de l'acide urique qui va conduire généralement à des crampes lors d'efforts pour prévenir d'un manque d'oxygène. Lors de la formation de cet acide urique la xanthine oxydase va produire des ROS (Chung et al. 1997; Kostić et al. 2015).

Bien sûr, les chimiothérapies et d'autres facteurs exogènes peuvent induire une production de ROS. La production de ROS par l'oxaliplatine reste peu expliquée et comprise, c'est pourquoi nous allons prendre l'exemple des effets des métaux lourds, agents exogènes plus représentatif de la vie de tous les jours. Le cadmium, composé des matières plastiques pour la couleur jaune, est capable d'induire l'apparition des ROS par des mécanismes indirects. Ce métal possède une toxicité importante en inhibant la réparation de l'ADN ou en interférant avec les métaux essentiels (Waisberg et al. 2003).

Cependant la production de ROS n'est pas l'activité principale des différents systèmes enzymatiques que nous venons de voir. Seules les NADPH oxydases ont pour fonction de produire ces ROS.

6 Les NADPH oxydases

6.1 Histoire des NADPH oxydases

L'histoire des NADPH oxydases (ou NOX) est intimement liée à l'étude du burst respiratoire. Bien que le burst respiratoire soit connu depuis la première moitié du 20^{ème} siècle, les NADPH oxydases n'étaient pas encore bien connues. Les premières observations ont été faites en 1933 dans les phagocytes (Baldrige and Gerard, 1933). puis en 1943 dans les spermatozoïdes (MacLeod 1943). L'étude plus approfondie du burst respiratoire montre, en 1959, que son fonctionnement était dépendant du métabolisme du glucose (Sbarra and Karnovsky 1959). Peu de temps après, une étude montre que le burst respiratoire est lié à la génération de peroxyde d'hydrogène (Sbarra and Karnovsky 1959). Cependant la réduction de l'oxygène n'est pas totalement comprise, il restait une incertitude concernant le substrat, s'agissait-il du NADPH ou du NADH ? En 1964, Les NADPH oxydases étaient enfin identifiées comme les responsables de ce burst respiratoire (Rossi and Zatti 1964). En 1973, il est démontré que les superoxydes sont les produits initiaux du burst respiratoire et non pas le peroxyde d'hydrogène (Babior, Kipnes, and Curnutte 1973).

Les études cliniques ont été une seconde ligne pour la découverte des NADPH oxydases. En 1957, la granulomatose chronique est décrite comme étant une maladie rare touchant les jeunes garçons avec pour symptômes des infections chroniques et diverses atteintes au niveau des cellules sanguines (Berendes, Bridges, and Good 1957). Les observations de 1967 montrent que les enfants atteints de cette maladie ont une capacité antibactérienne inférieure, alors que les fonctions phagocytaires tels que la phagocytose et la dégranulation sont intactes. C'est le burst respiratoire qui est responsable de cette faible capacité antibactérienne (Quie et al. 1967; Holmes, Page, and Good 1967).

Les études sur la production de ROS dans les phagocytes montrent que le système enzymatique produisait des ions superoxydes, qu'il n'était pas sensible au cyanure (donc il ne s'agissait pas de la chaîne mitochondriale), qu'il était plus sélectif pour le NADPH mais aussi que la production de ROS était présente chez des patients ayant des déficiences de myéloperoxydase (Babior, Curnutte, and Kipnes 1975). Le challenge était alors d'identifier les protéines responsables de cette production de ROS. En 1978, on trouve une protéine

manquante dans la plupart des patients atteints de granulomatose, la protéine *b₅₅₈* (Segal and Jones 1978; Segal et al. 1978). À la fin des années 1980, un gène d'une sous unité de la NADPH oxydase est codé et référencé comme la gp91^{phox} appelé aussi NOX2 (Royer-Pokora et al. 1986; Teahan et al. 1987).

Très rapidement, il a été compris que les NADPH oxydases n'étaient pas seulement composé de la gp91^{phox}. En 1987, une autre protéine associée à la gp91^{phox} est découverte, la p22^{phox} (Segal 1987; Dinauer et al. 1987). Le développement d'une technique d'activation des NADPH oxydases acellulaires en utilisant des fractions membranaires et cytosoliques purifiées (Heyneman and Vercauteren 1984) a permis la découverte des sous-unités activatrices cytosoliques p47^{phox} et p67^{phox} (Volpp, Nauseef, and Clark 1988; Nuno et al. 1988). D'autres activateurs cytosoliques sont identifiés, notamment les GTP-protéines Rac1 et Rac2 (Abo et al. 1991; Knaus et al. 1991). En 1993, une troisième sous-unité cytosolique, la protéine p40^{phox}, est découverte (Wientjes et al. 1993).

En parallèle aux études réalisées sur NOX2, une série d'observations réalisées sur d'autres cellules ont montré que des systèmes identiques à NOX2 se trouvaient dans beaucoup d'autres types cellulaires tel que les fibroblastes (Meier et al. 1991), les cellules vasculaires, les cellules des muscles lisses (Griendling et al. 1994) et diverses cellules cancéreuses (Szatrowski and Nathan 1991). Il a été montré que des fibroblastes de patients déficients en NOX2 possédaient une production de ROS à un niveau normal laissant supposer qu'il existait d'autres NADPH oxydases (Emmendorffer et al. 1993). Deux groupes de scientifiques ont indépendamment identifié le premier homologue de NOX2 qu'ils ont appelé *mitogenic oxidase* ou *mox-1* pour l'un (Suh et al. 1999) et *NADPH oxidase homolog 1* ou *NOH-1* pour l'autre (Bánfi et al. 2000). La terminologie a depuis été modifiée et cette protéine homologue est appelée NOX1.

Elle fut rapidement suivie par le clonage de NOX3 (Kikuchi et al. 2000; Cheng et al. 2001), NOX4 (Shiose et al. 2001; Geiszt et al. 2000) et NOX5 (Cheng et al. 2001 ; Bánfi et al. 2000). En plus de ses 4 protéines supplémentaires, deux autres membres de la famille des NOXs sont découvertes, initialement nommés comme les thyroïdes oxydases puis DUOX1 et DUOX2 (Dupuy et al. 1999; Deken et al. 2000).

Malgré l'identification de ses protéines leurs fonctions biochimiques restaient floues, d'autant plus que la protéine NOX1, la plus proche homologue de NOX2, était généralement inactive lorsqu'elle était exprimée seule par transfection. La recherche des homologues des sous-unités cytosoliques de NOX2 (p47^{phox} et p67^{phox}) conduisit au clonage de nouveaux couples de sous-unités cytosoliques, NOXO1 et NOXA1 dans un premier temps (Bánfi et al.

2003 ; Geiszt et al. 2003 ; Takeya et al. 2003) puis DUOXA1 et DUOXA2 (Grasberger and Refetoff 2006).

Au final, sept isoformes des NOX ont été identifiées (NOX1 à 5 et DUOX1 et 2) ainsi que deux sous-unités organisatrices (p47^{phox} et NOXO1), deux sous-unités activatrices (p67^{phox} et NOXA1), deux facteurs spécifiques des DUOX (DUOXA1 et DUOXA2) et deux sous-unités modulatrices qui sont p40^{phox} et p22^{phox} (Sumimoto, Miyano, and Takeya 2005).

6.2 Famille des NADPH oxydases

Ces différentes protéines forment des complexes enzymatiques qui sont représentés dans la Figure 28. On distingue les complexes suivants :

- NOX1 avec NOXA1, NOXO1, p22^{phox} et Rac
- NOX2 avec p67^{phox}, p47^{phox}, p40^{phox}, p22^{phox} et Rac
- NOX3 avec NOXO1, p22^{phox} et potentiellement Rac et NOXA1
- NOX4 avec p22^{phox}
- NOX5
- DUOX1 et 2 avec DUOXA1 et DUOXA

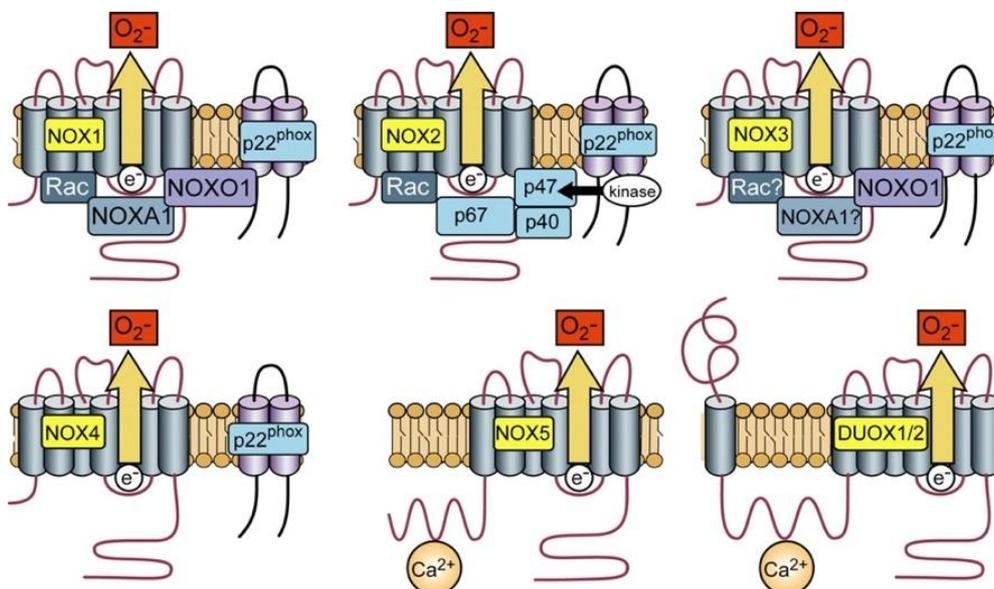


Figure 28 : La famille des NOXs

Représentation schématique des différentes NOX

(image tirée de Bedard and Krause 2007)

6.2.1 NOX1

NOX1 a été le premier homologue non phagocytaire identifié et cloné, à partir de la lignée d'adénocarcinome colique Caco-2, par deux équipes quasi-simultanément (Banfi et al., 2000, Suh et al., 1999). Ayant un nombre d'exons identique, une taille très proche et un gène localisé sur le même chromosome (X), NOX1 et NOX2 présentent une forte homologie. NOX1 possède une isoforme issue d'un épissage alternatif dans laquelle l'exon 11 est manquant. Ce dernier coderait pour une protéine incapable de produire des superoxydes (Geiszt et al., 2004). À l'échelle protéique, les deux NADPH oxydases présentent plus de 60% d'homologie de séquence, ce qui fait de NOX1, protéine de 546 acides aminés, l'homologue le plus proche du prototype NOX2. Malgré la présence de deux sites de glycosylation, NOX1 ne serait pas glycosylée puisque sa masse molaire est comprise entre 55 et 70 kDa, (Ambasta et al., 2004; Cui et al., 2006; Dikalova et al., 2005 ; Janiszewski et al., 2005). Comme NOX2, NOX1 possède six hélices alpha transmembranaires englobant deux hèmes dans l'extrémité N-terminale. Le domaine C-terminal est cytoplasmique et inclut des régions de fixation du NADPH et du FAD (Nauseef, 2008).

6.2.2 NOX2

NOX2, protéine également connue sous le nom de gp91^{phox}, est le prototype de NADPH oxydase. Une grande partie de ce qui est connu sur la structure des isoformes de NOX provient d'études réalisées sur NOX2. Pourtant, même pour NOX2, les caractéristiques topographiques proposées sont déduites des données indirectes et, par conséquent, sont encore des hypothèses. Les affections définitives devront attendre des études cristallographiques, qui malheureusement n'ont pas encore été réalisées.

NOX2 a été décrit pour la première fois dans les neutrophiles et les macrophages et est souvent désignée sous le nom de NADPH oxydase de phagocytes. La NOX2 est encore largement considérée comme ayant une expression essentiellement spécifique aux phagocytes (Sumimoto, Miyano, and Takeya 2005), mais lorsque la distribution tissulaire de l'ARNm total provenant de divers organes a été étudiée, il a été observé que NOX2 est l'une des NOX la plus largement distribuée. L'ARN messenger de NOX2 a été détecté dans un grand nombre de tissus, y compris le thymus, l'intestin grêle, le côlon, la rate, le pancréas, les ovaires, le placenta, la prostate et les testicules (Cheng et al. 2001). Cette large distribution tissulaire est principalement due à la présence de phagocytes et/ou de contamination du sang dans les tissus à partir desquels l'ARNm total a été extrait. Cependant, il existe maintenant également des preuves croissantes à la fois au niveau du messenger et au niveau des protéines que NOX2 est

exprimée dans des cellules non-phagocytaires, y compris les neurones (Serrano et al. 2003), les cardiomyocytes (Heymes et al. 2003), les myocytes des muscles squelettiques (Javeshghani et al. 2002), les hépatocytes (Reinehr, Becker, Eberle, et al. 2005), les cellules endothéliales (Görlach et al. 2000; Jones et al. 1996; Li and Shah 2002) et des cellules souches hématopoïétiques (Piccoli et al. 2005).

6.2.3 NOX3

Bien que la NADPH oxydase NOX3 ait été découverte en 2000, les résultats des études concernant sa structure et sa fonction n'ont été publiés qu'en 2004 (Bánfi et al. 2004). NOX3 est une protéine de 568 acides aminés qui possède 56% d'homologie avec NOX2. Elle a été retrouvée essentiellement dans l'oreille interne, et plus particulièrement dans le système vestibulaire et auditif. Elle intervient dans le contrôle de l'équilibre et de la formation de l'oreille interne (Bánfi et al. 2004; Paffenholz et al. 2004). Le gène est localisé sur le chromosome 6. Outre les reins et le système auditif, une expression transcriptionnelle de NOX3 a été détectée dans le foie, les poumons et la rate (Kikuchi et al. 2000). Il semblerait que p22^{phox} soit indispensable à l'activation de cette enzyme (Kawahara, Ritsick, et al. 2005). En effet, l'inactivation de p22^{phox} entraîne l'inhibition des superoxydes produits par NOX3 (Ueno et al. 2005). A l'heure actuelle, il n'y a pas de données concernant le ou les rôles joués par NOX3 en physiopathologie.

6.2.4 NOX4

Initialement découverte dans les reins, la NADPH oxydase 4 fut tout d'abord baptisée renox par l'équipe de Tom Leto (Geiszt et al. 2000). C'est une protéine de 578 acides aminés dont le gène est localisé sur le chromosome 11. Alors que NOX1 et NOX3 sont très proches dans le dendrogramme de l'évolution du sous-groupe des NOX, l'homologue NOX4 est la plus distante, puisqu'elle partage uniquement 39% d'homologie avec le prototype NOX2. NOX4 a été détectée dans les neurones, les cellules endothéliales, les kératinocytes, les cellules musculaires lisses, les cellules cardiaques, pancréatiques, les cellules du placenta, du muscle strié, des ovaires, des testicules, dans les ostéoclastes et la famille des fibroblastes et des astrocytes (Bedard and Krause 2007). En raison de son expression quasi-ubiquitaire, de nombreuses fonctions ont été attribuées à NOX4. Dans le système rénal, elle aurait un rôle de détecteur d'oxygène, de régulateur de la sécrétion d'érythropoïétine et d'activateur de la prolifération cellulaire (Shiose et al. 2001). Dans le tissu cardiaque, NOX4 aurait un rôle dans la différenciation cardiaque au stade embryonnaire (Li et al. 2006), alors qu'elle interviendrait

dans la résorption osseuse au niveau des ostéoclastes (Yang et al. 2001) et dans la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes en présence de TGF- β (Cucoranu et al. 2005). Même si l'activation de NOX4 semble être constitutive, la surexpression de p22^{phox} permet d'augmenter l'activité de cette NADPH oxydase (Ambasta et al. 2004).

La localisation de NOX4 semble être dépendante du modèle cellulaire dans lequel elle est exprimée. Dans les cellules vasculaires de muscles lisses, une localisation nucléaire a été suggérée (Hilenski et al. 2004), alors que dans les cellules endothéliales ainsi que dans les cellules où NOX4 est surexprimée, l'oxydase est localisée dans le réticulum endoplasmique (Martyn et al. 2006; Van Buul et al. 2005). L'activation de NOX4 aboutit majoritairement à la production de peroxyde d'hydrogène. L'absence de production de superoxyde par NOX4, peut s'expliquer par la rapidité de dismutation que subit l'ion superoxyde dans le réticulum endoplasmique.

Les travaux de Yong et coll. ont montré que NOX4 est impliquée dans la néphropathie diabétique. En effet, ils ont montré que NOX4 est impliquée dans l'augmentation du glucose induite par la production des ROS. Dans les leucémies, NOX4 jouerait un rôle important dans la transduction des signaux apoptotiques (McKallip et al. 2006). En outre une étude menée par Montezano et Touyz en 2014 montre que le rôle physiopathologique de NOX4 reste insaisissable et controversé. Bien que l'expression de NOX4 soit augmentée en cas d'hypertension, de diabète et d'obésité, certaines études montrent qu'une carence en NOX4 prédispose à l'obésité et la résistance à l'insuline. Ce qui a conduit à l'utilisation de certains inhibiteurs pour contrecarrer ces effets controversés comme le GKT137831 (GKT) qui inhibe NOX4 à faible dose (Montezano and Touyz 2014).

6.2.5 NOX5

NOX5 a été découverte simultanément par deux groupes en 2001 (Bánfi et al. 2001; Cheng et al. 2001). Le gène humain de la protéine est localisé sur le chromosome 15. L'existence de cinq isoformes de NOX5 a été rapportée (NOX5 α , NOX5 β , NOX5 ϵ , NOX5 γ et NOX5 δ) (Bánfi et al. 2001; Cheng et al. 2001). Présentant seulement 27% d'homologie avec le prototype NOX2, cette oxydase se distingue du groupe des NOX dites « classiques » par la présence, dans son extrémité N-terminale, de 4 motifs « EF-hands » qui permettent la fixation du calcium. La régulation de NOX5 est totalement différente de celle des autres NOX, puisque son activation nécessite le calcium et est indépendante de p22^{phox} ou des sous-unités cytosoliques (Kawahara, Kohjima, et al. 2005). NOX5 n'est pas exprimée chez la

souris ce qui rend difficile l'étude de la fonction de l'oxydase. Chez l'homme, son expression principale (ARN messagers) se situe dans les organes lymphatiques et les testicules où son rôle semble lié à la maturation des spermatozoïdes (Bánfi et al. 2001). Dans les cellules aortiques de muscle lisse, NOX5 joue un rôle important dans la transduction des signaux pro-proliférateurs stimulés par le PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*) (Jay et al. 2008). L'équipe de Doroshov a montré que NOX5 est impliquée dans les voies de signalisation physiologiques et physiopathologiques, y compris dans le développement du cancer et dans sa progression. Une surexpression de NOX5 a été observée dans plusieurs cancers humains, y compris ceux de la prostate, du sein, du côlon, du poumon, du cerveau, des ovaires, et aussi dans le mélanome malin et le lymphome non-hodgkinien. Dans la plupart des tissus non malins l'expression de NOX5 est faible (Antony et al. 2013).

6.2.6 Les DUOX1 et 2

Depuis la détection dans les cellules épithéliales thyroïdiennes d'une production de H₂O₂ stimuable par le calcium et le NADPH, de nombreuses équipes se sont attelées à la recherche d'une NADPH oxydase dans le système thyroïdien. Initialement baptisées thyroïde oxydase (Thox ou Tox), les DUOX ont été isolées dans les glandes du tractus gastro-intestinal et dans la glande thyroïde pour DUOX2 (Dupuy et al. 1999) et dans l'épithélium respiratoire et dans la thyroïde pour DUOX1 (Deken et al. 2000). Les gènes codants pour les deux DUOX sont localisés sur le chromosome 15 humain. Par rapport aux autres NOX, les DUOX sont N-glycosylées et ont la particularité de posséder un domaine transmembranaire supplémentaire à l'extrémité N-terminale et un domaine « *peroxydase-like* » dans la partie extra-membranaire du domaine N-terminal. Les DUOX possèdent également deux domaines EF-hand dans la partie intra-membranaire du domaine N-terminal. Les DUOX sont composées de 1 551 et 1 548 acides aminés respectivement pour DUOX1 et DUOX2 et présentent 83% d'homologie entre elles et seulement 47% d'homologie avec NOX2 (Donkó et al. 2005). La nature des ROS produits par les DUOX est très controversée, étant donné que les enzymes à domaine hème transportent uniquement un électron, les DUOX devraient produire uniquement des ions superoxydes et pas de H₂O₂ en fonction primaire. Cependant, de nombreuses études ont mis en évidence une production de H₂O₂ dans les thyrocytes (Dupuy et al. 1999; Leseney et al. 1999). Bien que toutes les deux soient dépendantes du calcium, l'activation des DUOX est différente de celle de NOX5. En effet, contrairement à cette dernière, pour laquelle les régions EF-hands, fixant le calcium, sont des domaines activateurs, les domaines EF-hands des DUOX serviraient de régions auto-inhibitrices démasquées par mise en contact avec le

calcium (Sumimoto 2008). Pour être fonctionnelles, les DUOX ont besoin de leurs facteurs de maturation, DUOXA1 et DUOXA2, qui permettent la maturation protéique, le transport et la localisation à la membrane plasmique (Grasberger and Refetoff 2006). Les DUOX sont majoritairement impliquées dans la synthèse des hormones thyroïdiennes mais aussi dans les mécanismes de défense au niveau des épithéliums (Bedard and Krause 2007).

6.3 Structure et composants des NADPH oxydases

Les NADPH oxydases sont des complexes multimériques, dissociés à l'état de repos, constitués de facteurs cytosoliques (p47^{phox}, NOXO1, p67^{phox}, NOXA1, p40^{phox}, Rac2 et Rap1A) et d'un cœur membranaire redox, les gp91^{phox} et p22^{phox}, qui sont les sous-unités bêta et alpha respectivement de ce que l'on appelle le cytochrome *b*₅₅₈ (Lambeth 2002; Dinauer et al. 1987). Nous allons voir maintenant les caractéristiques détaillées de chacun de ces composants maintenant.

6.3.1 Le cytochrome *b*₅₅₈ ou partie transmembranaire

L'appellation cytochrome *b*₅₅₈ fait référence à l'absorbance maximale de la sous-unité alpha du cytochrome qui a lieu à 558 nm (Cross, Parkinson, and Jones 1984). Il a aussi été appelé cytochrome *b*₂₄₅ en raison de son potentiel redox de - 245 mV (Jesaitis 1995). Le cytochrome est formé par l'assemblage de 2 sous-unités : une sous-unité bêta, glycosylée, de 91 kDa appelée gp91^{phox} ou NOX2 et une sous-unité alpha de 22 kDa baptisée p22^{phox} (Parkos et al. 1987). Leur rapport stœchiométrique est de 1:1 (Huang, Hitt, and Kleinberg 1995). Seulement 20% du cytochrome *b*₅₅₈ est localisé au niveau de la membrane plasmique, dans des micro-domaines enrichis en cholestérol (radeaux lipidiques ou rafts) (Shao, Segal, and Dekker 2003). La majeure partie du cytochrome *b*₅₅₈ est localisée dans des granules, qui fusionnent avec la membrane plasmique au niveau du site de phagocytose lors de la stimulation du processus inflammatoire (Borregaard et al. 1983).

6.3.1.1 La gp91^{phox}

Cette glycoprotéine de 570 acides aminés possède une masse moléculaire qui varie entre 65 kDa et 91 kDa, en raison des glycosylations hétérogènes (N-acétyl glucosamine et galactose en majorité) sur les résidus asparagine (Asn132, Asn149 et Asn240). L'oxydase est codée par le gène *cybb*, qui est situé sur le bras court du chromosome X (Xp21.1) (Royer-Pokora et al. 1986). Les 300 acides aminés du côté N-terminal forment six hélices alpha transmembranaires incluant deux hèmes (*via* deux paires d'histidine) de potentiel redox

respectifs de -225mV et -265 mV à $\text{pH } 7,0$ (Quinn, Mullen, and Jesaitis 1992). La partie C-terminale, constituée d'un domaine cytoplasmique homologue à la ferrédoxine-NADP⁺ réductase (FNR), englobe les domaines correspondant aux sites de fixation du NADPH et du FAD (Segal et al. 1992; Sumimoto et al. 1992). Certaines régions cytosoliques de la protéine gp91^{phox} sont également des sites potentiels de liaison avec les facteurs cytosoliques tels que p47^{phox} (Kleinberg et al. 1992; Park and Babior 1997). C'est donc la sous-unité NOX2 du cytochrome *b*₅₅₈ qui permet, par le biais du NADPH, du FAD et des deux hèmes, le transfert d'électrons aboutissant à la formation de l'ion superoxyde. La structure schématisée de gp91^{phox} est présentée dans la figure 29.

L'expression de NOX2 n'est pas restreinte au système phagocytaire. En effet, NOX2 a été détectée dans les neurones (Serrano et al. 2003), les cardiomyocytes (Heymes et al. 2003), les hépatocytes (Reinehr, Becker, Keitel, et al. 2005), les cellules endothéliales (Görlach et al. 2000; Li and Shah 2002) et les cellules souches hématopoïétiques (Piccoli et al. 2005). Cependant dans les cellules non phagocytaires le niveau d'expression de NOX2 est faible.

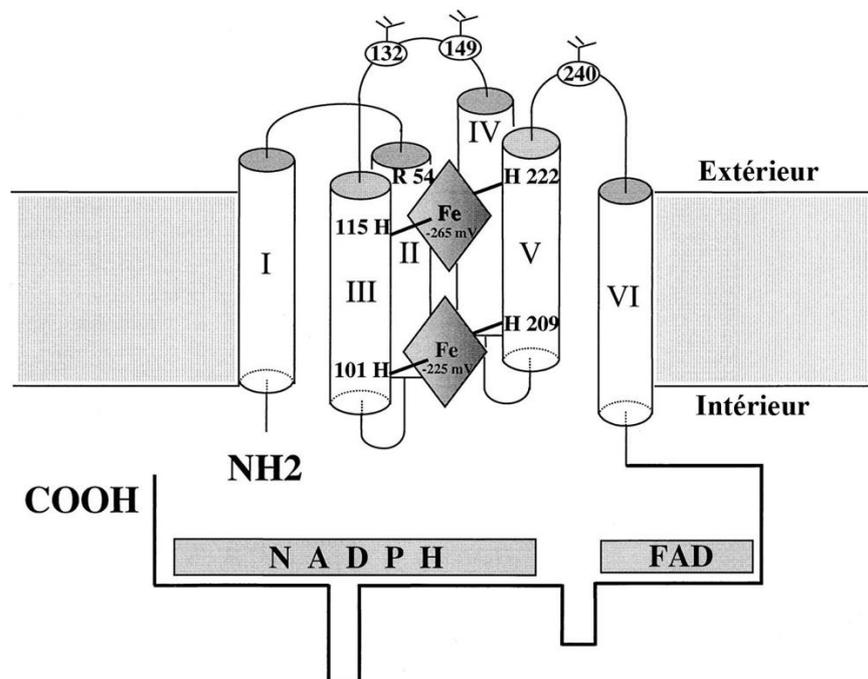


Figure 29 : Structure schématisée de la gp91^{phox}

Représentation schématisée des six hélices transmembranaires, les extrémités NH₂ et COOH sont indiquées. L'hème avec le potentiel RedOx de -265 mV se situe vers la face externe de la membrane et est associé avec les His115 et 222. Le deuxième hème avec le potentiel RedOx de -225 mV se situe vers la face interne de la membrane et est associé avec

les His101 et 209. L'acide aminé R54 de l'hélice II est lui aussi représenté car il peut interagir avec l'hème -265 mV. Les trois résidus Asp132, 149 et 240 sont indiqués comme ils sont des sites de glycosylation. La numérotation des acides aminés se fait à partir de la méthionine en N-terminal (Yu et al. 1998).

6.3.1.2 La p22^{phox}

Cette protéine membranaire de 22 kDa, non glycosylée, est constituée de 195 acides aminés. Elle est codée par le gène *cyba* localisé chez l'Homme sur le chromosome 16 (16q24) (Bedard and Krause 2007). En raison de l'absence de données cristallographiques, la topologie membranaire de p22^{phox} reste hypothétique. En effet, les modèles proposés, basés sur les profils d'hydrophobicité, ont prédit 2 (Leto, Adams, and de Mendez 1994), 3 (Groemping and Rittinger 2005) ou 4 (Dahan et al. 2002) domaines transmembranaires. Toutefois, diverses études ont appuyé l'hypothèse de deux domaines transmembranaires, avec les deux domaines C- et N-terminaux du côté cytoplasmique (Burritt et al. 1998; Imajoh-Ohmi et al. 1992; Taylor et al. 2004) (Figure 30). Sur le plan structural, la partie C-terminale de la protéine renferme une région riche en proline permettant à la protéine p22^{phox} d'interagir avec les motifs SH3 de la protéine cytosolique p47^{phox} lors de l'activation (Leto, Adams, and de Mendez 1994; Sumimoto et al. 1996). La structure schématique de cette protéine est présentée dans la figure 30. La protéine p22^{phox} constitue également un point d'ancrage du facteur cytosolique p67^{phox}. Cependant, l'affinité de p67^{phox} pour p22^{phox} est moins importante que celle de p47^{phox} (Dahan et al. 2002). L'association de p22^{phox} avec la sous-unité β du cytochrome *b₅₅₈* s'effectue, après la traduction et avant la glycosylation de la gp91^{phox} dans l'appareil de Golgi. Le rôle de p22^{phox} n'est pas encore bien défini, cependant il semblerait que les deux sous-unités qui forment le cytochrome *b₅₅₈* ne soient stables qu'en formant l'hétérodimère, puisque à l'état de monomère, les sous-unités sont dégradées par la machinerie du protéasome (DeLeo et al., 2000), ce qui est en accord avec les observations faites en clinique. En effet, les patients atteints d'une granulomatose septique chronique causée par la perte de la sous-unité NOX2, n'expriment pas p22^{phox} dans leurs phagocytes et vice-versa (Parkos et al. 1989).

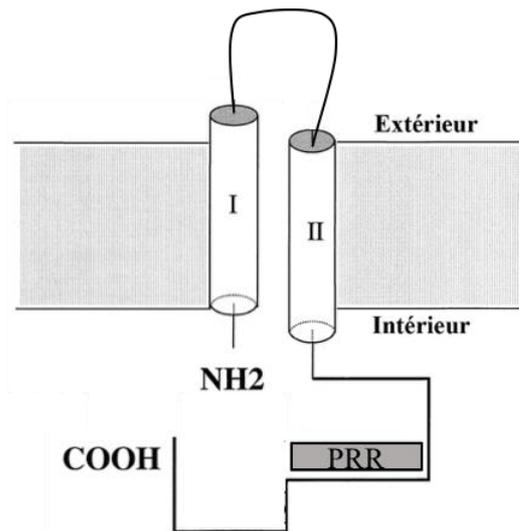


Figure 30 : Structure schématique de la p22^{phox}

Représentation schématique des six hélices transmembranaires, les extrémités NH₂ et COOH sont indiquées. La numérotation des acides aminés se fait à partir de la méthionine en N-terminale (Yu et al. 1998).

6.3.2 Les facteurs cytosoliques

6.3.2.1 p47^{phox}

Appelé aussi « organisateur » ou Ncf1 (*neutrophile cytosolic factor 1*), p47^{phox} est une protéine cytosolique de 390 acides aminés, codée par le gène *ncf1* qui est localisé sur le chromosome 7 (locus 7q11.23) (Lomax et al. 1989). La partie N-terminale contient un domaine PX (*Phox homology domain*) (résidus 4-128) qui permet d'interagir spécifiquement avec les phosphoinositides (Ellson et al. 2001; Kanai et al. 2001), un tandem SH3 (*Src homology domain 3*) (résidus 156-215 et 226-285) permettant d'interagir avec le domaine PRR de p22^{phox}, une région riche en résidus sérine (314-347) qui constituent des sites potentiels de phosphorylation et une région riche en proline dans le domaine C-terminal (PRR) (résidus 360-369), permettant l'interaction avec p67^{phox} (Takeya and Sumimoto 2003). Cette structure est représentée schématiquement dans la figure 31.

A l'état quiescent, les deux domaines SH3 de p47^{phox} sont masqués par une interaction intramoléculaire avec la région AIR (*Auto Inhibitory Region*), localisée au niveau de l'extrémité C-terminale (Ago et al. 1999; Groemping et al. 2003). En cas de phagocytose ou de stimulation par des activateurs tels que le phorbol myristate acétate (PMA), de nombreux résidus sérine (Ser₃₀₃, Ser₃₀₄, Ser₃₁₅, Ser₃₂₀, Ser₃₂₈, Ser₃₄₅, Ser₃₄₈, Ser₃₅₉, Ser₃₇₀ et Ser₃₇₉) se trouvant au niveau de la région AIR de p47^{phox} sont phosphorylés. Cette série de

phosphorylation entraîne, en coopération avec d'autres agonistes tels que l'acide arachidonique (Shiose and Sumimoto 2000), un changement de conformation de p47^{phox} qui se traduit par le démasquage du tandem SH3 permettant ainsi son interaction avec le domaine PRR de p22^{phox} (Ogura et al. 2006) (Figure 31).

Au vu de la structure « multi domaines » de p47^{phox}, il apparaît clairement que son rôle au niveau de l'activation du complexe NADPH oxydase est celui d'un organisateur. En effet, outre son interaction avérée avec les phosphoinositides, le domaine PX de p47^{phox} peut aussi interagir avec la moésine (protéine du cytosquelette). Cette interaction pourrait même être à l'origine de l'étape fondamentale du processus d'activation, caractérisé par la translocation à la membrane de p47^{phox} (Zhan et al. 2004). En fait, il semblerait que la fonction primaire de p47^{phox} soit restreinte à l'adressage de p67^{phox}, p40^{phox} et Rac2 à la membrane. En effet des observations cliniques ont rapporté un défaut de translocation de p67^{phox}, p40^{phox} et Rac2 dans les neutrophiles des patients atteints d'une granulomatose septique chronique liée à la déficience en p47^{phox} (Dusi, Donini, and Rossi 1996; Heyworth et al. 1991). Des études *in vitro* ont montré que, bien que pouvant augmenter la production d'ion superoxyde, p47^{phox} n'était pas indispensable à l'activation de la NADPH oxydase. Son absence peut être compensée par l'augmentation de la concentration protéique de p67^{phox} (Koshkin, Lotan, and Pick 1996). D'autres études, réalisées en milieu acellulaire, ont montré que p47^{phox} augmentait l'affinité de p67^{phox} pour le cytochrome *b*₅₅₈ (Dang et al. 2002). Il apparaît donc que p47^{phox} est une protéine adaptatrice nécessaire *in vivo* au bon positionnement des différents facteurs cytosoliques lors de leur translocation membranaire au cours de l'activation de l'enzyme (Figure 31).

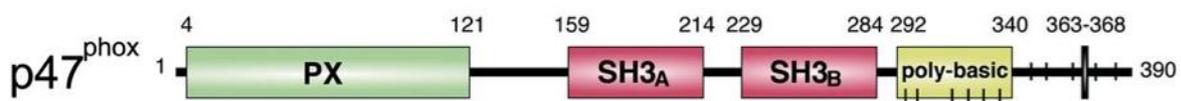


Figure 31 : Structure schématique de la p47^{phox}

Le domaine d'homologie phox (PX, a.a. 4-121), les deux domaines d'homologie à Src 3 (SH3A et B a.a. 159-214, a.a. 229-284 respectivement), le domaine poly-basique ou d'auto-inhibition (AIR a.a. 292-340) et le domaine riche en proline (PRR a.a. 363-368) sont représentés (Groemping and Rittinger 2005).

6.3.2.2 p67^{phox} :

Initialement identifié comme étant le facteur cytosolique manquant dans les neutrophiles de patients présentant une granulomatose septique chronique autosomale (Volpp, Nauseef, and Clark 1988), p67^{phox} (appelé aussi « activateur » ou Ncf2 pour *Neutrophil cytosolic factor 2*) est une protéine cytosolique non glycosylée de 526 acides aminés qui possède une masse moléculaire de 59,8 kDa (Groemping and Rittinger 2005). Le gène codant pour la protéine p67^{phox} a été localisé sur le chromosome 1 (locus 1q25). L'extrémité N-terminale est formée par un domaine à quatre motifs TPR (*tetratricopeptide repeat*) (Koga et al. 1999), un domaine PRR (*Prolin rich region*) et deux domaines SH3 (résidus 240-299 and 457-518), séparés par un domaine PB1 (*Phox and Bem1*) (résidus 338-428) et un domaine d'activation (AD) entre les résidus d'acides aminés 199-210 qui est requis pour l'activation de NOX2 (Han et al. 1998). La structure schématique est présentée dans la figure 32. La région N-terminale de p67^{phox}, caractérisée par le domaine à motifs TPR, est responsable de l'interaction entre p67^{phox} et Rac d'une manière GTP-dépendante (Diekmann et al. 1994). Outre sa capacité à fixer le NADPH, le motif TPR peut posséder une faible activité déshydrogénase (Dang, Babior, and Smith 1999). Le domaine PB1 de p67^{phox} est capable d'interagir avec le motif PC (Ito et al. 2001), notamment celui qui constitue le domaine PB1 au niveau de l'extrémité C-terminale de p40^{phox}, avec lequel il forme un hétérodimère (Kuribayashi et al. 2002). Comme p47^{phox}, cette protéine est phosphorylable au cours de l'activation de la NADPH oxydase, majoritairement sur le résidu Thr233 (Forbes, Moss, and Segal 1999) (Figure 32).

Contrairement à p47^{phox} dont la présence n'est pas nécessaire pour l'activation de la NADPH oxydase dans un milieu acellulaire (Koshkin, Lotan, and Pick 1996), p67^{phox} est indispensable à l'activation de l'oxydase *in vitro* (Vergnaud et al. 2000). Des études basées sur des formes tronquées de la protéine ont montré que seuls les 210 premiers acides aminés étaient indispensables (Nisimoto et al. 2004). De ce fait, la partie fonctionnelle de p67^{phox} correspondrait au fragment N-terminal. Cette hypothèse a été confirmée par les analyses cliniques qui ont révélé des mutations au niveau de cette région N-terminale dans la plupart des cas de granulomatose septique chronique liée à une déficience de p67^{phox} (Grizot et al. 2001).

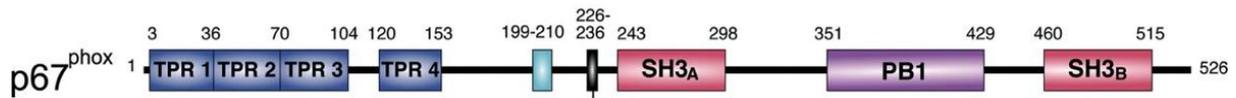


Figure 32 : Structure schématique de la p67^{phox}

Les quatre domaines tetratricopeptide repeat (TPR 1 à 4, a.a. 3-36, a.a. 37-70, a.a. 71-104 et a.a. 120-153), le domaine d'activation (AD, a.a. 199-210), le domaine riche en proline (a.a. 226-236), les deux domaines d'homologie à Src 3 (SH3A et B a.a. 243-298, a.a. 460-515 respectivement), et le domaine PB1 (AIR a.a. 351-429) sont représentés.

(Groemping and Rittinger 2005)

6.3.2.3 NOXO1

NOXO1 est le produit d'un gène situé sur le chromosome 16 donnant une protéine de 370 acides aminés avec un poids moléculaire apparent de 41 kDa. Il existe quatre variants de NOXO1 : α , β , δ et γ , issus d'épissages alternatifs de l'exon 3 codant pour le domaine PX (Cheng and Lambeth 2005). Même s'il présente uniquement 23% d'homologie de séquences en acides aminés avec p47^{phox}, la protéine NOXO1, appelée également p41^{nox}, présente une très forte homologie de domaines avec p47^{phox}. En effet, comme p47^{phox}, NOXO1 possède un domaine PX, un tandem SH3 et un motif PRR à l'extrémité C-terminale (Figure 33). Le domaine PX permet à NOXO1 de lier les lipides membranaires (Sato, Overduin, and Emr 2001); le tandem SH3 permet l'interaction avec p22^{phox} ; le motif PRR est nécessaire pour l'interaction avec NOXA1 (Takeya et al. 2003). Contrairement à p47^{phox}, NOXO1 ne possède pas de séquence AIR capable de masquer le tandem SH3, ce qui explique sa localisation continue à la membrane. Toutefois, une étude *in vitro* a mis en évidence une possible interaction entre le domaine Bis-SH3 et le motif PRR qui inhiberait la liaison de NOXO1 à ses protéines cibles, p22^{phox} et NOXA1 (Figure 33).

Il existe d'autres homologues de la protéine p47^{phox} et de NOXO1, les *tyrosine kinase substrate* ou Tks 4 et 5, qui peuvent être impliquées dans l'activation de NOX1 mais aussi de NOX3 (Gianni et al. 2009). Ces Tks sont, elles aussi, formées en N-terminal d'un domaine PX suivi d'un nombre variable de domaines SH3 (quatre pour Tks 4 et cinq pour Tks 5). Ces domaines SH3 vont leur permettre d'interagir avec la protéine NOXA1 *via* le domaine PRR (Gianni, DerMardirossian, and Bokoch 2011).

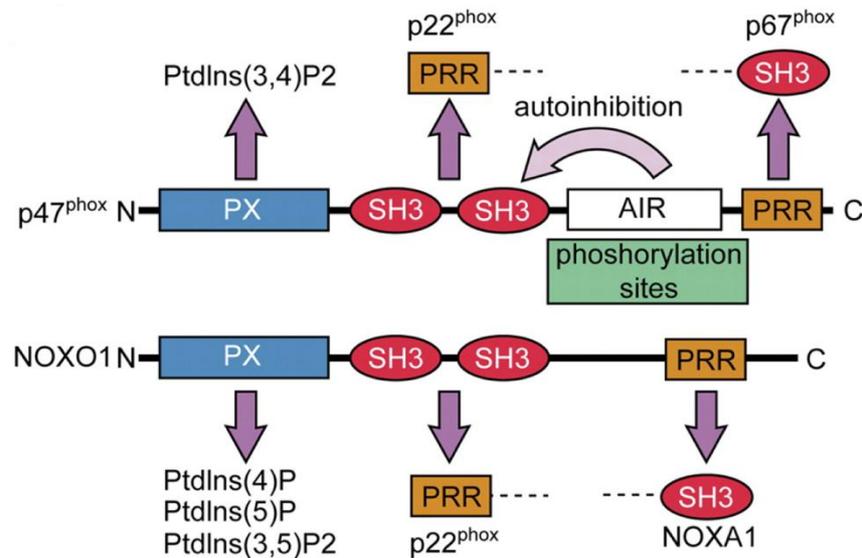


Figure 33 : Comparaison des structures schématiques de NOXO1 et de p47^{phox}

Représentation schématique des différents domaines structuraux de p47^{phox} et NOXO1. La seule différence majeure entre ces deux protéines est la perte du domaine d'auto-inhibition entre NOXO1 et p47^{phox} (Bedard and Krause 2007).

6.3.2.4 NOXA1

NOXA1, également appelée p51^{nox}, est le produit d'un gène se situant chez l'Homme sur le chromosome 9. Elle est formée de 476 acides aminés et a un poids moléculaire de 51 kDa (Takeya et al. 2003). Elle ne présente que 28% d'homologie de séquence en acides aminés avec son homologue p67^{phox}. Cependant, elle possède une architecture similaire au niveau des domaines structuraux. En effet, elle comprend quatre motifs TPR localisés dans la partie N-terminale et nécessaire à l'interaction avec Rac et un domaine d'activation (AD) dont le changement conformationnel lui permet de transférer les électrons (Figure 34). Par ailleurs, le domaine PB1, permettant à p67^{phox} d'interagir avec p40^{phox}, ne contient pas, chez NOXA1, la lysine 355 nécessaire à cette interaction (Takeya et al. 2003). NOXA1 ne possède qu'un seul domaine SH3 au contraire de la p67^{phox} qui en possède deux dans la partie C-terminale. Ce domaine, par analogie avec la p67^{phox}, serait impliqué dans l'interaction avec la région PRR de la sous-unité organisatrice (NOXO1 ou p47^{phox}).

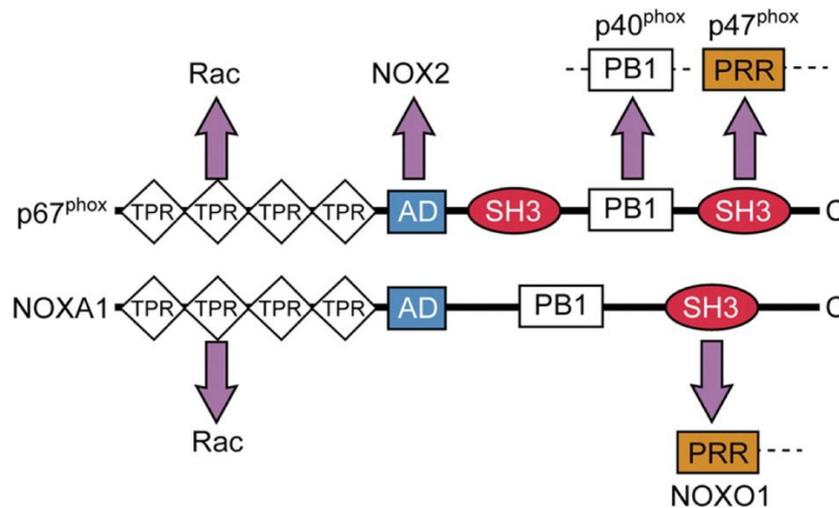


Figure 34 : Comparaison des structures schématiques de NOXA1 et de p67^{phox}

La seule différence majeure entre ces deux protéines est la perte d'un SH3 entre NOXA1 et p67^{phox} (Bedard and Krause 2007).

6.3.2.5 p40^{phox}

Le gène codant pour p40^{phox} est localisé sur le chromosome humain 22. Cette protéine cytosolique de 339 acides aminés, qui a une masse moléculaire de 39 kDa, est constituée de trois domaines fonctionnels : un domaine PX, un domaine SH3 et un domaine PB1 (dans le contexte de p40^{phox}, ce domaine a été initialement baptisé PC pour *Phox et cdc 24*) (Figure 35). p40^{phox} a été la dernière sous-unité du complexe NADPH oxydase à être identifiée par co-immunoprécipitation avec p67^{phox} et p47^{phox} (Someya, Nagaoka, and Yamashita 1993). p40^{phox} interagit avec p67^{phox} par le biais de son domaine PB1 localisé au niveau de l'extrémité C-terminale. Le domaine PX permet à p40^{phox} de fixer spécifiquement le phosphatidylinositol 3 phosphate accumulé au niveau des membranes des phagosomes, favorisant ainsi l'assemblage de l'oxydase à la membrane. Le domaine SH3 de p40^{phox} lui permettrait d'interagir avec la région riche en proline de p47^{phox} (PRR) (Fuchs, Dagher, and Vignais 1995; Grizot et al. 2001). Toutefois, cette interaction, dont la pertinence physiologique n'est pas avérée, serait moins probable que celle qui a lieu entre la région PRR de p47^{phox} et le domaine SH3 de p67^{phox}. Le rôle de p40^{phox} dans le processus d'activation de la NADPH oxydase est extrêmement discuté. Un rôle d'assistant a été suggéré par les travaux de Cross qui a montré, par une étude d'interaction dans un système acellulaire, que p40^{phox} augmentait l'affinité de p47^{phox} pour le cytochrome *b₅₅₈* (Cross 2000). D'autres travaux ont mis en évidence un rôle majeur de p40^{phox} dans la régulation de la translocation des facteurs

cytosoliques p47^{phox} et p67^{phox} (Kuribayashi et al. 2002). En revanche, Sathyamoorthy et ses collaborateurs ont montré *in vitro* que le domaine SH3 de p40^{phox} inhibait l'activité de l'oxydase en antagonisant p67^{phox} au niveau de la fixation du motif PRR de p47^{phox} (Sathyamoorthy et al. 1997) (Figure 35).

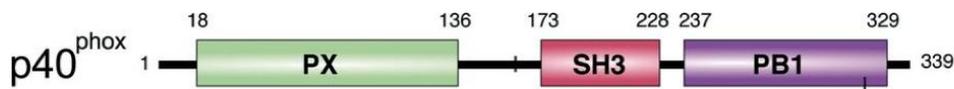


Figure 35 : Structure schématique de p40^{phox}

Le domaine d'homologie phox (PX a.a. 18-136), le domaine d'homologie à Src 3 (SH3 a.a. 173-228), et le domaine PB1 (AIR a.a. 237-329) sont représentés (Groemping and Rittinger 2005).

6.3.2.6 Rac1 & Rac2

Rac est une petite protéine G monomérique de 192 acides aminés, appartenant à la famille des RhoGTPases (Didsbury et al. 1989; Polakis et al. 1989). Outre son rôle majeur dans le contrôle de la migration cellulaire, cette protéine est indispensable à l'activation du complexe NADPH oxydase. D'ailleurs c'est dans ce système que Rac1 a été identifiée par Abo et ses collaborateurs (Abo et al. 1991). De même, Rac2 a été purifiée à partir du complexe NADPH oxydase (Knaus et al. 1991). Rac1 et Rac2 sont capables de migrer et d'interagir indépendamment des autres facteurs cytosoliques avec la membrane plasmique grâce à la géranylation de leur extrémité C-terminale. À l'état quiescent, la protéine Rac est cytosolique et complexée à une molécule inhibitrice, RhoGDI (*GDP Dissociation Inhibitor*), qui maintient Rac sous forme inactive (Pick, Gorzalczany, and Engel 1993). Lors du processus d'activation de la NADPH oxydase, et indépendamment des autres sous-unités du système NADPH oxydase, Rac se dissocie de son inhibiteur RhoGDI, migre à la membrane et interagit avec les motifs TPR de l'extrémité N-terminale de la protéine p67^{phox} (Heyworth et al. 1994; Koga et al. 1999). La présence de Rac (Rac 1 ou 2) est indispensable pour le fonctionnement de l'oxydase. Même si Rac2 est prédominant dans les neutrophiles, Rac1 peut complètement restaurer l'activité NADPH oxydase dans les cellules déficientes en Rac2 (Gu et al. 2001).

6.3.2.7 Rap1A

Rap1A est une petite protéine G qui appartient à la famille des protéines Ras. Cette

protéine a été découverte fortuitement lors de la purification du cytochrome *b₅₅₈* (Quinn et al. 1992). Le rôle de cette protéine dans la régulation de l'activité de la NADPH oxydase est très discuté (Gabig et al. 1995; Maly et al. 1994). Rap1A est phosphorylable sur son domaine C-terminal (résidu Ser₁₈₀), et se lie au cytochrome *b₅₅₈* avec une stœchiométrie de 1:1. Sa phosphorylation induit la rupture de l'interaction avec le cytochrome *b₅₅₈* et pourrait ainsi réguler la désactivation de la NADPH oxydase (Wang et al. 2014).

➤ *NOX1 étant exprimée dans le colon et surexprimée dans les cellules tumorales colorectales, nous nous sommes focalisés sur cette isoforme au cours de notre étude. Nous allons donc maintenant étudier les caractéristiques détaillées de cette NADPH oxydase.*

6.4 NOX1

6.4.1 Distribution

NOX1 est majoritairement exprimée dans l'épithélium colique, à la surface (Szanto et al., 2005) ou au fond des cryptes (Geiszt et al., 2003a). Il apparaît que l'expression de cette NADPH oxydase dans le colon suit le gradient de charge bactérienne intra-colique avec une expression, faible dans l'iléum, modérée dans le colon proximal et élevée dans le colon distal (Szanto et al., 2005). L'ARN messager de NOX1 a par ailleurs été détecté dans de nombreux types cellulaires et organes tels que les cellules vasculaires du muscle lisse (VSMC) (Lassegue et al., 2001), (Janiszewski et al., 2005), les cellules endothéliales (Ago et al., 2005; Kobayashi et al., 2004), l'utérus (Cheng et al., 2001), le placenta (Cui et al., 2006), la prostate (Banfi et al., 2000), les ostéoclastes (Lee et al., 2005) et la microglie (Cheret et al., 2008). Aucune expression n'a été détectée dans l'estomac humain. Toutefois, une étude a mis en évidence une expression de l'ARNm de NOX1 dans des adénocarcinomes gastriques (Tominaga et al., 2007). L'expression de NOX1 est avérée dans les cellules de la muqueuse gastrique du cobaye (Kawahara et al., 2001). Par ailleurs, l'expression de NOX1 a été détectée dans de nombreuses lignées cellulaires incluant les lignées issues d'adénocarcinome colique HT29 (Gianni et al., 2008) et Caco-2 (Perner et al., 2003), la lignée de cellules épithéliales bronchiques A549 (Goyal et al., 2004), la lignée de kératinocytes HaCat (Chamulitrat et al., 2004) et la lignée de carcinome épidermoïde de la vulve A431 (Morazzani et al., 2004). Outre son expression constitutive listée ci-dessus, l'expression du messager de

NOX1 peut être induit en réponse aux traitements par les facteurs de croissance. En effet, l'expression de l'ARNm de NOX1 peut être majorée, par l'angiotensine II *in vitro* et *in vivo* (Lassègue et al., 2001; Mollnau et al., 2002), par l'interféron γ dans les lignées de cancer colique T84 (Kuwano et al., 2006) et Caco-2 (Geiszt et al., 2003a), par les lipopolysaccharides (LPS) d'*Helicobacter pylori* dans les cellules de la muqueuse gastrique du cobaye (Teshima et al., 1999), par le PDGF dans les VSMC (Lee. M. Y. et al., 2009; Pescatore et al., 2012; Suh et al., 1999) et par le PGF2 α (*prostaglandin factor*) (Katsuyama et al., 2002) dans les cellules de muscle lisse aortique de rat A7r5 *via* la trans-activation du récepteur de l'EGF (Fan et al., 2005). Une augmentation de l'expression de l'ARNm de NOX1 a aussi été mise en évidence dans les cellules endothéliales sujettes au stress de cisaillement oscillatoire *via* l'augmentation de BMP4 (*Bone Morphogenic Protein 4*) (Sorescu et al., 2004) et dans les cellules de rein de rat NRK transduites par Ras (Mitsushita et al., 2004). La région 5' du gène de NOX1 contient des sites de fixation des transducteurs de signal et activateurs de la transcription STATs, du facteur de régulation de l'interféron IRF, de NF- κ B, d'AP-1 et des facteurs GATA (Bedard and Krause, 2007). Alors que l'augmentation de l'expression de NOX1 en réponse à la stimulation par l'interféron γ est initiée par la fixation du dimère de STAT1 sur la séquence γ -activable GAS (Kuwano et al., 2006), l'expression constitutive de NOX1 dans les cellules épithéliales intestinales est dépendante des séquences de fixation GATA, localisées 520 paires de bases en amont du site d'initiation de transcription (Brewer et al., 2006).

6.4.2 Régulation

L'activité constitutive de NOX1 suggérée par les travaux de Suh et de ses collaborateurs (Suh et al., 1999) a été rapidement contredite par plusieurs équipes qui n'ont pas réussi à détecter une production notable de superoxydes quand les cellules sont transduites uniquement par NOX1 (Bánfi et al., 2003; Grizot et al., 2001a). La découverte, dans le colon, d'homologues des sous-unités cytosoliques p47^{phox} et p67^{phox} baptisées respectivement NOXO1 (*NOX Organizer 1*) et NOXA1 (*NOX Activator 1*) a permis d'établir que l'activation de NOX1 est dépendante de son association avec ces sous-unités cytosoliques (Figure 36) (Bánfi et al., 2003; Geiszt et al., 2003b; Takeya et al., 2003b). L'activité constitutive peut donc être expliquée par le fait que, contrairement à son homologue p47^{phox} dont la translocation membranaire est dépendante de sa phosphorylation, NOXO1 est constamment localisée à la membrane (Sumimoto, 2008) (Figure 36).

Cependant l'association de ces sous-unités avec NOX1 est régulée par différentes phosphorylations qui peuvent aussi bien touchées les sous-unités que NOX1 elle-même.

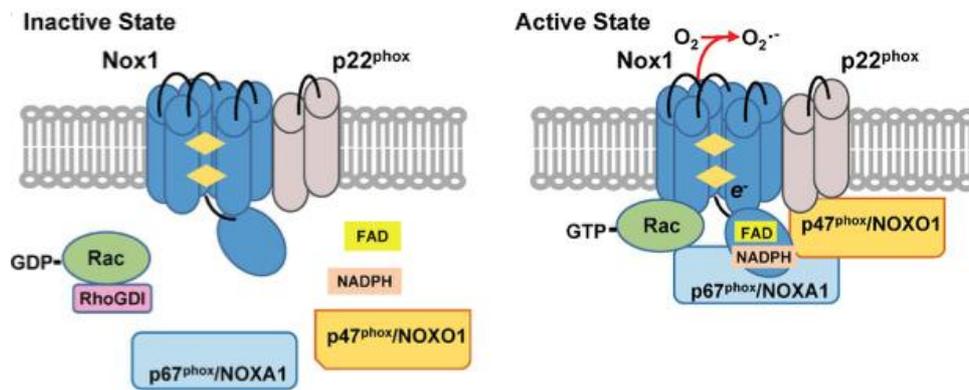


Figure 36 : Représentation schématique de l'activation de NOX1 (Gimenez et al. 2016)

6.4.2.1 Phosphorylations de NOXA1

Comme nous l'avons vu la phosphorylation de NOXA1 apparaît comme un processus important dans la modulation de l'activité du complexe NOX1. En effet il a été montré que différentes phosphorylations de NOXA1 modulent l'activité de NOX1. Les voies MAPK et les PKC et PKA phosphorylent NOXA1 sur les résidus Ser₂₈₂ et Ser₁₇₂ respectivement, régulant ainsi l'activité de NOX1 (Figure 37) (Kroviarski et al. 2010). Des scientifiques ont montré grâce à la mutagenèse dirigée et à l'utilisation d'anticorps dirigés contre les sites consensus de phosphorylation reconnus par la PKA, que cette kinase phosphorylait NOXA1 sur les sérines 172 et 461 aussi bien *in vitro* que dans les cellules HEK293 (Kim et al. 2007). Cette étude a montré que cette phosphorylation induit l'interaction de NOXA1 avec la protéine 14-3-3 ce qui maintient NOXA1 dans le cytosol, empêchant ainsi la formation du complexe NOX1 et donc son activation. À l'inverse la phosphorylation de NOXA1 sur la tyrosine 110 par les kinases de la famille Src peut potentialiser l'activité de NOX1 en permettant son interaction avec la Tks4 (sous sa forme phosphorylée) dans la lignée épithéliale DLD1 du colon ce qui contribue à la formation des invadopodes (Gianni et al. 2010) (Figure 37).

Des souris homozygotes invalidées pour le gène NOXA1 ont été récemment générées, cependant le phénotype de ces souris ainsi que la fonction de NOXA1 dans chaque tissu n'ont

pas encore été déterminés (Flaherty et al. 2010).

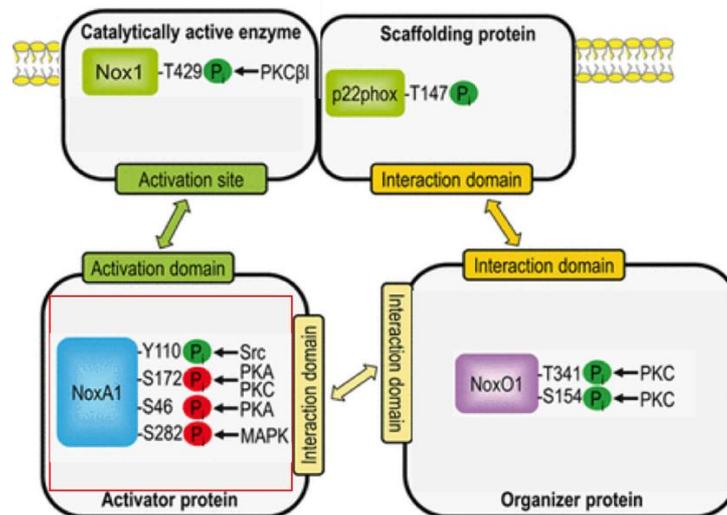


Figure 37 : Phosphorylations de NOX1, de NOXA1, de NOXO1 et de p22^{phox}

Les P_i en vert indiquent les phosphorylations activatrices, les P_i en rouge les phosphorylations inhibitrices (Brandes and Schröder 2014).

6.4.2.2 Phosphorylation de NOX1

Plusieurs études montrent que NOX1 peut être directement phosphorylée ce qui conduit à un meilleur assemblage du complexe donc à une plus grande activité. Cette phosphorylation est présentée dans la figure 37. NOX1 est phosphorylée sur la tyrosine 429 par la PKC-β1 ce qui conduit à une augmentation de son activité. Cette phosphorylation a été observée en réponse au TNF-α pour faciliter l'association NOX1/NOXA1 et ainsi conduire à la migration des cellules vasculaire des muscles lisses (Streeter et al. 2014) (Figure 37).

6.4.2.3 Phosphorylations de NOXO1

NOXO1 ayant une conformation ouverte et une localisation constitutive à la membrane (Geiszt, Lekstrom, Witta, et al. 2003b; Takeya and Sumimoto 2003), il était communément admis qu'une phosphorylation de NOXO1 n'était pas nécessaire pour activer NOX1. Cependant, il a été montré récemment que le PMA induit une phosphorylation de NOXO1 sur la sérine 154 dans des cellules HEK293 exprimant le système humain NOX1/NOXO1/NOXA1 (Figure 37). Cette phosphorylation augmente la production des ROS produits par NOX1 en renforçant la liaison de NOXO1 à p22^{phox} et à NOXA1 (Debbabi et al. 2013). Un autre groupe a confirmé l'implication de la phosphorylation des résidus Ser₁₅₄ et Thr₃₄₁ de NOXO1 dans l'activation du système NOX1/NOXO1/NOXA1 reconstruit dans des

cellules CHO traitées au PMA (Yamamoto et al. 2013). Ces résultats confirment les observations précédentes montrant une stimulation de la production de superoxydes par le PMA dans des cellules transduites par le système humain NOX1/NOXO1/NOXA1 (Geiszt, Lekstrom, Witta, et al. 2003a; Takeya et al. 2003). Toutefois il est à noter que la transduction des cellules par le système murin NOX1/NOXO1/NOXA1 entraîne une forte activation constitutive de la production de superoxydes, insensible à l'ajout de PMA (Bánfi et al. 2003) (Figure 37).

6.4.2.4 Dégradation de NOXO1

La dégradation de NOXO1 est la dernière régulation du complexe NOX1 mise en évidence. Il a en effet été montré que la phosphorylation de NOXO1 ne permet pas uniquement la formation du complexe avec NOXA1 et la production de ROS, elle bloque aussi l'ubiquitination de NOXO1 et donc sa dégradation (Figure 38). L'ubiquitination de NOXO1 permet la liaison des protéines Grb2 et Cbl et donc la dégradation par le protéasome (Joo et al. 2016). La liaison de NOXO1 à NOXA1 empêche cette protéolyse.

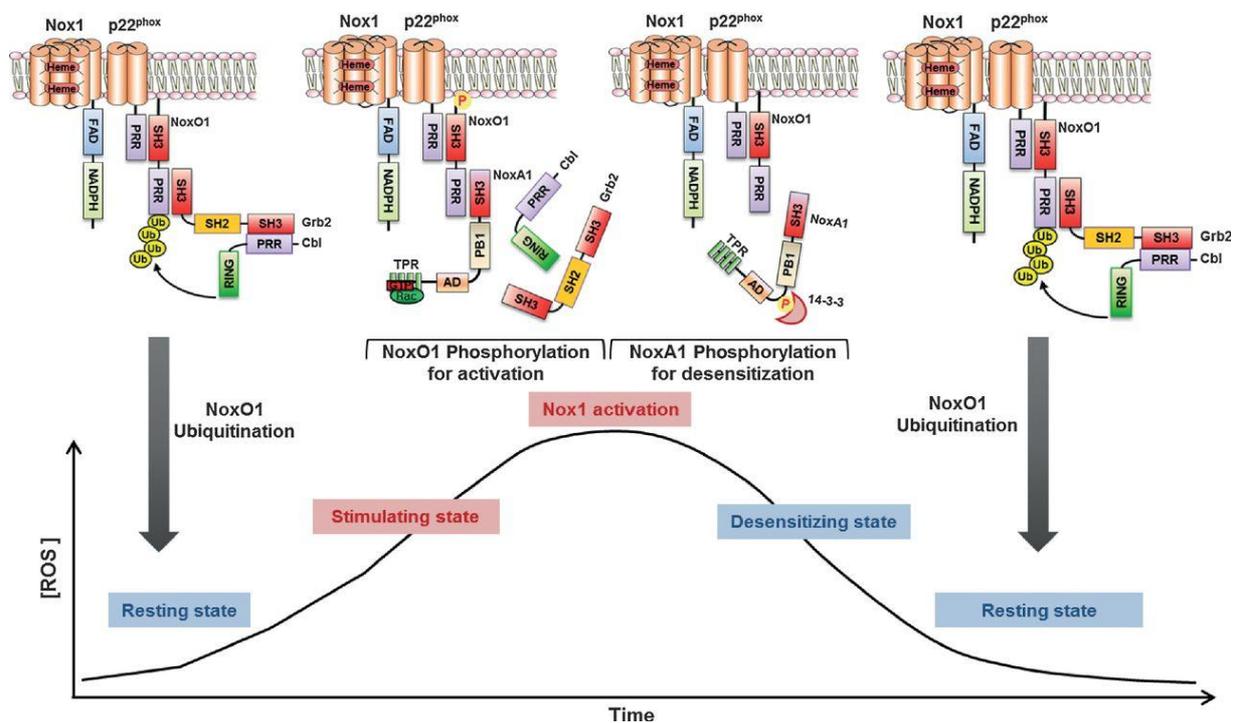


Figure 38 : Implication de la dégradation de NOXO1 dans la régulation de la production de ROS (Joo et al. 2016)

6.4.2.5 Régulation par les autres facteurs cytosoliques

La régulation de NOX1 n'est pas exclusivement dépendante du système NOXO1/NOXA1 (Sumimoto, Miyano, and Takeya 2005). En effet une production de superoxydes dépendante de NOX1 a été détectée dans des cellules transduites par le système NOX1/p47^{phox}/p67^{phox} (Bánfi et al. 2003). De plus, une étude a démontré dans des cellules endothéliales vasculaires murines que la délétion de p47^{phox} entraîne une inhibition de la production de superoxydes dépendante de NOX1 (Sorescu et al. 2004). Il est maintenant clair que différentes combinaisons de sous-unités cytosoliques peuvent induire l'activation de NOX1. Ainsi, les systèmes p47^{phox}/NOXA1 ou NOXO1/p67^{phox} sont capables d'activer la production de superoxydes par NOX1. Cependant cette activation est plus faible que celle détectée après transduction par le système NOXO1/NOXA1 (Geiszt, Lekstrom, Witta, et al. 2003a). La même étude a montré que NOX2 peut être activée par le système p47^{phox}/NOXA1 et dans une moindre mesure par le système NOXO1/p67^{phox}. Outre la nécessité de l'interaction avec les sous unités cytosoliques, l'activation de NOX1 est conditionnée à la fois, par la présence de p22^{phox} et de Rac (Ambasta et al. 2004; Kawahara, Ritsick, et al. 2005; Takeya et al. 2003).

6.4.3 Rôles physiologiques et pathologiques de NOX1 dans le colon

C'est dans le colon que les composants du complexe NOX1 sont le plus largement exprimés, suggérant que cette NADPH oxydase a des rôles importants à jouer dans cet organe. Bien que les rôles précis de NOX1 ne soient pas encore clairement établis, deux fonctions importantes sont proposées : l'immunité innée et la prolifération cellulaire.

6.4.3.1 Immunité innée

Il a été observé une corrélation entre le niveau d'expression de NOX1 et de la densité de la flore bactérienne, l'expression étant la plus élevée dans les zones où la flore est la plus abondante (Geiszt, Lekstrom, Brenner, et al. 2003; Glebov et al. 2003; Szanto et al. 2005). Il a également été montré que certaines sous-unités du complexe NOX1 peuvent être modulées par les cytokines pro- et anti-inflammatoires. Les cytokines pro-inflammatoires IFN γ , IL-1 β et TNF α augmentent l'ARN messager et donc l'expression de NOX1 dans les cellules coliques T84. L'IFN γ et le TNF α peuvent conduire à une augmentation d'expression de NOXO1 dans cette même lignée. Ces augmentations entraînent une augmentation corrélée de la production de ROS (Kuwano et al. 2006; Kuwano et al. 2008; Kamizato et al. 2009). De plus, il a été observé une forte augmentation de l'ARN messager de NOX1 dans les lymphocytes, au

niveau des lésions inflammatoires du colon de patients atteints de la maladie de Crohn. La maladie de Crohn est généralement associée à une surproduction d'IFN γ et de TNF α (Bouma and Strober 2003).

La cytokine anti-inflammatoire IL-10 permet une régulation de l'augmentation d'expression de NOX1 et de NOXO1, et donc la production de ROS, induite par les cytokines pro-inflammatoires dans les cellules T84. Chez la souris, l'expression de NOX1 liée au vieillissement est inhibée par cette cytokine (Kamizato et al. 2009). À l'inverse, la cytokine anti-inflammatoire IL-13 active NOX1 dans la lignée tumorale colorectale HT-29 (Mandal, Fu, and Levine 2010).

Les motifs moléculaires associés aux pathogènes (ou PAMPs) peuvent réguler l'expression de NOX1. Il a été ainsi montré que la flagelline de *S. enteritidis* induit une augmentation de l'expression et de l'activité de NOX1 via le TLR5 dans des cellules T84 (Kawahara et al. 2004). Les LPS des bactéries *H. pylori* et *E. coli* augmentent la transcription de NOX1 et de NOXO1, ainsi que la production de ROS dans la muqueuse gastrique du cochon d'inde (Teshima, Tsunawaki, and Rokutan 1999; Kawahara, Teshima, et al. 2001; Kawahara, Kuwano, et al. 2001).

6.4.3.2 Prolifération cellulaire

La transfection de NOX1 dans les NIH3T3 augmente de façon significative la prolifération, et entraîne des changements de phénotype avec une élongation des cellules et une perte de l'inhibition de contact ce qui entraîne la formation de tumeurs dans des souris athymiques *nude* (Suh et al. 1999; Arnold et al. 2001). La présence de la mutation V12 activatrice du proto-oncogène K-Ras dans ces cellules serait en fait responsable de cette transformation, mettant en cause le rôle prolifératif de NOX1 (Lambeth 2004). Cependant, il a été montré que l'oncogène k-Ras entraîne l'augmentation de l'expression de NOX1 et que le blocage de cette augmentation supprime la prolifération cellulaire et la transformation (Mitsushita, Lambeth, and Kamata 2004)

Il a été aussi montré en utilisant des HT-29 et des Caco-2 que la production de ROS était différente lorsque les cellules étaient sub-confluentes ou confluentes. Les cellules sub-confluentes, caractérisées par une prolifération plus élevée, possèdent une production de ROS augmentée comparée aux cellules confluentes. La prolifération de la lignée HT29-D4 est contrôlée par la voie phospholipase-A2/12-lipoxygénase/NOX1. En effet l'utilisation d'inhibiteurs sélectifs entraîne une diminution de la prolifération (de Carvalho et al. 2008)

Cependant, il a été observé que dans des tumeurs du colon bien différenciées, l'expression de NOX1 est plus élevée que dans les tumeurs peu différenciées, cette surexpression corrèle négativement avec le marqueur de prolifération Ki67 (Fukuyama et al. 2005). Ainsi l'augmentation d'expression de NOX1 ne serait pas forcément corrélée avec la prolifération, même si NOX1 est surexprimée dans les cellules tumorales. Cette surexpression pourrait être expliquée par les mutations activatrices du proto-oncogène k-Ras (Mitsushita, Lambeth, and Kamata 2004).

En plus de son potentiel effet sur la prolifération cellulaire, la surexpression de NOX1 pourrait être impliquée dans le développement du processus cancéreux via d'autres mécanismes : l'angiogenèse *via* l'activation du facteur de transcription Sp1 qui permet l'expression de VEGF (Komatsu et al. 2008), l'inhibition de l'apoptose par l'activation de la voie NF- κ B (Fukuyama et al. 2005), la migration grâce au turnover des intégrines (Sadok et al. 2008) et l'inflammation chronique provoquée par une production de ROS soutenue et prolongée qui provoque des dommages au niveau de l'ADN contribuant à la carcinogénèse (Meira et al. 2008).

Chapitre 4

Les calpaïnes

1 Généralités

1.1 Histoire des calpaïnes

L'histoire des calpaïnes débute en 1964 par la découverte de cystéine-protéases activées par le calcium à pH neutre (Guroff 1964). Ces enzymes ont été nommées CANP pour *calcium-activated neutral proteases*. Ce système protéolytique, complexe, a nécessité de nombreuses études (Goll et al. 2003). Ces protéases se trouvaient être bien différentes des cathepsines, puisque leur activité est de type papaine et dépendante du calcium, qu'elles sont non lysosomales et qu'elles nécessitent un pH neutre. Ces protéases étant différentes de celles connues à l'époque, un nouveau nom a été créé : calpaïne, par contraction de calcium et papaine.

Les calpaïnes identifiées par Guroff en 1964 dans le système nerveux central des rats furent baptisées calpaïnes 1 et 2 (en fonction de leur ordre d'éluion lors de la purification). Puis de nombreuses calpaïnes ont été découvertes ou reclassées. Ainsi une nouvelle calpaïne est identifiée en 1989 dans les muscles, baptisée dans un premier temps nCL-1 elle fut reclassée et rebaptisée calpaïne 3. En 1997, deux nouvelles calpaïnes sont découvertes, il s'agit des calpaïnes 5 et 6. En 2000, des protéases sont reclassées et ajoutées à la famille des calpaïnes : palBX, nCL-2 et nCL-4 deviennent respectivement les calpaïnes 7, 8 et 9. Sont ensuite découvertes les calpaïnes 10 à 12, puis 13 et 14 en 2001. Une quinzaine calpaïne, homologue à la protéase SolH de la drosophile a ensuite été découverte, puis récemment une seizième appelée calpaïne 16 ou demi-calpaïne.

Toutes ces découvertes portent le nombre de calpaïnes à quinze avec deux sous-unités régulatrices. La première sous-unité régulatrice a été identifiée en 1964 comme la calpaïne 4. L'absence d'activité protéolytique de cette sous-unité et la découverte en 2002 d'une seconde sous-unité régulatrice a changé la nomenclature, la calpaïne 4 perdant son nom de calpaïne et devant C_{ss}1 (pour *calpain small subunit*), la deuxième sous-unité régulatrice étant C_{ss}2.

2 Classification & nomenclature des calpaïnes

La nomenclature actuelle, et donc le regroupement de toutes ces protéases sous le terme « calpaïne », a été mise en place en 2001 lors de la *FASEB Summer Research Conference*. Elle distingue donc 15 calpaïnes, de la calpaïne 1 à la calpaïne 16, codées par les gènes *capn1* à *capn16* (Tableau 9). Les sous-unités régulatrices capables de s'hétérodimériser avec les calpaïnes 1 et 2 sont appelées C_{ss}1 (ancienne calpaïne 4) et C_{ss}2.

Calpaïne	Gène	Autres noms	Tissus	Chromosome
Calpaïne 1	<i>capn1</i>	μ-calpaïne, CAPN1	ubiquitaire	11q13
Calpaïne 2	<i>capn2</i>	m-calpaïne, CAPN2	ubiquitaire	1q41
Calpaïne 3	<i>capn3</i>	nCL-1, p94	muscle squelettique, lentille, rétine	15q15.1
Calpaïne 5	<i>capn5</i>	Htra3, nCL-3	ubiquitaire	11q14
Calpaïne 6	<i>capn6</i>	CAPNX, calpamodulin	placenta	Xq28
Calpaïne 7	<i>capn7</i>	palBH	ubiquitaire	3p24-p25
Calpaïne 8	<i>capn8</i>	n-CL-2	Muqueuse stomacale	1q41
Calpaïne 9	<i>capn9</i>	n-CL-4	Appareil digestif	1q42
Calpaïne 10	<i>capn10</i>	CAPN10, CAPN8	ubiquitaire	2q37.3
Calpaïne 11	<i>capn11</i>	CAPN11	testicules	6p12
Calpaïne 12	<i>capn12</i>	CAPN12	ubiquitaire	19q13.2
Calpaïne 13	<i>capn13</i>	CAPN13	testicules, poumons	2p21-22
Calpaïne 14	<i>capn14</i>	CAPN14	ubiquitaire	2p23.1
Calpaïne 15	<i>capn15</i>	SolH	ubiquitaire	16p13.3
Calpaïne 16	<i>capn16</i>	demi-calpaïne	?	6q24.2-25.2
C_{ss}1	<i>Capn-s1</i> ou <i>cpns1</i>	CAPN4	ubiquitaire	19q13.1
C_{ss}2	<i>Capn-s2</i> ou <i>cpns2</i>		ubiquitaire	16q12.2

Tableau 9 : Tableau représentant les différentes calpaïnes et les deux sous-unités régulatrices

Le nombre important de calpaïnes et leurs caractéristiques très variables ont fait apparaître un besoin de classification. Il en existe deux différentes. La première permet de classer les calpaïnes en deux groupes distincts en se basant sur la présence ou l'absence de domaine « calmodulin-like ». Ce domaine comporte les EF-hands, structures capables de lier le calcium (décrit en 1972 par Kretsinger). Les calpaïnes possédant ces structures sont dites 'conventionnelles' ou 'typiques'. Au contraire, les calpaïnes dépourvues de ces structures sont dites 'atypiques'. Le classement est le suivant :

- Calpaïnes typiques : calpaïnes 1, 2, 3, 8, 9, 11, 12 et 13
- Calpaïnes atypiques : calpaïnes 5, 6, 7, 10, 14, 15 et 16

La deuxième classification est basée sur la localisation de ces enzymes. Les calpaïnes présentes dans toutes les cellules de l'organisme, quel que soit le tissu, sont dites ubiquitaires, au contraire de certaines calpaïnes exprimées uniquement dans certains tissus dites tissu-spécifiques. Elles sont alors classées ainsi :

- Calpaïnes ubiquitaires : calpaïnes 1, 2, 5, 7, 10, 12, 14 et 15
- Calpaïnes tissu-spécifiques : calpaïnes 3, 6, 8, 9, 11 et 13

3 La famille des calpaïnes

3.1 Les calpaïnes ubiquitaires

Comme nous l'avons vu précédemment, les calpaïnes 1 et 2 ont été découvertes en 1964 par Guroff (Guroff 1964) avec leur sous-unité catalytique C_{ss}1. Ces deux calpaïnes sont les calpaïnes les plus étudiées ces trente dernières années avec plus de huit mille publications dans Pubmed. Le gène *capn1* se trouve sur le chromosome 11 tandis que le gène *capn2* se trouve sur le chromosome 1. Il n'y a pas d'épissage alternatif.

La calpaïne 5 est une calpaïne atypique. Bien qu'ubiquitaire, cette isoforme est particulièrement exprimée dans les poumons, les reins, le système nerveux central, le thymus et les testicules (Franz et al. 2004; Waghray et al. 2004). Le gène *capn5* se trouve sur le chromosome 11.

La calpaïne 7 qui est également une calpaïne atypique. Elle possède une particularité en position C-terminale, un domaine supplémentaire qui fait qu'elle ne possède que 30% d'homologie avec les autres membres de la famille (Franz et al. 1999).

La calpaïne 10, atypique elle-aussi, possède 8 isoformes résultant de l'épissage alternatif du gène *capn10* (calpaïne 10a à 10h). La calpaïne 10a est la plus exprimée notamment dans le foie, le cœur, le cerveau, le placenta, les poumons, les muscles squelettiques, le rein, le pancréas et la rétine (Ma et al. 2001; Horikawa et al. 2000). La calpaïne 10 est impliquée dans la sécrétion et l'action de l'insuline mais aussi la production hépatique du glucose. Elle est donc impliquée dans le diabète de type II (Horikawa et al. 2000; Hou, Li, and Cao 2017) mais aussi dans le risque d'obésité par ses divers SNP (Yu et al. 2016) ce qui fait qu'elle fait l'objet de nombreuses études récemment.

La calpaïne 12 est une calpaïne typique. L'épissage alternatif de son gène de 21 exons conduirait à l'expression de trois isoformes différentes (Dear et al. 2000). Elle est impliquée dans divers problèmes de peau congénitaux tel que l'ichthyose (Bochner et al. 2017), mais aussi dans la chimio-protection du médulloblastome (Waye et al. 2015).

La calpaïne 14 est une calpaïne typique. Elle est codé par le gène *capn14*, situé sur le chromosome 2, très proche du gène codant pour la calpaïne 13 (Dear and Boehm 2001). Elle est impliquée notamment dans l'œsophagite éosinophile (Oyoshi 2015).

La calpaïne 15 est une calpaïne atypique. Son gène *capn15*, constitué de 14 exons, est situé sur le chromosome 16. Son polymorphisme serait associé à la cryptorchidie de rat (Barthold et al. 2016). Elle serait également impliquée dans la cataracte héréditaire (Kamei et al. 1998).

3.2 Les calpaïnes tissu-spécifiques

La calpaïne 3 est la plus étudiée de ces calpaïnes. Sa découverte par Sorimachi et ses collaborateurs date de 1989. Elle est principalement exprimée dans les muscles squelettiques humains et de rat (Sorimachi et al. 1989). Cependant ses ARNm ont été détectés au niveau de la langue, des yeux et du cerveau (König et al. 2003). Cette calpaïne est connue pour être impliquée dans une forme de dystrophie musculaire (LGMD2A, *limb girdle muscular dystrophy type 2A*) (Richard and Beckmann 1996) ce qui a conduit à de nombreuses études. Ces études ont permis d'observer dans le gène *capn3* plus de 100 mutations impliquées dans cette pathologie (Ono et al. 2016).

La calpaïne 6 a été décrite en 1997 par Dear et ses collaborateurs. Cette calpaïne est unique puisqu'elle possède un site catalytique différent de celui des autres calpaïnes. La calpaïne 6 est exprimée au cours de la grossesse, principalement dans le placenta, mais aussi dans les muscles, les poumons et les reins de l'embryon (Dear and Boehm 1999:5).

Cependant elle est surexprimée dans certains cas de cancer de l'utérus (Skubitz and Skubitz 2003b; Skubitz and Skubitz 2003a), dans les sarcomes stromaux et les carcino-sarcomes des cancers utérins (Lee et al. 2007), dans les carcinomes cervicaux utérins (Lee et al. 2008), mais aussi dans certains ostéosarcomes (Marion et al. 2012). Sa fonction tout comme son activité protéasique restent peu claires mais elle pourrait jouer le rôle de chaperonne pour les microtubules (Tonami et al. 2007) et participer avec la Rho guanine-nucleotide-exchange-factor et le GEF-H1, au crosstalk entre les microtubules et l'actine (Tonami et al. 2011).

Les calpaïnes 8 et 9 ont été respectivement découvertes en 1993 par Sorimachi et ses collaborateurs et en 1998 par Lee et ses collaborateurs. Ces deux calpaïnes sont dites typiques.

Elles sont spécifiques du tractus digestif, la calpaïne 8 étant cependant plus précisément exprimée au niveau des muqueuses stomacales. Leurs fonctions physiologiques sont mal connues. Des études ont montré que la calpaïne 9 est généralement sous exprimée dans certains cancers digestifs (Lee et al. 1998), elle aurait même un rôle de surpresseur de tumeur (Vaish and Sanyal 2012).

Les calpaïnes 11 et 13 ont été découvertes en 1999 et 2001 respectivement, elles sont aussi typiques et atypiques respectivement. Elles sont toutes les deux exprimées dans les testicules mais la calpaïne 13 a également été détectées dans les tissus pulmonaires.

4 Structure des calpaïnes

Les calpaïnes ont été très bien conservées dans l'évolution, des bactéries jusqu'aux mammifères. Le site actif de ces cystéine-protéases est composé d'une triade d'acide aminés : une cystéine, une histidine et une asparagine. Cette triade catalytique est très bien conservée dans toutes les calpaïnes, à part la calpaïne 6 où la cystéine est remplacée par une lysine.

La structure des différentes calpaïnes est schématisée dans la figure 39. Comme nous pouvons le voir toutes les calpaïnes possèdent deux domaines catalytiques où est située la triade catalytique : un domaine PC1 qui porte la cystéine, et un domaine PC2 qui porte l'histidine et l'asparagine. Seule la calpaïne 16 diffère puisqu'elle ne possède que le domaine PC1 ce qui lui vaut le nom de « demi-calpaïne ». À part les calpaïnes 15 et 16, toutes les calpaïnes possèdent ensuite un ou deux domaines C2-like (C2L). Les calpaïnes typiques possèdent en plus des EF-hands (PEF) pour fixer le calcium.

Il est à noter qu'il existe des particularités : la calpaïne 3 possède des domaines d'insertion appelés NS, IS1 et IS2, la calpaïne 7 possède un domaine MIT pour fixer les

microtubules, la calpaïne 15 possède un domaine en doigt de zinc (Zn) et un domaine SolH et la calpaïne 16 possède un domaine d'interaction avec la calmoduline (IQ).

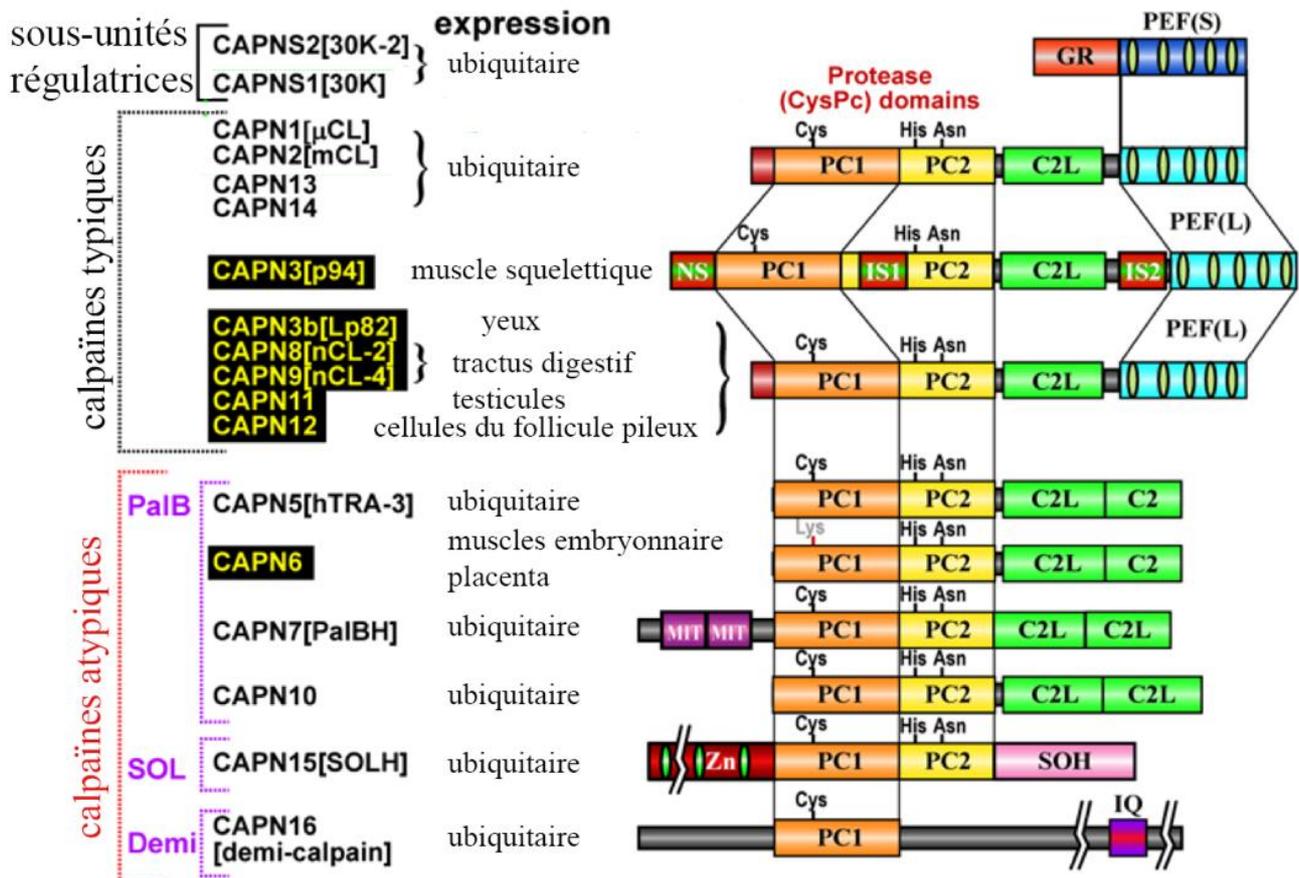


Figure 39 : Structures schématiques des différentes calpaines

- Dans notre étude nous nous sommes principalement intéressés aux calpaines ubiquitaires 1 et 2, nous allons donc maintenant nous focaliser uniquement sur ces deux enzymes.

4.1 Les calpaines 1 & 2

Les calpaines 1 et 2 s'associent généralement avec l'une des deux sous-unités régulatrices pour former des hétérodimères structurellement très proches. L'hétérodimère formé par la calpaïne 1 est appelé micro-calpaïne ou μ -calpaïne et celui formé par la calpaïne 2 milli-calpaïne ou m-calpaïne.

Les calpaïnes 1 et 2 sont composées respectivement de 714 et 699 acides aminés portant ainsi leur poids moléculaire à environ 80 kDa (81 889 Da pour la calpaïne 1 et de 79 900 Da pour la calpaïne 2) (Aoki et al. 1986; Imajoh et al. 1988). Comme nous le montre la figure 40, elles sont toutes les deux composées de quatre domaines différents.

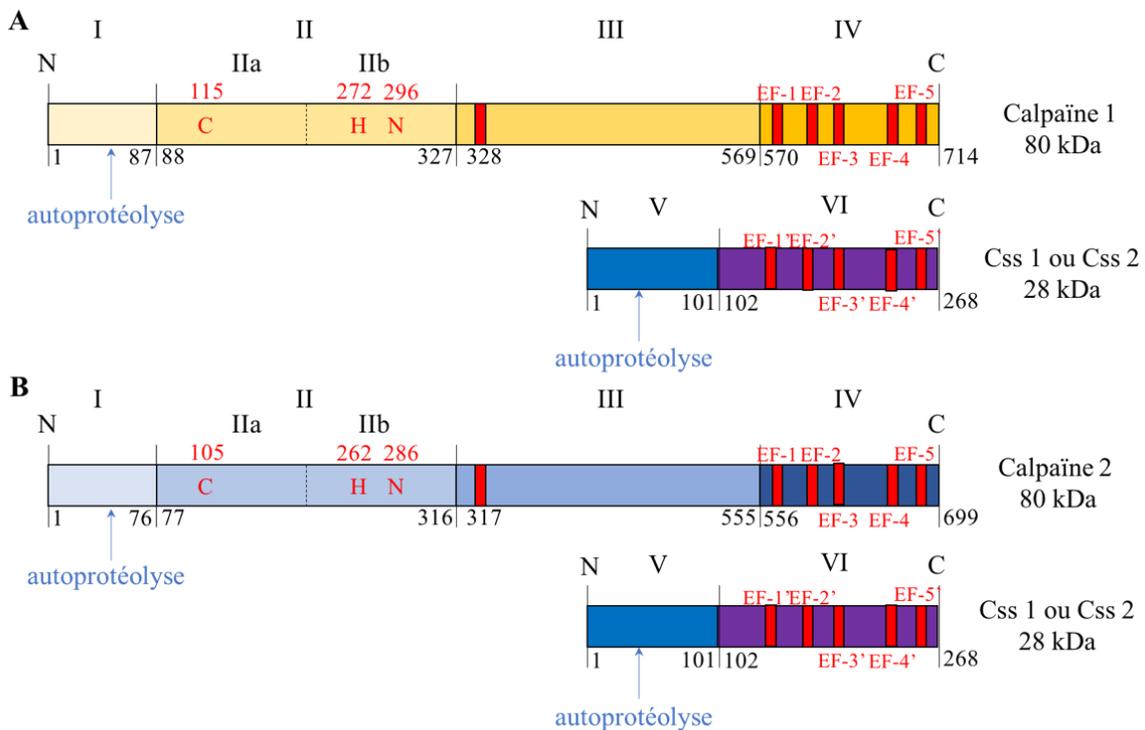


Figure 40 : Structure schématique de la micro-calpaïne (A) et de la milli-calpaïne (B)

Les différents domaines sont représentés par des rectangles de couleurs différentes surmontées du chiffre romain associé (de I à VI). Le domaine II est quant à lui divisé en deux par les pointillés représentant les deux sous-domaines IIa et IIb (ou PC1 et PC2). Le site actif est représenté par ses trois acides aminés correspondant C, H et N. Les rectangles rouges représentent les domaines EF-hands, numérotées EF-1 à EF-5 pour la grande sous unité et EF-1' à EF-5' pour la petite sous unité. Image adaptée de Goll et al. 2003.

En N-terminale, le domaine I est impliqué dans l'autolyse de la protéase. Il est très bien conservé, son homologie variant que de 72 à 86% en fonction des espèces. Il ne présente aucune homologie de séquence avec d'autres polypeptides identifiés (Goll et al. 2003).

Le domaine II est le domaine de la triade catalytique qui est caractéristique des protéases à cystéine telles que la papaïne et les cathepsines. Ce domaine est fortement conservé entre les espèces avec une homologie de 85 à 93%, cependant il présente une faible

homologie avec les autres protéases à cystéine, ce qui laisse penser qu'il a évolué d'un gène ancestral différent (Goll et al. 2003). Ce domaine est la clef catalytique, il est composé des acides aminés formant la triade catalytique qui sont la cystéine, l'histidine et l'asparagine en position 115, 272 et 296 pour la calpaïne 1 et 105, 262 et 286 pour calpaïne 2. Il peut être sous-divisé en deux domaines, le IIa (ou PC1) portant la cystéine et le IIb (ou PC2) portant les deux autres acides aminés.

Le rôle du domaine III est encore mal compris, il possède diverses régions dont une dite C2 qui est capable d'interagir avec les phospholipides membranaires (Ono, Sorimachi, and Suzuki 1998; Tompa et al. 2001), et une structure EF-hand qui n'est pas capable de lier le calcium (Andresen, Tom, and Strand 1991). Ce domaine est capable de se lier avec la calpastatine, l'inhibiteur endogène des calpaïne qui sera décrit un peu plus bas (Wendt, Thompson, and Goll 2004).

Le domaine IV, en C-terminal, est composé des 5 EF-hands permettant la liaison avec le calcium. Les quatre premières EF-hands ont été identifiées dans les années 80 (Imajoh et al. 1988; Emori et al. 1986). La cinquième a été détectée plus tardivement grâce à des études cristallographiques (Blanchard et al. 1997). Les domaines EF-hand sont numérotés de 1 à 5 à partir du N-terminal. Ce domaine présente 51 à 54 % de similarité avec la calmoduline ce qui lui vaut le nom de « *calmodulin-like* ».

4.2 Les sous-unités régulatrices 1 et 2

Les sous-unité régulatrices C_{ss}1 et C_{ss}2 sont respectivement composées de 268 et 248 acides aminés ce qui leurs confèrent une masse moléculaire d'environ 28 kDa (28 100 Da pour C_{ss}1 et 27 659 Da pour C_{ss}2) (Sakihama et al. 1985 ; Schád et al. 2002). Ces sous-unités régulatrices sont toutes deux composées de deux domaines.

Le domaine V, en N-terminal des sous-unité régulatrices, est riche en glycine et serait capable d'interagir avec les phospholipides membranaires. Il serait aussi impliqué, comme le domaine I, dans l'autolyse de la protéase. Il s'associe avec le domaine II pour former l'hétérodimère (Hosfield et al. 1999).

Le domaine VI est lui aussi composé de cinq structures EF-hand permettant la fixation du calcium. Sa forte homologie avec le domaine IV lui vaut le nom de domaine IV'. Des études cristallographiques ont montré que les domaines IV et VI s'associent pour l'hétérodimérisation de la protéase (Hosfield et al. 1999).

5 Activation & régulations des calpaïnes 1 et 2

Le calcium joue évidemment un rôle capital dans l'activation des calpaïnes. La cristallographie a permis de mieux comprendre comment le calcium pourrait agir. Les répulsions électrostatiques entre les sous-domaines IIa et IIb qui portent la triade catalytique permettent le maintien du site actif ouvert. La distance entre les trois acides aminés du site actif empêche l'enzyme d'être active, empêchant ainsi une protéolyse anarchique. Le calcium entraîne de nombreux changements conformationnels permettant notamment le rapprochement des deux sous-domaines. Les trois acides aminés de la triade catalytique étant alors proches, le site actif devient opérationnel (Hata et al. 2001; Moldoveanu, Jia, and Davies 2004; Reverter, Sorimachi, and Bode 2001). Les calpaïnes, une fois activée par le calcium va migrer vers la membrane plasmique où les domaines III et V vont interagir avec les phospholipides membranaires grâce à leurs régions hydrophobes. La suite des événements reste peu claire et il existe deux modèles d'activation des calpaïnes qui sont présentés dans la figure 41.

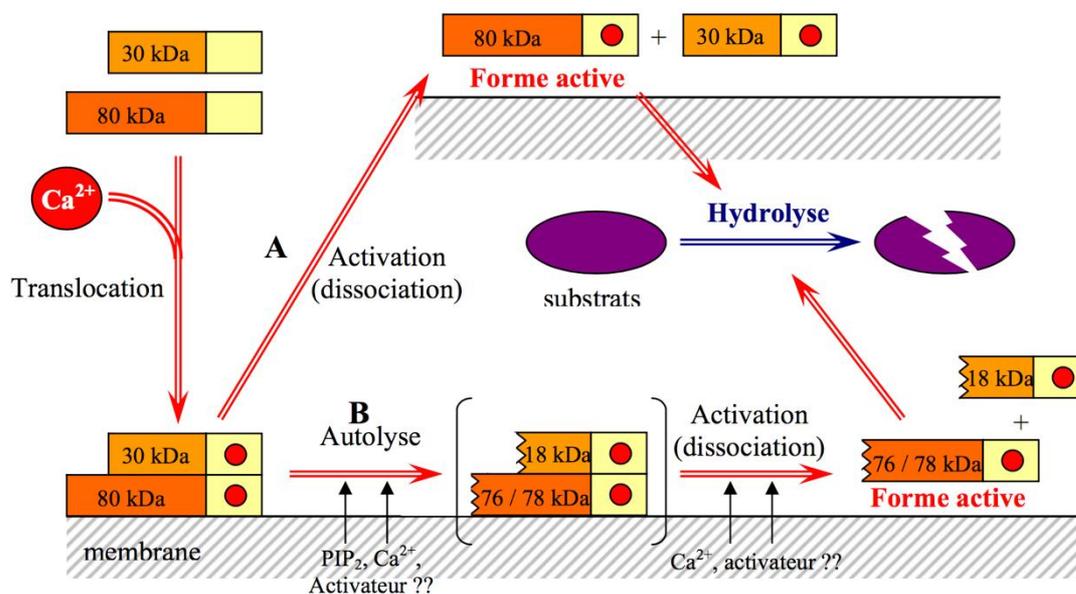


Figure 41 : Les différents modes d'activation des calpaïnes d'après Suzuki and Sorimachi 1998

5.1 Modèle d'activation par autolyse

La capacité des deux calpaïnes à s'autolyser est bien connue depuis les années 1980 (Cong et al. 1989; Dayton 1982). Le modèle d'activation par autolyse a été largement accepté

dans les années 1990. Il suggérait que, comme les caspases, les calpaïnes étaient synthétisées sous forme de pro-enzymes.

L'autolyse se fait en deux étapes pour les calpaïnes 1 et 2 tandis qu'elle se fait en trois étapes pour les sous-unités régulatrices. Ce processus entraîne la perte d'une partie des domaines I et V. L'autolyse de la calpaïne 1 va donner une forme autolysée d'un poids moléculaire de 76 kDa tandis que l'autolyse de la calpaïne 2 va produire une forme autolysée d'un poids de 78 kDa (Zimmerman and Schlaepfer 1991; Brown and Crawford 1993). Cette autolyse peut se poursuivre sur ces sous-unités catalytiques entraînant la formation de fragments inactifs de 30 à 33 kDa (Nishimura and Goll 1991). L'autolyse des sous-unités régulatrices va conduire à la formation de fragments de 18 kDa (McClland, Lash, and Hathaway 1989). Ce modèle suggérait que l'autolyse conduisait à la formation de micro- et milli-calpaïne actives de 76 kDa / 18 kDa et de 78 kDa / 18 kDa respectivement.

5.2 Modèle d'activation par dissociation

Plusieurs études infirmèrent l'hypothèse de la pro-enzyme, en effet des calpaïnes non autolysées se sont montrées actives, pouvant hydrolyser leurs substrats (Cong et al. 1989; Cong, Thompson, and Goll 1993; Goll et al. 1992:19; Molinari, Anagli, and Carafoli 1994). Un modèle de dissociation est alors proposé et soutenu par des travaux montrant que la sous-unité catalytique était active lorsqu'elle était seule (Meyer et al. 1996; Yoshizawa et al. 1995). D'autant plus que la sous-unité catalytique est plus sensible au calcium une fois dissociée (Vilei et al. 1997). La séparation des deux sous-unités pourrait être la conséquence de l'interaction de celles-ci avec les phospholipides membranaires qui entraînerait des changements conformationnels. Toutefois la dissociation n'a jamais été détectée et des études cristallographiques montrent clairement la formation de ces dimères (Zhang, Lane, and Mellgren 1996).

En 1998, un modèle intégrant ces deux modèles d'activation est proposé par Suzuki et Sorimachi (Figure 41). Il est désormais largement accepté. Ainsi l'autolyse, malgré son rôle facultatif, faciliterait la dissociation des deux hétérodimères permettant la libération de la sous-unité catalytique active. La durée de vie de la sous-unité catalytique serait plus courte lorsqu'elle est seule, la sous unité régulatrice permettrait donc la stabilisation de celle-ci.

5.3 Régulation de l'activité des calpaïnes

5.3.1 Le calcium

Le calcium est un élément clef de l'activation des calpaïnes. Cependant, la concentration de calcium nécessaire à l'activation des calpaïnes est nettement supérieure à la concentration calcique intracellulaire. En effet, la concentration en calcium dans une cellule varie de 50 à 300 nM selon son état, tandis que la concentration calcique activatrice de la micro- et milli-calpaïne est respectivement de l'ordre de 3 à 50 μ M et 0,25 à 1 mM (Maravall et al. 2000; Goll et al. 2003). Le calcium ne peut donc à lui seul expliquer l'activation et la régulation des calpaïnes 1 et 2.

5.3.2 L'autolyse

Comme nous venons de le voir, l'autolyse est utile à l'activation des calpaïnes. L'autolyse permet de diminuer la concentration calcique nécessaire à l'activation, elle diminue d'un facteur 1,5 à 100 et d'un facteur 5 pour la micro- et milli-calpaïne respectivement (Goll et al. 1992). Cependant, malgré ces diminutions, les concentrations calciques nécessaires à l'activité des calpaïnes restent supérieures à la concentration calcique cellulaire.

5.3.3 Les phospholipides

Les phospholipides acides tels que la phosphatidylsérine (PS), le phosphatidylinositol (PI) et le phosphatidylinositol 4,5 biphosphate (PIP_2), en interagissant avec les domaines III et V, réduirait la concentration calcique indispensable à l'autolyse des calpaïnes d'un facteur 3 à 8 (Coolican and Hathaway 1984; Cong et al. 1989; Saïdo, Mizuno, and Suzuki 1991; Saïdo et al. 1992). Toutefois, la stœchiométrie (1 calpaïne pour 375 à 4 100 phospholipides) et la concentration nécessaire à l'autolyse ne sont pas physiologiquement possible.

5.3.4 Les phosphorylations

Les micro- et milli-calpaïnes présentent respectivement 9 et 8 sites de phosphorylation qui jouent un rôle régulateur positif ou négatif sur l'activité (Goll et al. 2003). La phosphorylation de la calpaïne 2 sur la sérine 50 par la voie ERK/MAPK activée par l'EGF permet une forte augmentation de l'activité de la milli-calpaïne (Glading et al. 2004; Glading et al. 2000) jouant ainsi notamment sur la migration (Leloup et al. 2010).

Au contraire, une phosphorylation de cette même calpaïne 2 par la PKA sur la sérine 369 ou la thréonine 370 conduit à une rigidification de la structure, laissant le site actif ouvert et réduisant ainsi l'activité de la milli-calpaïne (Shiraha et al. 2002; Shiraha et al. 1999)

5.3.5 La calpastatine

Les calpaïnes ne doivent pas seulement être activées, elles doivent aussi être inhibées de manière à éviter une protéolyse anarchique. Un inhibiteur endogène a été découvert en même temps que la milli-calpaïne, lors des premiers essais de purification de cette enzyme (Dayton et al. 1976). Cet inhibiteur, appelée calpastatine, possède une séquence unique, composée de 708 acides aminés et subdivisée en cinq domaines (Figure 42). Le domaine L, situé en N-terminal, comporte 120 acides aminés, dont de nombreux acides aminés basiques permettant la liaison à la membrane (Mellgren 1988). Il est suivi de 4 domaines inhibiteurs répétés contenant 140 acides aminés, numérotés de I à IV en partant de la partie N-terminale. Ces domaines sont composés de trois sous-domaines nommés A, B et C. Le seul sous-domaine possédant une activité inhibitrice est le sous-domaine B, les autres sous-domaines étant inactifs (Maki et al. 1988; Uemori et al. 1990).

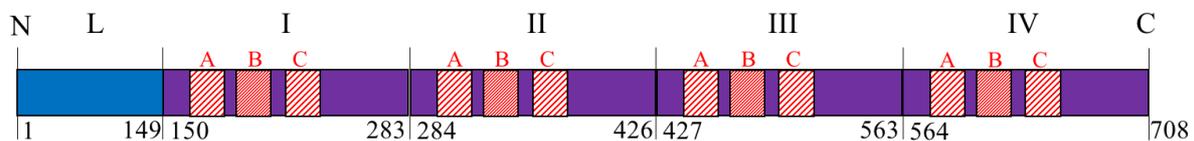


Figure 42 : Structure schématique de la calpastatine (Wendt, Thompson, and Goll 2004)

L'inhibition des calpaïnes est un phénomène calcium-dépendant (Kapprell and Goll 1989; Cottin et al. 2000). Les sous-domaines A et C se fixent, en présence de calcium, aux domaines IV et VI des calpaïnes, permettant le contact du sous-domaine B avec le site actif des calpaïnes situé sur le domaine II (Todd et al. 2003). La phosphorylation par les protéines kinase A ou C permet la localisation de la calpastatine dans le noyau. Le calcium permettrait une déphosphorylation de la calpastatine ce qui conduirait à une relocalisation de celle-ci à la membrane (Averna et al. 2001; Averna et al. 2003; Averna et al. 1999).

6 Rôles physiologiques et pathologiques des calpaïnes 1 et 2

6.1 Les substrats des calpaïnes

Une meilleure compréhension des rôles physiologiques joués par les calpaïnes ubiquitaires passe par une identification de leurs substrats. Plus d'une centaine de protéines ont été identifiées comme étant des substrats de la micro- et de la milli-calpaïne (Croall and McGrody 1994).

6.1.1 La séquence cible

La séquence commune à la majorité de ses différents substrats est la séquence PEST (proline, glutamate et/ou aspartate, sérine et thréonine), elle a été identifiée en 1989 (Wang, Villalobo, and Roufogalis 1989). En effet la proximité de ces quatre acides aminés et de leurs charges négatives permettrait la fixation du calcium nécessaire à l'activation des calpaïnes (Harris, Croall, and Morrow 1989).

Cependant cette séquence PEST n'est ni suffisante ni indispensable pour induire le clivage par les calpaïnes. En effet, on ne retrouve pas cette séquence sur l'ensemble des substrats et surtout les mutations de cette séquence n'empêche pas le clivage par les calpaïnes (Carillo et al. 1996). La comparaison des sites de clivage par les calpaïnes a permis de mettre en évidence une homologie au niveau des deux premiers acides aminés précédant la coupure. En effet, on observe que le premier acide aminé était un acide aminé basique et le deuxième acide aminé correspondait à un acide aminé hydrophobe (Croall and DeMartino 1991). Les phosphorylations des protéines ciblées par les calpaïnes pourraient également jouer un rôle.

6.1.2 Les substrats principaux

La liste des substrats a été réalisée par des expériences *in vitro*. Ils ont été répertoriés de façon exhaustive par Goll et ses collaborateurs (Goll et al. 2003). Nous pouvons distinguer plusieurs types de protéines :

- Des protéines cytosoliques : adducine, N-cadhérine, calponine, β -caténine, desmine, dystrophine, filamine, myosine, taline, titine, tropomyosine, troponines, tubuline, vimentine, vinculine ...
- Des enzymes : la protéine kinase C (PKC), la phospholipase C, les caspases 3, 7 et 12, la FAK (*focal adhesion kinase*), la kinase du récepteur à l'EGF ...
- Des protéines associées à la membrane : A-CAM, cavéoline-3, MARCKS

(*myristoylated alanine-rich C kinase substrate*), EGFR, PDGFR, intégrine $\beta 3$...

- Des facteurs de transcription : la myogénine, p53, $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, c-Fos, c-Jun, c-Myc, ...

6.2 Rôles physiologiques des calpaïnes

Du fait du grand nombre de leurs substrats, les calpaïnes ubiquitaires sont impliquées dans de nombreux processus biologiques. Nous allons faire ici une liste des rôles majeurs des calpaïnes 1 et 2.

Elles sont impliquées dans la régulation du cycle cellulaire en dégradant des facteurs tels que la cycline D1 et la protéine p53. Elles jouent aussi un rôle dans la transduction du signal en clivant des protéines impliquées dans diverses voies de signalisation tels que les intégrines $\beta 3$, les récepteurs à l'EGF, au PDGF et à l'insuline. En clivant et activant les pro-caspases 3, 7 et 12, elles sont impliquées dans l'induction de l'apoptose. Elles furent d'ailleurs identifiées au départ comme les enzymes responsables de ce phénomène de mort cellulaire. Elles sont également impliquées dans la migration cellulaire.

Les calpaïnes sont impliquées bien sûr dans de nombreux autres phénomènes biologiques mais ces quatre exemples sont très intéressants car ce sont des processus qui peuvent être impliqués dans le développement des cancers.

6.3 Rôles pathologiques des calpaïnes

6.3.1 Pathologies diverses

Les calpaïnes sont également impliquées, plus ou moins directement, dans de très nombreux processus pathologiques.

Les calpaïnes sont ainsi impliquées dans les dystrophies musculaires. C'est le cas notamment pour les dystrophies musculaires de Duchenne et de Becker. L'augmentation de la concentration intracellulaire du calcium permet l'augmentation de l'activité des calpaïnes conduisant à des protéolyses anarchiques. Comme nous l'avons évoqué plus tôt la mutation de la calpaïne 3 est liée avec la LGMD2A.

Elles sont également impliquées dans des maladies neurodégénératives. Des augmentations d'expression et/ou d'activité ont été observées dans les maladies neurodégénératives d'Alzheimer (Grynspan et al. 1997), de Parkinson (Mouatt-Prigent et al. 2000) et de Huntington (Gafni and Ellerby 2002).

Une augmentation de la concentration calcique dans l'œil est également à l'origine de la dégradation de la cristalline par la milli-calpaïne, conduisant à la formation d'agrégats et à la cataracte (Xu et al. 2004)

Nous pourrions également citer les ischémies, le psoriasis et bien d'autres encore. Ces dernières années, plusieurs études ont mis en évidence le rôle des calpaïnes dans l'établissement du cancer, mais aussi dans la résistance au traitement de chimiothérapie.

6.3.2 Le cancer

Les études réalisées sur les calpaïnes dans le cancer ont révélé des rôles antinomiques. Il a été observé, entre autres, une implication dans la prolifération cellulaire, dans l'apoptose et dans la migration et l'invasion cellulaire.

6.3.2.1 La prolifération cellulaire

Les calpaïnes régulent la prolifération cellulaire *via* le clivage de deux importants régulateurs : Myc et β -caténine. Les conditions extrêmes que l'on retrouve au niveau de la tumeur (diminution de l'apport en nutriment et d'oxygène) entraîne généralement une activation de l'apoptose *via* la protéine Myc. Cependant la dégradation de celle-ci par les calpaïnes conduit à un échappement de cette apoptose. Le produit de cette dégradation appelé Myc-nick est inactif (Conacci-Sorrell, Ngouenet, and Eisenman 2010; Conacci-Sorrell and Eisenman 2011). Dans les cellules tumorales colorectales, en condition de stress extrême, une augmentation de ces produits de dégradation est observée, diminuant ainsi le pool de Myc totale conduisant à la survie des cellules tumorales. De plus, l'augmentation de la quantité de Myc-nick conduit à la migration cellulaire et la survie cellulaire induite par l'autophagie, conduisant à la promotion du cancer et à la chimiorésistance.

Lors de l'adhésion, les deux molécules E-cadhérine et β -caténine vont activer des voies de signalisation et notamment la voie Wnt. La β -caténine est stabilisée ce qui permet son accumulation et la transcription de facteurs permettant la prolifération et l'inhibition de l'apoptose. Dans les cancers du sein et de la prostate, le clivage de la E-cadhérine par les calpaïnes entraîne de manière surprenante une stabilisation accrue de la β -caténine conduisant à l'augmentation de l'expression de facteurs oncogéniques (Rios-Doria et al. 2003). Au contraire dans le cancer colorectal, les calpaïnes vont dégrader la β -caténine permettant l'inhibition de la prolifération (Benetti et al. 2005)

6.3.2.2 *La migration cellulaire & l'invasion tumorale*

Il existe deux types de migration, la migration mésenchymale et la migration amœboïde.

La migration mésenchymale est dépendante de l'adhésion par les intégrines, phénomène régulé notamment par les calpaïnes. Comme nous l'avons vu précédemment beaucoup des substrats des calpaïnes sont des protéines ou des enzymes impliquées dans la migration telles que la FAK (Chan, Bennin, and Huttenlocher 2010), la taline (Franco et al. 2004) et bien d'autres. Dans les cellules de mélanome, une suractivation des calpaïnes conduit à un clivage plus important de la filamine ce qui entraîne une plus forte migration (O'Connell et al. 2009). Dans le cancer métastatique de la prostate, les calpaïnes vont cliver la E-cadhérine et ainsi déréguler les contacts focaux et promouvoir l'invasion tumorale (Rios-Doria et al. 2003). De plus, les calpaïnes sont impliquées dans l'expression de métalloprotéases permettant un remodelage de l'environnement tumorale et conduisant à une plus grande infiltration tumorale (Braun et al. 1999; Zheng et al. 2014). Cependant les calpaïnes peuvent être également impliquées dans une diminution de la migration, en effet elles peuvent dégrader la paxilline ce qui va réguler négativement la dynamique des contacts focaux est ainsi induire une stabilisation de ceux-ci (Cortesio et al. 2008).

6.3.2.3 *L'apoptose*

Les thérapies anti-cancéreuses cherchent à induire l'apoptose des cellules tumorales pour pouvoir inhiber la progression cancéreuse. Dans cette machinerie apoptotique, on retrouve notamment les caspases. L'activation des caspases jouent donc un rôle crucial dans l'activation des voies apoptotiques. Il a été montré que l'activation des calpaïnes était fortement impliquée dans l'activation de ces mêmes voies apoptotiques. Cette implication a d'ailleurs entrainer des débats pour savoir quelles protéases étaient réellement les initiatrices de l'apoptose (Waterhouse et al. 1998; Daniel et al. 2003). Les deux systèmes protéolytiques sont très interconnectés pour induire l'apoptose, les calpaïnes activant les caspases.

Il a ainsi été montré que les calpaïnes pouvaient être impliquées dans la cytotoxicité induite par la chimiothérapie mais aussi dans la résistance à ces traitements. Dans le cancer du sein, la génistéine induit un influx calcique qui active les protéases calcium-dépendantes que sont la calpaïne-2 et la caspase-12 et promeut ainsi l'apoptose (Sergeev 2004). De même un dysfonctionnement de la calpaïne 1 peut conduire à une résistance des cellules tumorales du sein au trastuzumab (Kulkarni et al. 2010). Dans le mélanome et le cancer de l'ovaire, les

calpaïnes sont impliquées dans les effets cytotoxiques du cisplatine, notamment en activant les effecteurs de l'apoptose tels que la caspase 3 et Bak (Mandic et al. 2002).

Cependant une étude récente met en évidence un lien entre la calpaïne 2 et la résistance des cellules tumorales colorectales à l'irinotécan. La calpaïne 2, surexprimée dans les cellules résistantes, dégrade I κ B levant ainsi l'inhibition de NF- κ B et permettant la survie de ces cellules. Ce mécanisme conduit à une résistance à l'irinotécan (Fenouille et al. 2012). Pour autant il n'y a actuellement aucune donnée concernant l'implication des calpaïnes dans la réponse ou la résistance des cellules tumorales colorectales à l'oxaliplatine.

Objectif de l'étude

Notre étude poursuit les travaux entamés par Laetitia Dahan dans le laboratoire sur l'implication des ROS produits par NOX1 dans la cytotoxicité de l'oxaliplatine dans le cancer colorectal. Des données préliminaires obtenues au laboratoire montraient également qu'il existait potentiellement un lien entre la production de ROS et les calpaïnes dans les cellules tumorales colorectales. Nous nous sommes donc intéressés à l'implication de NOX1 et des calpaïnes dans la résistance des cellules tumorales colorectales à l'oxaliplatine, résistance qui est responsable du faible taux de survie des patients atteints d'un cancer métastatique.

L'objectif de cette étude est d'avoir une meilleure compréhension du phénomène de résistance à l'oxaliplatine et des acteurs impliqués ce qui nous permettra d'identifier des cibles thérapeutiques potentielles et d'optimiser cette chimiothérapie en réduisant le phénomène de résistance. L'objectif est également d'identifier des « marqueurs » potentiels de la résistance qui nous permettraient de prévoir la réponse des cellules tumorales à l'oxaliplatine. Cela permettrait d'orienter ou non un patient vers le protocole de chimiothérapie FOLFOX. Nous souhaitons également identifier des traitements susceptibles d'être utilisés pour soigner les patients ne répondant pas à l'oxaliplatine.

Dans un premier temps, nous avons caractérisé une voie de signalisation impliquée dans la réponse des cellules tumorales colorectales à l'oxaliplatine. Nous avons étudié les mécanismes de régulation existants entre les calpaïnes et la NADPH oxydase NOX1 et nous avons évalué le rôle de cette régulation des ROS produits par Nox1 dans la signalisation cellulaire conduisant à la mort ou à la survie cellulaire suite au traitement à l'oxaliplatine.

Dans un second temps, nous avons approfondi notre étude sur la résistance au traitement et sur la régulation de cette voie de signalisation dans la réponse à l'oxaliplatine. Nous avons réalisé un screening de différentes chimiothérapies pour voir s'il était possible d'induire la mort cellulaire dans nos cellules résistantes à l'oxaliplatine. Ce screening nous a permis de montrer que nos cellules résistantes à l'oxaliplatine sont particulièrement sensibles à la gemcitabine. Nous avons ensuite caractérisé les différentes voies de signalisation impliquées dans la cytotoxicité induite par la gemcitabine.

Chapitre 5

Reversion of resistance to oxaliplatin by inhibition of p38 MAPK in colorectal cancer cells lines: Involvement of the calpain/Nox1 pathway

1 Introduction

Le rôle des ROS dans l'efficacité des traitements chimiothérapeutiques a été suggéré depuis longtemps. Il a été ainsi montré que l'oxaliplatine induit une production des ROS dans les cellules tumorales colorectales ce qui conduit à la mort de ces dernières.

Des travaux au sein de notre équipe ont mis en évidence dans les cellules d'adénocarcinome de colon HT29-D4 une implication des ROS produits par NOX1 dans la réponse à l'oxaliplatine (Dahan et al. 2009). De plus des travaux complémentaires réalisés au laboratoire ont montré qu'une inhibition des calpaïnes augmentait la production de ROS dans les cellules tumorales colorectales.

Dans ce contexte, nous avons émis l'hypothèse que les calpaïnes pourraient être impliquées dans la résistance des cellules tumorales colorectales à l'oxaliplatine *via* une régulation de l'activité de NOX1. Pour les cellules sensibles à l'oxaliplatine (Figure 46), les calpaïnes présenteraient une activité normale, tout comme NOX1 qui produirait les ROS nécessaires aux effets cytotoxiques de l'oxaliplatine. Dans le même temps, la voie NF- κ B resterait inhibée par la protéine I κ B. Ainsi la balance entre la survie cellulaire et la mort cellulaire tendrait vers la mort cellulaire. Pour les cellules résistantes, les calpaïnes seraient surexprimées et/ou suractivées, entraînant la dégradation des protéines associées à NOX1, comme NOXO1 ou p47phox. De la même manière les calpaïnes pourraient dégrader Tiam1, substrat connu des calpaïnes, et ainsi inhiber Rac1 et donc indirectement NOX1. La production de ROS serait réduite ce qui inhiberait les effets cytotoxiques de l'oxaliplatine. Parallèlement, les calpaïnes dégraderaient la protéine I κ B ce qui lèverait l'inhibition de NF- κ B, augmentant la survie cellulaire. La balance entre la survie et la mort cellulaire serait alors en faveur de la survie. Cette hypothèse initiale est présentée dans la figure 43.

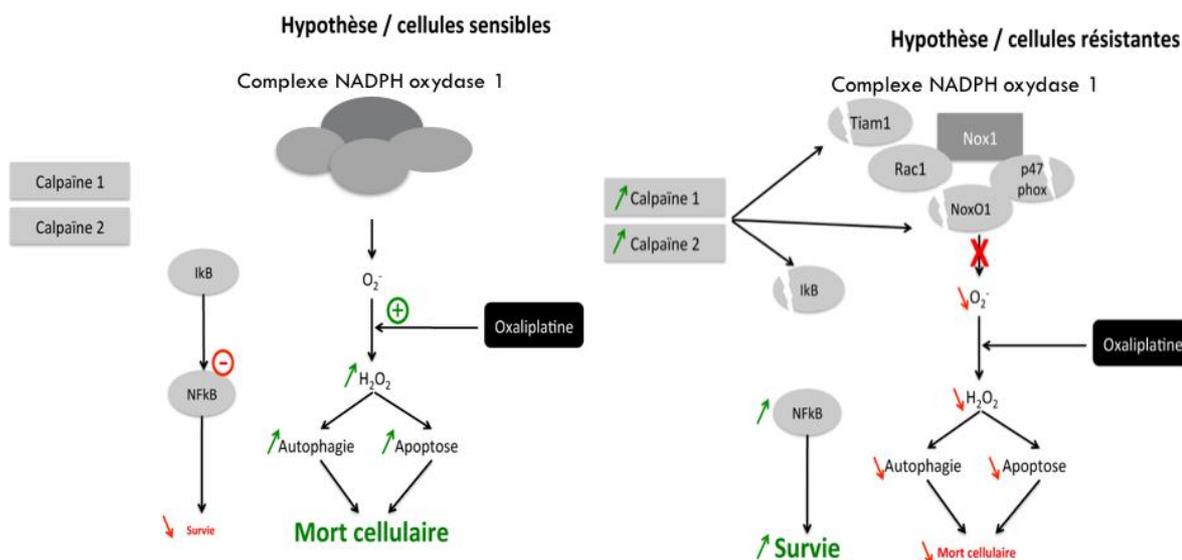


Figure 43 : Hypothèse initiale de notre étude

2 Dans des lignées cellulaires présentant la mutation BRAF V600E

2.1 Introduction

Afin de vérifier notre hypothèse, nous avons sélectionné des lignées résistantes à l'oxaliplatine à partir de deux lignées cellulaires d'adénocarcinome colique : les HT29-D4 et les RKO. La lignée HT29-D4 est un clone issu de la lignée HT29 et obtenu dans notre laboratoire (Fantini et al. 1986). Les deux lignées choisies présentent toutes les deux la mutation BRAF V600E, elles diffèrent cependant, entre autres, par le statut mutationnel de p53. En effet, les cellules HT29-D4 présentent la mutation p53 R273H tandis que les RKO expriment la p53 sauvage.

Nous avons alors testé la régulation de la production de ROS en présence de l'oxaliplatine sur les cellules sensibles et résistantes. Nous avons également étudié la régulation des calpaïnes sur cette production de ROS. Nous avons enfin étudié l'implication de différentes voies de signalisation dans cette régulation calpaïnes/NOX1 et dans la survie cellulaire.

2.2 Article 1 (publié dans Oncotarget 2017)

www.impactjournals.com/oncotarget/

Oncotarget, Advance Publications 2017

Reversion of resistance to oxaliplatin by inhibition of p38 MAPK in colorectal cancer cell lines: involvement of the calpain / Nox1 pathway

Mathieu Chocry¹, Ludovic Leloup¹ and Hervé Kovacic¹¹Aix-Marseille Université, INSERM, CRO2 UMR_S 911, Marseille 13385, France**Correspondence to:** Ludovic Leloup, **email:** ludovic.leloup@univ-amu.fr**Keywords:** NADPH oxidase, calpain, colorectal cancer, oxaliplatin, chemoresistance**Received:** July 21, 2017**Accepted:** September 21, 2017**Published:** October 10, 2017**Copyright:** Chocry et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 3.0 (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

Oxaliplatin is a major treatment for metastatic colorectal cancer, however its effectiveness is greatly diminished by the development of resistances. Our previous work has shown that oxaliplatin efficacy depends on the reactive oxygen species (ROS) produced by Nox1. In this report, we investigated Nox1 involvement in the survival mechanisms of oxaliplatin resistant cell lines that we have selected. Our results show that basal ROS production by Nox1 is increased in resistant cells. Whereas the transitory Nox1-dependent production of superoxide contributes to the cytotoxicity of oxaliplatin in sensitive cells, oxaliplatin treatment of resistant cells leads to a decrease in the production of superoxide associated with an increase of H₂O₂ and a decreased cytotoxicity of oxaliplatin. We have shown that calpains regulate differently Nox1 according to the sensitivity of the cells to oxaliplatin. In sensitive cells, calpains inhibit Nox1 by cleaving NoxA1 leading to a transient ROS production necessary for oxaliplatin cytotoxic effects. In contrast, in resistant cells calpain activation is associated with an increase of Nox1 activity through Src kinases, inducing a strong and maintained ROS production responsible for cell survival. Using a kinomic study we have shown that this overactivation of Nox1 results in an increase of p38 MAPK activity allowing the resistant cells to escape apoptosis. Our results show that the modulation of Nox1 activity in the context of anticancer treatment remains complex. However, a strategy to maximize Nox1 activation while inhibiting the p38 MAPK-dependent escape routes appears to be an option of choice to optimize oxaliplatin efficiency.

Introduction

Colorectal cancer (CRC) became a major cancer due to its increasing frequency and its mortality. It is currently the third most common cancer in the world, with nearly 1.4 million new cases diagnosed in 2012 [1]. The average 5-year survival rate is about 52%, however major disparities are observed, depending on the CRC stages [1]. A quarter of the patients are diagnosed at the metastatic stage and 50% will develop metastasis [2]. At this stage, the survival rate is only 13.1% in the USA (National Cancer Institute) and less than 10% in Europe (6.6 % in England, National Cancer Intelligence Network, 2009, and 8.1% in France, Institut National du Cancer, 2012).

At metastatic stage, CRC is usually treated with multidrug chemotherapies, such as FOLFIRI and FOLFOX regimens. These first-line treatments, constituted of 5-fluorouracil (5-FU), folinic acid and irinotecan or oxaliplatin (L-OHP), have equivalent efficacies which remain unfortunately low due to the therapeutic escape of tumor cells. Oxaliplatin is a third-generation platinum-based alkylating agent which induces the formation of intra- and inter-strand bridges between guanines leading to the inhibition of DNA replication and synthesis. The oxaliplatin monotherapy has a very low activity with an objective response rate not exceeding 10%, while the combination of oxaliplatin with 5-FU and folinic acid strongly improves the treatment efficiency, increasing the objective response rate up to 58% [3]. However, around 50% of the patients develop resistances to this chemotherapy protocol leading to treatment failure [4]. It is thus critical to identify the actors of these resistances, particularly to oxaliplatin, to improve the treatment efficiency and to predict the tumor cell response.

Our previous works have highlighted the crucial role played by Nox1 and the reactive oxygen species (ROS) in the response of CRC cells to oxaliplatin [5]. In tumor cells, the main sources of ROS are the mitochondrial respiratory chain and NADPH oxidases (Nox) [6]. The five identified Nox isoforms (from Nox1 to Nox5) are non-mitochondrial multi-protein enzymes associated with the plasma membrane. They produce superoxide ions by oxidizing the NADPH coenzyme with the help of associated proteins. Nox1 isoform is associated with four proteins that are necessary for its activity: p22phox, Rac1, NoxO1 (NADPH oxidase organizer 1) and NoxA1 (NADPH oxidase activator 1). Nox1 is localized in the invagination of the plasma membrane (caveolae) as well as on the endosome surface, allowing the enzyme to produce extracellular and endoplasmic ROS. Nox1 has numerous functions and regulates many fundamental physiological processes as well as pathological phenomena. NADPH

oxidases present tissue-specific expression patterns and Nox1 isoform is strongly expressed in the colon and generally overexpressed in colorectal tumor cells [7]. Due to its implication in CRC cell response to oxaliplatin, it is crucial to have a better understanding of Nox1 activity and role, however the regulation of this enzyme remains unclear.

In this work, we have studied the implication of calpains in the regulation of Nox1 activity. The calpain family consists of 15 calcium-dependent cysteine proteases (from calpain 1 to calpain 16), which are classified according to their tissue expression. We can distinguish ubiquitous calpains such as calpain 1 and calpain 2, and tissue-specific calpains such as calpain 9 which is expressed mainly in the digestive tract (and under-expressed in CRC cell). Calpains 1 and 2 activities are mainly regulated by calcium and by their specific inhibitor, calpastatin [8]. Calpain 2 is also regulated by ERK and PKA phosphorylations and by its localization at the membrane [9–11]. These calpains are broad-spectrum enzymes, cleaving cytoskeletal proteins (such as talin, vinculin, etc.), transcription factors (p53, c-fos...) or enzymes (caspases, Rho A, Rac ...) [8,12]. The diversity of these substrates explains the large number of physiological and pathological phenomena in which calpains are involved. This is notably the case for cancers since several studies have shown an involvement of calpains in tumor invasion and in angiogenesis but also in the response to chemotherapy. However, their roles seem to be antinomic according to cancers. Indeed, calpains are involved in the cytotoxic effects of genistein and trastuzumab in breast cancer, and of cisplatin in melanoma and ovarian cancer [13–15], while calpain 2 is implicated in the resistance of CRC cells to irinotecan [16].

Based on these data and on our previous work, we have studied the implication of Nox1 and calpains in the resistance of CRC cells to oxaliplatin. After establishing oxaliplatin-resistant colorectal cancer lines, we observed that these cell lines showed an increase in Nox1 and calpain activity. In sensitive cells, calpains inhibit Nox1 activity by cleaving NoxA1 leading to the transient production of ROS necessary for oxaliplatin cytotoxic effects. In contrast, in resistant cells the activation of calpains is responsible for the increase of Nox1 without inducing mortality under treatment with oxaliplatin. Kinomic approach allowed us to demonstrate the activation of an escape route to cell death secondary to the overactivation of Nox1 in resistant cells. Our results confirm that the production of ROS by Nox1 is necessary for the efficacy of oxaliplatin. However, in resistant cells, adaptive mechanisms are developed downstream of Nox1 to limit the oxaliplatin-induced cytotoxicity. Taken together, our data show that the new identified calpain/Nox1/p38 MAPK pathway could be an interesting

therapeutic target to improve oxaliplatin-based treatment efficiency and a predictive marker of oxaliplatin resistance.

Results

Selection of cells resistant to oxaliplatin

We selected oxaliplatin-resistant colorectal cancer cells by growing HT29-D4 and RKO cells in the presence of increasing concentrations of oxaliplatin (see Material and Methods section). The selection allowed us to obtain two different sub-lines for HT29-D4 that will be called HT29-D4 Rox1 (Rox1) and HT29-D4 Rox2 (Rox2) and two sub-lines for RKO (RKO Rox1 and RKO Rox2). These cells are considered resistant as they are able to grow in culture medium containing 2 μM of oxaliplatin, this concentration corresponding to the clinically relevant plasma concentration of patients treated with oxaliplatin. This 2 μM concentration was thus used in all our experiments.

Cytotoxicity assays show that Rox1 and Rox2 cells are resistant to oxaliplatin in comparison to the sensitive HT29-D4 cells (Figure 1A-1B). Indeed, low oxaliplatin concentrations (0.25 and 0.5 μM , inferior to 2 μM) has no significant effects on the resistant cells, their survival rates remaining between 96 and 99%. On the opposite, the viability of sensitive cells is impacted, decreasing to 83% at 0.25 μM and 65% at 0.5 μM (Figure 1A). The IC_{50} of oxaliplatin is $0.8 \pm 0.2 \mu\text{M}$ for HT29-D4 cells compared to $5.2 \pm 0.6 \mu\text{M}$ for Rox1 and $6.3 \pm 0.9 \mu\text{M}$ for Rox2 cells ($p < 0.05$, Figure 1B). These significant differences confirm the resistance of our selected cells to oxaliplatin. Similar results were obtained with RKO cells (supplemental Figure 1).

To get closer to the tumor environment, the cytotoxic effects of oxaliplatin were also studied in a 3D cell culture model. For HT29-D4 cells, the IC_{50} of oxaliplatin is $2.1 \pm 0.1 \mu\text{M}$, this value is increased to $5.8 \pm 0.1 \mu\text{M}$ and $4.4 \pm 0.4 \mu\text{M}$ for Rox1 and Rox2 cells, respectively (Figure 1D-1E). Spheroids growth in sensitive and resistant cell lines over time were presented in supplemental figure 2. These results confirmed the resistance of our cells, with similar profiles in 2D and 3D experiments.

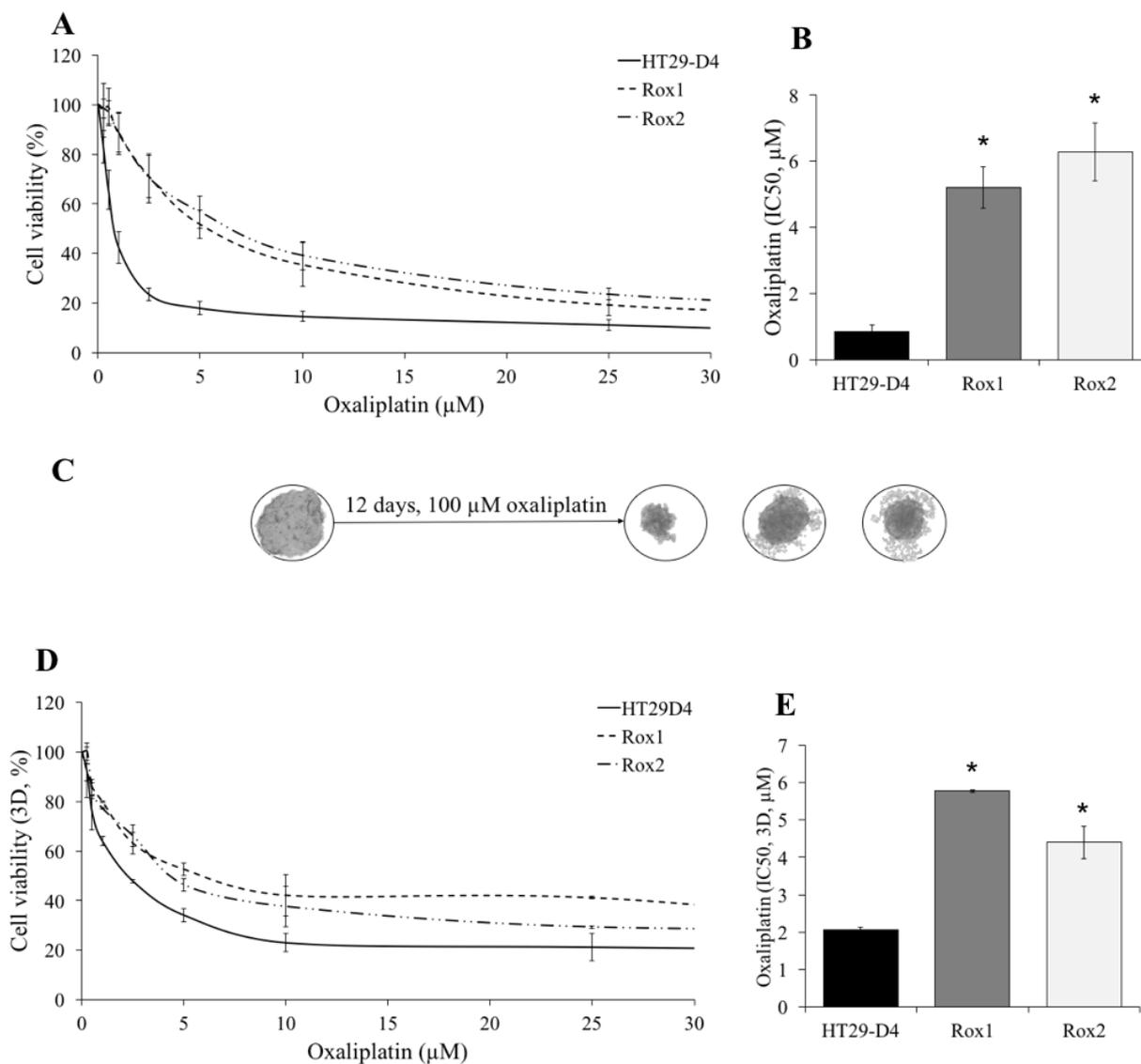


Figure 1: Validation of the resistance status of the selected cells.

The HT29-D4, HT29-D4-Rox1 (Rox1) and HT29-D4-Rox2 (Rox2) cells were submitted to a 72-hour cytotoxicity assay in 2 dimensions (2D, **A**) and in 3 dimensions (3D, spheroids, **D**). The IC50 of oxaliplatin were then calculated using the Chou and Talalay's method in 2D (**B**) and 3D models (**E**). The effects of oxaliplatin on spheroids are illustrated in **C**. Asterisks indicate a statistical significance with $p < 0.05$.

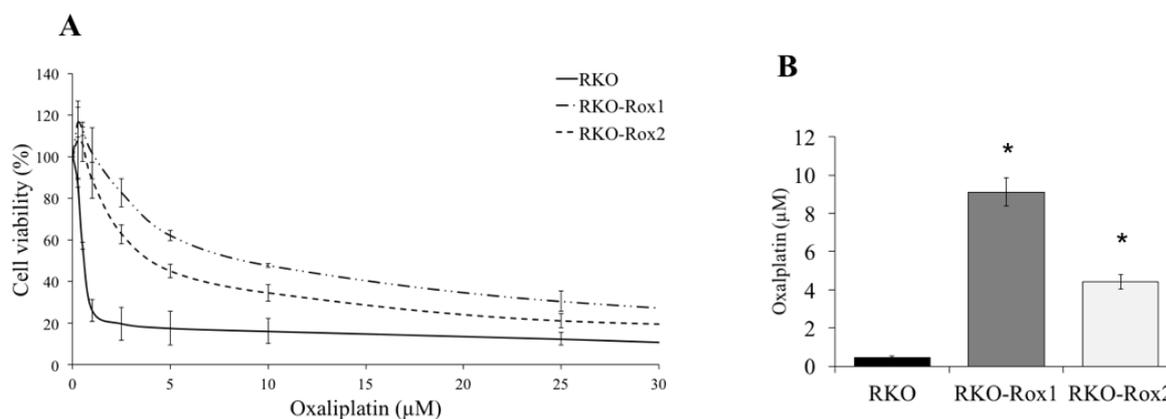


Figure S.1: Determination of the resistance status of selected cells.

RKO, RKO-Rox1 (Rox1) and RKO-Rox2 (Rox2) were submitted to 72-hour cytotoxicity assays to oxaliplatin (**A**). The IC₅₀ were calculated using the Chou and Talalay's method (**B**). Asterisks indicate a statistical significance with $p < 0.05$.

Nox1 isoform is necessary for oxaliplatin cytotoxicity

Our previous works have shown that ROS produced by Nox1 are necessary for oxaliplatin-induced cytotoxicity [5]. Treatment of cells with apocynin (0.5 mM) confirmed that ROS production impacts oxaliplatin cytotoxicity in sensitive cells but also in resistant cells. Apocynin increased the IC₅₀ of oxaliplatin for HT29-D4 from $0.9 \pm 0.1 \mu\text{M}$ to $5.6 \pm 0.7 \mu\text{M}$ (Figure 2A). The IC₅₀ of oxaliplatin for Rox1 cells was increased from $5.2 \pm 0.6 \mu\text{M}$ to $27.5 \pm 2.3 \mu\text{M}$ in the presence of this inhibitor (Figure 2A). Similar results were obtained with Rox2 cells (Figure 2A). The repression of Nox1 expression leads to a significant decrease of oxaliplatin efficiency, the IC₅₀ increasing from $5.9 \pm 0.5 \mu\text{M}$ for Rox1 cells transfected with control siRNA to $75.8 \pm 5.0 \mu\text{M}$ with siRNA directed against Nox1. The IC₅₀ for Rox2 cells were similarly modified increasing from $9.1 \pm 1.4 \mu\text{M}$ to $74.0 \pm 8.2 \mu\text{M}$ (Figure 2B). We have then compared the expression levels of the different proteins constituting Nox1 complex in these cells. Our results show no significant difference in the expression of Nox1 and NoxO1 between sensitive and resistant cells (Figure 2C). However, the expression of NoxA1 was increased by 31.5% and 32.9% in Rox1 and Rox2 cells, respectively (Figure 2C, Supplemental Figure 3C). The effects of oxaliplatin on Nox1 expression were also studied. As shown in Figure 2D, oxaliplatin has no significant effect on Nox1 expression in our resistant and sensitive cells.

We have then studied Nox1 activity by measuring the superoxide production. Our different cell lines were treated with oxaliplatin and the superoxide production was monitored over the time using lucigenin chemiluminescence. Our results show that in the absence of oxaliplatin superoxide production is strongly and significantly increased in our resistant cells, reaching $182.4 \pm 18.7\%$ for Rox1 cells and $210.0 \pm 21.9\%$ for Rox2 cells ($p < 0.05$, Figure 2E). Similar data were obtained with RKO cells, the superoxide production increasing to $275.4 \pm 24.8\%$ for RKO Rox1 cells and to $275.0 \pm 37.1\%$ for RKO Rox2 cells (Supplemental Figure 4A). The repression of Nox1 expression using siRNA induced strong reductions of the superoxide production, showing clearly that Nox1 is the major source of superoxide production in our cells and that Nox1 is responsible for the increases observed in the resistant cells (Figure 2E).

We have then studied the effects of oxaliplatin on the superoxide production in our sensitive and resistant cells. The kinetic study of superoxide production shows that oxaliplatin stimulates significantly Nox1 activity in sensitive cells after 45 minutes and 4 hours of treatment, the superoxide production reaching $159.2 \pm 28.7\%$ and $199.8 \pm 40.7\%$, respectively. Superoxide production is then reduced, returning to regular levels after 24 hours (Figure 2E). In resistant cells, opposite effects are observed. In Rox1 cells, superoxide production is significantly reduced by oxaliplatin, decreasing from $182.4 \pm 18.7\%$ to $135.0 \pm 15.1\%$ after 45 minutes and to $129.1 \pm 24.3\%$ after 4 hours. Similarly, the superoxide production of Rox2 cells decreased from $210.7 \pm 21.9\%$ to $139.7 \pm 13.4\%$ and $139.3 \pm 26.6\%$ when oxaliplatin is added for 45 minutes or 4 hours, respectively (Figure 2E). Like for sensitive cells, superoxide production returns to regular levels after 24 hours.

Extracellular H_2O_2 production was measured using Amplex Red fluorescence, in the same conditions than for superoxides (the H_2O_2 production of untreated HT29-D4 cells was set to 100%). In the absence of oxaliplatin, extracellular H_2O_2 production was strongly and significantly increased in our resistant cells, reaching $171.2 \pm 17.6\%$ for Rox1 cells and $178.0 \pm 14.0\%$ for Rox2 cells ($p < 0.05$, Figure 2F). The results obtained for the cells transfected with the siRNA against Nox1 show that Nox1 activity is required for the production of H_2O_2 . Indeed, the inhibition of Nox1 expression reduces the H_2O_2 production by 50% in the sensitive cells and by more than 65% in the resistant ones. A kinetic study of oxaliplatin effects was also performed. The results show that the peroxide production is stimulated by oxaliplatin in sensitive cells for short time treatments, like it was observed for superoxide production previously. The production is then reduced and returns to regular levels after 24 hours. In resistant cells, oxaliplatin strongly stimulates the production of H_2O_2 after 45

minutes and 4 hours, as shown in Figure 2F. Unlike what was observed with sensitive cells, the peroxide production is maintained at high levels even after 24 hours of treatment.

Taken together, these data indicate that oxaliplatin stimulates Nox1 activity in sensitive cells to increase transiently ROS production and thus induce cell death. Our data also show that ROS production is over activated and dysregulated in our resistant cells.

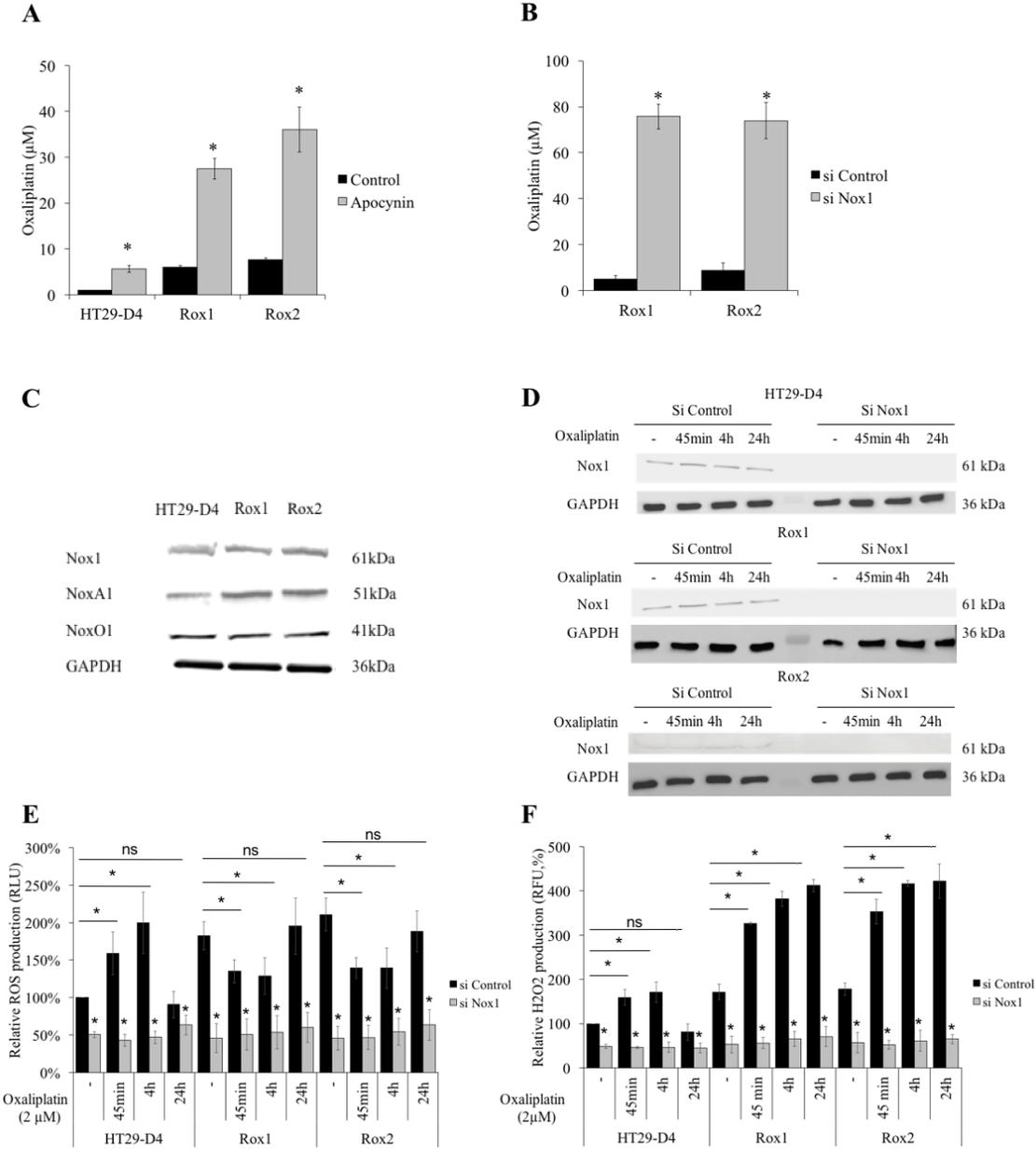


Figure 2: Implication of Nox1 in oxaliplatin-induced ROS production and cytotoxicity. The effects of oxaliplatin on cell viability were studied with HT29-D4, Rox1 and Rox2 cells treated with apocynin (A) or transfected with control siRNA (si Control) or Nox1 specific siRNA (si Nox1) (B). HT29-D4, Rox1 and Rox2 cells were lysed, and equal amounts of cellular proteins were processed for immunoblotting using the antibodies against Nox1, NoxA1, NoxO1 and GAPDH (C). HT29-D4, Rox1 and Rox2 cells were transfected with

control siRNA (si Control) and Nox1 specific siRNA (si Nox1). The cells were lysed, and equal amounts of cellular protein were processed for immunoblotting using the antibodies against Nox1 (**D**). Transfected cells were also seeded in white 96-well plates to perform lucigenin assays (**E**) and in black 96-well plates to perform Amplex red assay (**F**). These cells were treated with 2 μ M oxaliplatin over time (- untreated, 45 minutes (45 min), 4 hours (4h) and 24 hours (24h)). Asterisks indicate a statistical significance with $p < 0.05$.

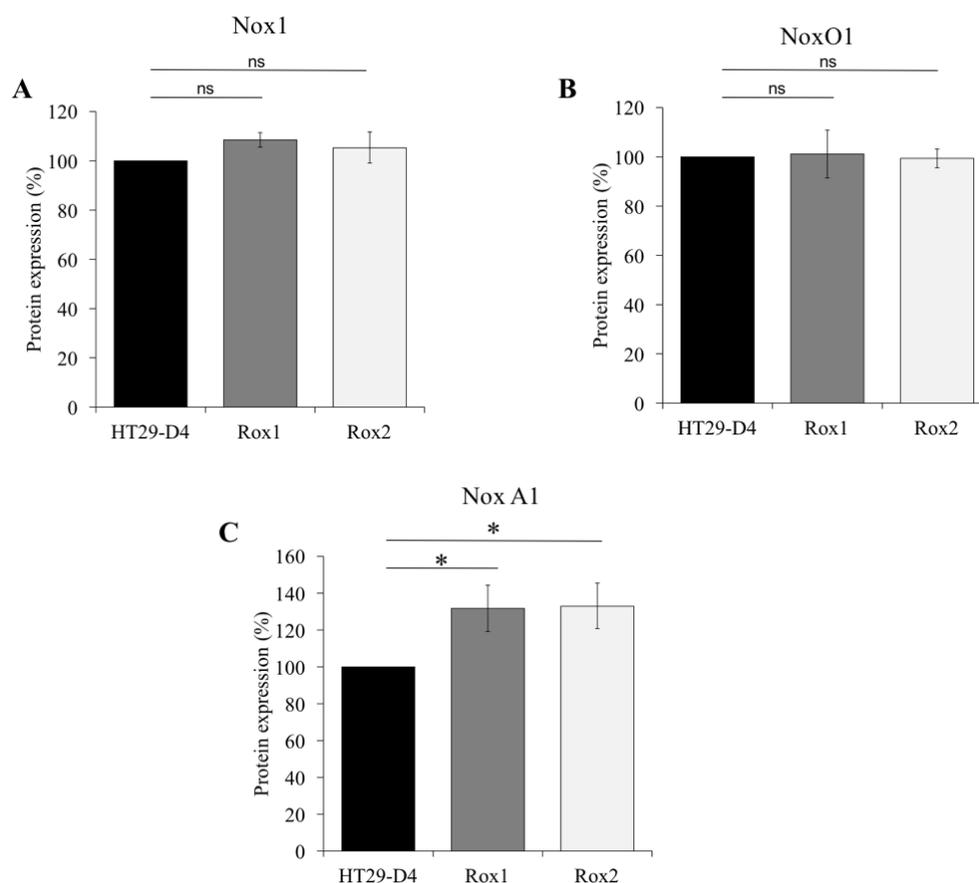


Figure S.3: Expression of the components of Nox1 complex.

The expressions of Nox1 (**A**), NoxO1(**B**) and NoxA1 (**C**) were quantified from the bands obtained by Western blotting. Asterisks indicate a statistical significance with $p < 0.05$.

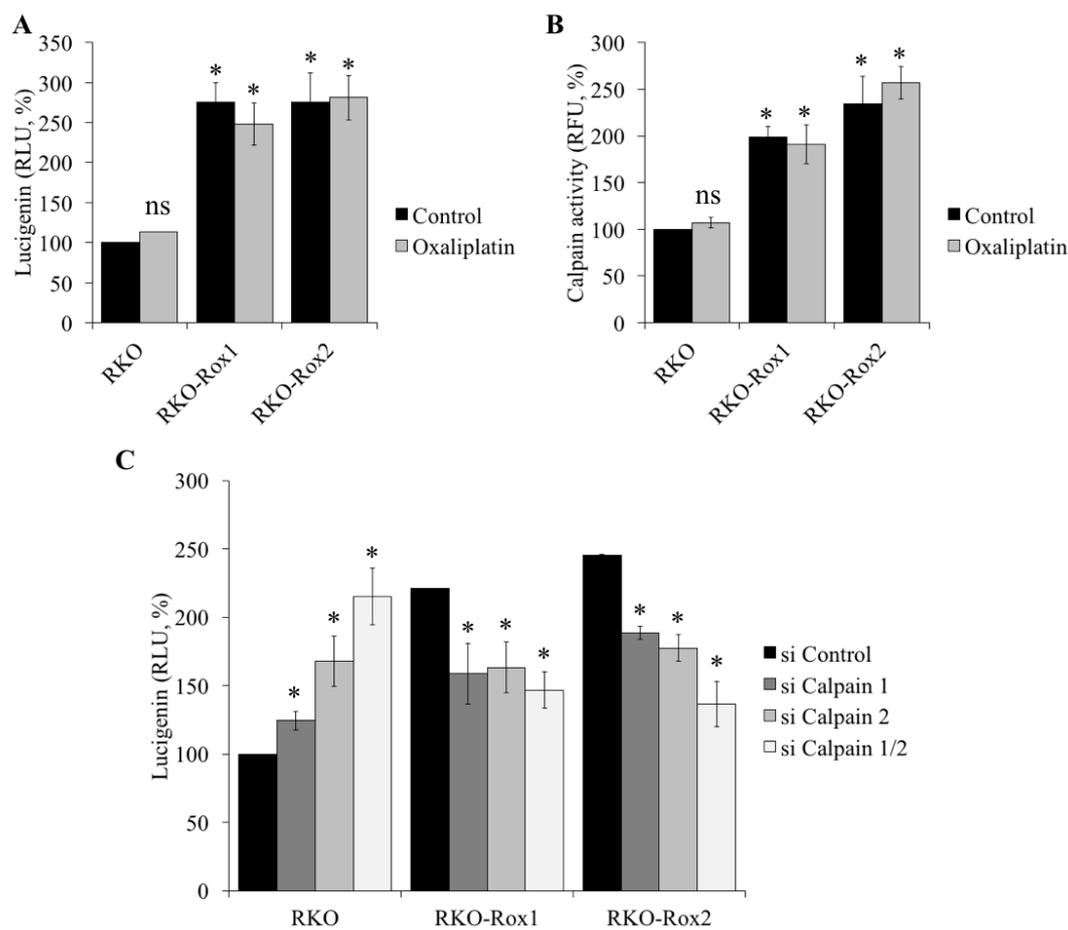


Figure S.4: Sensitive and resistant RKO cells behave as sensitive and resistant HT29-D4.

RKO, RKO-Rox1 and RKO-Rox2 cells were seeded in white 96-well plates to perform lucigenin assays in the absence (Control) or in the presence of oxaliplatin (**A**). RKO, RKO-Rox1 and RKO-Rox2 cells were seeded in black 96-well plates to perform calpain activity assays in the absence (Control) or in the presence of oxaliplatin (**B**). RKO, RKO-Rox1 and RKO-Rox2 cells were transfected with control siRNA (si Control), calpain 1 specific siRNA (si Calpain 1), calpain 2 specific siRNA (si Calpain 2) or both siRNAs (si Calpain 1/2). The cells were seeded in white 96-well plates to perform lucigenin assays (**C**). Asterisks indicate a statistical significance with $p < 0.05$.

Calpain activity and roles are modified in resistant cells in comparison to sensitive cells

Recent studies have identified calpain 2 as an actor of the resistance of colorectal cancer cells to irinotecan [16], we have thus studied the potential implication of ubiquitous calpains in the resistance to oxaliplatin. Firstly, the expression of calpains 1 and 2 was compared between sensitive and resistant cells. Our results show no significant difference in the expression level of these two proteases (Figure 3A, Supplemental Figure 5A-5B). However, as calpains are enzymes regulated notably by calcium and phosphorylations, their activity may not be correlated with their expression. Calpain activity was thus measured in our sensitive and resistant cells using the fluorescent substrate t-boc-LM-CMAC (calpain activity in HT29-D4 cells was fixed at 100%). Our results show a strong and significant stimulation of calpain activity in the resistant cells. Indeed, calpain activity reached $193.0 \pm 9.8\%$ for Rox1 cells and $185.1 \pm 9.4\%$ for Rox2 cells (Figure 3B). Oxaliplatin has no effect on calpain activity, in sensitive and in resistant cells. Very similar results were obtained with sensitive and resistant RKO cells (Supplemental Figure 4B). These data indicate that the stimulation of calpain activity observed in the resistant cells is constitutive and does not depend on the presence of oxaliplatin.

To identify the calpain isoform responsible for this increase of activity, the experiment was repeated using cells transfected with siRNAs directed against calpain 1 and/or 2. The efficacy of these siRNAs was confirmed and the under expression was maintained after 96 hours (Figure 3C). The activity assays carried out with these transfected cells show that the two isoforms are equally involved in the increase of activity observed with the resistant cells and that there is no isoform specifically responsible for this phenomenon (Supplemental Figure 5C). To identify the potential roles played by calpains in the resistance to oxaliplatin, cytotoxicity assays were performed with HT29-D4, Rox1 and Rox2 cells under-expressing calpain 1 and/or 2. Our results obtained with the sensitive cells show that the repression of the expression of calpain 1 or both calpains reduces the IC_{50} of oxaliplatin in comparison to cells transfected with control siRNA (Figure 3D). Indeed, the IC_{50} of oxaliplatin in HT29-D4 cells was reduced from $1.2 \pm 0.1 \mu\text{M}$ with control siRNA to $0.6 \pm 0.1 \mu\text{M}$ with siRNA against calpain 1 and to $0.5 \pm 0.1 \mu\text{M}$ with the siRNA directed against the two isoforms (Figure 3C). No significant difference was observed when repressing calpain 2 expression. On the opposite, in resistant cells our results show that the repression of calpain expression leads to an increase of the IC_{50} of oxaliplatin (Figure 3C). The IC_{50} values are increased from $6.4 \pm 1.9 \mu\text{M}$ for Rox1 and $5.9 \pm 0.6 \mu\text{M}$ for Rox2 cells, to $18.7 \pm 2.9 \mu\text{M}$ and $26.0 \pm 1.2 \mu\text{M}$ when

calpain 1 expression is repressed. The inhibition of calpain 2 expression has stronger effects, the IC₅₀ of oxaliplatin reaching $46.6 \pm 2.9 \mu\text{M}$ for the Rox1 and $96.0 \pm 4.1 \mu\text{M}$ for Rox2 (Figure 3C). The inhibition of the two calpains gives results close to those obtained with the siRNA directed against calpain 1.

Taken together these results show that calpains reduce oxaliplatin effects in the sensitive cells while they are required for oxaliplatin-induced cytotoxicity in the resistant cells.

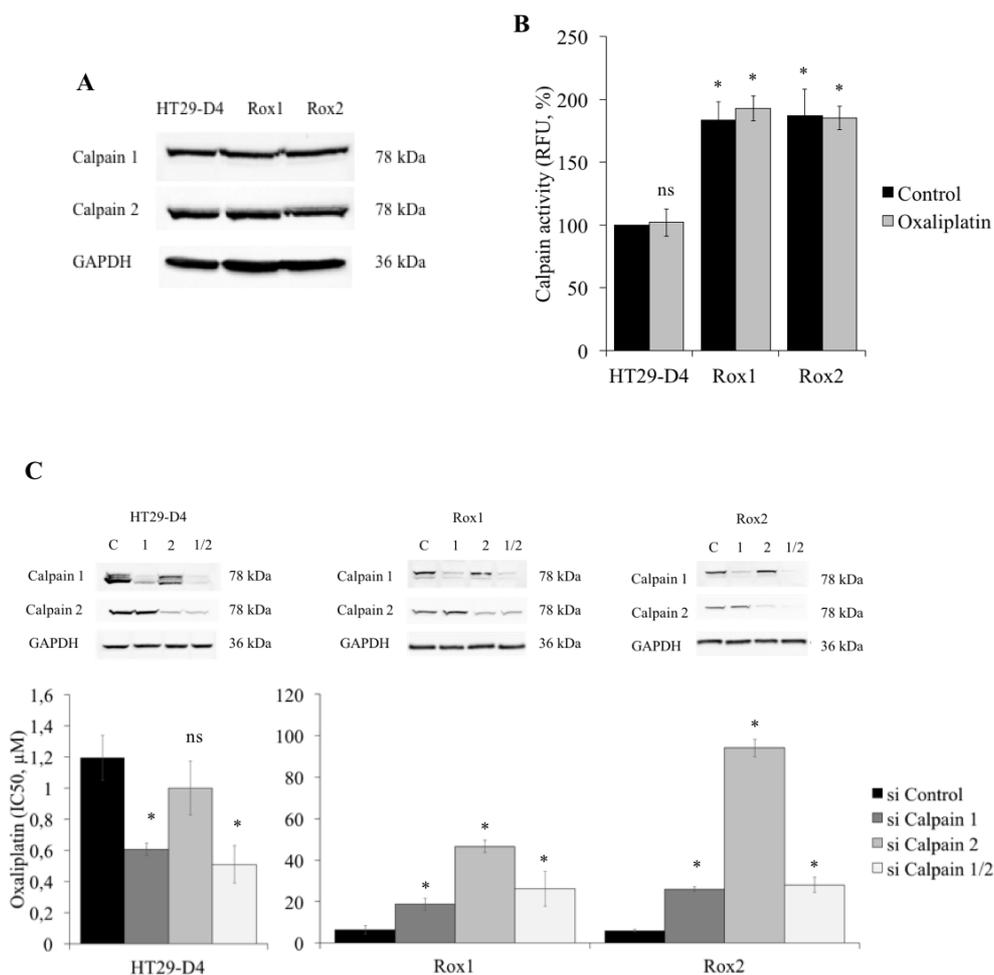


Figure 3: Study of calpain expression, activity and implication in oxaliplatin-induced cytotoxicity.

HT29-D4, Rox1 and Rox2 cells were lysed and equal amounts of proteins were processed for immunoblotting using the antibodies against calpain 1, calpain 2 and GAPDH (A). HT29-D4, Rox1 and Rox2 cells were seeded in black 96-well plates to perform calpain activity assays with (Oxaliplatin) or without oxaliplatin (Control) (B). HT29-D4, Rox1 and Rox2 cells were transfected with control siRNA (si Control), calpain-1 specific siRNA (si Calpain 1), calpain 2 specific siRNA (si Calpain 2) or both siRNAs (si Calpain 1/2). The cells were lysed and equal amounts of proteins were processed for immunoblotting using antibodies against

calpain 1 and calpain 2 (C). The transfected cells were also seeded to perform 72-hour cytotoxicity assays (C). Asterisks indicate a statistical significance with $p < 0.05$.

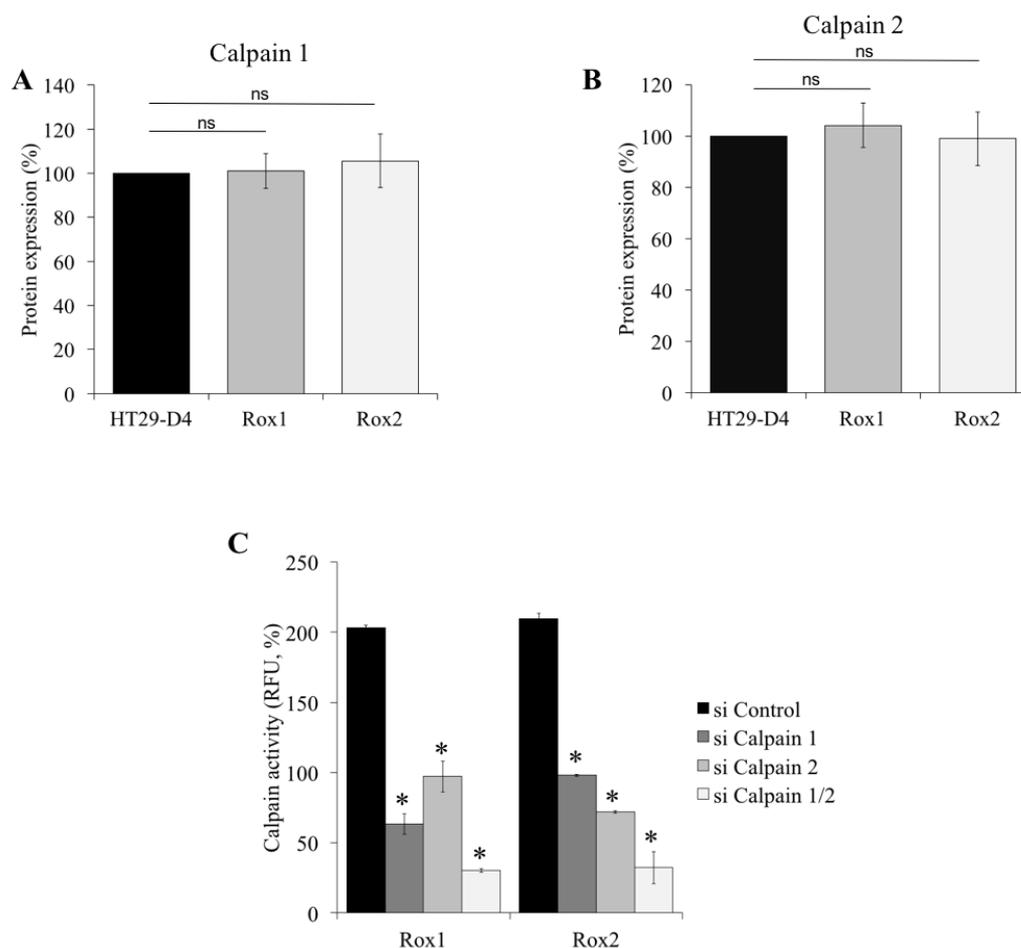


Figure S.5: Expression and activity of the ubiquitous calpains.

The expressions of calpain 1 (A) and calpain 2 (B) were quantified from the bands obtained by Western blotting. HT29-D4, Rox1 and Rox2 cells were transfected with control siRNA or with siRNAs directed against calpain 1 and/or calpain 2. The cells were seeded on black 96-well plates and calpain activity was measured using t-boc. The activity was expressed as a percentage (C). Asterisks indicate a statistical significance with $p < 0.05$.

Calpain regulation involves calcium and PKC delta

We have then studied the activation of calpains to identify the actors responsible for the stimulation of calpain activity observed in the resistant cells. As shown in Figure 3A, the expression of the calpain isoforms is not responsible for the increased activity. It is well

known that calpains can be activated by calcium and that calpain 2 activity is stimulated by ERK/MAPK pathway. We have thus studied these two activation pathways.

We have firstly performed calpain activity assays in our cells treated with or without PD98059, a specific ERK/MAPK pathway inhibitor. The results show that PD98059 has no significant effect on calpain activity in sensitive and resistant cells. Indeed, in sensitive cells PD98059 reduced calpain activity only from 100% to $96.8 \pm 2.5\%$. In the same manner, the inhibitor reduced the activity from $155.8 \pm 11.3\%$ to $149.2 \pm 13.1\%$ in Rox1 cells and from $164.7 \pm 12.9\%$ to $156.1 \pm 10.4\%$ in Rox2 cells (Figure 4A). These data clearly indicate that the ERK/MAPK pathway is not responsible for the calpain activity increase observed in our oxaliplatin resistant cells.

We therefore carried out calpain activity assays with our HT29-D4, Rox1 and Rox2 cells, treated or not with DPI (10 μM), a specific inhibitor of Nox enzymes. As shown in Figure 4B, no significant effect on calpain activity was observed. The activity was only reduced from 100% to $90.9 \pm 8.5\%$ in sensitive cells, from $193.0 \pm 9.8\%$ to $184.2 \pm 5.1\%$ in Rox1 cells, and only slightly increased from $190.5 \pm 9.4\%$ to $198.5 \pm 23.3\%$ in Rox2 cells (Figure 4B). These data clearly indicate that ROS produced by Nox1 do not regulate calpain activity in our cells.

Intracellular calcium levels were then measured using FURA2-AM. Firstly, our results show clearly that oxaliplatin induces a strong increase of the intracellular calcium concentration in the sensitive HT29-D4 cells. The relative concentration was indeed increased from 100% to $221.7 \pm 9.6\%$ by oxaliplatin (Figure 4C). Our data show also that intracellular calcium levels are increased in the resistant cells and that oxaliplatin has no effect on calcium concentration in these cells. In Rox1 cells, the relative calcium concentration was measured at $221.7 \pm 9.6\%$ in the absence of oxaliplatin and $250.8 \pm 18.4\%$ in the presence of this chemotherapy agent (Figure 4C). Similarly, in Rox2 cells calcium concentration was not impacted by oxaliplatin, increasing only from $233.5 \pm 15.4\%$ to $236.9 \pm 23.3\%$. These data show that the intracellular calcium concentration is constitutively increased in the cells resistant to oxaliplatin, and suggest that this increase could be responsible for calpain over-activation.

As shown in Figure 4D, the inhibition of PKC δ leads to an increase of calpain activity in both the sensitive and resistant cells. In HT29-D4, the activity (fixed at 100% for the control siRNA) was significantly increased to $133.1 \pm 15.9\%$ when PKC δ expression is repressed. Calpain activity was also increased from $168.9 \pm 10.0\%$ and $185.1 \pm 9.3\%$ to 214.1

$\pm 12.6\%$ and $234.7 \pm 14.9\%$ in Rox1 and Rox2 cells, respectively (Figure 4D). These results demonstrate that PKC δ regulates negatively calpain activity.

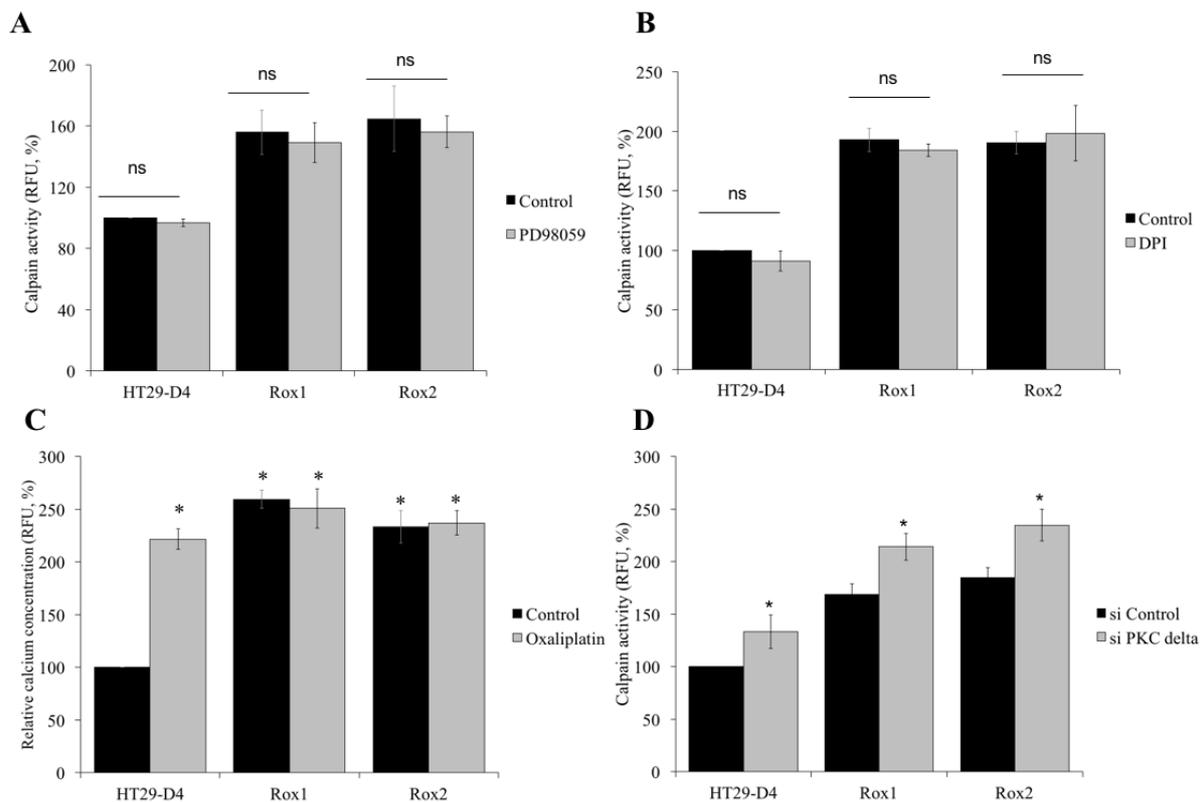


Figure 4: Regulation of calpain activity.

HT29-D4, Rox1 and Rox2 cells were seeded in black 96-well plates to perform calpain activity assays in the absence (control) or in the presence of a MEK inhibitor (PD98058, 2.5 μ M) (A). Calpain activity was measured like previously (A) with cells incubated in the absence (Control) or in the presence of an inhibitor of ROS (DPI, 5 μ M) (B). HT29-D4, Rox1 and Rox2 cells were treated with (Oxaliplatin, 2 μ M) or without oxaliplatin (Control) and incubated with 10 μ M of FURA-2-AM to measure the intracellular concentration of calcium (C). HT29-D4, Rox1 and Rox2 cells were transfected with control siRNA (si CTRL) or PKC δ specific siRNA (si PKC delta) and seeded in black 96-well plates to perform calpain activity assays (D). Asterisks indicate a statistical significance with $p < 0.05$.

Calpains regulate Nox1 activity in both sensitive and resistant cells

We then investigated the existence of a potential regulation between calpains and Nox1.

We have thus studied the effects of the inhibition of calpain expression on the production of ROS by Nox1. For this purpose, ROS measurements were performed using our sensitive and resistant cells transfected with siRNA directed against calpain 1 and/or 2. The ROS production of the cells transfected with the control siRNA was set at 100%. Interestingly, we have observed opposite regulations depending on the resistance status of our cells. In the sensitive cells, we have clearly observed that the inhibition of ubiquitous calpain expression leads to a strong and significant increase of the production of ROS. Indeed, the inhibition of calpain 1 and calpain 2 expression increases the production of ROS from 100% to $173.5 \pm 24.1\%$ and $177.6\% \pm 15.3\%$, respectively (Figure 5A). The repression of both calpain expression leads to a major peak of ROS production ($245.5 \pm 31.8\%$, Figure 5A). We have also confirmed that these increases of ROS production are depending on Nox1 activity (data not shown). Surprisingly, opposite effects were observed in resistant cells, as the down-regulation of calpain expression induced a strong inhibition of ROS production. In Rox1 cells, the repression of calpain 1 and calpain 2 reduced ROS production from 100% to $79.9 \pm 7.6\%$ and $67.2\% \pm 7.6\%$, respectively (Figure 5A). In Rox2 cells, we observed a 31% decrease of ROS production with the siRNA directed against calpain 1 and a 42% decrease with the siRNA directed against calpain 2. In the presence of both siRNA, the production was decreased to $29.6 \pm 2.6\%$ for Rox1 and $58.9 \pm 5.6\%$ for Rox2 (Figure 5A). As shown in Supplemental Figure 4C, the same regulations were observed in RKO cells.

As we have shown that PKC δ regulates negatively calpain activity, we have studied the effects of the inhibition of PKC δ expression on ROS production. Like with the siRNA directed against calpains, we have observed opposite effects in the sensitive and the resistant cells. A significant decrease in ROS production was observed in the sensitive cells, from 100% to $59.8 \pm 9.7\%$, while in resistant cells the production was increased from $225.3 \pm 5.2\%$ to $291.9 \pm 5.0\%$ and from $262.7 \pm 12.2\%$ to $322.3 \pm 2.7\%$ for Rox1 and Rox2 cells, respectively (Figure 5B).

Taken together, these data prove the existence of a regulation of Nox1 activity by the two ubiquitous calpains, in both sensitive and resistant cells. However, this regulation is inverted according to the sensitivity of the cells to oxaliplatin, calpains repressing Nox1 activity in sensitive cells and stimulating this activity in resistant cells.

Calpains inhibit Nox1 in sensitive cells through NoxA1 degradation

To characterize the regulation of Nox1 activity by calpains, we have studied the expression of the proteins constituting Nox1 complex, particularly the activator NoxA1. We have transfected sensitive and resistant cells with the siRNA directed against calpain 1 and calpain 2 and we have observed the effects of a 24-hour treatment with oxaliplatin on NoxA1 expression. The results show that oxaliplatin induces a strong decrease of NoxA1 expression in both the sensitive and the resistant cells. However, the effects of oxaliplatin are limited in the resistant cells in comparison to the sensitive cells, in which NoxA1 protein is not detectable after the oxaliplatin treatment (Figure 5C). The repression of ubiquitous calpain expression induces an increase of NoxA1 expression in the sensitive cells and limits the effects of oxaliplatin. In the resistant cells, the same phenomenon is observed at a weaker extent. These results suggest that calpains could regulate Nox1 through the degradation of NoxA1. To confirm this regulation, NoxA1 was purified by immunoprecipitation and then incubated in the presence of purified calpain 1. Our results show that the presence of calpain 1 induces the appearance of a second band around 49 kDa, very close to the band corresponding to the full length NoxA1 (51 kDa; Figure 5D). Calpains would thus cleave NoxA1 at its extremities, as predicted using the SVM prediction model (Supplemental Figure 6A). To characterize this cleavage, we have performed the same experiment using a NoxA1 protein modified by the addition of a DDK tag at its N-terminal extremity. The effects of the incubation of the immunoprecipitated NoxA1 with the purified calpain 1 were observed using an antibody directed against the DDK tag. The results are similar to those obtained using the endogenous NoxA1, showing two bands, the upper one corresponding to the full length NoxA1 at 51 kDa and the smaller one to the cleaved NoxA1 (Figure 5E). As the cleaved NoxA1-DDK is also observed around 49 kDa, we can thus conclude that calpains are cleaving NoxA1 at its C-terminal extremity. This C-terminal part is known to be involved in the binding of NoxO1, required for the activation of Nox1 (Supplemental Figure 6B).

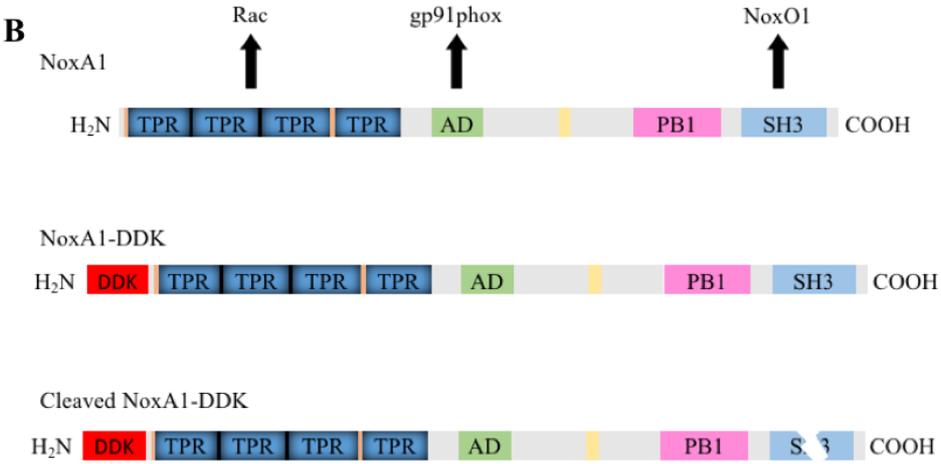
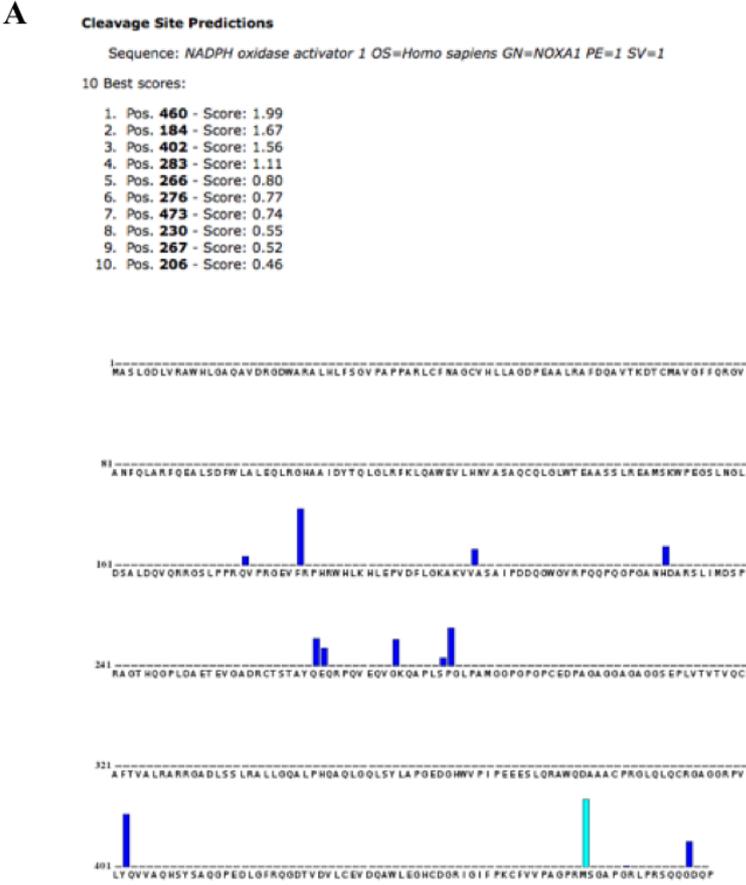


Figure S.6: NoxA1 is cleaved by calpains in its C-terminal part.

Calpain cleavage of NoxA1 was predicted using SVM prediction model (on <http://calpain.org/predict.rb?cls=substrate>). The cleavage was predicted to occur at the C-terminal end of NoxA1 (A), in the SH3 domain, known to be involved in the interaction with NoxO1 (B).

Calpains activate Nox1 in resistant cells through Src activation

The direct cleavage of NoxA1 by calpains is responsible for the repression of Nox1 activity in sensitive cells, however this cleavage is very limited in the resistant cells and cannot be responsible for the activation of Nox1 by calpains observed in these cells. Src is known to be a potential activator of Nox1, we have thus characterized the activation of Nox1 by calpains by studying Src implication.

We have firstly studied the potential involvement of Src kinases in the regulation of ROS production by using a specific inhibitor of these enzymes. Our results show that Src inhibitor has no significant effect on the production of ROS in the sensitive cells (production increased from 100% to $104.1 \pm 3.2\%$), whereas significant inhibitions were observed in our resistant cells (Figure 5F). The production of ROS was decreased from 231.0 ± 10.5 to $141.8 \pm 4.0\%$ for Rox1 cells and from $242.0 \pm 5.9\%$ to $140.7 \pm 2.1\%$ in Rox2 cells (Figure 5F). It is well known that Src is regulated by phosphorylation, the kinase activity of this enzyme is notably repressed by a phosphorylation on the tyrosine 527. We have therefore studied the phosphorylation status of Src in our cells transfected with a control siRNA or with siRNA directed against the ubiquitous calpains. Our results show that Src is less phosphorylated on the Y527 in our resistant cells than in the sensitive cells, suggesting that Src is more active in our Rox1 and Rox2 cells. The repression of calpain expression induces a strong phosphorylation of Src in our three sub-lines (Figure 5G).

These data show that Src mediate the activation of Nox1 by calpains in our resistant cells. The over-activated calpains maintain Src in its unphosphorylated active form, thus leading to the activation of Nox1 and to the increase of ROS production.

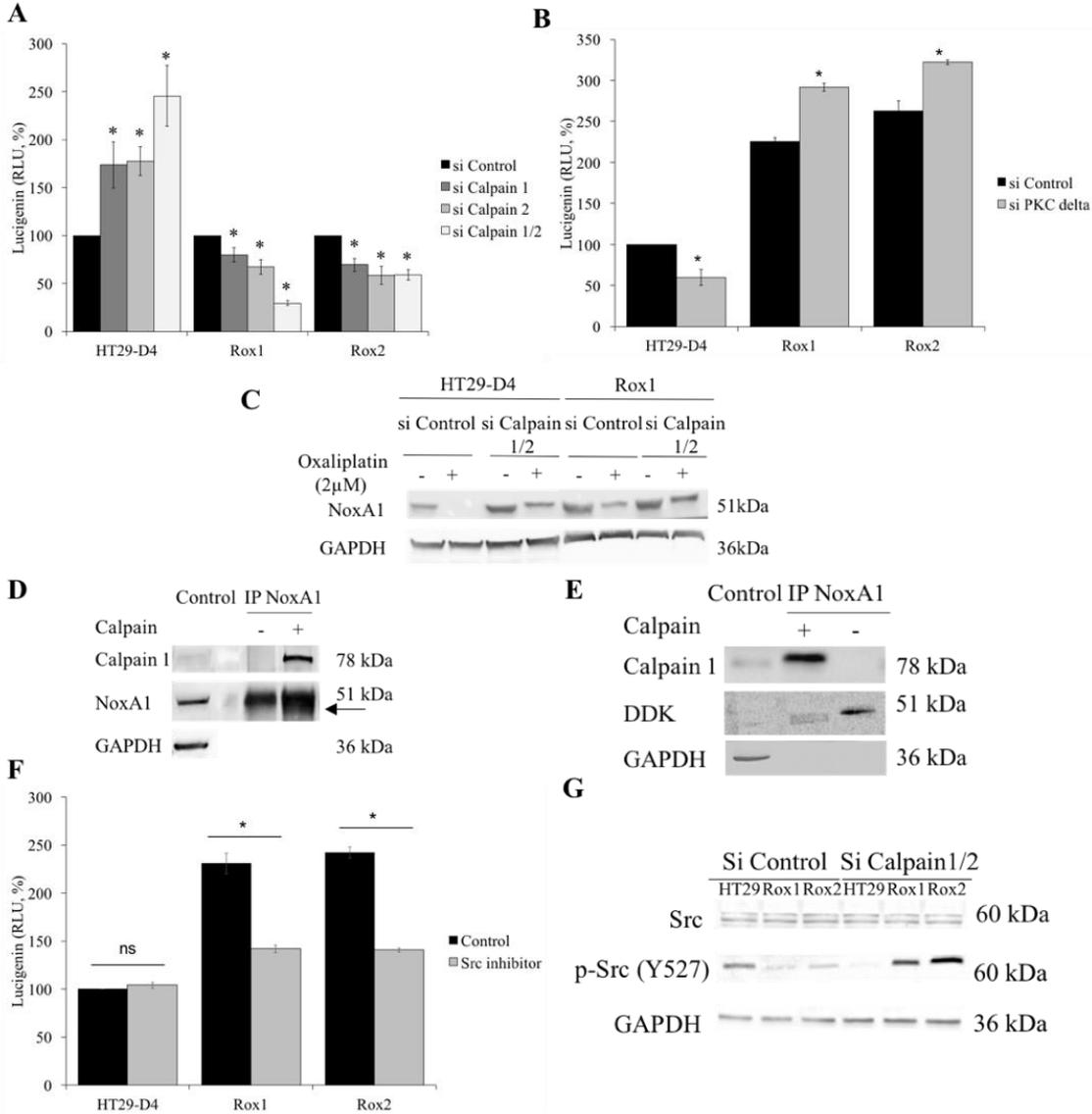


Figure 5: Regulation of Nox1 by calpain.

HT29-D4, Rox1 and Rox2 cells were transfected with control siRNA (si Control), calpain 1 specific siRNA (si Calpain 1), calpain 2 specific siRNA (si Calpain 2) or with both siRNA (si Calpain 1/2). The cells were seeded in white 96-well plates to perform lucigenin assays (A), and in 6-well plates to perform Western blots after oxaliplatin treatment (2 μM) (C). HT29-D4, Rox1 and Rox2 cells were transfected with control siRNA (si CTRL) or PKC d specific siRNA (si PKC delta) and seeded in a white 96-well plate to perform lucigenin assays (B). NoxA1 was immunoprecipitated from HT29-D4 lysates and incubated with purified calpain 1. The samples were then processed for immunoblotting using antibodies against calpain 1, NoxA1 and GAPDH (Control: total lysate before IP, D). HT29-D4 cells were transfected with a plasmid encoding NoxA1-DDK. The cells were lysed, and NoxA1 was immunoprecipitated (IP NoxA1) and incubated with purified calpain 1. The samples were then processed for

immunoblotting using antibodies against calpain 1, DDK tag and GAPDH (E). HT29-D4, Rox1 and Rox2 cells were seeded in white 96-well plates to perform lucigenin assays in the absence (Control) or in the presence of Src inhibitor (F). HT29-D4 (HT29), Rox1 and Rox2 cells were transfected with control siRNA (si Control), or both calpain 1 and calpain 2 specific siRNAs (si Calpain 1/2). The cells were then lysed and the proteins were processed for immunoblotting using antibodies against Src, p-Src (tyrosine 527) and GAPDH (G). Asterisks indicate a statistical significance with $p < 0.05$.

Src and p38 MAPK kinases are involved in the resistance to oxaliplatin

To have a better understanding of the pathways involved in the resistance of our cells to oxaliplatin, we have performed a screening of the kinase activities of our sensitive and resistant cells, incubated in the absence or in the presence of oxaliplatin during 45 minutes and 4 hours. The kinase activity was measured using PamGene technology and the BioNavigator software. The data obtained in the absence of oxaliplatin clearly show that the activity of Src kinases is increased in the resistant cells in comparison to the sensitive cells (Figure 6A). Indeed, the kinases of the Src family were in the top kinase list with high specificity scores (1.47 for BLK, 0.80 for SRC and 0.40 for YES1) and high normalized kinase statistics (2.10, 2.02 and 1.82 for BLK, SRC and YES1, respectively). These data show that Src kinases are strongly activated in our resistant cells, confirming the results obtained by studying Src phosphorylation. The treatment of our cells with oxaliplatin for 4 hours induces a major and significant increase of p38 MAPK activity, as shown in Figure 6B. Indeed, the kinases of the p38 MAPK family were in the top list with high specificity scores (2.7 for p38 α MAPK (MAPK 14), 1.9 for p38 γ MAPK (MAPK12) and 1.4 for p38 δ MAPK (MAPK 11)) and high normalized kinase statistics (1.5, 1.5 and 1.3 for p38 α MAPK, p38 γ MAPK and p38 δ MAPK, respectively; Figure 6B). These results show that p38 MAPK are activated by oxaliplatin in our resistant cells. p38 MAPK is well known to be strongly implicated in cell survival, notably in response to chemotherapy.

To complete these data and observe the effects of oxaliplatin on the various signaling pathways, we performed a screening of signaling pathways using the Cell Signaling Technology PathScan (Figure 6, supplemental Figure 8). Our results show major modifications in the activation of several signaling pathways. First of all, oxaliplatin was able to induce the phosphorylation of p53 in both the sensitive and the resistant cells, but failed to

induce to cleavage of PARP in our resistant cells (Figure 6C-6D). Indeed, in the sensitive cells the cleavage of PARP was increased from 100% to $344.8 \pm 3.7\%$ by oxaliplatin. On the opposite, in Rox1 and Rox2 cells, the cleavage was reduced from $160.1 \pm 2.4\%$ and $147.4 \pm 5.0\%$ to $72.5 \pm 16.8\%$ and $86.7 \pm 0.9\%$, respectively. These data were confirmed by Western blots (Figure 6D). The cleavage of caspase 3 was too weak to be analyzed (data not shown). This study using the PathScan also confirmed the results obtained for p38 MAPK using PamGene technology. Indeed, the oxaliplatin treatment induced a strong increase of p38 MAPK phosphorylation in both Rox1 and Rox2 cells, by more than 2 folds, while it had no effect in the sensitive cells (Figure 6E-6F). The levels of phosphorylation of the other signaling pathways measured by the PathScan were too weak to be analyzed (data not shown).

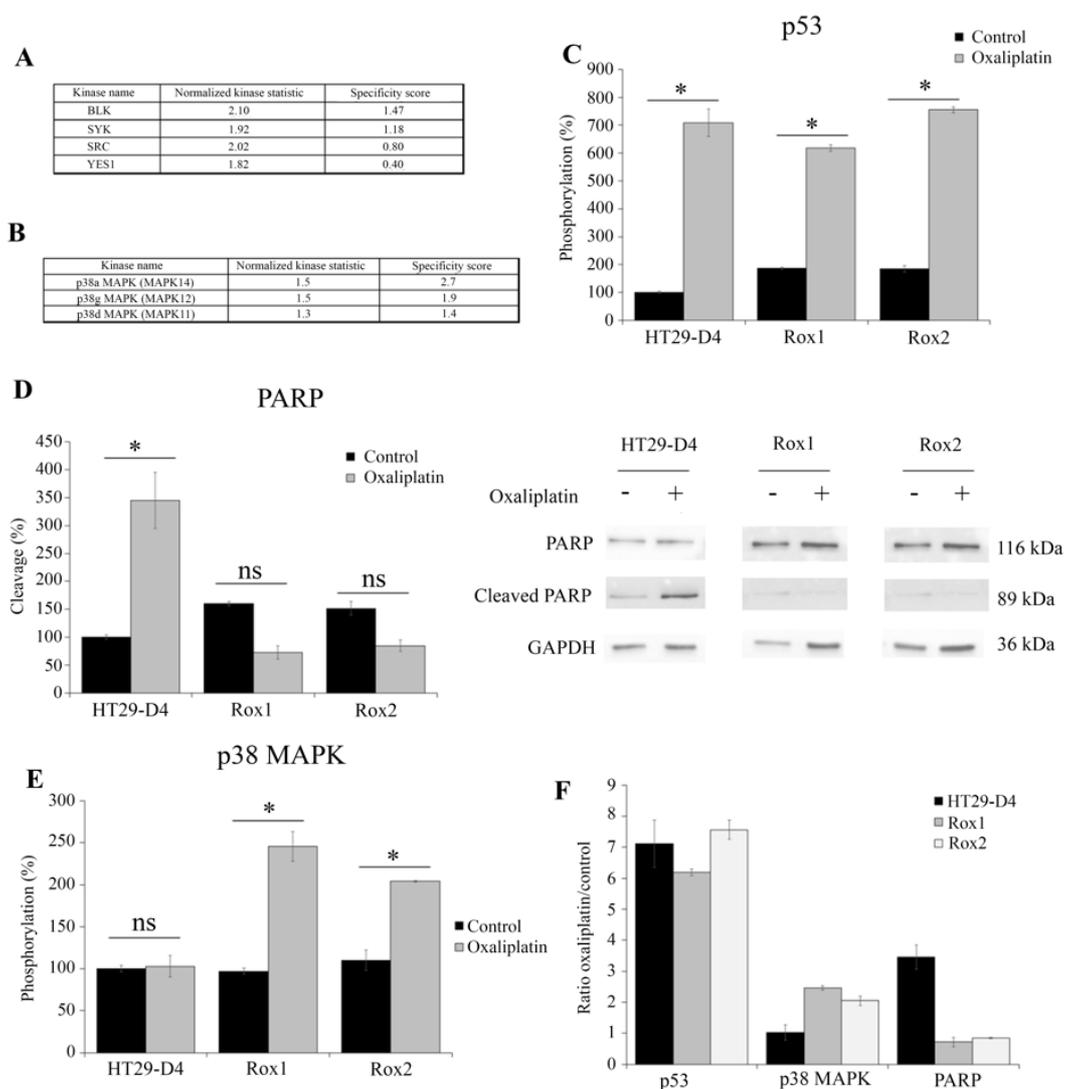


Figure 6: Comparison of HT29-D4, Rox1 and Rox2 signaling pathways.

HT29-D4 and Rox1 cells were seeded in 6-well plates and incubated in the absence or in the presence of 2 μM of oxaliplatin for 4 hours. The cells were lysed and 0.5 μg of proteins were used for PamGene kinase activity assay. The data were analyzed using the BioNavigator software to compare the kinase activity of HT29-D4 and Rox1. The top kinase lists obtained in the absence of in the presence of oxaliplatin are presented in **A** and **B**, respectively. A positive normalized kinase statistic value indicate a kinase activity higher for Rox1 than for HT29-D4. HT29-D4, Rox1 and Rox2 cells were seeded in 6-well plates and were treated in the absence (Control) or in the presence of 100 μM of oxaliplatin (Oxaliplatin) for 24 hours. The cells were then lysed and 37.5 μg of proteins were used for the PathScan assay. The data were analyzed and the phosphorylation levels of p53 (**C**) and p38 (**E**) as well as the cleavage of PARP (**D**) were compared. HT29-D4, Rox1 and Rox2 cells were seeded in 6-well plates and incubated in the absence (control) or in the presence of 100 μM of oxaliplatin. The cells were lysed and equal amounts of proteins were processed for immunoblotting using antibodies against GAPDH, PARP and cleaved PARP (Asp214) The effects of oxaliplatin were visualized by calculating the ratio between the treated and untreated cells (**F**). Asterisks indicate a statistical significance with $p < 0.05$.

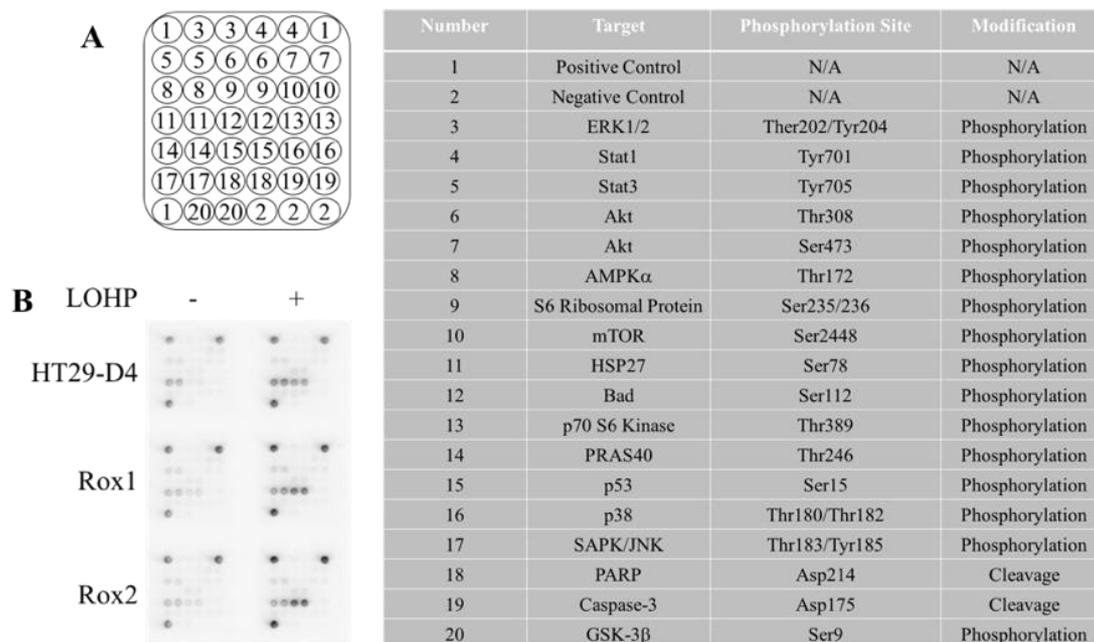


Figure S.7: Signaling pathway study using PathScan Array.

Target map of PathScan Array allowing the simultaneous detection of 18 important and well-characterized signaling molecules when phosphorylated or cleaved (**A**). HT29-D4, Rox1 and Rox2 cells were seeded in 6-well plates and were incubated in the absence or in the presence

of oxaliplatin for 24 hours. The cells were then lysed and 37.5 µg of cellular proteins were used for the PathScan assay. The raw data were obtained using the G box imaging system (**B**).

A

n°	Protein kinase name	Specificity score	Normalized kinase statistic
1	p38g MAPK (MAPK12)	2.7	0.42
2	p38b MAPK (MAPK11)	2.7	0.42
3	p38a MAPK (MAPK14)	2.7	0.42
4	CHED	2.7	0.5
5	JNK3 (MAPK10)	2.7	0.43
6	JNK2 (MAPK9)	2.7	0.43
7	JNK1 (MAPK8)	2.7	0.43
8	p38d MAPK (MAPK13)	2.5	0.39
9	ERK5 (MAPK7)	2.4	0.4
10	ERK2 (MAPK1)	1.7	0.36
11	ERK1	1.7	0.36
12	MAK	1.6	0.65
13	CDK3	1.4	0.41
14	CDK1 (CDC2)	1.4	0.41
15	ATR	0.8	0.34

B

n°	Protein kinase name	Specificity score	Normalized kinase statistic
1	p38g MAPK (MAPK12)	1.4	0.6
2	p38d MAPK (MAPK13)	1.4	0.57
3	PRKY	1.1	0.57
4	GSK3A	1	0.53
5	NDR2 (KIAA0965)	0.9	0.57
6	PRKX	0.8	0.48
7	p70S6Kb (RPS6KB2)	0.8	0.48
8	DNAPK/PRKDC	0.8	0.56
9	CHK2 (CHEK2)	0.6	0.48

C

n°	Protein kinase name	Specificity score	Normalized kinase statistic
1	p38d MAPK (MAPK13)	2.4	0.34
2	p38b MAPK (MAPK11)	2.0	0.39
3	p38a MAPK (MAPK14)	1.8	0.41
4	JNK3 (MAPK10)	1.8	0.39
5	JNK2 (MAPK9)	1.8	0.39
6	JNK1 (MAPK8)	1.8	0.39
7	p38g MAPK (MAPK13)	1.8	0.36
8	ERK5 (MAPK7)	1.8	0.35
9	ERK1	1.6	0.29
10	CHED	1.5	0.46
11	ERK7 (BI916334)	1.4	0.70
12	ATR	1.4	0.41
13	CDK2	1.2	0.30
14	CDK3	1.0	0.32
15	CDK1 (CDC2)	1.0	0.35

Figure S.8: Comparison of serine/threonine kinase activities in Rox1 treated with oxaliplatin.

Rox1 cells were seeded in 6-well plate and treated with 2 µM of oxaliplatin during 45 minutes, 4 hours and 24 hours. The cells were lysed and 0.5 µg of cellular protein were processed using the PamGene kinase activity assay. The kinase activities of untreated and treated Rox1 cells were compared. The kinases presenting the strongest modifications after 45 minutes, 4 hours and 24 hours of treatment are presented in **A**, **B** and **C**, respectively. A positive normalized kinase statistic indicates a kinase activity increased by oxaliplatin treatment.

p38 MAPK plays a major role in the resistance to oxaliplatin

Our results obtained with PamGene technology and Cell Signaling PathScan suggest a potential implication of p38 MAPK pathway in the resistance of our cells to oxaliplatin. To confirm this involvement, we have studied the phosphorylation status of p38 MAPK in our sensitive and resistant cells. As shown in Figure 7A, p38 MAPK phosphorylation is weak in

both our sensitive and resistant cells. However, oxaliplatin induces the phosphorylation of p38 MAPK in the resistant cells but not in the sensitive ones. These results confirm those obtained with the PathScan assay.

We have then studied the effects of the down-regulation of Nox1 expression on the phosphorylation of p38 MAPK. Our results show that the inhibition of Nox1 expression has a very limited effect on the phosphorylation of the p38 MAPK in the sensitive cells (Figure 7B). On the opposite, in Rox1 and Rox2 cells, the repression of Nox1 induces a very strong inhibition of the phosphorylation of p38 MAPK, even leading to the inhibition of p38 MAPK expression in Rox2 cells (Figure 7C-7D).

As p38 MAPK pathway activation is well known to be involved in cell survival, we have studied the effects of a specific p38 MAPK inhibitor on the cytotoxic effects of oxaliplatin on our three sub-lines. The IC₅₀ of oxaliplatin for HT29-D4 cells was not modified by the inhibitor, increasing only from $1.0 \pm 0.3 \mu\text{M}$ in the absence of SB203580 to $1.2 \pm 0.6 \mu\text{M}$ in the presence of this inhibitor (Figure 7E). The involvement of p38 isoform in the resistance to oxaliplatin was confirmed using this inhibitor on resistant cells. Indeed, the repression of p38 activity induced a strong increase of oxaliplatin efficiency, the IC₅₀ being reduced to $1.9 \pm 0.6 \mu\text{M}$ for Rox1 and $2.8 \pm 0.1 \mu\text{M}$ for Rox2 ($p < 0.05$; Figure 7E).

To understand how p38 MAPK acts on the effects of oxaliplatin, we analyzed the induction of apoptosis in our cells by studying the cleavage of PARP. As shown in Figure 7F, oxaliplatin was able to induce the cleavage of PARP in our sensitive cells, while it failed to do so in the resistant ones. However, we observed a strong induction of the cleavage of PARP in our resistant cells when the cells are treated with oxaliplatin in combination with p38 inhibitor SB203580 (Figure 7F).

Taken together, these data show that the ROS produced by Nox1 in the resistant cells induced the activation of p38 MAPK leading to an inhibition of apoptosis and thus to cell survival.

Discussion

Resistance to chemotherapy is one of the major factors limiting the effectiveness of the treatments, particularly in colorectal cancer. Previous works have shown an important role of ROS (especially produced by Noxs and Duoxs) as they are necessary for the cytotoxicity of oxaliplatin [5,17,18] We showed here that the impact of ROS is also major in the context of colorectal cancer cells resistant to oxaliplatin. The inhibition of the production of ROS,

particularly by Nox1, induced a further increase of the IC₅₀ values in the resistant cells. These results confirm that, as in sensitive cells, ROS from Nox1 are involved in the cytotoxicity of oxaliplatin. Paradoxically, resistant cells exhibit a basal level of ROS produced by Nox1 almost twice as high as sensitive cells. However, the oxaliplatin treatment of the resistant cells leads to a reduction in the level of concomitant superoxide ion to an increase in the production of hydrogen peroxide inducing the activation of the survival pathways in the resistant cells. The activation of these survival pathways relies on the activation of p38 MAPK downstream of Nox1 in resistant cells. In agreement with this result, Shi et al. have shown that ROS can protect cells against oxaliplatin-induced cell death by activating autophagy [19].

The complexity of regulation of ROS, the diversity of species produced and the diversity of their cellular impact represents a limit to the use of modulators of oxidative stress for therapeutic purposes. To understand how to modulate oxidative stress to improve the effectiveness of anti-cancer therapies, numerous studies have focused on the role of superoxide and hydrogen peroxide. The intracellular concentration of H₂O₂ has been shown to be critical because it reaches the toxicity threshold in tumor cells. Increasing the level of H₂O₂ for normal cells tends to stimulate proliferation whereas in cancer cells it slows down tumor proliferation and leads to the death of an apoptotic cell [20]. Conversely, any agent that decreases intracellular levels of H₂O₂ improves tumor growth [21]. Moreover, in tumor cells, it appears that a predominant increase of superoxide favors cell survival and oncogenesis whereas an inclination in favor of hydrogen peroxide prevents carcinogenesis by facilitating the signaling of cell death [22]. Our results on sensitive colorectal cancer cells are consistent with the mechanism previously described. The production of superoxide and hydrogen peroxide induced by oxaliplatin treatment promotes the cytotoxicity of oxaliplatin and depends mainly on the activation of Nox1 (Figure 2E and F). Furthermore, the increase in superoxide ion production in basal cell resistant cells is associated with a greater proliferation of cells on 3D culture models (Figure 1C). Our data add a new piece to the puzzle by showing that the transient increase of ROS production observed in sensitive cells leads to the activation of apoptosis, while superoxide ions will be extremely rapidly transmuted into peroxide in resistant cells, leading to cell survival. This study shows once again the double and antinomic role played by ROS in cancer and highlights the very fine limit of regulation existing in these cells [23,24]. These data are shown for an oxaliplatin concentration of 2 μ M (toxic for sensitive cells and poor effect on resistant cells), which represents the plasma concentration in the treated patients. It should be noted that we have observed this dismutation like effect on sensitive cells at oxaliplatin concentrations of 100 μ M but in this situation the shift of

superoxide to hydrogen peroxide induced cell death [5]. Thus, this phenomenon would be triggered at doses much higher than the plasma concentrations of oxaliplatin in the sensitive cells compared to the resistant cells. Finally, in our model, the production of H₂O₂ in our cells returned to the basal level at 24h of treatment and therefore does not seem compatible with an increase in Duox2 expression as observed in a recent study [17].

The level of expression of Nox1 and some of its regulatory partners is known to be increased in colorectal cancer and could explain the increase in Nox1 activity observed in our resistant cells [25,26]. In our study, we did not observe any increase in the expression of Nox1 or NoxO1 between resistant or sensitive cells under treatment with oxaliplatin. However, we observed a significant increase of NoxA1 expression in our resistant cells consistent with the observed increase in Nox1 basal ROS production.

In order to identify the signaling pathways involved in the resistance to oxaliplatin, we carried out kinomic screening using PamGene array and PathScan signaling array. Our data obtained using PamGene show an increase in Src kinase and p38 MAPK activation in the resistant cells, in comparison to the sensitive ones. Consistent with our result, p38 MAPK is strongly involved in cell survival and linked to the resistance to irinotecan and 5-FU in colorectal cancer cells [27,28]. Our data also show an absence of activation of the effectors of apoptosis in our resistant cells after treatment with oxaliplatin. There is indeed a decrease in the cleavage of PARP and an absence of cleavage of the caspase 3. There would therefore be a dysfunction at the level of one of the effectors of the apoptosis [29]. We also observed an increase of PRAS40 phosphorylation in our sensitive cells in the presence of oxaliplatin, while the phosphorylation of this protein was decreased in our resistant cells. This result is surprising as it was shown that a decrease of PRAS40 phosphorylation can increase apoptosis and reduce tumor development [30,31]. However, it has been shown that the decrease of PRAS40 phosphorylation can also prevent apoptosis in HeLa cells through Akt and/or Pim1 activation [30]. Finally, we confirmed with the PathScan array that p38 MAPK activity was increased in resistant cells compared to sensitive cells. Several publications have highlighted the connection existing between the ROS produced by Nox1 and the activation of p38 MAPK [32]. We have observed that p38 MAPK was strongly phosphorylated and thus activated in our resistant cells. This activation of p38 MAPK is required for the resistance of cells to oxaliplatin as the use of a p38 MAPK inhibitor (SB203580;10 μ M) strongly reduces the IC₅₀ of oxaliplatin for these cells. Using siRNA, we could show that the ROS produced by Nox1 are required for the activation of p38 MAPK in the resistant cells.

Previous works have highlighted that calpains have also antinomic roles in the response of cancer cells to chemotherapies. Indeed, it was shown that calpains are involved in both the cytotoxic effects induced by chemotherapy and the resistance to the treatments, depending on the type of cancer. In colorectal cancer, a recent study has shown that calpain 2 is involved in the resistance of cancer cells to irinotecan [16]. To have a better understanding of the roles played by calpains in the resistance to oxaliplatin, we have compared the expression and activity of the ubiquitous calpains between our sensitive and resistant cells. Our data show that the expression levels of calpain 1 and calpain 2 are not modified but that their activity is strongly increased. Our results also show that both calpains are responsible for this activity increase. This calpain over-activation in our resistant cells can be surprising as several publications have shown that chemotherapy molecules can induce apoptosis by activating calpains via short-term induction of calcium influx [15,33]. Our data show that the inhibition of calpains in resistant cells induces a significant increase in their resistance. We can thus hypothesize that oxaliplatin activates calpains to induce the apoptosis of our resistant cells, but that dysfunctions in the apoptotic pathways lead to cell survival [29]. To complete these data, we have studied the different pathways that could be responsible for this calpain over-activation in our resistant cells. It is well known that calpains are activated by calcium and by ERK/MAPK pathway but it was also shown that ROS can regulate calpain activity [8,9,34,35]. Our results exclude the hypothesis of a stimulation of calpains due to the over-production of ROS, as the inhibition of Nox1 by DPI had no effect on calpain activity. Similarly, the inhibition of MEK1 using PD98059 induced no change in the activity of calpains.

Our data support the hypothesis of an activation of calpains by calcium influxes. Indeed, we have observed a significant increase of the intracellular concentration of calcium in our resistant cells in comparison to the sensitive ones. We were also able to show for the first time that PKC delta regulates negatively calpain activity. Indeed, an inhibition of PKC delta leads to a significant increase in calpain activity. However, complementary studies will be required to know if this regulation has a role in the development of the resistance to oxaliplatin and how this regulation is mediated.

Our data exclude a regulation of calpain activity by Nox1-produced ROS in our cells, however it is possible that calpains regulate Nox1 activity. Several studies have highlighted the existence of regulatory links between calpains and NADPH oxidases, however these regulations are different depending on the cell types studied. As said before it was proved that ROS can regulate calpain activity [34,35], but the opposite was also shown. Chen and

colleagues have shown that the inhibition of calpains results in reduction of ROS [36]. In addition, some agents increase calpain activity via calcium, resulting in an inhibition of ROS production [37]. Silibinin was also shown to induce an increase of calpain activity leading to an increase of ROS production [38]. Our experimental data show that the repression of calpain expression, and therefore of calpain activity, leads to a strong inhibition of the production of ROS in our resistant cells. However, in our sensitive cells the inhibition of calpain 1 or both calpains 1 and 2 induced an increase of ROS production. These results show a positive regulation of Nox1 by the ubiquitous calpains in the resistant cells, while calpains are negatively regulating Nox1 in the sensitive HT29-D4 cells. We are thus showing for the first time an inversion of regulation of Nox1 by calpains according to the resistance status of our cancer cells. These observations are confirmed by the results that we obtained when inhibiting PKC delta expression. Indeed, the repression of PKC delta expression induced an increase of calpain activity in both our sensitive and resistant cells, leading to an increase of superoxide production in sensitive cells and to a decrease of this production in our resistant cells.

In order to have a better understanding of this inversion of regulation, we have studied and characterized both the inhibition of Nox1 by calpains in the sensitive cells and the activation observed in the resistant ones. Concerning the inhibition observed in the sensitive cells, we hypothesized that calpains could cleave one or several components of Nox1 complex. Nox1 requires NoxA1, NoxO1 and Rac1 to be active. None of these proteins are known as calpain substrates. Tiam1, a Rac1 activator, was shown to be cleaved by calpains in fibroblasts [39], however no cleavage was observed in our cells (data not shown). Using a cleavage prediction program (CalCleave; calpain.org), we observed that only NoxA1 could be cleaved by calpains. This prediction correlates with our data. Indeed, we observed that oxaliplatin induced a disappearance of NoxA1 in our cells, however this depletion was partially inhibited when calpain expression was repressed. The depletion of NoxA1 could thus be the result of a degradation mediated by calpains. The incubation of immunoprecipitated NoxA1 with purified calpain 1 led to the appearance of a cleaved NoxA1 band, confirming the existence of one site of cleavage. The cleaved NoxA1 being around 49kDa, the cleavage site is located at one extremity of the protein. Using an immunoprecipitated DDK-tagged NoxA1 we could show that the cleavage is occurring at the C-terminus of NoxA1. This cleavage is thus occurring in a SH3 domain, known to be involved in the binding of NoxA1 to NoxO1 required for the activation of Nox1 (Supplemental Figure 5). It is the first time that NoxA1 is identified as a calpain substrate. This cleavage explains how calpains regulate

negatively Nox1 activity in our sensitive cells. In these cells, oxaliplatin induces a strong increase of ROS production by activating Nox1. Calpains, also activated by oxaliplatin, cleave NoxA1, thus inhibiting Nox1 and reducing ROS production to a regular level, as observed after a 24-hour treatment with oxaliplatin. This short-term peak of ROS production leads to cell apoptosis. In these cells, calpains and Nox1 are both involved in the cytotoxic effects of oxaliplatin.

In our resistant cells, the oxaliplatin-induced cleavage of NoxA1 by calpains is present however the increase of expression of NoxA1 (Figure 2C, Supplemental Figure 3C) in these cells reduce the efficiency of this ROS production inhibition compared to sensitive cells. This difference could be due to different locations of calpains and NoxA1. Src kinase is an excellent candidate to explain this regulation. It is known that Src can phosphorylate NoxA1 on tyrosine 110 in HT29 cells, thus increasing the production of ROS [40]. It was also previously shown that calpain 2 can induce the activation of Src kinase by cleaving PTP1B [41]. Src kinase activity is inhibited by a phosphorylation on tyrosine 527. PTP1B is a phosphatase, activated by calpain cleavage, known to dephosphorylate the tyrosine 527 of Src, leading to the kinase activation. We can thus hypothesize that calpain could induce Nox1 activation by derepressing Src activity. As we showed that Src activity is decreased in resistant cell using the PamGene array, we confirmed that hypothesis by studying Src phosphorylation and by using Src inhibitor (Figure 5F-5G). Indeed, we have observed that Src is less phosphorylated and thus more active in our resistant cells compared to sensitive cells. Moreover, the inhibition of Src in these cells strongly reduced the production of ROS, while it has no effect in the sensitive cells. The implication of calpains in this phenomenon was confirmed using siRNA. The repression of ubiquitous calpain expression led to the phosphorylation of Src, and thus to its inactivation. Taken together our data clearly show that calpains inhibit Nox1 in the sensitive cells by cleaving NoxA1, while they activate Nox1 activity by activating Src kinase.

Taken together, our results allow us to have a better understanding of the mechanism of resistance of cancer cells to oxaliplatin and to propose a new model presented in Figure 8. We could identify a new calpain/Nox1 pathway, regulated differently according to the resistance status of the cells. We have also identified NoxA1 as a new calpain substrate. In sensitive cells oxaliplatin induces the activation of Nox1 and thus the production of ROS. The activation of calpains leads to the cleavage and degradation of NoxA1, reducing Nox1 activity and returning ROS production to regular levels. The short-term peak of ROS induces the activation of p53, PARP and caspase 3 leading to cell death. It is important to note that

p53 mutation status seems to have no impact on the resistance of our cell lines to oxaliplatin. Indeed we obtained similar results using HT29-D4 and RKO cells while these cells present a different p53 mutation status (R273H mutation in HT29-D4 cells, wild-type p53 in RKO cells). In the resistant cells, the strong calcium concentration induces calpain activation, leading to Src and thus Nox1 activation. The strong ROS production, maintained at high levels, induces the activation of p38 MAPK and thus cell survival. Our data also show that ROS are involved in both cell survival and cell death, per the level of their production. If the production is too low, oxaliplatin is unable to activate cell death, however if ROS production is too high, it leads to the activation of survival pathways through p38 MAPK activation. As p38 MAPK inhibitor are now under clinical evaluation for colorectal cancer treatment, it is interesting to consider that a strategy leading to maximize Nox1 activity associated to the inhibition of p38 MAPK would be beneficial for patients, particularly those resistant for oxaliplatin treatment.

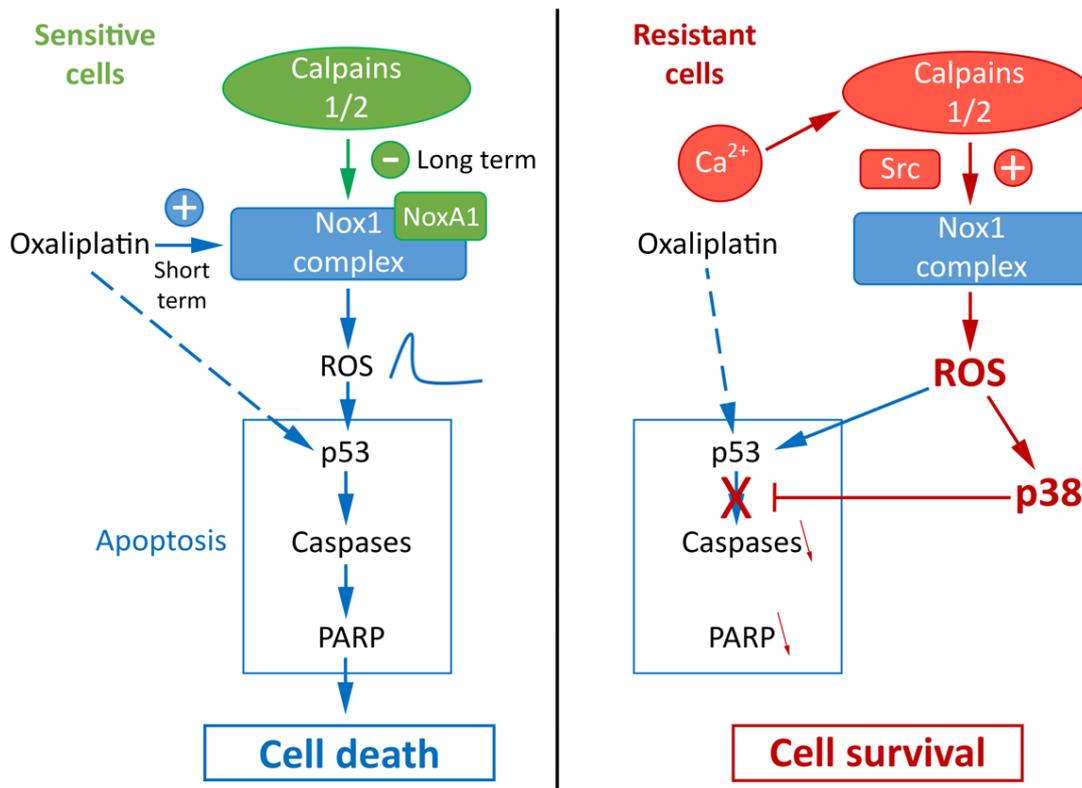


Figure 8: Proposed model for the regulation of oxaliplatin effects by calpains, Nox1 and p38 in sensitive and resistant colorectal cancer cells.

Material and methods

Tumor cell lines and culture conditions

Two human colon carcinoma cell lines, HT29-D4 and RKO, were routinely maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% fetal bovine serum (FBS) (GIBCO Cell Culture systems, Invitrogen), supplemented with 2 mM L-glutamine, at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. HT29-D4 cell line was originally derived from HT29 colon adenocarcinoma cell line [42].

Reagents and antibodies

Most of the reagents were supplied by Sigma-Aldrich.

The following reagents were used: oxaliplatin (L-OHP) stored at 5.4 mg/mL (12.5 mM) and used at different concentrations; apocynin, inhibitor of ROS production [43], stored at 100 mM and used at 0.5 mM (concentration validated by previous works); DPI (Merck Millipore) inhibitor of ROS production, stored at 10 mM and used at 10 μM (concentration validated by previous works); the ML171 (Merck Millipore), a Nox1 specific inhibitor, stored at 10 mM and used at 1.5 μM (in agreement with the IC₅₀ values provided by the manufacturer); the MDL28170 (Calbiochem, Merck Millipore), a specific calpain inhibitor, stored at 200 mM and used at 2.5 μM; the PD98059 (Calbiochem, Merck Millipore), a specific MEK1 inhibitor, the SB203580, a specific p38 MAPK inhibitor, stored at 10 mM and used at 10 μM. The following primary antibodies were used: anti-calpain1 (diluted at 1/1,000, ref. 2556, Cell Signaling Technology); anti-calpain 2 (diluted at 1/1,000, ref. 2539, Cell Signaling Technology); anti-DDK tag (FLAG) (diluted at 1/ 1,000, ref. TA50011, Origene Technologies); anti-GAPDH (1/20,000, ref. G8795); anti-Nox1 (1/1,000, ref. ab121009, Abcam); anti-NoxA1 (1/1,000, ref. ab68523, Abcam); for NoxA1 immunoprecipitation: anti-NoxA1 (ref. H00010811-PW1, Abnova); anti-NoxO1 (1/1,000, ref. ab34761, Abcam); anti-p38 MAPK (1/1,000, ref. sc-535, Santa Cruz); anti-phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (1/500, ref. sc17852, Santa Cruz); anti-PARP and anti-cleaved PARP (1/1,000, ref. 9542 and 9541, respectively, Cell Signaling Technology); anti-vinculin (1/20,000, ref. V9264). The HRP-coupled secondary antibodies were purchased from Cell Signaling Technology.

Selection of oxaliplatin-resistant cell lines

Resistance to oxaliplatin (L-OHP) was induced by exposing the sensitive cells to increasing concentrations of the drug. The initial dose was 0.01 $\mu\text{g/mL}$ and the final concentration, 0.87 $\mu\text{g/mL}$ (2 μM), corresponds to the clinically relevant plasma concentration of oxaliplatin [44]. The oxaliplatin concentration was increased every two passages in two different ways: rapidly (for Rox1 cells) and slowly (for Rox2 cells). For Rox1 cells, the concentration was doubled, while it was increased by 0.1 $\mu\text{g/mL}$ (0.25 μM) for Rox2. Once selected, the resistant cells were grown in the regular culture medium supplemented with 0.87 $\mu\text{g/mL}$ oxaliplatin. For both HT29-D4 and RKO cell lines two groups were considered for investigations: the parental cells and the chemo resistant cells (HT29-D4-Rox1 and 2, and RKO-Rox1 and 2).

Cytotoxicity assay

Cell viability was determined using the MTT assay. This assay is based on the ability of mitochondrial dehydrogenase enzyme to convert the yellow water-soluble tetrazolium 3-(4,5-dimethyl-thiazolyl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) into violet formazan compound, whose absorbance is proportional to the amount of living cells. After counting and plating the sensitive or resistant (Rox) cells (50,000 cells/mL) in 96-well plates with DMEM culture medium, the cells were exposed to increasing concentrations of the drug (from 0 to 100 μM) for 72 hours. The culture medium was then replaced with DMEM containing 0.5 mg/mL MTT. After a 2-hour incubation, the cells were lysed and the formazan solubilized using pure DMSO. The optical density (OD) was measured at 600 nm in a plate reader (Multiskan RC, Labsystems). The data were expressed as percentage of survival (using the untreated cells as 100%) and subjected to statistical analysis ($n = 5$). The IC_{50} were determined using the Chou and Talalay method [45].

3D MTT assay

After counting, the cells were seeded on a 96-well plate with round bottom, at a density of 1,000 cells per well in a medium containing 20% methylcellulose (6 g/L). After a 72-hour incubation allowing the spheroid formation, the cells were treated with increasing concentrations of oxaliplatin (from 0.25 μM to 100 μM). The treatment was renewed every 72

hours during 15 days. The medium was then removed and cells were incubated in culture medium containing 0.5 mg/mL MTT for 24 hours (time required for the total coloring of the spheroid). Medium containing MTT was then removed and the cells were lysed with pure DMSO. The optical density was measured at 600 nm using a plate reader (Multiskan RC, Labsystems). The IC_{50} were determined by the method of Chou and Talalay [45]. In addition, pictures of cells were taken every day to follow the spheroid evolution. Their areas were calculated using the NIH ImageJ software.

Preparation of cells extracts

The cells were washed in ice-cold PBS (phosphate buffered saline) and lysed in hypotonic lysis buffer (Tris buffered saline (TBS) pH 7.5, 0.1% Sodium dodecyl sulfate (SDS), 1 mM EDTA, 1% Triton X-100; cocktails of protease and phosphatase inhibitors (Halt phosphatase and Halt protease inhibitor kits, Thermo Fisher Scientific). Lysates were centrifuged at 11,300 g for 10 minutes at 4 °C to remove cell debris. A protein quantification assay was then performed using the Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad). Loading buffer (Laemmli sample buffer, 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 25% glycerol, 2% (SDS); bromophenol blue, 350 mM dithiothreitol (DTT)) was added to the proteins and the samples were denatured at 95°C for 5 minutes.

Western blotting

Protein samples were loaded (30 µg/lane) and separated on 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. The separated proteins were electrophoretically transferred on Nitrocellulose Blotting Membrane (Amersham Protan, GE Healthcare) using a transfer system (Bio-Rad). The membranes were incubated with blocking solution (5% nonfat milk) for 1 hour and then incubated overnight with the proper primary antibodies. The membranes were then washed three times with a PBST solution (PBS plus 0.05% Tween20) and incubated with horseradish-peroxidase-conjugated secondary antibodies for 1 hour. The membranes were again washed three times with PBST, and revealed using chemiluminescence HRP substrate (Merck Millipore) and the G-Box (Syngene). The band intensities were quantified using the NIH ImageJ software.

Calpain activity assay

The cells were seeded on a black bottom 96-well plate (20,000 cells per well). After 24 hours of culture, the cells were incubated with different treatments according to the experiment protocol. The cells were then incubated with 25 mM of t-boc-LM-CMAC, a fluorogenic calpain substrate provided by Invitrogen (Life Technologies). After a 25-minute incubation, the cells were washed with PBS and the fluorescence was quantified using a Fluoroskan (FL Fluoroskan Ascent, Labsystems; excitation wavelength: 355 nm, emission wavelength: 460 nm). The cells were then fixed in 1% glutaraldehyde for 10 minutes and stained with crystal violet (0.1%) for 30 minutes. After several washes with PBS, cells were lysed in pure DMSO and the optical densities were measured using a plate reader (Multiskan RC, Labsystems). The results obtained with the t-boc-LM-CMAC were normalized using the crystal violet OD values. They were then compared to the control condition and expressed as a percentage.

Measurement of superoxide production

The cells were seeded on a white 96-well plate (20,000 cells per well). After 24 hours of culture, the cells were incubated with the different treatments according to the experiment protocol. The cells were then incubated with 1 mM of NADPH (cofactor of the NADPH oxidases) and 10 μ M of lucigenin. The superoxide production was calculated by integrating the luminescence values measured every minute during a 45-minute period using a Fluoroskan plate reader (FL Fluoroskan Ascent, Labsystems). The cells were fixed with glutaraldehyde (1%) for 10 minutes and stained with crystal violet (0.1%) for 30 minutes. After several washes with PBS, cells were lysed in pure DMSO and the optical densities were measured using a plate reader (Multiskan RC, Labsystems). The results obtained with lucigenin (in RLU) were normalized using the crystal violet OD values. They were then compared to the control condition and expressed as a percentage.

Measurement of intracellular H₂O₂

The H₂O₂ generation was measured by dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂-DCFDA). After seeding of the cells in black 96-well plates (20,000 cells per well) and incubation for the desired time with the different treatments. The culture media were replaced by measurement buffer containing 10 μ M of H₂-DCFDA for 30 min. Cells were then washed with

measurement buffer without H₂-DCFDA, and fluorescence was measured at 37°C using the Fluoroskan Ascent FL fluorimeter (excitation: 490 nm, emission: 538 nm; Labsystems, France). The H₂O₂ production was calculated by integrating the fluorescence values measured every minute during a 1-hour period. The results obtained with DCFDA (in RFU) were normalized using the crystal violet OD values (for crystal violet staining see description above). They were then compared to the control condition and expressed as a percentage.

Measurement of extracellular H₂O₂

The cells were seeded on a black 96-well plate (20,000 cells per well). After 24 hours of culture, the cells were incubated with the different treatments according to the experiment. The cells were then treated with 50 µM Amplex Red reagent and 0.1 U/mL HRP (Amplex Red Hydrogen Peroxide/peroxidase Assay Kit, Invitrogen, USA) and were incubated at room temperature for 30 minutes protected from the light. The fluorescence was measured at 37°C using POLARstar Omega (excitation: 560 nm, emission: 590 nm; BMG LabTech, Germany). The results were normalized using the crystal violet OD values, compared to the control condition and expressed as a percentage.

Cell transfection

HT29-D4 sensitive and resistant cells were transfected with siRNAs directed against calpain 1 and/or 2 and against Nox1 (a scramble siRNA was used as a control). The 22-nucleotide long siRNA used in these experiments were purchased from Qiagen (siRNA calpain 1 target sequence: 5'-TAGGATCATCAGAAACACAA-3'; siRNA calpain 2 target sequence: 5'-CTCGGAGGCCATCACGTTTCA-3'; siRNA Nox1: target sequence not provided by the supplier). Transfections were performed by electroporation using the Nucleofector Technology (Lonza). Different experimental procedures were compared to optimize the transfection protocol used (3 million cells, 100 µL of Nucleofector T, 300 nM siRNA, W-017 program). After electroporation, the cells were seeded in complete culture medium and incubated for 24 hours. The cells were then used in the different experiments. A part of the cells was seeded separately to monitor the transfection efficiency by Western blot.

Immunoprecipitation and in vitro calpain degradation

NoxA1 immunoprecipitation was performed on HT29-D4 cells, transfected or not with the plasmid containing NoxA1-DDK gene. The cells were washed with cold PBS and incubated in RIPA buffer (Tris-HCl 50 mM, NP-40 1%, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, protease and phosphatase inhibitors (Halt protease and Halt phosphatase inhibitor cocktails, Thermo Fisher Scientific)) for 30 minutes at 4°C. After scrapping, the samples were sonicated for 20 seconds. Centrifugation was then carried out at 10,000 g for 10 minutes at 4°C. The lysates were incubated overnight at 4°C with 0.5 µg of primary antibody directed against NoxA1 (Abnova). The next day, 60 µg of protein A-sepharose beads (Roche) were added to the lysates and incubated for 1 hour at 4°C. The lysate-antibody-bead mixtures were centrifuged at 200 g for 5 minutes at 4°C and the beads were washed with RIPA buffer twice. To achieve in vitro calpain degradation, the beads were resuspended in a calcium buffer (50 mM HEPES pH 7.0, 50 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM DTT). Five micrograms of purified calpain 1 (Calbiochem, Merck Millipore) were then added to the samples. Control samples without purified calpain were also prepared. The samples were incubated at 37°C for an hour, with regular stirring. After addition of Laemmli sample buffer, the samples were boiled at 95°C for 5 minutes and centrifuged at 11,300 g for 10 minutes. The supernatants were then used to perform Western blots.

Measurement of cytosolic calcium variation

The cells, treated or not, were incubated in the Fura-2AM loading solution consisted of standard extracellular saline (SES; 10 mM HEPES pH 7.4, 135 mM NaCl, 5mM KCl, 1.2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 1 mM bicarbonate and 5 mM glucose) with 0.1% BSA and 10 µM Fura-2AM (Thermo Fischer Scientific) at 37°C for 30 min. The loading solution was then removed and the cells were equilibrated in fresh SES buffer for 15 min and detached using trypsin. The fluorescence of the cell suspensions (1 mL) was recorded using a SFM 25 (Kontron Instruments; excitation wavelengths: 340 and 380 nm, emission wavelength: 510 nm). The changes in the intracellular calcium concentration were monitored using the Fura-2 340/380 fluorescence ratio.

Intracellular signaling array

The PathScan Intracellular signaling array kit from Cell Signaling Technology was used to investigate the modification of the signaling pathway activation. After a 24-hour incubation in

the presence or in the absence of oxaliplatin, the cells were lysed with the lysis buffer supplied in the kit complemented with protease and phosphatase inhibitors (Halt phosphatase and Halt protease inhibitor cocktails, Thermo Fisher Scientific). The lysates were centrifuged at 2,000 g for 3 minutes at 4°C. The supernatant was removed and the proteins were quantified using the Precision Red Advanced Protein Assay from Cytoskeleton, Inc. The samples were diluted in lysis buffer to obtain a final concentration of 1.2 mg/mL in 50 µL. The slides were saturated for 15 minutes with a saturation buffer provided in the kit and 50 µL of the lysates were added to the different wells. After an overnight incubation at 4°C, the wells were washed during 5 minutes three times. The slides were incubated with the detection antibody provided in the kit for 1 hour at room temperature. After washing, the slides were treated with HRP-coupled streptavidin (provided in kit) for 30 minutes at room temperature. After another series of washes, the chemiluminescence was revealed using the Lumiglo/peroxide detection kit (provided by the manufacturer) and observed with the Syngene G-Box. The intensity of the chemiluminescence was quantified with NIH ImageJ software. After subtraction of the intensity of the negative control, the results were expressed as percentage using the positive control as 100%.

Kinase activity assay

To study the kinase activity, the Protein Tyrosine Kinase (PTK) and the Serine-Threonine Kinase (STK) assays from PamGene were used. The HT29-D4 or HT29-D4-Rox1 cells were treated with oxaliplatin for different incubation times, collected and lysed using the M-PER lysis buffer (Thermo Fisher Scientific). A protein quantification assay was then performed using the Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad). 5 µg and 1 µg were loaded on Protein Tyrosine Kinase and Serine-Threonine Kinase Pamchips, respectively. The phosphorylation of PamChip peptides were monitored by the PamStation® 12, following the provided protocols (PamGene). The images were quantified using BioNavigator software (PamGene).

Statistical analysis

For kinomic analysis, image analysis and signal quantification were performed using the BioNavigator® software (PamGene). Peptides that showed kinetics (increase in signal intensity in time) were preselected (“QC list”). For each peptide, the comparisons between

sensitive and resistant cells were performed using ANOVA. Kinexus Kinase Predictor was used to determine putative upstream kinases.

The Student's *t*-test was used to compare the means and to determine whether the differences observed in our experiments were significant or not. All data were made in triplicate and were repeated at least three times except for the PathScan array. The difference is considered to be significant when the *p* value is less than 0.05 (significativity greater than 95%). In our figures, the values represent the mean plus or minus the standard deviation and the significance is represented by an asterisk (*).

References

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015; 136: E359-386. doi: 10.1002/ijc.29210.
2. Van Cutsem E, Cervantes A, Nordlinger B, Arnold D, ESMO Guidelines Working Group. Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2014; 25 Suppl 3: iii1-9. doi: 10.1093/annonc/mdu260.
3. Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2007; 7: 573–84. doi: 10.1038/nrc2167.
4. Bécouarn Y, Ychou M, Ducreux M, Borel C, Bertheault-Cvitkovic F, Seitz JF, Nasca S, Nguyen TD, Paillot B, Raoul JL, Duffour J, Fandi A, Dupont-André G, et al. Phase II trial of oxaliplatin as first-line chemotherapy in metastatic colorectal cancer patients. Digestive Group of French Federation of Cancer Centers. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1998; 16: 2739–44. doi: 10.1200/JCO.1998.16.8.2739.
5. Dahan L, Sadok A, Formento J-L, Seitz JF, Kovacic H. Modulation of cellular redox state underlies antagonism between oxaliplatin and cetuximab in human colorectal cancer cell lines. *Br J Pharmacol*. 2009; 158: 610–20. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00341.x.
6. Dikalov S. Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases. *Free Radic Biol Med*. 2011; 51: 1289–301. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.06.033.
7. Rokutan K, Kawahara T, Kuwano Y, Tominaga K, Sekiyama A, Teshima-Kondo S. NADPH oxidases in the gastrointestinal tract: a potential role of Nox1 in innate immune response and carcinogenesis. *Antioxid Redox Signal*. 2006; 8: 1573–82. doi: 10.1089/ars.2006.8.1573.
8. Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J. The calpain system. *Physiol Rev*. 2003; 83: 731–801. doi: 10.1152/physrev.00029.2002.
9. Glading A, Bodnar RJ, Reynolds IJ, Shiraha H, Satish L, Potter DA, Blair HC, Wells A. Epidermal growth factor activates m-calpain (calpain II), at least in part, by extracellular signal-regulated kinase-mediated phosphorylation. *Mol Cell Biol*. 2004; 24: 2499–512.
10. Leloup L, Shao H, Bae YH, Deasy B, Stolz D, Roy P, Wells A. m-Calpain activation is regulated by its membrane localization and by its binding to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Biol Chem*. 2010; 285: 33549–66. doi: 10.1074/jbc.M110.123604.
11. Shiraha H, Glading A, Chou J, Jia Z, Wells A. Activation of m-calpain (calpain II) by epidermal growth factor is limited by protein kinase A phosphorylation of m-calpain. *Mol Cell Biol*. 2002; 22: 2716–27.
12. Leloup L, Wells A. Calpains as potential anti-cancer targets. *Expert Opin Ther*

Targets. 2011; 15: 309–23. doi: 10.1517/14728222.2011.553611.

13. Kulkarni S, Reddy KB, Esteva FJ, Moore HCF, Budd GT, Tubbs RR. Calpain regulates sensitivity to trastuzumab and survival in HER2-positive breast cancer. *Oncogene*. 2010; 29: 1339–50. doi: 10.1038/onc.2009.422.
14. Mandic A, Viktorsson K, Strandberg L, Heiden T, Hansson J, Linder S, Shoshan MC. Calpain-mediated Bid cleavage and calpain-independent Bak modulation: two separate pathways in cisplatin-induced apoptosis. *Mol Cell Biol*. 2002; 22: 3003–13.
15. Sergeev IN. Genistein induces Ca²⁺-mediated, calpain/caspase-12-dependent apoptosis in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 321: 462–7. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.06.173.
16. Fenouille N, Grosso S, Yunchao S, Mary D, Pontier-Bres R, Imbert V, Czerucka D, Caroli-Bosc F-X, Peyron J-F, Lagadec P. Calpain 2-dependent IκBα degradation mediates CPT-11 secondary resistance in colorectal cancer xenografts. *J Pathol*. 2012; 227: 118–29. doi: 10.1002/path.3034.
17. Santoro V, Jia R, Thompson H, Nijhuis A, Jeffery R, Kiakos K, Silver AR, Hartley JA, Hochhauser D. Role of Reactive Oxygen Species in the Abrogation of Oxaliplatin Activity by Cetuximab in Colorectal Cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2016; 108: djv394. doi: 10.1093/jnci/djv394.
18. Laurent A, Nicco C, Chéreau C, Goulvestre C, Alexandre J, Alves A, Lévy E, Goldwasser F, Panis Y, Soubrane O, Weill B, Batteux F. Controlling tumor growth by modulating endogenous production of reactive oxygen species. *Cancer Res*. 2005; 65: 948–56.
19. Shi Y, Tang B, Yu P-W, Tang B, Hao Y-X, Lei X, Luo H-X, Zeng D-Z. Autophagy protects against oxaliplatin-induced cell death via ER stress and ROS in Caco-2 cells. *PLoS One*. 2012; 7: e51076. doi: 10.1371/journal.pone.0051076.
20. Alexandre J, Nicco C, Chéreau C, Laurent A, Weill B, Goldwasser F, Batteux F. Improvement of the therapeutic index of anticancer drugs by the superoxide dismutase mimic mangafodipir. *J Natl Cancer Inst*. 2006; 98: 236–44. doi: 10.1093/jnci/djj049.
21. Nicco C, Laurent A, Chereau C, Weill B, Batteux F. Differential modulation of normal and tumor cell proliferation by reactive oxygen species. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother*. 2005; 59: 169–74. doi: 10.1016/j.biopha.2005.03.009.
22. Pervaiz S, Clement M-V. Superoxide anion: oncogenic reactive oxygen species? *Int J Biochem Cell Biol*. 2007; 39: 1297–304. doi: 10.1016/j.biocel.2007.04.007.
23. Kim J, Kim J, Bae J-S. ROS homeostasis and metabolism: a critical liaison for cancer therapy. *Exp Mol Med*. 2016; 48: e269. doi: 10.1038/emm.2016.119.
24. Galadari S, Rahman A, Pallichankandy S, Thayyullathil F. Reactive oxygen species and cancer paradox: To promote or to suppress? *Free Radic Biol Med*. 2017; 104: 144–64. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.004.
25. Wang R, Dashwood W-M, Nian H, Löhr CV, Fischer KA, Tsuchiya N, Nakagama H, Ashktorab H, Dashwood RH. NADPH oxidase overexpression in human colon cancers and rat colon tumors induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP). *Int J Cancer*. 2011; 128: 2581–90. doi: 10.1002/ijc.25610.
26. Laurent E, McCoy JW, Macina RA, Liu W, Cheng G, Robine S, Papkoff J, Lambeth JD. Nox1 is over-expressed in human colon cancers and correlates with activating mutations in K-Ras. *Int J Cancer*. 2008; 123: 100–7. doi: 10.1002/ijc.23423.
27. Yang SY, Miah A, Sales KM, Fuller B, Seifalian AM, Winslet M. Inhibition of the p38 MAPK pathway sensitises human colon cancer cells to 5-fluorouracil treatment. *Int J Oncol*. 2011; 38: 1695–702. doi: 10.3892/ijo.2011.982.
28. Paillas S, Boissière F, Bibeau F, Denouel A, Mollevi C, Causse A, Denis V, Vezzio-Vié N, Marzi L, Cortijo C, Ait-Arsa I, Askari N, Pourquier P, et al. Targeting the p38 MAPK

- pathway inhibits irinotecan resistance in colon adenocarcinoma. *Cancer Res.* 2011; 71: 1041–9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2726.
29. Gourdier I, Del Rio M, Crabbé L, Candeil L, Copois V, Ychou M, Auffray C, Martineau P, Mechti N, Pommier Y, Pau B. Drug specific resistance to oxaliplatin is associated with apoptosis defect in a cellular model of colon carcinoma. *FEBS Lett.* 2002; 529: 232–6.
30. Wiza C, Nascimento EBM, Ouwens DM. Role of PRAS40 in Akt and mTOR signaling in health and disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012; 302: E1453-1460. doi: 10.1152/ajpendo.00660.2011.
31. Bian S, Sun X, Bai A, Zhang C, Li L, Enjyoji K, Junger WG, Robson SC, Wu Y. P2X7 integrates PI3K/AKT and AMPK-PRAS40-mTOR signaling pathways to mediate tumor cell death. *PloS One.* 2013; 8: e60184. doi: 10.1371/journal.pone.0060184.
32. Pekarčíková L, Knopfová L, Beneš P, Šmarda J. c-Myb regulates NOX1/p38 to control survival of colorectal carcinoma cells. *Cell Signal.* 2016; 28: 924–36. doi: 10.1016/j.cellsig.2016.04.007.
33. Sareen D, Darjatmoko SR, Albert DM, Polans AS. Mitochondria, calcium, and calpain are key mediators of resveratrol-induced apoptosis in breast cancer. *Mol Pharmacol.* 2007; 72: 1466–75. doi: 10.1124/mol.107.039040.
34. Li Y, Li Y, Feng Q, Arnold M, Peng T. Calpain activation contributes to hyperglycaemia-induced apoptosis in cardiomyocytes. *Cardiovasc Res.* 2009; 84: 100–10. doi: 10.1093/cvr/cvp189.
35. Páramo B, Montiel T, Hernández-Espinosa DR, Rivera-Martínez M, Morán J, Massieu L. Calpain activation induced by glucose deprivation is mediated by oxidative stress and contributes to neuronal damage. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013; 45: 2596–604. doi: 10.1016/j.biocel.2013.08.013.
36. Chen B, Zhao Q, Ni R, Tang F, Shan L, Cepinskas I, Cepinskas G, Wang W, Schiller PW, Peng T. Inhibition of calpain reduces oxidative stress and attenuates endothelial dysfunction in diabetes. *Cardiovasc Diabetol.* 2014; 13: 88. doi: 10.1186/1475-2840-13-88.
37. Maddalena F, Laudiero G, Piscazzi A, Secondo A, Scorziello A, Lombardi V, Matassa DS, Fersini A, Neri V, Esposito F, Landriscina M. Sorcin induces a drug-resistant phenotype in human colorectal cancer by modulating Ca(2+) homeostasis. *Cancer Res.* 2011; 71: 7659–69. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2172.
38. Kim KW, Choi CH, Kim TH, Kwon CH, Woo JS, Kim YK. Silibinin inhibits glioma cell proliferation via Ca²⁺/ROS/MAPK-dependent mechanism in vitro and glioma tumor growth in vivo. *Neurochem Res.* 2009; 34: 1479–90. doi: 10.1007/s11064-009-9935-6.
39. Woodcock SA, Jones RC, Edmondson RD, Malliri A. A modified tandem affinity purification technique identifies that 14-3-3 proteins interact with Tiam1, an interaction which controls Tiam1 stability. *J Proteome Res.* 2009; 8: 5629–41. doi: 10.1021/pr900716e.
40. Gianni D, Taulet N, DerMardirossian C, Bokoch GM. c-Src-mediated phosphorylation of NoxA1 and Tks4 induces the reactive oxygen species (ROS)-dependent formation of functional invadopodia in human colon cancer cells. *Mol Biol Cell.* 2010; 21: 4287–98. doi: 10.1091/mbc.E10-08-0685.
41. Cortesio CL, Chan KT, Perrin BJ, Burton NO, Zhang S, Zhang Z-Y, Huttenlocher A. Calpain 2 and PTP1B function in a novel pathway with Src to regulate invadopodia dynamics and breast cancer cell invasion. *J Cell Biol.* 2008; 180: 957–71. doi: 10.1083/jcb.200708048.
42. Fantini J, Abadie B, Tirard A, Remy L, Ripert JP, el Battari A, Marvaldi J. Spontaneous and induced dome formation by two clonal cell populations derived from a human adenocarcinoma cell line, HT29. *J Cell Sci.* 1986; 83: 235–49.
43. Stefanska J, Pawliczak R. Apocynin: molecular aptitudes. *Mediators Inflamm.* 2008; 2008: 106507. doi: 10.1155/2008/106507.

44. Yang AD, Fan F, Camp ER, van Buren G, Liu W, Somcio R, Gray MJ, Cheng H, Hoff PM, Ellis LM. Chronic oxaliplatin resistance induces epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer cell lines. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2006; 12: 4147–53. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-0038.
45. Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul.* 1984; 22: 27–55.

3 Dans des lignées cellulaires exprimant BRAF sauvage

3.1 Introduction

De manière à étudier le rôle potentiel de la mutation BRAF V600E dans la résistance à l'oxaliplatine nous avons sélectionné des cellules résistantes à cette chimiothérapie à partir d'une autre lignée cellulaire d'adénocarcinome colique, les Caco-2. Contrairement aux HT29-D4 et aux RKO, ces cellules expriment la forme sauvage de BRAF.

Nous avons alors étudié la régulation de la production de ROS en présence de l'oxaliplatine dans les cellules sensibles et résistantes. Nous avons également étudié la régulation de cette production de ROS par les calpaïnes. L'implication des différentes voies de signalisation impliquées dans cette régulation calpaïnes/ NOX1 et dans la survie cellulaire a également été étudiée.

3.2 Résultats

3.2.1 Sélection des cellules résistantes

Afin d'établir cette lignée résistante à l'oxaliplatine nous avons cultivé des cellules Caco-2 sensibles en présence de concentrations croissantes d'oxaliplatine (comme pour les cellules HT29-D4 ou RKO). La sélection nous a permis d'obtenir une sous-lignée que l'on nommera Caco2-Rox. Les cellules résistantes obtenues prolifèrent de manière similaire aux cellules sensibles et aucune modification morphologique n'a été observée (données non présentées).

Des tests de cytotoxicité ont été réalisés pour confirmer la résistance des cellules Caco-2-Rox. Nos résultats confirment cette résistance, l' IC_{50} de l'oxaliplatine étant supérieure pour les Caco-2-Rox par rapport aux Caco-2 sensibles (Figure 1 A). L' IC_{50} des cellules Caco-2 est de $0,9 \pm 0,2 \mu\text{M}$, cette valeur est significativement augmentée à $23,1 \pm 2,4 \mu\text{M}$ pour les cellules Caco2-Rox ($p < 0.05$) (Figure 1 B).

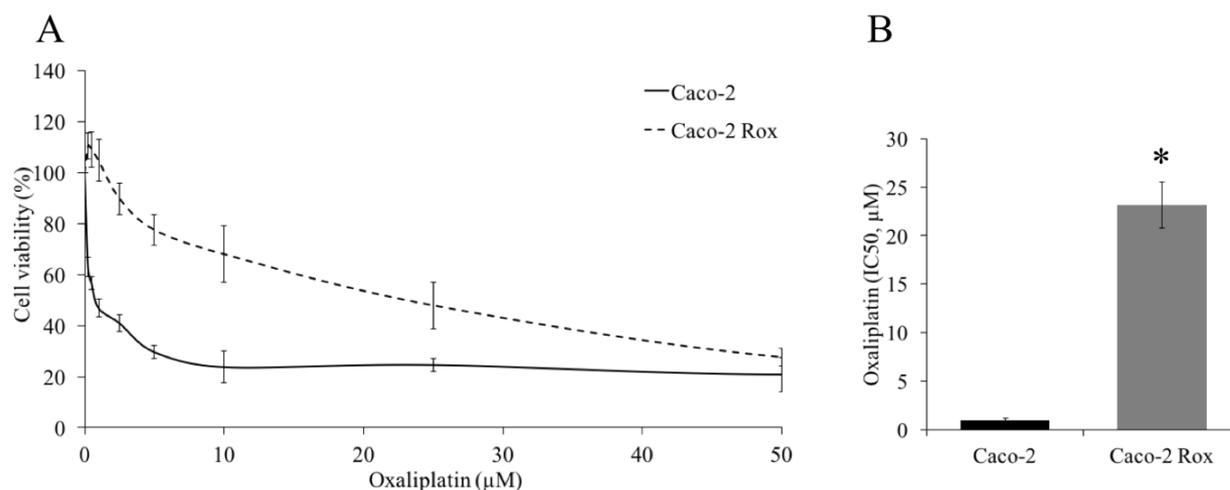


Figure 1 : Réponse des Caco-2 et des Caco-2-Rox à l'oxaliplatine.

Des tests de cytotoxicité ont été réalisés avec les cellules Caco-2 et Caco-2-Rox. Les courbes de survie sont présentées en (A). Les IC₅₀ ont été calculés grâce à la méthode de Chou and Talalay (B). Les astérisques représentent la significativité ($p < 0,05$).

3.2.2 Implication des ROS et des calpaïnes dans la résistance à l'oxaliplatine

Afin d'appréhender le rôle joué par les ROS dans la résistance à l'oxaliplatine, nous avons réalisé des tests de cytotoxicité en présence d'un agent antioxydant, l'apocynine, utilisé à une concentration n'ayant aucun impact sur la viabilité cellulaire (0,5 mM). Nos résultats montrent que la résistance des cellules Caco-2-Rox est fortement augmentée en présence d'apocynine. L'IC₅₀ des cellules Caco-2-Rox est augmentée de $23,1 \pm 2,4 \mu\text{M}$ en absence d'apocynine à $107,8 \pm 6,1 \mu\text{M}$ en présence de cet inhibiteur (**Figure 2B**). Des données similaires ont été obtenues avec les cellules Caco-2, pour les courbes de survie ainsi que pour l'IC₅₀ ($0,9 \pm 0,2 \mu\text{M}$ et $10,0 \pm 1,8 \mu\text{M}$ en absence et en présence d'apocynine respectivement ; **Figure 2D**). Ces données indiquent que les ROS ne sont pas responsables de la résistance et sont au contraire nécessaires à la cytotoxicité de l'oxaliplatine même dans les cellules résistantes.

Afin d'étudier l'implication des calpaïnes dans la résistance à l'oxaliplatine, nous avons réalisé des tests de cytotoxicité sur les cellules Caco-2 et Caco-2-Rox en présence d'un inhibiteur de l'activité des calpaïnes, le MDL28170 à 2,5 μM. Nos résultats montrent qu'aucune différence n'est observée en présence de cet inhibiteur. En effet, l'IC₅₀ des cellules Caco-2 passe de $0,9 \pm 0,2 \mu\text{M}$ en absence de l'inhibiteur à $1,2 \pm 0,3 \mu\text{M}$ en sa présence (**Figure 2B**). Des données similaires ont été obtenues avec les cellules Caco-2-Rox, pour les courbes de survie ainsi que pour l'IC₅₀ ($23,1 \pm 2,4 \mu\text{M}$ et $23,8 \pm 4,8 \mu\text{M}$ en absence et en

présence de MDL28170 respectivement ; **Figure 2D**). Ces données indiquent que les calpaïnes ne sont pas responsables de la résistance à l'oxaliplatine aussi bien dans les cellules sensibles que dans les cellules résistantes.

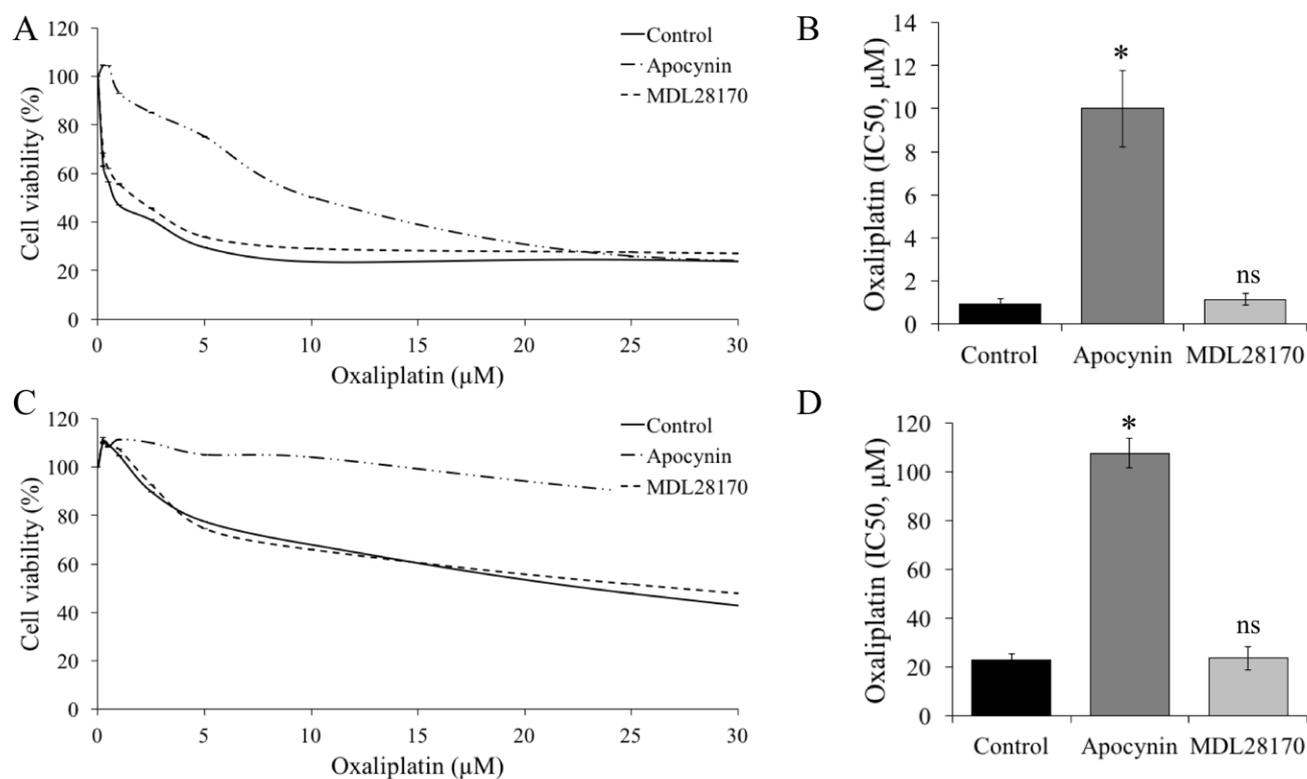


Figure 2 : Implication des ROS et des calpaïnes dans la réponse des cellules Caco-2 et Caco-2-Rox à l'oxaliplatine.

Des tests de cytotoxicité à l'oxaliplatine ont été réalisés en présence d'inhibiteur de ROS (apocynin) et d'inhibiteur de l'activité des calpaïnes (MDL28170). Les courbes de survie sont présentées en A et C. Les IC50 ont été calculés grâce à la méthode de Chou and Talalay (B, D). Les astérisques représentent la significativité ($p < 0,05$)

3.2.3 Implication de Nox5 dans la production de ROS

Afin d'étudier l'implication des ROS dans la résistance à l'oxaliplatine, nous avons mesuré la production de ROS des cellules Caco-2 et Caco-2-Rox en utilisant la lucigénine. Nous avons également étudié l'expression des composants du complexe NOX1 ainsi que celle de NOX5 par Western blot. Nos résultats montrent une diminution significative de la production de ROS dans les cellules Caco-2-Rox, elle est en effet de $28,2 \pm 8,8$ % par rapport aux Caco-2 dont la production est fixée à 100 % (**Figure 3A**). Nos données montrent également qu'il n'y a aucune modification de l'expression de NOX1, cependant l'expression

de NOXA1 semble modifiée. En effet le niveau d'expression de NOXA1 augmente dans les cellules Caco-2-Rox, comme nous l'avons observé précédemment dans les cellules HT29-D4 et RKO résistantes (**Figure 3B**). L'expression de NOX5 est également impactée. Elle est fortement diminuée dans les cellules Caco-2-Rox (**Figure 3C**). Cette variation d'expression étant corrélée à la diminution de production de ROS, nous pouvons supposer que les ROS mesurés sont produits par NOX5, et que la diminution observée est due à la réduction d'expression de cette isoforme.

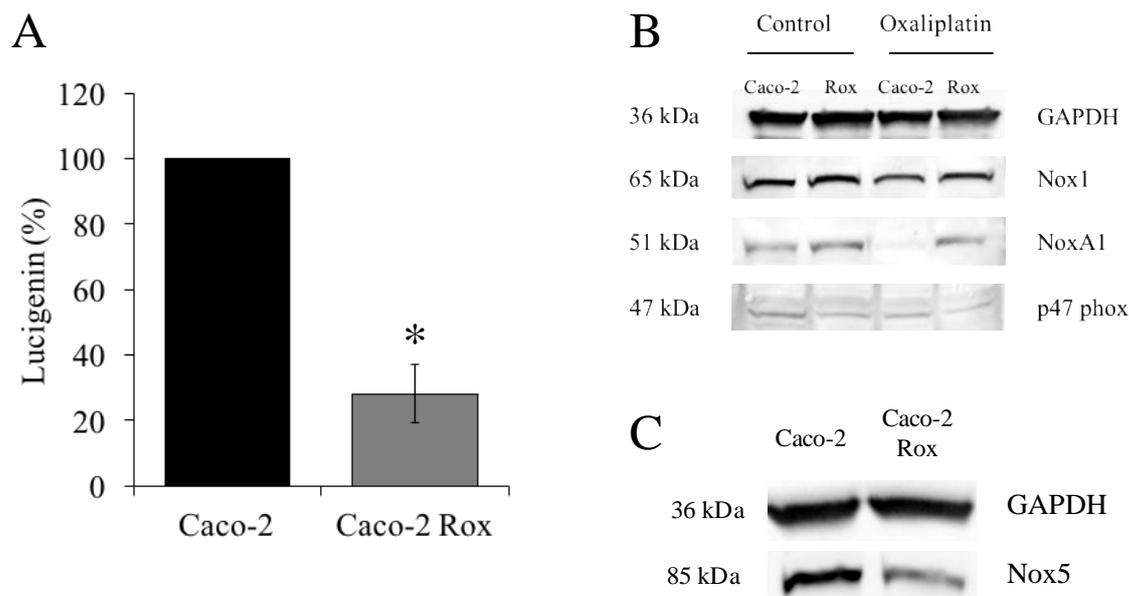


Figure 3 : Production de ROS dans les cellules Caco-2 et Caco-2-Rox

Une mesure de la production de ROS a été réalisée avec les cellules Caco-2 et Caco-2-Rox en utilisant la lucigénine (A). Les cellules Caco-2 et Caco-2-Rox (Rox) ont été incubées avec 2 μ M d'oxaliplatine (oxaliplatin) puis lysées et les niveaux d'expression de la GAPDH, de NOX1, de NOXA1 et de p47 phox ont été étudiés par Western blot (B). L'expression de NOX5 a également été étudiée (C). Les astérisques représentent la significativité ($p < 0,05$).

3.2.4 Étude de l'activité des calpaïnes

Nous avons mesuré l'activité des calpaïnes dans nos cellules sensibles et résistantes à l'oxaliplatine en utilisant le t-boc-LM-CMAC. Nous avons également étudié l'expression des calpaïnes ubiquitaires dans nos cellules Caco-2 et Caco-2-Rox par Western blot. Nos résultats montrent une augmentation significative de l'activité des calpaïnes dans les cellules Caco-2-Rox, elle passe en effet de 100 % dans nos cellules sensibles à $161,3 \pm 41,6$ % dans nos cellules résistantes (**Figure 4A**). Cette augmentation de l'activité des calpaïnes d'un facteur

1,6 n'est pas due à une augmentation d'expression. En effet l'expression de la calpaïne 1 et celle de la calpaïne 2 ne varient pas dans nos cellules (**Figure 4B**). Nous avons observé précédemment une dégradation de NOXA1 par les calpaïnes. Pour voir si ce phénomène existe dans les cellules Caco-2 nous avons induit une sous-expression des calpaïnes dans nos cellules sensibles et résistantes en utilisant des siRNA. Nos données montrent aucune modification de l'expression de NOX1 en présence de siRNA dirigées contre les calpaïnes mais, comme pour les cellules HT29-D4 et RKO, l'expression de NOXA1 est impactée, elle augmente dans les cellules sensibles et résistantes quand l'expression des calpaïnes est réduite (**Figure 4B**). NOXA1 serait donc un substrat des calpaïnes également dans les cellules Caco-2. Nos données confirment également la surexpression de NOXA1 dans les cellules résistantes. L'expression de NOX5 semble également être augmentée dans les cellules Caco-2-Rox en présence de siRNA dirigés contre les calpaïnes (**Figure 4B**). Ces données indiquent que les calpaïnes seraient liées une nouvelle fois à la production de ROS dans les cellules résistantes.

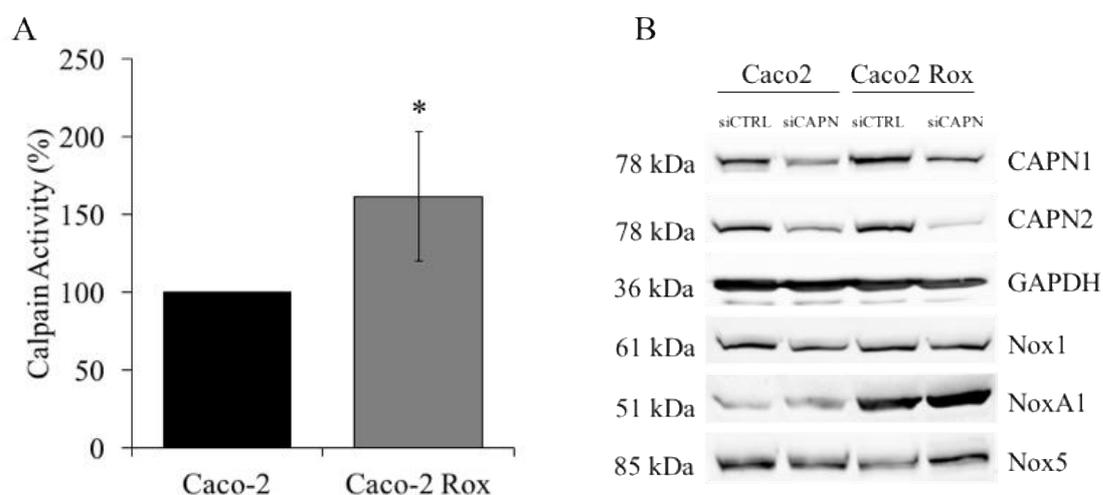


Figure 4 : Activité des calpaïnes dans les cellules Caco-2 et Caco-2-Rox.

L'activité des calpaïnes a été mesurée dans les cellules Caco-2 et Caco-2-Rox en utilisant le t-boc-LM-CMAC (A). Les cellules Caco-2 et Caco-2-Rox ont été transfectées avec 200 nM de siRNA contrôle (si CTRL) ou de siRNA dirigées contre les calpaïnes 1 et 2 (siCAPN) puis lysées. Un Western blot a été réalisé en utilisant des anticorps dirigés contre la GAPDH, NOX1, NOXA1, la calpaïne 1 (CAPN1), la calpaïne 2 (CAPN2) et NOX5 (B). Les astérisques représentent la significativité ($p < 0,05$).

4 Conclusion de la première partie

Voici les résultats principaux obtenus dans cette première partie de notre étude :

- ✓ Nous avons confirmé que la production de ROS par NOX1 est nécessaire aux effets cytotoxiques de l'oxaliplatine dans les cellules tumorales colorectales. La production de ROS est cependant fortement augmentée dans nos cellules résistantes présentant la mutation BRAF V600E. Elle est à l'inverse diminuée dans celles exprimant la forme sauvage de BRAF, mais ce serait NOX5 qui serait impliquée et non NOX1. L'activité des calpaïnes est également augmentée dans nos cellules résistantes à l'oxaliplatine, surtout dans celles présentant la mutation BRAF V600E. Une inhibition des calpaïnes ou de NOX1, qu'elle soit chimique ou par le biais de traitement anti-sens, conduit à une augmentation de la survie cellulaire signifiant que ces enzymes restent indispensables à la mort cellulaire. Les calpaïnes et les NOX ne semblent pas être de bonnes cibles thérapeutiques pour améliorer l'efficacité de l'oxaliplatine, ces enzymes sont trop finement régulées et des modifications mal contrôlées de leurs activités pourraient avoir des effets opposés à ceux souhaités.
- ✓ Les calpaïnes ubiquitaires sont impliquées dans la régulation de la production de ROS dans les cellules sensibles à l'oxaliplatine. En effet les traitements anti-sens dirigés contre les calpaïnes 1 et 2 induisent une augmentation de la production de ROS dans ces cellules. Les deux isoformes sont impliquées dans cette régulation de la production de ROS.
- ✓ Les calpaïnes ont un rôle inversé entre cellules sensibles et cellules résistantes. En effet les mêmes traitements anti-sens dirigés contre les calpaïnes 1 et 2 dans les cellules résistantes induisent une diminution de la production des ROS. Cependant ces résultats n'ont été obtenus que dans les cellules présentant la mutation BRAF V600E, laissant supposer une régulation liée à cette mutation.
- ✓ La régulation négative de la production de ROS par les calpaïnes dans les cellules sensibles se fait par un clivage de NOXA1, la protéine activatrice de NOX1. Nos résultats montrent que ce clivage de NOXA1 pourrait se faire sur le domaine SH3. Ce domaine permettant l'interaction avec NOXO1, le clivage empêcherait donc de ce fait

la mise en place du complexe NOX1-NOXO1-NOXA1 et ainsi la production de ROS. En inhibant l'activité de NOX1, cette dégradation empêcherait que la production de ROS ne se maintienne à un haut niveau et serait responsable du côté transitoire du pic de ROS induit par l'oxaliplatine.

- ✓ La régulation positive de la production de ROS par les calpaïnes dans les cellules résistantes ayant une mutation BRAF V600E se fait par le biais de l'activation des Src kinases. En effet un traitement anti-sens des calpaïnes ubiquitaires conduit à une augmentation de la phosphorylation inhibitrice des Src kinases. De plus, une inhibition des Src kinases par le biais d'un agent inhibiteur chimique conduit à une diminution de la production de ROS dans les cellules résistantes. Cette diminution est importante puisqu'elle permet de redescendre à une production de ROS équivalent à la production basale observée dans les cellules sensibles. Les calpaïnes, suractivées dans les cellules résistantes, lèvent l'inhibition de Src ce qui conduit à une activation de la production de ROS. Les Src kinases sont donc des cibles thérapeutiques potentielles et des inhibiteurs de ces enzymes pourraient être utilisés comme adjuvants chimiothérapeutiques potentiels pour les patients présentant des tumeurs résistantes à la chimiothérapie FOLFOX et ayant la mutation BRAF V600E. Des études précliniques sont en cours de validations, cependant elles ne prennent pas en compte le statut mutationnel des patients.

- ✓ La production de ROS induite par l'activation des Src kinases dans les cellules résistantes à l'oxaliplatine conduit à l'activation de la p38 MAPK. En effet, une inhibition de l'expression de la protéine NOX1 conduit à une diminution de la phosphorylation activatrice de p38 MAPK. Ce phénomène n'est observé que dans les cellules résistantes à l'oxaliplatine. De plus, nous avons observé via différentes techniques (PathScan, PamGene, Western blots) une augmentation soit de la phosphorylation activatrice soit directement de l'expression de p38 MAPK au cours du temps après traitement à l'oxaliplatine dans les cellules résistantes. Cette augmentation de l'activité de la p38 MAPK conduit à un contournement de la voie apoptotique. En effet, une inhibition chimique de cette p38 MAPK dans les cellules résistantes conduit à un retour à des IC₅₀ proches de celles des cellules sensibles. Nous pouvons aussi voir que cette inhibition de la p38 MAPK permet une ré-activation de la voie apoptotique, puisque nous pouvons observer à nouveau un clivage de PARP dans

ces cellules résistantes traitées à la fois avec l'inhibiteur de p38 MAPK et avec l'oxaliplatine. Ainsi p38 MAPK pourrait être une cible thérapeutique potentielle et ses inhibiteurs de potentiels agents chimiothérapeutiques associés à FOLFOX pour les patients ne répondant pas à ce protocole et présentant une mutation BRAF V600E.

- ✓ La mutation BRAF V600E semble impliquée, plus ou moins directement, dans ces régulations que nous avons observées dans les HT29-D4 et dans les RKO. En effet, les cellules Caco-2 qui n'ont pas cette mutation ne présentent pas les mêmes régulations. La production de ROS n'évolue pas dans le même sens dans ce cellules et l'isoforme NOX5 semble joué un rôle dans ces cellules à la place de NOX1. Des études complémentaires restent cependant nécessaires pour pouvoir valider cette hypothèse.

Chapitre 6

Gemcitabine: an alternative treatment for patients with oxaliplatin resistant colorectal cancer

1 Introduction

Dans la première partie de notre étude, nous avons décrit le mécanisme de résistance mis en place par les cellules tumorales colorectales pour échapper aux traitements basés sur l'oxaliplatine. Nous avons ainsi mis en évidence les rôles cruciaux joués par les calpaïnes ubiquitaires, les Src kinases et p38 MAPK dans l'inhibition de l'apoptose dans les cellules résistantes à l'oxaliplatine. Les calpaïnes, suractivées dans ces cellules, lèvent l'inhibition des Src kinases, ce qui conduit à une activation de NOX1 et à une forte production de ROS. Les hauts niveaux de ROS qui en résultent induisent l'activation de p38 MAPK et ainsi la survie des cellules résistantes.

Le but de cette deuxième partie de notre étude a donc été d'identifier des moyens de contourner ce mécanisme de résistance de manière à optimiser l'efficacité de l'oxaliplatine. Pour cela nous avons analysé la réponse de nos cellules sensibles et résistantes à l'oxaliplatine face à différentes chimiothérapies ayant déjà une autorisation de mise sur le marché (AMM). L'objectif est de proposer des traitements existants de rechange pour contrer la résistance à l'oxaliplatine et ainsi mieux traiter les patients ne répondant pas aux traitements. Cette étude nous permettra également de savoir si le mécanisme de résistance que nous avons identifié permet aux cellules résistantes à l'oxaliplatine de survivre à d'autres traitements.

Cette deuxième partie de notre étude nous a permis de montrer que nos cellules résistantes à l'oxaliplatine sont également résistantes à de nombreuses autres chimiothérapies. De manière surprenante ces cellules sont sensibles à la gemcitabine, cette chimiothérapie étant même plus efficace sur les cellules résistantes à l'oxaliplatine que sur les sensibles. Nous avons montré que la gemcitabine inhibe mTor, Akt et surtout p38 MAPK, ce qui conduit à une activation de l'apoptose et donc à la mort des cellules.

2 Article 2 (en préparation)

Introduction

Colorectal cancer is one of the most frequent cancer worldwide (1). The mortality rate of this cancer is also one of the strongest, especially due to the resistance of the advanced stages to the different chemotherapy protocols. Despite the different advances in combination chemotherapies, the five-year survival rate for metastatic cancer remains very low, around 13% for the US (National Cancer Institute) and less than 10% for Europe.

The treatment of metastatic colorectal cancer is based on poly-chemotherapies. These poly-chemotherapies are usually composed of 5-fluoro-uracil, folinic acid and oxaliplatin and/or irinotecan (2). These poly-chemotherapies can be coupled to monoclonal antibodies such as cetuximab, however their efficacy strongly depends on the mutations observed in the tumor cells (3,4). The treatment failure is not only due to the mutational status of the patient but also, in around 50% of case, to the development of resistance to chemotherapies (5). It is thus crucial to decipher the resistance mechanisms developed by the cancer cells and to identify therapeutic targets. It is also essential to identify treatments capable of countering the resistance to chemotherapy.

There are several mechanisms of resistance to chemotherapy, some of them are specific to the molecules, and others are common to all chemotherapies. The dysregulation of the influx or efflux systems is one of the most well-known mechanism (6,7). It leads to a decrease of the drug availability and therefore to a limited response to the treatment. There are also specific mechanisms allowing the cells to resist to the apoptotic processes induced by chemotherapies. In the case of oxaliplatin, it was shown that the increase of the expression of two inhibitors of apoptosis, survivin and BIRC6, leads to the resistance to this drug in colorectal cancer cells (8,9). In our previous work, we have selected oxaliplatin-resistant cells from different colorectal cancer cell lines and identified the actors involved in the resistance. Using our resistant cells, we have highlighted the existence of a calpain/NOX1/Src kinase pathway responsible for the activation of the anti-apoptotic p38 MAPK (10). We have clearly identified p38 MAPK as a potential therapeutic target and recent studies have also come to the same conclusion, showing that the isoform p38 MAPK α could be a good target in colorectal cancer (11). However, inhibiting directly p38 MAPK is complicated because of the too wide

spectrum of action of its inhibitors (12). It is therefore important to identify treatments inducing the inhibition of the p38-mediated survival in a more “controlled” manner.

In this study, we have studied the cytotoxic effects of several chemotherapy agents on our oxaliplatin-resistant colorectal cancer cells. We have observed that only gemcitabine is able to specifically induce the apoptosis of our oxaliplatin-resistant cells. Our results show that gemcitabine decreases Akt and p38 MAPK phosphorylations, thus enhancing the apoptosis by inhibiting the survival pathways. On the opposite, gemcitabine has only limited effects on the cells sensitive to oxaliplatin. We are also showing that the combination of oxaliplatin and gemcitabine is not a good solution as these two drugs have antagonist effects in our resistant cells. Taken together, our data show that gemcitabine, a drug rarely used to treat colorectal cancer, could be an alternative treatment to oxaliplatin when the colorectal cancer cells are not responding to this chemotherapy.

Material and methods

Tumor cell lines and culture conditions

The three human colon carcinoma cell lines used in this study (HT29-D4, Caco-2 and RKO) were routinely maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (GIBCO cell culture systems, Invitrogen, UK) and 2 mM L-glutamine. For Caco-2 the medium was also supplemented with non-essential amino acids. The cells were grown at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. HT29-D4 cell line was originally derived from HT29 colon adenocarcinoma cell line (13). The selected oxaliplatin-resistant cells are cultured in the same way, with the same medium supplemented with 2 µM of oxaliplatin.

Reagents and antibodies

The following reagents were used: oxaliplatin (L-OHP, Sigma-Aldrich , USA) stored at 5.4 mg/mL (12.5 mM); gemcitabine, (gemcitabine hydrochloride, Sigma-Aldrich , USA) stored at 30 mg/mL (100 mM); doxorubicin (doxorubicin hydrochloride solution, Sigma-Aldrich , USA) stored at 2 mg/mL (3.5 mM); 5-fluoro-uracil (Sigma-Aldrich, USA) stored at 130 mg/mL (1 M), etoposide (Sigma-Aldrich, USA) stored at 25 mg/mL (42.4 mM); vincristine (vincristine sulfate salt, Sigma-Aldrich, USA) stored at 1 mg/mL (1 mM); paclitaxel stored at 1 mg/mL (1.2 mM); all these chemotherapies were used at different concentrations; The following primary antibodies were used for Western blotting: anti-Akt (diluted at 1/1 000, ref. 9272, Cell Signaling Technology, USA); anti-phospho-Akt (Ser473) (diluted at 1/1 000, ref.

9271, Cell Signaling Technology, USA); anti-GAPDH (1/20 000, ref. G8795, Sigma-Aldrich, USA); anti-p38 (1/1 000, ref. sc-535, Santa Cruz, USA); anti-phospho-p38 (Thr180/Tyr182) (1/500, ref. sc17852, Santa Cruz, USA); anti-p70S6K (1/1 000, ref. 9202, Cell Signaling Technology, USA) anti-phospho-p70S6K (Thr 389) (1/1 000, ref. 9205, Cell Signaling Technology, USA). The HRP-coupled secondary antibodies were purchased from Cell Signaling Technology (USA).

Cytotoxicity assay

Cell viability was determined using the MTT assay. After counting and plating the sensitive or resistant (Rox) cells (5×10^4 cells/mL) in 96-well plates with DMEM culture medium, the cells were exposed to increasing concentrations of the drug (from 0 to 100 μ M or nM according to the drugs) for 72 hours. The culture medium was then replaced with DMEM containing 0.5 mg/mL MTT. After a 2-hour incubation, the cells were lysed and the formazan solubilized using pure DMSO (Sigma-Aldrich, USA). The optical density (OD) was measured at 600 nm in a plate reader (Multiskan RC, Labsystems, USA). The data were expressed as percentage of survival (using the untreated cells as 100%) and subjected to statistical analysis ($n = 5$). The IC_{50} were determined using the Chou and Talalay method (14).

Combination index analysis

After counting and plating the sensitive or resistant (Rox) cells (5×10^4 cells/mL) in 96-well plates with DMEM culture medium, the cells were exposed to oxaliplatin and gemcitabine, either alone or in combination, according to the protocol as described (15). Drug synergism studies were carried out using CompuSyn software version 1.0 (Ting Chao Chou and Nick Martin, Paramus, NJ, 2005). Combination index (CI) was measured based on mass action law of degree of drug interaction according to Chou and Talalay. Dose effect curve and Combination index were generated through CompuSyn. The combination index values were generated using the formula $CI = (D)1/(Dx)1 + (D)2/(Dx)2$, (Dx)1 or (Dx)2 representing the dose of drug 1 or 2 in a combination needed for achieving the same efficiency as that of the single drug 1 or 2 at D1 or D2, respectively. $CI < 1$ indicates drug synergism, $CI > 1$ indicates drug antagonism and $CI = 1$ shows additive effects.

Annexin V-FITC assay for apoptosis

The sensitive and resistant (Rox) cells were seeded into 6-well plates at a density of 5×10^5 cells per well. After 24 hours of incubation, the cells were treated with oxaliplatin and

gemcitabine for 48 hours. After treatment, cells were harvested by trypsinization and stained with Annexin V/ FITC and propidium iodide (PI) in binding buffer according to the manufacturer protocol (ThermoFisher Scientific, Cat No V13242). Cells were analyzed using flow cytometer (...).

Kinase activity assay

To study the kinase activity, the Protein Tyrosine Kinase (PTK) and the Serine-Threonine Kinase (STK) assays from PamGene (The Netherlands) were used. The HT29-D4 or HT29-D4-Rox1 cells were treated with gemcitabine for 4 hours, collected and lysed using the M-PER lysis buffer (Thermo Fisher Scientific, USA). A protein quantification assay was then performed using the Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad, USA). Five μg and 1 μg were loaded on Protein Tyrosine Kinase and Serine-Threonine Kinase Pamchips, respectively. The phosphorylation of PamChip peptides were monitored by the PamStation® 12, following the provided protocols (PamGene, The Netherlands). The images were quantified using BioNavigator software (PamGene, The Netherlands).

Western blotting

Protein samples were loaded (30 $\mu\text{g}/\text{lane}$) and separated on 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. The separated proteins were electrophoretically transferred on Nitrocellulose Blotting Membrane (Amersham Protan, GE Healthcare, USA) using a transfer system (Bio-Rad, USA). The membranes were incubated with blocking solution (5% nonfat milk) for 1 hour and then incubated overnight with the proper primary antibodies. The membranes were then washed three times with a PBST (PBS plus 0.05% Tween20) solution and incubated with horseradish-peroxidase-conjugated secondary antibodies for 1 hour. The membranes were again washed three times with PBST, and revealed using chemiluminescence HRP substrate (Merck Millipore, USA) and the G-Box (Syngene, UK). The band intensities were quantified using the NIH ImageJ software (USA).

Statistical Analysis

The Student test (t-test) was used to compare the means and whether the differences observed in our experiments were significant. All data were made in triplicate and were repeated at least three times except for the PathScan array. The difference is said to be significant when the value of p is less than 0.05 (significativity greater than 95%). In our figures, the

significance is represented by an asterisk (*). In addition, the values represent the mean plus or minus the standard deviations.

For kinomic analysis, image analysis and signal quantification were performed using the BioNavigator[®] software (PamGene), Peptides that showed kinetics (increase in signal intensity in time) were preselected (“QC list”). Resistant cells status were evaluated for each peptide using ANOVA. Kinexus Kinase Predictor was used to determine putative upstream PTK or upstream STK.

Results and Discussion

Screening of different chemotherapy efficacies

In order to identify a chemotherapy agent able to induce the apoptosis of our oxaliplatin-resistant cells, we have performed cytotoxicity assays with the following molecules: 5-fluoro-uracil (5-FU), etoposide, vincristine, paclitaxel, doxorubicin and gemcitabine. The IC₅₀ values of all the different chemotherapies, except gemcitabine, are indexed in **Figure 1A**. We have clearly observed that our different oxaliplatin-resistant cells are also resistant to all these chemotherapies. Indeed the IC₅₀ values are 3 to 6 times higher for our oxaliplatin-resistant cells in comparison to the corresponding sensitive cells. These data could suggest the existence of a multi-drug resistance mechanism in our Rox cells, allowing the extraction of the chemotherapies from the cytoplasm of the cells and thus their therapeutic escape (16). However, we have observed in our previous study that the resistance depends on p38 MAPK activity and that their apoptotic functions are restored in the presence of a p38 MAPK inhibitor (10).

Moreover, our oxaliplatin-resistant cells are sensitive to one of the chemotherapy agent. Indeed, gemcitabine is able to induce cell death in our Rox cells (**Figure 1B, D and F**). Gemcitabine is an antimetabolite chemotherapy agent with clinical activity against a number of solid tumors (17,18). The IC₅₀ of gemcitabine is 7.6 ± 1.6 nM, 12.5 ± 1.1 nM and 11.6 ± 2.0 nM for sensitive cells HT29-D4, RKO and Caco-2 cells respectively, compared to 1.9 ± 0.6 nM and 3.2 ± 0.8 nM for HT29-D4 Rox1 and RKO Rox1 respectively; 1.9 ± 0.5 nM and 1.9 ± 0.6 nM for HT29-D4 Rox2 and RKO Rox2 cells respectively ($p < 0.05$, **Figure 1C-E**); and 2.4 ± 0.5 nM for Caco-2-Rox ($p < 0.05$, **Figure 1G**). The cytotoxic effects of gemcitabine are clearly stronger when the cells are resistant to oxaliplatin. This phenomenon is independent of the mutational status of the cells, as similar results are obtained with HT29-D4, RKO and Caco-2 cells. Gemcitabine could thus be a new therapeutic option for patients

who do not respond to the conventional chemotherapy regimen for metastatic colorectal cancer. Many clinical studies are underway to see the effectiveness of these treatments (19,20).

Analysis of the efficacy of gemcitabine and oxaliplatin combination treatments

As oxaliplatin and gemcitabine have cytotoxic effects on our sensitive and resistant cells respectively, we have studied the effects of treatments combining these two drugs. We have firstly measured the viability of our HT29-D4 sensitive and resistant cells after treatment with the two different chemotherapies, alone or combined.

As previously observed, oxaliplatin decreases significantly the sensitive cell viability after 72 hours of treatment (2 μ M of oxaliplatin), the cell viability being reduced from 100% to $45.6 \pm 3.5\%$ (**Figure 2A**). On the opposite, gemcitabine has no significant effect on these sensitive cells, their viability decreasing only to $77.4 \pm 2.5\%$ in the presence of 10 nM of this drug. No additional cytotoxicity was observed when the two chemotherapies are combined. Indeed, the sensitive cell viability is decreased to $46.3 \pm 1.4\%$ (**Figure 2A**). This value is not significantly different to the results obtained with the oxaliplatin alone.

Opposite effects were observed for the resistant HT29-D4 cells. In Rox1 cells, the viability was significantly and similarly reduced by gemcitabine and the combination treatment, decreasing from 100 % to $25.3 \pm 3.8\%$ after incubation with 10 nM of gemcitabine and to $30.7 \pm 1.1\%$ in the presence of the two chemotherapies (**Figure 2A**). There is no significant difference between these two conditions. As previously observed, oxaliplatin is unable to induce cell death in our Rox cells. Very similar results were obtained with the Rox2 cells. Cell viability is reduced from 100% to $38.2 \pm 3.4\%$ and $35.9 \pm 1.6\%$ by gemcitabine and by the combination treatment, respectively. Oxaliplatin has no effect on these cells, the viability being at $102.1 \pm 0.6\%$ (**Figure 2A**).

Seeing no major difference in the cytotoxicity of the chemotherapies when they are used alone or combined, we have analyzed the interactions of these two drugs using CompuSyn software. The CompuSyn software allowed us to compare the fractions of the sensitive and resistant cells affected by oxaliplatin and/ or gemcitabine. The affected fractions were calculated according to the doses of the chemotherapy (0.25 IC_{50} , 0.5 IC_{50} , IC_{50} , 2 IC_{50} and 4 IC_{50}). We observed that the affected fractions were higher in the sensitive cells for the combination of the low doses of chemotherapy, indeed for the quarter of the IC_{50} 47% of the cells were affected by the combination treatment, compared to 12% and 6% for oxaliplatin and gemcitabine respectively. The same observations are observed for concentrations superior

to the IC₅₀. However, at high doses (two times and four times the IC₅₀), the affected fractions were higher for the chemotherapies used separately (**Figure 2B**). For the resistant cells, we observed that the affected fractions were higher when the chemotherapies are used alone (**Figure 2B**).

The combination indexes (CI) were then calculated using CompuSyn software. A CI lower than 1 indicates drug synergism, a CI higher than 1 indicates drug antagonism and a CI = 1 shows additive effects. As for the affected fractions we have observed differences between the sensitive and the resistant cells. In the case of sensitive cells, the CI value is lower than 1 for all concentrations except for the highest dose (CI of 2.5, **Figure 2C**). For our oxaliplatin-resistant cells, we observed CI values higher than 1 for all the conditions, the values reaching 1.84 for Rox2 and 2.03 for Rox1 (**Figure 2C**). However the hypothetical values proposed by the CompuSyn software show that a combination of low doses could be synergistic, however with no major effect on the affected fraction. The same data were obtained with the two other cell types, RKO and Caco-2 (data not show).

Our data are very interesting as they are showing that the combination of gemcitabine and oxaliplatin, also called GEMOX, is only effective for low doses in sensitive cells and very low doses in resistant cells. These data explain why the combination protocol GEMOX is not effective to treat colorectal cancer and why the results of the clinical studies are negative (21). Therefore, it would be more interesting to treat patients with oxaliplatin-resistant cancer with only a regimen of gemcitabine to eliminate oxaliplatin-resistant cells and then with FOLFOX protocol to eliminate the sensitive cells.

Analysis of apoptosis induction

An annexin-V/PI double staining assay was performed to analyze the ability of oxaliplatin and gemcitabine to induce the apoptosis in our HT29-D4 sensitive and resistant cells. This double staining assay detects the presence of phosphatidylserine translocation to the outer leaflet of the plasma membrane in apoptotic cells. During apoptosis, translocated phosphatidylserine conjugates with FITC-labeled annexin-V to emit fluorescence that can be detected. PI is a vital fluorescent dye is used for the evaluation of cellular viability. The results obtained for HT29-D4, Rox1 and for Rox2 are presented in **Figure 3A-C**. The statistical analyses are summarized in **Figure 3 D-E**.

Our results clearly show that oxaliplatin is able to strongly induce apoptosis in the sensitive HT29-D4 cells, the values for early and late stage of apoptosis increasing from 5.6% and 4.9% in control to 17.6% and 9.7% after a 48-hour incubation in the presence of

oxaliplatin. On the opposite, oxaliplatin is unable to induce the apoptosis of our resistant cells, the values of both the early and late stage of apoptosis remaining unchanged. In the absence of treatment, the values for early and late apoptosis are 2.6% and 1.8% for Rox1 and 1.9% and 2.2% for Rox2, respectively, in the presence of oxaliplatin, these values are 3.8% and 3.9% for Rox1 and 3.2% and 3.9% for Rox2, respectively.

For the sensitive cells treated with gemcitabine, modifications were observed only for the late stage of apoptosis. The proportions of early and late apoptotic cells reach from 5.6% and 4.9% in control to 5.0% and 10.1% after a 48-hour treatment with gemcitabine, respectively. In resistant cells, the proportions of both early and late apoptotic cells are higher in the presence of gemcitabine than in its absence, the values increasing from 2.6% and 1.8% for Rox1 and 1.9% and 2.2% for Rox2 respectively, to 5.3% and 16.6% for Rox1 and 4.3% and 13.5% for Rox2 respectively.

To confirm the induction of apoptosis by oxaliplatin in our sensitive cells, and by gemcitabine in our resistant cells, we have studied the cleavage of PARP. We have clearly observed that oxaliplatin is only able to induce the cleavage of PARP and thus the induction of apoptosis in our sensitive cells (**Figure 3F**). No modification of PARP cleavage was observed in these cells in the presence of oxaliplatin. On the contrary, the cleavage of PARP is induced by gemcitabine only in the oxaliplatin-resistant cells, while no cleavage is observed in the sensitive cells.

Studies have shown that different platinum salts, including oxaliplatin, induce apoptosis via caspase activation (22). Resistance to oxaliplatin can therefore be done through a decrease in these apoptotic pathways. Regulators of the intrinsic apoptotic pathway, whether proapoptotic like Bad, Bak, and Bax, or anti-apoptotic like Bcl-2, Bcl-x1, and Mcl-1, may also play a role in drug resistance. A loss of the protein Bax will thus induce a greater resistance (23). Regulators of the extrinsic apoptotic pathway may also be involved, such as the TNFR1, Fas / CD95, TRAIL, DR4 and DR5 death receptors, and the Bid protein. A decrease in the expression of the protein Bid will thus lead to a strong resistance to oxaliplatin (24). The resistance to oxaliplatin may also be due to the over-expression of c-FLIP which will lead to the activation of the XIAP protein and the Akt pathway (25). However, our data clearly show that our oxaliplatin-resistant cells present no modification or dysregulation of these apoptotic pathways. Indeed, the apoptosis can still be induced in these cells, notably by gemcitabine.

Cell signaling pathway screening and analysis

To have a better understanding of the pathways involved in the induction of apoptosis by gemcitabine in our resistance cells, we have performed a screening of the kinase activities of our sensitive and resistant cells incubated in the presence of gemcitabine for 4 hours. The kinase activities were measured using PamGene technology and the BioNavigator software. In our previous study, we have shown using this same technology that Src kinases and p38 MAPK were upregulated in our resistant cells and that these kinases were implicated in the survival of these cells.

Our data obtained in the PTK analysis clearly show that the activity of Src kinases is strongly decreased by gemcitabine in the resistant cells in comparison to the sensitive cells (**Figure 4A**). Indeed, the kinases of the Src family are in the top kinase list with high specificity scores (1.2 for SRC) and high normalized kinase statistics (1.0 for SRC). These data show that Src kinases are strongly inhibited by gemcitabine in our resistant cells. Moreover, the STK analysis shows that the treatment of our resistant cells with gemcitabine induces a major and significant decrease of p38 MAPK activity, as shown in **Figure 4B**. Indeed, the kinases of the p38 MAPK family are in the top list with high specificity scores (2.2 for p38 α MAPK (MAPK 14), 1.7 for p38 γ MAPK (MAPK12) and 2.2 for p38 δ MAPK (MAPK 11)) and high normalized kinase statistics (1.3 for all of them; **Figure 4B**). Moreover, this STK analysis also shows that the activity of the kinases of mTor/Akt/P70S6 pathway is reduced in the presence of gemcitabine in the resistant cells in comparison to sensitive cells (**Figure 4C**). Despite a low normalized kinase statistic for this pathway (0.3, 0.1, 0.4 and 0.1 for AKT3, AKT1, mTOR/FRAP and p70S6Kb, respectively), these results show that Src kinase, mTor/Akt/P70S6 kinase pathway and p38 MAPK are strongly inhibited by gemcitabine in our resistant cells. This mTor/Akt/P70S6 kinase pathway and p38 MAPK are well known to be strongly implicated in cell survival, notably in response to chemotherapy.

To confirm these data, we studied the phosphorylation of these kinases by Western blots. Our results show major modifications in the activation of these signaling pathways. First of all, gemcitabine was able to induce the phosphorylation of p38 MAPK in both the sensitive and the resistant cells, but failed to keep it to a strong level in our resistant cells (**Figure 4D**). Indeed, in the sensitive cells the phosphorylation of p38 MAPK was increased by gemcitabine after 45 minutes of treatment and stays elevated after 4 hours and 24 hours of incubation. On the opposite, in Rox1 and Rox2 cells, the phosphorylation was increased after a 45-minute treatment but was then reduced after 4 hours and 24 hours of treatment. Similarly, gemcitabine induced a strong increase of Akt and p70S6 kinase phosphorylation in our sensitive cells. On the opposite, these phosphorylations were reduced by gemcitabine in

our oxaliplatin-resistant cells (**Figure 4D**). The phosphorylation levels of these kinases were also studied in our other cell lines. Similar effects were observed for p38 MAPK and Akt in RKO cells and only for Akt in Caco-2 cells (data not shown).

Consistent with our result, p38 MAPK and Akt pathway are strongly involved in cell survival and linked to the resistance to irinotecan and 5-FU in colorectal cancer cell (26–29). Our data obtained using PamGene show a decrease in Src kinase and p38 MAPK activation in the resistant cells, in comparison to the sensitive ones. This is very interesting as our previous works have shown that these kinases are intimately involved in the resistance to oxaliplatin, with calpains and NOX1 (10). By reducing Src and p38 MAPK activities, gemcitabine prevents the inhibition of the apoptotic pathway and thus leads to the induction of apoptosis in our oxaliplatin-resistant cells. The activation of Akt was previously shown to be involved in the resistance of tumor cells to gemcitabine. Our data also show that gemcitabine induces the apoptosis of our oxaliplatin-resistant cells by inhibiting the Akt / mTor / p70S6 kinase pathway, while the activation of this same pathway in our sensitive cells allows them to survive to this treatment (30,31). Preclinical studies have shown the efficacy of a chemotherapy protocol combining gemcitabine and the Akt inhibitor LY2780301 on patients with solid tumors mutated on PI3K (32). This study was carried out on several types of solid tumors, however only two patients of this cohort had a colorectal cancer. Our HT29-D4 and RKO cell lines have a PI3K mutation, P449T and H1047R respectively, while the Caco-2 cell line has a wild-type PI3K (33). Thus, it would be interesting to study the efficacy of a LY2780301 – gemcitabine combination treatment on these three cell lines.

Taken together, our results allow us to have a better understanding of the mechanism allowing colorectal cancer cells to resist to oxaliplatin treatment and to propose a new therapeutic protocol (**Figure 5**). We have indeed proved that gemcitabine could be a potential therapeutic option to treat patients with an oxaliplatin-resistant form of colorectal cancer. However this chemotherapy agent should not be used for patients responding correctly to oxaliplatin. Indeed, gemcitabine induces the activation of p38 MAPK and Akt in the cells sensitive to oxaliplatin, leading to cell survival. The data that we have obtained previously and the results presented in this study clearly identify Akt, p38 MAPK and Src kinases as potential therapeutic targets. While p38 MAPK and Src inhibitors are currently under clinical evaluation for colorectal cancer treatment (11,34), we are showing that gemcitabine could also be useful to maximize the inhibition of these kinases and thus beneficial for patients, particularly those presenting a resistance to oxaliplatin treatment.

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2015;65:87–108.
2. Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2007;7:573–84.
3. Thomsen M, Guren MG, Skovlund E, Glimelius B, Hjermsstad MJ, Johansen JS, et al. Health-related quality of life in patients with metastatic colorectal cancer, association with systemic inflammatory response and RAS and BRAF mutation status. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. 2017;81:26–35.
4. Li Z, Liu X-W, Chi Z-C, Sun B-S, Cheng Y, Cheng L-W. Detection of K-ras Mutations in Predicting Efficacy of Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase (EGFR-TK) Inhibitor in Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *PloS One*. 2015;10:e0101019.
5. Bécouarn Y, Ychou M, Ducreux M, Borel C, Bertheault-Cvitkovic F, Seitz JF, et al. Phase II trial of oxaliplatin as first-line chemotherapy in metastatic colorectal cancer patients. Digestive Group of French Federation of Cancer Centers. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1998;16:2739–44.
6. Beretta GL, Benedetti V, Cossa G, Assaraf YGA, Bram E, Gatti L, et al. Increased levels and defective glycosylation of MRPs in ovarian carcinoma cells resistant to oxaliplatin. *Biochem Pharmacol*. 2010;79:1108–17.
7. Kataoka J, Shiraha H, Horiguchi S, Sawahara H, Uchida D, Nagahara T, et al. Loss of Runt-related transcription factor 3 induces resistance to 5-fluorouracil and cisplatin in hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep*. 2016;35:2576–82.
8. Wen K, Fu Z, Wu X, Feng J, Chen W, Qian J. Oct-4 is required for an antiapoptotic behavior of chemoresistant colorectal cancer cells enriched for cancer stem cells: effects associated with STAT3/Survivin. *Cancer Lett*. 2013;333:56–65.
9. Van Houdt WJ, Emmink BL, Pham TV, Piersma SR, Verheem A, Vries RG, et al. Comparative proteomics of colon cancer stem cells and differentiated tumor cells identifies BIRC6 as a potential therapeutic target. *Mol Cell Proteomics MCP*. 2011;10:M111.011353.
10. Chocry M, Leloup L, Kovacic H, Chocry M, Leloup L, Kovacic H. Reversion of resistance to oxaliplatin by inhibition of p38 MAPK in colorectal cancer cell lines: involvement of the calpain / Nox1 pathway. *Oncotarget* [Internet]. 2017 [cited 2017 Oct 20];5. Available from: <http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path%5B%5D=21780&author-preview=gt0>
11. Grossi V, Peserico A, Tezil T, Simone C. p38 α MAPK pathway: a key factor in colorectal cancer therapy and chemoresistance. *World J Gastroenterol*. 2014;20:9744–58.
12. Cossa G, Gatti L, Cassinelli G, Lanzi C, Zaffaroni N, Perego P. Modulation of sensitivity to antitumor agents by targeting the MAPK survival pathway. *Curr Pharm Des*. 2013;19:883–94.
13. Fantini J, Abadie B, Tirard A, Remy L, Ripert JP, el Battari A, et al. Spontaneous and induced dome formation by two clonal cell populations derived from a human adenocarcinoma cell line, HT29. *J Cell Sci*. 1986;83:235–49.
14. Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul*. 1984;22:27–55.
15. Chou T-C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev*. 2006;58:621–81.
16. Costantino E, Maddalena F, Calise S, Piscazzi A, Tirino V, Fersini A, et al. TRAP1, a novel mitochondrial chaperone responsible for multi-drug resistance and protection from apoptosis in human colorectal carcinoma cells. *Cancer Lett*. 2009;279:39–46.
17. Plunkett W, Huang P, Xu YZ, Heinemann V, Grunewald R, Gandhi V. Gemcitabine:

- metabolism, mechanisms of action, and self-potential. *Semin Oncol.* 1995;22:3–10.
18. Storniolo AM, Allerheiligen SR, Pearce HL. Preclinical, pharmacologic, and phase I studies of gemcitabine. *Semin Oncol.* 1997;24:S7-2-S7-7.
 19. Cahan B, Leong L, Wagman L, Yamauchi D, Shibata S, Wilczynski S, et al. Phase I/II Trial of Anticarcinoembryonic Antigen Radioimmunotherapy, Gemcitabine, and Hepatic Arterial Infusion of Fluorodeoxyuridine Postresection of Liver Metastasis for Colorectal Carcinoma. *Cancer Biother Radiopharm.* 2017;32:258–65.
 20. Passardi A, Fanini F, Turci L, Foca F, Rosetti P, Ruscelli S, et al. Prolonged Pemetrexed Infusion Plus Gemcitabine in Refractory Metastatic Colorectal Cancer: Preclinical Rationale and Phase II Study Results. *The Oncologist.* 2017;22:886-e79.
 21. Ziras N, Potamianou A, Varthalitis I, Syrigos K, Tsousis S, Boukovinas I, et al. Multicenter phase II study of gemcitabine and oxaliplatin (GEMOX) as second-line chemotherapy in colorectal cancer patients pretreated with 5-fluorouracil plus irinotecan. *Oncology.* 2006;70:106–14.
 22. Tao Z, Goodisman J, Penefsky HS, Souid A-K. Caspase activation by anticancer drugs: the caspase storm. *Mol Pharm.* 2007;4:583–95.
 23. Gourcier I, Del Rio M, Crabbé L, Candeil L, Copois V, Ychou M, et al. Drug specific resistance to oxaliplatin is associated with apoptosis defect in a cellular model of colon carcinoma. *FEBS Lett.* 2002;529:232–6.
 24. Köhler B, Anguissola S, Concannon CG, Rehm M, Kögel D, Prehn JHM. Bid participates in genotoxic drug-induced apoptosis of HeLa cells and is essential for death receptor ligands' apoptotic and synergistic effects. *PloS One.* 2008;3:e2844.
 25. Kim S, Lee T-J, Park J-W, Kwon TK. Overexpression of cFLIPs inhibits oxaliplatin-mediated apoptosis through enhanced XIAP stability and Akt activation in human renal cancer cells. *J Cell Biochem.* 2008;105:971–9.
 26. Wang J, Wang W, Cai H, Du B, Zhang L, Ma W, et al. MACC1 facilitates chemoresistance and cancer stem cell-like properties of colon cancer cells through the PI3K/AKT signaling pathway. *Mol Med Rep.* 2017;
 27. Yang F, Gao J-Y, Chen H, Du Z-H, Zhang X-Q, Gao W. Targeted inhibition of the phosphoinositide 3-kinase impairs cell proliferation, survival, and invasion in colon cancer. *OncoTargets Ther.* 2017;10:4413–22.
 28. Paillas S, Boissière F, Bibeau F, Denouel A, Mollevi C, Causse A, et al. Targeting the p38 MAPK pathway inhibits irinotecan resistance in colon adenocarcinoma. *Cancer Res.* 2011;71:1041–9.
 29. Yang SY, Miah A, Sales KM, Fuller B, Seifalian AM, Winslet M. Inhibition of the p38 MAPK pathway sensitises human colon cancer cells to 5-fluorouracil treatment. *Int J Oncol.* 2011;38:1695–702.
 30. Massihnia D, Avan A, Funel N, Maftouh M, van Krieken A, Granchi C, et al. Phospho-Akt overexpression is prognostic and can be used to tailor the synergistic interaction of Akt inhibitors with gemcitabine in pancreatic cancer. *J Hematol Oncol/J Hematol Oncol.* 2017;10:9.
 31. Peng T, Dou QP. Everolimus Inhibits Growth of Gemcitabine-Resistant Pancreatic Cancer Cells via Induction of Caspase-Dependent Apoptosis and G2 /M Arrest. *J Cell Biochem.* 2017;118:2722–30.
 32. Angevin E, Cassier PA, Italiano A, Gonçalves A, Gazzah A, Terret C, et al. Safety, tolerability and antitumour activity of LY2780301 (p70S6K/AKT inhibitor) in combination with gemcitabine in molecularly selected patients with advanced or metastatic cancer: a phase IB dose escalation study. *Eur J Cancer.* 2017;83:194–202.
 33. Ahmed D, Eide PW, Eilertsen IA, Danielsen SA, Eknæs M, Hektoen M, et al. Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis.* 2013;2:e71.

34. Chen J, Elfiky A, Han M, Chen C, Saif MW. The role of Src in colon cancer and its therapeutic implications. *Clin Colorectal Cancer*. 2014;13:5–13.

Figure legends

Figure 1: Screening of different chemotherapy efficacies. The HT29-D4, HT29-D4-Rox1 (Rox1), HT29-D4-Rox2 (Rox2), RKO, RKO-Rox1 (Rox1), RKO-Rox2 (Rox2), Caco-2 and Caco-2-Rox cells were submitted to 72-hour cytotoxicity assays to 5-fluoro-uracil, etoposide, vincristine, paclitaxel, doxorubicin and gemcitabine (**C**, **E** and **G** respectively to cells). The IC₅₀ values of 5-fluoro-uracil, etoposide, vincristine, paclitaxel, doxorubicin (**A**) and gemcitabine (**D**, **F** and **H** respectively to cells) were then calculated using the Chou and Talalay's method.

Figure 2: Analysis of gemcitabine and oxaliplatin interactions

The HT29-D4, HT29-D4-Rox1 (Rox1) and HT29-D4-Rox2 (Rox2) cells were submitted to 72-hour cytotoxicity assays to oxaliplatin or/and gemcitabine (**A**). The combination status of oxaliplatin and gemcitabine (**B** and **C**) was then calculated using the Chou and Talalay's method with CompuSyn software. The HT29-D4, Rox1 and Rox2 cells were submitted to 72-hour cytotoxicity assays using different concentrations of the drugs alone (LOHP, gem) or in combination (LvsG). The concentrations were determined according to the IC₅₀. The results obtained with CompuSyn (fraction affected (Fa) and the combination index (CI)) are presented in **B** and **C**.

Figure 3: Analysis of the induction of apoptosis by oxaliplatin and gemcitabine

Flow cytometry analysis of Annexin-V-FITC and propidium iodide staining. Representative dot plots of HT29-D4 (**A**), Rox1 (**B**) and Rox2 (**C**) incubated a 48-hour to oxaliplatin (**oxaliplatin**) and to gemcitabine (**gemcitabine**). The early and late apoptosis (**D** and **C** respectively) values of the different conditions were submitted to a diagram. Values are means ± standard error (error bars) (n=3). HT29-D4, Rox1 and Rox2 cells were seeded in 6-well plates and incubated in the absence, or in the presence of 2 µM of oxaliplatin or 10 nm of gemcitabine. The cells were lysed and equal amounts of proteins were processed for immunoblotting using antibodies against GAPDH, PARP and cleaved PARP (Asp214) (**E**).

Figure 4: Screening of gemcitabine effects on signaling pathways

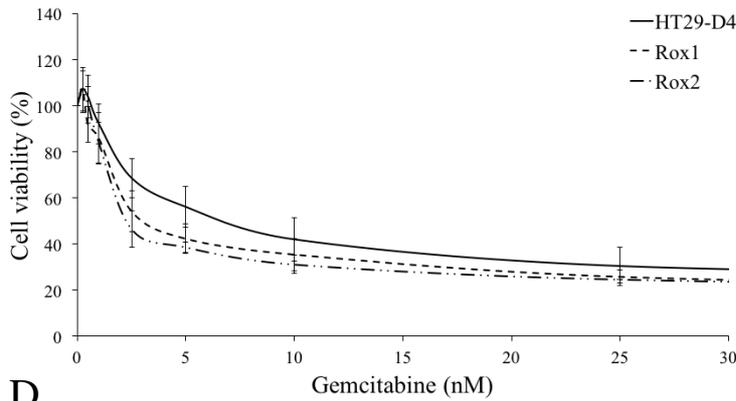
HT29-D4 and Rox1 cells were seeded in 6-well plates and incubated in the presence of 10 nM of gemcitabine for 4 hours. The cells were lysed and 0.5 µg of proteins were used for PamGene kinase activity assay. The data were analyzed using the BioNavigator software to compare the kinase activity of HT29-D4 and Rox1. The top kinase lists of PTK and STK analysis obtained in the presence of gemcitabine are presented in **A**, **B** and **C**, respectively. A negative normalized kinase statistic value indicates a kinase activity higher for HT29-D4 than for Rox1. The cells were incubated in the absence (CTRL) or in the presence of 2 µM of oxaliplatin for 45 minutes (45m), 4 hours (4h), 24 hours (24h). The cells were lysed and equal amounts of proteins were processed for immunoblotting using antibodies against Akt, phospho-Akt (ser 473), p70S6K, phospho-p70S6K (thr389), GAPDH, p38 MAPK and phospho-p38 MAPK (thr180/tyr182) (**D**).

Figure 5: Schematic model of gemcitabine effects in colorectal cancer cells sensitive or resistant to oxaliplatin.

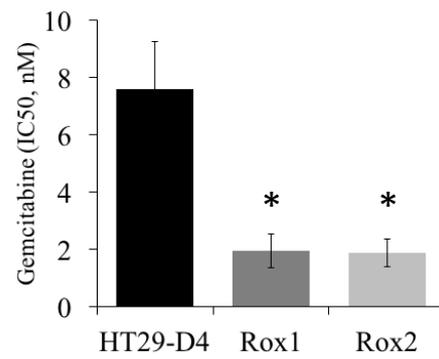
A

	HT29-D4			RKO			Caco-2	
	Sensible	Rox1	Rox2	Sensible	Rox1	Rox2	Sensible	Rox
etoposide (nM)	10.3 ± 1.3	30.8 ± 4.6	37.3 ± 2.8	9.5 ± 0.3	27.8 ± 3.5	22.4 ± 4.6	10.1 ± 2.4	28.3 ± 3.6
vincristine (nM)	3.5 ± 0.6	17.7 ± 3.5	19.6 ± 1.6	3.9 ± 1.5	36.3 ± 2.6	38.3 ± 3.9	4.3 ± 1.3	22.9 ± 2.6
paclitaxel (µM)	12.1 ± 1.8	34.5 ± 4.9	45.4 ± 5.4	7.6 ± 2.3	21.5 ± 1.9	26.8 ± 2.1	8.9 ± 2.5	28.4 ± 3.6
doxorubicin (nM)	48.0 ± 2.5	256.4 ± 8.5	300.9 ± 11.0	35.1 ± 4.3	250.3 ± 10.5	276.7 ± 13.4	38.7 ± 3.7	245.9 ± 20.7
5-FU (µM)	1.0 ± 0.3	3.4 ± 1.2	2.8 ± 0.3	1.5 ± 0.4	6.2 ± 1.7	7.3 ± 1.9	1.3 ± 0.5	6.8 ± 1.2

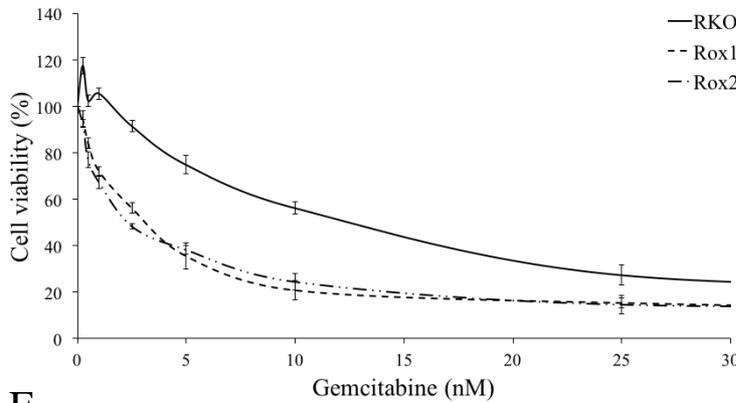
B



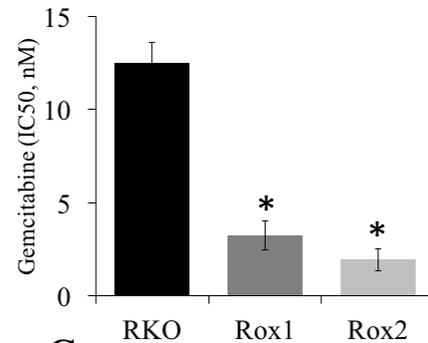
C



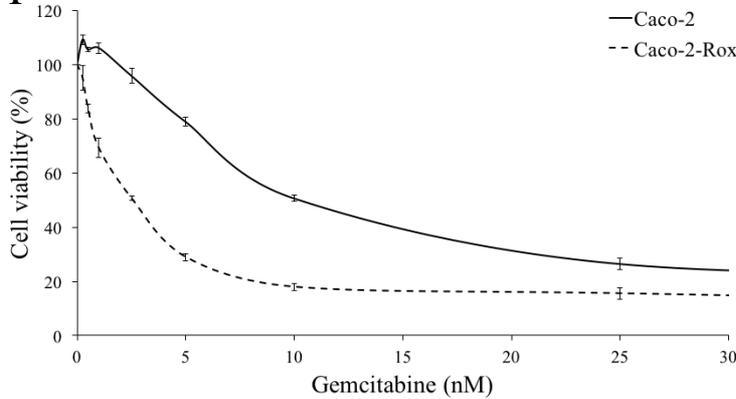
D



E



F



G

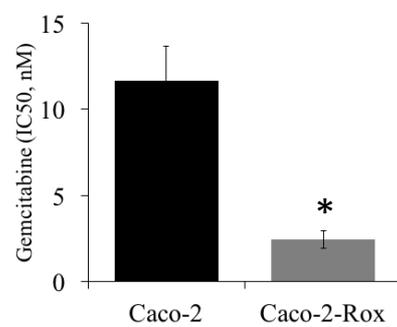


Figure 1:

Figure 2:

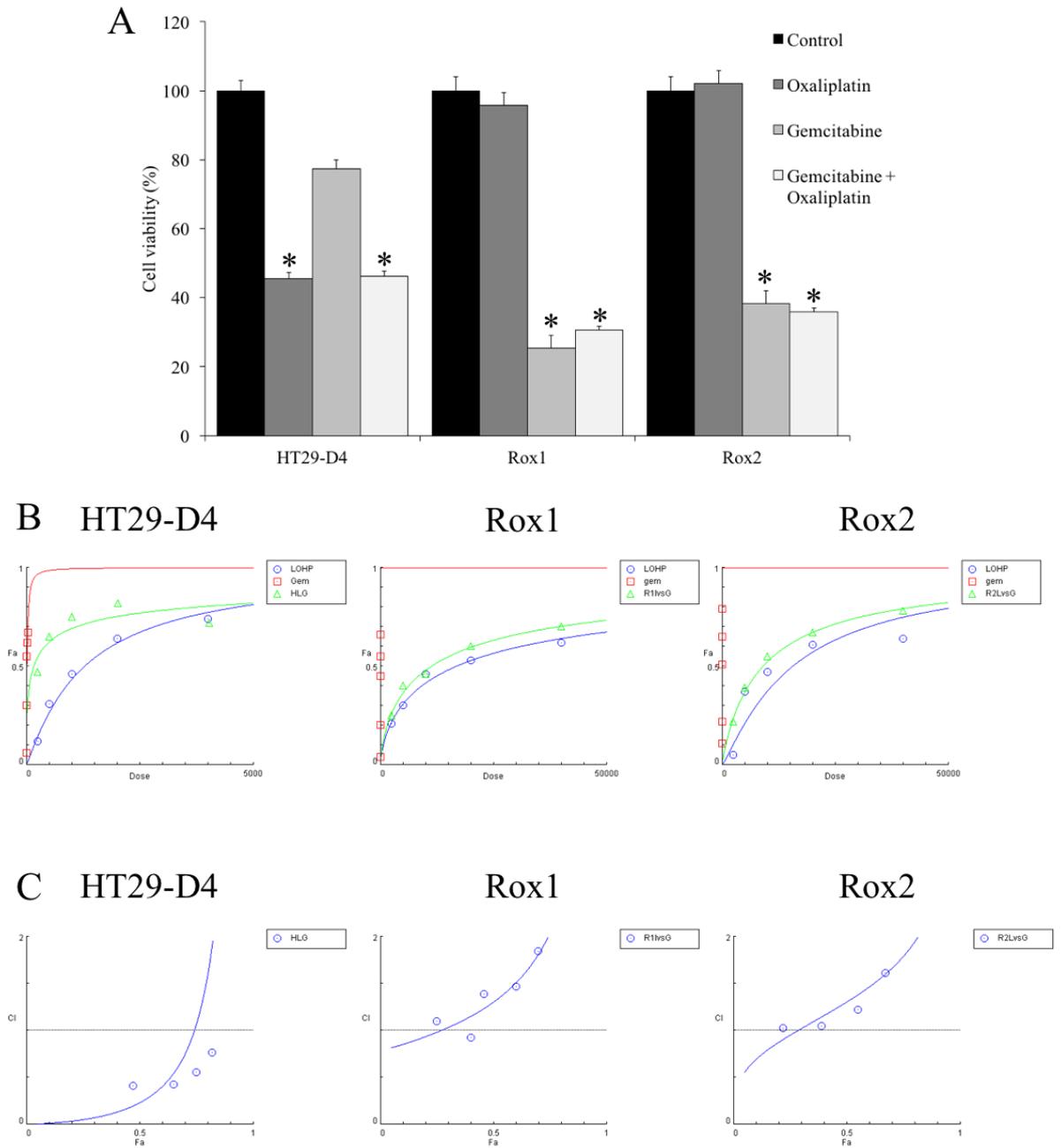


Figure 3:

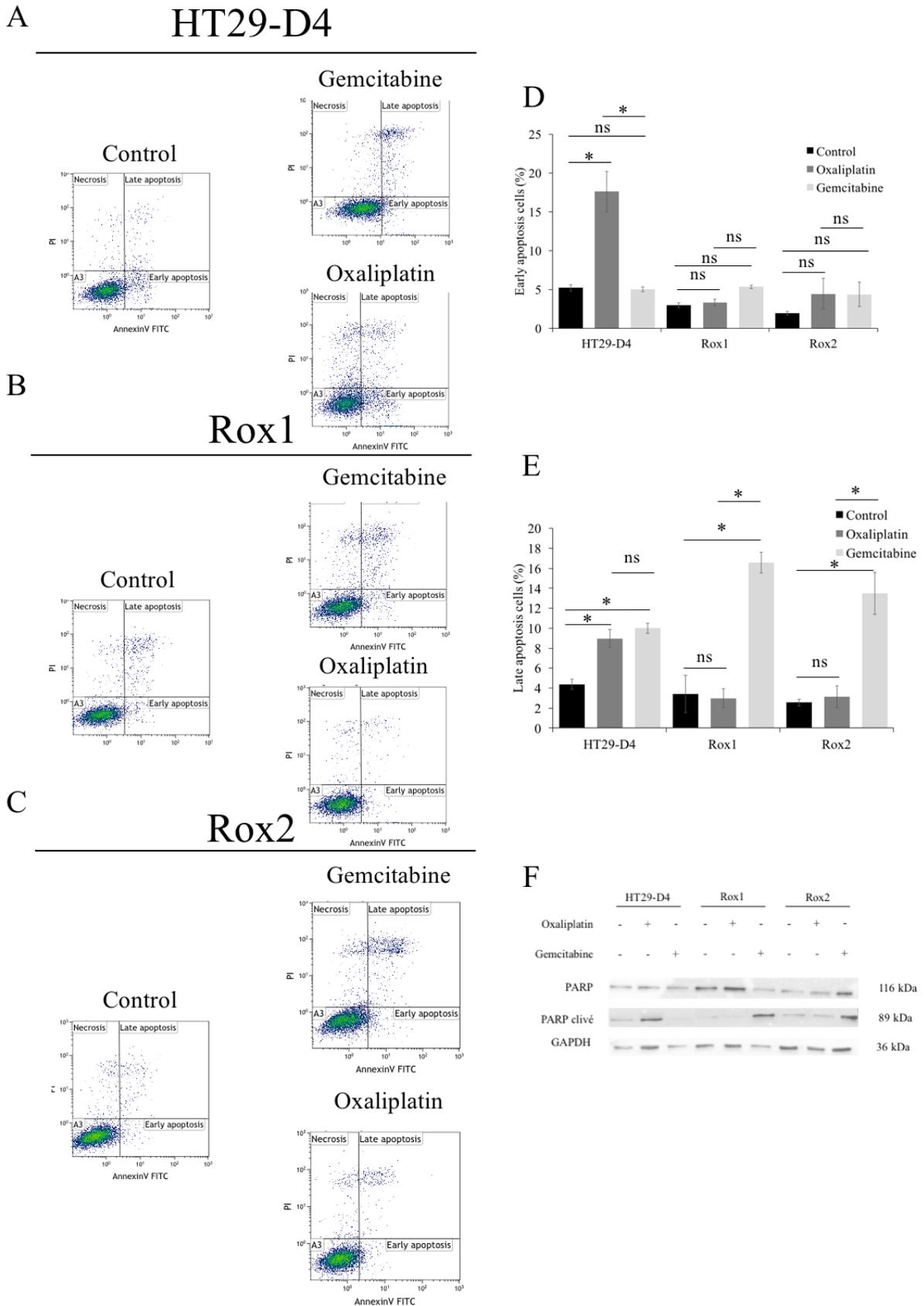


Figure 4:

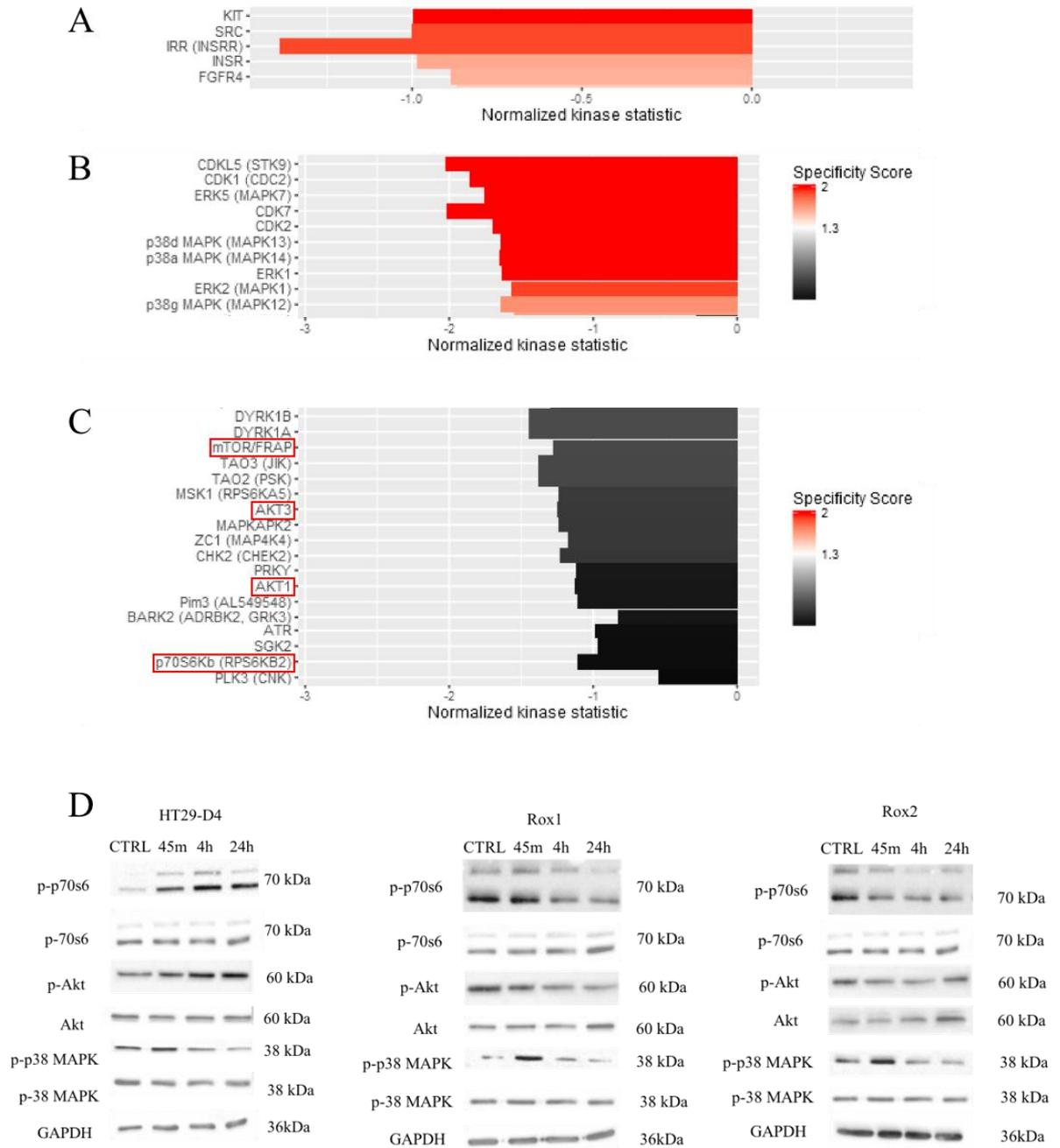
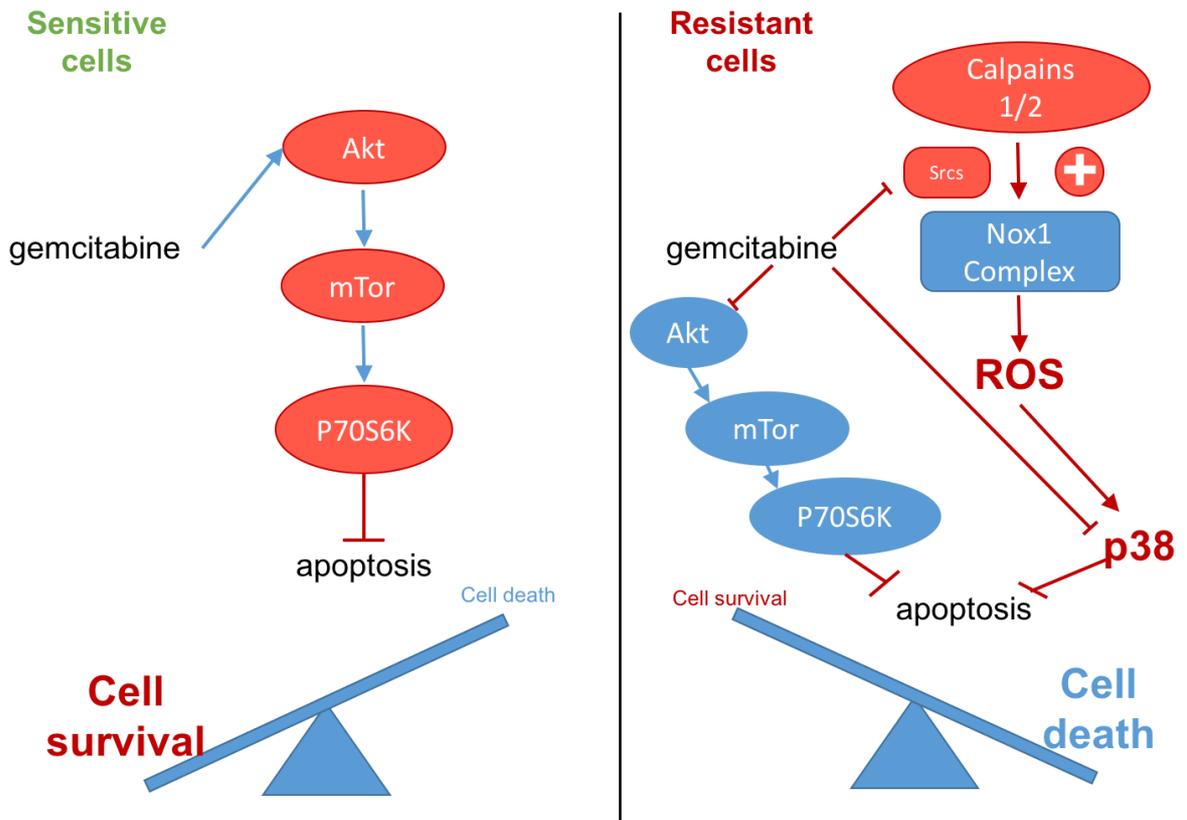


Figure 5:



3 Conclusion de la deuxième partie

Voici les résultats principaux obtenus dans cette deuxième partie (article en préparation) :

- ✓ Les cellules résistantes à l'oxaliplatine sont également résistantes à plusieurs autres chimiothérapies. Les tests de cytotoxicité avec les différentes drogues montrent, en effet que les cellules résistantes ont toujours une IC_{50} supérieure à celle des cellules sensibles et cela pour tous les types cellulaires étudiés. Cette IC_{50} est généralement 3 à 6 fois plus élevées. Ces données montrant une multi-résistance laissent supposer un mécanisme de résistance non spécifique, potentiellement basé sur des canaux de relargage des chimiothérapies.
- ✓ Les cellules résistantes à l'oxaliplatine sont sensibles à la gemcitabine et elles présentent une sensibilité accrue par rapport aux cellules sensibles à l'oxaliplatine. En effet, l' IC_{50} des cellules résistantes est 5 fois inférieur à l' IC_{50} des cellules sensibles. Ces données montrent que nos cellules résistantes à l'oxaliplatine ne sont pas résistantes à toutes les chimiothérapies.
- ✓ La combinaison GEMOX (gemcitabine et oxaliplatine) n'entraîne pas une synergie mais au contraire un antagonisme dans les cellules. En effet, les tests de combinaison réalisés grâce au logiciel CompuSyn montrent que dans les cellules sensibles, il n'y a une possibilité de synergie qu'à faibles doses inférieures à l' IC_{50} , tandis qu'aux doses les plus fortes les deux drogues sont antagonistes. Dans les cellules résistantes, les deux drogues sont antagonistes, seules les très faibles doses seraient synergiques mais cela reste une extrapolation informatique des données.
- ✓ La gemcitabine induit l'apoptose des cellules résistantes à l'oxaliplatine. Des analyses annexine V/PI, qui permettent de différencier apoptose et nécrose, nous ont montré que la gemcitabine était capable d'activer l'apoptose dans nos cellules résistantes, tandis qu'elle n'est pas capable de le faire dans nos cellules sensibles. Ces données montrent que la résistance à l'oxaliplatine de nos cellules n'est pas due à des défauts des voies apoptotiques, puisque l'apoptose reste inductible, mais bien à un contournement par activation de voies de survie.

- ✓ La voie Akt est activée par la gemcitabine dans les cellules sensibles à l'oxaliplatine, ce qui explique l'absence d'induction de l'apoptose dans ces cellules.
- ✓ Dans les cellules résistantes, la gemcitabine inhibe la voie de résistance à l'oxaliplatine calpaïne/Src/NOX1/p38 MAPK identifiée dans la première partie de cette étude. En effet, la gemcitabine réduit l'activation des kinases Src, p38 MAPK et Akt dans les cellules résistantes à l'oxaliplatine.
- ✓ La gemcitabine induit l'apoptose des cellules résistantes à l'oxaliplatine en inhibant les voies de survie suractivées lors du développement de la résistance.
- ✓ Akt, p38 MAPK et Src sont des cibles thérapeutiques intéressantes pour traiter les patients atteints d'un cancer colorectal et ne répondant pas aux protocoles contenant de l'oxaliplatine. En inhibant ces kinases, la gemcitabine est une solution potentielle à la résistance à l'oxaliplatine.

Conclusion générale & perspectives

Les études réalisées précédemment au laboratoire ont mis en évidence une forte implication de NOX1 dans la réponse des cellules tumorales colorectales à l'oxaliplatine (Dahan et al. 2009), mais aussi l'implication de celle-ci et des calpaïnes dans les étapes de migration des cellules tumorales (Sadok et al. 2008; Leloup et al. 2010). Les travaux présentés dans ce manuscrit avaient pour objectif premier de montrer l'implication potentielle de NOX1 et des calpaïnes dans la résistance à l'oxaliplatine. Cependant, comme pour toute bonne thèse, l'hypothèse de départ a été grandement modifiée. Nous allons donc maintenant faire un résumé de toutes les données obtenues au cours de cette thèse et bien sûr les discuter.

➤ **Implication de la voie calpaïne/NOX1 dans la résistance à l'oxaliplatine**

Les résultats obtenus en comparant les cellules sensibles et cellules résistantes à l'oxaliplatine nous ont permis de mettre en évidence une toute nouvelle voie de signalisation mettant en jeu les calpaïnes et NOX1. Nos résultats montrent qu'il existe une régulation de l'activité de NOX1 par les calpaïnes puisqu'une inhibition des calpaïnes dans nos cellules sensibles et résistantes entraîne des variations importantes de la production de ROS. Nous avons ainsi observé une régulation négative de NOX1 par les calpaïnes dans les cellules sensibles, à l'inverse une régulation positive a été observée dans nos cellules résistantes. C'est la première fois qu'une telle inversion de régulation est observée. Il a noté que contrairement à certaines études nous n'avons observé aucune régulation de l'activité des calpaïnes par les ROS. Nous avons poursuivi l'étude en observant les différences de régulation qui existaient entre les cellules sensibles et les cellules résistantes. Nous avons ainsi pu mettre en évidence, pour la première fois, une régulation directe des calpaïnes sur le complexe NOX1 *via* le clivage de la protéine NOXA1 dans les cellules sensibles à l'oxaliplatine. NOXA1 se rajoute donc à la longue liste des substrats des calpaïnes ubiquitaires. La régulation est différente dans les cellules résistantes où les calpaïnes lèvent l'inhibition des Src kinases qui régulent à leur tour la production de ROS en activant NOX1. Ces ROS vont rapidement se dissiper et permettre l'activation de p38 MAPK et ainsi la survie des cellules.

Pour compléter nos travaux réalisés sur cette régulation de NOX1 par les calpaïnes, il serait intéressant d'étudier cette voie de signalisation de façon plus détaillée dans les cellules résistantes. Nous pourrions ainsi essayer de comprendre pourquoi NOXA1 n'est pas clivée dans ces cellules. Nous pourrions aussi mener une étude sur les mécanismes de régulation des calpaïnes sur les Src kinases en étudiant les différentes phosphatases impliquées dans la déphosphorylation du résidu tyrosine 527 dont la phosphorylation est inhibitrice. Des études réalisées précédemment ont identifié PTP1B, mais ces résultats sont à vérifier dans nos conditions (Cortasio et al. 2008). Nous pourrions également étudier la phosphorylation des protéines associées à NOX1, telle que NOXA1 ou p47phox, par les Src kinases (Gianni et al. 2010), de manière à mieux comprendre les mécanismes d'augmentation de production de ROS. La dismutation rapide des ions superoxydes doit être également étudiée dans nos cellules de manière à savoir par exemple si la superoxyde dismutase (SOD) extracellulaire SOD3 est impliquée (Lim et al. 2010). SOD3 pourrait être surexprimée dans les cas de résistance à l'oxaliplatine permettant la dismutation de l'ion superoxyde et ainsi induire l'activation de p38 MAPK (Pekarčíková et al. 2016). De plus, si cette SOD3 est surexprimée au niveau extracellulaire, cette surexpression pourrait être étudiée dans le sang des patients après un traitement à l'oxaliplatine. La présence ou l'absence d'augmentation d'expression de la SOD3 pourrait alors servir pour prédire la réponse au traitement.

Nous pourrions également étudier de manière plus détaillée le clivage de NOXA1 par les calpaïnes. Nos résultats et le logiciel CalCleave nous ont permis de montrer que le clivage intervient dans la partie C-terminal à environ 2 kDa de l'extrémité. Cependant nous ne savons au niveau de quelle séquence exactement ce clivage a lieu. Nous ne savons pas non plus dans quel domaine. C'est pourquoi des études de spectrométrie de masse seraient intéressantes à réaliser. Nous pourrions ainsi connaître plus précisément les mécanismes d'interaction de NOXA1 clivé avec les protéines du complexe NOX1 soit NOX1 lui-même soit NOXO1.

➤ **Implication des mutations de BRAF et de PI3K dans les différents mécanismes de résistance**

Cette étude nous a permis de voir les différences de régulation des voies de signalisation de résistance à l'oxaliplatine entre cellules HT29-D4, RKO et Caco-2. Nos résultats montrent des modifications de la production de ROS dans les différentes cellules résistantes HT29, RKO et Caco-2. Cependant des différences existent entre les différents types cellulaires. Nos mesures de production de ROS par lucigénine, nous ont montré une

augmentation de la production de ROS dans les cellules résistantes HT29-D4 et RKO, mais à l'inverse nous avons observé une diminution de cette production de ROS dans les cellules résistantes Caco-2. Cette diminution de la production de ROS pourrait être expliquée par la diminution d'expression de l'isoforme NOX5 que nous avons observée dans les cellules résistantes à l'oxaliplatine Caco-2-Rox. Cela signifierait que la production de ROS des cellules Caco-2 serait due à l'activité de NOX5, alors que NOX1 est responsable de la production dans les cellules HT29-D4 et RKO. Ces cellules présentent des profils mutationnels différents qui expliquent ces différences de production de ROS. En effet les cellules HT29-D4 et RKO présentent des mutations sur BRAF et sur la PI3K alors que les cellules Caco-2 expriment les formes sauvages de ces deux protéines (Ahmed et al. 2013). Il a été montré qu'une inhibition de l'expression de BRAF V600E conduisait à une augmentation de la production de ROS (Fukuyo et al. 2008; Halliwell 1999) et au contraire qu'une inhibition de la PI3K empêcherait la translocation des facteurs cytosoliques de NOX, conduisant à une diminution de la production de ROS (Nakanishi et al. 2014).

Nous pouvons donc supposer que ces deux mutations impacteraient la production de ROS dans nos différentes cellules résistantes et notamment l'isoforme responsable de cette production. La mutation BRAF V600E entraîne une inhibition de la production intracellulaire de ROS, or les différentes isoformes de NOX5 peuvent être exprimées dans les membranes intracellulaires telles que celles du réticulum endoplasmique et des mitochondries (données préliminaires). Ces différentes études n'ont pas pris en compte que les ROS extracellulaires, il serait donc intéressant de vérifier cette production de ROS (Fukuyo et al. 2008; Halliwell 1999). Les mutations activatrices de la PI3K induisent la phosphorylation des facteurs cytosoliques du complexe NOX1 et augmenterait donc la production de ROS par cette isoforme (Nakanishi et al. 2014). Ainsi les mutations de BRAF et de PI3K pourraient favoriser la production de ROS par l'isoforme NOX1 tandis que l'expression des protéines BRAF et PI3K sauvages favoriserait la production dépendante de NOX5.

L'étude de ce projet pourrait se faire en plusieurs points :

- Nous pourrions étudier l'implication de NOX5 dans la réponse à l'oxaliplatine en utilisant des cellules Caco-2 KO pour NOX5 (cellules déjà obtenues au laboratoire grâce à la technologie CRISPR/Cas9).
- Nous pourrions aussi étudier l'implication de la mutation PI3K en transfectant des cellules Caco-2 avec un plasmide permettant l'expression inductible de la protéine PI3K présentant une mutation activatrice. Cela nous permettrait de contrôler l'expression de la

protéine PI3K et ainsi suivre la production de ROS par lucigénine, mais aussi, de suivre la phosphorylation des différents facteurs cytosoliques du complexe NOX1 et ainsi vérifier que la production de ROS est bien dépendante de NOX1.

- Nous pourrions aussi utiliser des lignées isogéniques BRAF V600E Caco-2 et Caco-2-Rox. La production de ROS intra- et extracellulaire serait analysée pour identifier toutes les modifications induites par la mutation. Nous pourrions ainsi voir si la mutation impacte l'expression et l'activité de NOX5 dans ces cellules. Nous pourrions également transfecter ces cellules avec un plasmide permettant l'expression inductible de la PI3K mutée (activée) et observer les changements induits sur la voie calpaïne/NOX1.

➤ **Etude de l'efficacité d'une association d'inhibiteurs de Src et de p38 MAPK avec le traitement FOLFOX**

Un des objectifs de cette étude concernant l'implication de la voie calpaïne/NOX1 dans la résistance à l'oxaliplatine était d'en identifier les acteurs et de trouver des inhibiteurs pour contrer cette résistance afin de soigner au mieux le patient. Pour cela, nous avons inhibé les calpaïnes et NOX1 dans nos cellules résistantes, cependant les résultats n'étaient pas ceux attendus, les inhibitions étant bien trop drastiques. Ces enzymes étant intimement liées à la mise en place de l'apoptose (Ito et al. 2016; Matsuno et al. 2012; Huang et al. 2017; Li et al. 2009) et à la réponse à l'oxaliplatine dans les cellules tumorales colorectales (Dahan et al. 2009), il semble compliqué de les moduler directement et de manière suffisamment précise pour optimiser l'efficacité du traitement. L'étude de cette voie de signalisation, nous a cependant permis de mettre en évidence l'implication de deux autres acteurs de résistance à l'oxaliplatine. En effet, p38 MAPK et Src sont deux kinases impliquées dans cette voie. Nos résultats sur l'inhibition de p38 MAPK en présence d'oxaliplatine montre clairement un retour à l'apoptose de nos cellules résistantes.

Pour compléter les travaux réalisés sur ces deux kinases, il serait intéressant d'étudier les effets de l'inhibiteur de Src kinase sur la réponse des cellules résistantes à l'oxaliplatine. Pour se faire nous pourrions refaire des tests de cytotoxicité en présence de cet inhibiteur. Ensuite, des études de synergie entre l'oxaliplatine et ces deux inhibiteurs de Src et de p38 MAPK, pourraient être réalisées dans le but de connaître les concentrations suffisantes pour induire la mort cellulaire dans nos cellules résistantes. Ces résultats pourront être transposé à des souris avec des greffes sous-cutanées de nos cellules résistantes et cellules sensibles. Pour

aller encore plus loin nous pourrions étudier avec des cliniciens les effets d'un traitement inhibiteur de Src kinase et/ou de p38 MAPK avec le protocole FOLFOX sur des patients ayant les mutations PI3K activatrice et/ou BRAF V600E.

➤ **La gemcitabine, une thérapie de remplacement pour les tumeurs résistantes à FOLFOX ?**

Le « screening » de différentes chimiothérapies nous a permis de montrer que nos cellules résistantes à l'oxaliplatine sont également résistantes à de nombreuses autres chimiothérapies. Cependant une chimiothérapie sort du lot, en effet la gemcitabine, à l'inverse des autres chimiothérapies, est efficace sur les cellules résistantes à l'oxaliplatine. Elle présente même une efficacité accrue sur ces cellules par rapport aux cellules sensibles. Nous avons montré par différentes techniques (Western blot et annexine V/PI) que la gemcitabine est capable d'induire un retour de l'apoptose dans nos cellules résistantes, ce qui prouve qu'il n'y a pas dans nos cellules de défaut dans les mécanismes apoptotiques, contrairement à ce que certaines études suggèrent (Gourdier et al. 2002 ; Köhler et al. 2008). Cette voie apoptotique activée pourrait venir d'une sous-activation de deux voies de signalisation impliquées dans la survie cellulaire, la voie Akt et la voie p38 MAPK. Ces deux voies de signalisation sont souvent impliquées dans les résistances aux traitements dans différents types de cancer (Paillas et al. 2011; Gao et al. 2002; Igea and Nebreda 2015; Massihnia et al. 2017; Wang et al. 2017; Kim et al. 2008). Notre étude des interactions oxaliplatine – gemcitabine, sur les cellules sensibles et sur les cellules résistantes, a montré que ces deux drogues ont un effet antagoniste dans nos cellules résistantes, ce qui permet d'expliquer que le protocole GEMOX n'a pas fait ces preuves en étude clinique (Ziras et al. 2006). La gemcitabine serait plus efficace utilisée seule pour traiter les cellules résistantes à l'oxaliplatine.

Cependant plusieurs points restent à analyser :

- L'activation de l'apoptose doit être mieux analysée. D'autres tests sur l'activation de l'apoptose doivent être réalisés, nous pourrions ainsi étudier l'activation des caspases 3 et 7 ou la condensation de la chromatine avec le DAPI. Les voies de signalisation de l'apoptose doivent également être étudiées, comme la voie mitochondriale apoptotique qui peut être modulée par Akt (Zhang et al. 2017; Sun et al. 2017).

- Une analyse de l'efficacité de traitements combinant la gemcitabine et des inhibiteurs d'Akt et/ou de p38 MAPK devrait être réalisée. En effet les voies de signalisation Akt et p38 MAPK étant augmentées dans les cellules sensibles en présence de gemcitabine, une inhibition permettrait à ces cellules de retrouver un statut pro-apoptotique et ainsi conduire à leur mort cellulaire. Une étude préclinique étudie déjà cette possibilité (Angevin et al. 2017), cependant elle ne porte pas uniquement sur le cancer colorectal. Nous pourrions par exemple étudier l'effet de la combinaison du LY2780301 (un inhibiteur de p70S6K et Akt) et de la gemcitabine sur les patients ne répondant pas aux différents protocoles chimiothérapeutiques.
- Actuellement une étude sur l'animal est en train d'être réalisée au laboratoire, de façon à confirmer nos observations réalisées *in cellulo*. Cette étude va être aussi couplée à une analyse d'immunofluorescence pour observer les modifications de phosphorylation des protéines Akt et p38 MAPK. Si cette étude montre des effets positifs, nous pourrions discuter avec les cliniciens pour de futures mises en place de protocoles de traitement.

Références

- Abada, Paolo B., Christopher A. Larson, Gerald Manorek, Preston Adams, and Stephen B. Howell
 2012 Sec61 β Controls Sensitivity to Platinum-Containing Chemotherapeutic Agents through Modulation of the Copper-Transporting ATPase ATP7A. *Molecular Pharmacology* 82(3): 510–520.
- Abate, C., and T. Curran
 1990 Encounters with Fos and Jun on the Road to AP-1. *Seminars in Cancer Biology* 1(1): 19–26.
- Abo, A., E. Pick, A. Hall, et al.
 1991 Activation of the NADPH Oxidase Involves the Small GTP-Binding Protein p21rac1. *Nature* 353(6345): 668–670.
- Ago, T., H. Nuno, T. Ito, and H. Sumimoto
 1999 Mechanism for Phosphorylation-Induced Activation of the Phagocyte NADPH Oxidase Protein p47(phox). Triple Replacement of Serines 303, 304, and 328 with Aspartates Disrupts the SH3 Domain-Mediated Intramolecular Interaction in p47(phox), Thereby Activating the Oxidase. *The Journal of Biological Chemistry* 274(47): 33644–33653.
- Ahmad, Saeed
 2010 Platinum-DNA Interactions and Subsequent Cellular Processes Controlling Sensitivity to Anticancer Platinum Complexes. *Chemistry & Biodiversity* 7(3): 543–566.
- Ahmed, D, P W Eide, I A Eilertsen, et al.
 2013 Epigenetic and Genetic Features of 24 Colon Cancer Cell Lines. *Oncogenesis* 2(9): e71.
- Alessi, D. R., S. R. James, C. P. Downes, et al.
 1997 Characterization of a 3-Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase Which Phosphorylates and Activates Protein Kinase Balpha. *Current Biology: CB* 7(4): 261–269.
- Alexandre, Jérôme, Carole Nicco, Christiane Chéreau, et al.
 2006 Improvement of the Therapeutic Index of Anticancer Drugs by the Superoxide Dismutase Mimic Mangafodipir. *Journal of the National Cancer Institute* 98(4): 236–244.
- Almendro, Vanessa, Elisabet Ametller, Susana García-Recio, et al.
 2009 The Role of MMP7 and Its Cross-Talk with the FAS/FASL System during the Acquisition of Chemoresistance to Oxaliplatin. *PloS One* 4(3): e4728.
- Alonso, Gema, Concetta Ambrosino, Margaret Jones, and Angel R. Nebreda
 2000 Differential Activation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Isoforms Depending on Signal Strength. *Journal of Biological Chemistry* 275(51): 40641–40648.

- Ambasta, Rashmi K., Pravir Kumar, Kathy K. Griendling, et al.
2004 Direct Interaction of the Novel Nox Proteins with p22phox Is Required for the Formation of a Functionally Active NADPH Oxidase. *The Journal of Biological Chemistry* 279(44): 45935–45941.
- Ameziane-El-Hassani, Rabii, Myriem Boufrajech, Odile Lagente-Chevallier, et al.
2010 Role of H₂O₂ in RET/PTC1 Chromosomal Rearrangement Produced by Ionizing Radiation in Human Thyroid Cells. *Cancer Research* 70(10): 4123–4132.
- Andresen, K., T. D. Tom, and M. Strand
1991 Characterization of cDNA Clones Encoding a Novel Calcium-Activated Neutral Proteinase from *Schistosoma Mansoni*. *The Journal of Biological Chemistry* 266(23): 15085–15090.
- Andrews, P. A., and S. B. Howell
1990 Cellular Pharmacology of Cisplatin: Perspectives on Mechanisms of Acquired Resistance. *Cancer Cells* (Cold Spring Harbor, N.Y.: 1989) 2(2): 35–43.
- Angevin, Eric, Philippe A. Cassier, Antoine Italiano, et al.
2017 Safety, Tolerability and Antitumour Activity of LY2780301 (p70S6K/AKT Inhibitor) in Combination with Gemcitabine in Molecularly Selected Patients with Advanced or Metastatic Cancer: A Phase IB Dose Escalation Study. *European Journal of Cancer* 83(Supplement C): 194–202.
- Antony, Smitha, Yongzhong Wu, Stephen M. Hewitt, et al.
2013 Characterization of NADPH Oxidase 5 Expression in Human Tumors and Tumor Cell Lines with a Novel Mouse Monoclonal Antibody. *Free Radical Biology & Medicine* 65: 497–508.
- Antunes, F., and E. Cadenas
2001 Cellular Titration of Apoptosis with Steady State Concentrations of H₂O₂: Submicromolar Levels of H₂O₂ Induce Apoptosis through Fenton Chemistry Independent of the Cellular Thiol State. *Free Radical Biology & Medicine* 30(9): 1008–1018.
- Aoki, K., S. Imajoh, S. Ohno, et al.
1986 Complete Amino Acid Sequence of the Large Subunit of the Low-Ca²⁺-Requiring Form of Human Ca²⁺-Activated Neutral Protease (muCANP) Deduced from Its cDNA Sequence. *FEBS Letters* 205(2): 313–317.
- Arbiser, Jack L., John Petros, Robert Klagsbrun, et al.
2002 Reactive Oxygen Generated by Nox1 Triggers the Angiogenic Switch. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(2): 715–720.
- Arnold, R. S., J. Shi, E. Murad, et al.
2001 Hydrogen Peroxide Mediates the Cell Growth and Transformation Caused by the Mitogenic Oxidase Nox1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(10): 5550–5555.
- Arnould, S., I. Hennebelle, P. Canal, R. Bugat, and S. Guichard
2003 Cellular Determinants of Oxaliplatin Sensitivity in Colon Cancer Cell Lines. *European*

Journal of Cancer (Oxford, England: 1990) 39(1): 112–119.

Ashkenazi, A., and V. M. Dixit

1998 Death Receptors: Signaling and Modulation. *Science* (New York, N.Y.) 281(5381): 1305–1308.

Averna, M., R. De Tullio, P. Capini, et al.

2003 Changes in Calpastatin Localization and Expression during Calpain Activation: A New Mechanism for the Regulation of Intracellular Ca²⁺-Dependent Proteolysis. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 60(12): 2669–2678.

Averna, M., R. De Tullio, F. Salamino, E. Melloni, and S. Pontremoli

1999 Phosphorylation of Rat Brain Calpastatins by Protein Kinase C. *FEBS Letters* 450(1–2): 13–16.

Averna, M., R. de Tullio, M. Passalacqua, et al.

2001 Changes in Intracellular Calpastatin Localization Are Mediated by Reversible Phosphorylation. *The Biochemical Journal* 354(Pt 1): 25–30.

Babior, B. M., J. T. Curnutte, and B. S. Kipnes

1975 Pyridine Nucleotide-Dependent Superoxide Production by a Cell-Free System from Human Granulocytes. *The Journal of Clinical Investigation* 56(4): 1035–1042.

Babior, B. M., R. S. Kipnes, and J. T. Curnutte

1973 Biological Defense Mechanisms. The Production by Leukocytes of Superoxide, a Potential Bactericidal Agent. *The Journal of Clinical Investigation* 52(3): 741–744.

Bae, G. U., D. W. Seo, H. K. Kwon, et al.

1999 Hydrogen Peroxide Activates p70(S6k) Signaling Pathway. *The Journal of Biological Chemistry* 274(46): 32596–32602.

Bakhoun, Samuel F., and Duane A. Compton

2012 Chromosomal Instability and Cancer: A Complex Relationship with Therapeutic Potential. *The Journal of Clinical Investigation* 122(4): 1138–1143.

Balaban, Robert S., Shino Nemoto, and Toren Finkel

2005 Mitochondria, Oxidants, and Aging. *Cell* 120(4): 483–495.

Baldrige CW, **Gerard RW**. The extra respiration of phagocytosis. *Am J Physiol* **103**: 235–236, 1933

Ban, N., Y. Takahashi, T. Takayama, et al.

1996 Transfection of Glutathione S-Transferase (GST)-Pi Antisense Complementary DNA Increases the Sensitivity of a Colon Cancer Cell Line to Adriamycin, Cisplatin, Melphalan, and Etoposide. *Cancer Research* 56(15): 3577–3582.

Bánfi, Botond, Robert A. Clark, Klaus Steger, and Karl-Heinz Krause

2003 Two Novel Proteins Activate Superoxide Generation by the NADPH Oxidase NOX1. *Journal of Biological Chemistry* 278(6): 3510–3513.

- Bánfi, Botond, Brigitte Malgrange, Judit Knisz, et al.
2004 NOX3, a Superoxide-Generating NADPH Oxidase of the Inner Ear. *The Journal of Biological Chemistry* 279(44): 46065–46072.
- Bánfi, Botond, Andrés Maturana, Stefano Jaconi, et al.
2000 A Mammalian H⁺ Channel Generated Through Alternative Splicing of the NADPH Oxidase Homolog NOH-1. *Science* 287(5450): 138–142.
- Bánfi, Botond, Gergely Molnár, Andres Maturana, et al.
2001 A Ca²⁺-Activated NADPH Oxidase in Testis, Spleen, and Lymph Nodes. *Journal of Biological Chemistry* 276(40): 37594–37601.
- Barbic, A., and D. M. Crothers
2003 Comparison of Analyses of DNA Curvature. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics* 21(1): 89–97.
- Barouki, R., and Y. Morel
2001 [Biological targets of oxidative stress]. *Journées Annuelles De Diabetologie De l'Hotel-Dieu*: 65–73.
- Barrett, W. C., J. P. DeGnore, S. König, et al.
1999 Regulation of PTP1B via Glutathionylation of the Active Site Cysteine 215. *Biochemistry* 38(20): 6699–6705.
- Barthold, Julia Spencer, Joan Pugarelli, Madolyn L. MacDonald, et al.
2016 Polygenic Inheritance of Cryptorchidism Susceptibility in the LE/Orl Rat. *Molecular Human Reproduction* 22(1): 18–34.
- Bazan, N. G.
1989 Metabolism of Arachidonic Acid in the Retina and Retinal Pigment Epithelium: Biological Effects of Oxygenated Metabolites of Arachidonic Acid. *Progress in Clinical and Biological Research* 312: 15–37.
- Bécouarn, Y., M. Ychou, M. Ducreux, et al.
1998 Phase II Trial of Oxaliplatin as First-Line Chemotherapy in Metastatic Colorectal Cancer Patients. Digestive Group of French Federation of Cancer Centers. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 16(8): 2739–2744.
- Bedard, Karen, and Karl-Heinz Krause
2007 The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiological Reviews* 87(1): 245–313.
- Benetti, Roberta, Tamara Copetti, Stefania Dell'Orso, et al.
2005 The Calpain System Is Involved in the Constitutive Regulation of Beta-Catenin Signaling Functions. *The Journal of Biological Chemistry* 280(23): 22070–22080.
- Berendes, H., R. A. Bridges, and R. A. Good
1957 A Fatal Granulomatosis of Childhood: The Clinical Study of a New Syndrome. *Minnesota Medicine* 40(5): 309–312.

- Beretta, Giovanni Luca, Valentina Benedetti, Giacomo Cossa, et al.
2010 Increased Levels and Defective Glycosylation of MRPs in Ovarian Carcinoma Cells Resistant to Oxaliplatin. *Biochemical Pharmacology* 79(8): 1108–1117.
- Bian, Shu, Xiaofeng Sun, Aiping Bai, et al.
2013 P2X7 Integrates PI3K/AKT and AMPK-PRAS40-mTOR Signaling Pathways to Mediate Tumor Cell Death. *PLoS One* 8(4): e60184.
- Binder-Foucard, F
N.d. Estimation Nationale de L'incidence et de La Mortalité Par Cancer En France Entre 1980 et 2012. Partie 1 - Tumeurs Solides. Saint-Maurice (Fra) : Institut de Veille Sanitaire ; 2013. 122 P.
<http://invs.santepubliquefrance.fr/extension/invs/design/invs/javascript/sugget/DE2FA5E84B3537202D30AA6949BF4D08.cache.html>, accessed October 30, 2017.
- Blanchard, H., P. Grochulski, Y. Li, et al.
1997 Structure of a Calpain Ca(2+)-Binding Domain Reveals a Novel EF-Hand and Ca(2+)-Induced Conformational Changes. *Nature Structural Biology* 4(7): 532–538.
- Blokhina, Olga, Eija Virolainen, and Kurt V. Fagerstedt
2003 Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: A Review. *Annals of Botany* 91 Spec No: 179–194.
- Bochner, Ron, Liat Samuelov, Ofer Sarig, et al.
2017 Calpain 12 Function Revealed through the Study of an Atypical Case of Autosomal Recessive Congenital Ichthyosis. *The Journal of Investigative Dermatology* 137(2): 385–393.
- Bohanes, Pierre, Melissa J. Labonte, and Heinz-Josef Lenz
2011 A Review of Excision Repair Cross-Complementation Group 1 in Colorectal Cancer. *Clinical Colorectal Cancer* 10(3): 157–164.
- Borregaard, N., J. M. Heiple, E. R. Simons, and R. A. Clark
1983 Subcellular Localization of the B-Cytochrome Component of the Human Neutrophil Microbicidal Oxidase: Translocation during Activation. *The Journal of Cell Biology* 97(1): 52–61.
- Bouma, Gerd, and Warren Strober
2003 The Immunological and Genetic Basis of Inflammatory Bowel Disease. *Nature Reviews. Immunology* 3(7): 521–533.
- Boveris, A., and B. Chance
1973 The Mitochondrial Generation of Hydrogen Peroxide. General Properties and Effect of Hyperbaric Oxygen. *The Biochemical Journal* 134(3): 707–716.
- Boyer, John, Estelle G. McLean, Somaiah Aroori, et al.
2004 Characterization of p53 Wild-Type and Null Isogenic Colorectal Cancer Cell Lines Resistant to 5-Fluorouracil, Oxaliplatin, and Irinotecan. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 10(6): 2158–2167.
- Brandes, Ralf P., and Katrin Schröder

2014 NOXious Phosphorylation: Smooth Muscle Reactive Oxygen Species Production Is Facilitated by Direct Activation of the NADPH Oxidase Nox1. *Circulation Research* 115(11): 898–900.

Brash, Alan R.

1999 Lipoxygenases: Occurrence, Functions, Catalysis, and Acquisition of Substrate. *Journal of Biological Chemistry* 274(34): 23679–23682.

Braun, C., M. Engel, M. Seifert, et al.

1999 Expression of Calpain I Messenger RNA in Human Renal Cell Carcinoma: Correlation with Lymph Node Metastasis and Histological Type. *International Journal of Cancer* 84(1): 6–9.

Brown, N., and C. Crawford

1993 Structural Modifications Associated with the Change in Ca²⁺ Sensitivity on Activation of M-Calpain. *FEBS Letters* 322(1): 65–68.

Burger, H., A. Zoumaro-Djayoon, A. W. M. Boersma, et al.

2010 Differential Transport of Platinum Compounds by the Human Organic Cation Transporter hOCT2 (hSLC22A2). *British Journal of Pharmacology* 159(4): 898–908.

Burger, Herman, Walter J. Loos, Karel Eechoute, et al.

2011 Drug Transporters of Platinum-Based Anticancer Agents and Their Clinical Significance. *Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy* 14(1): 22–34.

Burritt, J. B., S. C. Busse, D. Gizachew, et al.

1998 Antibody Imprint of a Membrane Protein Surface. Phagocyte Flavocytochrome B. *The Journal of Biological Chemistry* 273(38): 24847–24852.

Cai, Hua

2005 Hydrogen Peroxide Regulation of Endothelial Function: Origins, Mechanisms, and Consequences. *Cardiovascular Research* 68(1): 26–36.

Carillo, S., M. Pariat, A. m Steff, et al.

1996 PEST Motifs Are Not Required for Rapid Calpain-Mediated Proteolysis of c-Fos Protein. *The Biochemical Journal* 313 (Pt 1): 245–251.

de Carvalho, Daniela D., Amine Sadok, Véronique Bourgarel-Rey, et al.

2008 Nox1 Downstream of 12-Lipoxygenase Controls Cell Proliferation but Not Cell Spreading of Colon Cancer Cells. *International Journal of Cancer* 122(8): 1757–1764.

Cassidy, J.

2000 Review of Oxaliplatin: An Active Platinum Agent in Colorectal Cancer. *International Journal of Clinical Practice* 54(6): 399–402.

Chan, Keefe T., David A. Bennin, and Anna Huttenlocher

2010 Regulation of Adhesion Dynamics by Calpain-Mediated Proteolysis of Focal Adhesion Kinase (FAK). *The Journal of Biological Chemistry* 285(15): 11418–11426.

- Chandel, N. S., D. S. McClintock, C. E. Feliciano, et al.
2000 Reactive Oxygen Species Generated at Mitochondrial Complex III Stabilize Hypoxia-Inducible Factor-1 α during Hypoxia: A Mechanism of O₂ Sensing. *The Journal of Biological Chemistry* 275(33): 25130–25138.
- Chaney, S.
1995 The Chemistry and Biology of Platinum Complexes with the 1,2-Diaminocyclohexane Carrier Ligand (Review). *International Journal of Oncology* 6(6): 1291–1305.
- Chen, Bainian, Qing Zhao, Rui Ni, et al.
2014 Inhibition of Calpain Reduces Oxidative Stress and Attenuates Endothelial Dysfunction in Diabetes. *Cardiovascular Diabetology* 13: 88.
- Chen, Jiezhong, Xu-Feng Huang, Liang Qiao, and Andrew Katsifis
2011 Insulin Caused Drug Resistance to Oxaliplatin in Colon Cancer Cell Line HT29. *Journal of Gastrointestinal Oncology* 2(1): 27–33.
- Chen, Kai, Michael T. Kirber, Hui Xiao, Yu Yang, and John F. Keane
2008 Regulation of ROS Signal Transduction by NADPH Oxidase 4 Localization. *The Journal of Cell Biology* 181(7): 1129–1139.
- Cheng, G., Z. Cao, X. Xu, E. G. van Meir, and J. D. Lambeth
2001 Homologs of gp91phox: Cloning and Tissue Expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene* 269(1–2): 131–140.
- Cheng, Guangjie, and J. David Lambeth
2005 Alternative mRNA Splice Forms of NOXO1: Differential Tissue Expression and Regulation of Nox1 and Nox3. *Gene* 356: 118–126.
- Chiang, Anne C., and Joan Massagué
2008 Molecular Basis of Metastasis. *The New England Journal of Medicine* 359(26): 2814–2823.
- Chicheportiche, Y., P. R. Bourdon, H. Xu, et al.
1997 TWEAK, a New Secreted Ligand in the Tumor Necrosis Factor Family That Weakly Induces Apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* 272(51): 32401–32410.
- Chou, T. C., and P. Talalay
1984 Quantitative Analysis of Dose-Effect Relationships: The Combined Effects of Multiple Drugs or Enzyme Inhibitors. *Advances in Enzyme Regulation* 22: 27–55.
- Chung, Hae Young, Bong Sook Baek, Sang Ho Song, et al.
1997 Xanthine Dehydrogenase/Xanthine Oxidase and Oxidative Stress. *Age* 20(3): 127–140.
- Ciccolini, Joseph
2015 DPD Deficiency in Patients Treated with Fluorouracil. *The Lancet Oncology* 16(16): 1574–1576.
- Comito, Giuseppina, Maura Calvani, Elisa Giannoni, et al.

2011 HIF-1 α Stabilization by Mitochondrial ROS Promotes Met-Dependent Invasive Growth and Vasculogenic Mimicry in Melanoma Cells. *Free Radical Biology & Medicine* 51(4): 893–904.

Compton, Carolyn C.

2003 Colorectal Carcinoma: Diagnostic, Prognostic, and Molecular Features. *Modern Pathology* 16(4): 376–388.

Conacci-Sorrell, Maralice, and Robert N. Eisenman

2011 Post-Translational Control of Myc Function during Differentiation. *Cell Cycle* (Georgetown, Tex.) 10(4): 604–610.

Conacci-Sorrell, Maralice, Celine Ngouenet, and Robert N. Eisenman

2010 Myc-Nick: A Cytoplasmic Cleavage Product of Myc That Promotes Alpha-Tubulin Acetylation and Cell Differentiation. *Cell* 142(3): 480–493.

Cong, J., D. E. Goll, A. M. Peterson, and H. P. Kapprell

1989 The Role of Autolysis in Activity of the Ca²⁺-Dependent Proteinases (Mu-Calpain and M-Calpain). *The Journal of Biological Chemistry* 264(17): 10096–10103.

Cong, J., V. F. Thompson, and D. E. Goll

1993 Effect of Monoclonal Antibodies Specific for the 28-kDa Subunit on Catalytic Properties of the Calpains. *The Journal of Biological Chemistry* 268(34): 25740–25747.

Cooke, Marcus S., Mark D. Evans, Miral Dizdaroglu, and Joseph Lunec

2003 Oxidative DNA Damage: Mechanisms, Mutation, and Disease. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17(10): 1195–1214.

Coolican, S. A., and D. R. Hathaway

1984 Effect of L-Alpha-Phosphatidylinositol on a Vascular Smooth Muscle Ca²⁺-Dependent Protease. Reduction of the Ca²⁺ Requirement for Autolysis. *The Journal of Biological Chemistry* 259(19): 11627–11630.

Cortesio, Christa L., Keefe T. Chan, Benjamin J. Perrin, et al.

2008 Calpain 2 and PTP1B Function in a Novel Pathway with Src to Regulate Invasiveness Dynamics and Breast Cancer Cell Invasion. *The Journal of Cell Biology* 180(5): 957–971.

Cottin, P., S. Poussard, E. Dargelos, et al.

2000 Calpains and Myogenesis. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.) 144: 173–180.

Crea, Francesco, Stefania Nobili, Elisa Paolicchi, et al.

2011 Epigenetics and Chemoresistance in Colorectal Cancer: An Opportunity for Treatment Tailoring and Novel Therapeutic Strategies. *Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy* 14(6): 280–296.

Croall, D. E., and G. N. DeMartino

1991 Calcium-Activated Neutral Protease (Calpain) System: Structure, Function, and Regulation. *Physiological Reviews* 71(3): 813–847.

Croall, D. E., and K. S. McGrody

1994 Domain Structure of Calpain: Mapping the Binding Site for Calpastatin. *Biochemistry* 33(45): 13223–13230.

Cross, A. R.

2000 p40(phox) Participates in the Activation of NADPH Oxidase by Increasing the Affinity of p47(phox) for Flavocytochrome b(558). *The Biochemical Journal* 349(Pt 1): 113–117.

Cross, A. R., J. F. Parkinson, and O. T. Jones

1984 The Superoxide-Generating Oxidase of Leucocytes. NADPH-Dependent Reduction of Flavin and Cytochrome B in Solubilized Preparations. *The Biochemical Journal* 223(2): 337–344.

Cuadrado, Ana, and Angel R. Nebreda

2010 Mechanisms and Functions of p38 MAPK Signalling. *Biochemical Journal* 429(3): 403–417.

Cucoranu, Ioan, Roza Clempus, Anna Dikalova, et al.

2005 NAD(P)H Oxidase 4 Mediates Transforming Growth Factor-beta1-Induced Differentiation of Cardiac Fibroblasts into Myofibroblasts. *Circulation Research* 97(9): 900–907.

Dahan, Iris, Irina Issaeva, Yara Gorzalczany, et al.

2002 Mapping of Functional Domains in the p22(phox) Subunit of Flavocytochrome b(559) Participating in the Assembly of the NADPH Oxidase Complex By “peptide Walking.” *The Journal of Biological Chemistry* 277(10): 8421–8432.

Dahan, Laetitia, Amine Sadok, Jean-Louis Formento, Jean François Seitz, and Hervé Kovacic

2009 Modulation of Cellular Redox State Underlies Antagonism between Oxaliplatin and Cetuximab in Human Colorectal Cancer Cell Lines. *British Journal of Pharmacology* 158(2): 610–620.

Dang, P. M., B. M. Babior, and R. M. Smith

1999 NADPH Dehydrogenase Activity of p67PHOX, a Cytosolic Subunit of the Leukocyte NADPH Oxidase. *Biochemistry* 38(18): 5746–5753.

Dang, Pham My-Chan, Andrew R. Cross, Mark T. Quinn, and Bernard M. Babior

2002 Assembly of the Neutrophil Respiratory Burst Oxidase: A Direct Interaction between p67PHOX and Cytochrome b558 II. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(7): 4262–4265.

Daniel, Kenyon G., Johnathan S. Anderson, Qing Zhong, et al.

2003 Association of Mitochondrial Calpain Activation with Increased Expression and Autolysis of Calpain Small Subunit in an Early Stage of Apoptosis. *International Journal of Molecular Medicine* 12(2): 247–252.

Dayton, W. R.

1982 Comparison of Low- and High-Calcium-Requiring Forms of the Calcium-Activated

- Protease with Their Autocatalytic Breakdown Products. *Biochimica Et Biophysica Acta* 709(2): 166–172.
- Dayton, W. R., W. J. Reville, D. E. Goll, and M. H. Stromer
1976 A Ca²⁺-Activated Protease Possibly Involved in Myofibrillar Protein Turnover. Partial Characterization of the Purified Enzyme. *Biochemistry* 15(10): 2159–2167.
- Dear, T. N., and T. Boehm
1999 Diverse mRNA Expression Patterns of the Mouse Calpain Genes Capn5, Capn6 and Capn11 during Development. *Mechanisms of Development* 89(1–2): 201–209.
2001 Identification and Characterization of Two Novel Calpain Large Subunit Genes. *Gene* 274(1–2): 245–252.
- Dear, T. N., N. T. Meier, M. Hunn, and T. Boehm
2000 Gene Structure, Chromosomal Localization, and Expression Pattern of Capn12, a New Member of the Calpain Large Subunit Gene Family. *Genomics* 68(2): 152–160.
- Debbabi, Maya, Yolande Kroviarski, Odile Bournier, et al.
2013 NOXO1 Phosphorylation on Serine 154 Is Critical for Optimal NADPH Oxidase 1 Assembly and Activation. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 27(4): 1733–1748.
- Deken, Xavier De, Dantong Wang, Marie-Christine Many, et al.
2000 Cloning of Two Human Thyroid cDNAs Encoding New Members of the NADPH Oxidase Family. *Journal of Biological Chemistry* 275(30): 23227–23233.
- Denu, J. M., and K. G. Tanner
1998 Specific and Reversible Inactivation of Protein Tyrosine Phosphatases by Hydrogen Peroxide: Evidence for a Sulfenic Acid Intermediate and Implications for Redox Regulation. *Biochemistry* 37(16): 5633–5642.
- DeVita, Vincent T., and Edward Chu
2008 A History of Cancer Chemotherapy. *Cancer Research* 68(21): 8643–8653.
- Díaz, Begoña, and Sara A. Courtneidge
2012 Redox Signaling at Invasive Microdomains in Cancer Cells. *Free Radical Biology & Medicine* 52(2): 247–256.
- Didsbury, J., R. F. Weber, G. M. Bokoch, T. Evans, and R. Snyderman
1989 Rac, a Novel Ras-Related Family of Proteins That Are Botulinum Toxin Substrates. *The Journal of Biological Chemistry* 264(28): 16378–16382.
- Diekmann, D., A. Abo, C. Johnston, A. W. Segal, and A. Hall
1994 Interaction of Rac with p67phox and Regulation of Phagocytic NADPH Oxidase Activity. *Science (New York, N.Y.)* 265(5171): 531–533.
- Dikalov, Sergey
2011 Cross Talk between Mitochondria and NADPH Oxidases. *Free Radical Biology & Medicine* 51(7): 1289–1301.

- Dinauer, M. C., S. H. Orkin, R. Brown, A. J. Jesaitis, and C. A. Parkos
1987 The Glycoprotein Encoded by the X-Linked Chronic Granulomatous Disease Locus Is a Component of the Neutrophil Cytochrome B Complex. *Nature* 327(6124): 717–720.
- Ding, Zhen-Bin, Bo Hui, Ying-Hong Shi, et al.
2011 Autophagy Activation in Hepatocellular Carcinoma Contributes to the Tolerance of Oxaliplatin via Reactive Oxygen Species Modulation. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 17(19): 6229–6238.
- Diplock, A. T.
1996 The Leon Golberg Memorial Lecture. Antioxidants and Disease Prevention. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 34(10): 1013–1020.
- Donkó, Agnes, Zalán Péterfi, Adrienn Sum, Thomas Leto, and Miklós Geiszt
2005 Dual Oxidases. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 360(1464): 2301–2308.
- Doza, Y. N., A. Cuenda, G. M. Thomas, P. Cohen, and A. R. Nebreda
1995 Activation of the MAP Kinase Homologue RK Requires the Phosphorylation of Thr-180 and Tyr-182 and Both Residues Are Phosphorylated in Chemically Stressed KB Cells. *FEBS Letters* 364(2): 223–228.
- Du, C., M. Fang, Y. Li, L. Li, and X. Wang
2000 Smac, a Mitochondrial Protein That Promotes Cytochrome c-Dependent Caspase Activation by Eliminating IAP Inhibition. *Cell* 102(1): 33–42.
- Dubois, Eline A, and Adam F Cohen
2009 Panitumumab. *British Journal of Clinical Pharmacology* 68(4): 482–483.
- Dumont, A., S. P. Hehner, T. G. Hofmann, et al.
1999 Hydrogen Peroxide-Induced Apoptosis Is CD95-Independent, Requires the Release of Mitochondria-Derived Reactive Oxygen Species and the Activation of NF-kappaB. *Oncogene* 18(3): 747–757.
- Dupont, Yves
2007 Dictionnaire des risques. Armand Colin.
- Dupuy, Corinne, Renée Ohayon, Alexander Valent, et al.
1999 Purification of a Novel Flavoprotein Involved in the Thyroid NADPH Oxidase CLONING OF THE PORCINE AND HUMAN cDNAs. *Journal of Biological Chemistry* 274(52): 37265–37269.
- Dusi, S., M. Donini, and F. Rossi
1996 Mechanisms of NADPH Oxidase Activation: Translocation of p40phox, Rac1 and Rac2 from the Cytosol to the Membranes in Human Neutrophils Lacking p47phox or p67phox. *The Biochemical Journal* 314 (Pt 2): 409–412.
- Edge, Stephen B., and Carolyn C. Compton
2010 The American Joint Committee on Cancer: The 7th Edition of the AJCC Cancer

Staging Manual and the Future of TNM. *Annals of Surgical Oncology* 17(6): 1471–1474.

Ekblad, Lars, Johan Kjellström, and Anders Johnsson

2010 Reduced Drug Accumulation Is More Important in Acquired Resistance against Oxaliplatin than against Cisplatin in Isogenic Colon Cancer Cells. *Anti-Cancer Drugs* 21(5): 523–531.

Ellis, Lee M.

2006 Mechanisms of Action of Bevacizumab as a Component of Therapy for Metastatic Colorectal Cancer. *Seminars in Oncology* 33(5 Suppl 10): S1-7.

Ellson, C. D., S. Gobert-Gosse, K. E. Anderson, et al.

2001 PtdIns(3)P Regulates the Neutrophil Oxidase Complex by Binding to the PX Domain of p40(phox). *Nature Cell Biology* 3(7): 679–682.

Elmore, Susan

2007 Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology* 35(4): 495–516.

Emmendorffer, A., J. Roesler, J. Elsner, et al.

1993 Production of Oxygen Radicals by Fibroblasts and Neutrophils from a Patient with X-Linked Chronic Granulomatous Disease. *European Journal of Haematology* 51(4): 223–227.

Emori, Y., H. Kawasaki, H. Sugihara, et al.

1986 Isolation and Sequence Analyses of cDNA Clones for the Large Subunits of Two Isozymes of Rabbit Calcium-Dependent Protease. *The Journal of Biological Chemistry* 261(20): 9465–9471.

Enslin, Hervé, Joël Raingeaud, and Roger J. Davis

1998 Selective Activation of p38 Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Isoforms by the MAP Kinase Kinases MKK3 and MKK6. *Journal of Biological Chemistry* 273(3): 1741–1748.

Eskelinen, Eeva-Liisa

2011 The Dual Role of Autophagy in Cancer. *Current Opinion in Pharmacology* 11(4): 294–300.

Esteller, Manel

2008 Epigenetics in Cancer. *The New England Journal of Medicine* 358(11): 1148–1159.

Faivre, Sandrine, Denise Chan, Richard Salinas, Barbara Woynarowska, and Jan M. Woynarowski

2003 DNA Strand Breaks and Apoptosis Induced by Oxaliplatin in Cancer Cells. *Biochemical Pharmacology* 66(2): 225–237.

Fantini, J., B. Abadie, A. Tirard, et al.

1986 Spontaneous and Induced Dome Formation by Two Clonal Cell Populations Derived from a Human Adenocarcinoma Cell Line, HT29. *Journal of Cell Science* 83: 235–249.

Federico, Alessandro, Floriana Morgillo, Concetta Tuccillo, Fortunato Ciardiello, and

- Carmela Loguercio
2007 Chronic Inflammation and Oxidative Stress in Human Carcinogenesis. *International Journal of Cancer* 121(11): 2381–2386.
- Fenouille, Nina, Sebastien Grosso, Su Yunchao, et al.
2012 Calpain 2-Dependent I κ B α Degradation Mediates CPT-11 Secondary Resistance in Colorectal Cancer Xenografts. *The Journal of Pathology* 227(1): 118–129.
- Ferlay, Jacques, Isabelle Soerjomataram, Rajesh Dikshit, et al.
2015 Cancer Incidence and Mortality Worldwide: Sources, Methods and Major Patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer* 136(5): E359-386.
- Finkel, Toren
2003 Oxidant Signals and Oxidative Stress. *Current Opinion in Cell Biology* 15(2): 247–254.
- Fischel, J L, P Formento, J Ciccolini, et al.
2002 Impact of the Oxaliplatin-5 Fluorouracil-Folinic Acid Combination on Respective Intracellular Determinants of Drug Activity. *British Journal of Cancer* 86(7): 1162–1168.
- Flaherty, John P., Catrina A. Spruce, Heather E. Fairfield, and David E. Bergstrom
2010 Generation of a Conditional Null Allele of NADPH Oxidase Activator 1 (NOXA1). *Genesis (New York, N.Y.: 2000)* 48(9): 568–575.
- Fleming, Matthew, Sreelakshmi Ravula, Sergei F. Tatishchev, and Hanlin L. Wang
2012 Colorectal Carcinoma: Pathologic Aspects. *Journal of Gastrointestinal Oncology* 3(3): 153–173.
- Fluorouracil Side Effects in Detail
N.d. Drugs.com. <https://www.drugs.com/sfx/fluorouracil-side-effects.html>, accessed October 30, 2017.
- Forbes, L. V., S. J. Moss, and A. W. Segal
1999 Phosphorylation of p67phox in the Neutrophil Occurs in the Cytosol and Is Independent of p47phox. *FEBS Letters* 449(2–3): 225–229.
- Foreman, Julia, Vadim Demidchik, John H. F. Bothwell, et al.
2003 Reactive Oxygen Species Produced by NADPH Oxidase Regulate Plant Cell Growth. *Nature* 422(6930): 442–446.
- Franco, Santos J., Mary A. Rodgers, Benjamin J. Perrin, et al.
2004 Calpain-Mediated Proteolysis of Talin Regulates Adhesion Dynamics. *Nature Cell Biology* 6(10): 977–983.
- Franz, T., M. Vingron, T. Boehm, and T. N. Dear
1999 Capn7: A Highly Divergent Vertebrate Calpain with a Novel C-Terminal Domain. *Mammalian Genome: Official Journal of the International Mammalian Genome Society* 10(3): 318–321.
- Franz, Tanna, Lara Winckler, Thomas Boehm, and T. Neil Dear

- 2004 Capn5 Is Expressed in a Subset of T Cells and Is Dispensable for Development. *Molecular and Cellular Biology* 24(4): 1649–1654.
- Fuchs, A., M. C. Dagher, and P. V. Vignais
1995 Mapping the Domains of Interaction of p40phox with Both p47phox and p67phox of the Neutrophil Oxidase Complex Using the Two-Hybrid System. *The Journal of Biological Chemistry* 270(11): 5695–5697.
- Fukuyama, Mitsutoshi, Kazuhito Rokutan, Toshiaki Sano, et al.
2005 Overexpression of a Novel Superoxide-Producing Enzyme, NADPH Oxidase 1, in Adenoma and Well Differentiated Adenocarcinoma of the Human Colon. *Cancer Letters* 221(1): 97–104.
- Fukuyo, Yayoi, Masahiro Inoue, Takuma Nakajima, et al.
2008 Oxidative Stress Plays a Critical Role in Inactivating Mutant BRAF by Geldanamycin Derivatives. *Cancer Research* 68(15): 6324–6330.
- Gabig, T. G., C. D. Crean, P. L. Mantel, and R. Rosli
1995 Function of Wild-Type or Mutant Rac2 and Rap1a GTPases in Differentiated HL60 Cell NADPH Oxidase Activation. *Blood* 85(3): 804–811.
- Gafni, Juliette, and Lisa M. Ellerby
2002 Calpain Activation in Huntington's Disease. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 22(12): 4842–4849.
- Galadari, Sehamuddin, Anees Rahman, Siraj Pallichankandy, and Faisal Thayyullathil
2017 Reactive Oxygen Species and Cancer Paradox: To Promote or to Suppress? *Free Radical Biology & Medicine* 104: 144–164.
- Gao, Ning, Bing-Hua Jiang, Stephen S. Leonard, et al.
2002 p38 Signaling-Mediated Hypoxia-Inducible Factor 1alpha and Vascular Endothelial Growth Factor Induction by Cr(VI) in DU145 Human Prostate Carcinoma Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 277(47): 45041–45048.
- Gao, Ping, Huafeng Zhang, Ramani Dinavahi, et al.
2007 HIF-Dependent Antitumorigenic Effect of Antioxidants in Vivo. *Cancer Cell* 12(3): 230–238.
- GBD 2015 Mortality and Causes of Death Collaborators
2016 Global, Regional, and National Life Expectancy, All-Cause Mortality, and Cause-Specific Mortality for 249 Causes of Death, 1980-2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet (London, England)* 388(10053): 1459–1544.
- Geiszt, Miklós, Jeffrey B. Kopp, Péter Várnai, and Thomas L. Leto
2000 Identification of Renox, an NAD(P)H Oxidase in Kidney. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(14): 8010–8014.
- Geiszt, Miklós, Kristen Lekstrom, Sebastian Brenner, et al.
2003 NAD(P)H Oxidase 1, a Product of Differentiated Colon Epithelial Cells, Can Partially Replace Glycoprotein 91phox in the Regulated Production of Superoxide by Phagocytes.

Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) 171(1): 299–306.

Geiszt, Miklós, Kristen Lekstrom, Jassir Witta, and Thomas L. Leto

2003a Proteins Homologous to p47phox and p67phox Support Superoxide Production by NAD(P)H Oxidase 1 in Colon Epithelial Cells. *Journal of Biological Chemistry* 278(22): 20006–20012.

2003b Proteins Homologous to p47phox and p67phox Support Superoxide Production by NAD(P)H Oxidase 1 in Colon Epithelial Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 278(22): 20006–20012.

Gewirtz, David A., Shawn E. Holt, and Lynne W. Elmore

2008 Accelerated Senescence: An Emerging Role in Tumor Cell Response to Chemotherapy and Radiation. *Biochemical Pharmacology* 76(8): 947–957.

Gianni, Davide, Céline DerMardirossian, and Gary M. Bokoch

2011 Direct Interaction between Tks Proteins and the N-Terminal Proline-Rich Region (PRR) of NoxA1 Mediates Nox1-Dependent ROS Generation. *European Journal of Cell Biology* 90(2–3): 164–171.

Gianni, Davide, Begoña Diaz, Nicolas Taulet, et al.

2009 Novel p47(phox)-Related Organizers Regulate Localized NADPH Oxidase 1 (Nox1) Activity. *Science Signaling* 2(88): ra54.

Gianni, Davide, Nicolas Taulet, Céline DerMardirossian, and Gary M. Bokoch

2010 C-Src-Mediated Phosphorylation of NoxA1 and Tks4 Induces the Reactive Oxygen Species (ROS)-Dependent Formation of Functional Invadopodia in Human Colon Cancer Cells. *Molecular Biology of the Cell* 21(23): 4287–4298.

Gimenez, Marcela, Brandon M. Schickling, Lucia R. Lopes, and Francis J. Miller

2016 Nox1 in Cardiovascular Diseases: Regulation and Pathophysiology. *Clinical Science (London, England: 1979)* 130(3): 151–165.

Giorgio, Marco, Mirella Trinei, Enrica Migliaccio, and Pier Giuseppe Pelicci

2007 Hydrogen Peroxide: A Metabolic by-Product or a Common Mediator of Ageing Signals? *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 8(9): 722–728.

Glading, A., R. J. Bodnar, I. J. Reynolds, et al.

2004 Epidermal Growth Factor Activates M-Calpain (Calpain II), at Least in Part, by Extracellular Signal-Regulated Kinase-Mediated Phosphorylation. *Molecular and Cellular Biology* 24(6): 2499–2512.

Glading, A., P. Chang, D. A. Lauffenburger, and A. Wells

2000 Epidermal Growth Factor Receptor Activation of Calpain Is Required for Fibroblast Motility and Occurs via an ERK/MAP Kinase Signaling Pathway. *The Journal of Biological Chemistry* 275(4): 2390–2398.

Glebov, Oleg K., Luz M. Rodriguez, Kenneth Nakahara, et al.

2003 Distinguishing Right from Left Colon by the Pattern of Gene Expression. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 12(8): 755–

762.

- Goll, D. E., V. F. Thompson, R. G. Taylor, and T. Zalewska
1992 Is Calpain Activity Regulated by Membranes and Autolysis or by Calcium and Calpastatin? *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 14(8): 549–556.
- Goll, Darrell E., Valery Y F. Thompson, Hongqi Li, Wei Wei, and Jinyang Cong
2003 The Calpain System. *Physiological Reviews* 83(3): 731–801.
- Görlach, A., R. P. Brandes, K. Nguyen, et al.
2000 A gp91phox Containing NADPH Oxidase Selectively Expressed in Endothelial Cells Is a Major Source of Oxygen Radical Generation in the Arterial Wall. *Circulation Research* 87(1): 26–32.
- Goto, S., T. Iida, S. Cho, et al.
1999 Overexpression of Glutathione S-Transferase Pi Enhances the Adduct Formation of Cisplatin with Glutathione in Human Cancer Cells. *Free Radical Research* 31(6): 549–558.
- Gourdier, Isabelle, Maguy Del Rio, Laure Crabbé, et al.
2002a Drug Specific Resistance to Oxaliplatin Is Associated with Apoptosis Defect in a Cellular Model of Colon Carcinoma. *FEBS Letters* 529(2–3): 232–236.
2002b Drug Specific Resistance to Oxaliplatin Is Associated with Apoptosis Defect in a Cellular Model of Colon Carcinoma. *FEBS Letters* 529(2–3): 232–236.
- Graf, Nora, Wee Han Ang, Guangyu Zhu, MyatNoeZin Myint, and Stephen J. Lippard
2011 Role of Endonucleases XPF and XPG in Nucleotide Excision Repair of Platinated DNA and Cisplatin/Oxaliplatin Cytotoxicity. *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology* 12(7): 1115–1123.
- Graham, M. A., G. F. Lockwood, D. Greenslade, et al.
2000 Clinical Pharmacokinetics of Oxaliplatin: A Critical Review. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 6(4): 1205–1218.
- Grasberger, Helmut, and Samuel Refetoff
2006 Identification of the Maturation Factor for Dual Oxidase EVOLUTION OF AN EUKARYOTIC OPERON EQUIVALENT. *Journal of Biological Chemistry* 281(27): 18269–18272.
- Grassilli, Emanuela, Robert Narloch, Elena Federzoni, et al.
2013 Inhibition of GSK3B Bypass Drug Resistance of p53-Null Colon Carcinomas by Enabling Necroptosis in Response to Chemotherapy. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 19(14): 3820–3831.
- Griendling, K. K., C. A. Minieri, J. D. Ollerenshaw, and R. W. Alexander
1994 Angiotensin II Stimulates NADH and NADPH Oxidase Activity in Cultured Vascular Smooth Muscle Cells. *Circulation Research* 74(6): 1141–1148.
- Grizot, S., F. Fieschi, M. C. Dagher, and E. Pebay-Peyroula

- 2001 The Active N-Terminal Region of p67phox. Structure at 1.8 Å Resolution and Biochemical Characterizations of the A128V Mutant Implicated in Chronic Granulomatous Disease. *The Journal of Biological Chemistry* 276(24): 21627–21631.
- Groemping, Yvonne, Karine Lapouge, Stephen J. Smerdon, and Katrin Rittinger
2003 Molecular Basis of Phosphorylation-Induced Activation of the NADPH Oxidase. *Cell* 113(3): 343–355.
- Groemping, Yvonne, and Katrin Rittinger
2005 Activation and Assembly of the NADPH Oxidase: A Structural Perspective. *The Biochemical Journal* 386(Pt 3): 401–416.
- Grosclaude, P
2013 *Survie Des Personnes Atteintes de Cancer En France, 1989-2007 - Etude À Partir Des Registres Des Cancers Du Réseau Francim*. Saint-Maurice : Institut de Veille Sanitaire ; 2013. 412 P.
<http://invs.santepubliquefrance.fr/extension/invs/design/invs/javascript/sugget/DE2FA5E84B3537202D30AA6949BF4D08.cache.html>, accessed October 30, 2017.
- Grynspan, F., W. R. Griffin, A. Cataldo, S. Katayama, and R. A. Nixon
1997 Active Site-Directed Antibodies Identify Calpain II as an Early-Appearing and Pervasive Component of Neurofibrillary Pathology in Alzheimer's Disease. *Brain Research* 763(2): 145–158.
- Gu, Y., B. Jia, F. C. Yang, et al.
2001 Biochemical and Biological Characterization of a Human Rac2 GTPase Mutant Associated with Phagocytic Immunodeficiency. *The Journal of Biological Chemistry* 276(19): 15929–15938.
- Guroff, G.
1964 A NEUTRAL, CALCIUM-ACTIVATED PROTEINASE FROM THE SOLUBLE FRACTION OF RAT BRAIN. *The Journal of Biological Chemistry* 239: 149–155.
- Guyton, K. Z., Y. Liu, M. Gorospe, Q. Xu, and N. J. Holbrook
1996 Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase by H₂O₂. Role in Cell Survival Following Oxidant Injury. *The Journal of Biological Chemistry* 271(8): 4138–4142.
- Haenisch, Sierk, and Ingolf Cascorbi
2012 miRNAs as Mediators of Drug Resistance. *Epigenomics* 4(4): 369–381.
- Half, Elizabeth, Dani Bercovich, and Paul Rozen
2009 Familial Adenomatous Polyposis. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 4: 22.
- Halliwell, B.
1999a Oxygen and Nitrogen Are pro-Carcinogens. Damage to DNA by Reactive Oxygen, Chlorine and Nitrogen Species: Measurement, Mechanism and the Effects of Nutrition. *Mutation Research* 443(1–2): 37–52.
1999b Oxygen and Nitrogen Are pro-Carcinogens. Damage to DNA by Reactive Oxygen, Chlorine and Nitrogen Species: Measurement, Mechanism and the Effects of Nutrition. *Mutation Research* 443(1–2): 37–52.

1999c Antioxidant Defence Mechanisms: From the Beginning to the End (of the Beginning). *Free Radical Research* 31(4): 261–272.

Han, C. H., J. L. Freeman, T. Lee, S. A. Motalebi, and J. D. Lambeth
1998 Regulation of the Neutrophil Respiratory Burst Oxidase. Identification of an Activation Domain in p67(phox). *The Journal of Biological Chemistry* 273(27): 16663–16668.

Hanahan, Douglas, and Robert A. Weinberg
2011 Hallmarks of Cancer: The next Generation. *Cell* 144(5): 646–674.

Harman, D.
1956 Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. *Journal of Gerontology* 11(3): 298–300.

Harris, A. S., D. E. Croall, and J. S. Morrow
1989 Calmodulin Regulates Fodrin Susceptibility to Cleavage by Calcium-Dependent Protease I. *The Journal of Biological Chemistry* 264(29): 17401–17408.

Hata, S., H. Sorimachi, K. Nakagawa, et al.
2001 Domain II of M-Calpain Is a Ca(2+)-Dependent Cysteine Protease. *FEBS Letters* 501(2–3): 111–114.

Hatch, Stephanie B., Lonnie P. Swift, Simona Caporali, et al.
2014 XPF Protein Levels Determine Sensitivity of Malignant Melanoma Cells to Oxaliplatin Chemotherapy: Suitability as a Biomarker for Patient Selection. *International Journal of Cancer* 134(6): 1495–1503.

Hayward, Richard L., Janet S. Macpherson, Jeff Cummings, et al.
2004 Enhanced Oxaliplatin-Induced Apoptosis Following Antisense Bcl-Xl down-Regulation Is p53 and Bax Dependent: Genetic Evidence for Specificity of the Antisense Effect. *Molecular Cancer Therapeutics* 3(2): 169–178.

Hector, S., W. Bolanowska-Higdon, J. Zdanowicz, S. Hitt, and L. Pendyala
2001 In Vitro Studies on the Mechanisms of Oxaliplatin Resistance. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 48(5): 398–406.

Helleman, Jozien, Herman Burger, Irene H. L. Hamelers, et al.
2006 Impaired Cisplatin Influx in an A2780 Mutant Cell Line: Evidence for a Putative, Cis-Configuration-Specific, Platinum Influx Transporter. *Cancer Biology & Therapy* 5(8): 943–949.

Heymes, Christophe, Jennifer K. Bendall, Philippe Ratajczak, et al.
2003 Increased Myocardial NADPH Oxidase Activity in Human Heart Failure. *Journal of the American College of Cardiology* 41(12): 2164–2171.

Heyneman, R. A., and R. E. Vercauteren
1984 Activation of a NADPH Oxidase from Horse Polymorphonuclear Leukocytes in a Cell-Free System. *Journal of Leukocyte Biology* 36(6): 751–759.

- Heyworth, P. G., B. P. Bohl, G. M. Bokoch, and J. T. Curnutte
1994 Rac Translocates Independently of the Neutrophil NADPH Oxidase Components p47phox and p67phox. Evidence for Its Interaction with Flavocytochrome b558. *The Journal of Biological Chemistry* 269(49): 30749–30752.
- Heyworth, P. G., J. T. Curnutte, W. M. Nauseef, et al.
1991 Neutrophil Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase Assembly. Translocation of p47-Phox and p67-Phox Requires Interaction between p47-Phox and Cytochrome b558. *The Journal of Clinical Investigation* 87(1): 352–356.
- Hilenski, Lula L., Roza E. Clempus, Mark T. Quinn, J. David Lambeth, and Kathy K. Griendling
2004 Distinct Subcellular Localizations of Nox1 and Nox4 in Vascular Smooth Muscle Cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 24(4): 677–683.
- Hill, Michelle M., Colin Adrain, Patrick J. Duriez, Emma M. Creagh, and Seamus J. Martin
2004 Analysis of the Composition, Assembly Kinetics and Activity of Native Apaf-1 Apoptosomes. *The EMBO Journal* 23(10): 2134–2145.
- Ho, Chin-Chin, Kuang-Chi Lai, Shu-Chun Hsu, et al.
2011 Benzyl Isothiocyanate (BITC) Inhibits Migration and Invasion of Human Gastric Cancer AGS Cells via Suppressing ERK Signal Pathways. *Human & Experimental Toxicology* 30(4): 296–306.
- Hoffmann, J. S., M. J. Pillaire, G. Maga, et al.
1995 DNA Polymerase Beta Bypasses in Vitro a Single d(GpG)-Cisplatin Adduct Placed on Codon 13 of the HRAS Gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92(12): 5356–5360.
- Holmes, B., A. R. Page, and R. A. Good
1967 Studies of the Metabolic Activity of Leukocytes from Patients with a Genetic Abnormality of Phagocytic Function. *The Journal of Clinical Investigation* 46(9): 1422–1432.
- Horikawa, Y., N. Oda, N. J. Cox, et al.
2000 Genetic Variation in the Gene Encoding Calpain-10 Is Associated with Type 2 Diabetes Mellitus. *Nature Genetics* 26(2): 163–175.
- Hosfield, C. M., J. S. Elce, P. L. Davies, and Z. Jia
1999 Crystal Structure of Calpain Reveals the Structural Basis for Ca(2+)-Dependent Protease Activity and a Novel Mode of Enzyme Activation. *The EMBO Journal* 18(24): 6880–6889.
- Hou, Zhi, Ming Li, and Yanmin Cao
2017 TCF7L2, CAPN10 Polymorphisms Are Associated with Gestational Diabetes Mellitus (GDM) Risks: A Meta-Analysis. *Gynecological Endocrinology: The Official Journal of the International Society of Gynecological Endocrinology* 33(5): 399–404.
- Howell, Stephen B., Roohangiz Safaei, Christopher A. Larson, and Michael J. Sailor
2010 Copper Transporters and the Cellular Pharmacology of the Platinum-Containing Cancer Drugs. *Molecular Pharmacology* 77(6): 887–894.

- Hua, Hanju, Wenbin Chen, Ling Shen, Qinsong Sheng, and Lisong Teng
2013 Honokiol Augments the Anti-Cancer Effects of Oxaliplatin in Colon Cancer Cells. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica* 45(9): 773–779.
- Huang, J., N. D. Hitt, and M. E. Kleinberg
1995 Stoichiometry of p22-Phox and gp91-Phox in Phagocyte Cytochrome b558. *Biochemistry* 34(51): 16753–16757.
- Huang, Weiqi, Ling Bei, Elizabeth E. Hjort, and Elizabeth A. Eklund
2017 Decreased Calpain Activity in Chronic Myeloid Leukemia Impairs Apoptosis by Increasing Survivin in Myeloid Progenitors and xiap1 in Differentiating Granulocytes. *Oncotarget* 8(31): 50629–50641.
- Huang, Zhao-Hui, Dong Hua, and Xiang Du
2009 Polymorphisms in p53, GSTP1 and XRCC1 Predict Relapse and Survival of Gastric Cancer Patients Treated with Oxaliplatin-Based Adjuvant Chemotherapy. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 64(5): 1001–1007.
- Igea, Ana, and Angel R. Nebreda
2015 The Stress Kinase p38 α as a Target for Cancer Therapy. *Cancer Research* 75(19): 3997–4002.
- Imajoh, S., K. Aoki, S. Ohno, et al.
1988 Molecular Cloning of the cDNA for the Large Subunit of the High-Ca²⁺-Requiring Form of Human Ca²⁺-Activated Neutral Protease. *Biochemistry* 27(21): 8122–8128.
- Imajoh-Ohmi, S., K. Tokita, H. Ochiai, M. Nakamura, and S. Kanegasaki
1992 Topology of Cytochrome b558 in Neutrophil Membrane Analyzed by Anti-Peptide Antibodies and Proteolysis. *The Journal of Biological Chemistry* 267(1): 180–184.
- INCa
2017 Données Globales D'épidémiologie Des Cancers - Epidémiologie Des Cancers | Institut National Du Cancer. <http://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/Les-chiffres-du-cancer-en-France/Epidemiologie-des-cancers/Donnees-globales>, accessed October 30, 2017.
- InfoCancer
2017 Le Cancer À Travers Les Âges. <http://www.arcagy.org/infocancer/en-savoir-plus/cancer/le-cancer-travers-les-ages.html>, accessed October 30, 2017.
- Irinotecan Side Effects in Detail - Drugs.com
N.d. <https://www.drugs.com/sfx/irinotecan-side-effects.html>, accessed October 30, 2017.
- Ishida, Seiko, Jaekwon Lee, Dennis J. Thiele, and Ira Herskowitz
2002 Uptake of the Anticancer Drug Cisplatin Mediated by the Copper Transporter Ctr1 in Yeast and Mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(22): 14298–14302.
- Ito, Kunihiro, Akinobu Ota, Takayuki Ono, et al.
2016 Inhibition of Nox1 Induces Apoptosis by Attenuating the AKT Signaling Pathway in

Oral Squamous Cell Carcinoma Cell Lines. *Oncology Reports* 36(5): 2991–2998.

Ito, T., Y. Matsui, T. Ago, K. Ota, and H. Sumimoto
2001 Novel Modular Domain PB1 Recognizes PC Motif to Mediate Functional Protein-Protein Interactions. *The EMBO Journal* 20(15): 3938–3946.

Jani, Tanvi S., Jennifer DeVecchio, Tapati Mazumdar, Akwasi Agyeman, and Janet A. Houghton
2010 Inhibition of NF-kappaB Signaling by Quinacrine Is Cytotoxic to Human Colon Carcinoma Cell Lines and Is Synergistic in Combination with Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) or Oxaliplatin. *The Journal of Biological Chemistry* 285(25): 19162–19172.

Janssen-Heininger, Yvonne M. W., Brooke T. Mossman, Nicholas H. Heintz, et al.
2008 Redox-Based Regulation of Signal Transduction: Principles, Pitfalls, and Promises. *Free Radical Biology & Medicine* 45(1): 1–17.

Jass, J. R.
1999 Serrated Adenoma and Colorectal Cancer. *The Journal of Pathology* 187(5): 499–502.

Javeshghani, Danesh, Danesh Javesghani, Sheldon A. Magder, et al.
2002 Molecular Characterization of a Superoxide-Generating NAD(P)H Oxidase in the Ventilatory Muscles. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 165(3): 412–418.

Jay, Desmond B., Christopher A. Papaharalambus, Bonnie Seidel-Rogol, et al.
2008 Nox5 Mediates PDGF-Induced Proliferation in Human Aortic Smooth Muscle Cells. *Free Radical Biology & Medicine* 45(3): 329–335.

Jesaitis, A. J.
1995 Structure of Human Phagocyte Cytochrome B and Its Relationship to Microbicidal Superoxide Production. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 155(7): 3286–3288.

Ji, Li Li
2007 Antioxidant Signaling in Skeletal Muscle: A Brief Review. *Experimental Gerontology* 42(7): 582–593.

Jones, S. A., V. B. O'Donnell, J. D. Wood, et al.
1996 Expression of Phagocyte NADPH Oxidase Components in Human Endothelial Cells. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 271(4): H1626–H1634.

Joo, Jung Hee, Hyunjin Oh, Myungjin Kim, et al.
2016 NADPH Oxidase 1 Activity and ROS Generation Are Regulated by Grb2/Cbl-Mediated Proteasomal Degradation of NoxO1 in Colon Cancer Cells. *Cancer Research* 76(4): 855–865.

Kamei, M., G. C. Webb, I. G. Young, and H. D. Campbell
1998 SOLH, a Human Homologue of the *Drosophila Melanogaster* Small Optic Lobes Gene Is a Member of the Calpain and Zinc-Finger Gene Families and Maps to Human Chromosome 16p13.3 near CATM (Cataract with Microphthalmia). *Genomics* 51(2): 197–206.

- Kamizato, Mai, Kensei Nishida, Kiyoshi Masuda, et al.
2009 Interleukin 10 Inhibits Interferon Gamma- and Tumor Necrosis Factor Alpha-Stimulated Activation of NADPH Oxidase 1 in Human Colonic Epithelial Cells and the Mouse Colon. *Journal of Gastroenterology* 44(12): 1172–1184.
- Kanai, F., H. Liu, S. J. Field, et al.
2001 The PX Domains of p47phox and p40phox Bind to Lipid Products of PI(3)K. *Nature Cell Biology* 3(7): 675–678.
- Kapprell, H. P., and D. E. Goll
1989 Effect of Ca²⁺ on Binding of the Calpains to Calpastatin. *The Journal of Biological Chemistry* 264(30): 17888–17896.
- Katano, Kuniyuki, Akira Kondo, Roohangiz Safaei, et al.
2002 Acquisition of Resistance to Cisplatin Is Accompanied by Changes in the Cellular Pharmacology of Copper. *Cancer Research* 62(22): 6559–6565.
- Kawahara, T., Y. Kuwano, S. Teshima-Kondo, et al.
2001 Toll-like Receptor 4 Regulates Gastric Pit Cell Responses to Helicobacter Pylori Infection. *The Journal of Medical Investigation: JMI* 48(3–4): 190–197.
- Kawahara, T., S. Teshima, A. Oka, et al.
2001 Type I Helicobacter Pylori Lipopolysaccharide Stimulates Toll-like Receptor 4 and Activates Mitogen Oxidase 1 in Gastric Pit Cells. *Infection and Immunity* 69(7): 4382–4389.
- Kawahara, Tsukasa, Motoyuki Kohjima, Yuki Kuwano, et al.
2005 Helicobacter Pylori Lipopolysaccharide Activates Rac1 and Transcription of NADPH Oxidase Nox1 and Its Organizer NOXO1 in Guinea Pig Gastric Mucosal Cells. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 288(2): C450–457.
- Kawahara, Tsukasa, Yuki Kuwano, Shigetada Teshima-Kondo, et al.
2004 Role of Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase 1 in Oxidative Burst Response to Toll-like Receptor 5 Signaling in Large Intestinal Epithelial Cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 172(5): 3051–3058.
- Kawahara, Tsukasa, Darren Ritsick, Guangjie Cheng, and J. David Lambeth
2005 Point Mutations in the Proline-Rich Region of p22phox Are Dominant Inhibitors of Nox1- and Nox2-Dependent Reactive Oxygen Generation. *The Journal of Biological Chemistry* 280(36): 31859–31869.
- Kelland, Lloyd
2007 The Resurgence of Platinum-Based Cancer Chemotherapy. *Nature Reviews. Cancer* 7(8): 573–584.
- Kikuchi, H., M. Hikage, H. Miyashita, and M. Fukumoto
2000 NADPH Oxidase Subunit, gp91(phox) Homologue, Preferentially Expressed in Human Colon Epithelial Cells. *Gene* 254(1–2): 237–243.
- Kim, Jongdoo, Jaehong Kim, and Jong-Sup Bae

- 2016 ROS Homeostasis and Metabolism: A Critical Liaison for Cancer Therapy. *Experimental & Molecular Medicine* 48(11): e269.
- Kim, Jun-Sub, Becky A. Diebold, Bernard M. Babior, Ulla G. Knaus, and Gary M. Bokoch
2007 Regulation of Nox1 Activity via Protein Kinase A-Mediated Phosphorylation of NoxA1 and 14-3-3 Binding. *The Journal of Biological Chemistry* 282(48): 34787–34800.
- Kim, Kwang Won, Chang Hwa Choi, Thae Hyun Kim, et al.
2009 Silibinin Inhibits Glioma Cell Proliferation via Ca²⁺/ROS/MAPK-Dependent Mechanism in Vitro and Glioma Tumor Growth in Vivo. *Neurochemical Research* 34(8): 1479–1490.
- Kim, Shin, Tae-Jin Lee, Jong-Wook Park, and Taeg Kyu Kwon
2008 Overexpression of cFLIPs Inhibits Oxaliplatin-Mediated Apoptosis through Enhanced XIAP Stability and Akt Activation in Human Renal Cancer Cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 105(4): 971–979.
- Kischkel, F. C., S. Hellbardt, I. Behrmann, et al.
1995 Cytotoxicity-Dependent APO-1 (Fas/CD95)-Associated Proteins Form a Death-Inducing Signaling Complex (DISC) with the Receptor. *The EMBO Journal* 14(22): 5579–5588.
- Kjersem, J. B., T. Ik Dahl, O. C. Lingjaerde, et al.
2014 Plasma microRNAs Predicting Clinical Outcome in Metastatic Colorectal Cancer Patients Receiving First-Line Oxaliplatin-Based Treatment. *Molecular Oncology* 8(1): 59–67.
- Kleinberg, M. E., D. Mital, D. Rotrosen, and H. L. Malech
1992 Characterization of a Phagocyte Cytochrome b558 91-Kilodalton Subunit Functional Domain: Identification of Peptide Sequence and Amino Acids Essential for Activity. *Biochemistry* 31(10): 2686–2690.
- Knaus, U. G., P. G. Heyworth, T. Evans, J. T. Curnutte, and G. M. Bokoch
1991 Regulation of Phagocyte Oxygen Radical Production by the GTP-Binding Protein Rac 2. *Science* 254(5037): 1512–1515.
- Koga, H., H. Terasawa, H. Nunoi, et al.
1999 Tetratricopeptide Repeat (TPR) Motifs of p67(phox) Participate in Interaction with the Small GTPase Rac and Activation of the Phagocyte NADPH Oxidase. *The Journal of Biological Chemistry* 274(35): 25051–25060.
- Köhler, Barbara, Sergio Anguissola, Caoimhin G. Concannon, et al.
2008 Bid Participates in Genotoxic Drug-Induced Apoptosis of HeLa Cells and Is Essential for Death Receptor Ligands' Apoptotic and Synergistic Effects. *PloS One* 3(7): e2844.
- Komatsu, D., M. Kato, J. Nakayama, S. Miyagawa, and T. Kamata
2008 NADPH Oxidase 1 Plays a Critical Mediating Role in Oncogenic Ras-Induced Vascular Endothelial Growth Factor Expression. *Oncogene* 27(34): 4724–4732.
- König, Norbert, Fabrice Raynaud, Helen Feane, et al.
2003 Calpain 3 Is Expressed in Astrocytes of Rat and Microcebus Brain. *Journal of*

Chemical Neuroanatomy 25(2): 129–136.

Korshunov, Sergei S., and James A. Imlay

2002 A Potential Role for Periplasmic Superoxide Dismutase in Blocking the Penetration of External Superoxide into the Cytosol of Gram-Negative Bacteria. *Molecular Microbiology* 43(1): 95–106.

Koshkin, V., O. Lotan, and E. Pick

1996 The Cytosolic Component p47(phox) Is Not a Sine qua Non Participant in the Activation of NADPH Oxidase but Is Required for Optimal Superoxide Production. *The Journal of Biological Chemistry* 271(48): 30326–30329.

Kostić, Danijela A, Dimitrijević, et al.

2015 Xanthine Oxidase: Isolation, Assays of Activity, and Inhibition. Research article. *Journal of Chemistry*. <https://www.hindawi.com/journals/jchem/2015/294858/>.

Kroviarski, Yolande, Maya Debbabi, Rafik Bachoual, et al.

2010 Phosphorylation of NADPH Oxidase Activator 1 (NOXA1) on Serine 282 by MAP Kinases and on Serine 172 by Protein Kinase C and Protein Kinase A Prevents NOX1 Hyperactivation. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 24(6): 2077–2092.

Kulkarni, S., K. B. Reddy, F. J. Esteva, et al.

2010 Calpain Regulates Sensitivity to Trastuzumab and Survival in HER2-Positive Breast Cancer. *Oncogene* 29(9): 1339–1350.

Kuribayashi, Futoshi, Hiroyuki Nuno, Kaori Wakamatsu, et al.

2002 The Adaptor Protein p40(phox) as a Positive Regulator of the Superoxide-Producing Phagocyte Oxidase. *The EMBO Journal* 21(23): 6312–6320.

Kuwano, Yuki, Tsukasa Kawahara, Hironori Yamamoto, et al.

2006 Interferon-Gamma Activates Transcription of NADPH Oxidase 1 Gene and Upregulates Production of Superoxide Anion by Human Large Intestinal Epithelial Cells. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 290(2): C433-443.

Kuwano, Yuki, Kumiko Tominaga, Tsukasa Kawahara, et al.

2008 Tumor Necrosis Factor Alpha Activates Transcription of the NADPH Oxidase Organizer 1 (NOXO1) Gene and Upregulates Superoxide Production in Colon Epithelial Cells. *Free Radical Biology & Medicine* 45(12): 1642–1652.

Kweekel, D. M., H. Gelderblom, and H.-J. Guchelaar

2005 Pharmacology of Oxaliplatin and the Use of Pharmacogenomics to Individualize Therapy. *Cancer Treatment Reviews* 31(2): 90–105.

Kweekel, Dina M., Hans Gelderblom, Ninja F. Antonini, et al.

2009 Glutathione-S-Transferase Pi (GSTP1) Codon 105 Polymorphism Is Not Associated with Oxaliplatin Efficacy or Toxicity in Advanced Colorectal Cancer Patients. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 45(4): 572–578.

Lambeth, J. David

- 2002 Nox/Duox Family of Nicotinamide Adenine Dinucleotide (Phosphate) Oxidases. *Current Opinion in Hematology* 9(1): 11–17.
- 2004 NOX Enzymes and the Biology of Reactive Oxygen. *Nature Reviews. Immunology* 4(3): 181–189.
- Lange, Sabine S., Kei-ichi Takata, and Richard D. Wood
2011 DNA Polymerases and Cancer. *Nature Reviews. Cancer* 11(2): 96–110.
- Larsson, Susanna C., and Alicja Wolk
2007 Obesity and Colon and Rectal Cancer Risk: A Meta-Analysis of Prospective Studies. *The American Journal of Clinical Nutrition* 86(3): 556–565.
- Laurent, Alexis, Carole Nicco, Christiane Chéreau, et al.
2005 Controlling Tumor Growth by Modulating Endogenous Production of Reactive Oxygen Species. *Cancer Research* 65(3): 948–956.
- Laurent, Eunice, James W. McCoy, Roberto A. Macina, et al.
2008 Nox1 Is over-Expressed in Human Colon Cancers and Correlates with Activating Mutations in K-Ras. *International Journal of Cancer* 123(1): 100–107.
- Le Morvan, Valérie, Denis Smith, Armelle Laurand, et al.
2007 Determination of ERCC2 Lys751Gln and GSTP1 Ile105Val Gene Polymorphisms in Colorectal Cancer Patients: Relationships with Treatment Outcome. *Pharmacogenomics* 8(12): 1693–1703.
- Lebwohl, D., and R. Canetta
1998 Clinical Development of Platinum Complexes in Cancer Therapy: An Historical Perspective and an Update. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 34(10): 1522–1534.
- Lecomte T, André T, Panis Y, Laurent-Puig P, Bibeau F, Taieb J. « du côlon ». *Thésaurus National de Cancérologie Digestive*, 11-2016
- Lee, H. J., H. Sorimachi, S. Y. Jeong, S. Ishiura, and K. Suzuki
1998 Molecular Cloning and Characterization of a Novel Tissue-Specific Calpain Predominantly Expressed in the Digestive Tract. *Biological Chemistry* 379(2): 175–183.
- Lee, Ju-Han, Jun-Won Um, Ji-Hye Lee, et al.
2012 Can Immunohistochemistry of Multidrug-Resistant Proteins Replace the Histoculture Drug Response Assay in Colorectal Adenocarcinomas? *Hepato-Gastroenterology* 59(116): 1075–1078.
- Lee, S.-J., Y.-L. Choi, E.-J. Lee, et al.
2007 Increased Expression of Calpain 6 in Uterine Sarcomas and Carcinosarcomas: An Immunohistochemical Analysis. *International Journal of Gynecological Cancer: Official Journal of the International Gynecological Cancer Society* 17(1): 248–253.
- Lee, Sun-Joo, Byoung-Gie Kim, Yoon-La Choi, and Jeong-Won Lee
2008 Increased Expression of Calpain 6 during the Progression of Uterine Cervical Neoplasia: Immunohistochemical Analysis. *Oncology Reports* 19(4): 859–863.

- Leloup, Ludovic, Hanshuang Shao, Yong Ho Bae, et al.
2010a M-Calpain Activation Is Regulated by Its Membrane Localization and by Its Binding to Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate. *The Journal of Biological Chemistry* 285(43): 33549–33566.
2010b M-Calpain Activation Is Regulated by Its Membrane Localization and by Its Binding to Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate. *The Journal of Biological Chemistry* 285(43): 33549–33566.
- Leloup, Ludovic, and Alan Wells
2011 Calpains as Potential Anti-Cancer Targets. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 15(3): 309–323.
- Lenz, Heinz-Josef
2007 Cetuximab in the Management of Colorectal Cancer. *Biologics : Targets & Therapy* 1(2): 77–91.
- Leseney, A. M., D. Dème, O. Legué, et al.
1999 Biochemical Characterization of a Ca²⁺/NAD(P)H-Dependent H₂O₂ Generator in Human Thyroid Tissue. *Biochimie* 81(4): 373–380.
- Leto, T. L., A. G. Adams, and I. de Mendez
1994 Assembly of the Phagocyte NADPH Oxidase: Binding of Src Homology 3 Domains to Proline-Rich Targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(22): 10650–10654.
- Lewis, D. F., and G. Sheridan
2001 Cytochromes P450, Oxygen, and Evolution. *TheScientificWorldJournal* 1: 151–167.
- Li, Jian, Michael Stouffs, Lena Serrander, et al.
2006 The NADPH Oxidase NOX4 Drives Cardiac Differentiation: Role in Regulating Cardiac Transcription Factors and MAP Kinase Activation. *Molecular Biology of the Cell* 17(9): 3978–3988.
- Li, Jian-Mei, and Ajay M. Shah
2002 Intracellular Localization and Preassembly of the NADPH Oxidase Complex in Cultured Endothelial Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 277(22): 19952–19960.
- Li, P., Y. J. Fang, F. Li, et al.
2013 ERCC1, Defective Mismatch Repair Status as Predictive Biomarkers of Survival for Stage III Colon Cancer Patients Receiving Oxaliplatin-Based Adjuvant Chemotherapy. *British Journal of Cancer* 108(6): 1238–1244.
- Li, Ying, Yanwen Li, Qingping Feng, Malcolm Arnold, and Tianqing Peng
2009 Calpain Activation Contributes to Hyperglycaemia-Induced Apoptosis in Cardiomyocytes. *Cardiovascular Research* 84(1): 100–110.
- Liang, Peter S., Ting-Yi Chen, and Edward Giovannucci
2009 Cigarette Smoking and Colorectal Cancer Incidence and Mortality: Systematic Review and Meta-Analysis. *International Journal of Cancer* 124(10): 2406–2415.

- Lim, Sung-Chul, Jeong Eun Choi, Ho Sung Kang, Song Iy Han, and Han Si
2010 Ursodeoxycholic Acid Switches Oxaliplatin-Induced Necrosis to Apoptosis by Inhibiting Reactive Oxygen Species Production and Activating p53-Caspase 8 Pathway in HepG2 Hepatocellular Carcinoma. *International Journal of Cancer* 126(7): 1582–1595.
- Locksley, R. M., N. Killeen, and M. J. Lenardo
2001 The TNF and TNF Receptor Superfamilies: Integrating Mammalian Biology. *Cell* 104(4): 487–501.
- Lomax, K. J., T. L. Leto, H. Nunoi, J. I. Gallin, and H. L. Malech
1989 Recombinant 47-Kilodalton Cytosol Factor Restores NADPH Oxidase in Chronic Granulomatous Disease. *Science (New York, N.Y.)* 245(4916): 409–412.
- Lynch, D. K., C. A. Ellis, P. A. Edwards, and I. D. Hiles
1999 Integrin-Linked Kinase Regulates Phosphorylation of Serine 473 of Protein Kinase B by an Indirect Mechanism. *Oncogene* 18(56): 8024–8032.
- Ma, H., C. Fukiage, Y. H. Kim, et al.
2001 Characterization and Expression of Calpain 10. A Novel Ubiquitous Calpain with Nuclear Localization. *The Journal of Biological Chemistry* 276(30): 28525–28531.
- Maddalena, Francesca, Gabriella Laudiero, Annamaria Piscazzi, et al.
2011 Sorcin Induces a Drug-Resistant Phenotype in Human Colorectal Cancer by Modulating Ca(2+) Homeostasis. *Cancer Research* 71(24): 7659–7669.
- Maki, M., E. Takano, T. Osawa, et al.
1988 Analysis of Structure-Function Relationship of Pig Calpastatin by Expression of Mutated cDNAs in Escherichia Coli. *The Journal of Biological Chemistry* 263(21): 10254–10261.
- Malina, Jaroslav, Olga Novakova, Marie Vojtiskova, Giovanni Natile, and Viktor Brabec
2007 Conformation of DNA GG Intrastrand Cross-Link of Antitumor Oxaliplatin and Its Enantiomeric Analog. *Biophysical Journal* 93(11): 3950–3962.
- Maly, F. E., L. A. Quilliam, O. Dorseuil, C. J. Der, and G. M. Bokoch
1994 Activated or Dominant Inhibitory Mutants of Rap1A Decrease the Oxidative Burst of Epstein-Barr Virus-Transformed Human B Lymphocytes. *The Journal of Biological Chemistry* 269(29): 18743–18746.
- Mandal, Ananya
2009a Histoire de Cancer. News-Medical.net. [https://www.news-medical.net/health/Cancer-History-\(French\).aspx](https://www.news-medical.net/health/Cancer-History-(French).aspx), accessed October 30, 2017.
2009b Histoire de Chimiothérapie. News-Medical.net. [https://www.news-medical.net/health/History-of-Chemotherapy-\(French\).aspx](https://www.news-medical.net/health/History-of-Chemotherapy-(French).aspx), accessed October 30, 2017.
- Mandal, Debasmita, Pingfu Fu, and Alan D. Levine
2010 REDOX Regulation of IL-13 Signaling in Intestinal Epithelial Cells: Usage of Alternate Pathways Mediates Distinct Gene Expression Patterns. *Cellular Signalling* 22(10): 1485–1494.

- Mandic, Aleksandra, Kristina Viktorsson, Linda Strandberg, et al.
2002 Calpain-Mediated Bid Cleavage and Calpain-Independent Bak Modulation: Two Separate Pathways in Cisplatin-Induced Apoptosis. *Molecular and Cellular Biology* 22(9): 3003–3013.
- Maravall, M., Z. F. Mainen, B. L. Sabatini, and K. Svoboda
2000 Estimating Intracellular Calcium Concentrations and Buffering without Wavelength Ratioing. *Biophysical Journal* 78(5): 2655–2667.
- Marchetti, Paolo, Domenico A. P. Galla, F. Paola Russo, et al.
2004 Apoptosis Induced by Oxaliplatin in Human Colon Cancer HCT15 Cell Line. *Anticancer Research* 24(1): 219–226.
- Marion, Allison, François-Xavier Dieudonné, Ana Patiño-Garcia, et al.
2012 Calpain-6 Is an Endothelin-1 Signaling Dependent Protective Factor in Chemoresistant Osteosarcoma. *International Journal of Cancer* 130(11): 2514–2525.
- Martinez-Balibrea, Eva, Anna Martínez-Cardús, Eva Musulén, et al.
2009 Increased Levels of Copper Efflux Transporter ATP7B Are Associated with Poor Outcome in Colorectal Cancer Patients Receiving Oxaliplatin-Based Chemotherapy. *International Journal of Cancer* 124(12): 2905–2910.
- Martinez-Cardús, Anna, Eva Martinez-Balibrea, Eva Bandrés, et al.
2009 Pharmacogenomic Approach for the Identification of Novel Determinants of Acquired Resistance to Oxaliplatin in Colorectal Cancer. *Molecular Cancer Therapeutics* 8(1): 194–202.
- Martyn, Kendra D., Linda M. Frederick, Katharina von Loehneysen, Mary C. Dinauer, and Ulla G. Knaus
2006 Functional Analysis of Nox4 Reveals Unique Characteristics Compared to Other NADPH Oxidases. *Cellular Signalling* 18(1): 69–82.
- Massihnia, Daniela, Amir Avan, Niccola Funel, et al.
2017 Phospho-Akt Overexpression Is Prognostic and Can Be Used to Tailor the Synergistic Interaction of Akt Inhibitors with Gemcitabine in Pancreatic Cancer. *Journal of Hematology & Oncology* 10(1): 9.
- Matsuno, Kuniharu, Kazumi Iwata, Misaki Matsumoto, et al.
2012 NOX1/NADPH Oxidase Is Involved in Endotoxin-Induced Cardiomyocyte Apoptosis. *Free Radical Biology & Medicine* 53(9): 1718–1728.
- McCelland, P., J. A. Lash, and D. R. Hathaway
1989 Identification of Major Autolytic Cleavage Sites in the Regulatory Subunit of Vascular Calpain II. A Comparison of Partial Amino-Terminal Sequences to Deduced Sequence from Complementary DNA. *The Journal of Biological Chemistry* 264(29): 17428–17431.
- McCord, J. M., and I. Fridovich
1969 Superoxide Dismutase. An Enzymic Function for Erythrocyte Hemocuprein (Hemocuprein). *The Journal of Biological Chemistry* 244(22): 6049–6055.

- McKallip, Robert J., Wentao Jia, Jerome Schlomer, et al.
2006 Cannabidiol-Induced Apoptosis in Human Leukemia Cells: A Novel Role of Cannabidiol in the Regulation of p22phox and Nox4 Expression. *Molecular Pharmacology* 70(3): 897–908.
- Meier, B., A. R. Cross, J. T. Hancock, F. J. Kaup, and O. T. G. Jones
1991 Identification of a Superoxide-Generating NADPH Oxidase System in Human Fibroblasts. *Biochemical Journal* 275(1): 241–245.
- Meira, Lisiane B., James M. Bugni, Stephanie L. Green, et al.
2008 DNA Damage Induced by Chronic Inflammation Contributes to Colon Carcinogenesis in Mice. *The Journal of Clinical Investigation* 118(7): 2516–2525.
- Mellgren, R. L.
1988 On the Mechanism of Binding of Calpastatin, the Protein Inhibitor of Calpains, to Biologic Membranes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 150(1): 170–176.
- Meyer, S. L., D. Bozyczko-Coyne, S. K. Mallya, et al.
1996 Biologically Active Monomeric and Heterodimeric Recombinant Human Calpain I Produced Using the Baculovirus Expression System. *The Biochemical Journal* 314 (Pt 2): 511–519.
- Miller, D. M., G. R. Buettner, and S. D. Aust
1990 Transition Metals as Catalysts Of “autoxidation” reactions. *Free Radical Biology & Medicine* 8(1): 95–108.
- Mitsushita, Junji, J. David Lambeth, and Tohru Kamata
2004 The Superoxide-Generating Oxidase Nox1 Is Functionally Required for Ras Oncogene Transformation. *Cancer Research* 64(10): 3580–3585.
- Moldoveanu, Tudor, Zongchao Jia, and Peter L. Davies
2004 Calpain Activation by Cooperative Ca²⁺ Binding at Two Non-EF-Hand Sites. *The Journal of Biological Chemistry* 279(7): 6106–6114.
- Molinari, M., J. Anagli, and E. Carafoli
1994 Ca(2+)-Activated Neutral Protease Is Active in the Erythrocyte Membrane in Its Nonautolyzed 80-kDa Form. *The Journal of Biological Chemistry* 269(45): 27992–27995.
- Montezano, Augusto C., and Rhian M. Touyz
2014 Reactive Oxygen Species, Vascular Noxs, and Hypertension: Focus on Translational and Clinical Research. *Antioxidants & Redox Signaling* 20(1): 164–182.
- Mouatt-Prigent, A., J. O. Karlsson, J. Yelnik, Y. Agid, and E. C. Hirsch
2000 Calpastatin Immunoreactivity in the Monkey and Human Brain of Control Subjects and Patients with Parkinson’s Disease. *The Journal of Comparative Neurology* 419(2): 175–192.
- Moutinho, Catia, Anna Martinez-Cardús, Cristina Santos, et al.

2014 Epigenetic Inactivation of the BRCA1 Interactor SRBC and Resistance to Oxaliplatin in Colorectal Cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 106(1): djt322.

Nakanishi, Atsuko, Yoko Wada, Yasuko Kitagishi, and Satoru Matsuda
2014 Link between PI3K/AKT/PTEN Pathway and NOX Protein in Diseases. *Aging and Disease* 5(3): 203–211.

Nicco, Carole, Alexis Laurent, Christiane Chereau, Bernard Weill, and Frédéric Batteux
2005 Differential Modulation of Normal and Tumor Cell Proliferation by Reactive Oxygen Species. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* 59(4): 169–174.

Niecknig, Helene, Suzan Tug, Buena Delos Reyes, et al.
2012 Role of Reactive Oxygen Species in the Regulation of HIF-1 by Prolyl Hydroxylase 2 under Mild Hypoxia. *Free Radical Research* 46(6): 705–717.

Nishimura, T., and D. E. Goll
1991 Binding of Calpain Fragments to Calpastatin. *The Journal of Biological Chemistry* 266(18): 11842–11850.

Nisimoto, Yukio, Hisamitsu Ogawa, Kei Miyano, and Minoru Tamura
2004 Activation of the Flavoprotein Domain of gp91phox upon Interaction with N-Terminal p67phox (1-210) and the Rac Complex. *Biochemistry* 43(29): 9567–9575.

Nunoi, H., D. Rotrosen, J. I. Gallin, and H. L. Malech
1988 Two Forms of Autosomal Chronic Granulomatous Disease Lack Distinct Neutrophil Cytosol Factors. *Science* 242(4883): 1298–1301.

O’Connell, Michael P., Jennifer L. Fiori, Katherine M. Baugher, et al.
2009 Wnt5A Activates the Calpain-Mediated Cleavage of Filamin A. *The Journal of Investigative Dermatology* 129(7): 1782–1789.

Ogura, Kenji, Ikuo Nobuhisa, Satoru Yuzawa, et al.
2006 NMR Solution Structure of the Tandem Src Homology 3 Domains of p47phox Complexed with a p22phox-Derived Proline-Rich Peptide. *The Journal of Biological Chemistry* 281(6): 3660–3668.

Olschwang, S., C. Bonaïti, J. Feingold, et al.
2005 [HNPCC syndrome (hereditary non polyposis colon cancer): identification and management]. *La Revue De Medecine Interne* 26(2): 109–118.

Ono, Y., H. Sorimachi, and K. Suzuki
1998 Structure and Physiology of Calpain, an Enigmatic Protease. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 245(2): 289–294.

Ono, Yasuko, Koichi Ojima, Fumiko Shinkai-Ouchi, Shoji Hata, and Hiroyuki Sorimachi
2016 An Eccentric Calpain, CAPN3/p94/Calpain-3. *Biochimie* 122: 169–187.

Orlandi, A., M. Di Salvatore, C. Bagalà, et al.
2015 ERCC1 Induction after Oxaliplatin Exposure May Depend on KRAS Mutational

- Status in Colorectal Cancer Cell Line: In Vitro Veritas. *Journal of Cancer* 6(1): 70–81.
- Oxaliplatin Side Effects in Detail
N.d. Drugs.com. <https://www.drugs.com/sfx/oxaliplatin-side-effects.html>, accessed October 30, 2017.
- Oyoshi, Michiko K.
2015 Recent Research Advances in Eosinophilic Esophagitis. *Current Opinion in Pediatrics* 27(6): 741–747.
- Paffenholz, Rainer, Rebecca A. Bergstrom, Francesca Pasutto, et al.
2004 Vestibular Defects in Head-Tilt Mice Result from Mutations in Nox3, Encoding an NADPH Oxidase. *Genes & Development* 18(5): 486–491.
- Paillas, Salomé, Florence Boissière, Frédéric Bibeau, et al.
2011 Targeting the p38 MAPK Pathway Inhibits Irinotecan Resistance in Colon Adenocarcinoma. *Cancer Research* 71(3): 1041–1049.
- Páramo, Blanca, Teresa Montiel, Diego R. Hernández-Espinosa, et al.
2013 Calpain Activation Induced by Glucose Deprivation Is Mediated by Oxidative Stress and Contributes to Neuronal Damage. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 45(11): 2596–2604.
- Park, J. W., and B. M. Babior
1997 Activation of the Leukocyte NADPH Oxidase Subunit p47phox by Protein Kinase C. A Phosphorylation-Dependent Change in the Conformation of the C-Terminal End of p47phox. *Biochemistry* 36(24): 7474–7480.
- Parkos, C. A., R. A. Allen, C. G. Cochrane, and A. J. Jesaitis
1987 Purified Cytochrome B from Human Granulocyte Plasma Membrane Is Comprised of Two Polypeptides with Relative Molecular Weights of 91,000 and 22,000. *The Journal of Clinical Investigation* 80(3): 732–742.
- Parkos, C. A., M. C. Dinauer, A. J. Jesaitis, S. H. Orkin, and J. T. Curnutte
1989 Absence of Both the 91kD and 22kD Subunits of Human Neutrophil Cytochrome B in Two Genetic Forms of Chronic Granulomatous Disease. *Blood* 73(6): 1416–1420.
- Pastor, N., H. Weinstein, E. Jamison, and M. Brenowitz
2000 A Detailed Interpretation of OH Radical Footprints in a TBP-DNA Complex Reveals the Role of Dynamics in the Mechanism of Sequence-Specific Binding. *Journal of Molecular Biology* 304(1): 55–68.
- Pekarčíková, Lucie, Lucia Knopfová, Petr Beneš, and Jan Šmarda
2016 C-Myb Regulates NOX1/p38 to Control Survival of Colorectal Carcinoma Cells. *Cellular Signalling* 28(8): 924–936.
- Pendyala, L., P. J. Creaven, R. Perez, J. R. Zdanowicz, and D. Raghavan
1995 Intracellular Glutathione and Cytotoxicity of Platinum Complexes. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 36(4): 271–278.

- Pervaiz, Shazib, and Marie-Veronique Clement
2007 Superoxide Anion: Oncogenic Reactive Oxygen Species? *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39(7–8): 1297–1304.
- Peter, M. E., and P. H. Kramer
1998 Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-Mediated Apoptosis. *Current Opinion in Immunology* 10(5): 545–551.
- Piccoli, Claudia, Roberto Ria, Rosella Scrima, et al.
2005 Characterization of Mitochondrial and Extra-Mitochondrial Oxygen Consuming Reactions in Human Hematopoietic Stem Cells. Novel Evidence of the Occurrence of NAD(P)H Oxidase Activity. *The Journal of Biological Chemistry* 280(28): 26467–26476.
- Pick, E., Y. Gorzalczy, and S. Engel
1993 Role of the rac1 p21-GDP-Dissociation Inhibitor for Rho Heterodimer in the Activation of the Superoxide-Forming NADPH Oxidase of Macrophages. *European Journal of Biochemistry* 217(1): 441–455.
- Polakis, P. G., R. F. Weber, B. Nevins, et al.
1989 Identification of the Ral and rac1 Gene Products, Low Molecular Mass GTP-Binding Proteins from Human Platelets. *The Journal of Biological Chemistry* 264(28): 16383–16389.
- Portela, Anna, and Manel Esteller
2010 Epigenetic Modifications and Human Disease. *Nature Biotechnology* 28(10): 1057–1068.
- Potter, J. D., M. L. Slattery, R. M. Bostick, and S. M. Gapstur
1993 Colon Cancer: A Review of the Epidemiology. *Epidemiologic Reviews* 15(2): 499–545.
- Prabhakar, N. R., and J. L. Overholt
2000 Cellular Mechanisms of Oxygen Sensing at the Carotid Body: Heme Proteins and Ion Channels. *Respiration Physiology* 122(2–3): 209–221.
- Preston, Thomas J., Jeffrey T. Henderson, Gordon P. McCallum, and Peter G. Wells
2009 Base Excision Repair of Reactive Oxygen Species-Initiated 7,8-Dihydro-8-Oxo-2'-deoxyguanosine Inhibits the Cytotoxicity of Platinum Anticancer Drugs. *Molecular Cancer Therapeutics* 8(7): 2015–2026.
- Pubchem
N.d. 5-Fluorouracil. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3385>, accessed October 30, 2017, a.
N.d. CAPECITABINE. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/60953>, accessed October 30, 2017, b.
N.d. Irinotecan. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/60838>, accessed October 30, 2017, c.
- Qian, Xu, Jing Yu, Yu Yin, et al.
2013 MicroRNA-143 Inhibits Tumor Growth and Angiogenesis and Sensitizes Chemosensitivity to Oxaliplatin in Colorectal Cancers. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 12(9):

1385–1394.

Qu, Kai, Xinsen Xu, Chang Liu, et al.

2013 Negative Regulation of Transcription Factor FoxM1 by p53 Enhances Oxaliplatin-Induced Senescence in Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Letters* 331(1): 105–114.

Quie, P. G., J. G. White, B. Holmes, and R. A. Good

1967 In Vitro Bactericidal Capacity of Human Polymorphonuclear Leukocytes: Diminished Activity in Chronic Granulomatous Disease of Childhood. *The Journal of Clinical Investigation* 46(4): 668–679.

Quinn, M. T., M. L. Mullen, and A. J. Jesaitis

1992 Human Neutrophil Cytochrome B Contains Multiple Hemes. Evidence for Heme Associated with Both Subunits. *The Journal of Biological Chemistry* 267(11): 7303–7309.

Quinn, M. T., M. L. Mullen, A. J. Jesaitis, and J. G. Linner

1992 Subcellular Distribution of the Rap1A Protein in Human Neutrophils: Colocalization and Cotranslocation with Cytochrome b559. *Blood* 79(6): 1563–1573.

Rakitina, Tatiana V., Irina A. Vasilevskaya, and Peter J. O'Dwyer

2003 Additive Interaction of Oxaliplatin and 17-Allylamino-17-Demethoxygeldanamycin in Colon Cancer Cell Lines Results from Inhibition of Nuclear Factor kappaB Signaling. *Cancer Research* 63(24): 8600–8605.

Rasmussen, Mads Heilskov, Iben Lyskjær, Rosa Rakownikow Jersie-Christensen, et al.

2016 miR-625-3p Regulates Oxaliplatin Resistance by Targeting MAP2K6-p38 Signalling in Human Colorectal Adenocarcinoma Cells. *Nature Communications* 7: 12436.

Raymond, E., S. G. Chaney, A. Taamma, and E. Cvitkovic

1998 Oxaliplatin: A Review of Preclinical and Clinical Studies. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 9(10): 1053–1071.

Reardon, J. T., A. Vaisman, S. G. Chaney, and A. Sancar

1999 Efficient Nucleotide Excision Repair of Cisplatin, Oxaliplatin, and Bis-Aceto-Ammine-Dichloro-Cyclohexylamine-platinum(IV) (JM216) Platinum Intrastrand DNA Diadducts. *Cancer Research* 59(16): 3968–3971.

Reinehr, Roland, Stephan Becker, Andrea Eberle, Susanne Grether-Beck, and Dieter Häussinger

2005 Involvement of NADPH Oxidase Isoforms and Src Family Kinases in CD95-Dependent Hepatocyte Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 280(29): 27179–27194.

Reinehr, Roland, Stephan Becker, Verena Keitel, et al.

2005 Bile Salt-Induced Apoptosis Involves NADPH Oxidase Isoform Activation. *Gastroenterology* 129(6): 2009–2031.

Reinhardt, H. Christian, Aaron S. Aslanian, Jacqueline A. Lees, and Michael B. Yaffe

2007 p53-Deficient Cells Rely on ATM- and ATR-Mediated Checkpoint Signaling through the p38MAPK/MK2 Pathway for Survival after DNA Damage. *Cancer Cell* 11(2): 175–189.

- Reverter, D., H. Sorimachi, and W. Bode
2001 The Structure of Calcium-Free Human M-Calpain: Implications for Calcium Activation and Function. *Trends in Cardiovascular Medicine* 11(6): 222–229.
- Richard, I., and J. S. Beckmann
1996 Molecular Cloning of Mouse *canp3*, the Gene Associated with Limb-Girdle Muscular Dystrophy 2A in Human. *Mammalian Genome: Official Journal of the International Mammalian Genome Society* 7(5): 377–379.
- Rios-Doria, Jonathan, Kathleen C. Day, Rainer Kuefer, et al.
2003 The Role of Calpain in the Proteolytic Cleavage of E-Cadherin in Prostate and Mammary Epithelial Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 278(2): 1372–1379.
- Rokutan, Kazuhito, Tsukasa Kawahara, Yuki Kuwano, et al.
2006 NADPH Oxidases in the Gastrointestinal Tract: A Potential Role of Nox1 in Innate Immune Response and Carcinogenesis. *Antioxidants & Redox Signaling* 8(9–10): 1573–1582.
- Rossi, F., and M. Zatti
1964 Biochemical Aspects of Phagocytosis in Polymorphonuclear Leucocytes. NADH and NADPH Oxidation by the Granules of Resting and Phagocytizing Cells. *Experientia* 20(1): 21–23.
- Roy, S., C. K. Sen, and L. Packer
1999 Determination of Cell-Cell Adhesion in Response to Oxidants and Antioxidants. *Methods in Enzymology* 300: 395–401.
- Royer-Pokora, B., L. M. Kunkel, A. P. Monaco, et al.
1986 Cloning the Gene for an Inherited Human Disorder--Chronic Granulomatous Disease--on the Basis of Its Chromosomal Location. *Nature* 322(6074): 32–38.
- Rubio-Moscardo, Fanny, David Blesa, Cinta Mestre, et al.
2005 Characterization of 8p21.3 Chromosomal Deletions in B-Cell Lymphoma: TRAIL-R1 and TRAIL-R2 as Candidate Dosage-Dependent Tumor Suppressor Genes. *Blood* 106(9): 3214–3222.
- Sadok, Amine, Véronique Bourgarel-Rey, Florence Gattacceca, et al.
2008 Nox1-Dependent Superoxide Production Controls Colon Adenocarcinoma Cell Migration. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1783(1): 23–33.
- Saelens, Xavier, Nele Festjens, Lieselotte Vande Walle, et al.
2004 Toxic Proteins Released from Mitochondria in Cell Death. *Oncogene* 23(16): 2861–2874.
- Saido, T. C., K. Mizuno, and K. Suzuki
1991 Proteolysis of Protein Kinase C by Calpain: Effect of Acidic Phospholipids. *Biomedica Biochimica Acta* 50(4–6): 485–489.
- Saido, T. C., M. Shibata, T. Takenawa, H. Murofushi, and K. Suzuki
1992 Positive Regulation of Mu-Calpain Action by Polyphosphoinositides. *The Journal of*

Biological Chemistry 267(34): 24585–24590.

Sakihama, T., H. Kakidani, K. Zenita, et al.

1985 A Putative Ca²⁺-Binding Protein: Structure of the Light Subunit of Porcine Calpain Elucidated by Molecular Cloning and Protein Sequence Analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82(18): 6075–6079.

Santoro, Valeria, Ruochen Jia, Hannah Thompson, et al.

2016 Role of Reactive Oxygen Species in the Abrogation of Oxaliplatin Activity by Cetuximab in Colorectal Cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 108(6): djv394.

Sareen, Dhruv, Soesiawati R. Darjatmoko, Daniel M. Albert, and Arthur S. Polans

2007 Mitochondria, Calcium, and Calpain Are Key Mediators of Resveratrol-Induced Apoptosis in Breast Cancer. *Molecular Pharmacology* 72(6): 1466–1475.

Sathyamoorthy, M., I. de Mendez, A. G. Adams, and T. L. Leto

1997 p40(phox) down-Regulates NADPH Oxidase Activity through Interactions with Its SH3 Domain. *The Journal of Biological Chemistry* 272(14): 9141–9146.

Sato, T. K., M. Overduin, and S. D. Emr

2001 Location, Location, Location: Membrane Targeting Directed by PX Domains. *Science (New York, N.Y.)* 294(5548): 1881–1885.

Sbarra, A. J., and M. L. Karnovsky

1959 The Biochemical Basis of Phagocytosis. I. Metabolic Changes during the Ingestion of Particles by Polymorphonuclear Leukocytes. *The Journal of Biological Chemistry* 234(6): 1355–1362.

Schád, Eva, Attila Farkas, Gáspár Jékely, Peter Tompa, and Peter Friedrich

2002 A Novel Human Small Subunit of Calpains. *The Biochemical Journal* 362(Pt 2): 383–388.

Scheeff, E. D., J. M. Briggs, and S. B. Howell

1999 Molecular Modeling of the Intrastrand Guanine-Guanine DNA Adducts Produced by Cisplatin and Oxaliplatin. *Molecular Pharmacology* 56(3): 633–643.

Schreck, R., P. Rieber, and P. A. Baeuerle

1991 Reactive Oxygen Intermediates as Apparently Widely Used Messengers in the Activation of the NF-Kappa B Transcription Factor and HIV-1. *The EMBO Journal* 10(8): 2247–2258.

Segal, A. W.

1987 Absence of Both Cytochrome B-245 Subunits from Neutrophils in X-Linked Chronic Granulomatous Disease. *Nature* 326(6108): 88–91.

Segal, A. W., and O. T. Jones

1978 Novel Cytochrome B System in Phagocytic Vacuoles of Human Granulocytes. *Nature* 276(5687): 515–517.

Segal, A. W., O. T. Jones, D. Webster, and A. C. Allison

- 1978 Absence of a Newly Described Cytochrome B from Neutrophils of Patients with Chronic Granulomatous Disease. *Lancet* (London, England) 2(8087): 446–449.
- Segal, A. W., I. West, F. Wientjes, et al.
1992 Cytochrome B-245 Is a Flavocytochrome Containing FAD and the NADPH-Binding Site of the Microbicidal Oxidase of Phagocytes. *The Biochemical Journal* 284 (Pt 3): 781–788.
- Sergeev, Igor N.
2004 Genistein Induces Ca²⁺-Mediated, Calpain/Caspase-12-Dependent Apoptosis in Breast Cancer Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 321(2): 462–467.
- Serrano, Faridis, Nutan S. Kolluri, Frans B. Wientjes, J. Patrick Card, and Eric Klann
2003 NADPH Oxidase Immunoreactivity in the Mouse Brain. *Brain Research* 988(1–2): 193–198.
- Shao, Dongmin, Anthony W. Segal, and Lodewijk V. Dekker
2003 Lipid Rafts Determine Efficiency of NADPH Oxidase Activation in Neutrophils. *FEBS Letters* 550(1–3): 101–106.
- Sharma, Shilpy, Nicholas A. Shah, Ariell M. Joiner, Katelyn H. Roberts, and Christine E. Canman
2012 DNA Polymerase ζ Is a Major Determinant of Resistance to Platinum-Based Chemotherapeutic Agents. *Molecular Pharmacology* 81(6): 778–787.
- Shi, Yan, Bin Tang, Pei-Wu Yu, et al.
2012 Autophagy Protects against Oxaliplatin-Induced Cell Death via ER Stress and ROS in Caco-2 Cells. *PloS One* 7(11): e51076.
- Shi, Ying, Xiao-Xiao Huang, Guo-Bin Chen, et al.
2016 Dragon (RGMb) Induces Oxaliplatin Resistance in Colon Cancer Cells. *Oncotarget* 7(30): 48027–48037.
- Shiose, A., and H. Sumimoto
2000 Arachidonic Acid and Phosphorylation Synergistically Induce a Conformational Change of p47phox to Activate the Phagocyte NADPH Oxidase. *The Journal of Biological Chemistry* 275(18): 13793–13801.
- Shiose, Akira, Junya Kuroda, Kazuhiko Tsuruya, et al.
2001 A Novel Superoxide-Producing NAD(P)H Oxidase in Kidney. *Journal of Biological Chemistry* 276(2): 1417–1423.
- Shiraha, H., A. Glading, K. Gupta, and A. Wells
1999 IP-10 Inhibits Epidermal Growth Factor-Induced Motility by Decreasing Epidermal Growth Factor Receptor-Mediated Calpain Activity. *The Journal of Cell Biology* 146(1): 243–254.
- Shiraha, Hidenori, Angela Glading, Jeffrey Chou, Zongchao Jia, and Alan Wells
2002 Activation of M-Calpain (Calpain II) by Epidermal Growth Factor Is Limited by

- Protein Kinase A Phosphorylation of M-Calpain. *Molecular and Cellular Biology* 22(8): 2716–2727.
- Shirota, Y., J. Stoehlmacher, J. Brabender, et al.
2001 ERCC1 and Thymidylate Synthase mRNA Levels Predict Survival for Colorectal Cancer Patients Receiving Combination Oxaliplatin and Fluorouracil Chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 19(23): 4298–4304.
- Simon, A. R., U. Rai, B. L. Fanburg, and B. H. Cochran
1998 Activation of the JAK-STAT Pathway by Reactive Oxygen Species. *The American Journal of Physiology* 275(6 Pt 1): C1640-1652.
- Skubitz, Keith M., and Amy P. N. Skubitz
2003a Differential Gene Expression in Uterine Leiomyoma. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 141(5): 297–308.
2003b Differential Gene Expression in Leiomyosarcoma. *Cancer* 98(5): 1029–1038.
- Société de recherche sur le cancer
2017 Historique Du Cancer - L'Époque Contemporaine - Société de Recherche Sur Le Cancer. <https://www.societederecherchesurlecancer.ca/page.aspx?pid=1968>, accessed October 30, 2017.
- Someya, A., I. Nagaoka, and T. Yamashita
1993 Purification of the 260 kDa Cytosolic Complex Involved in the Superoxide Production of Guinea Pig Neutrophils. *FEBS Letters* 330(2): 215–218.
- Sorescu, George P., Hannah Song, Sarah L. Tressel, et al.
2004 Bone Morphogenic Protein 4 Produced in Endothelial Cells by Oscillatory Shear Stress Induces Monocyte Adhesion by Stimulating Reactive Oxygen Species Production from a nox1-Based NADPH Oxidase. *Circulation Research* 95(8): 773–779.
- Sorimachi, H., S. Imajoh-Ohmi, Y. Emori, et al.
1989 Molecular Cloning of a Novel Mammalian Calcium-Dependent Protease Distinct from Both M- and Mu-Types. Specific Expression of the mRNA in Skeletal Muscle. *The Journal of Biological Chemistry* 264(33): 20106–20111.
- Stefanska, J., and R. Pawliczak
2008 Apocynin: Molecular Aptitudes. *Mediators of Inflammation* 2008: 106507.
- Stoehlmacher, Jan, David J. Park, Wu Zhang, et al.
2002 Association between Glutathione S-Transferase P1, T1, and M1 Genetic Polymorphism and Survival of Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 94(12): 936–942.
- Stone, James R., and Suping Yang
2006 Hydrogen Peroxide: A Signaling Messenger. *Antioxidants & Redox Signaling* 8(3–4): 243–270.
- Streeter, Jennifer, Brandon M. Schickling, Shuxia Jiang, et al.

- 2014 Phosphorylation of Nox1 Regulates Association with NoxA1 Activation Domain. *Circulation Research* 115(11): 911–918.
- Suh, Y. A., R. S. Arnold, B. Lassegue, et al.
1999 Cell Transformation by the Superoxide-Generating Oxidase Mox1. *Nature* 401(6748): 79–82.
- Sumimoto, H., K. Hata, K. Mizuki, et al.
1996 Assembly and Activation of the Phagocyte NADPH Oxidase. Specific Interaction of the N-Terminal Src Homology 3 Domain of p47phox with p22phox Is Required for Activation of the NADPH Oxidase. *The Journal of Biological Chemistry* 271(36): 22152–22158.
- Sumimoto, H., N. Sakamoto, M. Nozaki, et al.
1992 Cytochrome b558, a Component of the Phagocyte NADPH Oxidase, Is a Flavoprotein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 186(3): 1368–1375.
- Sumimoto, Hideki
2008 Structure, Regulation and Evolution of Nox-Family NADPH Oxidases That Produce Reactive Oxygen Species. *The FEBS Journal* 275(13): 3249–3277.
- Sumimoto, Hideki, Kei Miyano, and Ryu Takeya
2005 Molecular Composition and Regulation of the Nox Family NAD(P)H Oxidases. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 338(1): 677–686.
- Sun, Guochao, Ying Lu, Yingxia Li, et al.
2017 miR-19a Protects Cardiomyocytes from Hypoxia/Reoxygenation-Induced Apoptosis via PTEN/PI3K/P-Akt Pathway. *Bioscience Reports*.
- Suzuki, K., and H. Sorimachi
1998 A Novel Aspect of Calpain Activation. *FEBS Letters* 433(1–2): 1–4.
- Suzuki, T., K. Nishio, and S. Tanabe
2001 The MRP Family and Anticancer Drug Metabolism. *Current Drug Metabolism* 2(4): 367–377.
- Szanto, I., L. Rubbia-Brandt, P. Kiss, et al.
2005 Expression of NOX1, a Superoxide-Generating NADPH Oxidase, in Colon Cancer and Inflammatory Bowel Disease. *The Journal of Pathology* 207(2): 164–176.
- Szatrowski, Ted P., and Carl F. Nathan
1991 Production of Large Amounts of Hydrogen Peroxide by Human Tumor Cells. *Cancer Research* 51(3): 794–798.
- Takeya, Ryu, and Hideki Sumimoto
2003 Molecular Mechanism for Activation of Superoxide-Producing NADPH Oxidases. *Molecules and Cells* 16(3): 271–277.
- Takeya, Ryu, Noriko Ueno, Keiichiro Kami, et al.
2003 Novel Human Homologues of p47phox and p67phox Participate in Activation of

Superoxide-Producing NADPH Oxidases. *Journal of Biological Chemistry* 278(27): 25234–25246.

Tang, D., R. Kang, C.-W. Cheh, et al.

2010 HMGB1 Release and Redox Regulates Autophagy and Apoptosis in Cancer Cells. *Oncogene* 29(38): 5299–5310.

Tao, Zhimin, Jerry Goodisman, Harvey S. Penefsky, and A.-K. Souid

2007 Caspase Activation by Anticancer Drugs: The Caspase Storm. *Molecular Pharmaceutics* 4(4): 583–595.

Taylor, R. P., and J. W. Starnes

2003 Age, Cell Signalling and Cardioprotection. *Acta Physiologica Scandinavica* 178(2): 107–116.

Taylor, Ross M., James B. Burritt, Danas Baniulis, et al.

2004 Site-Specific Inhibitors of NADPH Oxidase Activity and Structural Probes of Flavocytochrome B: Characterization of Six Monoclonal Antibodies to the p22phox Subunit. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950) 173(12): 7349–7357.

Teahan, C., P. Rowe, P. Parker, N. Totty, and A. W. Segal

1987 The X-Linked Chronic Granulomatous Disease Gene Codes for the Beta-Chain of Cytochrome B-245. *Nature* 327(6124): 720–721.

Teng, Kai-yuan, Miao-zhen Qiu, Zhuang-hua Li, et al.

2010 DNA Polymerase η Protein Expression Predicts Treatment Response and Survival of Metastatic Gastric Adenocarcinoma Patients Treated with Oxaliplatin-Based Chemotherapy. *Journal of Translational Medicine* 8: 126.

Teshima, S., S. Tsunawaki, and K. Rokutan

1999 Helicobacter Pylori Lipopolysaccharide Enhances the Expression of NADPH Oxidase Components in Cultured Guinea Pig Gastric Mucosal Cells. *FEBS Letters* 452(3): 243–246.

Thannickal, V. J., and B. L. Fanburg

2000 Reactive Oxygen Species in Cell Signaling. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 279(6): L1005-1028.

Thornton, Tina M., and Mercedes Rincon

2008 Non-Classical P38 Map Kinase Functions: Cell Cycle Checkpoints and Survival. *International Journal of Biological Sciences* 5(1): 44–52.

Todd, Bice, Dwight Moore, Champion C. S. Deivanayagam, et al.

2003 A Structural Model for the Inhibition of Calpain by Calpastatin: Crystal Structures of the Native Domain VI of Calpain and Its Complexes with Calpastatin Peptide and a Small Molecule Inhibitor. *Journal of Molecular Biology* 328(1): 131–146.

Tompa, P., Y. Emori, H. Sorimachi, K. Suzuki, and P. Friedrich

2001 Domain III of Calpain Is a Ca^{2+} -Regulated Phospholipid-Binding Domain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 280(5): 1333–1339.

- Tonami, Kazuo, Yukiko Kurihara, Hiroyuki Aburatani, et al.
2007 Calpain 6 Is Involved in Microtubule Stabilization and Cytoskeletal Organization. *Molecular and Cellular Biology* 27(7): 2548–2561.
- Tonami, Kazuo, Yukiko Kurihara, Satoshi Arima, et al.
2011 Calpain-6, a Microtubule-Stabilizing Protein, Regulates Rac1 Activity and Cell Motility through Interaction with GEF-H1. *Journal of Cell Science* 124(Pt 8): 1214–1223.
- Toscano, Florent, Béatrice Parmentier, Zineb El Fajoui, et al.
2007 p53 Dependent and Independent Sensitivity to Oxaliplatin of Colon Cancer Cells. *Biochemical Pharmacology* 74(3): 392–406.
- Tozawa, Katsuyuki, Tadayuki Oshima, Takehiko Kobayashi, et al.
2008 Oxaliplatin in Treatment of the Cisplatin-Resistant MKN45 Cell Line of Gastric Cancer. *Anticancer Research* 28(4B): 2087–2092.
- Tsuchida, S., and K. Sato
1992 Glutathione Transferases and Cancer. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 27(4–5): 337–384.
- Turner, Nancy D., and Shannon K. Lloyd
2017 Association between Red Meat Consumption and Colon Cancer: A Systematic Review of Experimental Results. *Experimental Biology and Medicine* (Maywood, N.J.) 242(8): 813–839.
- Uchida, Kazumi, Peter V. Danenberg, Kathleen D. Danenberg, and Jean L. Grem
2008 Thymidylate Synthase, Dihydropyrimidine Dehydrogenase, ERCC1, and Thymidine Phosphorylase Gene Expression in Primary and Metastatic Gastrointestinal Adenocarcinoma Tissue in Patients Treated on a Phase I Trial of Oxaliplatin and Capecitabine. *BMC Cancer* 8: 386.
- Uemori, T., T. Shimojo, K. Asada, et al.
1990 Characterization of a Functional Domain of Human Calpastatin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 166(3): 1485–1493.
- Ueno, Noriko, Ryu Takeya, Kei Miyano, Hideaki Kikuchi, and Hideki Sumimoto
2005 The NADPH Oxidase Nox3 Constitutively Produces Superoxide in a p22phox-Dependent Manner: Its Regulation by Oxidase Organizers and Activators. *The Journal of Biological Chemistry* 280(24): 23328–23339.
- Ushio-Fukai, Masuko
2006 Redox Signaling in Angiogenesis: Role of NADPH Oxidase. *Cardiovascular Research* 71(2): 226–235.
- Vaish, Vivek, and Sankar Nath Sanyal
2012 Role of Sulindac and Celecoxib in Chemoprevention of Colorectal Cancer via Intrinsic Pathway of Apoptosis: Exploring NHE-1, Intracellular Calcium Homeostasis and Calpain 9. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* 66(2): 116–130.
- Valko, Marian, Dieter Leibfritz, Jan Moncol, et al.

- 2007 Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39(1): 44–84.
- Van Buul, J. D., M. Fernandez-Borja, E. C. Anthony, and P. L. Hordijk
2005 Expression and Localization of NOX2 and NOX4 in Primary Human Endothelial Cells. *Antioxidants & Redox Signaling* 7(3–4): 308–317.
- Van Cutsem, E., A. Cervantes, B. Nordlinger, D. Arnold, and ESMO Guidelines Working Group
2014 Metastatic Colorectal Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 25 Suppl 3: iii1-9.
- Van Houdt, W. J., B. L. Emmink, T. V. Pham, et al.
2011 Comparative Proteomics of Colon Cancer Stem Cells and Differentiated Tumor Cells Identifies BIRC6 as a Potential Therapeutic Target. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 10(12): M111.011353.
- Vanden Berghe, Tom, Andreas Linkermann, Sandrine Jouan-Lanhouet, Henning Walczak, and Peter Vandenabeele
2014 Regulated Necrosis: The Expanding Network of Non-Apoptotic Cell Death Pathways. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 15(2): 135–147.
- Veal, Elizabeth A., Alison M. Day, and Brian A. Morgan
2007 Hydrogen Peroxide Sensing and Signaling. *Molecular Cell* 26(1): 1–14.
- Vergnaud, S., M. H. Paclet, J. El Benna, M. A. Pocardalo, and F. Morel
2000 Complementation of NADPH Oxidase in p67-Phox-Deficient CGD Patients p67-Phox/p40-Phox Interaction. *European Journal of Biochemistry* 267(4): 1059–1067.
- Vilei, E. M., S. Calderara, J. Anagli, et al.
1997 Functional Properties of Recombinant Calpain I and of Mutants Lacking Domains III and IV of the Catalytic Subunit. *The Journal of Biological Chemistry* 272(41): 25802–25808.
- Vincent, Duncan T., Yasmine F. Ibrahim, Michael Graham Espey, and Yuichiro J. Suzuki
2013 The Role of Antioxidants in the Era of Cardio-oncology. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 72(6): 1157–1168.
- Volpp, B. D., W. M. Nauseef, and R. A. Clark
1988 Two Cytosolic Neutrophil Oxidase Components Absent in Autosomal Chronic Granulomatous Disease. *Science* 242(4883): 1295–1297.
- Waghray, Anuradha, Deng-shun Wang, Deborah McKinsey, Ronald L. Hayes, and Kevin K. W. Wang
2004 Molecular Cloning and Characterization of Rat and Human Calpain-5. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 324(1): 46–51.
- Wagner, Brett A., Crystal B. Evig, Krzysztof J. Reszka, Garry R. Buettner, and C. Patrick Burns
2005 Doxorubicin Increases Intracellular Hydrogen Peroxide in PC3 Prostate Cancer Cells.

Archives of Biochemistry and Biophysics 440(2): 181–190.

Waisberg, Michael, Pius Joseph, Beverley Hale, and Detmar Beyersmann
2003 Molecular and Cellular Mechanisms of Cadmium Carcinogenesis. *Toxicology* 192(2–3): 95–117.

Wajant, Harald
2002 The Fas Signaling Pathway: More than a Paradigm. *Science* (New York, N.Y.) 296(5573): 1635–1636.

Walko, Christine M., and Celeste Lindley
2005 Capecitabine: A Review. *Clinical Therapeutics* 27(1): 23–44.

Wang, Haibo, Yanchao Jiang, Dallas Shi, et al.
2014 Activation of Rap1 Inhibits NADPH Oxidase-Dependent ROS Generation in Retinal Pigment Epithelium and Reduces Choroidal Neovascularization. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 28(1): 265–274.

Wang, Jiankai, Wenjuan Wang, Hongyi Cai, et al.
2017 MACC1 Facilitates Chemoresistance and Cancer Stem Cell-like Properties of Colon Cancer Cells through the PI3K/AKT Signaling Pathway. *Molecular Medicine Reports*.

Wang, K. K., A. Villalobo, and B. D. Roufogalis
1989 Calmodulin-Binding Proteins as Calpain Substrates. *The Biochemical Journal* 262(3): 693–706.

Wang, Rong, Wan-Mohaiza Dashwood, Hui Nian, et al.
2011 NADPH Oxidase Overexpression in Human Colon Cancers and Rat Colon Tumors Induced by 2-Amino-1-Methyl-6-phenylimidazo[4,5-B]pyridine (PhIP). *International Journal of Cancer* 128(11): 2581–2590.

Waterhouse, N. J., D. M. Finucane, D. R. Green, et al.
1998 Calpain Activation Is Upstream of Caspases in Radiation-Induced Apoptosis. *Cell Death and Differentiation* 5(12): 1051–1061.

Waye, Sarah, Aisha Naeem, Muhammad Umer Choudhry, et al.
2015 The p53 Tumor Suppressor Protein Protects against Chemotherapeutic Stress and Apoptosis in Human Medulloblastoma Cells. *Aging* 7(10): 854–868.

Weitzman, S. A., and L. I. Gordon
1990 Inflammation and Cancer: Role of Phagocyte-Generated Oxidants in Carcinogenesis. *Blood* 76(4): 655–663.

Wen, Kunming, Zhongxue Fu, Xingye Wu, et al.
2013 Oct-4 Is Required for an Antiapoptotic Behavior of Chemoresistant Colorectal Cancer Cells Enriched for Cancer Stem Cells: Effects Associated with STAT3/Survivin. *Cancer Letters* 333(1): 56–65.

Wendt, Amanda, Valery F. Thompson, and Darrel E. Goll

2004 Interaction of Calpastatin with Calpain: A Review. *Biological Chemistry* 385(6): 465–472.

WHO

2017 OMS | Cancer. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/fr/>, accessed October 30, 2017.

Wientjes, F. B., J. J. Hsuan, N. F. Totty, and A. W. Segal

1993 p40phox, a Third Cytosolic Component of the Activation Complex of the NADPH Oxidase to Contain Src Homology 3 Domains. *Biochemical Journal* 296(3): 557–561.

Wigmore, Peter M., Sarah Mustafa, Maha El-Beltagy, et al.

2010 Effects of 5-FU. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 678: 157–164.

Wiseman, L. R., and A. Markham

1996 Irinotecan. A Review of Its Pharmacological Properties and Clinical Efficacy in the Management of Advanced Colorectal Cancer. *Drugs* 52(4): 606–623.

Wiza, Claudia, Emmani B. M. Nascimento, and D. Margriet Ouwens

2012 Role of PRAS40 in Akt and mTOR Signaling in Health and Disease. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 302(12): E1453-1460.

Woodcock, Simon A., Richard C. Jones, Ricky D. Edmondson, and Angeliki Malliri

2009 A Modified Tandem Affinity Purification Technique Identifies That 14-3-3 Proteins Interact with Tiam1, an Interaction Which Controls Tiam1 Stability. *Journal of Proteome Research* 8(12): 5629–5641.

Woynarowski, J. M., W. G. Chapman, C. Napier, M. C. Herzig, and P. Juniewicz

1998 Sequence- and Region-Specificity of Oxaliplatin Adducts in Naked and Cellular DNA. *Molecular Pharmacology* 54(5): 770–777.

Woynarowski, J. M., S. Faivre, M. C. Herzig, et al.

2000 Oxaliplatin-Induced Damage of Cellular DNA. *Molecular Pharmacology* 58(5): 920–927.

Xu, Wen, Ke Yao, Zhao-hui Sun, Kai-jun Wang, and Xing-chao Shentu

2004 Expression and Proteolytic Activity of Calpain in Lens Epithelial Cells of Oxidative Cataract. *Journal of Zhejiang University. Science* 5(6): 743–748.

Xu, X. L., L. C. Wu, F. Du, et al.

2001 Inactivation of Human SRBC, Located within the 11p15.5-p15.4 Tumor Suppressor Region, in Breast and Lung Cancers. *Cancer Research* 61(21): 7943–7949.

Yamamoto, Asataro, Ryu Takeya, Masaki Matsumoto, Keiichi I. Nakayama, and Hideki Sumimoto

2013 Phosphorylation of Noxo1 at Threonine 341 Regulates Its Interaction with Nox1 and the Superoxide-Producing Activity of Nox1. *The FEBS Journal* 280(20): 5145–5159.

Yang, Anthony D., Fan Fan, E. Ramsay Camp, et al.

2006 Chronic Oxaliplatin Resistance Induces Epithelial-to-Mesenchymal Transition in

Colorectal Cancer Cell Lines. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 12(14 Pt 1): 4147–4153.

Yang, J., J. Parsons, N. H. Nicolay, et al.

2010 Cells Deficient in the Base Excision Repair Protein, DNA Polymerase Beta, Are Hypersensitive to Oxaliplatin Chemotherapy. *Oncogene* 29(3): 463–468.

Yang, S., P. Madyastha, S. Bingel, W. Ries, and L. Key

2001 A New Superoxide-Generating Oxidase in Murine Osteoclasts. *The Journal of Biological Chemistry* 276(8): 5452–5458.

Yang, Shi Yu, Anur Miah, Kevin M. Sales, et al.

2011 Inhibition of the p38 MAPK Pathway Sensitises Human Colon Cancer Cells to 5-Fluorouracil Treatment. *International Journal of Oncology* 38(6): 1695–1702.

Yoshizawa, T., H. Sorimachi, S. Tomioka, S. Ishiura, and K. Suzuki

1995 Calpain Dissociates into Subunits in the Presence of Calcium Ions. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 208(1): 376–383.

Yu, L., M. T. Quinn, A. R. Cross, and M. C. Dinauer

1998 Gp91(phox) Is the Heme Binding Subunit of the Superoxide-Generating NADPH Oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(14): 7993–7998.

Yu, T., J. Li, N. Li, et al.

2016 Obesity and Developmental Delay in a Patient with Uniparental Disomy of Chromosome 2. *International Journal of Obesity (2005)* 40(12): 1935–1941.

Zarubin, Tyler, and Jiahuai Han

2005 Activation and Signaling of the p38 MAP Kinase Pathway. *Cell Research* 15(1): 11–18.

Zhan, Yong, Dandan He, Peter E. Newburger, and G. Wayne Zhou

2004 p47(phox) PX Domain of NADPH Oxidase Targets Cell Membrane via Moesin-Mediated Association with the Actin Cytoskeleton. *Journal of Cellular Biochemistry* 92(4): 795–809.

Zhang, Jing, Li Li, Yueting Peng, et al.

2017 Surface Chemistry Induces Mitochondria-Mediated Apoptosis of Breast Cancer Cells via PTEN/PI3K/AKT Signaling Pathway. *Biochimica Et Biophysica Acta*.

Zhang, Lei, Karen Pickard, Veronika Jenei, et al.

2013 miR-153 Supports Colorectal Cancer Progression via Pleiotropic Effects That Enhance Invasion and Chemotherapeutic Resistance. *Cancer Research* 73(21): 6435–6447.

Zhang, Shuzhong, Katherine S. Lovejoy, James E. Shima, et al.

2006 Organic Cation Transporters Are Determinants of Oxaliplatin Cytotoxicity. *Cancer Research* 66(17): 8847–8857.

Zhang, W., R. D. Lane, and R. L. Mellgren

1996 The Major Calpain Isozymes Are Long-Lived Proteins. Design of an Antisense Strategy for Calpain Depletion in Cultured Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 271(31): 18825–18830.

Zhang, Ya-Jie, A-Jian Li, Yi Han, Lu Yin, and Mou-Bin Lin
2014 Inhibition of Girdin Enhances Chemosensitivity of Colorectal Cancer Cells to Oxaliplatin. *World Journal of Gastroenterology : WJG* 20(25): 8229–8236.

Zheng, Pei-Chan, Xiong Chen, Hong-Wu Zhu, et al.
2014 Capn4 Is a Marker of Poor Clinical Outcomes and Promotes Nasopharyngeal Carcinoma Metastasis via Nuclear Factor- κ B-Induced Matrix Metalloproteinase 2 Expression. *Cancer Science* 105(6): 630–638.

Zhou, L. Z., A. P. Johnson, and T. A. Rando
2001 NF Kappa B and AP-1 Mediate Transcriptional Responses to Oxidative Stress in Skeletal Muscle Cells. *Free Radical Biology & Medicine* 31(11): 1405–1416.

Zhou, Yunfei, Guohui Wan, Riccardo Spizzo, et al.
2014 miR-203 Induces Oxaliplatin Resistance in Colorectal Cancer Cells by Negatively Regulating ATM Kinase. *Molecular Oncology* 8(1): 83–92.

Zimmerman, U. J., and W. W. Schlaepfer
1991 Two-Stage Autolysis of the Catalytic Subunit Initiates Activation of Calpain I. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1080(3): 275.

Ziras, N., A. Potamianou, I. Varthalitis, et al.
2006 Multicenter Phase II Study of Gemcitabine and Oxaliplatin (GEMOX) as Second-Line Chemotherapy in Colorectal Cancer Patients Pretreated with 5-Fluorouracil plus Irinotecan. *Oncology* 70(2): 106–114.