



HAL
open science

Etude des mécanismes de chimiorésistance dans les cancers digestifs : impact de CDX2 et des transporteurs ABC

Jean-Baptiste Delhorme

► **To cite this version:**

Jean-Baptiste Delhorme. Etude des mécanismes de chimiorésistance dans les cancers digestifs : impact de CDX2 et des transporteurs ABC. Cancer. Université de Strasbourg, 2018. Français. NNT : 2018STRAJ119. tel-02917997

HAL Id: tel-02917997

<https://theses.hal.science/tel-02917997>

Submitted on 20 Aug 2020

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 DE STRASBOURG
ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE
Unité INSERM 1113

Thèse présentée pour le diplôme de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG
Discipline/spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

**Étude des mécanismes de chimiorésistance
dans les cancers digestifs :
impact de CDX2 et des transporteurs ABC**

PAR

Jean-Baptiste DELHORME

soutenue le 30 octobre 2018

Thèse dirigée par :

M^{me} GROSS Isabelle

CR, Inserm 1113, Strasbourg

Rapporteurs :

M^{me} PAYEN Léa

PU-PH, Inserm 1052, Lyon

M. BRESLER Laurent

PU-PH, CHU Nancy

Examineur interne :

M. CERALINE Jocelyn

MCU-PH, IGBMC, Strasbourg

REMERCIEMENTS

Depuis le début de mes études de médecine, mon objectif est de soigner des patients atteints de cancer. J'ai toujours considéré que médecine et recherche clinique et fondamentale ne pouvaient pas s'envisager l'une sans les autres et c'est par souci de compréhension et d'approfondissement de mes connaissances que je me suis lancé dans la recherche. Jeune interne, j'ai demandé à Jocelyn Ceraline (lors des cours du module cancérologie de M1) de m'indiquer un laboratoire qui travaillait dans le domaine du cancer colorectal et il m'a orienté vers celui de Jean-Noël Freund. J'y ai pu effectuer mon stage de M2 qui m'a permis de réellement découvrir la paillasse et de rencontrer les personnes qui m'ont fait tellement aimer ça, que j'ai voulu poursuivre avec une thèse de sciences. Thèse menée en même temps que mes 3 dernières années d'internat et mes 3 années de clinicat de chirurgie à raison d'une journée et demi par semaine (en partie sur des lendemains de garde), entrecoupée de 6 mois d'interCHU à Paris. Je suis content d'en être arrivé au bout et j'espère pouvoir continuer la recherche par la suite.

Je tiens d'abord à remercier les membres du jury, les Pr Payen et Bresler et le Dr Ceraline, qui ont accepté de juger ce travail. Merci de votre disponibilité et du temps passé à l'évaluation de ce manuscrit. L'organisation a été un peu difficile mais le principal est d'y être arrivé.

Je remercie également Isabelle (« maman au labo »), avec qui j'ai effectué mon M2 et ma thèse. C'est toi qui m'a donné l'envie de faire cette thèse. Merci pour ta patience, ta disponibilité et tout ce que tu as pu et su me transmettre. Il est vrai qu'avec un doctorant médecin les choses avancent moins vite mais on y est arrivé !

Merci à Jean-Noël Freund, d'avoir accepté un étudiant médecin dans son unité. Merci pour cette passion pour la science qu'il transmet à tous les membres de son équipe.

Un grand merci à Monsieur le Professeur Serge Rohr, mon maître, pour avoir compris mon intérêt pour la recherche fondamentale et d'avoir facilité ma formation dans ce domaine. Rien n'aurait été possible sans vous. Merci également pour m'avoir accordé votre confiance pendant ces années d'internat et de clinicat et pour les années à venir.

Je tiens aussi à remercier Madame le Professeur Cécile Brigand (« maman Cécile ») pour m'avoir accompagné pendant toutes ces années d'internat et de clinicat et de m'avoir transmis son savoir. Cette thèse de sciences n'aurait aussi pas pu se faire sans vous.

Merci à Christian Gaidon pour avoir su m'aiguiller et me conseiller dans les différentes parties de ce projet.

Aux membres du labo Isabelle D, Claire, Elisabeth, Léo, Véro pour leur aide dans ce travail et la vie au labo au quotidien. Merci pour toutes ces discussions autour des repas gastronomiques du self de HautePierre (miam le poisson du vendredi !).

Aux actuels doctorants au labo, Marine, Emilie, Béné, Susanna, Gilles, Alex, Anaïs B et B et tous les autres pour leur aide à la réalisation de ce travail et la bonne ambiance qu'ils apportent à l'équipe. Aux anciennes doctorantes Mathilde, Isabelle H, Cynthia qui m'ont beaucoup appris.

A mes collègues et amis au service, les Drs Elhocine Triki, Blandine Simeu, Natalia Chilinsteva, Benoit Romain, Yannis Mesli, Amandine Klipfel, Mahery Raharimanatosoa pour leur aide et soutien au service.

A tous mes anciens co-internes de chirurgie et radiothérapie. Merci d'avoir compris et pallié mes absences pour les vendredis de labo ! Mille excuses pour la surcharge de travail occasionnée.

A mes parents, pour leur soutien, leur aide et leur amour. Merci de m'avoir éduqué comme vous l'avez fait et de m'avoir soutenu dans mes différents projets. J'espère que vous êtes fiers de moi.

A mes frères, Max et Ludo, mes belle-sœurs Laeti et Johanna, mes neveux, ma tante Jocelyne, mes cousins Alexia et Fred et petits cousins. La distance ne facilite pas les choses mais c'est toujours un plaisir de vous voir.

A ma Fanny, ma chérie, ma meilleure amie qui partage ma vie depuis 15 ans, pour son amour indéfectible que la distance n'a jamais brisé. Une nouvelle épreuve nous attend pendant cette année à Paris ! Merci d'avoir compris et accepté mes absences professionnelles ou musicales et les soirs et WE passés derrière mon ordi.

A Marie-Christine pour son aide pendant toutes ces années.

A Béa, Perrine, Ben et Anne-Laure pour leur amitié qui persiste depuis la fac malgré le temps et la distance. A quand un nouveau WE ensemble?

A Léa (« ça »), merci, je ne sais pas trop pourquoi mais merci quand même...

Enfin, une pensée à mes proches disparus, mes grands-parents Jean et Mathilde, ma tante Françoise et Jean-Pierre. Vous me manquez...

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS	1
LISTE DES FIGURES.....	10
LISTE DES TABLEAUX.....	10
1. INTRODUCTION.....	12
1.1. Le côlon : anatomie, physiologie, histologie et biologie moléculaire.....	13
1.1.1. Rappels anatomiques et physiologiques	13
1.1.2. Aspects cellulaires et moléculaires de l'épithélium colique	18
1.1.2.1. Aspects cellulaires de l'épithélium intestinal.....	18
1.1.2.1.1. Les cellules souches coliques.....	18
1.1.2.1.2. Les cellules différenciées.....	20
1.1.2.1.2.1. Les cellules absorbantes	20
1.1.2.1.2.2. Les cellules sécrétrices	20
1.1.2.1.2.2.1 Les cellules caliciformes	21
1.1.2.1.2.2.2 Les cellules entéroendocrines.....	21
1.1.2.1.2.2.3 Les cellules à houppe.....	21
1.1.2.2. Aspects moléculaires de l'homéostasie intestinale.....	22
1.1.2.2.1. Voie WNT/ β -caténine.....	22
1.1.2.2.2. Voie NOTCH.....	22
1.1.2.2.3. Voie des BMP	23
1.1.2.2.4. Voie Hedgehog.....	23
1.2. Le cancer colorectal.....	25
1.2.1. Épidémiologie	25
1.2.2. Facteurs de risque de CCR.....	25
1.2.2.1. Facteurs environnementaux.....	25
1.2.2.2. Facteurs familiaux.....	26
1.2.3. Anatomopathologie des CCR.....	27
1.2.4. Classification clinique des CCR.....	29
1.2.5. Bases cellulaires et moléculaires de la carcinogenèse colique.....	31
1.2.5.1. Modèle de Fearon et Vogelstein.....	31
1.2.5.2. Modèle des cellules souches cancéreuses	33
1.2.5.3. Instabilité génétique des CCR	33
1.2.5.3.1. Instabilité chromosomique : tumeur de type CIN	33
1.2.5.3.2. Instabilité microsatellitaire : tumeur de type MSI.....	34
1.2.5.3.3. Instabilité épigénétique : tumeur de type CIMP	34
1.2.5.3.4. Consensus de classification moléculaire des CCR.....	35
1.2.6. Traitement.....	36
1.2.6.1. Traitement endoscopique	36
1.2.6.2. Traitement chirurgical.....	37
1.2.6.3. Traitement médical	38
1.2.6.3.1. Anticancéreux utilisés en cancérologie digestive et notamment pour les CCR	39

1.2.6.3.1.1. Agents cytotoxiques	39
1.2.6.3.1.1.1 5-Fluorouracile et capecitabine	39
1.2.6.3.1.1.2 Irinotécan	43
1.2.6.3.1.1.3 Oxaliplatine	44
1.2.6.3.1.1.4 Lonsurf	45
1.2.6.3.1.2. Autres cytotoxiques utilisés dans les cancers digestifs	45
1.2.6.3.1.3. Thérapies ciblées	45
1.2.6.3.1.3.1 Bévacizumab	46
1.2.6.3.1.3.2 Cétuximab	46
1.2.6.3.1.3.3 Régorafenib	46
1.2.6.3.1.3.4 Thérapies ciblées utilisées dans d'autres cancers digestifs	47
1.2.7. Survie globale pour les CCR et les autres cancers digestifs.	47
1.3. Phénomènes de résistance à la chimiothérapie dans les cancers de l'appareil digestif	48
1.3.1. Diminution de l'entrée de molécules anticancéreuses dans la cellule tumorale	49
1.3.2. Dégradation ou inactivation intracellulaires des molécules de chimiothérapie	49
1.3.3. Altération des cibles moléculaires des agents de chimiothérapie	50
1.3.4. Voies de réparation de l'ADN	51
1.3.5. Efflux actif de l'agent de chimiothérapie en dehors de la cellule cancéreuse	52
1.3.5.1. Superfamille des ABC	52
1.3.5.2. ABC et drogues anticancéreuses dans les cancers de l'appareil digestif	53
1.3.5.2.1. Transporteurs de la famille ABC dans les CCR	53
1.3.5.2.2. Transporteurs de la famille ABC dans les autres cancers digestifs	55
1.3.5.2.3. Inhibiteurs d'ABC et essais cliniques	58
1.3.5.2.4. Cas particulier de ABCC11	59
1.3.6. Altération des mécanismes de l'apoptose	64
1.3.7. Altération des points de contrôle du cycle cellulaire	64
1.4. Stratégies de contournement de la résistance à la chimiothérapie dans les cancers	65
1.4.1. Stratégies cliniques	65
1.4.2. Stratégies de recherche fondamentale : le développement de nouvelles drogues anticancéreuses	65
1.4.2.1. Les dérivés du ruthénium et de l'osmium	66
1.4.2.1.1. Les dérivés du ruthénium	66
1.4.2.1.2. Les dérivés de l'osmium	68
1.5. CDX2, un gène clé dans l'intestin	69
1.5.1. Structure et fonction de CDX2	69
1.5.2. Expression de CDX2	71
1.5.3. Régulation de l'expression et de l'activité CDX2	71
1.5.4. CDX2 et cancérogenèse	72
1.5.4.1. Cancer colorectal	72
1.5.4.2. Autres lésions et cancers de l'appareil digestif	73
1.5.4.3. CDX2 comme facteur pronostic de survie dans le CCR	74
1.5.5. CDX2 et résistance à la chimiothérapie	75
1.5.5.1. Données cliniques	75
1.5.5.2. Données moléculaires : CDX2 et transporteurs ABC	76
2. SYNTHÈSE ET OBJECTIFS DE LA THÈSE	79

3.	RESULTATS ET ARTICLES ASSOCIES.....	82
3.1.	Projet I : CDX2 et chimiorésistance dans les CCR.....	82
3.1.1.	Résumé des résultats obtenus.....	82
3.1.1.1.	Impact de CDX2 sur la survie sans récurrence et la réponse clinique à la chimiothérapie.....	82
3.1.1.2.	Impact de la différenciation intestinale sur la résistance à la chimiothérapie..	82
3.1.1.3.	Effet de la différenciation intestinale sur les transporteurs de la famille ABC	83
3.1.1.4.	ABCC11 : nouveau gène cible de CDX2.....	83
3.1.1.5.	Participation d'ABCC11 à la résistance au 5-FU.....	84
3.1.2.	Article associé.....	86
3.2.	Projet II : Chimiorésistance induite par les dérivés organométalliques.....	124
3.2.1.	Résumé des résultats obtenus.....	124
3.2.1.1.	Effets des dérivés organométalliques sur des lignées cellulaires de cancer colique.....	124
3.2.1.2.	Effets des dérivés organométalliques sur des lignées cellulaires de cancer gastrique.....	130
3.2.1.2.1.	Impact des dérivés organométalliques sur la survie des cellules cancéreuses gastriques.....	130
3.2.1.2.2.	Impact des dérivés organométalliques sur l'expression de molécules d'efflux.....	131
3.2.2.	Article associé.....	134
4.	DISCUSSION, PERSPECTIVES ET CONCLUSION GENERALE.....	150
4.1.	Implication de CDX2 dans des phénomènes de chimiorésistance dans les CCR.....	150
4.1.1.	Corrélation entre CDX2 et efficacité de la chimiothérapie.....	150
4.1.2.	Identification de mécanismes de résistance au 5-FU en aval de CDX2.....	151
4.1.3.	Rôle de CDX2 dans la chimiorésistance.....	153
4.1.4.	Perspectives cliniques.....	155
4.2.	Chimiorésistance induite par les dérivés organométalliques dans les cancers digestifs ..	156
4.3.	Conclusion générale.....	157
5.	BIBLIOGRAPHIE.....	159
6.	COMMUNICATIONS ET AUTRES ARTICLES.....	186
6.1.	Communications.....	186
6.2.	Articles associés à la recherche clinique.....	188

Liste des abréviations

5-FdUMP	5-fluorodesoxyuridine monophosphate
5-FU	5-fluorouracile
5-FUTP	5- fluoro-uridine monophosphate

-A-

ABC	ATP-binding cassette
ADN	Acide désoxyribonucléique
AJCC	American Joint Committee on Cancer
ALDH	Aldehyde Dehydrogenase
APC	Adenomatosis Polyposis Coli
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
ATP	Adénosine-5'-triphosphate
AXIN2	Axis Inhibitor 2

-B-

BAD	Bcl-2-associated death promoter
BAX	Bcl-2 associated X protein
BCL-2	B-cell Lymphoma 2
BCL-XL	B-cell lymphoma-extra large
BER	Base Excision Repair

BCRP	Breast cancer resistance protein
BMI1	B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog
BMP	Bone morphogenetic protein
BMPR	Bone morphogenetic protein receptor

-C-

cAMP	Cyclic Adenosine Monophosphate
CCR	Cancer Colorectal
CCRS	Cytoréduction tumorale maximale
CD	Clusters of Differentiation
CDH1	Cadherin-1
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A
Cdk2	Cyclin-dependent kinase 2
CDX2	Caudal type homeobox 2
CDX2/AS	Caudal type homeobox 2 /alternatively spliced transcript
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CHIP	Chimiohyperthermie péritonéale
cGMP	Cyclic guanosine monophosphate
CIN	Chromosomal Instability
CIMP	CpG island methylator phenotype
CIT	Carte d'identité des tumeurs
CK7 et 20	Cytokératine 7 et 20
CK1	Casein Kinase 1
CMS	Consensus Molecular Subtype

CMV	CytomégaloVirus
CS	Cellule Souche
CSC	Cellule Souche Cancéreuse
CTR 1 et 2	Copper uptake protein 1 et 2

-D-

DHEAS	Dihydroepiandrosterone 3-sulfate
DHFU	Dihydrofluorouracile
DLL1	Delta-Like protein 1
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNP-SG	Dinitrophenyl-S-glutathione
DPD (DPYD)	Dihydromyrimidine deshydrogenase
dTMP	Desoxy thymidine monophosphate
dTTP	Desoxy thymidine triphosphate

-E-

E	Embryonic day
E ₁ S	Estrone-3-sulfate
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMT	Epithelial–mesenchymal transition
ENT	Equilibrative nucleoside transporters
ERCC	Excision repair cross-complementation
Erk	Extracellular signal-regulated kinase

-F-

FBS	Fetal Bovine Serum
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
FZ	Frizzled

-G-

GATA6	GATA-binding factor 6
GLI	Glioma-associated transcription factor
Glut 2	Glucose transporter 2
GSK3 β	Glycogen synthase kinase 3 beta
GSTP1	Glutathione S-transferase P 1

-H-

HD	Homeodomain
HER-2	Human Epidermal Growth Factor Receptor-2
HIF	Hypoxia Inducible Factor
HNF4 α	Hepatocyte nuclear factor 4 alpha
HNPCC	Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer
HoxB7	Homeobox protein B7
HR	Homologous Recombination

-I-

Inca Institut national du cancer

-K-

KRAS V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

-L-

LGR5 Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5

LI-cadherine Liver-Instetine Cadherin

LTC4 Leukotriene C 4

LRC Label-retainning cells

LRP Low density lipoprotein receptors

-M-

MEX3A Mex-3 RNA binding family member A

MDR Multi Drug Resistance

MICI Maladie chronique inflammatoire de l'intestin

miRNA MicroARN

ml Millilitres

MLH MutL homolog

MMR Missmatch repair

MSH MutS Homolog

MRP	Multidrug resistance-associated protein
MSI	Microsatellite instability
MSS	Microsatellite Stable
MTHFR	Méthylènetétrahydrofolate réductase
mTOR	Mechanistic target of <i>rapamycin</i>
MTT	Bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium
Muc	Mucin
Mucdhl	Mucin and cadherin like
MYC	Myelocytose
MYH	MutY Homolog

-N-

NBD	Nucleotide binding domain
NER	Nucleotide Excision Repair
NF- κ B	Nuclear factor-kappa B
NHEJ	Non Homologous End Joining
NICD	Notch intracellular domain
NLS	Nuclear localization signal
NP-40	Nonidet P40
ns	Not significant

-O-

OAT	Organic anion transporter
-----	---------------------------

OCT	Organic cation transporter
ODC	Osmium-derived compounds
OPRT	Orotate phosphoribosyl transferase

-P-

p27 ^{kip1}	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
p38	Protein 38
p53	Protein 53
p	p-value
PAF	Polypose adénomateuse familiale
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
P-gp	P-glycoprotein
PMEA	9'-(2'phosphonylmethoxyethyl)adénine
PTCH	Protein patched homolog

-R-

RAD18	E3 ubiquitin-protein ligase
RAF-1	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
RDC	Ruthenium-derived compound
RET	Rearranged during transfection
ROS	Reactive oxygen species
RT-qPCR	Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction

RUNX2 Runt-related transcription factor 2

-S-

SD Stabilization domain

SLC28 Solute-carrier 28

SMAD Mothers Against Decapentaplegic homolog

SMO Smoothened

SNP Single-nucleotide polymorphism

si-RNA Small interfering RNA

-T-

TAD Transactivator domain

TCF4 Transcription factor 4

TERT Telomerase reverse transcriptase

TGF- β Transforming growth factor beta 1

TIE2 Tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domains

TOP1 Topoisomerase 1

TMD Transmembrane domain

TNM Tumor-Node-Metastasis

TP (TYMP) Thymidine phosphorylase

TS (TYMS) Thymidilate synthase

-U-

UGT	Uridine diphosphate glucuronosyl-transferase
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
UP	Uridine phosphorylase

-V-

VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
VHL	Von Hippel–Lindau
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine

-W-

WNT	Wingless-type MMTV integration site family
-----	--

Liste des figures

Figure 1 : Incidence estimée en 2017 des cancers en France selon le sexe et l'organe.....	13
Figure 2 : Anatomie du cadre colique.....	14
Figure 3 : Structure d'un méso.....	15
Figure 4 : Structure histologique de la paroi colique.....	16
Figure 5 : Structure de l'épithélium colique normal.....	17
Figure 6 : Crypte colique.....	18
Figure 8 : Schéma résumant les principales voies de signalisation cellulaire régulant l'homéostasie intestinale.....	24
Figure 9 : Classification TNM des cancers colorectaux.....	30
Figure 10 : Classification par stade des cancers colorectaux.....	31
Figure 11 : Modèle de carcinogenèse colique selon Fearon et Vogelstein.....	32
Figure 12 : Photo d'une pièce de colectomie droite carcinologique.....	37
Figure 14 : Métabolisme du 5-FU.....	42
Figure 15 : Schéma du métabolisme et du mécanisme d'action des fluopyrimidines.....	43
Figure 16 : Structure de l'oxaliplatine.....	44
Figure 17 : Survie à 5 ans des CCR par stade.....	47
Figure 18 : Représentation schématique de la structure des 3 principaux transporteurs de la famille ABC : ABCB1 (P-gp), ABCC1 (MRP1) et ABCG2 (BRCP).....	57
Figure 19 : Transporteurs impliqués dans la résistance à la chimiothérapie anticancéreuse ...	58
Figure 20 : Structure des transporteurs ABCC4, ABCC5 et ABCC11.....	61
Figure 21 : Mode d'action des transporteurs ABC.....	63
Figure 22 : Structure du RDC-11.....	67
Figure 23 : Structures du RDC-11, RDC-34, ODC-2 et ODC-3.....	68
Figure 24 : Représentation schématique de la protéine CDX2 humaine.....	70
Figure 25 : Expression des transporteurs ABC dans la lignée HT-29.....	125
Figure 26 : Expression des transporteurs ABC dans la lignée SW480.....	125
Figure 27 : Expression des transporteurs ABC dans la lignée HCT116.....	126
Figure 28 : Expression des transporteurs ABC dans la lignée HT-29/TW6.....	127
Figure 29 : Expression des transporteurs ABC dans la lignée Caco2/TC7.....	127

Liste des tableaux

Tableau 1. Résumé des mécanismes de chimiorésistance impliqués dans les CCR selon l'agent de chimiothérapie.....	62
---	----

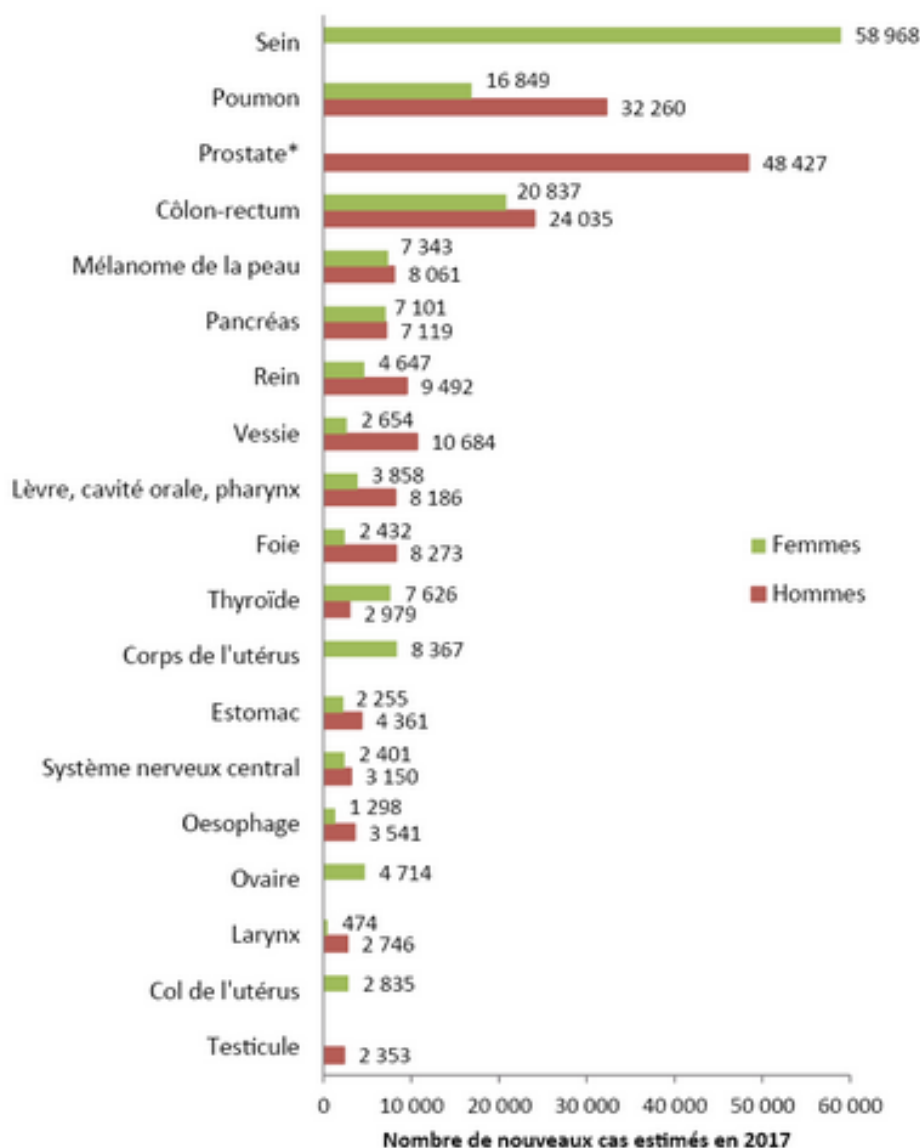


INTRODUCTION

1. INTRODUCTION

Les cancers de l'appareil digestif sont un problème de santé publique par leur fréquence et leur gravité. Selon la Société Nationale Française de Gastro-entérologie (SNFGE), ils correspondent à environ 25% des cancers en France et sont responsables de 30% des décès par cancer (40000 décès). Ces cancers concernent l'ensemble des organes de l'appareil digestif: l'œsophage, l'estomac, le foie, les voies biliaires, le pancréas, l'intestin grêle, le côlon et le rectum. Les parois du tube digestif sont constituées d'une couche de cellules appelée l'épithélium, en contact direct avec le bol alimentaire. Comme décrit plus loin (notamment pour le côlon), la physiologie et l'homéostasie des épithéliums sont très finement régulées par de multiples mécanismes moléculaires assurant leur renouvellement constant. Le dérèglement de ces mécanismes de régulation par des agents extérieurs ou des facteurs génétiques peut être à l'origine de la transformation tumorale de l'épithélium, évoluant ensuite en cancer invasif, capable de donner des métastases. Les métastases font toute la gravité de la maladie cancéreuse puisque ce sont elles qui sont à l'origine du décès des patients. En effet, la tumeur primitive, sauf complications, est rarement la cause des décès dans les cancers digestifs.

L'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans la chimiorésistance des cancers colorectaux (CCR) correspond à la majeure partie de ce travail de thèse, raison pour laquelle, cette pathologie sera la plus détaillée dans ce manuscrit. Les autres cancers du tube digestif, moins fréquents que les CCR (figure 1), ne seront qu'évoqués à travers les résultats de manipulations réalisées pour des travaux parallèles.



* Les données de projection 2017 ne sont pas fournies pour ce cancer. Il s'agit de l'estimation pour 2013.
 Source : Partenariat Francim/HCL/Santé publique France/INCa [Jéhannin-Ligier K. 2017]. Traitement : INCa 2017

Figure 1 : Incidence estimée en 2017 des cancers en France selon le sexe et l'organe

Les cancers de l'appareil digestif ont une incidence élevée. Parmi eux, le cancer colorectal (CCR) correspond au cancer le plus fréquent. Source Inca 2017

1.1. Le côlon : anatomie, physiologie, histologie et biologie moléculaire

1.1.1. Rappels anatomiques et physiologiques

Le côlon est le segment du tube digestif situé entre l'intestin grêle et l'anus. Il est divisé en plusieurs parties : le caecum, le côlon ascendant, le côlon transverse, le côlon descendant, le

côlon sigmoïde et le rectum. Il décrit un trajet en cadre parcourant la quasi-totalité de l'abdomen et mesure en moyenne 1,5 mètre de long (figure 2).

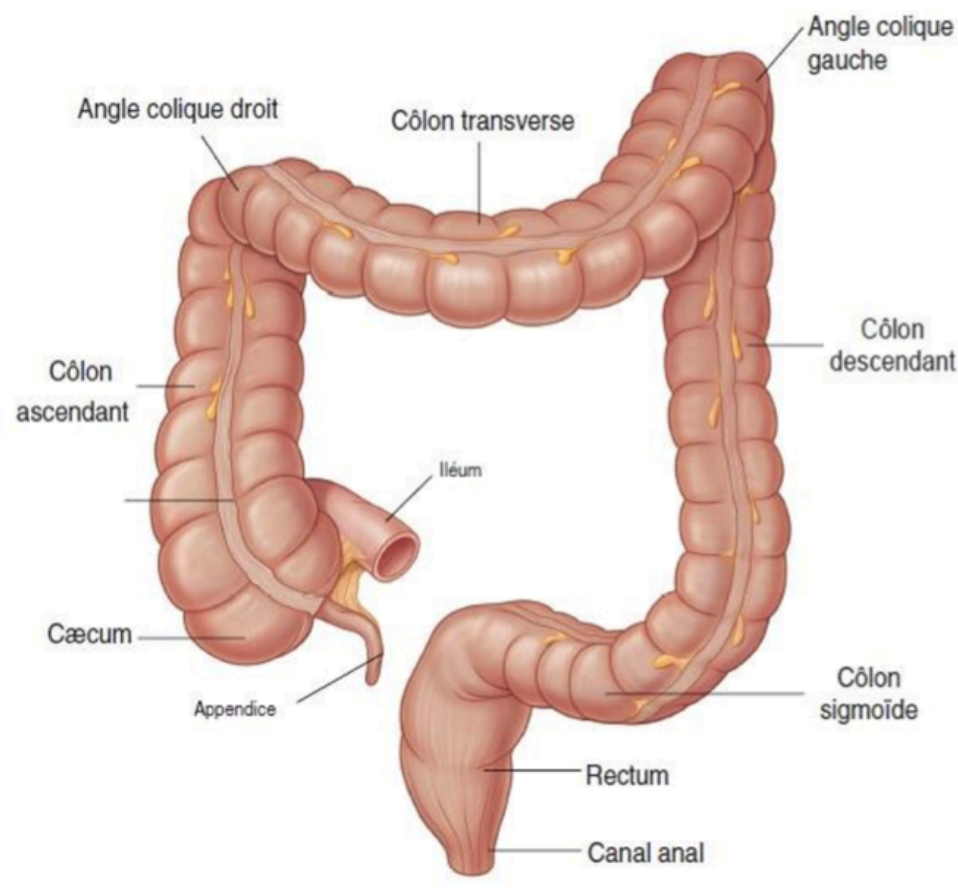


Figure 2 : Anatomie du cadre colique

(Drake and Gray 2010)

Le caecum, le côlon ascendant et les 2 tiers proximaux du côlon transverse (ensemble représentant le côlon droit) sont vascularisés par des branches de division de l'artère mésentérique supérieure. Le tiers distal du côlon transverse, le côlon descendant et le côlon sigmoïde (ensemble représentant le côlon gauche) sont vascularisés par des branches de division de l'artère mésentérique inférieure. Ces 2 réseaux vasculaires sont reliés entre eux par l'arcade de Riolan. Les veines drainant le côlon, une par artère, se drainent dans le système porte. Le drainage lymphatique du côlon droit est assuré par des relais ganglionnaires qui

remontent le long de l'axe mésentérique supérieur. Les nerfs innervant le côlon droit sont issus du plexus solaire et du plexus mésentérique supérieur. Le drainage lymphatique du côlon gauche est assuré par la chaîne mésentérique inférieure, en commun avec le rectum. L'innervation colique gauche est issue du plexus solaire et assurée par les plexus intermésentérique et mésentérique inférieur, satellite de l'artère mésentérique inférieure. Tous ces éléments vasculaires, lymphatiques et nerveux cheminent dans les mésos. Les mésos (figure 3) correspondent à des lames formées de deux feuillets de péritoine viscéral qui raccordent un organe intra abdominal à la paroi abdominale.

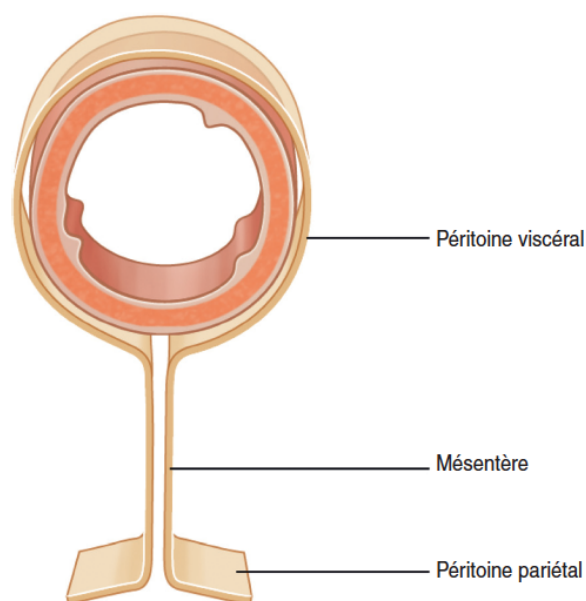


Figure 3 : Structure d'un méso

(Drake and Gray 2010)

La fonction principale du côlon est l'absorption de l'eau et des électrolytes du bol alimentaire et l'expulsion des fèces par le rectum et l'anus. Le côlon reçoit normalement 500 à 1 500 ml d'eau par 24 heures. Il en absorbe environ 90 % dans sa partie droite et transverse. L'absorption de l'eau est liée à celle de sodium.

La paroi colique représente également une barrière entre le milieu extérieur (lumière colique) et le milieu intérieur. Elle est composée de plusieurs couches concentriques délimitant la lumière colique où passent les fèces. Ces couches de la périphérie vers l'intérieur sont nommées la séreuse, la musculuse, la sous-muqueuse et la muqueuse (figures 4 et 5).

- La séreuse est bordée par le feuillet viscéral du péritoine. Elle comporte un tissu adipeux où cheminent les vaisseaux sanguins qui se dirigent vers les couches plus profondes à travers la musculuse.
- La musculuse est formée de deux couches de cellules musculaires lisses entre lesquelles cheminent les trajets nerveux du plexus myentérique (ou plexus d'Auerbach). La couche externe est longitudinale et permet le raccourcissement segmentaire du côlon. La couche interne, circulaire, permet de calibrer le diamètre colique. La contraction alternative de ces couches musculaires permet la progression des fèces le long du côlon.

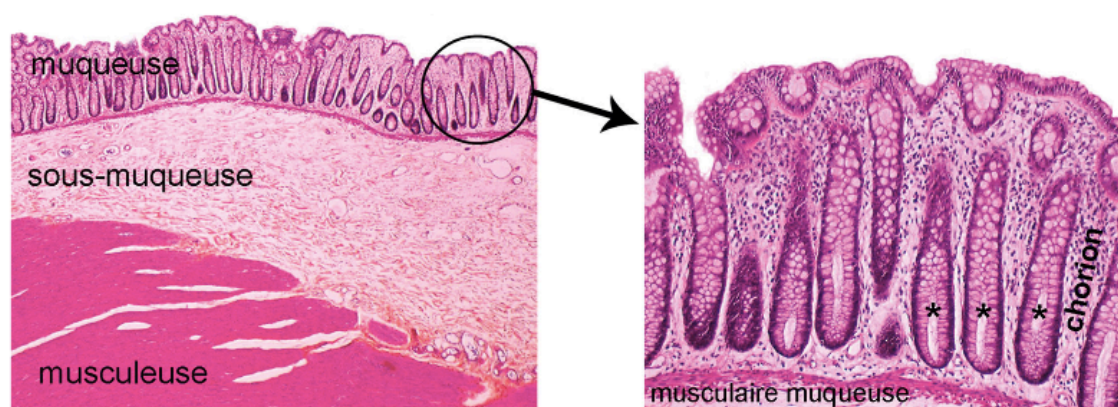


Figure 4 : Structure histologique de la paroi colique

A gauche, paroi colique saine. A droite, zoom sur la muqueuse.

(Collège des universitaires en hépato-gastro-entérologie, Beaugerie, and Sokol 2014)

- La sous-muqueuse, composée de tissu conjonctif, contient les éléments vasculaires lymphatiques et nerveux du plexus sous-muqueux (ou plexus de Meisner).
- La muqueuse est elle-même composée de plusieurs couches :
 - la musculaire-muqueuse, fine couche de fibres musculaires, sépare la sous-muqueuse de la muqueuse.
 - le chorion (ou la lamina propria) est composé de tissu lymphoïde, de capillaires et de fibres nerveuses.
 - la membrane basale sur laquelle repose l'épithélium colique.
 - l'épithélium colique est représenté par une monocouche de cellules épithéliales. Ces cellules constituent une barrière physiologique et immunologique protégeant l'organisme contre les agents xénobiotiques du contenu digestif. Les cellules épithéliales s'organisent sous la forme d'une succession d'invaginations (appelées cryptes ou glandes de Lieberkühn) et de surfaces planes.

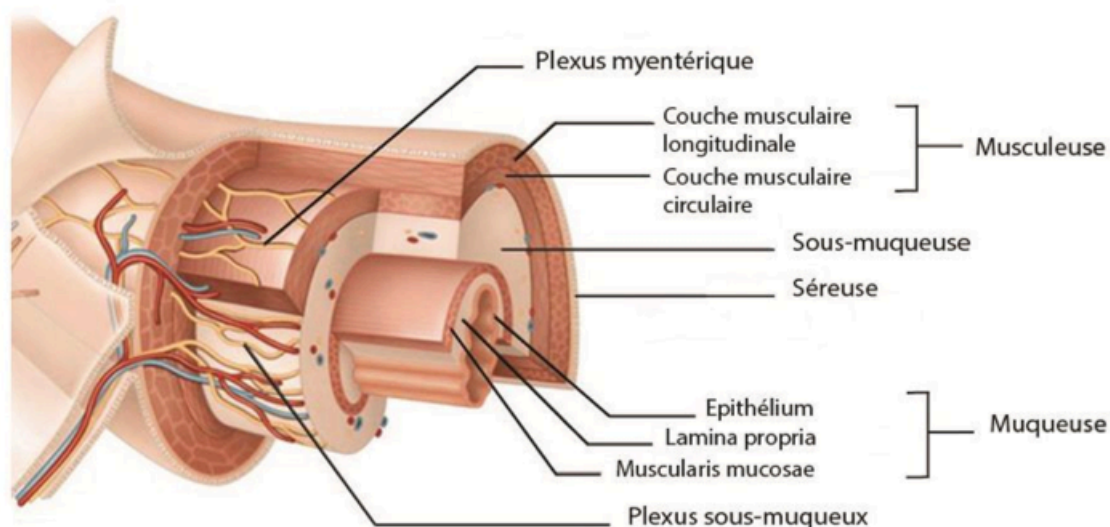


Figure 5 : Structure de l'épithélium colique normal

(Drake and Gray 2010)

1.1.2. Aspects cellulaires et moléculaires de l'épithélium colique

1.1.2.1. Aspects cellulaires de l'épithélium intestinal

L'épithélium colique se renouvelle entièrement en 5 à 7 jours grâce aux cellules souches (CS) coliques capables d'auto-renouvellement et de multipotence situées au fond des cryptes (figure 6). Les CS coliques donnent naissance à des progéniteurs (ou Transit-Amplifying cells) qui vont se différencier en cellules absorbantes et cellules sécrétrices qui assureront l'homéostasie colique (Barker 2014).

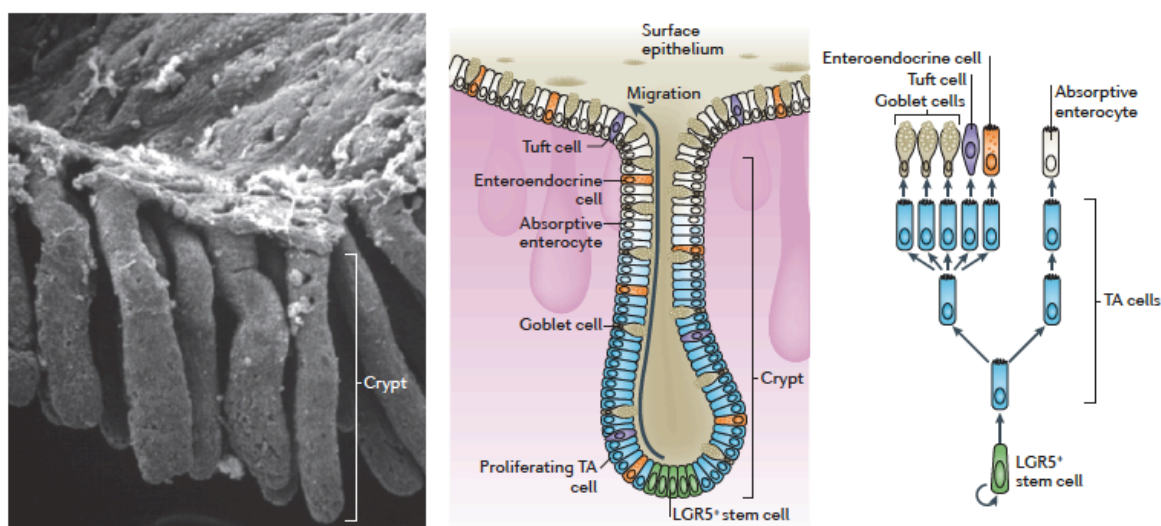


Figure 6 : Crypte colique

A gauche, image de microscopie électronique d'une crypte colique. A droite, représentation schématique d'une crypte colique et de son renouvellement : les cellules souches LGR5+ au fond des cryptes génèrent des cellules progénitrices qui prolifèrent activement dans la moitié inférieure de la crypte, puis se différencient en cellules absorbantes et sécrétrices matures situées à la surface de l'épithélium. (Barker 2014)

1.1.2.1.1. Les cellules souches coliques

Les CS sont définies par leur capacité d'auto-renouvellement et de multipotence. Elles sont au sommet d'une hiérarchie cellulaire et sont cruciales pour le renouvellement de la descendance différenciée dans la couche intestinale. Elles sont situées au fond des cryptes, à l'abri des

contraintes de cisaillement et des potentiels agents toxiques traversant le tractus digestif. L'identité exacte des CS coliques est encore l'objet de débats, mais le fait que les CS résident dans une niche qui fournit aux cellules des signaux essentiels à travers des voies de signalisation complexes fait consensus (Medema and Vermeulen 2011). Les CS coliques exprimant le marqueur LGR5 sont situées tout au fond de la crypte et assureraient le renouvellement continu de l'épithélium. Les CS coliques exprimant les marqueurs BMI1 et TERT sont situées en position +4 de la crypte et seraient des cellules quiescentes permettant la régénération en conditions pathologiques (K. S. Yan et al. 2012) (figure 7).

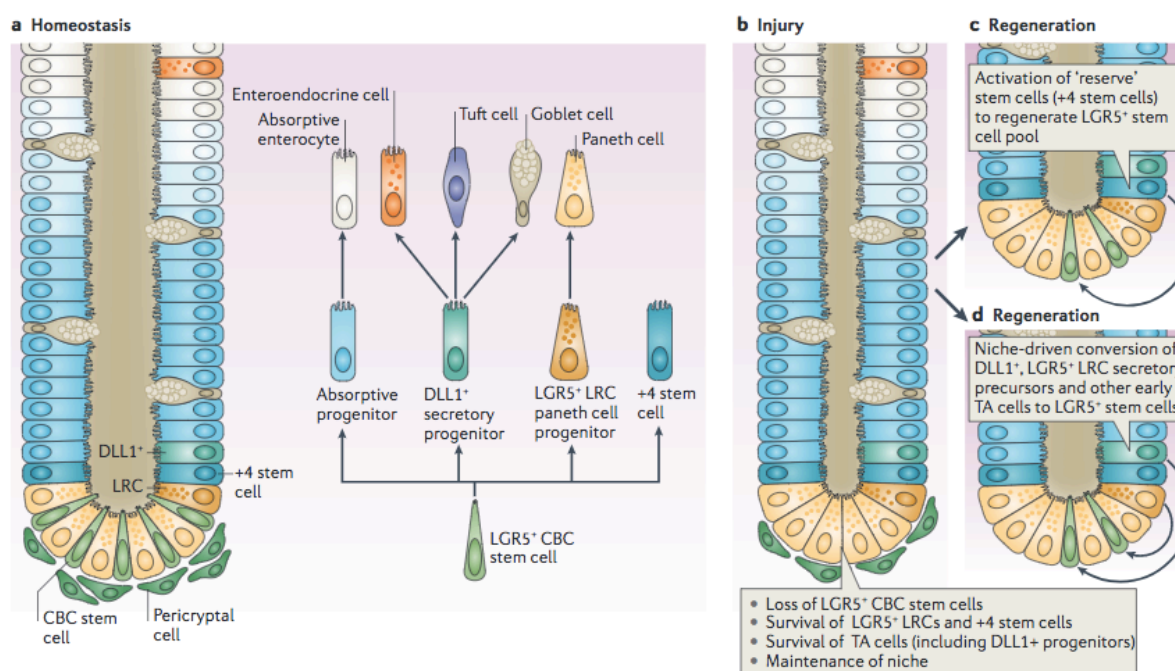


Figure 7 : Cellules au fond des cryptes coliques

Pour assurer l'homéostasie colique, les cellules souches LGR5+ à la base des cryptes régulent le renouvellement cellulaire. Les cellules progénitrices DLL1+ se différencient en cellules absorbatives, cellules endocrines, cellules caliciformes et cellules en houppes. En cas de lésions épithéliales, les cellules souches +4, les cellules LGR5+ LRC ou les cellules DLL1+ sont capables de retrouver leur état souche pour restaurer le renouvellement cellulaire.

(Barker 2014)

Il semblerait également que les cellules progénitrices possèdent une certaine plasticité leur permettant de réacquérir le phénotype « souche » en cas de lésion épithéliale afin d'assurer la régénération et le maintien de l'homéostasie de l'épithélium colique (Barker 2014).

D'une manière générale, l'état « souche » ou « différencié » des cellules de l'épithélium intestinal ne semble pas être une propriété intrinsèque et semble être finement régulé par des signaux du microenvironnement de l'épithélium colique (Barker 2014).

1.1.2.1.2. Les cellules différenciées

1.1.2.1.2.1. Les cellules absorbantes

Les cellules absorbantes coliques sont appelées colonocytes. Elles constituent la population cellulaire majoritaire de l'épithélium colique (environ 50%). Elles présentent à leur pôle apical des microvillosités permettant d'augmenter la surface d'absorption. Les microvillosités sont recouvertes d'un riche réseau de glycoprotéines et d'enzymes assurant l'absorption d'eau et d'électrolytes. Contrairement aux entérocytes de l'intestin grêle, les colonocytes n'absorbent pas le glucose et les acides aminés en quantité significative. Cependant, dans certaines conditions pathologiques où les entérocytes de l'intestin grêle sont incapables d'assurer cette fonction, les colonocytes peuvent, dans une certaine mesure, les suppléer (Marcil et al. 2004).

1.1.2.1.2.2. Les cellules sécrétrices

Les cellules sécrétrices, endocrines ou exocrines, de l'épithélium colique sont les cellules caliciformes (ou cellules de Goblet), les cellules entéroendocrines et les cellules à houppe (ou Tuft cells).

1.1.2.1.2.2.1 Les cellules caliciformes

Les cellules caliciformes représentent 16% des cellules de l'épithélium colique. Elles sont caractérisées par la présence à leur pôle apical de nombreux granules de mucine contenant des glycoprotéines. La libération de ces granules par exocytose dans la lumière digestive permet la formation d'une couche de mucus tapissant l'ensemble de l'épithélium colique, le protégeant ainsi des agressions mécaniques, chimiques, microbiennes et facilitant la progression des fèces (Y. S. Kim and Ho 2010).

1.1.2.1.2.2.2 Les cellules entéroendocrines

Ces cellules représentent moins de 1% des cellules de l'épithélium colique mais ont un rôle important dans la sécrétion endocrine de différentes substances impliquées dans l'homéostasie colique. Les cellules entéro-chromaffines, majoritaires, sécrètent la sérotonine, impliquée dans la motilité, la sécrétion intestinale et la sensation comme la satiété. Les cellules D, sécrètent la somatostatine, impliquée dans l'inhibition des fonctions exocrines et endocrines, ainsi que la stimulation du péristaltisme colique. Enfin, les cellules L, sécrètent plusieurs peptides impliqués dans différents processus comme la motilité intestinale, la prolifération d'entérocytes ou la vidange gastrique (Gunawardene, Corfe, and Staton 2011).

1.1.2.1.2.2.3 Les cellules à houppe

Les cellules à houppe (ou Tuft cells), dont la fonction a été récemment décrite, sont des cellules essentielles pour la réponse immunitaire de type 2 aux infections parasitaires digestives en coopérant avec le compartiment hématopoïétique (François Gerbe, Legraverend, and Jay 2012; F. Gerbe and Jay 2016).

1.1.2.2. Aspects moléculaires de l'homéostasie intestinale

L'homéostasie et l'architecture intestinale sont maintenues et régulées à travers les CS coliques par un large réseau de communications entre les cellules de l'épithélium et le microenvironnement sous-jacent. Ces communications mettent en jeu des phénomènes d'activation ou d'inhibition de voies majeures de signalisation dont les voies WNT, NOTCH, BMP et Hedgehog, impliquées dans la prolifération cellulaire, la migration, la différenciation, l'adhésion et l'apoptose. La figure 8 résume ces voies de signalisation et leurs interactions. (Medema and Vermeulen 2011).

1.1.2.2.1. Voie WNT/ β -caténine

La voie WNT est impliquée dans le maintien des CS coliques, la prolifération des cellules progénitrices et la migration des cellules le long de l'axe crypto-villositaire. Le ligand WNT sécrété par les cellules de la niche permet la formation d'un complexe entre 2 récepteurs membranaires FZ et LRP. Ce complexe entraîne une inactivation du complexe contenant APC, AXIN2, GSK3 β , CK1, β -caténine qui phosphoryle et entraîne la dégradation de la β -caténine lorsque la voie WNT n'est pas activée. L'activation de la voie WNT conduit donc à la libération, la stabilisation et la translocation nucléaire de la β -caténine. Celle-ci agit comme co-activateur pour des facteurs de transcription (dont TCF) et permet l'expression de gènes cibles (Medema and Vermeulen 2011).

1.1.2.2.2. Voie NOTCH

La voie NOTCH contribue au maintien des CS coliques, à la prolifération des progéniteurs et à leur différenciation en entérocytes. La différenciation des cellules progénitrices s'oriente vers le lignage absorbant (colonocytes) lorsque la voie NOTCH est active et vers le lignage sécrétoire lorsqu'elle est inactive. La voie NOTCH est principalement active au niveau des

cryptes. Elle est activée par un contact cellule-à-cellule : les ligands Delta et Jagged situés à la surface d'une cellule activent le récepteur NOTCH d'une cellule voisine. Cette interaction entraîne le clivage du domaine intracellulaire de NOTCH (NICD) par des protéases. Le NICD libre se transloque alors dans le noyau où il entraîne la transcription des gènes cibles de NOTCH en se liant à d'autres médiateurs (Medema and Vermeulen 2011).

1.1.2.2.3. Voie des BMP

Les BMP sont principalement produits par les cellules du stroma. Les BMP contrebalancent les effets prolifératifs de la voie WNT, inhibant la prolifération et favorisant la différenciation des cellules progénitrices. Au fond des cryptes, les BMP sont bloqués de manière spécifique par une liaison à Noggin, les empêchant d'activer les récepteurs BMP à la surface des cellules. Lorsque la voie BMP est activée à mi-crypte, les BMP entraînent une hétérodimérisation entre les récepteurs BMPRI et BMPRII. Celle-ci conduit à la phosphorylation de SMAD1, SMAD5 et SMAD8, qui se complexent avec SMAD4, se transloquent dans le noyau et activent la transcription des gènes cibles de la voie des BMP en se liant à d'autres facteurs de transcription (comme RUNX2) et co-facteurs (Medema and Vermeulen 2011).

1.1.2.2.4. Voie Hedgehog

Les protéines Hedgehog relaient le signal entre les cellules épithéliales et les cellules mésenchymateuses. La protéine Hedgehog semble contrebalancer les effets de la voie WNT, potentiellement à travers la voie des BMP. Cependant, le rôle de cette voie dans l'homéostasie des CS coliques reste flou. La voie Hedgehog repose sur l'interaction PTCH-SMO : en se fixant sur PTCH, Hedgehog libère SMO qui active le facteur de transcription GLI et permet sa translocation dans le noyau pour activer la transcription des gènes cibles de la voie Hedgehog (Medema and Vermeulen 2011).

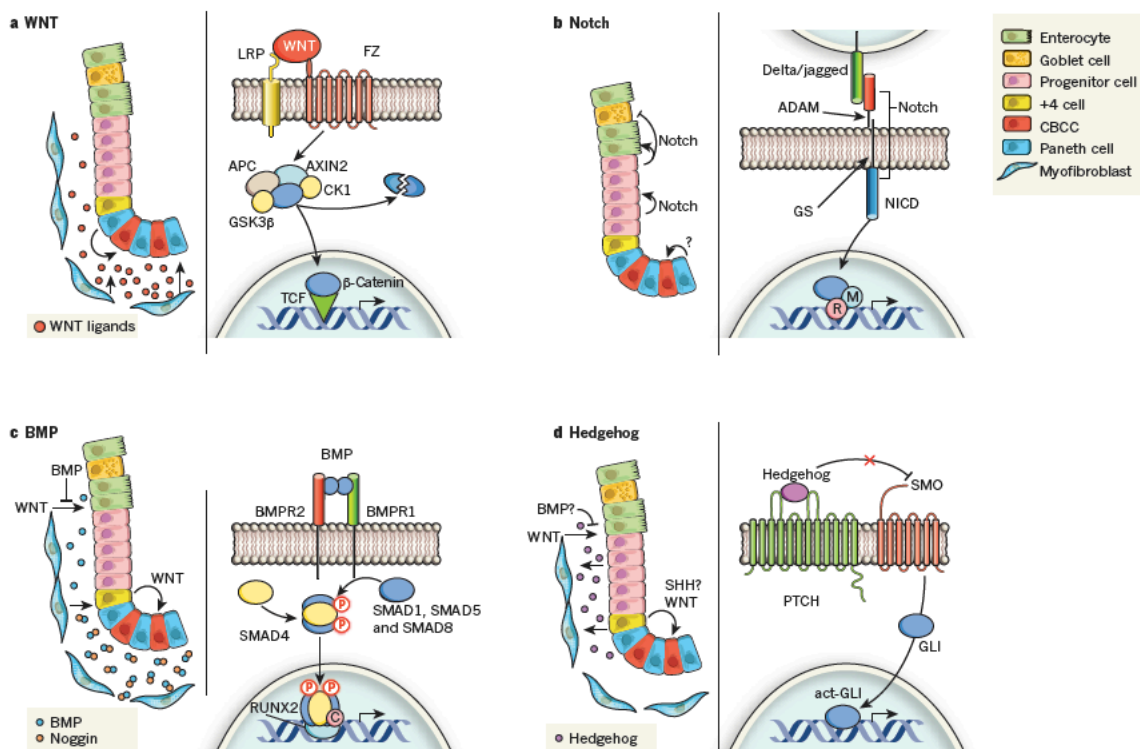


Figure 7 : Schéma résumant les principales voies de signalisation cellulaire régulant l'homéostasie intestinale

(a) voie *WNT*/ β -caténine, (b) voie *NOTCH*, (c) voie des *BMP*, (d) voie *Hedgehog*. (Medema and Vermeulen 2011)

1.2. Le cancer colorectal

1.2.1. Épidémiologie

Le cancer colorectal (CCR) est un enjeu majeur de santé publique en France en raison de sa fréquence et de sa gravité. En 2017, son incidence estimée était de 44872 nouveaux cas/an. Il s'agit du 2^{ème} cancer chez les femmes après le cancer du sein et le second en mortalité chez les hommes, après celui de la prostate. Il est à l'origine de 11,6 % de l'ensemble des décès par cancer (Belot et al. 2008), le classant ainsi au 3^{ème} rang des décès par cancer (17684 décès estimés en 2017). L'âge moyen au diagnostic était de 70 ans chez l'homme en 2005 et 73 ans chez la femme (source Inca). La survie nette standardisée sur l'âge à 5 ans sur la période 2005-2010 était de 63% alors que celle à 10 ans sur la période 1989-2010 était de 52% (Source Inca). La plupart des décès sont liés à l'évolution métastatique de ces cancers. Les stades avancés ou stades III et IV correspondent aux stades métastatiques (figure 10). Ces stades font toute la gravité de cette pathologie puisque la survie à 5 ans des patients de stade IV est estimée à environ 10% (Hollande, Pannequin, and Joubert 2010).

1.2.2. Facteurs de risque de CCR

1.2.2.1. Facteurs environnementaux

Dans les pays développés, le risque spontané de développer un CCR est d'environ 5%. Toutefois, plusieurs facteurs de risque ont été identifiés. L'âge supérieur à 50 ans est un facteur de risque de CCR justifiant la réalisation d'un dépistage organisé du CCR par recherche de sang occulte dans les selles (test immunologique). L'obésité, la sédentarité, la consommation de viande rouge et d'alcool, ainsi que le tabagisme, ont également été identifiés comme des facteurs de risque (Lecomte et al. 2017).

Même si la plupart des CCR sont sporadiques (75% des cas), les antécédents personnels et familiaux de CCR sont des facteurs de risque justifiant une surveillance par coloscopie à partir

de 45 ans à toute personne dont l'un des deux parents au premier degré a été atteint de CCR avant 65 ans ou dont les deux parents au premier degré ont été atteints de CCR.

Les maladies inflammatoires de l'intestin (MICI), comme la rectocolite hémorragique et la maladie de Crohn, sont aussi des facteurs de risque à partir de 10 ans d'évolution et en fonction de l'étendue de l'inflammation. Une coloscopie de surveillance systématique est proposée à ces patients (Lecomte et al. 2017).

1.2.2.2. Facteurs familiaux

Les familles atteintes de polypose adénomateuse familiale (PAF) se transmettent de manière dominante un allèle muté du gène suppresseur de tumeur *APC*. La mutation somatique du 2^{ème} allèle d'*APC* entraîne le développement de centaines de polypes dont le risque d'évolution maligne avant 40 ans est de 100%. La mutation du gène *MYH* est responsable d'une forme atténuée de la maladie et est transmise de manière récessive. La PAF est responsable de 1% des CCR. Les indications d'une analyse génétique chez le cas index dans les PAF sont (Lecomte et al. 2017) :

- La présence de plus de 15 polypes adénomateux colorectaux synchrones ou métachrones.
- En cas de polypose floride (>100 polypes) ou d'atteinte d'individus de générations successives ou de tumeur desmoïde, l'analyse débutera par la recherche d'une mutation *APC*.
- En cas de phénotype atténué en l'absence d'agrégation transgénérationnelle, l'analyse débutera par la recherche d'une mutation *MYH*.

Le syndrome de Lynch ou Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (HNPCC), qui correspond à 3% des CCR, est lié à une mutation des gènes *MLH1*, *MSH2* ou *MSH6* impliqués

dans les mécanismes de réparation de l'ADN par « mismatch repair ». Il augmente l'instabilité des microsatellites et le risque de développer un CCR (Markowitz et al. 2002). Le diagnostic de syndrome de Lynch nécessite la présence des critères suivants (Lecomte et al. 2017) :

- Au moins 3 sujets atteints de cancers du spectre HNPCC (CCR, endomètre, ovaire, grêle, uretère ou cavités excrétrices rénales) dont un uni aux deux autres au premier degré,
- Au moins deux générations successives concernées,
- Au moins un cas de CCR diagnostiqué avant l'âge de 50 ans (tumeurs vérifiées par examen anatomopathologique).

Dans de rares cas, la présence de polypes hamartomateux peut être à l'origine de CCR comme dans la polypose juvénile ou le syndrome de Peutz-Jeghers (Markowitz et al. 2002).

1.2.3. Anatomopathologie des CCR

La vaste majorité des CCR sont des carcinomes, avec plus de 90% des cas correspondant à des adénocarcinomes : 80% sont des adénocarcinomes lieberkühniens et 10% sont des adénocarcinomes mucineux ou colloïde-muqueux qui contiennent des plages étendues de mucus au sein de la tumeur (supérieures à 50% selon la définition). Les autres formes de carcinomes sont rares : carcinome adénoquameux, carcinome épidermoïde, carcinome indifférencié, carcinome en bague à chaton, carcinome à petites cellules.

Selon le pourcentage de glandes présentes, on distingue les adénocarcinomes bien différenciés (plus de 95% de glandes) des adénocarcinomes modérément différenciés (plus de 50%) et peu différenciés (moins de 49%).

En immunohistochimie, les adénocarcinomes coliques sont positifs pour CK20, négatifs pour CK7 et positifs pour CDX2 (voir plus loin).

D'autres histologies peuvent survenir dans le côlon et le rectum. Elles sont cependant très rares et sont plus fréquemment rencontrées sur d'autres parties du tube digestif comme l'intestin grêle ou l'estomac : les lymphomes, les tumeurs neuro-endocrines et les sarcomes (tumeur stromales gastro-intestinales).

La majorité des adénocarcinomes se développent à partir de lésions précancéreuses appelées adénomes (ou polypes adénomateux). Ces adénomes sont des lésions qui se développent à la surface de la paroi interne du côlon, au niveau de sa muqueuse. La transformation en lésion cancéreuse adénocarcinomateuse prend en moyenne entre 10 et 15 ans. Les processus moléculaires de l'évolution d'un adénome en adénocarcinome seront détaillés plus loin. Le risque d'évolution d'adénomes en adénocarcinome dépend de leur type, de leur taille et de leur nombre.

Il existe quatre types d'adénomes :

- L'adénome vilieux

L'adénome vilieux représente 5 % des polypes adénomateux et revêt un aspect velu avec de nombreuses projections longues et minces et une base d'implantation large sur la muqueuse dite sessile.

- L'adénome tubuleux

L'adénome tubuleux est le plus commun des adénomes et représente 75 % des polypes adénomateux. Il est constitué à sa surface de cryptes allongées ressemblant à une série de tubes et sa base est plus souvent pédiculée.

- L'adénome tubulovilleux

L'adénome tubulovilleux représente 20 % des polypes adénomateux. Il présente à la fois des caractéristiques de l'adénome vilieux et de l'adénome tubuleux.

- L'adénome plan

L'adénome plan est une lésion très localisée (moins d'un centimètre de diamètre) qui ne se développe pas en relief sous forme de polype, mais plutôt à plat (moins de 1,3 mm d'épaisseur).

Ce type d'adénome est le plus à risque de cancérisation.

1.2.4. Classification clinique des CCR

La classification clinique des CCR est basée sur la 8^{ème} édition de la classification TNM, applicable depuis 2017 (Lecomte et al. 2017). Le T pour « tumor » représente la profondeur d'invasion des cellules cancéreuses dans l'épithélium colique. Le N pour « node » correspond à l'envahissement ganglionnaire et le M pour « metastasis » correspond à la présence de métastase (figures 9 et 10). L'analyse d'au moins 12 ganglions régionaux est recommandée pour établir le statut N de la classification TNM. Quel que soit le stade, en particulier pour les stades II et III, le pronostic carcinologique est meilleur quand le nombre de ganglions prélevés et analysés est élevé.

Les ganglions régionaux du côlon sont :

- Appendice : iléo-coliques
- Cæcum : iléo-coliques, coliques droits
- Côlon ascendant : iléo-coliques, coliques droits, coliques moyens
- Angle droit - hépatique : coliques moyens, coliques droits
- Côlon transverse : coliques droits, coliques moyens, coliques gauches, mésentériques inférieurs
- Angle colique gauche : coliques moyens, coliques gauches, mésentériques inférieurs
- Côlon sigmoïde : nœuds sigmoïdiens, coliques gauches, rectaux supérieurs, recto-sigmoïdiens et mésentériques inférieurs.

Tumeur primaire (T)

Tis : carcinome intra-épithélial ou intra-muqueux (Carcinome *in situ*, adénocarcinome intra-muqueux envahissant le chorion ou la musculaire muqueuse).

T1 : tumeur envahissant la sous-muqueuse

T2 : tumeur envahissant la musculaire

T3 : tumeur envahissant la sous-séreuse

T4 : tumeur pénétrant le péritoine viscéral et/ou envahissant au moins une structure/organe de voisinage

T4a : pénétration du péritoine viscéral

T4b : envahissement d'une structure de voisinage

Ganglions (N)

N0 : pas de métastase ganglionnaire régionale

N1 : métastase dans 1 à 3 ganglions lymphatiques régionaux

N1a : métastase dans 1 ganglion lymphatique régional

N1b : métastases dans 2-3 ganglions lymphatiques régionaux

N1c : dépôts tumoraux « satellites » dans la sous-séreuse, ou dans le tissu péri-colique ou péri-rectal non péritonisé, en l'absence de ganglion métastatique

N2 : métastases dans au moins 4 ganglions lymphatiques régionaux

N2a : métastases dans 4-6 ganglions lymphatiques régionaux

N2b : métastases dans au moins 7 ganglions lymphatiques régionaux

Métastases (M)

M0 : pas de métastase à distance

M1a : métastases à distance confinées à un organe sans atteinte péritonéale

M1b : métastases atteignant plus d'un site métastatique

M1c : métastases péritonéales avec ou sans autre organe atteint

Figure 8 : Classification TNM des cancers colorectaux

(AJCC 8^{ème} édition, 2017)

Stade 0	pTis N0 M0
Stade I	pT1-2 N0 M0
Stade IIA	pT3 N0 M0
Stade IIB	pT4a N0 M0
Stade IIC	pT4b N0 M0
Stade IIIA	pT1-T2 N1/N1c M0 et pT1 N2a M0
Stade IIIB	pT3-T4a N1N1c M0, pT2-T3 N2a M0, pT1-T2 N2b M0
Stade IIIC	pT4a N2a M0; p T3-T4a N2b M0; pT4b N1-N2 M0
Stade IVA	tout T, tout N, M1a
Stade IVB	tout T, tout N, M1b
Stade IVC	tout T, tout N, M1c

Figure 9 : Classification par stade des cancers colorectaux

1.2.5. Bases cellulaires et moléculaires de la carcinogenèse colique

Les CCR se développent en général à partir de lésions bénignes, les adénomes, qui correspondent à une dysplasie épithéliale avec une prolifération incontrôlée.

1.2.5.1. Modèle de Fearon et Vogelstein

Depuis les années 90, la progression tumorale est vue comme une succession d'étapes, chacune associée à des modifications morphologiques et fonctionnelles de la cellule tumorale et correspondant à l'activation d'un oncogène ou à l'inactivation d'un gène suppresseur de tumeurs. Dans la séquence adénome-cancer colique, l'étape la plus précoce serait l'inactivation du gène suppresseur de tumeurs APC. Des mutations activatrices de *KRAS* et de *SMAD4* permettraient le passage d'un adénome précoce à un adénome intermédiaire, puis tardif. Le passage de l'adénome au carcinome serait dû à l'inactivation de p53 (Fearon and Vogelstein

1990). Puis, une cellule cancéreuse de la tumeur primaire deviendrait métastatique grâce à des modifications génétiques restant à déterminer (figure 11).

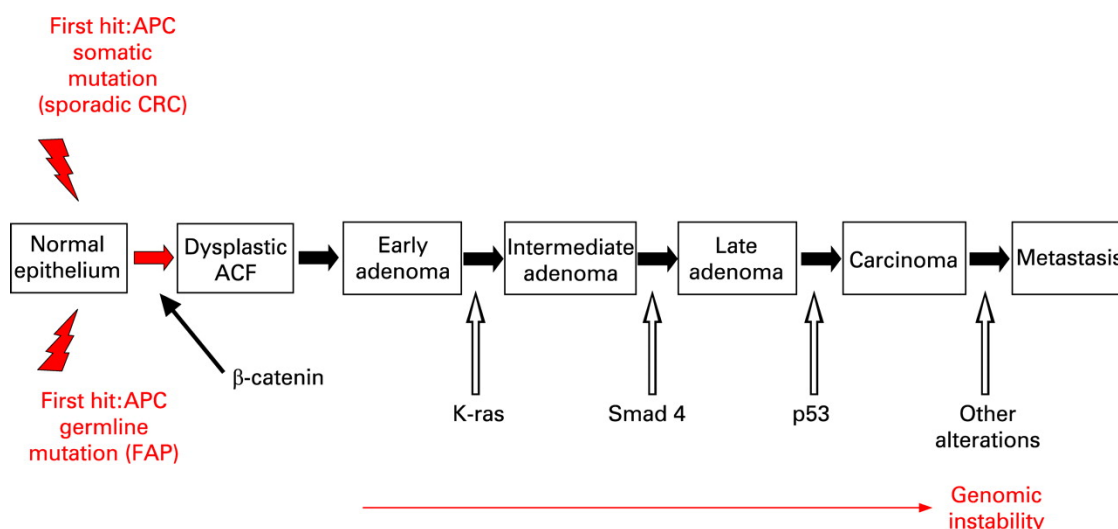


Figure 10 : Modèle de carcinogénèse colique selon Fearon et Vogelstein

La progression tumorale est vue comme une succession d'activations d'oncogènes ou d'inactivations de gènes suppresseur de tumeurs permettant la transformation d'un épithélium normal en carcinome.

Ce modèle est partiellement remis en cause car il existe une grande hétérogénéité cellulaire et moléculaire entre les tumeurs de différents patients, ainsi qu'au sein d'une même tumeur (Thiery 2002; Jass et al. 2003). En effet, celles-ci sont constituées de cellules différentes de par leur morphologie, leurs marqueurs, leur capacité de prolifération et de tumorigénicité. Par exemple, les cellules de la masse centrale de la tumeur primaire forment encore dans la plupart des cas des structures glandulaires et maintiennent des caractéristiques de cellules différenciées (polarité, adhésion...), alors que les cellules du front invasif (situées à l'interface de la tumeur primaire et du stroma ou disséminées dans le stroma) ont subi une transition de type épithélio-mésenchymateuse (EMT) (Vermeulen et al. 2008), caractérisée par de profondes modifications morphologiques (perte de la polarité cellulaire, réorganisation du cytosquelette) et fonctionnelles (arrêt de la prolifération, stimulation de la migration).

1.2.5.2. Modèle des cellules souches cancéreuses

Le concept de cellules souches cancéreuses (CSC), développé plus récemment (Vermeulen et al. 2008), illustre et permet d'expliquer l'hétérogénéité intra-tumorale. Des expériences de transplantation de cellules tumorales chez la souris ont montré que toutes les cellules tumorales ne sont pas capables de maintenir ou d'initier une croissance tumorale. Une minorité de cellules tumorales, peu différenciées et identifiées par des marqueurs (Ex : CD133, CD44, ALDH), seraient capables d'initier la tumorigenèse et auraient comme les CS normales un potentiel d'autorenouveaulement et de différenciation : ainsi, chaque CSC pourrait donner naissance soit à une autre CSC, soit à une cellule capable de différenciation tissulaire (Reya et al. 2001). L'origine des CSC est très discutée : elles proviendraient de CS adultes devenues cancéreuses ou de cellules cancéreuses qui ont acquis des propriétés de CS, éventuellement par EMT tumorale. En effet, une étude a montré que les cellules tumorales mammaires ayant subi une EMT s'apparentent du point de vue moléculaire et fonctionnel à des CS (Mani et al. 2008).

1.2.5.3. Instabilité génétique des CCR

Les CCR sont caractérisés par des altérations génomiques mettant en jeu 3 mécanismes moléculaires majeurs non exclusifs d'instabilité génétique : l'instabilité chromosomique (tumeur de type CIN), l'instabilité microsatellitaire (tumeur de type MSI) et l'instabilité épigénétique (tumeur de type CIMP).

1.2.5.3.1. Instabilité chromosomique : tumeur de type CIN

Les CCR de type CIN représentent 65 à 70% des CCR. Ces tumeurs sont caractérisées par des altérations chromosomiques conduisant à une aneuploïdie et à des pertes d'hétérozygotie selon le modèle de cancérogenèse colique de Fearon et Vogelstein. Les mécanismes impliqués dans le phénotype CIN incluent des altérations dans la ségrégation chromosomique, une dysfonction

des télomères et des anomalies de réponse aux lésions à l'ADN (Mármol et al. 2017). Dans les formes sporadiques, on retrouve majoritairement des altérations au niveau du gène *APC*, *KRAS*, *PI3K*, *SMAD4* et *p53*. Les formes héréditaires sont représentées par la PAF.

1.2.5.3.2. Instabilité microsatellitaire : tumeur de type MSI

Les tumeurs de type MSI représentent 15 à 20% des CCR. Ces tumeurs sont caractérisées par des mutations (insertions ou délétions) au niveau des régions microsatellites (petites séquences d'ADN de 1 à 6 nucléotides répétées et présentes sur l'ensemble du génome) qui sont secondaires à un dysfonctionnement du système de réparation de l'ADN par « mismatch repair » (MMR), permettant de reconnaître et réparer des mésappariements au niveau de l'ADN. Ce système est composé de protéines de la famille MSH et MLH. Les CCR de type MSI sont fréquemment associés à des mutations des gènes *BRAF*, *BAX* et *TGF β R2* (Boland and Goel 2010). Ces tumeurs sont cliniquement associées à une localisation colique droite préférentielle, à un type anatomopathologique mucineux et à un meilleur pronostic clinique, malgré une moins bonne réponse à la chimiothérapie. En effet, le phénotype MSI serait un facteur de résistance au 5-FU (Ribic et al. 2003).

Pour les formes sporadiques de CCR de type MSI, le dysfonctionnement du système MMR est lié à l'hyperméthylation du promoteur du gène *MLH1* entraînant sa perte d'expression. La forme héréditaire de CCR de type MSI est représentée par le syndrome de Lynch comme décrit plus haut (Boland and Goel 2010).

1.2.5.3.3. Instabilité épigénétique : tumeur de type CIMP

Les tumeurs de type CIMP présentent une instabilité épigénétique résultant d'une hyperméthylation des îlots CpG de l'ADN (Toyota et al. 2009). Ces altérations sont détectées dans 20 à 30% des CCR. Les îlots CpG sont des séquences dinucléotidiques présentes dans plus

de la moitié des régions promotrices du génome humain dont la méthylation participe à la répression génique, notamment des gènes *CDKN2A*, *CDHI* et *VHL*.

1.2.5.3.4. Consensus de classification moléculaire des CCR

Suite au développement des techniques de séquençage haut débit permettant de séquencer rapidement l'intégralité du génome ou du transcriptome des cellules tumorales, une nouvelle classification des CCR a vu le jour en 2015 (Guinney et al. 2015). Cette classification basée sur les données transcriptomiques, intimement liées au phénotype cellulaire et tumoral, ainsi qu'au comportement clinique de la tumeur, contraste avec les systèmes de classification précédents basés sur des analyses histologiques ou chromosomiques.

Ainsi, l'analyse transcriptomique de tumeurs de 3962 patients atteints de CCR par un consortium international a permis l'élaboration d'une classification moléculaire consensuelle proposant 4 sous-types de CCR (Guinney et al. 2015) :

- CMS1 (MSI-Immune) : Ce sous-type représente 14% des CCR et est caractérisé par un taux de mutation élevé, une forte instabilité microsatellitaire et épigénétique, un taux de mutations de BRAF élevé associé à une forte activation du système immunitaire. La survie des patients après récurrence dans ce groupe est diminuée.
- CMS2 (canonical) : Ce sous-type représente 37% des CCR et est caractérisé par un taux important d'instabilité chromosomique avec perte d'activité de gènes suppresseurs de tumeurs et activation d'oncogènes. Les voies WNT et MYC sont préférentiellement activées dans ce sous-type.
- CMS3 (metabolic) : Il représente 13% des CCR. Ces tumeurs sont caractérisées par une dérégulation du métabolisme et sont associées à des mutations fréquentes de l'oncogène *KRAS* et un phénotype CIMP-low.

- CMS4 (mesenchymal) : Ce groupe représente 23% des CCR et est caractérisé par un taux important d'instabilité chromosomique, une activation de la voie du TGF- β , une augmentation de l'angiogenèse et une infiltration stromale importante de la tumeur. Les cellules tumorales ont un phénotype d'EMT. Ces tumeurs ont un taux de récurrence locale plus important que les tumeurs des autres sous-types.

L'hétérogénéité moléculaire des CCR en fait une maladie complexe, composée de formes distinctes ayant des pronostics différents. En pratique, cette classification CMS est encore peu utilisée en clinique, mais pourrait permettre d'indiquer certains types de traitement en cas de pronostic tumoral défavorable.

1.2.6. Traitement

Le traitement des CCR dépend du stade et est multidisciplinaire (Lecomte et al. 2017). Il associe des traitements endoscopiques, chirurgicaux et/ou médicaux qui sont détaillés ci-dessous.

1.2.6.1. Traitement endoscopique

Après exérèse endoscopique d'un adénome dégénéré (pTis et pT1), des points importants sont à évaluer pour savoir si un traitement complémentaire est nécessaire : l'aspect macroscopique de la lésion selon la classification de Paris (sessile, pédiculée, plane), le type et la qualité de l'exérèse (polypectomie à l'anse ; mucoséctomie ; dissection sous-muqueuse ; exérèse monobloc ou « *piecemeal* » de la lésion ; caractère macroscopiquement complet ou non de l'exérèse), le risque d'envahissement ganglionnaire (entre 1 et 25% en cas d'envahissement de la sous-muqueuse) et le risque chirurgical lié au terrain du patient (antécédents). La résection endoscopique complète d'un adénome dégénéré de type Tis (intra-épithélial ou intra-muqueux) est un traitement suffisant, notamment en cas d'exérèse complète en un fragment.

En cas de lésions avec foyer(s) de carcinome(s) sous-muqueux, la résection endoscopique est considérée comme suffisante uniquement si l'envahissement sous-muqueux est superficiel (< 1000 μ m si lésion sessile ou plane, limité au 1/3 supérieur du pied si lésion pédiculée) et si la pièce d'exérèse endoscopique présente l'ensemble des critères de sécurité.

1.2.6.2. Traitement chirurgical

Pour les stades précoces (sauf traitement endoscopique cf supra), l'exérèse chirurgicale est la base du traitement. Il s'agit d'une colectomie segmentaire pouvant être réalisée par laparoscopie ou laparotomie associée à un curage au niveau de l'axe méésentérique concerné (figure 12). Le curage ganglionnaire doit prélever au moins 12 ganglions.



Figure 11 : Photo d'une pièce de colectomie droite carcinologique

Banque de données personnelle

En cas de métastases hépatiques, le traitement dépend de leur résecabilité (Phelip et al. 2018). Les patients atteints de métastases hépatiques de résecabilité de classe 1 (résecabilité évidente) font l'objet d'une hépatectomie classique. Les patients atteints de métastases hépatiques de résecabilité de classe 2 (résecabilité possible) font l'objet d'une hépatectomie complexe ou très large requérant une procédure difficile et/ou risquée dans des centres de référence. Dans tous les cas, une chimiothérapie périopératoire est recommandée (Phelip et al. 2018). Pour les patients atteints des métastases hépatiques synchrones d'un CCR, les modalités et la séquence de traitement restent actuellement débattues et discutées au cas par cas lors de réunions de concertation pluridisciplinaire de cancérologie digestive (Phelip et al. 2018).

Le péritoine est le 2^{ème} site métastatique le plus fréquent après le foie dans les CCR. La carcinose péritonéale, classée M1c dans la classification TNM, est présente dans 5 à 15 % au diagnostic et dans 10 à 35 % à la récurrence (Franko et al. 2012). En cas de carcinose péritonéale, le seul traitement curatif possible est la réalisation d'une cytoréduction tumorale maximale (CCRS) associée à une chimiohyperthermie péritonéale (CHIP). En effet, la survie globale à 5 ans des patients traités par la chimiothérapie systémique pour carcinose péritonéale d'origine colique est inférieure à 5 % (Franko et al. 2012). Grâce à ces techniques chirurgicales comprenant CCRS et CHIP, la carcinose péritonéale d'origine colique a vu son pronostic passer de 5,2 mois de survie médiane (Sadeghi et al. 2000) à plus de 30 mois (Elias et al. 2010; Glehen et al. 2004; Esquivel et al. 2014). Plusieurs études ont montré l'intérêt de l'association CCRS et CHIP en terme de survie, mais l'étude princeps a été l'étude prospective randomisée de Verwaal et al. en 2003 (Verwaal et al. 2003).

1.2.6.3. Traitement médical

Le traitement médical des CCR consiste en l'administration d'agents de chimiothérapie anticancéreuse et/ou de thérapie ciblée sous forme orale ou intraveineuse. Il s'adresse soit aux

patients à risque élevé de récurrence (stade II à risque élevé : tumeur MSS avec un ou plusieurs des facteurs de mauvais pronostic suivants : T4, analyse de moins de 12 ganglions, présence d'embolies veineuses, péri-nerveux et/ou lymphatiques, tumeur peu différenciée, tumeur perforée et occlusion révélatrice), soit à ceux présentant des métastases ganglionnaires (stade III), soit à ceux présentant des métastases à distance (stade IV). Le traitement médical peut être administré dans plusieurs contextes. Lorsqu'aucune guérison n'est possible, une chimiothérapie peut être délivrée en monothérapie ou sous forme de polychimiothérapie associée ou non à une thérapie ciblée à titre palliatif pour améliorer la durée et la qualité de vie du patient. Lorsque le traitement est à visée curative, une chimiothérapie associée ou non à une thérapie ciblée peut être administrée avant le geste chirurgical curateur (situation néoadjuvante) ou après celui-ci (situation adjuvante), ou les deux.

Les protocoles de chimiothérapie sont nombreux et sont déterminés en concertation pluridisciplinaire de cancérologie sur la base des essais thérapeutiques publiés et selon le projet thérapeutique du patient, du stade de la maladie et de la réponse ou non aux protocoles antérieurs.

1.2.6.3.1. Anticancéreux utilisés en cancérologie digestive et notamment pour les CCR

1.2.6.3.1.1. Agents cytotoxiques

Le 5-fluorouracile (5-FU) sera volontairement plus développé que les autres molécules car il sera l'agent le plus étudié dans ce projet.

1.2.6.3.1.1.1 5-Fluorouracile et capecitabine

Le 5-FU est l'agent de base des protocoles modernes de chimiothérapie utilisés dans les CCR bien que la preuve de son activité ait été démontrée dès 1957. C'est un analogue des bases

pyrimidiques (figure 13) qui inhibe la synthèse de l'ADN en bloquant la thymidilate synthase (TS) et en créant un déséquilibre entre les nucléotides induisant des altérations de la transcription, de la réparation de l'ADN et donc une mort cellulaire.

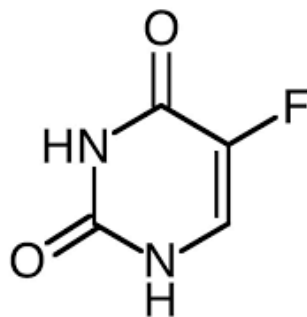


Figure 13 : Structure du 5-fluorouracile

Le 5-FU peut être administré par voie orale sous forme d'une prodrogue appelée capécitabine. Il s'agit d'une fluoropyrimidine carbamate qui est convertie en fluorouracile après absorption (figure 14). Le 5-FU et la capécitabine requièrent un passage intracellulaire avant leur transformation en métabolites actifs. Ce phénomène est médié par plusieurs familles de transporteurs dont OAT2 (organic anion transporter 2), ENT 1 et 2 (equilibrative nucleoside transporters) ou les transporteurs de la famille SLC28 (Nies et al. 2015). A l'intérieur de la cellule, un important réseau enzymatique est impliqué dans la métabolisation du 5-FU (figure 14). Les enzymes les plus importantes sont la thymidine phosphorylase (TP), l'uridine phosphorylase (UP) et l'orotate phosphoribosyl transferase (OPRT). Le métabolite actif principal, le 5-FdUMP (5-fluorodesoxyuridine monophosphate), inhibe la TS, une enzyme clé dans la formation du dTMP précurseur du dTTP (desoxy thymidine triphosphate), indispensable à la synthèse d'ADN, bloquant ainsi le cycle cellulaire en phase S (figures 14 et 15). Cette inhibition de la TS peut être potentialisée par l'administration concomitante d'acide

folinique. Un autre mécanisme d'action moins important est lié à l'incorporation dans l'ADN ou l'ARN de faux nucléotides dérivés d'autres métabolites du 5-FU (5-FUTP, 5-FdUTP) qui interfèrent avec la réplication / réparation de l'ADN ou la transcription / stabilité de l'ARN et entraînent une mort cellulaire (figures 14 et 15).

La dihydropyrimidine deshydrogenase (DPD) est l'enzyme clé responsable du catabolisme du 5-FU, le transformant en dihydrofluorouracile, première étape de son élimination (figures 14 et 15). Celui-ci est converti en forme soluble qui est ensuite éliminée dans les urines. La DPD étant le facteur limitant du catabolisme des pyrimidines (uracile et thymine), une toxicité accrue au 5-FU (Schirripa et al. 2017; Ruzzo et al. 2017) et des signes de mauvaise tolérance au 5-FU doivent conduire à la recherche d'un déficit en DPD qui concerne environ 0,3% de la population générale (Lecomte et al. 2017).

Les métabolites actifs peuvent également être efflués hors de la cellule par des transporteurs de la famille ABC (figure 15).

Les effets indésirables causés par administration de 5-FU sont principalement la mucite et le syndrome main-pied. L'effet secondaire le plus redouté est le spasme coronarien. Le 5-FU est peu émétisant.

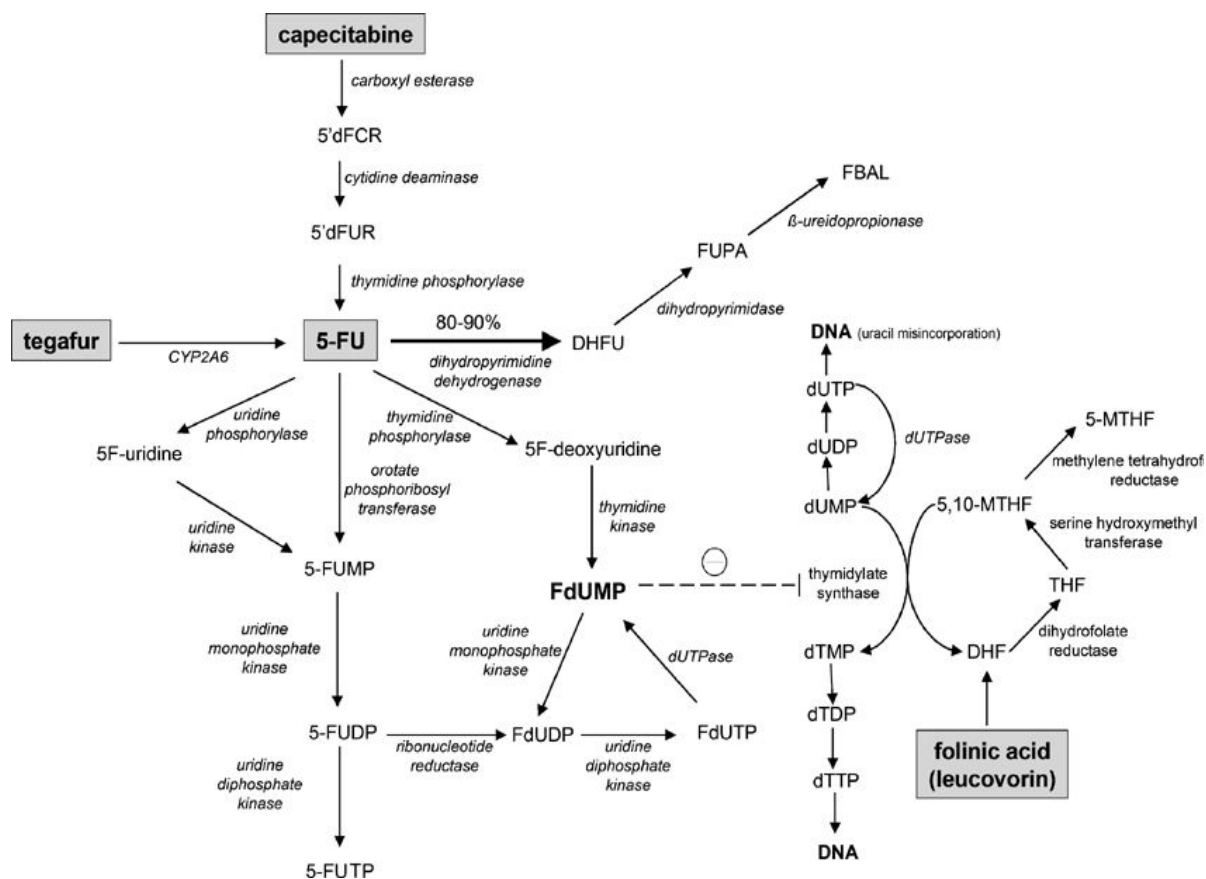


Figure 12 : Métabolisme du 5-FU

Le 5-FU est converti en 3 métabolites actifs principaux : le 5-fluorodésoxy-uridine monophosphate (5-FdUMP), le 5-fluorodésoxy-uridine triphosphate (5-FdUTP) et le 5-fluoro uridine triphosphate (5-FUTP). Le principal mécanisme d'activation du 5-FU est sa conversion en 5-fluoro-uridine monophosphate (5-FUMP), soit directement par l'orotate phosphoribosyl transferase (OPRT), soit indirectement via le 5-fluorouridine (5F-uridine) à travers l'action de l'uridine phosphorylase et de l'uridine kinase. Plusieurs réactions de phosphorylation ou déphosphorylation successives conduisent ensuite à la production des métabolites actifs. Une voie alternative d'activation est la transformation du 5-FU en 5-fluoro-2'-deoxyuridine (5F-deoxyuridine) par la thymidine phosphorylase (TP) qui est transformé par la thymidine kinase pour former l'inhibiteur de la thymidilate synthase. La dihydromyrimidine deshydrogenase (DPD) transforme le 5-FU en dihydrofluorouracile (DHFU), première étape du catabolisme du 5-FU.

(Maring et al. 2005)

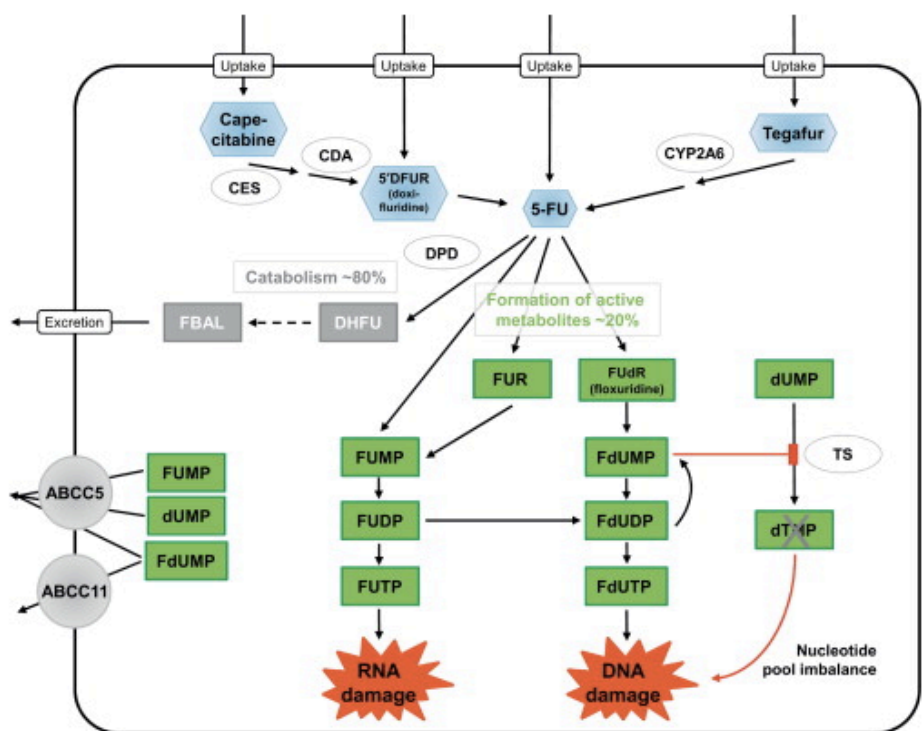


Figure 13 : Schéma du métabolisme et du mécanisme d'action des fluoropyrimidines

Dans la cellule, le 5-FU est transformé en ses métabolites actifs ou métabolisé et excrété. Les métabolites actifs peuvent être éflués en dehors de la cellule par des transporteurs transmembranaires de la famille ABC comme ABCC5 et ABCC11. Enzyme *s*: CDA, cytidine deaminase; CES, carboxyl esterase; CYP2A6, cytochrome P450 2A6; DPD, dihydropyrimidine dehydrogenase; TS, thymidylate synthase. Métabolites : 5'-DFUR, 5'-deoxy-5-fluorouridine; DHFU, dihydrofluorouracil; dUMP, deoxyuridine monophosphate; dTMP, deoxythymidine monophosphate; FBAL, fluoro- β -alanine; FdUDP, fluorodeoxyuridine diphosphate; FdUMP, fluorodeoxyuridine monophosphate; FdUTP, fluorodeoxyuridine triphosphate; 5-FU, 5-fluorouracil; FUDP, fluorouridine diphosphate; FUdR, fluorodeoxyuridine; FUMP, fluorouridine monophosphate; FUR, fluorouridine; FUTP, fluorouridine triphosphate. (Nies et al. 2015)

1.2.6.3.1.1.2 Irinotécan

L'irinotécan (CPT-11) est un dérivé semi-synthétique de la camptothécine qui empêche la religation et la dissociation de l'ADN en inhibant la topoisomérase I de manière sélective. A l'état normal, la topoisomérase 1 permet de relâcher les forces de torsion qui s'accumulent au niveau de la fourche de réplication lors de la phase de synthèse de l'ADN. L'inhibition de cette

enzyme par l'irinotécan induit des cassures simple brin de l'ADN. L'irinotécan est transformé dans le foie, le sang ou l'intestin en son métabolite actif, le SN 38, par la carboxylesterase. Des membres de la famille des uridine diphosphate glucuronosyl-transferases (UGTs) le métabolisent par glucuronidation dans le foie. Les principales toxicités sont la neutropénie, la diarrhée qui peut être sévère et l'asthénie. Le schéma associant 5-FU, acide folinique et irinotécan a pour acronyme FOLFIRI.

1.2.6.3.1.1.3 Oxaliplatine

L'oxaliplatine est un sel de platine dont l'action alkylante conduit à la formation de ponts intra-brins et inter-brins entre 2 guanines adjacentes, inhibant la synthèse et la réplication de l'ADN. L'atome de platine est complexé avec un 1,2-diaminocyclohexane et un groupe oxalate. L'oxaliplatine est un énantiomère unique, le *cis*-[*trans*-1-1,2-diaminocyclohexane oxalatoplatinum] (figure 16). Administré par voie systémique, la principale toxicité aiguë est neurologique. Il s'agit de paresthésies transitoires, de dysesthésies ou d'hypoesthésies. Ces manifestations neurosensorielles aiguës débutent dans les heures suivant l'administration, notamment lors d'une exposition au froid. Le schéma associant 5-FU, acide folinique et oxaliplatine a pour acronyme FOLFOX.

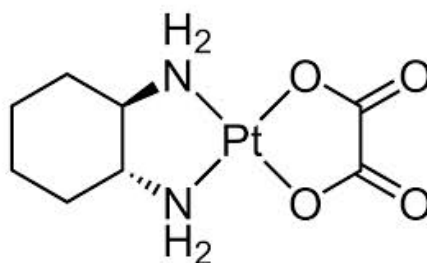


Figure 14 : Structure de l'oxaliplatine

L'ion Pt^{2+} est complexé avec un dianion oxalate d'une part et une molécule de 1,2-diaminocyclohexane d'autre part.

1.2.6.3.1.1.4 Lonsurf

Le Lonsurf associe 2 molécules : la trifluridine, un analogue nucléosidique de la thymine et le tipiracil, un inhibiteur de la thymidilate phosphorylase qui freine la dégradation de la trifluridine. Il est indiqué en dernière ligne de traitement de CCR métastatique.

1.2.6.3.1.2. Autres cytotoxiques utilisés dans les cancers digestifs

Les protocoles de chimiothérapie utilisés pour les autres cancers digestifs comportent fréquemment du 5-FU, de l'oxaliplatine et de l'irinotécan comme pour les CCR, mais également des molécules différentes.

Les taxanes sont des poisons du fuseau mitotique qui induisent une mort cellulaire en bloquant la mitose par fixation aux microtubules et inhibition de leur polymérisation. Cette classe de médicament est utilisée pour les cancers gastriques. Les anthracyclines telles que l'épirubicine agissent comme intercalants de l'ADN et bloquent la phase de réplication en se fixant entre 2 brins d'ADN. Cette molécule est couramment utilisée dans les cancers gastriques.

D'autres sels de platine comme le cisplatine sont aussi utilisés, notamment pour les cancers de l'œsophage et du canal anal. Sa néphrotoxicité est sa principale toxicité limitante. La mitomycine C, qui a un effet alkylant et forme des adduits avec l'ADN, est un antibiotique principalement utilisé pour les cancers du canal anal.

Enfin, la gemcitabine est un antimétabolite pyrimidique utilisé pour les cancers du pancréas et des voies biliaires.

1.2.6.3.1.3. Thérapies ciblées

Les thérapies ciblées dans les CCR ne sont utilisées qu'en situation métastatique et systématiquement associée à une mono ou polychimiothérapie.

1.2.6.3.1.3.1 Bévacicumab

Le bévacizumab est un anticorps monoclonal dirigé contre le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (Vascular Endothelial Growth Factor ou VEGF). Il inhibe l'angiogenèse, ralentissant ainsi la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins.

1.2.6.3.1.3.2 Cétuximab

Le cétuximab est un anticorps monoclonal murin humanisé ciblant et bloquant le récepteur au facteur de croissance épidermique (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) surexprimé à la surface de certaines cellules tumorales. L'utilisation et l'efficacité du cétuximab sont conditionnées par l'existence ou non de mutation dans la voie de signalisation intracellulaire RAS et en particulier du gène *KRAS*. Cette mutation doit être recherchée de manière systématique si l'utilisation du cétuximab est potentiellement indiquée: en effet une mutation de *KRAS* confère une résistance aux biothérapies de type anti-EGFR (Phelip et al. 2018).

1.2.6.3.1.3.3 Régorafénib

Le régorafénib est un inhibiteur des protéines tyrosines kinases impliquées dans l'angiogenèse tumorale (VEGFR1, 2, 3, TIE2), l'oncogenèse (KIT, RET, RAF-1, BRAF, BRAF^{V600E}) et le micro-environnement tumoral (PDGFR, FGFR). Il est indiqué dans le traitement des patients adultes atteints d'un CCR métastatique, en échec de chimiothérapie à base de fluoropyrimidine, en échec d'une autre thérapie ciblée ou en cas de contre-indication à ces traitements. Les effets secondaires les plus fréquents sont des réactions cutanées, la fatigue, l'hypertension artérielle, la diarrhée et l'asthénie.

1.2.6.3.1.3.4 Thérapies ciblées utilisées dans d'autres cancers digestifs

Le trastuzumab est un anticorps monoclonal dirigé contre HER-2 qui bloque la partie extracellulaire de ce récepteur à activité tyrosine kinase. Il est utilisé pour traiter les cancers gastriques et de la jonction oeso-gastrique métastatiques HER2 positifs.

1.2.7. Survie globale pour les CCR et les autres cancers digestifs.

De manière générale, quel que soit le stade, la survie à 5 ans des patients atteints de CCR est d'environ 60% (Lecomte et al. 2017). La survie des patients dépend du stade de la maladie. Plus le stade est élevé, moins bon est le pronostic. Malgré l'utilisation des protocoles de chimiothérapie intraveineuse actuels, la survie globale à 5 ans des patients atteints de CCR de stade IV n'excède pas 10% (figure 17).

	Survie à 5 ans
Stade (AJCC 6 ^{ème} édition) :	
I = T1 or T2, N0	93,2%
IIa = T3, N0	84,7%
IIb = T4, N0	72,2%
IIIa = T1 or T2, N1	83,4%
IIIb = T3 or T4, N1	64,1%
IIIc = Tx, N2	44,3%
IV = Tx, Nx, M1	8,1%

Figure 15 : Survie à 5 ans des CCR par stade

Selon la classification AJCC 6^{ème} édition

(Morère, Mornex, and Soulières 2011)

Les CCR restent cependant un cancer de meilleur pronostic que les autres cancers du tube digestif. D'après l'étude EUROCORE-5, la survie globale à 5 ans en France des cancers de l'œsophage était de 13,9 %. (Anderson et al. 2015). Dans cette même étude, la survie à 5 ans des cancers de l'estomac était de 26,3% et celle des cancers de l'intestin grêle de 50,8%. Dans ces cancers également, le pronostic est lié au stade de la maladie mais aussi aux types histologiques, différemment repartis que dans les CCR. Le pronostic était encore plus péjoratif pour les cancers primitifs du foie, des voies biliaires et du pancréas avec une survie à 5 ans respectivement de 13,1 %, 17,4% et 7,4% (Lepage et al. 2015).

1.3. Phénomènes de résistance à la chimiothérapie dans les cancers de l'appareil digestif

La résistance à la chimiothérapie anticancéreuse est un phénomène complexe et multifactoriel. En se basant sur la réponse tumorale de la thérapie initiale, la chimiorésistance peut être classée en 2 catégories : la résistance innée ou acquise. La résistance innée survient avant tout traitement et se manifeste cliniquement par une absence de réponse à la chimiothérapie sous forme de progression tumorale. La résistance acquise correspond à une résistance secondaire à l'exposition prolongée des cellules tumorales aux agents anticancéreux. Cliniquement, ce phénomène se traduit par une récurrence locale ou métastatique après un traitement initial efficace.

De multiples mécanismes de chimiorésistance anticancéreuse ont été décrits, pouvant impliquer l'altération du transport ou du métabolisme de l'agent anticancéreux, la modification de ses cibles ou du microenvironnement tumoral, l'activation de voies de signalisation intracellulaires alternatives, l'augmentation des capacités de réparation de l'ADN, de la résistance à l'apoptose et de l'autophagie.

1.3.1. Diminution de l'entrée de molécules anticancéreuses dans la cellule tumorale

Le mécanisme d'entrée de l'agent de chimiothérapie dans la cellule cancéreuse est généralement un phénomène de diffusion passive. Cependant, certains transporteurs régulent l'influx de composés dérivés du platine (en particulier le cisplatine) comme le transporteur du cuivre (CTR) ou les transporteurs de cations organiques (OCTs). Ainsi, OCT1, OCT2, CTR1 et CTR2 ont été étudiés au niveau préclinique comme potentielles cibles de modulation de l'entrée de molécules de chimiothérapie dans la cellule cancéreuse. Zhang et al. ont montré que la concentration intracellulaire d'oxaliplatine était significativement augmentée dans un modèle de cellules HEK transfectées avec un plasmide contenant OCT 1 ou 2 par rapport aux conditions contrôles et que l'utilisation d'un inhibiteur de OCT1 dans différentes lignées cellulaires de CCR diminuait la sensibilité de ces cellules à l'oxaliplatine (S. Zhang et al. 2006). De même, l'inactivation génétique de CTR1 entraîne une diminution de l'accumulation de cisplatine dans la cellule cancéreuse et ainsi une résistance au traitement *in vivo* (Howell et al. 2010).

1.3.2. Dégradation ou inactivation intracellulaires des molécules de chimiothérapie

Étant donné l'important réseau enzymatique associé au métabolisme du 5-FU (figure 14), il est évident que la cellule tumorale peut mettre en place des systèmes d'activation ou d'inhibition enzymatiques. Ainsi, la surexpression de la DPD induisant une augmentation de la dégradation des métabolites actifs du 5-FU et de la capecitabine (Salonga et al. 2000) est un mécanisme de chimiorésistance au 5-FU. De même, une forte expression de l'OPRT corrèle avec une forte sensibilité des tumeurs au 5-FU et à la capecitabine (Muhale et al. 2011). A l'inverse, une sous-expression de la TP corrèle avec une réponse accrue au 5-FU (Salonga et al. 2000).

Il en est de même pour l'irinotécan : l'augmentation de l'expression des UGTs induisant une augmentation de la dégradation du SN-38 est un phénomène de résistance à l'irinotécan dans les CCR. L'isoforme UGT1A a été beaucoup étudiée : son polymorphisme est impliqué dans

la toxicité à l'irinotécan et certains de ses variants seraient prédictifs de la réponse à une chimiothérapie par FOLFIRI chez des patients atteints de CCR (Panczyk 2014). La diminution de l'expression de la carboxylesterase a également été décrite comme mécanisme de résistance à l'irinotécan (Boyer et al. 2004).

Le glutathion est un antioxydant intervenant dans la détoxification cellulaire pour prévenir les dommages à l'ADN et à l'ARN. Un mécanisme de résistance aux dérivés du platine est basé sur leur inactivation et efflux hors de la cellule sous forme de dérivés glucorono-conjugués par la famille des glutathion-s-transférases (notamment l'isoenzyme GSTP1, fortement exprimée dans le côlon). Des études suggèrent qu'un certain polymorphisme de GSTP1 pourrait induire une toxicité augmentée après FOLFOX chez des patients atteints de CCR métastatiques (Panczyk 2014).

1.3.3. Altération des cibles moléculaires des agents de chimiothérapie

Les altérations des cibles moléculaires peuvent être quantitatives. Par exemple, l'augmentation de l'expression de la TS (enzyme cible principale du FdUMP, figure 14) est un mécanisme reconnu de résistance au 5-FU. Plusieurs méta-analyses ont montré une relation inverse entre l'expression du gène *TYMS* qui code la TS et la survie ou le taux de réponse de patients traités avec des fluoropyrimidines (Qiu et al. 2008). Au niveau moléculaire, la modification d'expression de la TS s'effectue via une augmentation du nombre de copies du gène *TYMS*. A l'inverse, une diminution de l'expression du gène *TOP1* codant pour la topoisomérase 1 (cible du métabolite actif de l'irinotécan SN-38) est impliquée dans des mécanismes de résistance intrinsèque à l'irinotécan chez des patients atteints de CCR de stade III (Smith et al. 2013).

Les modifications de la cible peuvent aussi être qualitatives. Par exemple, des mutations ponctuelles du gène *TOP1*, induisant des changements de conformation du site de fixation du

SN-38 sur la topoisomérase 1, ont été impliqués dans la résistance des patients et d'une lignée cancéreuse colique à l'irinotécan (Jensen et al. 2016).

1.3.4. Voies de réparation de l'ADN

Plusieurs voies de réparation de lésions de l'ADN coexistent : les voies de réparation « Base Excision Repair » (BER), « Nucleotide Excision Repair » (NER) et « Mismatch Repair » (MMR) interviennent dans la réparation des lésions simple brin, alors que les voies « Homologous Recombination » (HR) et « Non Homologous End Joining » (NHEJ) interviennent dans les lésions double brin de l'ADN. Toutefois, il semble que tous ces mécanismes de réparation soient activés lors de la réponse cellulaire aux 3 molécules de chimiothérapie utilisées pour traiter les CCR, sans spécificité par rapport au type de dommages causés (5-FU : dommages simple brin et cassures double brins ; oxaliplatine/irinotécan : cassures doubles brins).

L'ensemble des voies de réparation de l'ADN est susceptible d'altérations à l'origine d'un mécanisme de résistance à la chimiothérapie. Un des mécanismes particulièrement bien étudié est celui des protéines ERCC1 et 2. Ces protéines sont les principales effectrices du système de réparation NER. Elles reconnaissent les adduits platine-ADN et coordonnent les processus d'excision de bases. Baba et al. ont montré que le niveau d'expression de ERCC1 était augmenté dans des échantillons de tumeurs colorectales résistantes à l'oxaliplatine (H. Baba et al. 2012). De même, un niveau élevé d'expression de ERCC1 a été associé à une mauvaise réponse des patients atteints de CCR métastatique au FOLFOX (Shirota et al. 2001). Le système de réparation MMR semble également impliqué dans des phénomènes de résistance au 5-FU puisque Meyers et al. ont montré une résistance accrue au 5-FU de cellules cancéreuses coliques déficientes pour le MMR ou mutées au niveau du gène *MLH1* (Meyers et al. 2001).

1.3.5. Efflux actif de l'agent de chimiothérapie en dehors de la cellule cancéreuse

1.3.5.1. Superfamille des ABC

L'efflux de molécules de chimiothérapie est un mécanisme de résistance par lequel la cellule cancéreuse diminue sa concentration intracellulaire en agent de chimiothérapie ou en l'un de ses métabolites. Ce mécanisme est majoritairement médié par des transporteurs transmembranaires de la famille des transporteurs ATP-binding cassette (ABC). Cette superfamille est la plus importante famille de transporteurs présente dans tous les organismes (eucaryotes ou procaryotes). Chez l'Homme, il existe 49 gènes de la famille ABC classés en 7 sous-familles différentes (nommées de A à G) selon leur séquence en acides aminés et leur homologie de structure. La caractéristique structurale commune à tous les transporteurs de la famille ABC est la présence de 2 types de domaines : Nucleotide Binding Domain (NBD) et Transmembrane Domain (TMD) (M. Dean, Rzhetsky, and Allikmets 2001). Le domaine NBD hydrolyse l'ATP et l'énergie résultante est utilisée par le domaine TMD pour transloquer la substance à transporter à travers la membrane cellulaire (figure 18).

Les transporteurs de la famille ABC sont présents à l'état physiologique et permettent le transport de sucres, acides aminés, ions, peptides, protéines, cholestérol, métabolites, mais aussi de toxines endogènes ou d'agents xénobiotiques, à travers la membrane cellulaire. Les techniques d'identification des substrats des transporteurs de la famille ABC ont grandement évolué à travers le temps. Les manipulations de transport vésiculaire ont désormais laissé leur place à des études qui échantillonnent directement le gradient produit par l'interaction du composé avec le transporteur testé à travers une membrane biologique (Jani and Krajcsi 2014). Les transporteurs de la famille ABC jouent ainsi un rôle pivot dans l'absorption, la distribution et l'excrétion des médicaments, y compris les drogues anticancéreuses, affectant par définition leur efficacité et leur sécurité (Hu et al. 2016). Ils sont donc exprimés dans de nombreux tissus impliqués dans le métabolisme de médicaments comme l'intestin, le foie, le rein, la barrière

hémato-encéphalique, les plexus choroïdes, le testicule et le placenta, et ont un rôle important dans les phénomènes de barrière biologique. De manière générale, les transporteurs de la famille ABC ont un flux unidirectionnel (M. Dean, Rzhetsky, and Allikmets 2001). La cellule tumorale utilise cette fonction pour permettre l'efflux des molécules de chimiothérapie (El-Awady et al. 2016). Environ 50% des cancers humains expriment ABCB1 à un niveau suffisamment élevé pour être capable d'induire un mécanisme de résistance à la chimiothérapie. (Hu et al. 2016).

1.3.5.2. ABC et drogues anticancéreuses dans les cancers de l'appareil digestif

A ce jour, toute histologie confondue, 12 transporteurs de la famille ABC ont été impliqués dans l'efflux de molécules de chimiothérapie, mais les 3 principaux étudiés sont ABCB1 (MDR1, P-gp), ABCC1 (MRP1) et ABCG2 (BCRP) (Michael Dean 2009) (figure 18). La liste non exhaustive des agents cytotoxiques efflués selon le transporteur ABC fait l'objet de la figure 19.

1.3.5.2.1. Transporteurs de la famille ABC dans les CCR

ABCB1 : Les données les plus conséquentes concernent ABCB1, largement étudié et caractérisé. Le gène *ABCB1* est situé sur le chromosome 7 et code pour une protéine de 170 kDa comprenant 12 TMD et 1 NBD. Plusieurs études ont décrit une relation entre le polymorphisme du gène *ABCB1* et le risque de développer un CCR, mais aucune preuve formelle sur cette susceptibilité n'a pu être établie (He et al. 2013). En revanche, la plupart des tumeurs colorectales expriment ABCB1 à un niveau élevé dès le diagnostic, ce qui leur confère potentiellement une résistance innée à la plupart des molécules de chimiothérapie. Cependant, parmi les agents de chimiothérapie utilisés dans les CCR, seules les camptothécines (e.g. irinotécan) seraient effluées par ABCB1 (Hu et al. 2016).

Les mécanismes moléculaires potentiellement impliqués dans la surexpression d'ABCB1 dans les CCR sont multiples. D'une part, l'expression d'ABCB1 peut être induite par les molécules de chimiothérapie elles-mêmes. D'autre part, il a été montré dans plusieurs lignées cellulaires de CCR que l'expression d'ABCB1 pouvait être régulée par des voies de signalisation intracellulaires comme WNT/ β -caténine, HIF-1 α ou NF- κ B (Hu et al. 2016; Stein et al. 2012; Chikazawa et al. 2010). Une publication basée sur un modèle in vitro de colonosphères suggère que ce sont les cellules différenciées situées à leur périphérie de la sphère qui expriment MDR1 et protègent les colonosphères vis à vis de l'irinotécan (Emmink et al. 2011).

ABCC1 : ABCC1 permet également l'efflux de nombreuses molécules de chimiothérapie. La seule utilisée pour traiter les CCR est l'irinotécan. Son rôle dans les CCR reste débattu puisque plusieurs études rapportent des données contradictoires entre le niveau d'expression d'ABCC1 et la résistance à la chimiothérapie dans les CCR (Cao et al. 2017). Tout comme ABCB1, l'induction d'ABCC1 pourrait être induite par l'hypoxie, mais aussi des cytokines comme l'interleukine-1 β (Hu et al. 2016). En outre, l'expression d'ABCC1 était augmentée au cours de l'acquisition du phénotype « Multi Drug Resistance » (MDR) de la lignée HT-29 (Hu et al. 2016). De même, Cao et al. ont récemment montré la surexpression d'ABCC1 dans les lignées cellulaires de CCR Colo205 et HCT-8 rendues résistantes au 5-FU et à l'oxaliplatine. Ces travaux ont montré que ABCC1 jouait un rôle important dans le phénotype MDR dans les CCR, notamment à travers l'inhibition de l'apoptose (Cao et al. 2017).

ABCG2 : Les substrats ABCG2 sont partiellement communs à ABCB1 et ABCC1. Cependant, en plus de ceux décrits dans la figure 19, plusieurs inhibiteurs de tyrosine kinase comme l'imatinib ou le gefitinib et le 5-FU (Westover and Li 2015) peuvent également être efflués par ABCG2. De plus, il a récemment été montré dans un modèle in vitro de cellules LoVo rendues

résistantes à l'oxaliplatine que cette résistance à l'oxaliplatine était médiée par l'activation d'ABCG2 (Hsu et al. 2017). Le rôle d'ABCG2 dans la résistance à la chimiothérapie de protocoles à base d'irinotécan reste encore incertain.

Peu d'études se sont intéressées au rôle d'ABCG2 dans les CCR. Les données disponibles suggèrent que l'expression d'ABCG2 par la tumeur n'influe pas le pronostic des patients et les deux plus grandes études évaluant l'expression d'ABCG2 dans les CCR ont généré des résultats contradictoires (Nielsen et al. 2017).

1.3.5.2.2. Transporteurs de la famille ABC dans les autres cancers digestifs

Très peu de données existent concernant les transporteurs de la famille ABC dans les autres types de cancers digestifs et les seules disponibles semblent être contradictoires.

Une surexpression d'ABCB1 peut être détectée dans les cancers de l'estomac, mais celle-ci ne semble ni associée au stade tumoral, ni au pronostic des patients traités par chimiothérapie systémique (Wallner et al. 1993; Choi et al. 2002; Gürel et al. 1999). A l'inverse, d'autres études rapportent une faible expression d'ABCB1 dans des lignées cellulaires de cancer gastrique comme EPG85-257, rendue résistante à la mitoxantrone, ou des échantillons tissulaires de cancers gastriques (Tomonaga et al. 1996; Kellner et al. 1997). Dans une étude portant sur 50 échantillons de cancers gastriques, ABCB1 n'était détectée que dans 10% des patients et la co-expression d'ABCB1 et ABCC1 était rare (Fan et al. 2000). Cependant, dans une autre étude plus récente analysant 69 cancers de la jonction oeso-gastrique, une surexpression d'ABCB1 était détectée et corrélée avec la présence de métastases et la stratification clinicopathologique (Shi et al. 2008). Le caractère contradictoire de ces résultats pourrait être lié à l'hétérogénéité des populations étudiées (asiatiques versus caucasiennes), des types histopathologiques tumoraux (e.g. linéaire versus adénocarcinome bien différencié), des modèles de lignées cellulaires et des agents chimiothérapeutiques utilisés (D. Zhang and Fan 2010).

Le rôle d'ABCC1 a également été étudié dans les cancers gastriques. Une forte expression d'ABCC1 a été décrite dans les carcinomes gastriques, notamment localement avancés, mais elle ne semble pas liée à la survie des patients (D. Zhang and Fan 2010; Fan et al. 2000).

ABCG2 est également fréquemment exprimé dans les autres cancers du tractus digestif, mais sa contribution dans les phénomènes de chimiorésistance doit encore être démontrée (Robey et al. 2009).

En ce qui concerne les cancers de l'œsophage, les études sont encore plus limitées. Le peu de données disponibles suggèrent que certains variants d'ABCB1 seraient, entre autres, des marqueurs de survie globale et sans récurrence, notamment chez des patients traités avec du cisplatine (Findlay, Middleton, and Tomlinson 2015; Wu et al. 2006; L. Wang, Yang, and Zheng 2012). Des analogues des transporteurs ABC, tels que ATP7A et ATP7B, impliqués dans le transport du cuivre, sont également associés à des phénomènes de résistance vis à vis du cisplatine dans ces cancers (Safaei 2006). Enfin, la présence d'ABCG2 dans les carcinomes épidermoïdes œsophagiens a également été corrélée à l'envahissement ganglionnaire et à un moins bon pronostic des patients (Islam et al. 2015).

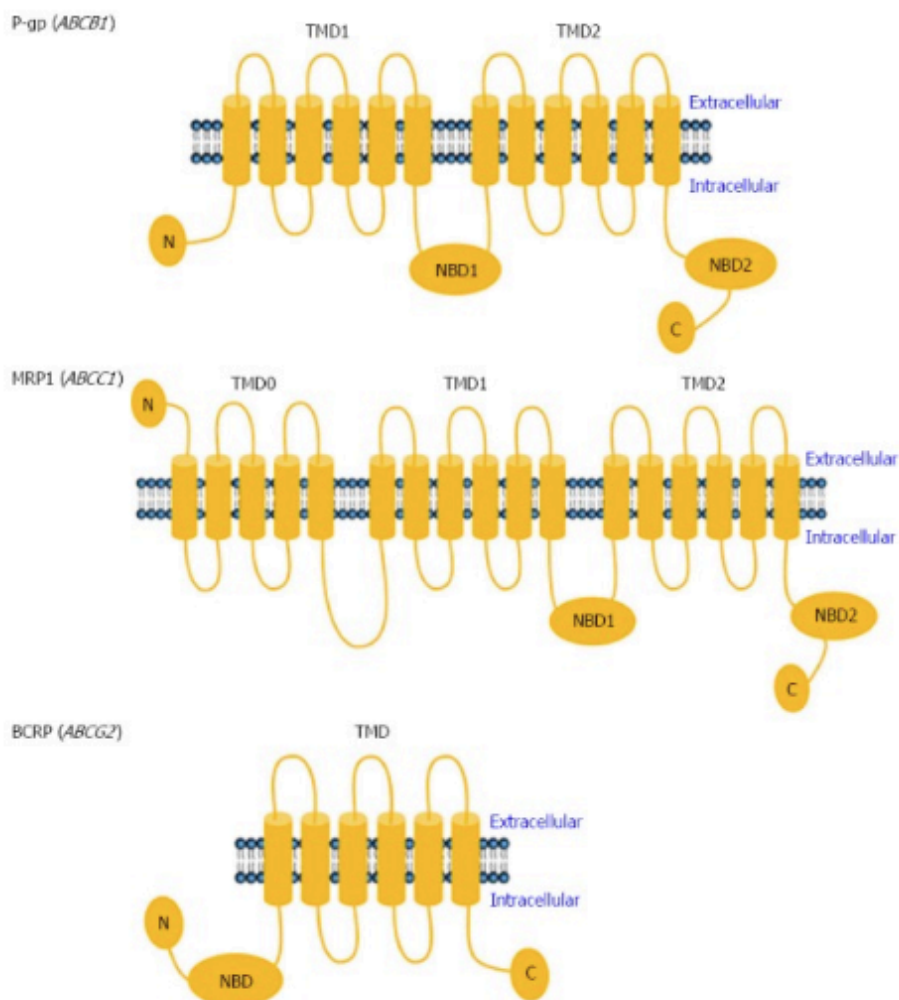


Figure 16 : Représentation schématique de la structure des 3 principaux transporteurs de la famille ABC : ABCB1 (P-gp), ABCC1 (MRP1) et ABCG2 (BCRP)

La caractéristique structurale commune est la succession de 2 types de domaines : NBD (nucleotide-binding domain) et TMD (transmembrane domain). BCRP : Breast cancer resistance protein; MRP1: Multidrug resistance-associated protein 1; P-gp : P-glycoprotein. (Hu et al. 2016)

Gene	Protein/alias	Chemotherapeutic drugs effluxed by transporter	Other drugs and substrates
<i>ABCA2</i>	ABCA2	Estramustine	
<i>ABCB1</i>	PGP/MDR1	Colchicine, doxorubicin, etoposide, vinblastine, paclitaxel	Digoxin, saquinivir,
<i>ABCC1</i>	MRP1	Doxorubicin, daunorubicin, vincristine, etoposide, colchicine, camptothecins, methotrexate	Rhodamine
<i>ABCC2</i>	MRP2	Vinblastine, cisplatin, doxorubicin, methotrexate	Sulfinpyrazone
<i>ABCC3</i>	MRP3	Methotrexate, etoposide	
<i>ABCC4</i>	MRP4	6-MP and 6-TG and metabolites, methotrexate	PMEA, cAMP, cGMP
<i>ABCC5</i>	MRP5	6-MP and 6-TG and metabolites	PMEA, cAMP, cGMP
<i>ABCC6</i>	MRP6	Etoposide	
<i>ABCC11</i>	MRP8	5-fluorouracil	PMEA, cAMP, cGMP
<i>ABCG2</i>	MXR/BCRP	Mitoxantrone, topotecan, doxorubicin, daunorubicin, CPT-11, imatinib, methotrexate	Pheophorbide A, Hoechst 33342, rhodamine

6-MP 6-mercaptopurine, *6-TG* 6-thioguanine, *PMEA* 9-[2-(phosphonomethoxy)ethyl]adenine, *cAMP* cyclic adenosine monophosphate, *cGMP* cyclic guanine monophosphate, *CPT-11* irinotecan

Figure 17 : Transporteurs impliqués dans la résistance à la chimiothérapie anticancéreuse

Les drogues classiquement utilisées pour le CCR sont principalement effluées par ABCC1 et ABCC11. (Michael Dean 2009)

1.3.5.2.3. Inhibiteurs d'ABC et essais cliniques

Comme les transporteurs de la famille ABC constituent des facteurs de résistance à la chimiothérapie anticancéreuse, des essais cliniques incluant des inhibiteurs de ces molécules ont été réalisés. Ainsi, plusieurs études ont testé l'efficacité du sorafenib (un inhibiteur de tyrosines kinase inhibant également ABCG2) en combinaison avec une chimiothérapie par FOLFIRI chez des patients atteints de CCR métastatique. Les résultats sont pour l'instant décevants, mais de nouvelles études de phase II sont en cours et les résultats ne sont pas encore publiés (Nielsen et al. 2017).

L'inhibition du transporteur ABCB1 a également été testée dans de nombreux cancers comme les leucémies myéloïdes aiguës ou le cancer du sein. Même si 3 générations d'inhibiteurs d'ABCB1 ont vu le jour, il existe une grande variabilité de l'efficacité de ces composés sur le taux de réponse tumorale due à l'hétérogénéité de l'expression d'ABCB1 dans les tumeurs et à la co-expression d'autres molécules d'efflux. Ainsi, les différents essais cliniques évaluant les effets des inhibiteurs d'ABCB1 n'ont montré que des résultats limités, voire nuls en terme de bénéfice thérapeutique (Binkhathlan and Lavasanifar 2013).

Cependant, cibler les transporteurs de la famille ABC semble être une stratégie thérapeutique potentielle rationnelle. De plus, le niveau d'expression de ces molécules par la tumeur pourrait être un marqueur de réponse à la chimiothérapie et leur profil d'expression pourrait contribuer à orienter le choix des cliniciens (thérapie personnalisée).

1.3.5.2.4. Cas particulier de ABCC11

ABCC11 (ou MRP8) est un transporteur particulièrement intéressant dans le contexte des CCR puisqu'il a été montré qu'il effluait la forme active du 5-FU. Chez l'homme, le gène *MRP8* contient 29 exons et code pour une protéine de 1382 acides aminés. La protéine est composée de 2 NBDs et 12 TMDs et a ainsi une structure similaire à celle d'ABCC4 et ABCC5, même si ceux-ci effluent des molécules différentes (figure 20). Chez la souris, le gène *ABCC11* n'existe pas. ABCC11 est exprimé dans tout l'organisme, mais particulièrement dans le foie, le côlon, le rein, le cerveau, le placenta, les seins, les testicules et ovaires. Son expression dans le reste du système digestif n'a pas été étudiée (Sodani et al. 2012). A l'état physiologique, ABCC11 transporte des hormones (dihydroepiandrosterone 3-sulfate (DHEAS), estrone-3-sulfate (E_1S)), des folates, des analogues nucléotidiques (cAMP, cGMP), des composés glutathion-conjugués (LTC₄, DNP-SG) et des acides biliaires (glycocholate et taurocholate). ABCC11 participe également à la résistance au PMEA (9'-(2-phosphonylmethoxyethyl)adénine) utilisé dans le traitement de l'hépatite B, au méthotrexate utilisé dans diverses pathologies inflammatoires et au 2'-3'dideoxycytidine, utilisé dans le traitement du VIH (Kruh et al. 2007). Il a également récemment été montré qu'ABCC11 avait pour substrat le Tenofovir, une drogue administrée en cas d'infection par le VIH ou le virus l'hépatite B (Tun-Yhong et al. 2017).

ABCC11 transporte la forme active du 5-FU, le FdUMP (Y. Guo et al. 2003). Dans un modèle cellulaire in vitro de vésicules membranaires dérivées de cellules épithéliales rénales porcines (LLC-PK1) transfectées avec un vecteur d'expression d'ABCC11, Guo et al. ont montré que

les vésicules étaient capables de catalyser le transport du FdUMP marqué. Les cellules transfectées étaient également plus résistantes à un traitement par 5-FU (Y. Guo et al. 2003). Dans un modèle *in silico*, Honorat et al. ont montré des sites potentiels de liaison entre ABCC11 et le FdUMP (Honorat et al. 2013). Dans cette étude, les auteurs proposent un modèle où le FdUMP se fixe sur la partie intracellulaire de ABCC11, ouverte vers le cytoplasme. Les changements de conformation de la protéine permettraient le passage du substrat qui se fixerait sur le second site de fixation en regard de la partie extracellulaire d'ABCC11. Enfin, la protéine s'ouvrirait au niveau de sa partie extracellulaire permettant la libération du substrat (figure 21) (Honorat et al. 2013; Szöllösi et al. 2018).

A ce jour, ABCC11 n'a jamais été associé à la résistance à la chimiothérapie dans le CCR. Cependant, ABCC11 semble exprimé dans la lignée de cancer colique CX-1 (Yabuuchi et al. 2001). De plus, le rôle direct d'ABCC11 dans la résistance au 5-FU a été montré dans la lignée PC6/23-26 de cancer pulmonaire à petites cellules et dans la lignée MCF7/E de cancer du sein par 2 équipes japonaises : dans les deux cas, l'inhibition d'ABCC11 par des siRNA restaurait la sensibilité de ces lignées au 5-FU (Oba, Izumi, and Ito 2016; Oguri et al. 2007). De même, l'équipe lyonnaise de Honorat et al. a montré dans des cancers du sein exprimant des récepteurs aux estrogènes alpha et dans la sous-catégorie de tumeurs « récepteurs aux estrogènes/récepteurs progestatifs » que l'expression d'ABCC11 contribuait à la chimio-résistance vis à vis de protocoles incluant le 5-FU (Honorat et al. 2008, 2011). Enfin, dans deux études de toxicité au 5-FU sur 672 et 514 patients atteints de différents types de cancers et traités par 5-FU, les auteurs ont montré que les variants SNP rs7194667 et c.1637C>T d'ABCC11 étaient significativement associés à un sur-risque de leucopénie, qui pourrait être secondaire à un efflux réduit du 5-FU (Magdy et al. 2013; Hamzic et al. 2017).

L'ensemble de ces informations suggère que ABCC11 pourrait jouer un rôle important dans la résistance à la chimiothérapie dans le CCR puisqu'il efflue l'agent de base de tous les protocoles de chimiothérapie intraveineuse.

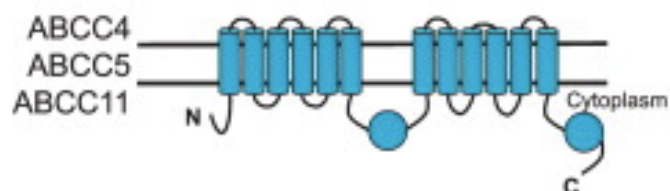


Figure 18 : Structure des transporteurs ABCC4, ABCC5 et ABCC11

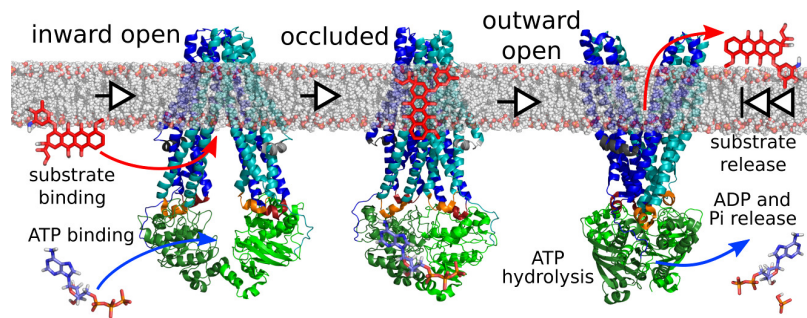
Les 12 TMD sont représentés par des barres et les 2 NBD par des ronds.

(Nies et al. 2015)

Tableau 1. Résumé des mécanismes de chimiorésistance impliqués dans les CCR selon l'agent de chimiothérapie

Agent	Cible	Mécanisme de résistance	Référence
5-FU	Thymidylate synthase	Augmentation enzyme cible corrèle avec réponse réduite au 5-FU	Qiu et al. 2008
	Ororate phosphoribosyl transferase	Forte expression corrèle avec sensibilité élevée au 5-FU	Muhale et al. 2011
	Dihydropyrimidine deshydrogenase	Surexpression induit une dégradation accrue des métabolites actifs	Salonga et al. 2000
	Thymidine phosphorylase	Sous expression corrèle avec réponse accrue au 5-FU	Salonga et al. 2000
	MLH1 (système de réparation MMR)	Déficiencia /mutation augmente résistance au 5-FU	Meyers et al. 2001
Irinotécan	Topoisomérase 1	Diminution nombre de copies de TOP1	Smith et al. 2013
	Uridine diphosphate glucuronosyl-transferases (UGTs)	Augmentation expression induit dégradation accrue du SN-38	Panczyck et al. 2014
	Carboxylesterase	Réduction expression	Boyer et al. 2004
	Famille des ABC	Augmentation efflux actif	Nielsen et al. 2017
Oxaliplatine	OCT1	Inhibition diminue la sensibilité cellulaire à l'oxaliplatine	Zhang et al. 2006
	Famille des ABC : ABCG2	Augmentation efflux actif	Hsu et al 2017
	Système de réparation NER (ERCC1)	Augmentation expression améliore réparation NER	Baba et al. 2012

A



B

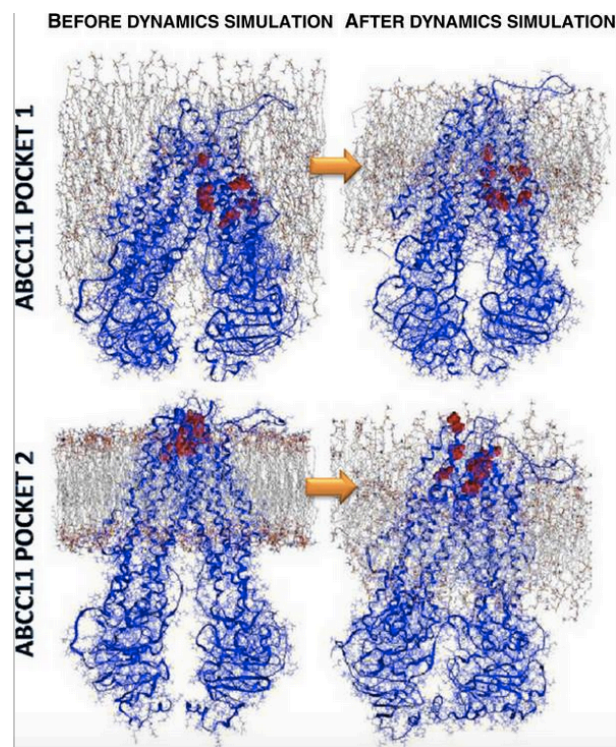


Figure 19 : Mode d'action des transporteurs ABC

(A) Modélisation du mode d'action des transporteurs de la famille ABC,
(Szöllósi et al. 2018)

(B) Même modélisation appliquée au transporteur ABCC11.
(Honorat et al. 2013)

1.3.6. Altération des mécanismes de l'apoptose

L'augmentation de la résistance à l'apoptose est un des mécanismes mis en œuvre par les cellules tumorales pour résister à la chimiothérapie anticancéreuse. L'apoptose est finement régulée par 2 grandes familles de protéines : les protéines pro-apoptotiques telles que Bax et Bad, et les protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2 et Bcl-XL. La surexpression de gènes codant pour des protéines anti-apoptotiques associée à la sous-expression de gènes codant pour des protéines pro-apoptotiques a été mise en évidence dans les lignées de cellules cancéreuses coliques résistantes au 5-FU ou à l'oxaliplatine (Konishi et al. 2006; Manoochehri et al. 2014; Gourdier et al. 2002). A l'échelon clinique, il semblerait qu'un niveau d'expression élevé de Bcl-2 serait associé à une meilleure survie sans récurrence et une meilleure survie globale dans les CCR (Huang et al. 2017).

1.3.7. Altération des points de contrôle du cycle cellulaire

Les points de contrôle du cycle cellulaire permettent le contrôle de l'intégrité du génome pendant toutes les phases du cycle cellulaire. En cas d'anomalie, la progression du cycle cellulaire est stoppée pour permettre la réparation des dommages à l'ADN ou bien orienter la cellule vers le processus d'apoptose en cas de lésions jugées non réparables. Les principaux mécanismes moléculaires de contrôle du cycle cellulaire mettent en jeu les protéines de la famille p53. La mutation du gène suppresseur de tumeur *TP53* a un rôle prédominant dans la carcinogénèse, mais aussi dans la résistance à la chimiothérapie. Les protéines p53 mutantes sont capables d'induire une résistance à la chimiothérapie anticancéreuse notamment par la modulation de l'expression de facteurs pro/anti-apoptotiques comme Fas et Bcl-XL (Simabuco et al. 2018). De manière intéressante, il semble également que les mutants p53 soient capables d'activer les mécanismes de chimiorésistance d'efflux à travers ABCB1, soit en agissant

directement sur son promoteur, soit indirectement par des phénomènes de méthylation et d'acétylation de la chromatine associée à son locus (Simabuco et al. 2018).

1.4. Stratégies de contournement de la résistance à la chimiothérapie dans les cancers

1.4.1. Stratégies cliniques

Les stratégies utilisées par les cliniciens pour contrer les phénomènes de résistance à la chimiothérapie sont de plusieurs types :

- D'une part, l'optimisation de l'utilisation des chimiothérapies conventionnelles (adaptation pharmacocinétiques des doses, chronochimiothérapie, chimiothérapie in situ, modulateurs d'activité comme l'acide folique) est un objectif en pratique clinique. De même, l'augmentation de la dose de médicaments diminue la rapidité d'apparition des résistances.
- D'autre part, l'utilisation synergique de plusieurs médicaments sous forme de polychimiothérapie est devenue un principe de base de l'administration d'une chimiothérapie anticancéreuse pour diminuer les phénomènes de résistance innée (exemple : association FOLFOX ou FOLFIRI dans les CCR).
- De plus, l'utilisation de thérapies innovantes a également pris un essor important depuis plusieurs années en réponse aux échecs des chimiothérapies conventionnelles. Ainsi les thérapies ciblées, les thérapies géniques (réparations des systèmes géniques déficients) et l'immunothérapie sont de plus en plus utilisées seules ou associées aux chimiothérapies conventionnelles.

1.4.2. Stratégies de recherche fondamentale : le développement de nouvelles drogues anticancéreuses

Même si les sels de platine sont largement utilisés dans différents types de cancers digestifs, ils présentent des inconvénients majeurs : certaines tumeurs présentent des mécanismes de

résistance innée et acquise et ils sont à l'origine d'effets indésirables (néphrotoxicité, ototoxicité, neuropathie notamment), limitant leur utilisation.

C'est en raison de ces problèmes associés aux sels de platine que des équipes de recherche fondamentale s'intéressant au développement de nouveaux agents anti-cancéreux se sont orientées pendant ces dernières années vers des composés organométalliques dérivés d'autres métaux lourds que le platine (or, ruthénium, osmium, titane, rhodium notamment).

1.4.2.1. Les dérivés du ruthénium et de l'osmium

Parmi les différents composés synthétisés à base de métaux, les plus intéressants en terme d'efficacité et d'effets secondaires semblent être ceux dérivés du ruthénium et de l'osmium.

1.4.2.1.1. Les dérivés du ruthénium

Le ruthénium est l'élément chimique de numéro atomique 44 et de symbole Ru. Il fait partie du groupe du platine. Les dérivés du ruthénium sont des composés qui présentent des propriétés intéressantes telles qu'une géométrie octaédrique, un potentiel redox important, de nombreux états d'oxydation et la possibilité d'engendrer des liaisons covalentes avec des macromolécules. Le ruthénium serait également moins toxique que le platine. Même si les mécanismes d'action de ces composés sont encore partiellement inconnus, certaines études ont déjà démontré que les dérivés à base de ruthénium sont capables d'interagir avec l'ADN et d'activer les voies de signalisation de dommage à l'ADN, d'activer des kinases et des métallo-protéases (Licona et al. 2017).

L'équipe de C. Gaiddon (UMR_S 1113, Strasbourg) développe ces composés dérivés du ruthénium en collaboration avec une équipe de chimistes (M. Pfeffer, UMR_S 7177, Strasbourg). Ils ont synthétisé à ce jour plus d'une centaine de composés dont le RDC-11, qui semble particulièrement intéressant en raison de ses propriétés chimiques, physiques et

biologiques. Le RDC-11 admet 6 ligands potentiels, lui offrant des structures différentes et originales (figure 22). In vitro, le RDC-11 a une activité cytotoxique élevée et notamment sur des lignées cellulaires résistantes au cisplatine. In vivo, le RDC-11 réduit la croissance tumorale dans des modèles murins syngéniques et de xélogreffes humaines. Il semblerait également que la toxicité induite par le RDC-11 soit moins importante que celle induite par le cisplatine (Meng et al. 2009) et que ce composé soit moins sensible aux mécanismes de chimiorésistance du cisplatine tels que la surexpression du transporteur ATP7B.

Les mécanismes d'action du RDC-11 sont multiples et sont étudiés dans le laboratoire. Le RDC-11 induit des voies de signalisation p53-dépendantes et p53-indépendantes (Gaiddon et al. 2005), une activation du stress du réticulum endoplasmique et de l'apoptose mitochondriale. Le RDC-11 altère le potentiel redox d'enzymes telles que la glucose oxydase et affecte le métabolisme cellulaire à travers la production de radicaux libres. Le RDC-11 est également capable de moduler la voie de signalisation HIF-mTOR, impliquée dans le contrôle et la progression tumorale, en diminuant l'expression de HIF-1 α et d'inhiber la néoangiogenèse tumorale en diminuant l'expression du VEGF.

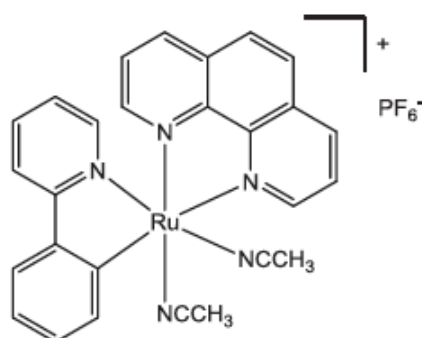


Figure 20 : Structure du RDC-11

En modifiant la structure du RDC-11 (remplacement des groupes acétonitrile par phénantroline), le laboratoire a développé un nouveau composé, le RDC-34. Le RDC-34 est le

plus cytotoxique de tous les RDCs. Son mécanisme d'action semble différent de celui du RDC-11, avec notamment une capacité plus faible à interagir avec l'ADN. Cependant, le RDC-34 semble capable de favoriser de manière plus importante la production de radicaux libres et d'induire la caspase 8, enzyme impliquée dans l'apoptose (Vidimar et al. 2012).

1.4.2.1.2. Les dérivés de l'osmium

L'atome de ruthénium composant les RDC peut être remplacé par un atome d'osmium, autre métal platinoïde lourd. C'est l'élément chimique de numéro atomique 76 et de symbole Os. Même si l'osmium a historiquement été découvert avant le ruthénium, son activité anticancéreuse a été beaucoup moins explorée (Meier-Menches et al. 2018).

Le remplacement de l'atome de ruthénium du RDC-11 par un atome d'osmium génère l'ODC-2 (figure 23). Le remplacement de l'atome de ruthénium du RDC-34 par un atome d'osmium génère l'ODC-3 (figure 23). Le mode d'action exacte des ODC reste encore mal connu et est en cours d'étude. D'une manière générale, les ODC semblent avoir un potentiel redox différent des RDC et donc des propriétés et mécanismes d'action différents par rapport aux RDC et aux autres dérivés du platine. Ils semblent également plus cytotoxiques que les RDC.

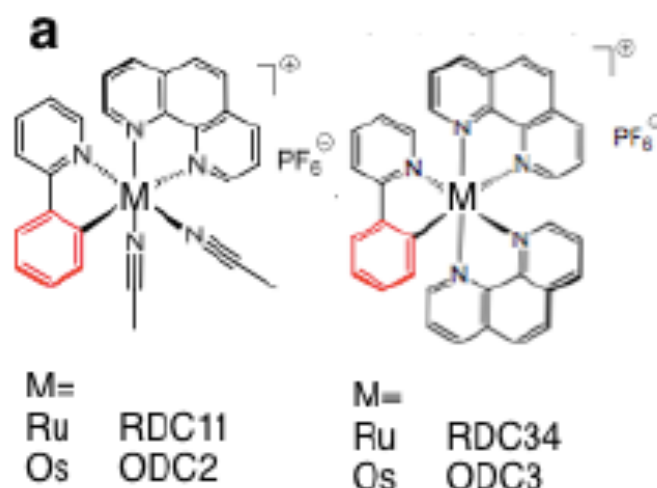


Figure 21 : Structures du RDC-11, RDC-34, ODC-2 et ODC-3

1.5. CDX2, un gène clé dans l'intestin

L'homéostasie intestinale est un processus complexe impliquant des voies de signalisation intracellulaires multiples et de nombreuses molécules régulatrices. Depuis plusieurs années, le laboratoire d'accueil s'intéresse plus particulièrement à CDX2, un facteur de transcription essentiel à l'homéostasie intestinale et dérégulé dans les cancers.

1.5.1. Structure et fonction de CDX2

Le gène *CDX2*, situé sur le chromosome 13, est composé de 3 exons et code pour un facteur de transcription à homéodomaine de 313 acides aminés (figure 23). La région centrale a été hautement conservée au cours de l'évolution et contient l'homéo-domaine. Celui-ci se lie à l'ADN au niveau du promoteur des gènes cibles sur une séquence consensus (A/CTTTATATA/G, (Margalit et al. 1993)). L'extrémité N-terminale correspond au domaine de trans-activation et module l'activité transcriptionnelle de CDX2 (Rings et al. 2001). L'extrémité C-terminale comporte des sites de phosphorylation qui régulent la stabilité de CDX2 (Isabelle Gross et al. 2005). Différentes isoformes générées par épissage alternatif (Witek et al. 2014; Balbinot et al. 2018) de CDX2 ont été décrites, dont miniCDX2, pour lequel l'extrémité N-terminale a été remplacée par quelques acides aminés. Ces variants d'épissage peuvent avoir une activité biologique différente comparée à la protéine entière (Balbinot et al. 2018).

CDX2 régule de nombreux processus au cours du développement embryonnaire, mais joue un rôle crucial dans la morphogenèse et l'homéostasie intestinale. En effet, CDX2 détermine l'identité intestinale de la moitié postérieure de l'endoderme lors de l'embryogenèse (Beck et al. 1999) et est nécessaire au maintien de l'intestin tout au long de la vie.



Figure 22 : Représentation schématique de la protéine CDX2 humaine

Les chiffres du haut correspondent à la position des différents domaines le long des 313 acides aminés de la protéine CDX2. TAD: transactivator domain; NLS: nuclear localization signal; HD: homeodomain; SD: stabilization domain.

(Renouf et al. 2012)

Chez la souris, l'inactivation complète du gène (*Cdx2*^{-/-}) dans l'endoderme durant l'embryogenèse à E9,5 conduit à l'absence de côlon (Gao, White, and Kaestner 2009), mais est également létale dans l'intestin d'embryons plus développés ou chez l'adulte, générant des cellules intestinales non fonctionnelles (perte des microvillosités, de la polarité et des enzymes intestinales, expression de marqueurs gastriques voire transdifférenciation en cellules gastriques) (Gao and Kaestner 2010; Grainger, Savory, and Lohnes 2010; Verzi et al. 2011; Stringer et al. 2012).

CDX2 régule l'expression de molécules impliquées dans la différenciation fonctionnelle des cellules intestinales telles que certaines enzymes intestinales (Ex : saccharase-isomaltase (Traber, Wu, and Wang 1992), lactase (Troelsen et al. 1997)), certains constituants du mucus intestinal (Ex : Muc2 (Yamamoto, Bai, and Yuasa 2003), Muc4 (Jonckheere et al. 2007)), certaines molécules d'adhésion (Ex : LI-cadhérine (Hinoi et al. 2002), Claudine-2, (Sakaguchi et al. 2002), Mucdhl (Hinkel et al. 2012)) ou certains transporteurs nécessaires au métabolisme de nutriments (Glut 2 (Uesaka, Kageyama, and Watanabe 2004), héphaestine (Hinoi et al. 2005)). CDX2 stimule l'adhésion inter-cellulaire et la polarité apico-basale, mais diminue la prolifération et la migration cellulaire (Keller et al. 2004; Gao and Kaestner 2010; Freund et al. 1998).

Parallèlement à cette activité transcriptionnelle, CDX2 possède une activité non transcriptionnelle reposant sur des phénomènes d'interaction avec d'autres protéines. Ainsi CDX2 est capable d'inhiber la réparation de type NHEJ des lésions doubles brins de l'ADN en interagissant avec les protéines Ku70/80 (Renouf et al. 2012) et HoxB7 (Soret et al. 2016). De même, en se liant à NF- κ B ou à la β -caténine, CDX2 peut bloquer la synthèse de prostaglandines et l'expression des gènes de la voie WNT, potentiellement impliqués dans les phénomènes de réponse inflammatoire et de cancérogenèse colique (Mutoh et al. 2007; Guo et al. 2010).

1.5.2. Expression de CDX2

Chez l'adulte, CDX2 est spécifiquement exprimé au niveau de l'épithélium intestinal et colique à l'état physiologique. Ainsi, en pratique clinique quotidienne, la détection de CDX2 par immunohistochimie atteste de l'origine colique d'un prélèvement. L'expression de CDX2 augmente à partir du duodénum jusqu'au côlon proximal. Il existe également un gradient d'expression de CDX2 le long de l'axe crypto-villositaire (San Roman et al. 2015).

1.5.3. Régulation de l'expression et de l'activité CDX2

L'importance du maintien du niveau d'expression de CDX2 implique des mécanismes de régulation d'expression du gène et de l'activité de la protéine à plusieurs niveaux, même si l'ensemble de ces mécanismes n'est pas encore parfaitement identifié.

La région promotrice de *CDX2* contient des éléments de réponse à certains facteurs de transcription comme HNF4 α , GATA6, et TCF4/ β -caténine (Benahmed et al. 2008; Boyd et al. 2009; Saandi et al. 2013) qui assurent en synergie la régulation transcriptionnelle de CDX2.

La régulation post transcriptionnelle de CDX2 fait intervenir des variants d'épissage inactifs comme CDX2/AS (Witek et al. 2014) ou se comportant comme dominant négatif sur les cibles transcriptionnelles de CDX2 comme mini-CDX2 (Balbinot et al. 2018). L'ARNm de CDX2

peut également interagir avec des miRNA ou certaines protéines (comme MEX3A) capables de favoriser sa dégradation (Tagawa et al. 2012; Pereira et al. 2013).

Le gradient d'expression de CDX2 observé le long de l'axe crypto-villositaire suggère des mécanismes de régulation post traductionnelle permettant l'inhibition de son activité dans les CS coliques et son activation dans les cellules différenciées des villosités. Ainsi, un système important de phosphorylation de CDX2 sur différents sites de la protéine et par différentes kinases (Ex : Cdk2, Erk1/2, p27^{kip1}, p38) permettent de stimuler ou d'inhiber son activité transcriptionnelle (Gross et al. 2005; Krueger et al. 2009; Boulanger et al. 2005; Houde et al. 2001).

1.5.4. CDX2 et cancérogenèse

1.5.4.1. Cancer colorectal

CDX2 est considéré comme un gène suppresseur de tumeur dans l'intestin. En effet, l'expression de CDX2 est généralement réduite chez les patients atteints de CCR et ceci favorise la progression tumorale.

Cette baisse d'expression de CDX2 n'est pas due à des mutations ou altérations au sein de son locus (Subtil et al. 2007; Sivagnanasundaram et al. 2001), mais serait contrôlée par des voies pro-oncogéniques comme les voies Ras et NF- κ B (Lorentz et al. 1999; S. Kim et al. 2002) et/ou le microenvironnement tumoral à travers HNF4 α notamment (Brabletz et al. 2004; Saandi et al. 2013). Plus récemment, Wang et al. ont corrélé la baisse de CDX2 dans les CCR avec une hyperméthylation du gène (Y. Wang et al. 2018).

Chez la souris, la réduction de l'expression de CDX2 favorise la progression de tumeurs coliques induites par un carcinogène ou la perte de fonction du suppresseur de tumeurs APC (Bonhomme et al. 2003; Aoki et al. 2003). A l'inverse, le maintien forcé de l'expression de CDX2 dans des cellules cancéreuses coliques injectées à des souris nude permet de diminuer le

volume des tumeurs formées et la dissémination métastatique (I. Gross et al. 2008). Le mode d'action de CDX2 en tant que suppresseur de tumeur n'est pas encore parfaitement compris, mais pourrait dépendre de sa capacité à maintenir le phénotype intestinal (inhibition de la prolifération, stimulation de la différenciation), à s'opposer à la réparation de type NHEJ de l'ADN endommagé par la protéine Ku70/80 (induction de l'apoptose) (Renouf et al. 2012; Soret et al. 2016) ou encore à sa capacité d'activer la voie Rho, impliquée dans l'organisation du cytosquelette et les jonctions adhérentes (Platet et al. 2017).

1.5.4.2. Autres lésions et cancers de l'appareil digestif

Il semblerait que l'expression ectopique de CDX2 puisse modifier sa fonction gène suppresseur de tumeur en fonction pro-oncogénique. En effet, une expression ectopique de CDX2 a été rapportée dans différents types de cancers, en particulier de phénotype mucineux, tels que des adénocarcinomes pancréatiques, œsophagiens, ovariens, pulmonaires ou les rares pseudomyxomes appendiculaires et extra-appendiculaires (Moskaluk et al. 2003; Werling et al. 2003; Delhorme et al. 2018; Nonaka et al. 2006).

L'expression ectopique de CDX2 peut également être détectée au sein de métaplasies intestinales gastriques ou œsophagiennes secondaires à une infection à *Helicobacter Pylori* ou un reflux gastro-œsophagien. Zhang et al. ont récemment montrés sur 60 tumeurs de patients atteints de cancer du cardia que l'expression de CDX2 était significativement augmentée dans ces tumeurs par rapport à des prélèvements sur muqueuses cardiales saines (Y. Zhang et al. 2016). De plus, l'expression de CDX2 augmentait parallèlement au niveau d'infection par *Helicobacter Pylori*. Dans cette étude, l'expression de CDX2 corrélait avec un envahissement ganglionnaire plus important. Cependant, l'expression de CDX2 dans les tumeurs de l'estomac est généralement corrélée à une meilleure survie (Masood, Loya, and Yusuf 2016).

Par ailleurs, une expression ectopique de CDX2 est détectée dans plus de 80% des leucémies aiguës lymphoïdes et myéloïdes et plusieurs études ont montré que CDX2 exerce une activité oncogénique en situation ectopique au sein du tissu hématopoïétique (Scholl et al. 2007; Thoene et al. 2009; Rawat et al. 2004).

L'ensemble de ces données suggère une fonction versatile de CDX2 dans les phénomènes de cancérogenèse dont le déterminant pourrait être lié à son site d'expression, à son niveau d'expression et au microenvironnement résultant.

1.5.4.3. CDX2 comme facteur pronostic de survie dans le CCR

Des études cliniques réalisées sur de faibles effectifs avaient déjà mis en évidence le rôle pronostic de CDX2 dans les CCR. En effet, la perte d'expression de CDX2 était un facteur de mauvais pronostic de survie en analyse multivariée et associée à des caractéristiques tumorales plus agressives telles que des tumeurs peu différenciées, des mutations de *BRAF*, un statut MMR déficient, un grade et stade tumoral plus important et un phénotype de type CIMP (Y. Baba et al. 2009; Bae et al. 2015; J. H. Kim et al. 2013; Knösel et al. 2012; Olsen et al. 2014, 2016).

Une publication récente regroupant des données transcriptomiques de tumeurs chez plus de 2000 patients atteints de CCR a montré que la perte d'expression de CDX2 était un facteur de mauvais pronostic de survie sans récurrence, avec un sur-risque de récurrence multiplié par 3,44 pour les tumeurs n'exprimant pas CDX2, et ceci indépendamment du sexe du patient, du stade et du grade tumoral (Dalerba et al. 2016). Cependant, dans cette étude, la perte d'expression de CDX2 ne survenait que dans seulement 4,1% des tumeurs (la plupart des CCR exprimant ou surexprimant CDX2). Ces données ont également été confirmées dans une méta-analyse de 26 études rétrospectives qui comparait la valeur pronostique de CDX2 dans différents types de cancers solides (CCR, cancer oeso-gastrique, pancréatique ou ovarien). La perte d'expression

de CDX2 était assez hétérogène selon les études et concernait environ 16% (extrêmes 5-50%) des tumeurs analysées. La perte d'expression de CDX2 était significativement associée à une moins bonne survie globale à 3 ans, 5 ans et 10 ans (Yuan et al. 2017). Cependant, la survie sans récurrence ne semblait pas être impactée. L'équipe parisienne de P. Laurent-Puig a également confirmé ces résultats sur la base de la carte d'identité des tumeurs coliques (CIT, Ligue contre le Cancer) où, sur une analyse transcriptomique de tumeurs de 469 patients atteints de CCR de stade II et III, la perte d'expression de CDX2 (cohorte représentant 15,6% de la population d'étude) était un facteur pronostique indépendant de survie globale et sans récurrence en analyse multivariée. La perte d'expression de CDX2 était particulièrement associée aux groupes de tumeurs CMS1 (phénotype d'instabilité microsatellitaire et infiltration immunitaire) et CMS4 (phénotype d'EMT) mais ne semblait impacter la survie que dans le groupe CMS4 (Pilati et al. 2017).

1.5.5. CDX2 et résistance à la chimiothérapie

1.5.5.1. Données cliniques

Dans l'étude de Dalerba et al., l'administration d'une chimiothérapie chez des patients dont les tumeurs avaient perdu l'expression de CDX2 améliorait significativement la survie sans récurrence comparée à des patients n'ayant pas reçu de chimiothérapie (Dalerba et al. 2016). Cependant, cet effet bénéfique de la chimiothérapie était nettement diminué (tumeurs de stade II), voire annulé (tumeurs de stade III), pour les patients dont les tumeurs exprimaient ou surexprimaient CDX2 (Dalerba et al. 2016). Ces données ont été confirmées sur la cohorte norvégienne de Bruun et al. analysant l'expression de CDX2 chez 1045 patients atteints de CCR (Bruun et al. 2018). De même, dans la méta-analyse de Yuan et al., le gain de survie globale chez les patients dont les tumeurs exprimaient CDX2 ne semblait pas attribuable à une meilleure réponse à la chimiothérapie puisque, dans cette même étude, le niveau d'expression

de CDX2 ne modifiait pas les effets de la chimiothérapie chez des patients qui en avait reçu, quelle que soit l'origine tumorale (cancer du côlon ou de l'ovaire) (Yuan et al. 2017).

Sur la base de ces données cliniques, la perte d'expression de CDX2 semble être un facteur de mauvais pronostic de survie, mais de meilleure réponse à la chimiothérapie. Dans cette proportion minoritaire de CCR, la perte drastique d'expression de CDX2 pourrait être associée à un caractère peu différencié de la tumeur, la rendant plus agressive et plus sensible à la chimiothérapie. A l'inverse, le maintien ou la surexpression de CDX2 semble être un facteur de mauvaise réponse à la chimiothérapie.

1.5.5.2. Données moléculaires : CDX2 et transporteurs ABC

De manière intéressante, le transporteur ABCB1 / MDR1 a été identifié comme gène cible de CDX2. En effet, Takakura et al. ont mis en évidence par analyse de « microarrays » une augmentation de l'expression d'ABCB1 dans la lignée de cellules cancéreuses coliques HT-29 exprimant ectopiquement CDX2 (Takakura et al. 2010). Ensuite, cette équipe a montré que CDX2 régulait directement ABCB1 en se fixant sur son promoteur et que la surexpression de CDX2 dans les cellules HT-29 induisait une résistance aux molécules de chimiothérapie effluées par ABCB1 (vincristine et paclitaxel) alors que l'inhibition d'ABCB1 par le verapamil restaurait la sensibilité des cellules à ces molécules (Takakura et al. 2010). Ces résultats ont été confortés par l'étude norvégienne de Bruun et al. où l'expression de ABCB1 était diminuée parallèlement à celle de CDX2 dans 121 tumeurs de patients, ainsi que dans 16 lignées cellulaires (Bruun et al. 2018). Les travaux de Koh et al. ont également montré par immunohistochimie que l'expression endogène de ABCB1 était positivement associée à celle de CDX2 dans une cohorte de patientes atteintes d'adénocarcinomes mucineux ovariens (Koh et al. 2016). Dans plusieurs lignées cellulaires d'adénocarcinomes mucineux ovariens, cette

équipe a montré que CDX2 induisait une surexpression de ABCB1 responsable d'une résistance accrue à la vincristine et au paclitaxel.

Yan et al. ont aussi montré que la surexpression de CDX2 dans deux modèles de lignées cellulaires de cancer gastrique réduisait significativement la sensibilité des cellules au cisplatine, à la doxorubicine et au 5-FU et diminuait l'accumulation intracellulaire de doxorubicine (L.-H. Yan et al. 2015).

Enfin, CDX2 aurait également pour gène cible le transporteur ABCC7 (ou cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)), impliqué dans la mucoviscidose (Kerschner and Harris 2012). Cependant, ce transporteur n'a jamais été décrit comme acteur de résistance à la chimiothérapie et ses substrats identifiés sont les ions chlore et bicarbonate (Vauthier, Housset, and Falguières 2017).

A l'image des cancers ovariens et gastriques, la surexpression de CDX2 pourrait donc jouer un rôle dans la chimiorésistance des CCR à travers la surexpression de molécules d'efflux.



OBJECTIFS

2. SYNTHÈSE ET OBJECTIFS DE LA THÈSE

Les cancers de l'appareil digestif, en particulier le CCR, correspondent à un problème de santé publique en raison de leur fréquence et de leur gravité. Pour les CCR de stades avancés de grade III et IV, les stratégies thérapeutiques actuelles, basées sur une chirurgie d'exérèse et la chimiothérapie (5-Fluorouracile (5-FU) + oxaliplatine / irinotécan), se heurtent à des phénomènes de résistance liés à l'hétérogénéité tumorale.

La compréhension des mécanismes de résistance à la chimiothérapie, ainsi que le développement de nouvelles drogues anticancéreuses, sont donc des axes de recherche fondamentaux dans la prise en charge des patients atteints de cancers digestifs et plus particulièrement de CCR. L'un des mécanismes de résistance à la chimiorésistance identifié est la surexpression de transporteurs de la famille ABC qui augmentent l'efflux actif des agents de chimiothérapie en dehors de la cellule cancéreuse.

Dans ce contexte, le laboratoire s'intéresse aux mécanismes moléculaires impliqués dans la cancérogenèse colique par le biais du suppresseur de tumeurs CDX2, ainsi qu'au développement de nouveaux agents chimiotoxiques.

- CDX2 est un facteur de transcription nécessaire au développement embryonnaire de l'intestin, mais également au fonctionnement et au renouvellement de l'épithélium intestinal chez l'adulte. La baisse d'expression de CDX2 généralement observée dans les tumeurs coliques humaines est hétérogène, variant d'un patient à l'autre, voire d'une zone tumorale à une autre. Or, il a été montré à l'échelon moléculaire que le niveau d'expression de CDX2 modifie les propriétés des cellules cancéreuses coliques, notamment en termes de potentiel de prolifération, de migration et éventuellement de réponse à la chimiothérapie. En effet, bien que le niveau d'expression de CDX2 soit un facteur pronostic majeur de survie pour les patients atteints de CCR, il semble prédire une mauvaise réponse à la chimiothérapie. De plus, le gène *ABCB1* codant pour une protéine d'efflux membranaire impliquée dans la résistance à la

chimiothérapie a récemment été identifié comme gène cible de CDX2. Ceci suggère que le niveau d'expression de CDX2 pourrait avoir un impact sur la sensibilité des cellules cancéreuses coliques aux drogues anticancéreuses.

- En collaboration avec des équipes de chimistes, le laboratoire développe et caractérise de nouveaux agents cytotoxiques à base d'osmium et de ruthénium. Ces composés seraient moins toxiques que ceux à base de platine et non sensibles aux mécanismes de résistance au cisplatine.

Sur ces bases, le projet de thèse visait à i) étudier l'impact du niveau d'expression de CDX2 sur la sensibilité aux drogues anticancéreuses, étant donné le rôle majeur de CDX2 dans la morphologie et le fonctionnement des cellules intestinales et ii) caractériser les effets induits par les nouveaux composés organométalliques du laboratoire en terme de résistance des cellules cancéreuses de l'appareil digestif.



RESULTATS

3. RESULTATS ET ARTICLES ASSOCIES

3.1. Projet I : CDX2 et chimiorésistance dans les CCR

3.1.1. Résumé des résultats obtenus

3.1.1.1. Impact de CDX2 sur la survie sans récurrence et la réponse clinique à la chimiothérapie

Une analyse transcriptomique de 12 différentes bases de données publiques de CCR, représentant 1237 patients, m'a permis de confirmer le caractère pronostic favorable du maintien ou de la surexpression de CDX2 par la tumeur sur la survie. Cette analyse m'a également permis de mettre en évidence que cet effet bénéfique sur la survie est perdu chez des patients atteints de tumeurs de stade II, III et IV traités par chimiothérapie.

Le niveau d'expression de CDX2 semble donc être un facteur de survie important chez les patients atteints de CCR. Cependant, l'effet bénéfique de CDX2 est perdu pour les patients ayant reçu de la chimiothérapie. Les expérimentations ultérieures du projet ont consisté à élucider les mécanismes moléculaires impliqués dans ce phénomène.

3.1.1.2. Impact de la différenciation intestinale sur la résistance à la chimiothérapie

J'ai réalisé des tests de survie cellulaire (MTT ou comptage) sur deux modèles différents de différenciation intestinale in vitro et montré que les cellules cancéreuses coliques différenciées, qui surexpriment CDX2, sont plus résistantes à certaines drogues de chimiothérapie (oxaliplatine, 5-FU) que des cellules moins différenciées.

Ainsi, l'expression de CDX2 s'oppose à l'efficacité de la chimiothérapie in vitro et in vivo.

3.1.1.3. Effet de la différenciation intestinale sur les transporteurs de la famille ABC

Des analyses par RT-qPCR m'ont permis de montrer que l'expression de CDX2 conduit à une nette augmentation de l'expression des transporteurs ABCB1 et ABCC11 dans les cellules cancéreuses coliques HT-29 et HCT116. De plus, l'expression d'ABCC11 est fortement augmentée (environ x13) dans les cellules cancéreuses coliques Caco2/TC7 différenciées spontanément à confluence (11 jours de culture) par rapport aux cellules non différenciées (1 jour de culture). Ceci est particulièrement intéressant puisqu'il a été montré qu'ABCC11 permettait l'efflux du 5-FU, la drogue à la base des protocoles de chimiothérapie utilisés en clinique pour les CCR. Ces données ont été confirmées dans des modèles représentant mieux le comportement tumoral, à savoir un modèle de colonosphères en 3D, ainsi qu'un modèle de greffe sous-cutanée chez la souris nude, de cellules HT-29 surexprimant ou non CDX2.

3.1.1.4. ABCC11 : nouveau gène cible de CDX2

J'ai ensuite utilisé une approche de perte de fonction par interférence à l'ARN : j'ai observé une diminution (environ -60%) de l'expression du transporteur ABCC11 dans des cellules cancéreuses coliques transfectées par un siRNA ciblant CDX2 par rapport à des cellules transfectées par un siRNA non spécifique. Ceci indique que le facteur de transcription CDX2 est nécessaire à l'expression du transporteur ABCC11.

Pour déterminer si CDX2 régule la transcription d'ABCC11, j'ai construit des plasmides rapporteurs de type luciférase qui contiennent des fragments d'ADN de différentes tailles de la zone située en amont du site d'initiation de la transcription d'ABCC11 et incluant des sites potentiels de liaison pour CDX2. J'ai co-transfecté ces plasmides rapporteurs avec un plasmide codant pour CDX2 dans des cellules HCT116. Les résultats montrent une augmentation du signal luciférase dans les cellules exprimant CDX2 par rapport aux cellules contrôles.

Pour confirmer l'interaction entre le promoteur d'ABCC11 et CDX2, j'ai également réalisé des expériences de co-immunoprécipitation de chromatine. Les résultats ont été analysés par qPCR et montrent que CDX2 interagit bien avec le promoteur d'ABCC11.

Pour compléter ces analyses moléculaires réalisées sur des lignées cellulaires, j'ai examiné le profil d'expression d'ABCC11 et CDX2 *in vivo*. L'analyse par RT-qPCR de tissus sains humains de différents segments du tube digestif montre un profil d'expression d'ABCC11 et de CDX2 compatible avec une régulation d'ABCC11 par CDX2.

Enfin, l'analyse par RT-qPCR de 38 échantillons de tumeurs coliques humaines issues d'une cohorte locale suggère qu'il existe une corrélation entre les niveaux d'expression de CDX2 et d'ABCC11 dans les tumeurs. Le regroupement et l'analyse de données transcriptomiques publiées m'ont permis de confirmer ces résultats à plus grande échelle (> 1200 patients).

3.1.1.5. Participation d'ABCC11 à la résistance au 5-FU

Pour déterminer si l'induction d'ABCC11 par CDX2 était effectivement impliquée dans la résistance à la chimiothérapie par le 5-FU, j'ai réalisé des tests de survie de type MTT sur des cellules cancéreuses coliques surexprimant ou non CDX2, traitées ou non par des doses croissantes de 5-FU et en présence ou non de MK571, un composé inhibiteur du transporteur ABCC11. Comme attendu, le 5-FU diminue la quantité de cellules et ceci est moins efficace en présence de CDX2 (environ -35%). Remarquablement, l'ajout de l'inhibiteur MK571 permet de restaurer la sensibilité au 5-FU des cellules exprimant CDX2, suggérant que l'activité d'ABCC11 est nécessaire à la chimiorésistance induite par CDX2. L'inhibition de ABCC11 par transfection de siRNA montre une tendance à des résultats similaires.

L'ensemble de mes données est compatible avec l'existence d'un mécanisme de résistance au 5-FU dans les cellules cancéreuses coliques différenciées basé sur l'expression accrue du

transporteur ABCC11 identifié comme nouveau gène cible de CDX2. Ces travaux, qui témoignent de l'intérêt diagnostique et thérapeutique d'ABCC11 et de CDX2 pour une meilleure prise en charge des CCR.

3.1.2. Article associé

CDX2 increases 5-Fluorouracil-resistance of colon cancer cells through its new target gene, the ABCC11 transporter.

JB. Delhorme^{1,2}, E. Bersuder¹, MP. Chenard³, E. Martin¹, S. Rohr^{1,2}, C. Brigand^{1,2}, JN. Freund¹ and I. Gross^{1*}

¹ *IRFAC UMR_S 1113 INSERM / Université de Strasbourg, Strasbourg*

² *Service de Chirurgie Générale et Digestive, Hôpital de Hautepierre, Strasbourg*

³ *Service de Pathologie, Hôpital de Hautepierre, Strasbourg*

* Corresponding author

Dr Isabelle Gross

IRFAC UMR_S 1113 INSERM, 3 avenue Molière, 67200 Strasbourg, France

Tel: +33 (0)3 88 27 77 27 Fax: +33 (0)3 88 26 35 38

Email: isabelle.gross@inserm.fr

Keywords

CDX2; colorectal cancer; chemoresistance; ABCC11; DPYD

Abstract

Context: The transcription factor CDX2 is a master regulator of intestinal identity that acts as a tumor suppressor in the colon. CDX2 expression in CRC seems associated with better survival but higher resistance rate to chemotherapy which may be related to drug efflux as MDR1/ABCB1 was recently identified as one of its target genes.

Methods and Results: We performed a pooled analysis of available transcriptomic data and confirmed the prognostic role of CDX2 in disease-free survival and chemoresistance in CRC. We observed that CDX2 expression and intestinal differentiation enhance resistance of colon cancer cell lines towards 5-FU. Using RT-qPCR, we found that chemoresistance of these cells correlates with increased expression of both ABCC11, an efflux molecule whose main substrate is 5-FU, and DPYD, responsible for 5-FU catabolism. Gain and loss of function experiments in colon cancer cells enabled us to show that CDX2 is necessary for the expression of ABCC11. Reporter gene and chromatin immunoprecipitation assays confirmed that CDX2 directly regulates the expression of ABCC11 and interacts with its promoter. Using RT-qPCR, we also observed a correlation between CDX2 and ABCC11 expression levels in a local series of 38 CRC and the 1237 CRC of our metacohort. Finally, we showed that pharmacological inhibition of ABCC11 by MK-571 improved 5-FU-sensitivity of CDX2-expressing colon cancer cells, strongly suggesting that the activity of ABCC11 is necessary for CDX2-induced chemoresistance to 5-FU. CDX2 and DPYD expression also correlated in the metacohort.

Conclusions: These data indicate that ABCC11 is a new CDX2 target gene that may contribute to 5-FU chemoresistance in CRC. Expression of CDX2 / ABCC11 / DPYD may be used to predict chemotherapy response.

Introduction

Caudal-type homeobox transcription factor 2 (CDX2) plays a crucial role in the determination and maintenance of the intestinal identity and is a biomarker of mature colorectal epithelial tissue¹. Its implication in carcinogenesis is strongly debated and may differ according to its localization but data suggest that CDX2 is a tumor suppressor gene in the colon. Indeed, in mouse models, decreased expression of CDX2 enhances colon cancer progression^{2,3} whereas overexpression of CDX2 decreases the size of tumors and incidence of metastases formed by colon cancer cells injected in nude mice⁴. In human, the loss of CDX2 expression in colorectal cancer (CRC) is associated with features of aggressiveness such as poor differentiation, BRAF mutation, high tumor grade, MMR deficiency, advanced stages and CIMP phenotype^{5,6}. Furthermore, Dalerba et al. and Pilati et al. recently showed that the loss of CDX2 expression was significantly associated with worse survival in stage II and III CRC^{7,8}. Paradoxically, patients with CDX2-positive tumors did not benefit from adjuvant chemotherapy compared to patients with CDX2-negative tumors, suggesting a role of CDX2 in chemoresistance⁹. Chemoresistance in CRC is a major concern as systemic chemotherapy is frequently administered in CRC associated to surgery or not. Several chemoresistance mechanisms have been proposed and described. Drugs efflux via ATP-Binding Cassette (ABC) family transporters is one of the most studied: it consists in the misuse and overexpression of transmembrane proteins whose physiological expression provides protections against xenobiotics. Recent data showed that CDX2 induces the expression of the multidrug resistance protein 1 (*MDR1*) gene by binding on its promoter¹⁰. Thus, CDX2 may play a role in CRC chemoresistance through the expression of ABC family transporters.

In the present study, we confirmed the role of CDX2 in the chemoresistance of CRC. We showed through a translational approach that CDX2 overexpression is implicated in 5-fluorouracil (5-FU) chemoresistance in CRC and described the molecular mechanisms

implicated in this finding. We identified the 5-FU transporter ABCC11 as a new transcriptional target of CDX2 whose activity contributes to the 5-FU-chemoresistance of colon cancer cells. Remarkably, CDX2 expression correlates with the expression of ABCC11 in human colon tumors, but also with the one of the DPYD enzyme involved in the 5-FU break down. Thus, our study links for the first time CDX2 to the 5-FU metabolism and provides a molecular mechanism for its impact on 5-FU-based chemotherapy.

Results

CDX2 expression and disease-free survival in the NCBI-GEO meta-cohort

To confirm the prognostic role of CDX2 expression in CRC, we analyzed a meta-cohort of 1237 patients affected with CRC by pooling 12 transcriptomic homogeneously re-analyzed studies from NCBI-GEO. Two groups were created according to the *CDX2* expression level within the tumors (Meta-CDX2-High group, n=797 and Meta-CDX2-Low group, n=440). Available clinical data are summarized in the table 1. As shown, tumors in the Meta-CDX2-High group were significantly located in the distal colon, more frequently stage IV, rather moderately differentiated, less frequently K-RAS and B-RAF mutated and with more frequent MSS phenotype. Data for DFS were available for 767 patients (data for OS were not workable as they were similar to the DFS ones in 70% of cases). DFS was significantly higher for patients of the Meta-CDX2-High group compared to the patients of the Meta-CDX2-Low group (log rank p=0.015) as already shown by Dalerba et al⁷ (figure 1A). However, when considering the 280 patients with stage II, III and IV CRC for whom the administration of a systemic chemotherapy was provided, no difference in DFS was observed between the Meta-CDX2-High and Meta-CDX2-Low groups (log rank p=0.06) (figure 1B). Furthermore, within the 302 patients in Meta-CDX2-High group with stage II, III and IV CRC for whom the information of

the administration systemic chemotherapy was provided, there was no DFS difference between those receiving chemotherapy (n=149) or not (n=153), log rank p=0.1 (figure 1C).

These results confirm the prognostic role of CDX2 expression for patients affected with CRC, as low level of CDX2 expression negatively impacts DFS. However, in the subgroups of patients treated with chemotherapy, the beneficial effect of CDX2 expression on DFS seems lost and reciprocally.

Impact of CDX2 on chemoresistance of CRC cells in vitro

To confirm the hypothesis that CDX2 expression bestows tumors with increased chemoresistance, we first used human colon cancer Caco-2/TC7 cells that spontaneously differentiate and express CDX2 when reaching confluence¹¹ (figure 2E). Caco-2/TC7 cells cultured for 1 (i.e. non-differentiated) and 11 (i.e. differentiated) days were compared. Eleven days-cultured Caco-2/TC7 cells were significantly more resistant to 5-FU treatment and combination of 5-FU+Oxaliplatin or 5-FU+ Irinotecan compared to 1 day Caco-2/TC7 cells (figure 2A). Treatments with Oxaliplatin and Irinotecan alone showed a trend toward the same results but without significant difference (figure 2A). Survival MTT assays were also performed on colon cancer HT29/TW6-CDX2 inducible cells⁴ in the presence or absence of CDX2 expression (i.e. +/- doxycyclin). Cells expressing CDX2 were significantly more resistant to ranges of 5-FU doses (figure 2B). These cells also tended to be more resistant for protocols mixing co-treatments with 5-FU and oxaliplatin (figure 2C) but not for irinotecan (figure 2D). No change of 5-FU sensitivity was observed upon doxycyclin treatment in the HT29/TG8 control clone⁴ that only expresses GFP (figure 2E)

Thus, we showed here that CDX2 expression correlates with 5-FU chemoresistance in CRC cells.

Impact of CDX2 on ABC family transporters expression

As *ABCB1* was identified as a CDX2 target gene¹⁰, we first focused on one particular mechanism of chemoresistance, namely drug efflux through the ABC family transporters. Several members of this family were screened by RT-qPCR in HT29/TW6-CDX2 inducible (+/- doxycyclin) cells (figure 3A). Interestingly, besides *ABCB1*, the 5-FU transporter *ABCC11* was the only one whose expression was increased in the presence of CDX2 in HT29/TW6-CDX2 inducible cells (figure 3A), whereas no change of *ABCB1* and *ABCC11* expression was observed in the HT29/TG8 control clone (figure 3B). Similar results were observed in two other colon cancer cellular models (figure 3C-D). Of note, increased expression of *ABCC11* was maintained after 5-FU treatment (figure 3E). Up-regulation of *ABCC11* also correlated with the presence of CDX2 in 3D-grown colonospheres (figures 3F-4A,) and subcutaneous tumors in nude mice (figures 3G-4B).

To further confirm that *ABCC11* expression depends on CDX2, we performed more direct gain and loss of function experiments. Transfection of a CDX2-expressing plasmid led to increased levels of *ABCC11* transcripts in HCT116, SW480 and HEK 293 cell lines (figure 5A). On the contrary, silencing CDX2 with siRNA significantly decreased *ABCC11* expression in SW480 cells (figure 5B). Thus, CDX2 contributes to the expression of *ABCC11* in colon cancer cells.

Direct regulation of *ABCC11* transcription by CDX2

Examination of the genomic sequence in the vicinity of the *ABCC11* locus revealed the presence of three consensus binding sites for CDX2. To check if CDX2 regulates the transcription of *ABCC11* through these sites, we performed luciferase and chromatin immunoprecipitation assays.

First, HCT116 cells were co-transfected with luciferase reporters plasmids containing various lengths of promoter region (pABCC11-Luc S, M and L; figure 5C) and a CDX2-expressing

plasmid or not. The activity of these pABCC11-Luc reporters was stimulated by the presence of CDX2 (figure 5D). The activation level of the reporters decreased as their sizes increased, suggesting that the required transcription elements were contained within the 1-kilobase region and the presence of negative regulation elements between the 1-kb and 3.2-kb region (figure 5D).

Second, chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments were performed in HCT116 cells transfected of not with a CDX2-expressing plasmid. As shown in figure 5E, a DNA fragment containing the *ABCC11* promoter region was specifically enriched in CDX2-immunoprecipitated chromatin compared to input in the presence of CDX2. Similar results were obtained in HT29/TW6-CDX2 inducible (+/- doxycyclin) cells (figure 5E).

Altogether, these data strongly indicate that CDX2 regulates the transcription of *ABCC11* by direct interaction with its promoter.

Correlation of CDX2 and ABCC11 expression in human healthy tissues and CRC

To determine the expression pattern of *ABCC11*, we collected samples from human healthy tissues and analyzed them by RT-qPCR. Although weak, *ABCC11* expression was detected all along the digestive tract and peaked in the colon. Furthermore, *ABCC11* and *CDX2* expression profiles along the digestive tract were similar enough to be compatible with a *ABCC11* regulation by CDX2 (figure 6A).

Next, we collected samples from a local cohort of patients suffering from CRC and having undergone elective colorectal surgery. We computed clinical data and analyzed the samples by RT-qPCR and immunofluorescence. Patients were divided into 2 groups with significantly different *CDX2* expression level (Local-CDX2-high group, n=12 and Local-CDX2-low group, n=26), according to RT-qPCR data. Both groups were comparable for basic clinical and pathological characteristics (Table 2), except for MSI status which, as expected from the

literature, tended to be more frequent in the Local-CDX2-low. As shown on figure 6B, a correlation between *CDX2* and *ABCC11* expressions in colon tumors was found: the expression of *ABCC11* was significantly higher in the Local-CDX2-high group compared to the Local-CDX2-low group ($p < 0.05$). These data were confirmed by immunofluorescence on representative samples: the fluorescence signal was higher for ABCC11 (membranous staining) in samples from the Local-CDX2-high (figure 6C). Given that the local cohort seemed not representative (high proportion of CDX2-low), we sought to confirm this result on a larger cohort of patients. Thus, we analyzed the *ABCC11* expression profile in the NCBI-GEO meta-cohort of 1237 patients and observed a similar correlation between *CDX2* and *ABCC11* expressions in CRC samples (figure 6D).

Taken altogether, these data strengthen the proposal of *ABCC11* being a new CDX2 target gene in the gut that persists upon CRC.

Inhibition of ABCC11 in CDX2 overexpressing cells

To study the contribution of ABCC11 to the 5-FU resistance induced by CDX2, we performed survival assays upon loss of function of ABCC11.

MTT survival assays were performed on HT29/TW6-CDX2 inducible cells treated 48h with 5-FU and cultured in presence or absence of doxycycline (CDX2 overexpression) and with or without an ABCC11 inhibitor (MK-571). As shown on figure 7A, 5-FU-sensitivity of HT29/TW6-CDX2 induced cells (i.e previously 5-FU resistant) was significantly restored to the level of the HT29/TW6-CDX2-non-induced cells upon MK-571 treatment. A similar trend was observed upon siRNA silencing of ABCC11 expression in HT29/TW6-CDX2 inducible cells (figure 7B). Thus, overexpression of the ABCC11 transporter, secondary to the presence of CDX2, may contribute to 5-FU resistance in CRC cells.

Other potential mechanisms of 5-FU-chemoresistance induced by CDX2 in CRC cells

With the awareness that the overexpression of ABC transporters may not be the only mechanism implicated in the 5-FU chemoresistance of CRC cells, we performed RT-qPCR analyzes in HT29/TW6-CDX2 inducible cells in the presence or absence of doxycyclin evaluating various genes implicated in the 5-FU metabolism, apoptosis or the MMR DNA repair mechanism. We observed that CDX2 overexpression increased the levels of *DPYD* that encodes the dihydropyrimidine dehydrogenase, responsible for the 5-FU break down. The expression of the other screened genes (*UMPS*, *TYMS*, *TYMP*, *MTHFR*, *BAX*, *Bcl2*, *MSH2* and *RAD18*) was not modified by CDX2 overexpression (figure 8A).

We then compared the *DPYD* expression profile in the Meta-CDX2-High and Meta-CDX2-Low groups and observed a correlation between *CDX2* and *DPYD* expressions in CRC samples (figure 8B).

Discussion

Most CRC patients undergo systemic 5-FU-based chemotherapy but efficacy is often hampered by toxicity (leading to dose limitation and/or treatment discontinuation) and resistance mechanisms in tumor cells. To overcome these clinical issues, deciphering the molecular determinants involved in the inter-individual variability in drug response is necessary. Here, using a comprehensive translational approach, we provide evidence that the intestinal master gene CDX2 is associated with reduced efficacy of chemotherapy in CRC and controls the expression of genes involved in the efflux and catabolism of 5-FU metabolites.

The role of CDX2 expression as an independent survival prognostic factor in CRC is exponentially emerging through the publication of several studies based on transcriptomic analyses. There is nowadays no doubt that the loss of CDX2 expression in CRC worsens patients' prognosis and may be a determinant to propose systemic chemotherapy for stage II

and III diseases^{7,8,12}. The loss of CDX2 correlates with colon cancer cells having a highly immature progenitor-cell phenotype and has been associated with several features of aggressiveness. The present study, based on a meta-analysis of 1237 patients, confirms these results, with significantly more right-sided and poorly differentiated tumors, K-RAS and B-RAF mutated tumors in the CDX2-Low tumors group as already described^{6,13}. However, this subgroup corresponds to a minority of patients (mean CDX2-Low tumors rate is 16% in Yuan et al. meta-analysis, range 5-50%)¹⁴ and most of CRC tumors express some level of CDX2^{15,16}. Paradoxically, we found that even if CDX2 expression correlates with better DFS rates, it is associated with lower response rates to systemic chemotherapy in CRC. Similarly, Yuan et al. showed by pooling 26 retrospective human that a high CDX2 level reflects a favorable 5-year OS for patients with gastric cancer, CRC and other cancer types such as ovarian and bilio-pancreatic tract cancers¹⁴. However, CDX2 expression was not associated with the chemotherapeutic effects in solid malignancies, CRC included. Very recently, Bruun et al. also found that CDX2 expression does not correlate with benefit from systemic chemotherapy in CRC, as well as sensitivity to conventional chemotherapeutics in colon cancer cell lines⁹. On the contrary, a panel of CDX2-negative cell lines was significantly more sensitive to irinotecan and to a weaker extent (i.e. without statistical significance) to 5-FU and oxaliplatin. Using an inducible colon cancer cell model that prevents possible clonal bias and has been validated in vivo⁴, we more directly showed that the presence of CDX2 confers resistance towards 5-FU.

At the molecular level, we identified two genes up-regulated by CDX2 that may contribute to 5-FU chemoresistance. The first gene, *ABCC11*, encodes a member of the multidrug resistance-associated protein (MRP) family and suggests a mechanism of increased drug efflux. Previous studies indicated that CDX2 stimulates the expression of *ABCB1*, encoding Multidrug resistance 1 protein (MDR1), and thereby confers resistance to vincristine and

paclitaxel to colon cancer cells¹⁰. Interestingly, *ABCC11* is able to transport the 5-FU active metabolite¹⁷, which in the cornerstone of actual CRC chemotherapy, and was shown to mediate 5-FU chemoresistance in lung¹⁸ and breast¹⁹ cancer. Using gain/loss of function, ChIP and reporter gene assays, we showed that *ABCC11* is a direct transcriptional target of *CDX2*. Yabuuchi et al reported that *ABCC11* expression is increased in colon adenocarcinoma and we found a good correlation with *CDX2* expression for tumors of our meta-cohort²⁰. The role of *ABCC11* in CRC has been poorly studied so far. Krizkova et al. recently showed that the DFS of 5-FU-treated patients for CRC after R0 resection was significantly modified by the *ABCC11* protein expression level²¹. However, low expression and presumably lower efflux was found in patients with poor DFS suggesting that this interaction is likely not functional in terms of 5-FU treatment. Curiously, the same team reported in a previous publication that *ABCC11* transcript level was significantly lower in non-responders in comparison to responders for patients palliatively treated with 5-FU-based systemic chemotherapy for metastatic CRC²², but they observed the same results for DFS on patients who had R0 resection of primary CRC. However, in both studies, survival analyzes for DFS were performed on a small number of patients who all had R0 resection without distant metastasis and DFS definition was unconventional (i.e. not really evaluating chemotherapy response).

Given the regulation of *ABCC11* by *CDX2* in CRC and the inherent tumors behavior previously cited, these results seem at the moment inconsistent with our findings. In addition, we showed that inhibition of *ABCC11* activity nearly suppresses 5-FU resistance conferred by *CDX2* expression in colon cancer cells. However, as we were not able to correlate *ABCC11* expression and response to chemotherapy in our meta-cohort of CRC patients, it is likely that other *CDX2* target genes are involved in this phenomenon.

The second mechanism potentially implicated in 5-FU chemoresistance associated with *CDX2* was overexpression of the *DPYD* gene, coding for the dihydropyrimidine deshydrogenase

(DPD), which is the rate-limiting enzyme in the 5-FU catabolism. The mechanism of *DPYD* regulation by CDX2 is unknown and should be investigated. However, one may postulate a direct transcriptional regulation (as new target gene) and/or an indirect regulation through REG IV as proposed by Hu et al.²³. Over 30 genetic polymorphisms have been described for the *DPYD* gene and DPD activity is highly heterogeneous among individuals. Interestingly, reduction or loss (i.e. 0.3% of the population) of DPD activity has been widely correlated with 5-FU cytotoxicity^{24,25}. Even if DPD is mostly active in the liver, positive expression has been identified in colon cancer cells²⁶ and in 47.5% of CRC²⁷. In addition, several studies indicate that DPD is a negative prognostic factor for survival and efficacy of 5-FU based regimens²⁸⁻³⁰. Thus, enhanced DPD activity upon CDX2 expression in colon cancer cells may contribute to their 5-FU resistance and should be demonstrated in future studies.

On a more conceptual level, it seems counterintuitive that a gene antagonizing tumorigenesis would be implicated in chemoresistance. One may argue that CDX2 has dual functions and acts either as a tumor suppressor gene or as an oncogene³¹. Indeed, we and others have clearly established that CDX2 suppresses intestinal tumorigenesis²⁻⁴ but CDX2 acts as an oncogene in several others malignancies (esophagus, gastric, ovarian and leukemia)^{6,14,32}. This versatility is still not clearly understood and might depend on the molecular context of the tumor cell and its microenvironment³³. One may also hypothesize that the biological function of CDX2 is hijacked by colon cancer cells. Indeed, CDX2 is driving differentiation and stimulates the expression of multiples genes involved in the function of mature intestinal cells. As a barrier facing the content of the lumen, the colon epithelium plays a protective role, namely against xenobiotics. Therefore, stimulation of genes encoding ABC transporters (i.e ABCB1, ABCC7 and ABCC11) by CDX2 may reflect its role in intestinal differentiation^{10,34}. Similarly, as differentiated cells do not proliferate, pyrimidine bases may no longer be required for DNA

synthesis and need to be catabolized through increased DPD expression. Accordingly, Emmink et al. showed that, within colonospheres, the peripheral differentiated cells expressed MDR1 and protected colonospheres from irinotecan whereas undifferentiated cells, at the center of the colonospheres, were responsible for tumor progression³⁵. Thus, expression of CDX2 may provide to genetically-altered colon cancer cells some of the functional attributes that reduce the efficacy of chemotherapy.

From a clinical point of view, our data suggest several new avenues of research. First, based on our results and the ones from other recent studies, CDX2 may be a useful marker for predicting drug resistance in CRC and guide therapeutic regimen toward the best drug's sensitivity, avoiding so side effects of potentially inefficient chemotherapy. Of note, CDX2 expression profile seems concordant between primary CRC and corresponding liver metastases suggesting the same chemosensitivity between both sites^{15,36}. Furthermore, pre-therapeutic screening of DPD activity, using liquid chromatography measures of the dihydrouracil/uracil ratio (UH₂/U) in plasma³⁷, will provide valuable information concerning both toxicity and efficacy of 5-FU based treatment and allow to adjust the dosage for each patient. Of note, different pharmacological DPD inhibitors such as gimeracil and eniluracil have been added to oral 5-FU formulations to improve 5-FU bioavailability³⁸⁻⁴⁰ and evaluation of individual DPD activity will be informative for the use of these inhibitors. Finally, even if ABC inhibitors have proven inefficient so far^{41,42}, targeting ABC transporters may still be rational to bypass this type of chemoresistance mechanism. For instance, ABCC11 inhibitors may be developed and evaluated in combination with 5-FU based regimens in randomized clinical trials.

Our study may present some limitations. Since the high number of missing clinical data in the NCBI-GEO meta-cohort, the results should be interpreted with cautiousness. OS data were not usable and the impact of CDX2 on OS is still uncertain. Furthermore, the contribution of

ABCC11 and DPD in 5-FU chemoresistance of colon cancer cells need to be further investigated. However, through this translational approach with several molecular models, we report convincing results that CDX2 seems implicated in the chemoresistance of CRC. We identified *ABCC11* and *DPYD* as molecular relays of CDX2 whose overexpression, secondary to the presence of CDX2, may contribute to the 5-FU chemoresistance in CRC.

Acknowledgments

The authors thank the Biological Resources Center (Hôpitaux Universitaires de Strasbourg) for providing human samples.

Material and methods

Cell lines

All cell lines were routinely tested for mycoplasma by PCR and were within 20 passages when used for the experiments. Human colon adenocarcinoma Caco-2/TC7 cells⁴³ were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, D. Dutscher) supplemented with heat-inactivated Fetal Bovine Serum (FBS, 20%, Gibco), essential amino-acids (1%, Gibco) and antibiotics. Human colon adenocarcinoma HCT116, SW480 cells (ATCC) and embryonic kidney HEK293 (ATCC) were grown in DMEM supplemented with FBS (10%) and antibiotics. HT29-CDX2 inducible cells (clone TW6) and control cells (clone TG8) generated from human colon adenocarcinoma HT29-16E/TR cells as described elsewhere⁴, are stably modified to express CDX2 and/or GFP upon addition of doxycycline (1 µg/ml, Sigma-Aldrich) to the culture medium; they were maintained in DMEM supplemented with FBS (10%), blasticidin (5 µg/ml, Gibco) and zeocin (100 µg/ml, Gibco). Control and CDX2-expressing HCT116

stables cell lines were established upon transfection of HCT116 cells with pCB6 (clone HC1) or pCB6-FLAG₂-mCDX2 WT (clone HW2) as previously described⁴⁴; they were maintained in DMEM supplemented with FBS (10%), G-418 (1 mg/ml, Gibco) and antibiotics.

Colonsphere and tumor formation

For colonospheres, HT29-CDX2 inducible cells (clone TW6) were seeded at 1000 cells/well in 6-well Ultra Low Attachment plates (Corning) and maintained during at least 15 days in DMEM/F12 medium (Invitrogen) supplemented with B-27 supplement (2%, Gibco), Epidermal Growth Factor (20 ng/ml, Sigma-Aldrich), Fibroblast Growth Factor (10 ng/ml, Peprotech), L-glutamine (1%, Gibco) and antibiotics in the absence or presence of doxycycline (1 µg/ml).

For xenografts, HT29-CDX2 inducible cells (clone TW6) were subcutaneously injected (2.10⁶ cells in 100 µl/injection point) in nu/nu mice (Elevage Janvier) as described¹¹. Induction of CDX2 was performed by adding doxycycline (400 µg/mL) in the drinking water. After 6 weeks, mice were sacrificed and tumors were analyzed.

Cytotoxicity assays

For HT29-CDX2 inducible cells (clone TW6) and control cells (clone TG8), seeding at 10000 cells/well in 96-well plates was performed on day 1 and addition or not of doxycycline to the culture medium occurred on day 2. Treatment with ranges of doses of 5-FU (Sigma-Aldrich), oxaliplatin (Teva Santé) and Irinotecan (Sigma-Aldrich) or vehicle was started on day 3 and amounts of live cells were evaluated 48 h later by performing MTT assays (Sigma-Aldrich). ABCC11 activity was reduced by either adding MK571 (50 µM, Sigma-Aldrich) to the culture medium or transfecting the cells with a pool of siRNA at day 2 (see transfection procedure below).

For Caco2/TC7 cells, the so-called “11-days cells” were initially seeded at 500000 cells/well in 6-well plates and maintained during 11 days. The the so-called “1-day cells” were seeded with $5 \cdot 10^6$ cells/well in 6-well plates. Caco2/TC7 cells were treated at day 1 or 11 at IC50 doses of 5-FU, oxaliplatin, irinotecan alone and in association. After 72h of treatment, cells were harvested and manually counted.

Plasmids and small interfering RNA transfections

HCT116, HEK and SW480 were seeded at day 1 with 500000 cells/well in 6-well plates. Cells were transfected at day 2 with 1 μ g of pFLAG-hCDX2¹¹ using the JetPrime transfection reagent (Polyplus Transfection) according to the recommendations of the supplier. After 48h of transfection, cells were harvested and analyzed by RT-qPCR (see procedures below).

For siRNA@CDX2 experiments, SW480 cells were seeded at day 1 with 500000 cells/well in 6-well plates and transfected at day 2 with 1 nM of stealth siRNA duplex oligoribonucleotides CDX2HSS141546 (siRNA@CDX2 546, Invitrogen) or low GC Duplex #2 as negative control (Invitrogen). After 48h of transfection, cells were harvested and analyzed by RT-qPCR (see procedures below).

For siRNA@ABCC11 experiments, CDX2-expressing HT-29/TW6 cells were seeded at day 1 with 10000 cells/well in 96-well plates. On day 2, cells were transfected with 10 nM of ABCC11 (ON-TARGETplus ABCC11 siRNA, Dharmacon) or control siRNA (ON-TARGETplus Non-targeting Pool, Dharmacon) during 24h and CDX2 was induced by adding doxycycline to the culture medium. Cells were treated with ranges of 5-FU doses at day 3 during 48h and MTT assays were performed at day 5.

All siRNA duplexes were transfected with Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen).

Luciferase reporter gene assays

To obtain pABCC11-Luc constructs, a 3.2, a 2.5 and a 1kb DNA fragments were generated by PCR using HT29 cells genomic DNA, the PCRx Enhancer System (Invitrogen) and ABCC11-promoter specific forward (F) and reverse (R) primers (3.2 kb F: TTT CTC TAT CGA TAG GTA CCT CAT ACT ATA GCT GAA AGG TGA GA; 2.5 kb F: TTT CTC TAT CGA TAG GTA CCT GTT CAT ACT GCC TCA TGA CAA TCA ; 1 kb : TTT CTC TAT CGA TAG GTA CCT GCA TGC CAT CAT ACC CAG CCT CA; R all 3: GAT CGCAGA TCT CGA TGT CGA TGC CAC GAT TCA CGA). The PCR products were inserted into KpnI and XhoI of pGL3-basic (Promega) with the « In Fusion HD » cloning kit (Clontech). Each new construct was checked by sequencing (GATC Biotech).

HCT116 (0.5×10^6) cells were co-transfected with 700 ng of pABCC11-Luc, 400 ng of pFLAG-hCDX2¹¹ and 35 ng of pRL-null (Promega) using JetPEI (Polyplus Transfection). Luciferase activity was performed with the Dual-Luciferase Reporter Assay (Promega) as described⁴. Data presented correspond to a representative experiment performed in triplicate

Chromatin immunoprecipitation (ChIP)

ChIP experiments were performed as previously described¹¹ using either transfected HCT116 cells (pFlag-CMV2 vs pFlag-hCDX2 plasmid) or HT29-CDX2 inducible cells (+/- doxycycline). After 48h, transfected cells were fixed with 1% (v/v) formaldehyde for 10 min at room temperature and quenched with 0.125 M Glycine for 5 min. ChIP experiments were carried out using the Magna ChIP™ G Chromatin Immunoprecipitation kit as advised by the supplier (Millipore). Sheared crosslinked chromatin from $\sim 10^6$ cells was incubated overnight at 4°C with 1 µg of normal mouse IgG (Santa Cruz Biotech), or anti-CDX2 (clone 88, Biogenex) antibody. Inputs were used as references and correspond to non-immunoprecipitated sheared crosslinked chromatin from $\sim 10^5$ cells (1%). qPCR analyses were performed with Power

SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) as recommended, using 1/100th of purified DNA as template and primers located in the promoter region of either *ABCC11* (F: CAT TCT TCA TTT ATT GAG CAC CTG; R: TGC TTT CCT CGC TGT TGA AT, Invitrogen), *CDH17* (F: TGT CTT TCC TCA TGT CTT CTG AGT; R: GCG CCA TGT CTG AGC AAT, Invitrogen) or *SI* (F: GGC TGG TAA GGG TGC AAT AA ; R : GCC TGT TCT CTT TGC TAT GTT G, Invitrogen). Enrichments relative to inputs were calculated according to the formula $\% \text{ input} = 2^{(\text{Ct input} - 6.64 - \text{Ct CHIP})} \times 100$.

RNA extraction and RT-qPCR

Total RNA was extracted using TRI Reagent (Molecular Research Center). For tissues, the Precellys24 homogenizer (Bertin Technologies) was used according to the manufacturer protocol before extraction. cDNA synthesis (RT) was performed with 2 µg of RNA with either the High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, cell samples) or the Cloned AMV Reverse Transcriptase kit (Invitrogen, tissue samples) according to the suppliers' recommendations. Quantitative PCR (qPCR) reactions were performed in technical duplicates with diluted cDNAs (5x), FastStart universal Probe Master-Rox (Roche) and gene-specific TaqMan probe and primers sets (TaqMan Gene Expression Assays, Applied Biosystems, Table 3) on a 7500 real-time PCR System (Applied Biosystems). Analyzes of the results were performed with the 7500 software v2.0.1 (Applied Biosystems) using a ΔCt or a relative $\Delta\Delta\text{Ct}$ quantification method. *B2M* (tissue samples) or *TBP* (cell samples) were used as reference genes.

Immunoblot analysis

Cells were rinsed with cold PBS, scraped in NP-40 lysis buffer (50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 2 % NP-40) containing CompleteTM protease inhibitors (Roche) and extracts were

precleared by centrifugation after 10 min. Protein concentrations were measured using Bio-Rad Protein Assay. 20 μ g of proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to 0.2 μ m Hybond P PVDF membranes (Amersham). Membranes were saturated at room temperature (RT) for 45 min in PBS containing 1 % BSA and incubated at 4 °C overnight with one of the following primary mouse monoclonal antibodies: Cdx2 (Biogenex; 1/5000) or Actin (clone C4, Chemicon; 1/15 000). For the detection, peroxidase-conjugated sheep anti-mouse IgG antiserum (Amersham; 1/5000) were used at RT for 45 min. Finally, the membranes were developed using ECL (Amersham). ReBlot Plus Strong Antibody Stripping Solution (Chemicon) was used as recommended to strip the membranes.

Immunofluorescence

Immunofluorescence was performed on dried and fixed (4% PFA, 15 min) frozen sections. After antigen-retrieval (10 min in 10mM Sodium citrate pH6), sections were blocked (5% NGS-0.1% Triton-PBS, 1h at room temperature), incubated O/N at 4°C with diluted primary antibodies (1/250^e anti-ABCC11 H-215 or S-19 from Santa Cruz Biotech and 1/5000^e anti-CDX2 from Biogenex), washed 3 times for 5 min with 0.1% Triton-PBS, incubated 1h at RT with diluted secondary antibodies (1/500^e Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG, Invitrogen), stained for DAPI (1/20000^e for 15 min at RT, Sigma-Aldrich) and mounted with FluorSave Reagent (Millipore). Imaging was based on optical sectioning using the ApoTome system (Zeiss) and the ImageJ software.

Human tissue samples

Frozen tissue samples, mostly originating from the General and Digestive Surgery Department (Hautepierre Hospital, Strasbourg, France), were obtained through the Biological Resources Center (Strasbourg University Hospital, France). They included 61 healthy tissue samples from

different parts of the digestive tract (stomach n=5, duodenum n=5, jejunum n= 1, ileum n =5, colon n= 40, rectum n=5) and 38 CRC samples (i.e. the so-called local cohort). All patient gave their written informed consent for the analyses of their clinical and biological data. The database complies with applicable local regulations and ethical principles (Declaration of Helsinki, Fortaleza 2013) related to data processing, files and personal freedom and privacy. For each patient, the following data were extracted: gender, age, WHO performance status, BMI, TNM stage and histopathological characteristics.

CRC Patients Gene Expression Datasets

12 publicly available CRC gene expression datasets (listed in table 4), annotated or not with survival and clinical information, were selected in the Gene Expression Omnibus at NCBI for their similar analyses features: all of them were obtained using the Affymetrix platform GPL 570 Human Genome U133 Plus 2.0 Array and analyzed with a Robust Multi Array analysis (RMA) algorithms^{45,46}. 20 others screened gene expression datasets were excluded from the pooling as they did not met the previous criteria. Raw data were extracted and, in order to remove biases due to data having been collected in different centers, we computed z-score for each data before merging them into a meta-cohort.

Statistical analyses on CRC patients

The 1237 patients of the meta-cohort and the 38 patients of the local cohort were classified in 2 groups (Meta/Local-CDX2-High or Meta/Local-CDX2-Low) according to the level expression of CDX2 determined by a Ward's method (hierarchical cluster analysis) with XLSTAT software (Addinsoft, France). Continuous variables are presented as numbers (with percentage), the mean (+/- standard deviation) or median (with range). Groups were compared using the Chi-squared and Fisher's exact tests when appropriate for categorical variables,

whereas Mann-Whitney tests were used for continuous variables. When available, disease free survival (DFS) and overall survival (OS) analyzes were performed on the pooled population using the Kaplan-Meier method and compared using the log-rank test with XLSTAT software.

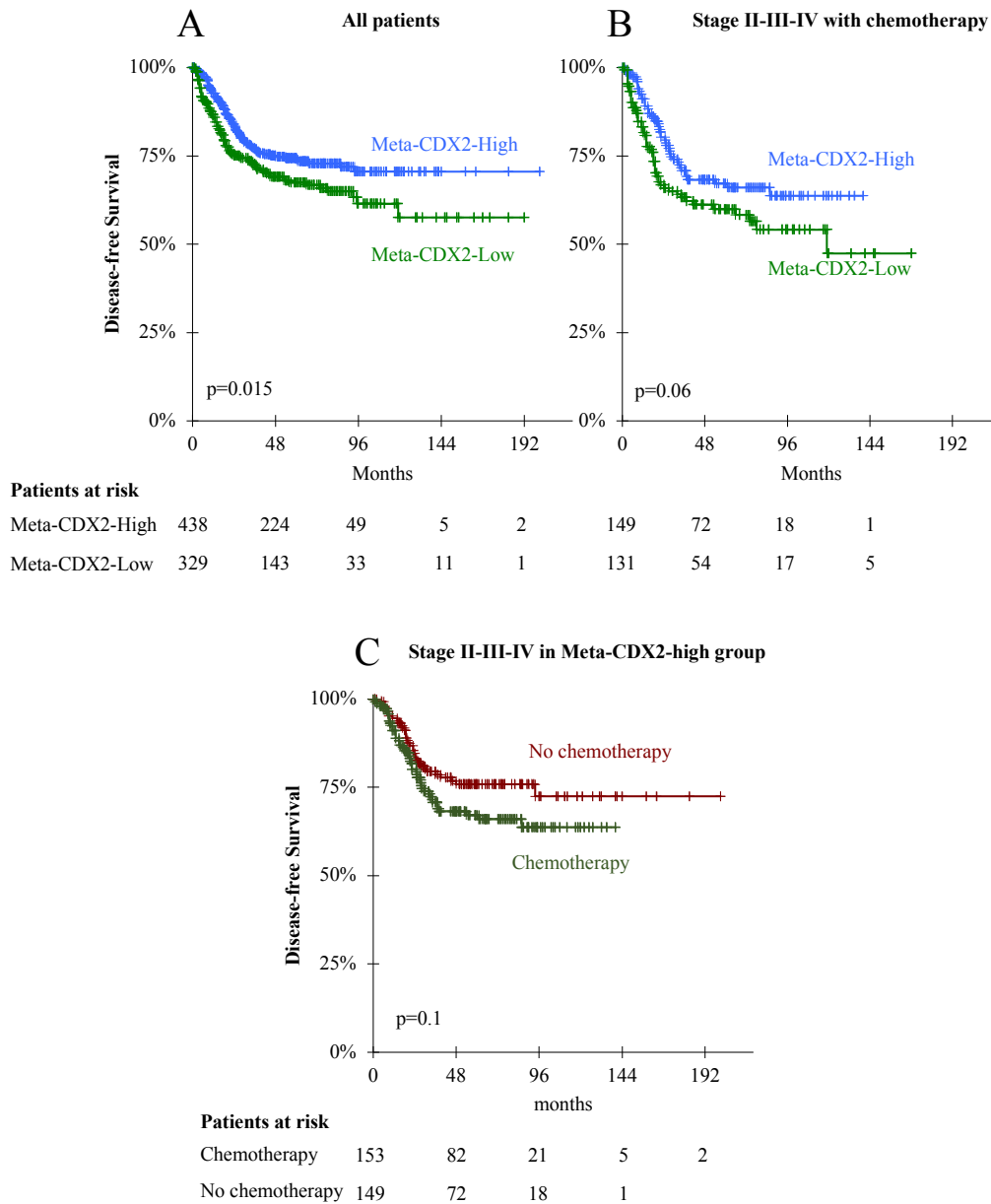


Figure 1. Loss beneficial effect of CDX2 expression on DFS.

Disease-free survival curves in the NCBI-GEO meta-cohort comparing (A) all patients for whom survival data were available, (B) patients with stage II, III and IV CRC for whom the administration of a systemic chemotherapy was provided, according to the expression level of CDX2 (Meta-CDX2-High vs meta-CDX2 Low groups) and (C) patients of the Meta-CDX2-High group with stage II, III and IV CRC according to the administration of systemic chemotherapy. p-value indicates results of the log-rank tests.

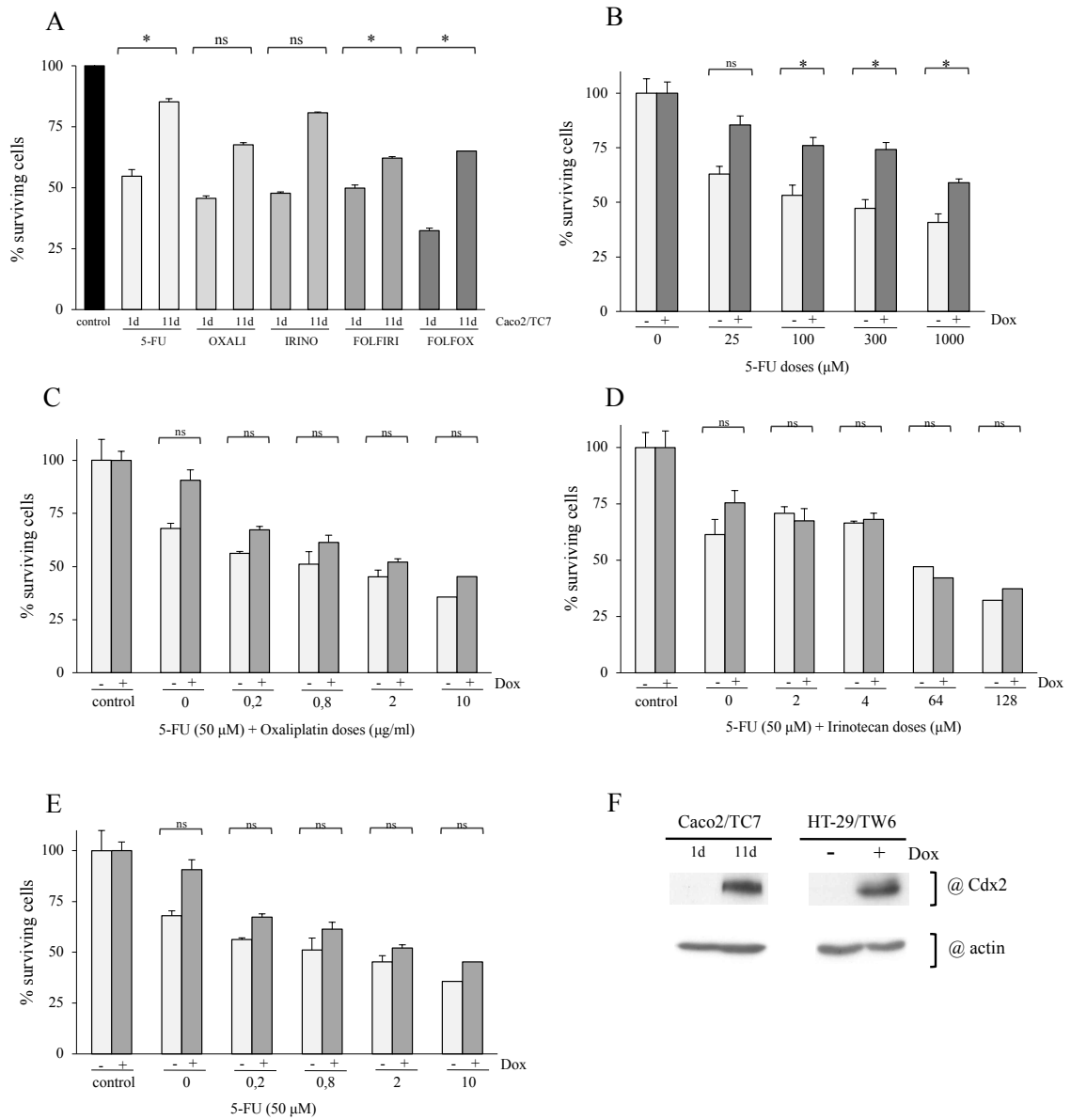


Figure 2. Impact of CDX2 on chemoresistance of CRC cells in vitro

Survival assays of (A) Caco2/TC7 cells cultured for 1 (undifferentiated) and 11 days (differentiated) and treated during 48h with different chemotherapy regimens and HT-29/TW6 cells cultured 24h in the presence or absence of CDX2 (+/- doxycycline) and treated during 48h with (B) ranges of 5-FU doses, (C) FOLFOX-type regimen, (D) FOLFIRI-type regimen and (E) HT29/TG8 control clone (+/- doxycycline) treated during 48h with ranges of 5-FU doses. (F) Western blot analyzing CDX2 protein in Caco2/TC7 cells cultured for 1 and 11 days and HT-29/TW6 cells (+/-Doxy). d days, * p-value < 0.05, ns not significant, Doxy doxycycline, @ antibody.

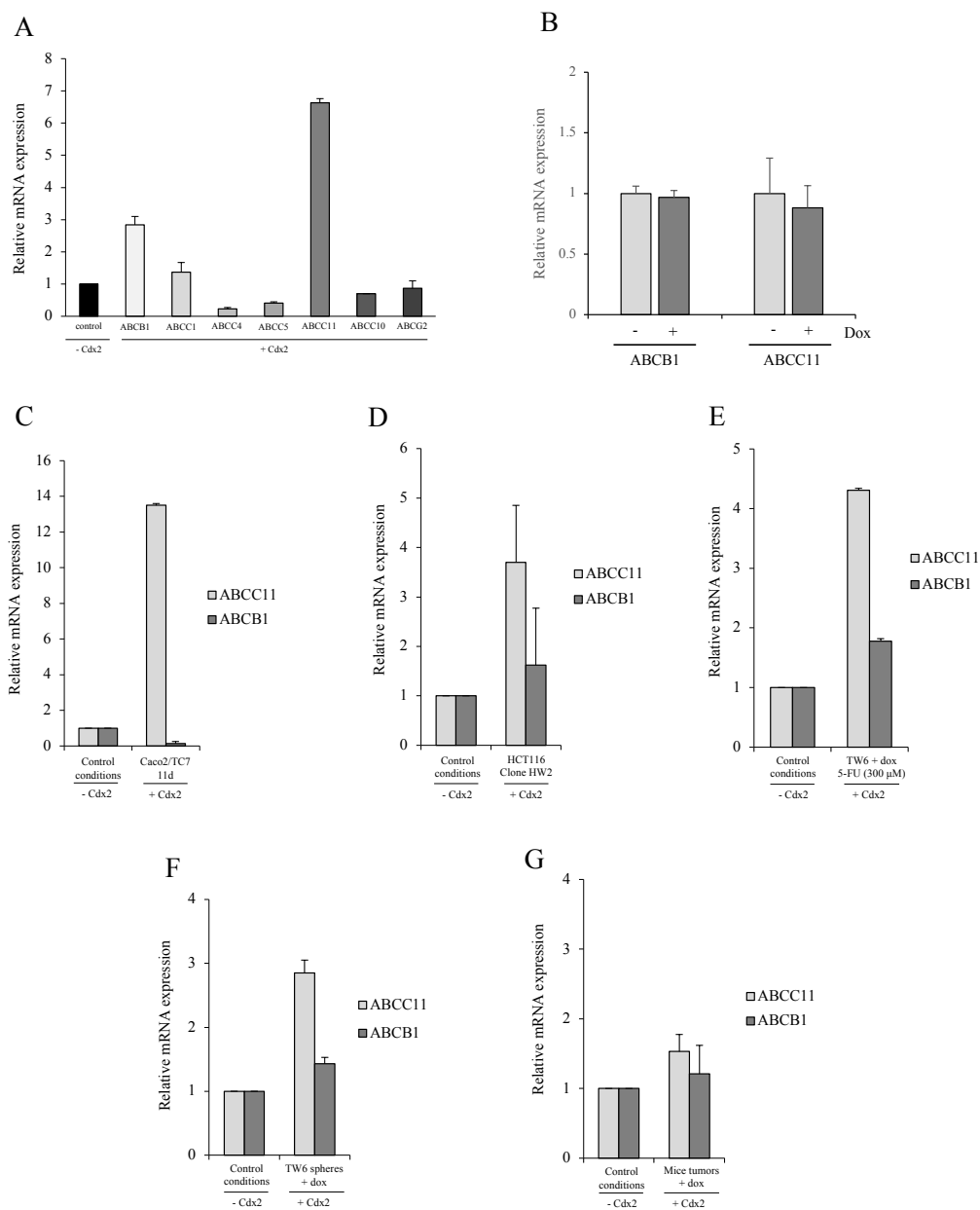


Figure 3. Impact of CDX2 on ABC family transporters expression

Results of ABC transporters expression evaluated by RTqPCR in (A) HT29/TW6-CDX2 inducible cells in the presence or absence of CDX2 (+/- doxycyclin), (B) HT29/TG8 respective control clone, (C) Caco2/TC7 cells cultured after 1 and 11 days, (D) control (clone HC1) and CDX2-expressing HCT116 stables cell lines (clone HW2), (E) HT29/TW6-CDX2 inducible cells in the presence or absence of CDX2 (+/- doxycyclin) and after 48h treatment of 5-FU (300 μM), (F) HT29/TW6-CDX2 inducible cells-based 3D-grown colonospheres in the presence or absence of CDX2 (+/- doxycyclin), and (G) HT29/TW6-CDX2 inducible cells-based subcutaneous tumors in nude mice in the presence or absence of CDX2 (+/- doxycyclin). d days, 5-FU 5-fluorouracile, Dox doxycycline.

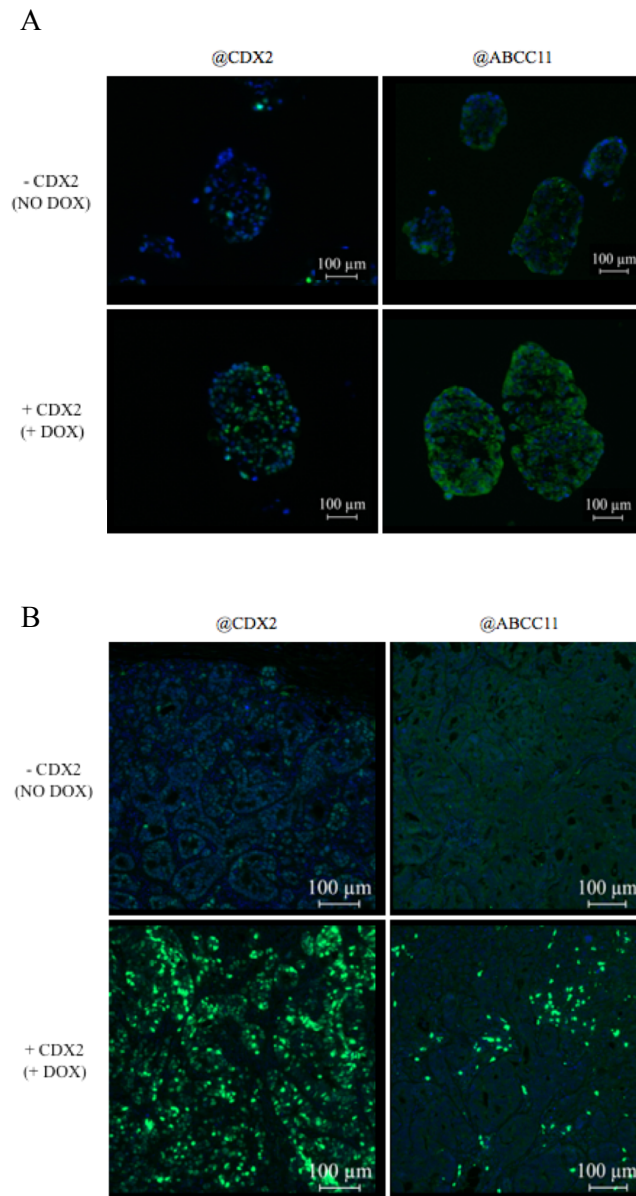


Figure 4. Impact of CDX2 on ABCC11 expression

Detection of CDX2 and ABCC11 by immunofluorescence in (A) HT29/TW6-based colonospheres and (B) HT-29/TW6 subcutaneous tumors of nude mice in the presence and absence of CDX2 (+/- doxycycline). Dox doxycycline, @ antibody.

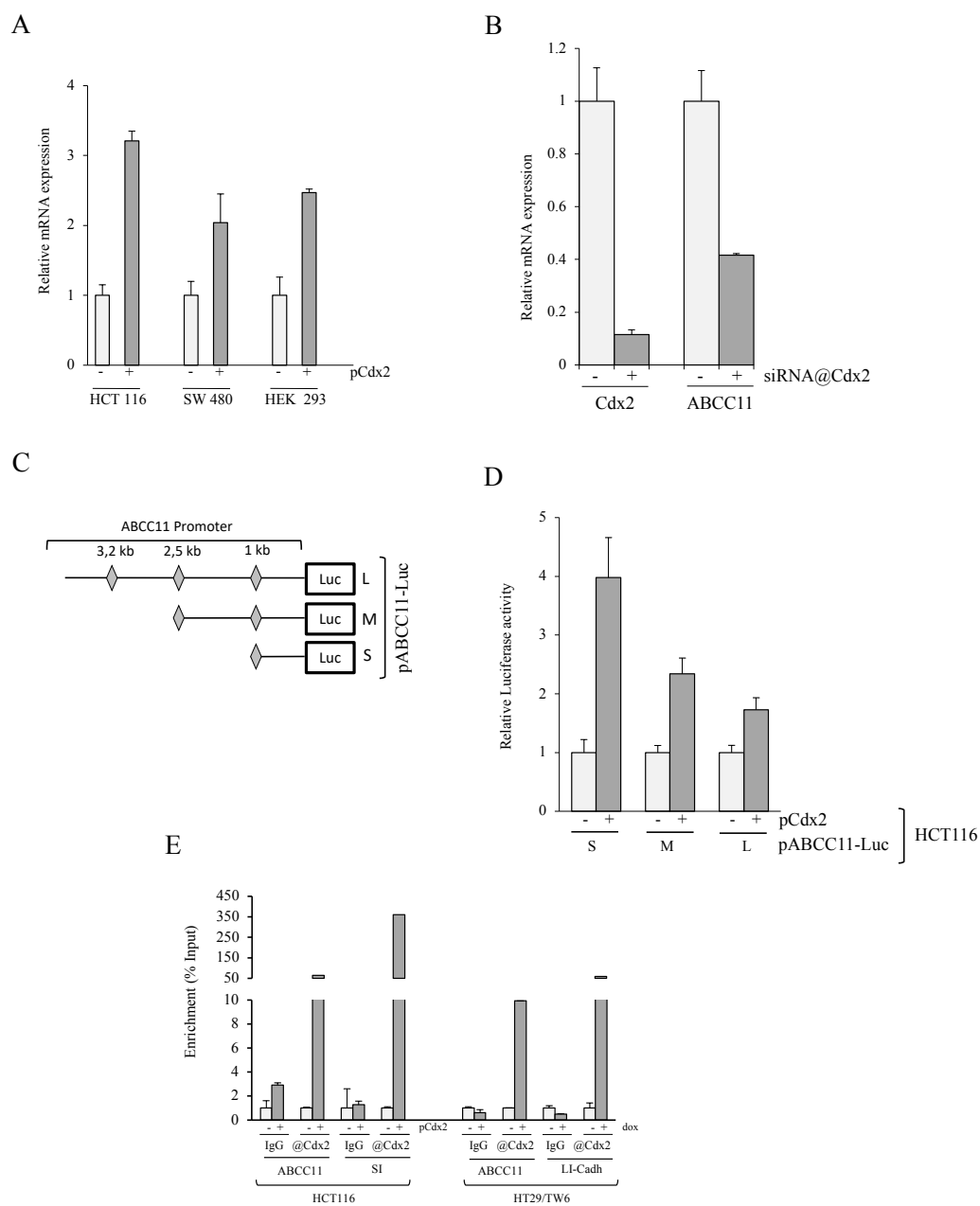


Figure 5. Direct regulation of ABCC11 transcription by CDX2

Evaluation of ABCC11 and CDX2 expression by RT-qPCR in (A) three cell lines transfected with pCDX2 (+) or control plasmid (-) and (B) SW480 cells transfected with control (-) or CDX2-silencing siRNA (+). (C) Schematic representation of the 3 luciferase reporter plasmids containing the ABCC11 promoter. (D) Activity of the pABCC11-Luc plasmids after co-transfection of pCDX2 in HCT116 cells. (E) Immunoprecipitation with control (IgG) or anti-CDX2 (@Cdx2) antibodies of the chromatin of HCT116 cells transfected with the plasmids pFlag-CDX2 (+) or pFlag-CMV2 (-) or HT29/TW6-Cdx2 inducible (+/- doxycyclin) cells, followed by PCR amplification of the ABCC11, SI or LI-cadh promoter fragment overlapping the CDX2-binding element. p plasmid, kb kilobase, Luc luciferase, Ig Immunoglobulin, @ antibody

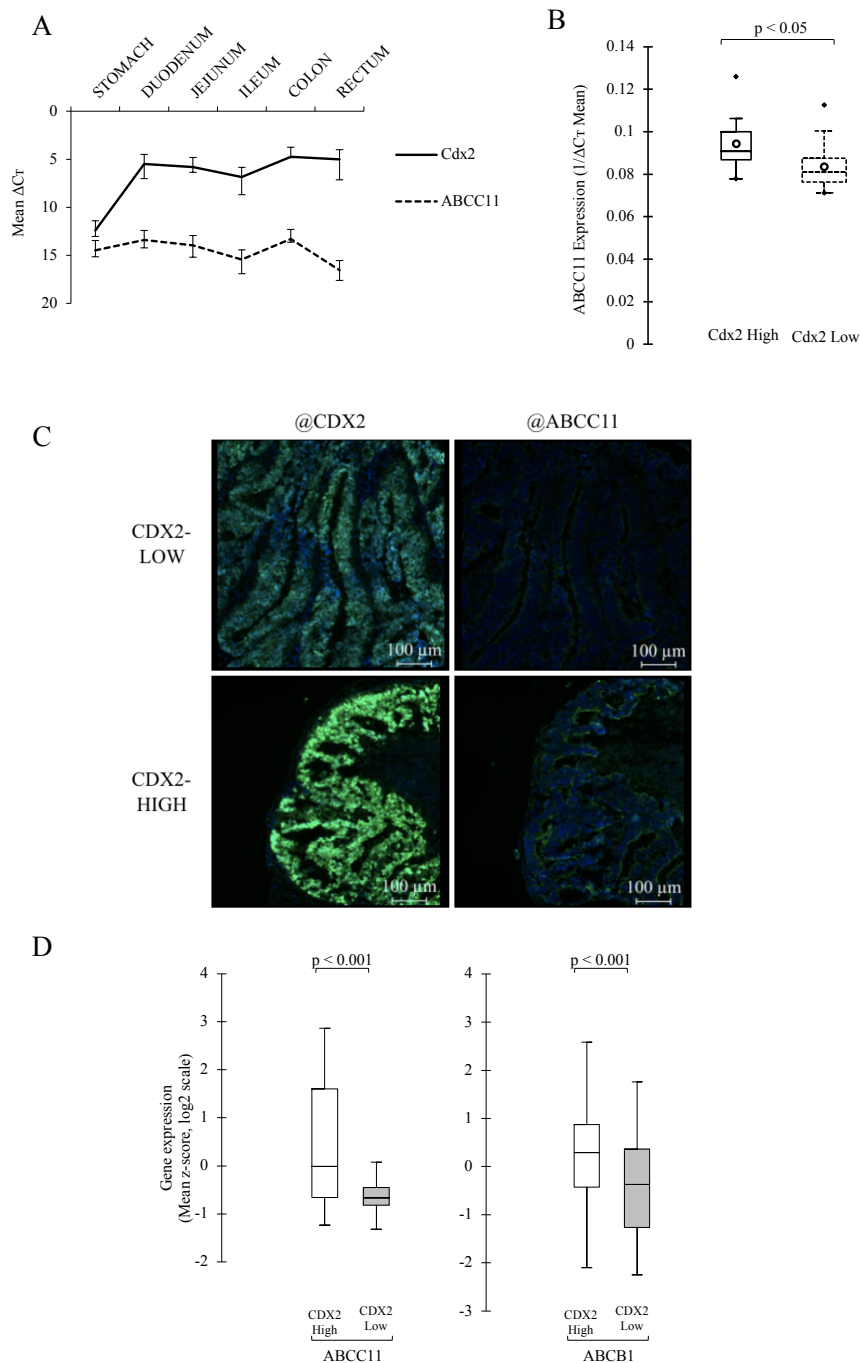


Figure 6. Correlation of CDX2 and ABCC11 expression in human healthy tissues and CRC

mRNA expression of (A) CDX2 and ABCC11 in 61 frozen samples from healthy tissues on different organs of the digestive tract (results presented as mean ΔC_t), (B) ABCC11 in 38 frozen samples of patients suffering from CRC classified according to CDX2 expression level (Local-Cdx2-high group, n=12 and Local-Cdx2-low group, n=26). (C) Immunofluorescence detection of CDX2 and ABCC11 proteins in representative CDX2-Low and CDX2-High tumors. (D) Expression of ABCC11 and ABCB1 in the NCBI-GEO meta-cohort of 1237 patients classified according to CDX2 expression level. p p-value, @ antibody.

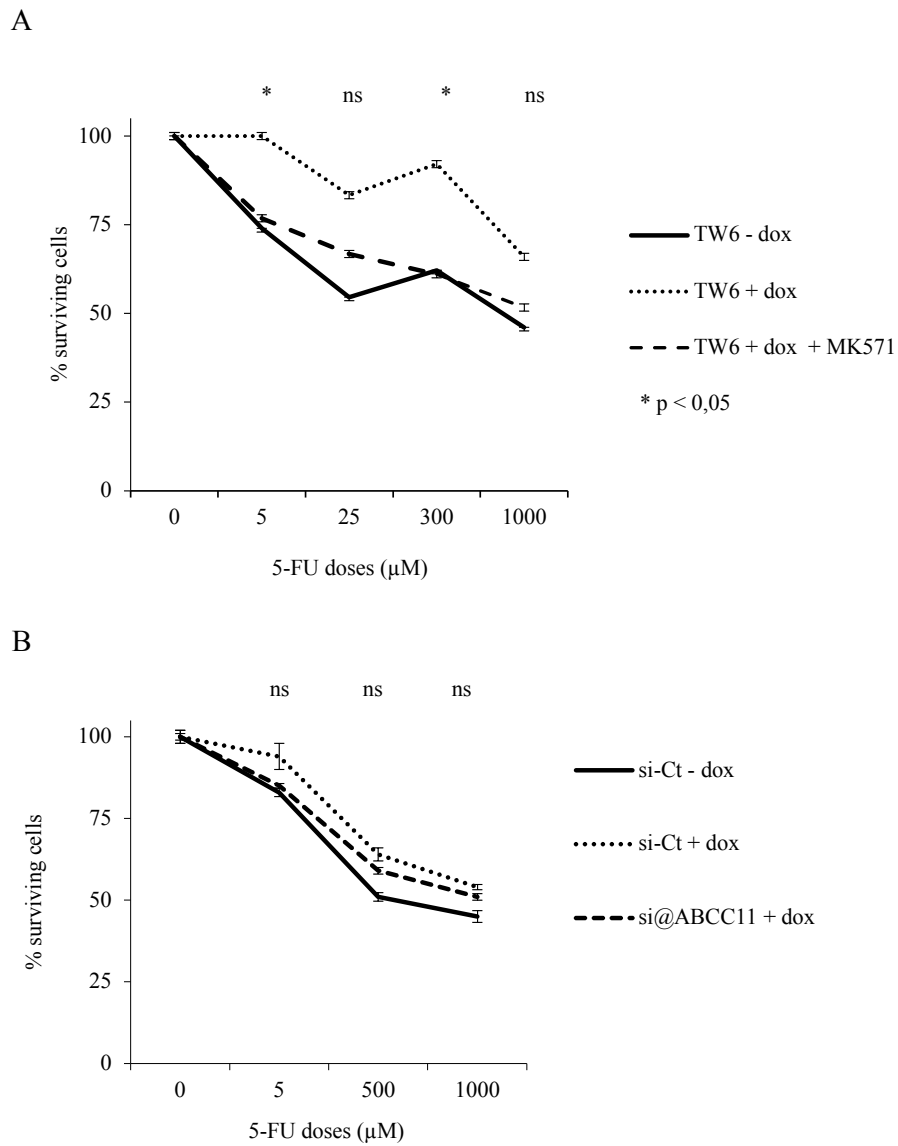


Figure 7. Inhibition of ABCC11 in CDX2 overexpressing cells

MTT assays on (A) HT-29/TW6 cells cultured 24h in the presence and absence of CDX2 (+/- doxycycline) and treated during 48h with ranges of 5-FU and the ABCC11 inhibitor MK-571 and (B) HT-29/TW6 cells cultured 24h in the presence and absence of CDX2 (+/- doxycycline) and transfected with a control (si-Ct) or ABCC11-silencing (si@ABCC11) siRNA and treated during 48h with ranges of 5-FU. TW6+dox or si-Ct+dox cells were statistically compared to TW6+dox+MK571 or si@ABCC11 + dox cells, respectively. p p-value, dox doxycyclin, Ct control, si small interfering RNA

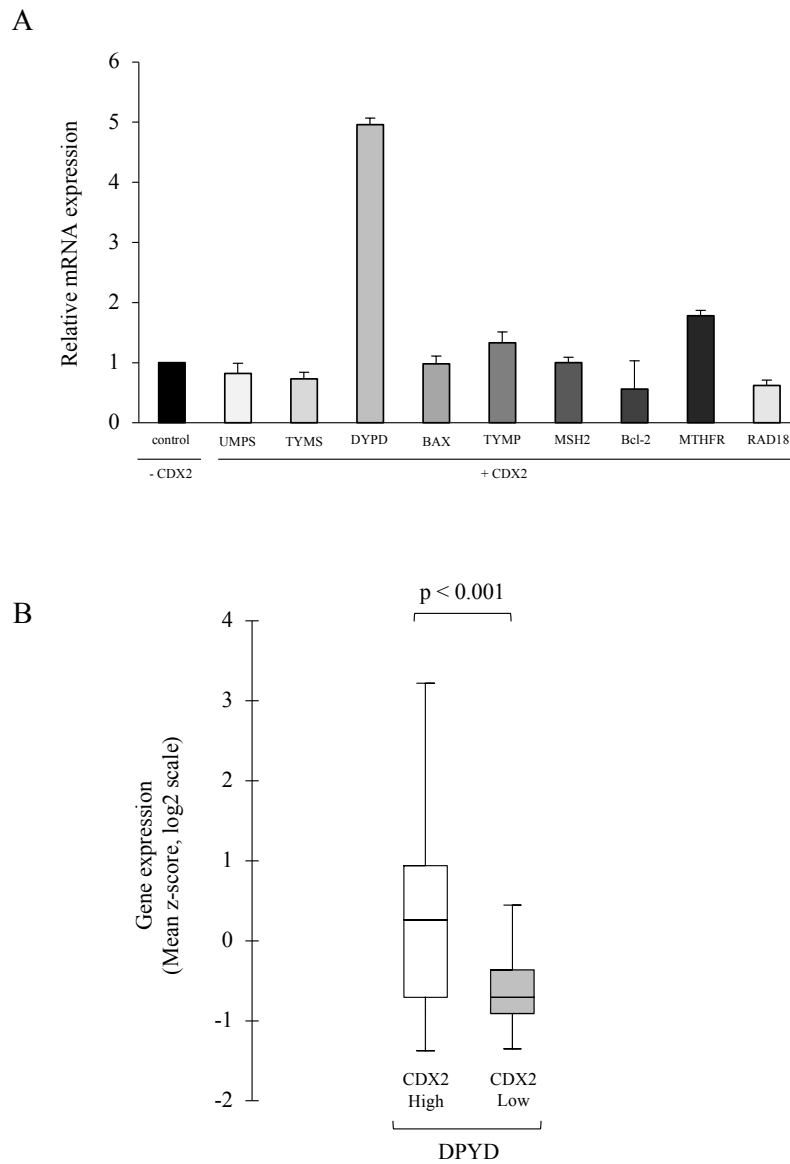


Figure 8. Other potential 5-FU mechanisms of chemoresistance of CDX2 overexpression in CRC cells

(A) RT-qPCR analyzes in HT-29/TW6 cells cultured 24h in the presence and absence of CDX2 (+/- doxycycline) of genes implicated in the 5-FU metabolism, apoptosis and in the MMR DNA repair mechanism; (B) Expression of DPYD in the NCBI-GEO meta-cohort of 1237 patients classified according to CDX2 expression level. p p-value

Tables

Table 1. Available clinical data in the NCBI-GEO meta-cohort

	Total n=1237	Meta-CDX2 Low n=440	Meta- CDX2 High n=797	p-value
<u>Gender</u>				0.69
Male	497 (53)	214 (54)	283 (53)	
Female	433 (47)	181 (46)	252 (47)	
unknown	307	45	262	
Mean Age (years)	65.8 (22-97)	66.6 (22-93)	65.1 (29-96)	0.21
<u>Side</u>				<0.001
Proximal	317 (41)	189 (53)	128 (31)	
Distal	451 (59)	167 (47)	284 (69)	
Unknown	469	84	385	
<u>UICC Tumor stage</u>				0.006
0	1	0	1	
1	87 (9)	25 (6)	66 (11)	
2	383 (39)	158 (40)	225 (38)	
3	324 (33)	146 (37)	176 (29.5)	
4	193 (20)	66 (17)	127 (21.5)	
unknown	251	49	202	
<u>Differentiation</u>				0.001
Well	18 (8)	2 (13)	15 (8)	
Moderate	166 (78)	12 (52)	154 (81)	
Poor	30 (14)	9 (35)	21 (11)	
unknown	1024	417	607	
<u>Molecular features</u>				
<u>KRAS mutation</u>				0.04
Yes	276 (41)	159 (44)	117 (37)	
No	402 (59)	199 (56)	202 (63)	
Unknown	560	82	478	
<u>BRAF mutation</u>				0.001
Yes	65 (10)	59 (18)	6 (2)	
No	579 (90)	277 (82)	302 (98)	
Unknown	593	104	489	
<u>Phenotype</u>				0.001
MSS	554 (85)	267 (79)	287 (92)	
MSI	96 (15)	70 (21)	26 (8)	
Unknown	587	103	484	

Results are presented as numbers (unless specified) and proportion are into brackets.

UICC: Union for International Cancer Control, MSS : Microsatellite Stable, MSI : microsatellite instability

Table 2. Clinical and pathological characteristics of patients including the local cohort

	Local-CDX2 Low n=12	Local-CDX2 High n=26	p-value
<u>Gender</u>			0.63
Male	7 (58)	13 (50)	
Female	5 (42)	13 (50)	
Mean Age (years)	69.6 (55-81)	63.5 (32-91)	0.10
<u>WHO performance status</u>			1
0-1	11 (92)	23 (88)	
≥ 2	1 (8)	2 (8)	
Unknown	0	1	
Mean BMI (kg/m ²)	27.1	29.9	0.25
<u>Site</u>			0.25
Right	5 (42)	16 (62)	
Left	7 (58)	10 (31)	
<u>Tumor stage (T)</u>			0.74
T1	0	0	
T2	2 (17)	3 (12)	
T3	9 (75)	18 (69)	
T4	1 (8)	5 (19)	
<u>Node stage (N)</u>			0.11
N0	9 (75)	11	
N1	2 (17)	5	
N2	1 (8)	10	
<u>Synchronous metastasis</u>	2 (17)	6 (23)	1
Liver	2	3	
Peritoneum	2	3	
<u>Differentiation</u>			0.73
Well	1 (8)	4 (15)	
Moderate	8 (67)	12 (46)	
Poor	0	1	
Mucinous	2 (17)	8 (31)	
unknown	1	1	
<u>Phenotype</u>			0.07
MSS	9 (75)	11 (42)	
MSI	2 (16)	11 (42)	
Unknown	1	4	

Results are presented as numbers (unless specified) and proportion are into brackets.

BMI: Body mass index, WHO: World health organization, MSS : Microsatellite Stable, MSI : microsatellite instability

Table 3. List of the Taqman probes used for RT-qPCR experiments.

Gene	Catalogue number
ABCB1	Hs00184500_m1
ABCC1	Hs00219905_m1
ABCC4	Hs00988717_m1
ABCC5	Hs00981087_m1
ABCC10	Hs00375701_m1
ABCC11	Hs01090768_m1
ABCG2	Hs01053790_m1
CDX2 (Caudal type homeobox 2)	Hs00230919_m1
CDX2 (Caudal type homeobox 2)	Mm00432449_m1
BCL2	Hs00608023_m1
B2M	Hs00187842_m1
TBP (TATA Binding Protein)	Hs00427620_m1
UMPS	Hs00923517_m1
RAD18	Hs00892551_m1
BAX	Hs00180269_m1
MTHFR	Hs01114487_m1
MSH2	Hs00953527_m1
DPYD	Hs01115750_m1
TYMS	Hs00426586_m1
TYMP	Hs00157317_m1
SI (Sucrase-Isomaltase)	Hs00356112_m1
CDH17 (LI-Cadherin)	Hs00184865_m1

Table 4. List of the NCBI-GEO datasets included into the meta-cohort

NCBI-GEO dataset	N	Pubmed ID	Reference
GSE35896	62	PMID: 23272949	Schlincker et al., BMC Med. Genomics, 2012
GSE17536	177	PMID:19914252	Smith et al., Gastroenterology, 2010
GSE17537	55	PMID:19914252	Smith et al., Gastroenterology, 2010
GSE39582	566	PMID: 23700391	Marisa et al., PLoS Med., 2013
GSE71222	152	PMID: 26499327	Takahashi et al., BMC cancer, 2015
GSE39084	70	PMID: 25083765	Kirzin et al., PLoS One, 2014
GSE54483	11	PMID: 25375918	Martinez-Garcia et al., Nat Med., 2014
GSE5275	37	PMID: 25730906	Estevez-Garcia, Oncotarget, 2015
GSE62080	21	PMID: 17327601	Del Rio, J Clin Oncol., 2007
GSE3232	17	PMID: 22399497	Khamas et al., Cancer Genomics Proteomics, 2012
GSE62932	64	PMID: 27176004	Chen et al. PloS One 2016
GSE23194	5	No ID	No reference

References

1. Ten Hoorn, S., Trinh, A., de Jong, J., Koens, L. & Vermeulen, L. Classification of Colorectal Cancer in Molecular Subtypes by Immunohistochemistry. *Methods Mol. Biol.* **1765**, 179–191 (2018).
2. Aoki, K., Tamai, Y., Horiike, S., Oshima, M. & Taketo, M. M. Colonic polyposis caused by mTOR-mediated chromosomal instability in *Apc*^{+/Delta716} *Cdx2*^{+/-} compound mutant mice. *Nat. Genet.* **35**, 323–330 (2003).
3. Bonhomme, C. *et al.* The *Cdx2* homeobox gene has a tumour suppressor function in the distal colon in addition to a homeotic role during gut development. *Gut* **52**, 1465–1471 (2003).
4. Gross, I. *et al.* The intestine-specific homeobox gene *Cdx2* decreases mobility and antagonizes dissemination of colon cancer cells. *Oncogene* **27**, 107–115 (2008).
5. Baba, Y. *et al.* Relationship of CDX2 loss with molecular features and prognosis in colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* **15**, 4665–4673 (2009).
6. Olsen, J., Espersen, M. L. M., Jess, P., Kirkeby, L. T. & Troelsen, J. T. The clinical perspectives of CDX2 expression in colorectal cancer: a qualitative systematic review. *Surg Oncol* **23**, 167–176 (2014).
7. Dalerba, P. *et al.* CDX2 as a Prognostic Biomarker in Stage II and Stage III Colon Cancer. *N. Engl. J. Med.* **374**, 211–222 (2016).
8. Pilati, C. *et al.* CDX2 prognostic value in stage II/III resected colon cancer is related to CMS classification. *Ann. Oncol.* **28**, 1032–1035 (2017).
9. Bruun, J. *et al.* Prognostic, predictive and pharmacogenomic assessments of CDX2 refine stratification of colorectal cancer. *Mol Oncol* (2018). doi:10.1002/1878-0261.12347
10. Takakura, Y. *et al.* CDX2 regulates multidrug resistance 1 gene expression in malignant intestinal epithelium. *Cancer Res.* **70**, 6767–6778 (2010).
11. Hinkel, I. *et al.* *Cdx2* controls expression of the protocadherin *Mucdhl*, an inhibitor of

growth and β -catenin activity in colon cancer cells. *Gastroenterology* **142**, 875-885.e3 (2012).

12. Tomasello, G. *et al.* Association of CDX2 Expression With Survival in Early Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Colorectal Cancer* **17**, 97–103 (2018).

13. Olsen, J. *et al.* CDX2 downregulation is associated with poor differentiation and MMR deficiency in colon cancer. *Exp. Mol. Pathol.* **100**, 59–66 (2016).

14. Yuan, J., Yin, Z., Tao, K., Wang, G. & Gao, J. Homeobox protein CDX2 as a prognostic biomarker in solid malignancies: a meta-analysis. *Oncotarget* **8**, 89160–89172 (2017).

15. Brabletz, T. *et al.* Down-regulation of the homeodomain factor Cdx2 in colorectal cancer by collagen type I: an active role for the tumor environment in malignant tumor progression. *Cancer Res.* **64**, 6973–6977 (2004).

16. Subtil, C. *et al.* Frequent rearrangements and amplification of the CDX2 homeobox gene in human sporadic colorectal cancers with chromosomal instability. *Cancer Lett.* **247**, 197–203 (2007).

17. Guo, Y. *et al.* MRP8, ATP-binding cassette C11 (ABCC11), is a cyclic nucleotide efflux pump and a resistance factor for fluoropyrimidines 2',3'-dideoxycytidine and 9'-(2'-phosphonylmethoxyethyl)adenine. *J. Biol. Chem.* **278**, 29509–29514 (2003).

18. Oguri, T. *et al.* MRP8/ABCC11 directly confers resistance to 5-fluorouracil. *Mol. Cancer Ther.* **6**, 122–127 (2007).

19. Honorat, M. *et al.* MRP8/ABCC11 expression is regulated by dexamethasone in breast cancer cells and is associated to progesterone receptor status in breast tumors. *Int J Breast Cancer* **2011**, 807380 (2011).

20. Yabuuchi, H., Shimizu, H., Takayanagi, S. & Ishikawa, T. Multiple splicing variants of two new human ATP-binding cassette transporters, ABCC11 and ABCC12. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **288**, 933–939 (2001).

21. Krizkova, V. *et al.* Protein expression of ATP-binding cassette transporters ABCC10

and ABCC11 associates with survival of colorectal cancer patients. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **78**, 595–603 (2016).

22. Hlavata, I. *et al.* The role of ABC transporters in progression and clinical outcome of colorectal cancer. *Mutagenesis* **27**, 187–196 (2012).
23. Hu, Y., Pan, C., Hu, J. & Zhang, S. The role of Reg IV in colorectal cancer, as a potential therapeutic target. *Contemp Oncol (Pozn)* **19**, 261–264 (2015).
24. Schirripa, M., Procaccio, L., Lonardi, S. & Loupakis, F. The role of pharmacogenetics in the new ESMO colorectal cancer guidelines. *Pharmacogenomics* **18**, 197–200 (2017).
25. Ruzzo, A. *et al.* Dihydropyrimidine dehydrogenase pharmacogenetics for predicting fluoropyrimidine-related toxicity in the randomised, phase III adjuvant TOSCA trial in high-risk colon cancer patients. *Br. J. Cancer* **117**, 1269–1277 (2017).
26. Gokare, P. *et al.* P53 represses pyrimidine catabolic gene dihydropyrimidine dehydrogenase (DPYD) expression in response to thymidylate synthase (TS) targeting. *Sci Rep* **7**, 9711 (2017).
27. Akagi, Y. *et al.* Expression of dihydropyrimidine dehydrogenase, orotate phosphoribosyl transferase and thymidylate synthase in patients with primary colorectal cancer, and associations with site of first metastasis. *Anticancer Res.* **32**, 2277–2282 (2012).
28. Koopman, M. *et al.* Predictive and prognostic markers for the outcome of chemotherapy in advanced colorectal cancer, a retrospective analysis of the phase III randomised CAIRO study. *Eur. J. Cancer* **45**, 1999–2006 (2009).
29. Gustavsson, B. *et al.* Molecular determinants of efficacy for 5-FU-based treatments in advanced colorectal cancer: mRNA expression for 18 chemotherapy-related genes. *Int. J. Cancer* **124**, 1220–1226 (2009).
30. Kataoka, K., Kanazawa, A., Nakajima, A., Yamaguchi, A. & Arimoto, A. Prognostic value of biomarkers in metastatic colorectal cancer patients. *J. Surg. Res.* **194**, 343–350 (2015).

31. Freund, J. N., Domon-Dell, C., Kedinger, M. & Duluc, I. The Cdx-1 and Cdx-2 homeobox genes in the intestine. *Biochem. Cell Biol.* **76**, 957–969 (1998).
32. Thoene, S. *et al.* The homeobox gene CDX2 is aberrantly expressed and associated with an inferior prognosis in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **23**, 649–655 (2009).
33. Renouf, B. *et al.* Cdx2 homeoprotein inhibits non-homologous end joining in colon cancer but not in leukemia cells. *Nucleic Acids Res.* **40**, 3456–3469 (2012).
34. Kerschner, J. L. & Harris, A. Transcriptional networks driving enhancer function in the CFTR gene. *Biochem. J.* **446**, 203–212 (2012).
35. Emmink, B. L. *et al.* Differentiated human colorectal cancer cells protect tumor-initiating cells from irinotecan. *Gastroenterology* **141**, 269–278 (2011).
36. Shigematsu, Y. *et al.* CDX2 expression is concordant between primary colorectal cancer lesions and corresponding liver metastases independent of chemotherapy: a single-center retrospective study in Japan. *Oncotarget* **9**, 17056–17065 (2018).
37. Boisdron-Celle, M. *et al.* 5-Fluorouracil-related severe toxicity: a comparison of different methods for the pretherapeutic detection of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *Cancer Lett.* **249**, 271–282 (2007).
38. Saif, M. W. *et al.* A phase I study evaluating the effect of CDHP as a component of S-1 on the pharmacokinetics of 5-fluorouracil. *Anticancer Res.* **31**, 625–632 (2011).
39. Miyamoto, Y., Sakamoto, Y., Yoshida, N. & Baba, H. Efficacy of S-1 in colorectal cancer. *Expert Opin Pharmacother* **15**, 1761–1770 (2014).
40. Miura, K. *et al.* Drug delivery of oral anti-cancer fluoropyrimidine agents. *Expert Opin Drug Deliv* **14**, 1355–1366 (2017).
41. Nielsen, D. L., Palshof, J. A., Brünner, N., Stenvang, J. & Viuff, B. M. Implications of ABCG2 Expression on Irinotecan Treatment of Colorectal Cancer Patients: A Review. *Int J*

Mol Sci **18**, (2017).

42. Binkhathlan, Z. & Lavasanifar, A. P-glycoprotein inhibition as a therapeutic approach for overcoming multidrug resistance in cancer: current status and future perspectives. *Curr Cancer Drug Targets* **13**, 326–346 (2013).
43. Chantret, I. *et al.* Differential expression of sucrase-isomaltase in clones isolated from early and late passages of the cell line Caco-2: evidence for glucose-dependent negative regulation. *J. Cell. Sci.* **107 (Pt 1)**, 213–225 (1994).
44. Gross, I. *et al.* Phosphorylation of the homeotic tumor suppressor Cdx2 mediates its ubiquitin-dependent proteasome degradation. *Oncogene* **24**, 7955–7963 (2005).
45. Irizarry, R. A. *et al.* Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res.* **31**, e15 (2003).
46. Shedden, K. *et al.* Comparison of seven methods for producing Affymetrix expression scores based on False Discovery Rates in disease profiling data. *BMC Bioinformatics* **6**, 26 (2005).

3.2. Projet II : Chimiorésistance induite par les dérivés organométalliques

Comme les dérivés de platine, les dérivés du ruthénium (RDC) et de l'osmium (ODC) ont une activité cytotoxique élevée et pourraient être de nouveaux outils thérapeutiques pour traiter les cancers. Toutefois, le développement de ces molécules souffre du manque d'informations quant à leur mode d'action. De plus, bien qu'une grande variété de RDC ait été synthétisée, les déterminants physico-chimiques nécessaires à leur activité cytotoxique sont encore mal connus. Le laboratoire a donc réalisé une comparaison systématique de 4 composés à base d'osmium (ODC2 et ODC3) ou de ruthénium (RDC11 et RDC34) qui présentent des caractéristiques physico-chimiques distinctes. L'impact de ces molécules sur la survie cellulaire, l'apoptose, le cycle cellulaire, la croissance tumorale, le potentiel redox, la production de ROS a été évalué. J'ai participé à cette étude en analysant la capacité de certains de ces composés à induire des mécanismes de chimiorésistance via les transporteurs de la famille ABC dans des modèles de cancers digestifs et gastriques.

3.2.1. Résumé des résultats obtenus

3.2.1.1. Effets des dérivés organométalliques sur des lignées cellulaires de cancer colique

L'analyse par RT-qPCR de l'expression de différents membres de la famille ABC dans des cellules cancéreuses coliques HT-29 (figure 25) et SW480 (figure 26) traitées avec de l'ODC-2 et du RDC-11 n'est pas en faveur de mécanismes de résistance liés à ces transporteurs. En effet, seule l'expression d'*ABCC11* semble légèrement stimulée après traitement des cellules HT-29 avec de l'ODC-2 (IC 50 : 1 μ M).

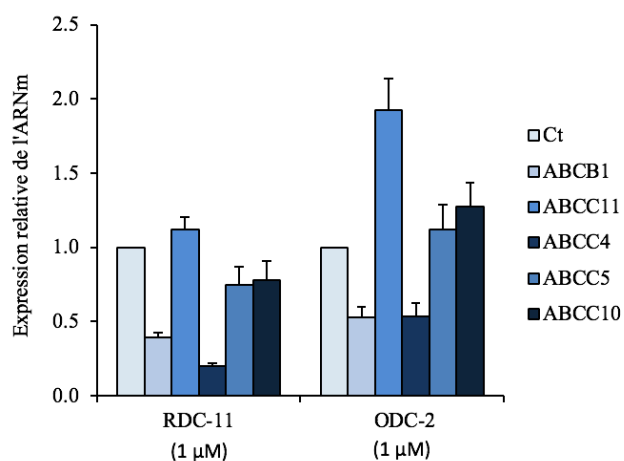


Figure 23 : Expression des transporteurs ABC dans la lignée HT-29

*RTqPCR réalisée après 48h de traitement par RDC-11 ou ODC-2
(Ct : expression du gène considéré dans les cellules non traitées)*

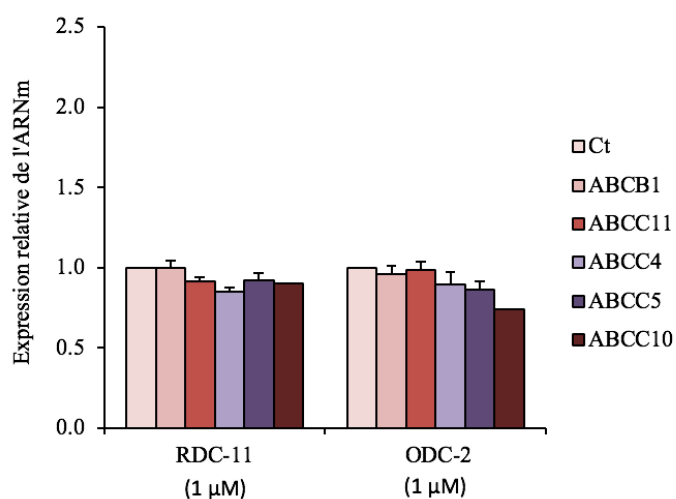


Figure 24 : Expression des transporteurs ABC dans la lignée SW480

*RTqPCR réalisée après 48h de traitement par RDC-11 ou ODC-2
(Ct : expression du gène considéré dans les cellules non traitées)*

En revanche, dans les cellules HCT116 (figure 27), l'expression des transporteurs *ABCG2* (voir publication chapitre 3-2-2, figure S4a), *ABCC11* et *ABCB1* est légèrement augmentée dans les cellules traitées avec le RDC-11 (1 μ M), suggérant l'implication potentielle de ce mécanisme dans la résistance aux dérivés organométalliques. Cependant, cette stimulation reste faible et n'est pas retrouvée dans d'autres lignées de cancer colique (HT-29/TW6 et Caco2/TC7) (figures 28 et 29).

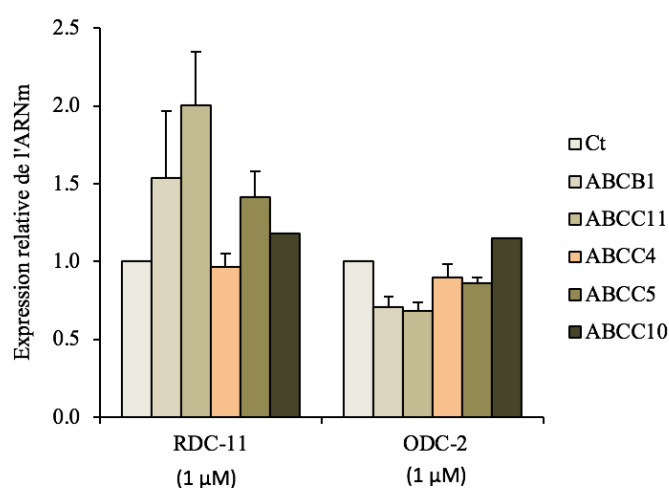


Figure 25 : Expression des transporteurs ABC dans la lignée HCT116

*RT-qPCR réalisée après 48h de traitement par RDC-11 ou ODC-2
(Ct : expression du gène considéré dans les cellules non traitées)*

De plus, l'expression accrue de certaines molécules d'efflux (*ABCB1*, *ABCG2* ou *ABCC11*) en présence de CDX2 (voir projet 1) dans les lignées Caco2/TC7 (différenciation spontanée) ou HT-29/TW6 (induction par la doxycycline) est maintenue, voire diminuée, par le traitement des cellules avec du RDC-11 (figures 28 et 29).

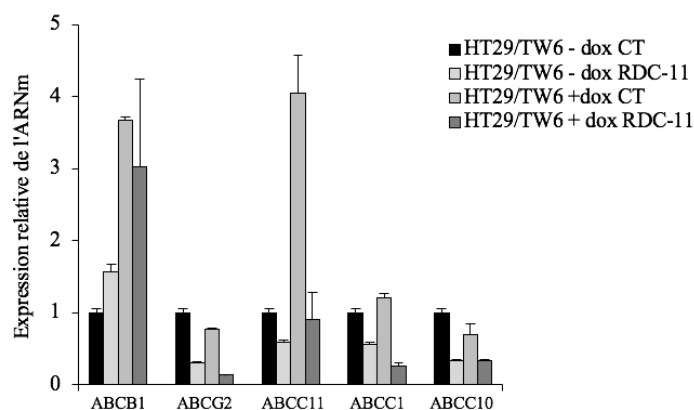


Figure 26 : Expression des transporteurs ABC dans la lignée HT-29/TW6

RT-qPCR réalisée après 48h de traitement par RDC-11 (IC30, 0,5 μ M) et 72h d'induction des transporteurs ABCB1 et ABCC11 (via Cdx2) par ajout de doxycycline (dox, 1 μ g/ml) dans le milieu de culture.

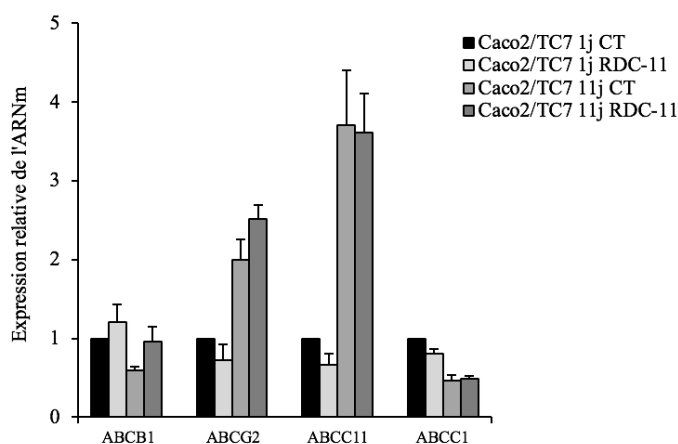


Figure 27 : Expression des transporteurs ABC dans la lignée Caco2/TC7

RT-qPCR réalisée après 48h de traitement par RDC-11 (IC50, 20 μ M) et induction des transporteurs ABCG2 et ABCC11 par différenciation spontanée (11j) comparée à des cellules moins différenciées (1j)

Pour aborder le rôle des transporteurs ABC de manière plus fonctionnelle, j'ai ensuite utilisé des inhibiteurs pharmacologiques (ABCB1 / ABCC1 : vérapamil, 5 μ M ; ABCC11 : MK571,

25 μM). J'ai réalisé des tests de survie (MTT) sur des cellules HT29/TW6 traitées à la doxycycline car ceci permet d'induire l'expression de CDX2 et d'accroître l'expression d'ABCB1 et ABCC11 (voir projet 1). Les résultats obtenus montrent que le verapamil restaure en partie la sensibilité des cellules HT29/TW6 à l'ODC-2 (figure 30 haut), contrairement à l'ODC-3 (figure 31 haut). Le MK571 (figures 30 bas et 31 bas) ne permet pas de restaurer la sensibilité des cellules HT29/TW6 aux deux ODC. Le verapamil n'a pas non plus d'effet sur la survie de cellules HCT116 traitées à l'ODC-2 (voir publication chapitre 3-2-2, figure S4).

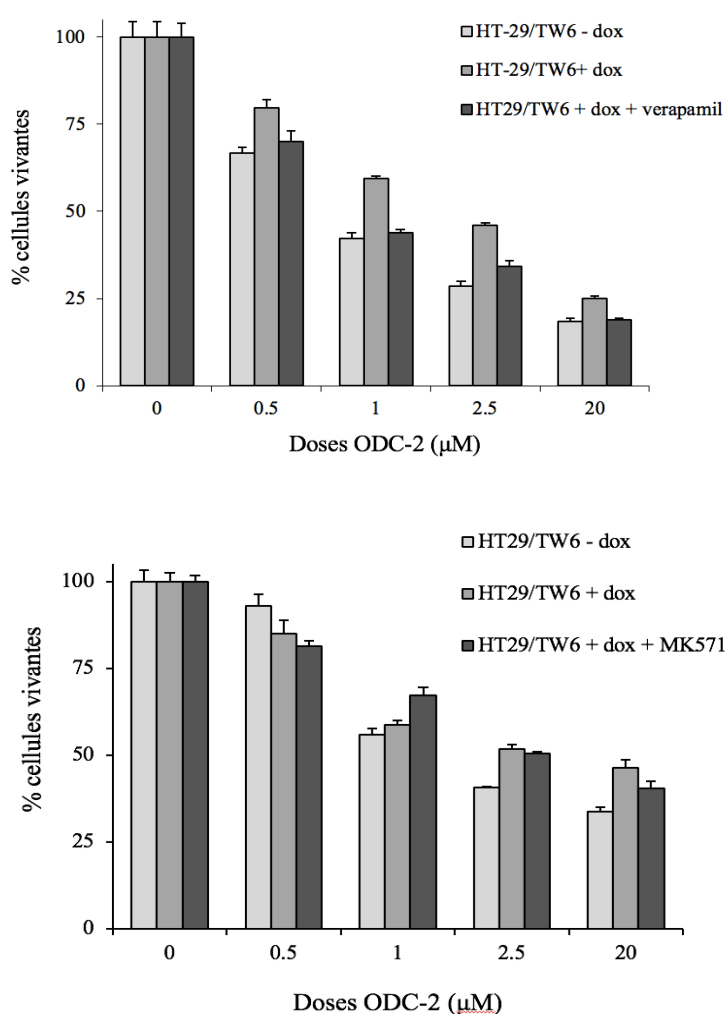


Figure 30 : Test de survie après traitement par ODC-2 (lignée HT-29/TW6)

MTT réalisé après 48h de traitement par l'ODC-2 et 72h d'induction des transporteurs ABCB1 et ABCC11 (via Cdx2) ajout de doxycycline (dox, 1 $\mu\text{g/ml}$) dans le milieu de culture et en présence d'inhibiteurs de ces transporteurs (verapamil 5 μM et MK571 25 μM)

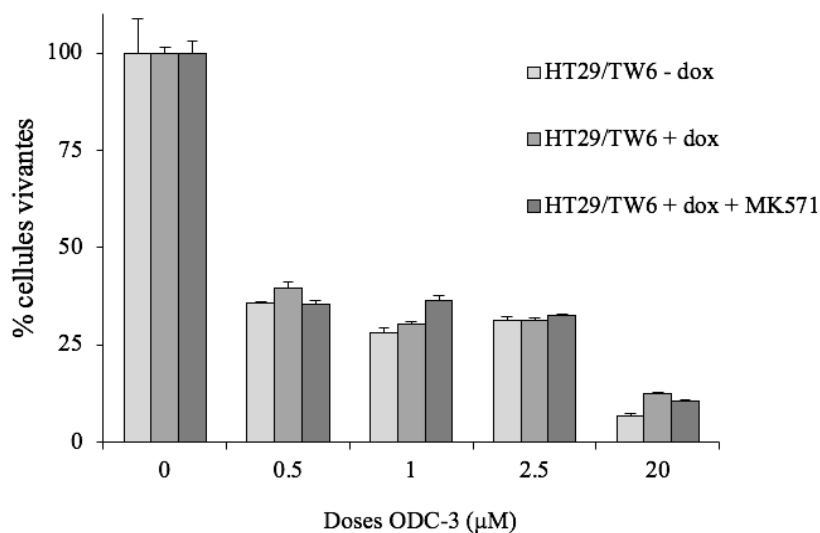
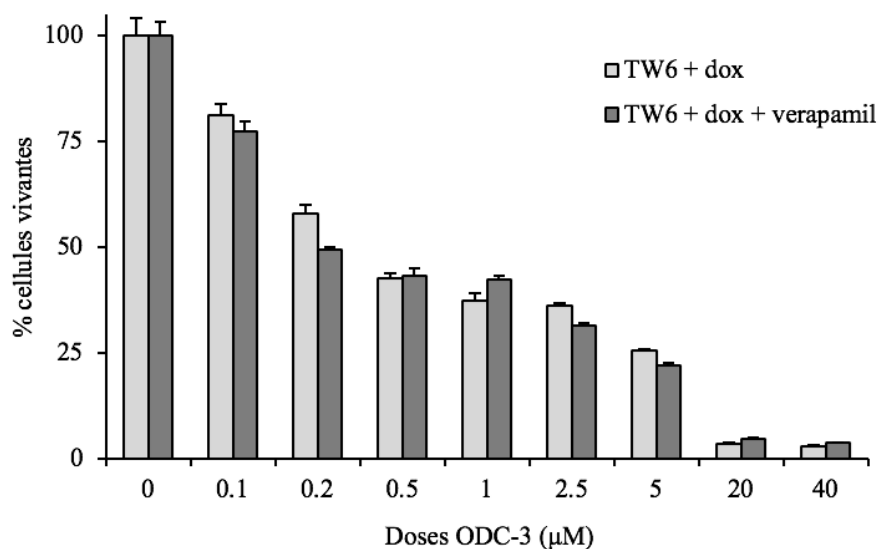


Figure 31 : Test de survie après traitement par ODC-3 (lignée HT-29/TW6)

MTT réalisé après 48h de traitement par l'ODC-3 induction des transporteurs ABCB1 et ABCC11 (via Cdx2) ajout de doxycycline (dox, 1 μg/ml) dans le milieu de culture et en présence d'inhibiteurs de ces transporteurs (verapamil 5 μM et MK571 25 μM)

L'ensemble de ces résultats indique que le RDC-11, l'ODC-2 et l'ODC-3 ont des effets légèrement différents selon les lignées sur l'expression des molécules d'efflux, mais n'induisent

pas une forte expression de ces molécules. Contrairement à l'ODC-3, l'ODC-2 semble sensible à la résistante induite par ABCB1 et ABCC11 dans les cellules HT29.

Plus globalement, cette étude a permis de mettre en exergue le lien entre la cytotoxicité, l'altération du potentiel redox et la production de ROS des dérivés testés. Un article, où je suis en position de 2^{ème} auteur, a été soumis pour publication une première fois (JACS, IF 13,8), mais n'ayant pas été accepté doit être soumis à un autre journal.

3.2.1.2. Effets des dérivés organométalliques sur des lignées cellulaires de cancer gastrique

3.2.1.2.1. Impact des dérivés organométalliques sur la survie des cellules cancéreuses gastriques

J'ai dans un premier temps réalisé des manipulations préliminaires afin de déterminer l'IC50 de différentes drogues (notamment celles utilisées classiquement en pratique clinique dans les cancers gastriques) sur des lignées cancéreuses gastriques AGS et Kato III après 48h de traitement. Les tests répétés de survie par MTT avec du 5-FU, de l'oxaliplatine, du cisplatine, de l'épirubicine et du RDC-11 ont permis de déterminer les IC50 suivantes :

	Lignées	
	AGS	Kato III
Cytotoxiques		
5-FU	50 μ M	15 μ M
Oxaliplatine	4 μ g/mL	2 μ g/mL
Cisplatine	25 μ M	20 μ M
Epirubicine	0,15 μ g/mL	0,10 μ g/mL
RDC-11	2 μ M	Non réalisé

3.2.1.2.2. Impact des dérivés organométalliques sur l'expression de molécules d'efflux

Dans un second temps, j'ai examiné par RT-qPCR l'expression de molécules d'efflux dans les cellules AGS et Kato III traitées ou non à l'IC50 de certaines des drogues précédemment testées. L'oxaliplatine et le 5-FU ne semblent pas stimuler de façon importante l'expression des transporteurs ABCB1, ABCC1, ABCC10, ABCC4 et ABCC5 dans les cellules AGS (figure 32 haut) et Kato III (figure 33). En revanche, l'expression d'ABCG2 est fortement diminuée (figures 32 haut et 33). Le 5-FU induit une légère augmentation de l'expression d'*ABCC11* dans les 2 lignées cellulaires. De façon intéressante, le traitement de cellules AGS par le RDC-11 ne semble pas non plus stimuler l'expression des molécules d'efflux testées (figure 32 bas). En revanche, l'épirubicine induit massivement l'expression des transporteurs ABCB1 (x35), ABCC11 (x37) et ABCG2 (x15) dans la lignée AGS et également, mais dans une moindre mesure, celle des transporteurs ABCB1 et ABCG2 dans la lignée Kato III (figure 34). L'ensemble de ces données suggère que le RDC-11, comparé aux autres drogues classiquement utilisées dans le traitement des cancers gastriques, semble avoir un effet cytotoxique important et n'induit pas de mécanisme de résistance type efflux par les transporteurs de la famille.

Ces résultats pourraient servir de base à une meilleure compréhension des mécanismes de résistance à la chimiothérapie dans les cancers gastriques.

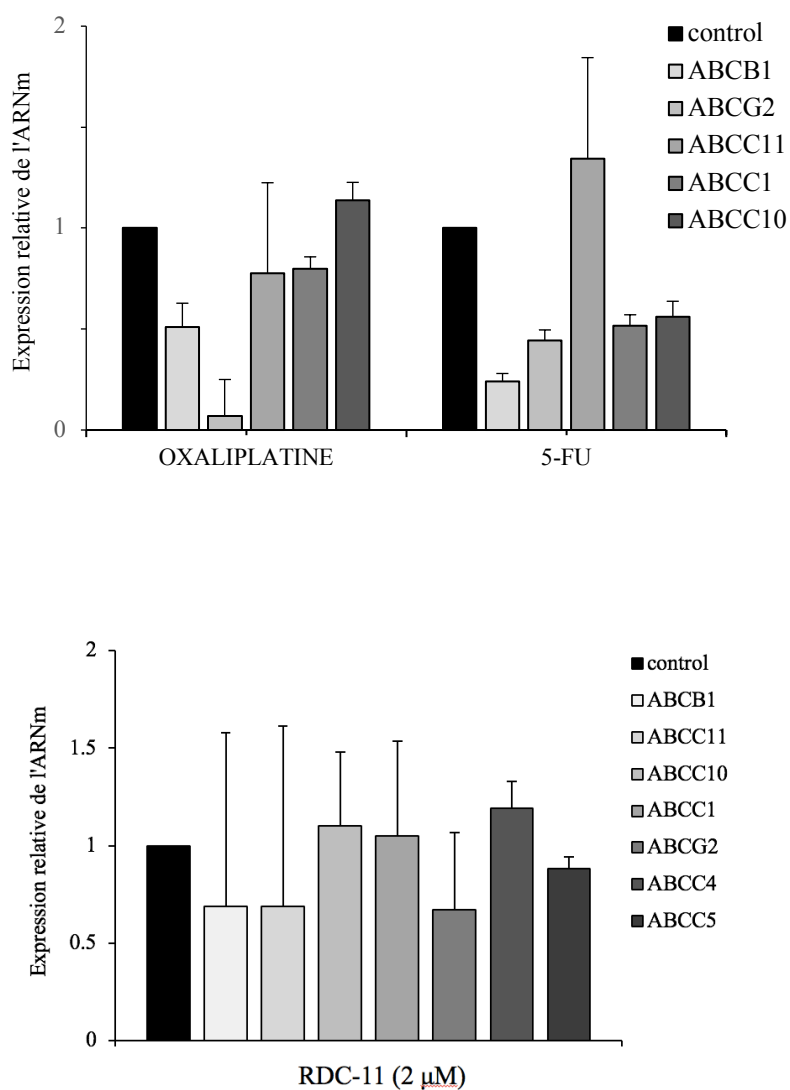


Figure 32 : Expression des transporteurs ABC dans la lignée AGS

RT-qPCR réalisée après 48h de traitement par l'IC50 de l'oxaliplatine (4 μg/mL), du 5-Fluorouracile (5-FU, 50 μM) et du RDC-11 (2 μM). (Control : expression du gène considéré dans les cellules non traitées)

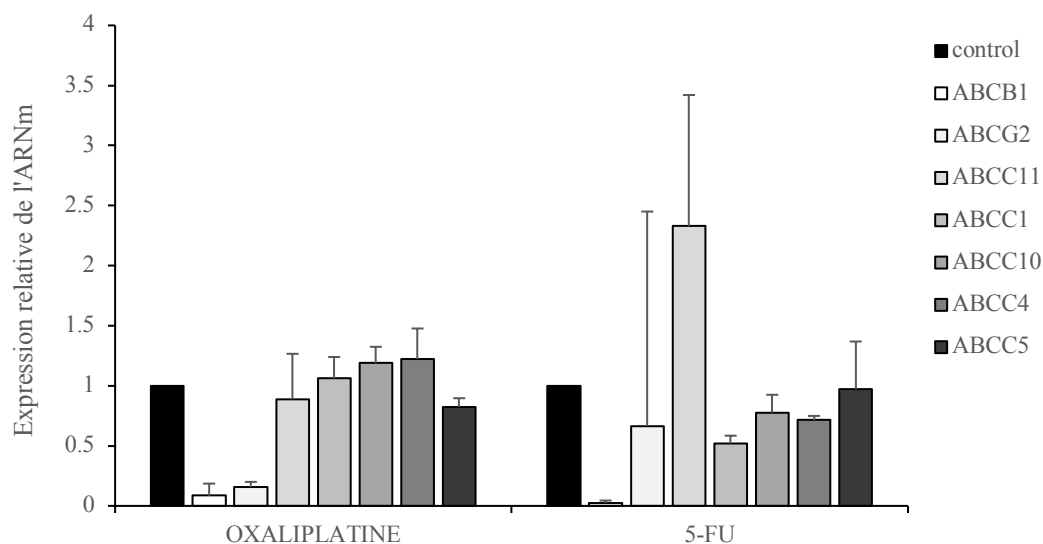


Figure 33 : Expression des transporteurs ABC dans la lignée Kato III

RTqPCR réalisée après 48h de traitement par l'IC50 de l'oxaliplatine (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) et du 5-Fluorouracile (5-FU, 50 μM).

(Control : expression du gène considéré dans les cellules non traitées)

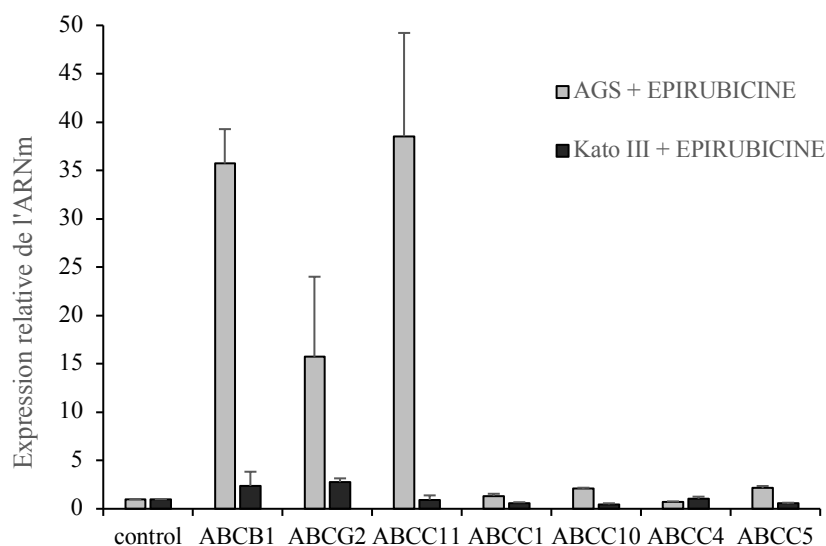


Figure 34 : Expression des transporteurs ABC dans les lignées AGS et Kato III en présence d'épirubicine

RTqPCR réalisée après 48h de traitement par l'IC50 l'épirubicine (AGS: 0,15 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Kato III: 0,10 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

(Control : expression du gène considéré dans les cellules non traitées)

3.2.2. Article associé

Exchange of ruthenium to osmium in organometallic compounds tunes redox potential and cancer cell selectivity via ROS and oxydo-reductase enzyme regulation

Cynthia Licona,[†] Jean-Baptiste Delhorme,[‡] Vania Vidimar,[‡] Bastien Boff,[‡] Hugo Rico Bautista*, Ricardo Cerón Camacho*, Ronan Le Lagadec*, Jean-Noel Freund,[†] Isabelle Gross,[‡] Georg Mellitzer,[‡] Michel Pfeffer,[‡] and Christian Gaiddoni*[‡]

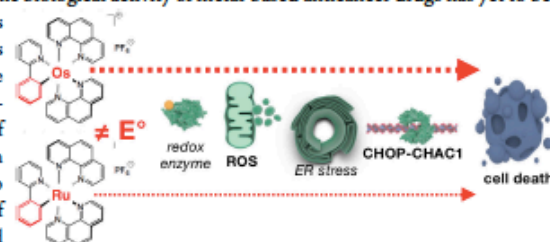
[†]INSERM 1113, Université de Strasbourg, FMTS, 3 av. Molière, 67200, Strasbourg, France

[‡]Institut de Chimie, UMR7177, Laboratoire de Synthèses Métallo-Induites, 4 rue Blaise Pascal, 67000, France

*Instituto de Química, UNAM, Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, México D. F. 04510, Mexico

KEYWORDS: Ruthenium; Osmium; anticancer drug; redox enzyme, p53, endoplasmic reticulum stress; NRF2; reactive oxygen species.

ABSTRACT: The exact physico-chemical determinants that account for the biological activity of metal-based anticancer drugs has yet to be clearly understood. We investigated the contribution of the metal and its redox-potential by comparing ruthenium and osmium-based compounds with the same structure. Switching from ruthenium to osmium atom while keeping identical ligands ($N^{\wedge}C = 2$ -phenylpyridinato; $N^{\wedge}N = 1,10$ -phenanthroline) does not change the spatial structure or the lipophilicity of organometallic compounds, but tunes the redox potential. The change in the redox potential of osmium-based compounds enhances its ability to modify redox enzyme activity and its cytotoxicity on multiple cell lines of various origins. This increased cytotoxicity does not correlate with increased affinity to DNA or activation of p53 signaling. However, it correlates with higher production of reactive oxygen species (ROS), Nrf2 activation and induction of endoplasmic reticulum stress pathway. Interestingly, ROS production and the activation of eif2 α are not required for the cytotoxicity of the compounds, whereas the silencing of a specific member of CHOP, a marker of the ER stress pathway, diminishes it. This study represents a unique comprehensive physico-chemical and biological analysis highlighting the importance of the redox potential for the anticancer activity of cyclometalated compounds.



INTRODUCTION

Ruthenium- and osmium-based compounds are being intensively investigated as potential anticancer drugs encouraged by the long lasting successes of platinum-based drugs and the intrinsic physico-chemical properties of transition metals¹⁻³. Although being the most advanced into the clinical trial process, the development of ruthenium-based compounds towards patients is handicapped by the diverse and controversial hypotheses on the physico-chemical determinant(s) relevant for their biological activity⁴. Indeed, multiple ruthenium- and osmium-based compounds have been designed with different ligands, such as half-sandwich “piano-stool” structures, and different types of bonds between the metal and the ligands (-O, -N, -C, -Cl...) ^{3,5}. This variety leads to a wide range of spatial structures, lipophilicities, metal charges (II to IV) and redox potentials. Such variety of physico-chemical properties may explain also the diversity of possible direct biological targets (DNA, Kinase, redox proteins) and induced signaling pathways (p53, ER stress - endoplasmic reticulum stress)^{6,17}. However, the relative contribution of a specific physico-chemical property to a given effect on a

direct target or signaling pathway remains often enigmatic. In particular, it is often difficult to estimate the exact contribution of the redox potential, the lipophilicity, the presence of bonds or special structures as by changing as given ligand, several of these characteristics are being modified. In an attempt to address this issue, we present here a comprehensive physico-chemical, cellular and *in vivo* biological analyses on a series of 4 cyclo-organometallic compounds with bidentate ligands that we selected to identify the relative contribution of the redox potential and the lipophilicity in their biological activity. We report that a switch from ruthenium to osmium modifies the redox potential evoking a strong increase in cytotoxicity and change in cancer cell selectivity via ROS and ER stress induction.

RESULTS AND DISCUSSION

Replacement of ruthenium by osmium alters redox potential and cell growth inhibition

Figure 1a shows the complexes depicted in this study. RDC11 and RDC34 synthesis and cytotoxicity have been in part previously

described^{12,13,18,19}. The compounds are stable at RT-temperature over 24 hours (Figure S1a). In contrary to the addition of a second phenanthroline, the replacement of ruthenium by osmium does not significantly affect the spatial structure established by crystallography (Figures S1b) or the lipophilicity measured by phase separation assay ($\text{Log}(P_o/w)$), (Figure 1b). However, introduction of osmium causes a significant drop in the redox potential ($E^{1/2} M(\text{III}/\text{II})$ value) (Figure 1b, S2a). The measures of oxygen consumption via a Clarke electrode show that the redox potential of the compound modifies its ability to alter *in vitro* the activity of the purified redox enzymes, glucose oxidase and peroxidase (Figure 1b). The addition of a second phenanthroline in RDC34 and ODC3 does not change the redox potential but improves the lipophilicity and changes the spatial structure, which also impact on the ability to alter redox enzyme function.

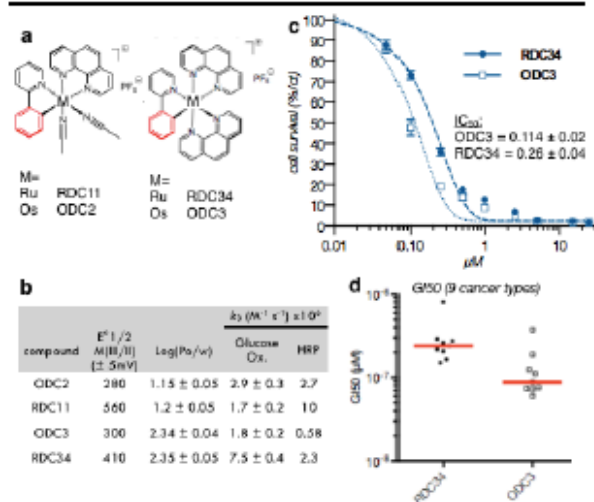


Figure 1. Structure (a) and physico-chemical properties (redox potential, lipophilicity, redox enzyme activities) (b) of the tested compounds. Cytotoxicity on HCT116 cells (MTT test; c) and on the NCI panel of 60 cancer cell lines (median of growth inhibition 50%, GI_{50}) grouped by organ origin (d).

The cytotoxicity of the drugs was tested in a panel of human cancer cell lines. The replacement of ruthenium by osmium decreases the IC_{50} values (concentrations reducing viability by 50%) of ODC2 and ODC3 in HCT116 cells measured by the MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay (Figure 1b, S2b). The increase in activity was confirmed on the NCI panel of cancer cell lines, both on the GI_{50} (50% of growth inhibition, Figure 1d, S3a, b) and the LC_{50} (dose inducing 50% of lethality, Figure S3c, d). Importantly, ODC3 displayed a strong anti-proliferative activity in the nanomolar range. Furthermore, osmium-based drugs showed changes in selectivity since their activity improve mostly on colon, central nervous system and ovarian cell lines. Within cell lines of identical origin, change in selectivity was also observed since few cell lines were inversely sensitive toward ruthenium or -osmium drugs (Figure 2a).

Interestingly, osmium-based compounds are not significantly sensitive to selected drug exclusion processes (MXR1, MRP1) since there is no induction of their mRNA levels and an inhibitor of these processes does not favor significantly the activity of the drug (Figure S4a, b, c).

More detailed analyses showed that cyclo-organosmium compounds induce cell growth arrest and apoptosis as indicated by FACS analysis (Figure 2b) and confirmed by induction of the cell cycle arrest gene *p21* and the pro-apoptotic gene *nox4* (Figure S5a), and cleavage of caspase 3 and PARP (Figure S5b).

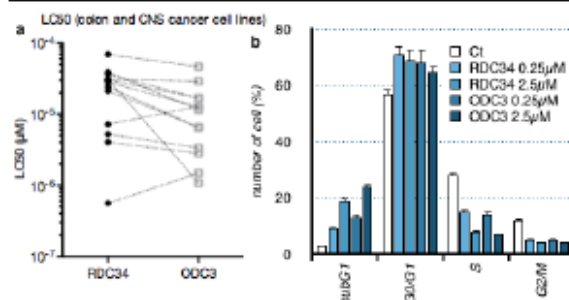


Figure 2. Activity of RDC34 and ODC3 on cell growth and cell death. Lethal concentration 50 (LC_{50}) in cancer cell lines of colon and central nervous system origin of the NCI panel (a). Distribution of HCT116 cells in cell cycle phases after 48h of treatment (b).

Phenanthroline cyclometalated osmium compounds do not induce the p53 pathway

Previous studies using osmium compounds with one phenanthroline reported interaction with DNA and induction of cell death via p53¹⁴. As previously observed with other phenanthroline-containing metallic drugs, ODC2 and ODC3 interact with a double-stranded plasmid DNA inducing a clear increase in the amount of nicked circular DNA when tested in gel electrophoresis (Figure 3a, S6a). Phosphorylation of H2Ax at serine 139 suggests the possibility that ODC compounds interact with DNA in cells (Figure S6b). However, ODC2 and ODC3 do not induce significantly p53 compared to oxaliplatin in HCT116 cells (Figure 3b). Furthermore, the average and mean of GI_{50} of ODC3 in mutated p53-expressing cells decreases compared to wild-type p53-expressing cells (Figure 3c, S6c), suggesting that ODC3 activity is independent from p53. In contrary and as expected, the GI_{50} of cisplatin increases (Figure 3d).

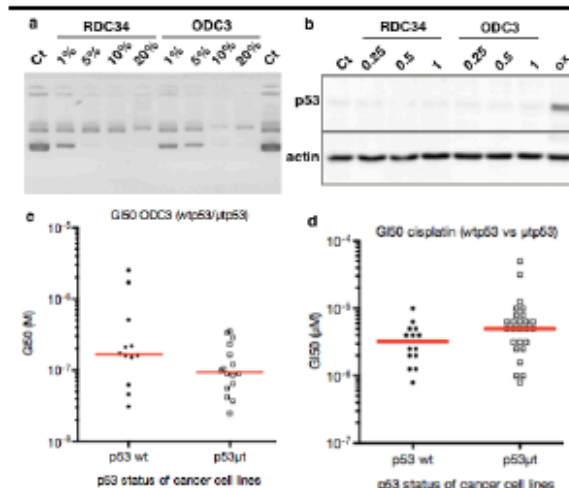


Figure 3. DNA interaction and p53 level induced by RDC34 and ODC3. Gel electrophoresis of plasmid DNA incubated with increasing

concentration of the compounds (a). p53 protein level induced by RDC34, ODC3 and cisplatin in HCT116 cells treated for 24h at the indicated concentration (μM). GI_{50} in mutated and wild type-expressing cancer cells from the NCI panel treated with ODC3 (c) or cisplatin (d).

Osmium compound ODC3 induces higher ROS level

As p53 seems not involved in ODC3 activity, we investigated alternate pathways. Based on the possibility that ODC3 alters the activity of redox enzymes (Figure 1b) that ultimately control the production of reactive oxygen species (ROS), we assessed whether the cytotoxicity of ODC3 might be dependent on ROS production. We measured ROS production using the fluorescent probe H2DFFDA in HCT116 cells after various times of treatment. As expected, after 16 hours of treatment, the compounds induce high levels of ROS (Figure S8a, b). Such late high levels of ROS are known to be part of the apoptotic process²⁰. Even more interesting, cyclometalated compounds with phenanthroline induce a rapid production of ROS starting already one hour after treatment (Figure 4a). The levels are similar to the levels of ROS reached with the treatment of cells by a known superoxide inducer (menadione). Importantly, the rapid induction of ROS inversely correlates with the redox potential of the compounds since ODC3 is more active than RDC34.

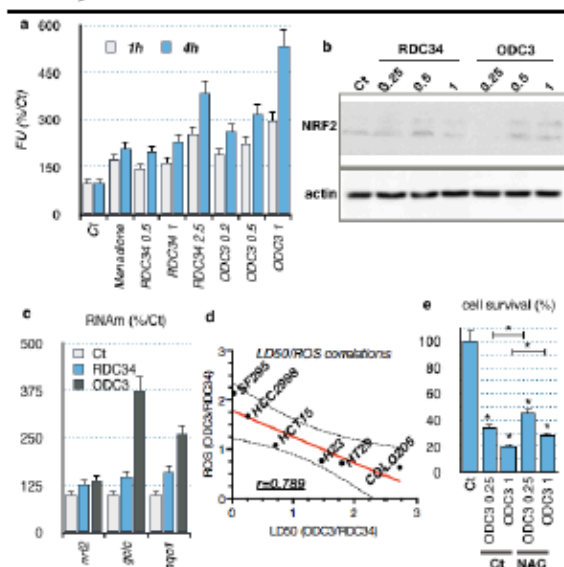


Figure 4. Correlation between radical oxygen species production and cytotoxicity of cyclo-osmium compounds. Detection of ROS production by H2DFFDA fluorescent probe (a). Protein expression of NRF2 (b). mRNA expression of NRF2 target genes (c). Effect of ROS anti-oxidant N-acetyl cysteine (NAC) on ODC3 induced cytotoxicity (d). Correlation between the relative ROS production induced by RDC34 and ODC3 after 1 hour and their relative cytotoxicity in cancer cell lines (e).

To further establish the possible relationship between the rapid production of ROS and the biological activity of ODC compounds, the ROS-response pathway Nrf2, including *nrf2* and two of its target genes (*gclc* and *nqo1*), was investigated²¹. Western blot analyses and RT-qPCR showed that ODC3 induced Nrf2 (Figure 4b). In addition, Nrf2 target genes (*gclc* and *nqo1*) were also more strongly induced by ODC3 compared to RDC34 (Figure 4c). ROS

were measured in several cancer cell lines that presented some selectivity either for RDC34 or for ODC3 (Figure 4d). To estimate the contribution of ROS production after one hour of treatment in the cytotoxicity of RDC34 or ODC3, we calculated the ratio of ROS production between ODC3 and RDC34 ($\text{ROS}(\text{ODC3})/\text{ROS}(\text{RDC34})$) and correlated it with the ratio of GI_{50} for ODC3 and RDC34 for each cell line. This analysis clearly showed that the sensitivity on a given cell line to RDC34 or ODC3 correlates well with the relative ability of ODC3 and RDC34 to induce ROS production after one hour of treatment. Hence, if a given cell line, such as COLO205, is more sensitive to RDC34 than ODC3, RDC34 induces in this cell line more ROS after one hour of treatment compared to ODC3. Inversely, a cell line more sensitive to ODC3, such as SF295, produces more ROS after one hour of treatment with ODC3 than with RDC34. To further establish the importance of the rapid production of ROS by ODC, we used the anti-oxidant NAC (N-acetyl cysteine). Cells were treated with ODC3 for 3 hours, in absence (Ct) or in presence of NAC. Interestingly, the inhibition of the early ROS production by NAC protected only partially cells from death (Figure 4e).

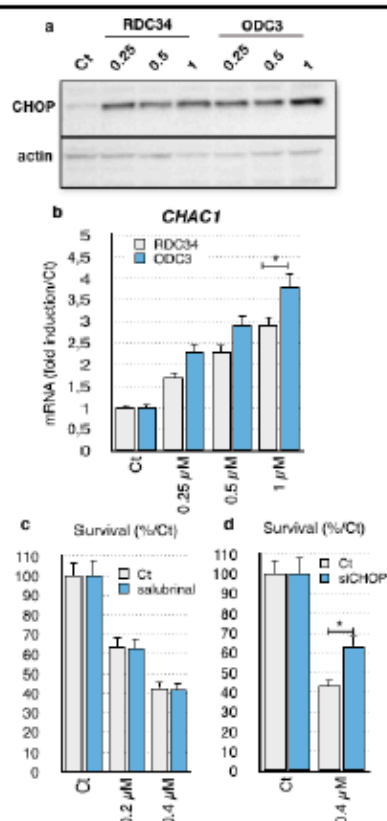


Figure 5. Role of the endoplasmic reticulum stress pathway in ODC cytotoxicity. CHOP protein expression detected by Western blot (a). RT-qPCR of CHOP target gene *chac1* (b). Effect of eif2a inhibition by salubrinal (c) or CHOP silencing by siRNA (d) on ODC3 cytotoxicity.

Phenanthroline cyclometalated osmium induced ER stress

We previously showed that cyclometalated RDC11 and RDC34 that contain phenanthroline induce the endoplasmic reticulum stress pathway (ER)^{12,13}. Interestingly, a recent report shows that an osmium compound only coordinated to phenanthroline is unable to induce ER stress¹⁴. Therefore, we evaluated the expression of ER stress markers in cells treated with osmium complexes ODC2 and ODC3 that we compared to RDC11 and RDC34. All compounds induced the pro-apoptotic ER stress transcription factor CHOP (Figure 5a, S7a, c) and its target gene, CHAC1 (Figure 5b, S7b, d). Interestingly, ODC3 displayed a stronger ability to induce CHOP and CHAC1 suggesting that the redox potential plays a role in the process. It also shows that a compound with phenanthroline can induce ER stress and that addition of a second phenanthroline favors it. To further understand the role of the ER stress in the biological activity of ODC3, we inhibited two effectors of the ER stress pathway, eif2a and CHOP. Inhibition of eif2a by salubrinal did not reduce the biological activity of ODC3 (Figure 5c). In contrast, the silencing of CHOP expression diminished the cytotoxicity induced by ODC3 (Figure 5d). These results suggest that ODC3 does not require the perk1-Eif2a component of the ER stress pathway, but does need for its activity the expression of the downstream effector CHOP. However, it is possible that the ODC3-regulated expression of CHOP might involve one of the two other components of the ER stress pathway, ATF6 or XBP1s²².

In vivo biological properties of the compounds were investigated using mouse and syngeneic tumor models. Maximal tolerated dose (MTD, dose that induces no more than 20% of weight loss) and lethal dose 50 (LD₅₀, dose that induces death in 50% animals) were measured using Swiss mice. The replacement of ruthenium by osmium increases the toxicity of the compounds with one phenanthroline (ODC2), but decreases it in the context of two phenanthrolines (Figure S6). The anticancer properties of the compounds were tested on a syngeneic model that is subcutaneous injection of mouse lung cancer cells (3LL) into 7 weeks old female Swiss mice. IC₅₀ of the compounds were established for 3LL cells *in vitro*. ODC3 is the most active on this cell line, followed by RDC34, ODC2 and then RDC11 (Figure S6). All compounds were injected intraperitoneally twice a week starting when tumors reached 100 mm³ and over three weeks. All compounds were able to reduce tumor growth (Figure S6). Replacement of ruthenium by osmium induced a slight increase in the anticancer activity. Surprisingly, the increase of *in vitro* activity caused by the addition of a second phenanthroline does not correlate with a significantly improved *in vivo* activity. Hence, *in vivo* analyses indicated that the contribution of the redox and lipophilicity to the anticancer activity in animals does not correlate with the *in vitro* activity. Likely, additional variables are in play, such as the stability in the blood stream or the ability of the compounds to pass various biological barriers (cellular membrane, extracellular matrix...).

CONCLUSION

The exact contribution of the redox potential, the lipophilicity or the spatial architecture in the activity of the osmium compounds is yet debated due to the diversity of the compounds and their *in vivo* biological activity is not always documented. Here, we provide the first comprehensive description of the contribution of the redox potential into the improvement of the cytotoxic activity of cycloorganosmium complexes and establish the importance of an early production of ROS and the induction of ER stress into this process. In addition, and to the best of our knowledge, it is the first report demonstrating that cyclometalated osmium complexes inducing

ER stress display *in vivo* anticancer activity. Furthermore, the insight gained into the role of the redox potential in the biological activity of these compounds constitute a significant step toward the design of more efficient and less expensive small molecules that could target cancers cells more efficiently.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information. Additional description of structure, stability and biological properties of the compounds are presented in supplementary figures S1 to S10. Complete experimental procedures are also provided. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

* Christian Gaiddon, gaiddon@unistra.fr

Author Contributions

All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Notes

The authors declare non-competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENT

This work is supported by CNRS, Ligue contre le cancer, ARC, COST CM1105, DGAPA-UNAM (PAPIIT Project IN204812) and CONA-CyT (Project 153151 and scholarship to HRB). We are thanking E. Martin for all her help with her tissue culture expertise and support. We also acknowledge L. Mathern for her administrative support.

ABBREVIATIONS

ER: endoplasmic reticulum; RDC: ruthenium-derived compound; ODC: osmium-derived compound; ROS: reactive oxygen species; NCI: National Cancer Institute;

REFERENCES

- Jakupec, M. A.; Galanski, M.; Arion, V. B.; Hartinger, C. G.; Keppler, B. K. *Dalton Trans* **2008**, 183.
- Kelland, L. *Nat Rev Cancer* **2007**, *7*, 573.
- Gasser, G.; Ott, I.; Metzler-Nolte, N. *Journal of medicinal chemistry* **2011**, *54*, 3.
- Bergamo, A.; Gaiddon, C.; Schellens, J. H.; Beijnen, J. H.; Sava, G. *J Inorg Biochem* **2012**, *106*, 90.
- Hanif, M.; Babak, M. V.; Hartinger, C. G. *Drug Discov Today* **2014**.
- Mei, H. Y.; Barton, J. K. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1988**, *85*, 1339.
- Brabec, V. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **2002**, *71*, 1.
- Zeglis, B. M.; Pierre, V. C.; Barton, J. K. *Chem Commun (Camb)* **2007**, 4565.
- Gaiddon, C.; Jeanvequin, P.; Bischoff, P.; Pfeffer, M.; Sirlin, C.; Loeffler, J. P. *J Pharmacol Exp Ther* **2005**, *315*, 1403.
- Hayward, R. L.; Schornagel, Q. C.; Tente, R.; Macpherson, J. S.; Aird, R. E.; Guichard, S.; Habtemariam, A.; Sadler, P.; Jodrell, D. I. *Cancer Chemother Pharmacol* **2005**, *55*, 577.
- Smalley, K. S.; Contractor, R.; Haass, N. K.; Kulp, A. N.; Atilla-Gokcumen, G. E.; Williams, D. S.; Bregman, H.; Flaherty, K. T.; Soengas, M. S.; Meggers, E.; Herlyn, M. *Cancer Res* **2007**, *67*, 209.
- Meng, X.; Leyva, M. L.; Jevvy, M.; Gross, I.; Benosman, S.; Fricker, B.; Harlepp, S.; Hebraud, P.; Boos, A.; Wlosik, P.; Bischoff, P.; Sirlin, C.; Pfeffer, M.; Loeffler, J. P.; Gaiddon, C. *Cancer Res* **2009**.
- Vidmar, V.; Meng, X.; Klajner, M.; Licona, C.; Fetzer, L.; Harlepp, S.; Hebraud, P.; Sidhoum, M.; Sirlin, C.; Loeffler, J. P.; Mellitzer, G.; Sava, G.; Pfeffer, M.; Gaiddon, C. *Biochem Pharmacol* **2012**, *84*, 1428.
- Suntharalingam, K.; Johnstone, T. C.; Bruno, P. M.; Lin, W.; Hemann, M. T.; Lippard, S. J. *J Am Chem Soc* **2013**, *135*, 14060.
- Ang, W. H.; De Luca, A.; Chapuis-Bernasconi, C.; Juillerat-Jeameret, L.; Lo Bello, M.; Dyson, P. J. *ChemMedChem* **2007**.

- (16) Dougan, S. J.; Habtemariam, A.; McHale, S. E.; Parsons, S.; Sadler, P. J. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, *105*, 11628.
- (17) Gava, B.; Zorzet, S.; Spessotto, P.; Cocchietto, M.; Sava, G. *J Pharmacol Exp Ther* **2006**, *317*, 284.
- (18) Klajner, M.; Hebraud, P.; Sirlin, C.; Gaiddon, C.; Harlepp, S. *J Phys Chem B* **2010**, *114*, 14041.
- (19) Klajner, M.; Licon, C.; Fetzer, L.; Hebraud, P.; Mellitzer, G.; Pfeffer, M.; Harlepp, S.; Gaiddon, C. *Inorganic chemistry* **2014**, *53*, 5150.
- (20) Simon, H. U.; Haj-Yehia, A.; Levi-Schaffer, F. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* **2000**, *5*, 415.
- (21) Kaspar, J. W.; Niture, S. K.; Jaiswal, A. K. *Free Radic Biol Med* **2009**, *47*, 1304.
- (22) Nagelkerke, A.; Bussink, J.; Sweep, F. C.; Span, P. N. *Biochim Biophys Acta* **2014**, *1846*, 277.

Figure S1

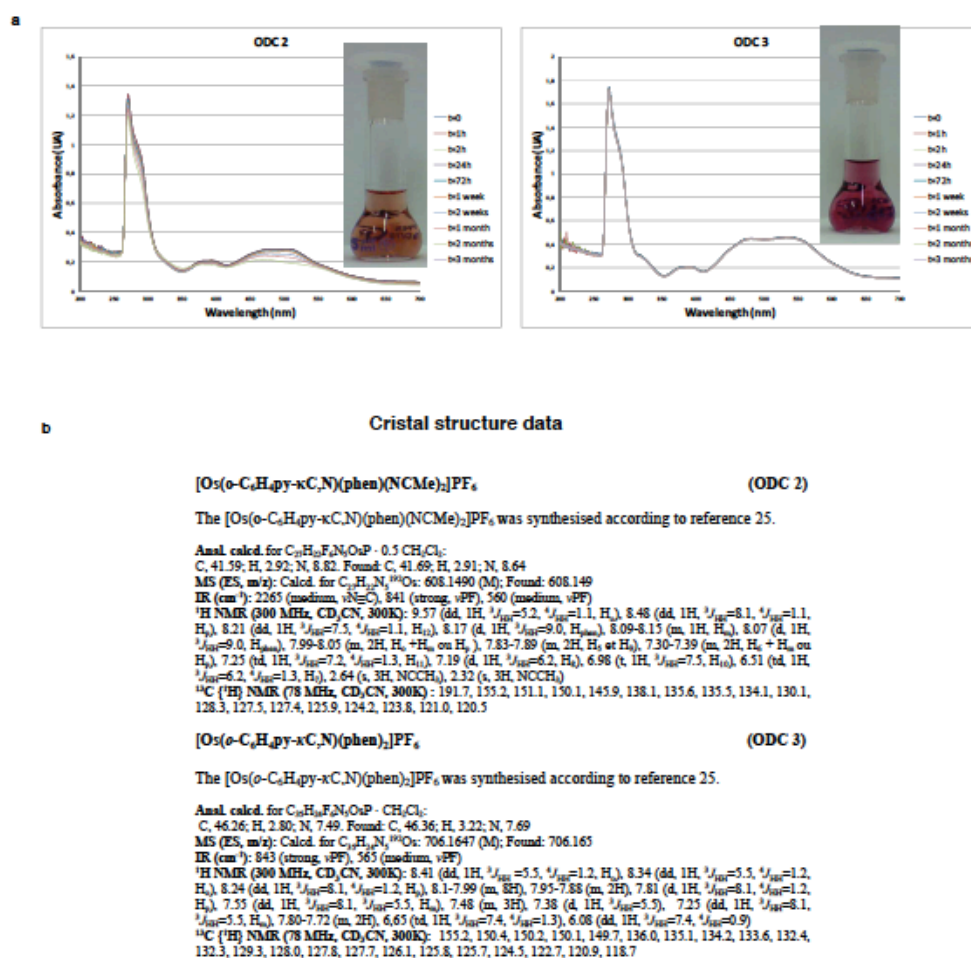


Figure S1: Stability and structure data of ODC2 and ODC3

a, Evolution of ODC2 and ODC3 stability over the time as measured by spectrometry

b, Cristal structure data for ODC2 and ODC3

Figure S2

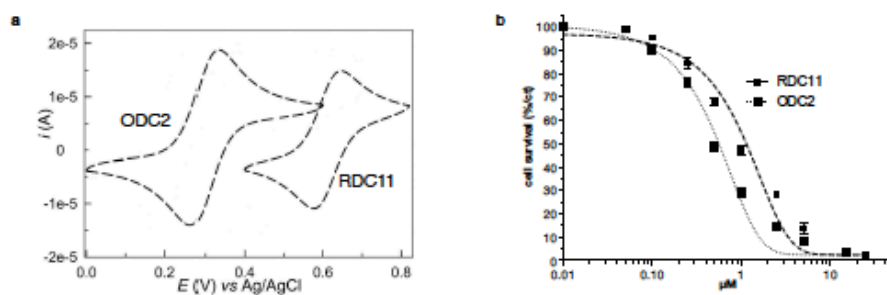


Figure S2: Redox potential and cytotoxicity of ODC2 and RDC11

a, Diagram representing the redox potential of ODC2 and RDC11

b, Cytotoxicity of RDC11 and ODC2 tested in HCT116 cells by MTT assays (n=8).

Figure S3

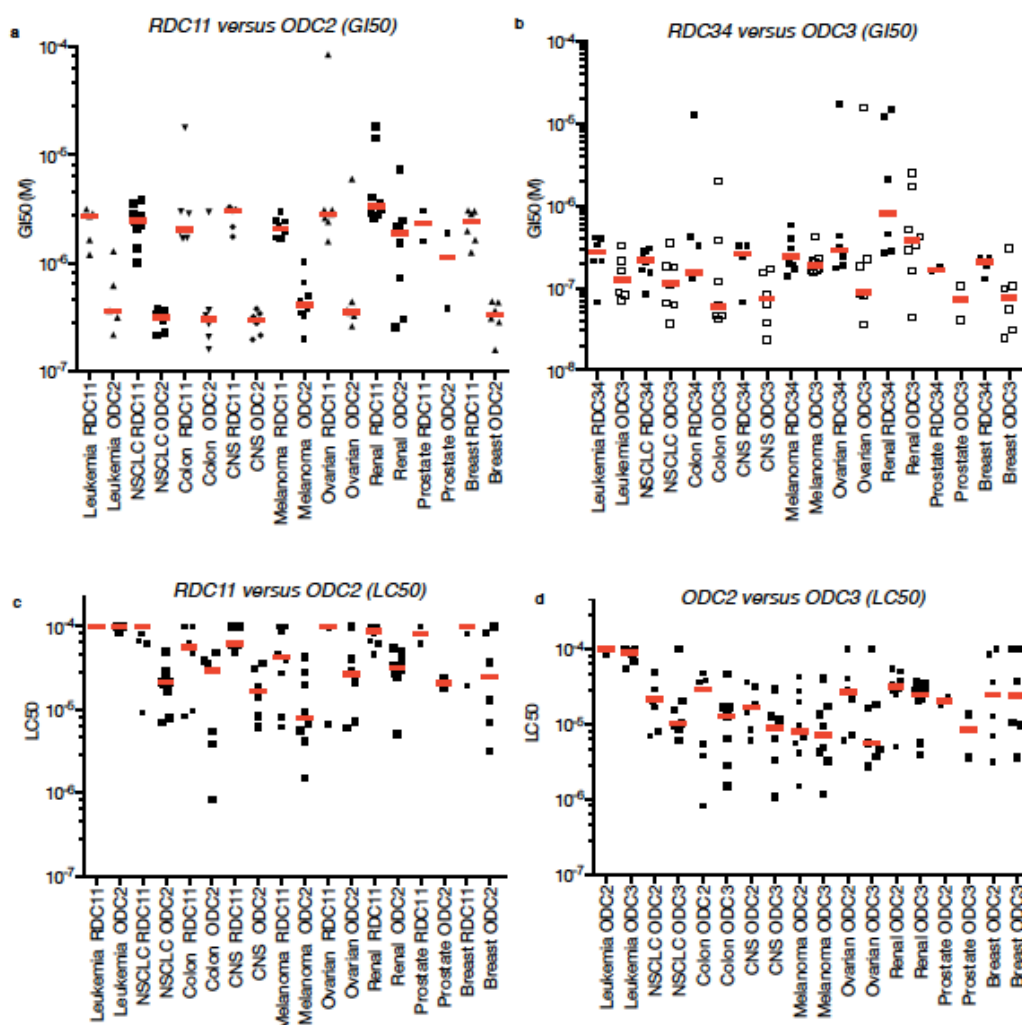


Figure S3: Cell growth and cytotoxicity of ODC2 and ODC3 compared to RDC11 and RDC34, respectively, on the 60 cancer cell lines of the National Cancer Institute

a, b, Diagrams representing the concentration for 50% of cell growth inhibition (GI₅₀). NCI cancer cell lines were grouped by cancer origins. Each point indicate a cell line. Red line indicate the median.

c, d, Diagrams representing the concentration for 50% of cell lethality (LC₅₀). NCI cancer cell lines were grouped by cancer origins. Each point indicate a cell line. Red line indicate the median.

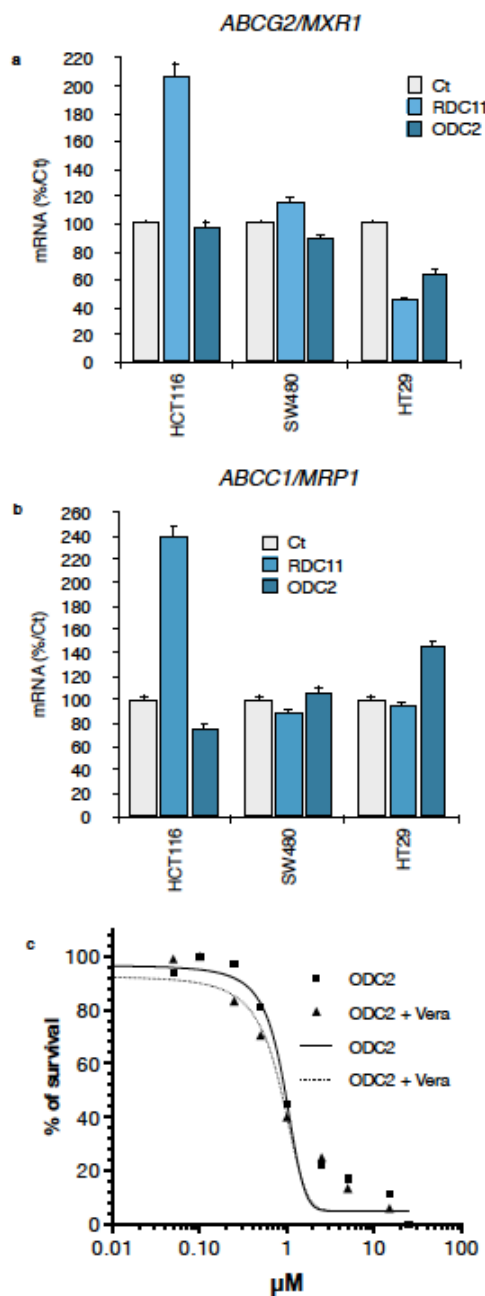
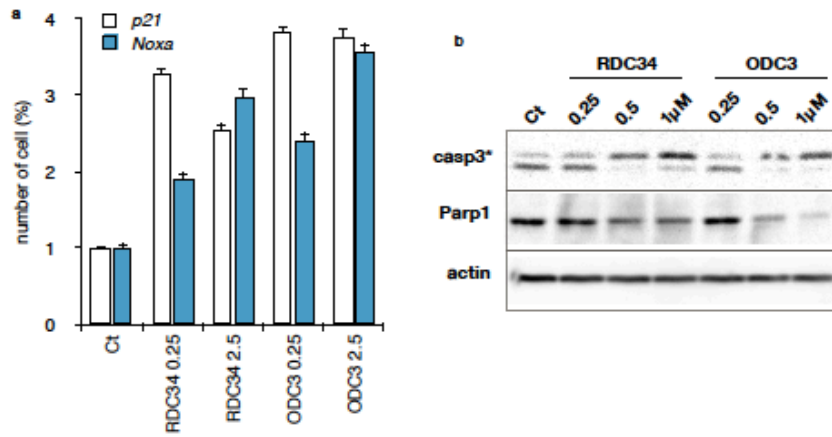


Figure S4: Gene expression of export proteins (ABCG2, ABCC1) and effect of export inhibitor verapamil on ODC2 activity activity.

a, b, mRNA levels of two known drug export proteins (ABCG2 and ABCC1) in the indicated colon cancer cell lines treated with ODC2 or RDC11 at their IC_{50} . mRNA levels were assessed by RT-qPCR.

c, Effect of Verapamil on ODC2 cytotoxicity in HCT116.

Figure S5

**Figure S5:** Expression of apoptosis markers.

a, mRNA levels of two known p53 target genes (*p21* and *noxa*) in the indicated colon cancer cell lines treated with RDC34 or ODC3 at the indicated concentrations. mRNA levels were assessed by RT-qPCR.

c, Clivage of caspase 3 (casp3*) and Parp1 detected by western blot in HCT116 cells treated with RDC34 or ODC3 at the indicated concentrations.

Figure S6

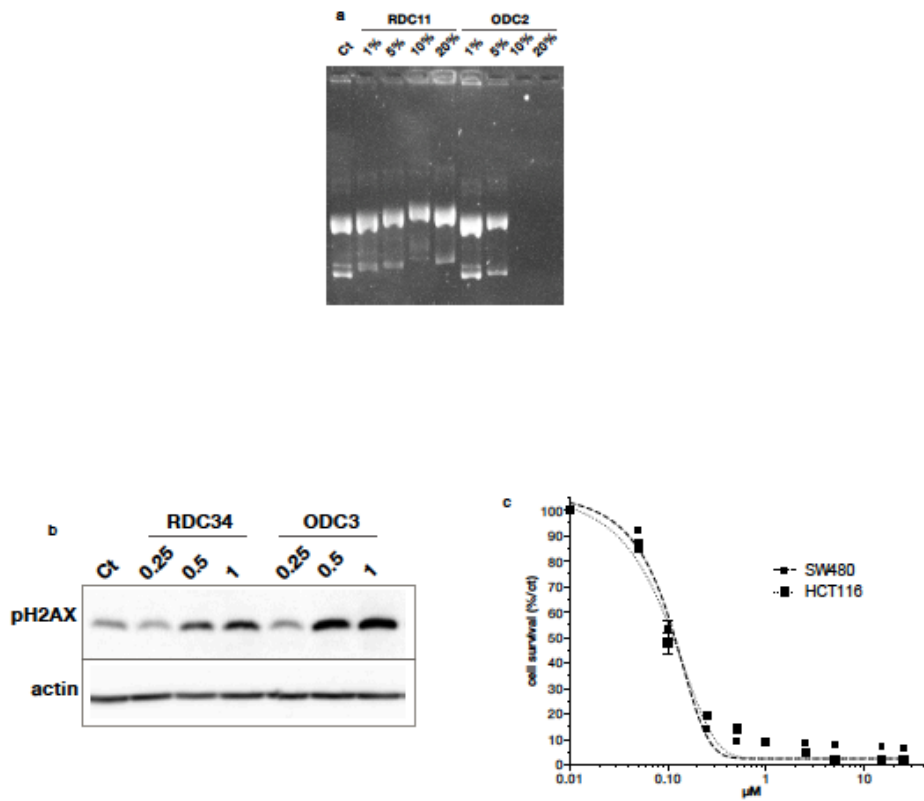


Figure S6: Interaction of RDC and ODC with DNA and role of p53

a, Migration of plasmidic DNA on an 1% agarose gel after incubation of the DNA with increasing quantity of RDC11 or ODC2 for 20 hours. Quantity is indicated as number of RDC or ODC for 100 base pairs (%).

b, Detection of H2AX phosphorylation by Western blot from protein extract of HCT116 treated with RDC34 or ODC3 at the indicated concentration.

c, Cytotoxicity of ODC3 in HCT116 cells (wild type for p53) and SW480 (mutated and inactivated p53). Cell viability was assessed by MTT assay.

Figure S7

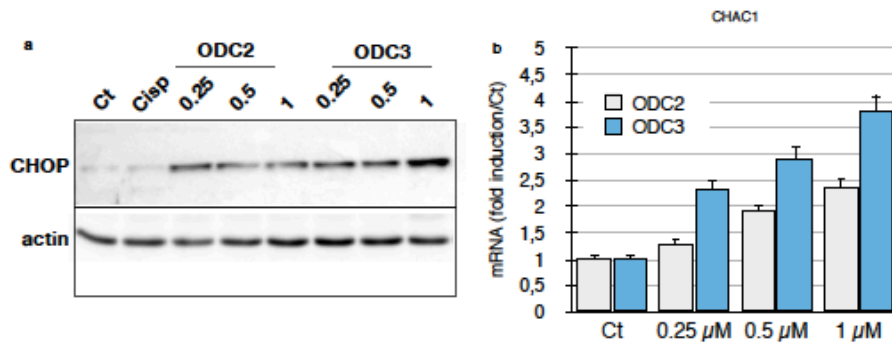


Figure S7: Expression of markers for the ER stress in ODC2 and ODC3 treated cells.

a, Protein expression of CHOP in cells treated with ODC2 or ODC3 and detected by Western blot. Actin was used as loading control.

b, mRNA levels of CHAC1 in cells treated with ODC2 or ODC3 at the indicated concentrations. mRNA levels were assessed by RT-qPCR.

Figure S8

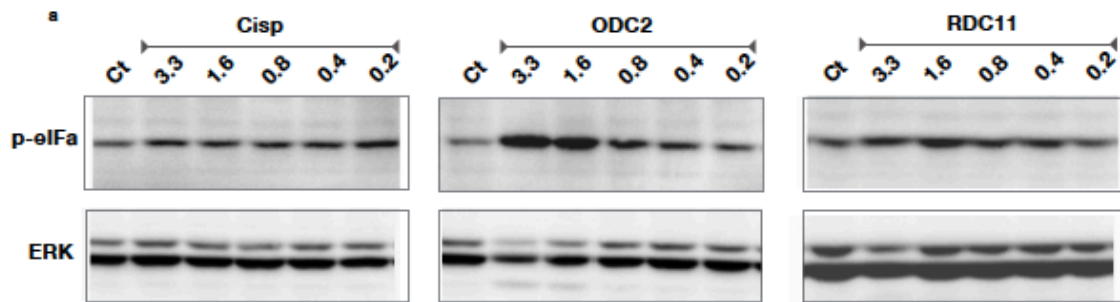


Figure S8: Phosphorylation of eif2a upon treatment with cisplatin, ODC2 and RDC11.

a, Phosphorylation of eif2a (p-eif2a) was detected by Western blot in protein extract of cells treated with cisplatin, ODC2 or RDC11 at the indicated concentration (μM). ERK was used as loading control.

Figure S9

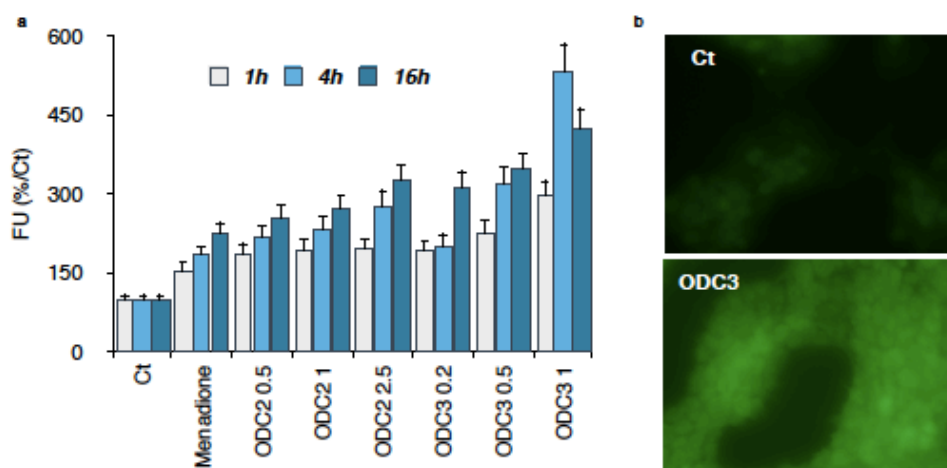
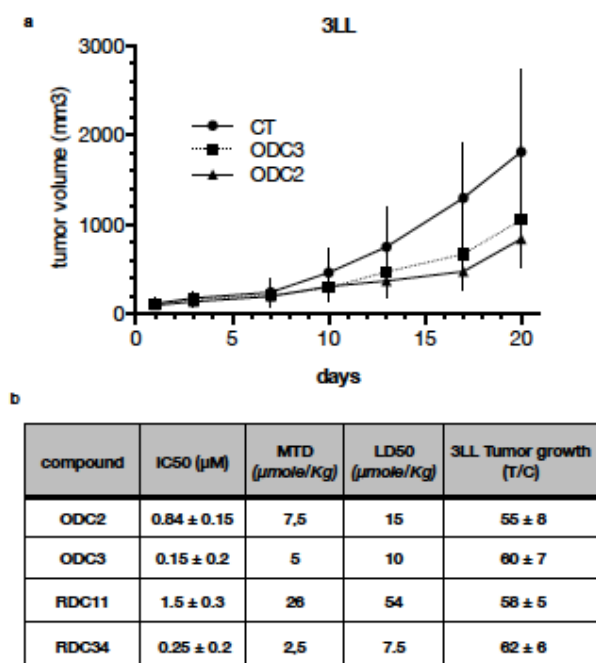


Figure S9: Production of reactive oxygen species induced by ODC2 and ODC3.

a, Levels of ROS detected by the carboxy-H2DCFDA ROS probe after treatment with the indicated concentration (μM) and time.

b, Fluorescence image of cells incubated with the ROS probe at 24h and 0.3 μM of ODC3.

Figure S10

**Figure S10:** In vivo properties of ODC2 and ODC3.

a, Growth curve of 3LL syngeneic tumors implanted in 8 weeks old black 6 mice. Mice were treated with ODC2 or ODC3 when tumors reached 100mm³. Drugs were injected twice a week at the MTD/

b, Table indicating the in vivo biological activity of ODC2,ODC3, RDC11 and RDC34. MTD (maximal tolerated dose, dose that induces less than 20% of weight loss), LD₅₀ (Lethal dose 50%, dose that induces the death of 50% of the animals), Tumor growth (T/C; ratio of volume tumor between the treated and control mice).



DISCUSSION,

PERSPECTIVES & CONCLUSION

GENERALE

4. DISCUSSION, PERSPECTIVES ET CONCLUSION GENERALE

Le décès des patients atteints de cancer est principalement lié à la présence de métastases dont le traitement inclut, dans la majorité des cas, une chimiothérapie intraveineuse. La chimiorésistance aux cytotoxiques anticancéreux, phénomène complexe et multifactoriel, représente donc un enjeu de santé publique important. Les mécanismes moléculaires impliqués dans ce phénomène sont multiples. Leur étude et leur compréhension sont cruciales pour la stratification des patients, ainsi que le développement de moyens de contournement à l'aide de molécules inhibitrices ou de nouveaux agents cytotoxiques non sensibles à ces phénomènes de résistance. Les travaux de thèse ont abordé ces différents aspects.

4.1. Implication de CDX2 dans des phénomènes de chimiorésistance dans les CCR

4.1.1. Corrélation entre CDX2 et efficacité de la chimiothérapie

L'implication de CDX2 comme marqueur pronostic de survie dans les CCR a récemment pris une ampleur importante à travers la publication de plusieurs études dans des revues prestigieuses (Dalerba et al. 2016; Pilati et al. 2017). La dernière version du Thésaurus National de Cancérologie Digestive sur les cancers du côlon inclut un paragraphe concernant cette valeur pronostique, même s'il n'est pas encore recommandé de l'utiliser en pratique clinique (Lecomte et al. 2017). En Suisse, en particulier à Lausanne, cette valeur pronostique de CDX2 contribue déjà couramment à la prise de décision de la réalisation d'une chimiothérapie. Ce travail de thèse a permis de confirmer le rôle majeur de CDX2 dans les CCR, mais illustre également la complexité de son action.

En effet, à l'échelon cellulaire, Bruun et al. ont montré que les lignées cellulaires de CCR CDX2-positives étaient moins sensibles à la chimiothérapie que les lignées CDX2-negatives (Bruun et al. 2018). Mes propres travaux ont confirmé plus directement l'impact de CDX2 sur la chimiorésistance de cellules cancéreuses coliques vis à vis du 5-FU. Ces résultats inattendus

sont en accord avec mes observations et celles d'autres équipes à l'échelon clinique, qui paraissaient paradoxales de prime abord : l'expression de CDX2 dans les CCR ne semble pas apporter de bénéfice de survie chez les patients traités par chimiothérapie (Dalerba et al. 2016; Bruun et al. 2018). Dans la méta-analyse de Yuan et al. regroupant 26 études rétrospectives (correspondant à plus de 5000 patients), le niveau d'expression de CDX2 ne modifiait pas non plus les effets de la chimiothérapie et ce quelle que soit l'origine tumorale (cancer du côlon ou de l'ovaire) (Yuan et al. 2017). Cependant, les auteurs concluaient que la surexpression de CDX2 était corrélée avec une meilleure réponse à la chimiothérapie pour les patients atteints de cancer de stade IV. Ces derniers résultats sont à prendre avec précaution. En effet, ils sont basés sur une seule étude, analysant le niveau d'expression de CDX2 chez 145 patients uniquement atteints de CCR métastatique qui présentaient des différences dans la répartition des sites métastatiques et dans les protocoles de chimiothérapie (Zhang et al. 2017), alors que toutes les autres études incluses dans la méta-analyse semblaient montrer l'inverse.

4.1.2. Identification de mécanismes de résistance au 5-FU en aval de CDX2

Parmi les mécanismes moléculaires potentiellement impliqués dans le phénomène de chimiorésistance au 5-FU induite par CDX2, ce travail a mis en évidence le rôle des transporteurs de la famille ABC (en particulier d'ABCC11) et de la DPD, enzyme dégradant le 5-FU.

Les manipulations réalisées ont permis de montrer qu'ABCC11, qui efflue le 5-FU, est un nouveau gène cible de CDX2 dont l'expression, en réponse à la présence de CDX2, serait capable d'induire une résistance au 5-FU dans des modèles cellulaires de CCR. D'autres études avaient déjà rapporté la stimulation par CDX2 d'ABCB1 (Takakura et al. 2010) et ABCC7 (Kerschner and Harris 2012) mais sans corrélation avec des phénomènes de chimiorésistance dans les CCR. Le rôle d'ABCC11 dans la chimiorésistance des CCR a très peu été étudié. Seule

une équipe tchèque s'est intéressée à l'expression protéique d'ABCC11 dans des tumeurs coliques résectionnées. Les auteurs suggéraient une association contraire entre le niveau d'expression d'ABCC11 et la survie sans récurrence des patients. En effet, l'expression réduite d'ABCC11, et donc vraisemblablement moins d'efflux de 5-FU, serait corrélée à une moins bonne survie sans récurrence. En outre, cette équipe avait déjà montré que, pour des CCR métastatiques traités par chimiothérapie palliative à base de 5-FU, le niveau d'expression d'ABCC11 était significativement plus faible chez les patients non-répondeurs que chez les répondeurs selon les critères RECIST (Hlavata et al. 2012). Cependant, dans les 2 études publiées par cette équipe, la définition de la survie sans récurrence était très inhabituelle et les tumeurs provenaient uniquement de patients résectionnés R0 (Krizkova et al. 2016). De notre côté, nous avons montré que l'expression d'ABCC11 corrèle avec celle de CDX2 dans différents modèles cellulaires, ainsi que dans les CCR, que ce soit au niveau transcriptionnel ou protéique. Aussi, les résultats des études tchèques apparaissent peu cohérents étant donnés les impacts respectifs de CDX2 et d'ABCC11 sur la chimiorésistance. A l'avenir, il sera toutefois nécessaire de confirmer l'implication d'ABCC11 dans la chimiorésistance des cellules cancéreuses coliques vis-à-vis du 5-FU. En effet, même si mes résultats indiquent que l'activité d'ABCC11 est nécessaire à la chimiorésistance induite par CDX2, son niveau d'expression reste faible et l'inhibiteur pharmacologique utilisé (MK571) pourrait interférer avec la fonction d'un des nombreux autres gènes régulés par CDX2 (Verzi et al. 2011). L'établissement de lignées cellulaires stables surexprimant ABCC11 de manière inductible permettrait de tester l'implication d'ABCC11 dans la capacité de cellules cancéreuses coliques à résister au 5-FU (voire à d'autres traitements) in vitro (test MTT) et in vivo (croissance tumorale chez souris nude).

Le second mécanisme mis en évidence et potentiellement impliqué dans la chimiorésistance au 5-FU dans les CCR est l'augmentation, en réponse à la présence de CDX2, de l'expression de

la DPD, responsable du catabolisme de plus de 80 % des fluoropyrimidines administrées sous forme de 5-FU lors d'un traitement. Des manipulations complémentaires seront nécessaires pour confirmer l'implication de la DPD dans la chimiorésistance induite par CDX2 : i) d'une part, il s'agira de déterminer si *DPYD* est un gène cible de CDX2 en réalisant des expériences de perte de fonction de CDX2 (ex. siRNA) et d'immunoprécipitation de chromatine ; ii) d'autre part, il faudra vérifier que la chimiorésistance induite par CDX2 est compromise en absence d'activité de la DPD en utilisant un inhibiteur (ex. gimeracil, eniluracil). Toutefois, l'augmentation accrue de *DPYD* en réponse à CDX2 est intéressante car de nombreuses études ont montré l'importance de l'activité du produit de ce gène pour la réponse des patients à la chimiothérapie. En effet, la présence de certains polymorphismes génétiques, le niveau d'expression et l'activité de la DPD ont été largement étudiés, mais principalement dans le cadre de la toxicité du 5-FU (Schirripa et al. 2017; Ruzzo et al. 2017). Par exemple, la présence du variant *DPYD*2A* conduit à une activité réduite de la DPD et corrèle avec la survenue de neutropénies (Lee et al. 2014). A l'inverse, une activité trop importante de la DPD pourrait diminuer la bio-disponibilité de dérivés de 5-FU. Ainsi, le niveau d'expression de *DPYD* intratumoral a été inversement corrélé à la survie et à l'efficacité de chimiothérapie à base de 5-FU pour des patients atteints de CCR métastatiques (Koopman et al. 2009; Kataoka et al. 2015; Gustavsson et al. 2009) et des inhibiteurs de la DPD ont été testés (Miura et al. 2017).

4.1.3. Rôle de CDX2 dans la chimiorésistance

Sur la base de mes résultats, plusieurs hypothèses peuvent être formulées quant au rôle de CDX2 dans la chimiorésistance des CCR. La première a trait à la dualité de CDX2 vis à vis de la tumorigenèse. En effet, plusieurs équipes, dont la nôtre, ont clairement montré que CDX2 s'oppose à la tumorigenèse dans l'intestin en diminuant notamment la prolifération et la migration cellulaire (Aoki et al. 2003; Bonhomme et al. 2003; I. Gross et al. 2008), mais

favorise la tumorigenèse dans d'autres organes (Scholl et al. 2007; Y. Zhang et al. 2016). Mes résultats pourraient suggérer une action versatile de CDX2 comme oncogène et gène suppresseur de tumeur, également dans le côlon. L'inhibition de la réparation de l'ADN par CDX2 dans les cellules cancéreuses coliques illustrerait également cette versatilité fonctionnelle (Renouf et al. 2012). Les mécanismes moléculaires impliqués dans cette versatilité sont encore inconnus et pourraient dépendre de son niveau d'expression, mais aussi du site d'expression et du microenvironnement.

La seconde hypothèse est le détournement de molécules caractéristiques du phénotype intestinal différencié par les cellules tumorales. A l'état physiologique, sous l'effet de l'expression de CDX2, les cellules différenciées sont situées à l'interface entre le milieu intérieur et extérieur et nécessitent notamment des transporteurs de la famille ABC pour se protéger des agents xénobiotiques provenant de l'alimentation. De plus, ces cellules différenciées n'ont pas vocation à se multiplier. La DPD, qui à l'état physiologique est impliquée dans l'étape initiale du catabolisme des pyrimidines (Gonzalez and Fernandez-Salguero 1995), pourrait avoir une activité augmentée dans les cellules différenciées, qui ne nécessiteraient plus les éléments de base pour la synthèse de l'ADN lors de la phase de réplication. Par le biais de CDX2, la cellule tumorale serait alors capable de détourner ces propriétés de cellules différenciées à son avantage pour résister à la chimiothérapie.

Enfin, il est évident que le rôle de CDX2 dans la chimiorésistance est probablement plus complexe et intrique plusieurs mécanismes entre eux. L'identification des nouveaux gènes cibles de CDX2 permettrait de mieux comprendre ce phénomène qui pourrait impliquer d'autres mécanismes de chimiorésistance tels que les altérations du cycle cellulaire ou de l'apoptose puisque CDX2 régule ces processus (R.-J. Guo, Suh, and Lynch 2004). Par ailleurs, l'étude du rôle de CDX2 dans d'autres cancers, comme les cancers gastriques ou œsophagiens,

dont certaines formes sont particulièrement résistantes à la chimiothérapie (ex. adénocarcinomes à cellules indépendantes) et où CDX2 est parfois exprimé de manière ectopique, pourrait également permettre de mieux évaluer son implication dans les phénomènes de chimiorésistance.

4.1.4. Perspectives cliniques

A plus longue échéance, les résultats de ces travaux pourraient servir de base à de nouvelles études cliniques. Dans un premier temps, il serait nécessaire de déterminer de manière prospective le bénéfice de l'administration d'une chimiothérapie systémique à des patients qui présentent un haut niveau d'expression de *CDX2* et/ou *ABCC11*. En effet, les études actuelles se basent sur des cohortes rétrospectives « poolées » et potentiellement inhomogènes de patients. Une étude prospective et randomisée de l'administration d'une chimiothérapie systémique selon le niveau d'expression de CDX2 intratumoral permettrait de proposer, en cas de résultats probants, de modifier les indications actuelles et éviter l'administration inutile de chimiothérapie qui, potentiellement toxique, pourrait induire des effets secondaires sans efficacité réelle. D'autres études cliniques pourraient également être menées pour orienter le clinicien vers l'utilisation d'autres molécules que le 5-FU selon le niveau d'expression de CDX2. A l'heure de la médecine personnalisée, la sensibilité de telle ou telle tumeur de patients à tel ou tel agent de chimiothérapie prend tout son sens et nécessite des marqueurs d'efficacité fiables, potentiellement représentés par l'expression de CDX2 ou ABCC11. De la même manière, il serait intéressant de déterminer si l'activité de la DPD, qui présente une forte variabilité inter-individuelle non nécessairement corrélée à son expression ou à des polymorphismes, pourrait être utilisée comme marqueur prédictif d'efficacité de la chimiothérapie. Des tests simples (ex. dosage du rapport dihydro-uracile/uracile UH2/U plasmatique), envisageables en pratique clinique, ont déjà été mis au point pour identifier les

patients ayant une activité insuffisante de la DPD et présentant un risque de toxicité sévère en cas de traitement à base de 5-FU (Boisdron-Celle et al. 2007).

Par ailleurs, même si les premières études cliniques n'ont pas montré de bénéfice de survie des molécules inhibitrices des transporteurs ABC (Nielsen et al. 2017; Binkhathlan and Lavasanifar 2013), l'inhibition des molécules d'efflux reste un moyen de contournement potentiel de chimiorésistance. Les études réalisées n'avaient peut-être pas sélectionné une population d'étude adéquate pour répondre à la question ou les molécules testées n'étaient pas assez spécifiques. Une étude comparant l'efficacité de ces molécules inhibitrices chez des patients dont les tumeurs surexpriment des transporteurs ABC et dont le niveau d'expression de CDX2 en serait le marqueur, pourrait permettre de mieux évaluer l'effet de l'ajout d'une molécule inhibitrice des ABC à une chimiothérapie classique sur la survie des patients. De manière analogue, des inhibiteurs de la DPD, n'ayant pas montré de bénéfice de survie en combinaison avec des formes orales du 5-FU (Saif et al. 2011; Miyamoto et al. 2014; Miura et al. 2017), pourraient être testés sur des populations de patients mieux ciblées.

4.2. Chimiorésistance induite par les dérivés organométalliques dans les cancers digestifs

Les phénomènes de chimiorésistance justifient le développement et l'utilisation de nouvelles molécules de chimiothérapie dans les CCR et les cancers digestifs en général. Toutefois, l'utilisation de nouvelles drogues dans des essais cliniques en cancérologie nécessite des étapes de phase préclinique importantes.

La seconde partie de ce travail de thèse a consisté en l'étude de nouveaux agents anticancéreux qui, comme le platine, sont dérivés d'autres métaux lourds comme le ruthénium et l'osmium. Bien qu'encore parcellaires, les résultats obtenus ont permis la rédaction (cf publication jointe) ou la préparation d'études précliniques sur les agents RDC-11, RDC-34, ODC-2 et ODC-3.

Ceux-ci indiquent que ces molécules ont des effets différents selon les lignées cellulaires sur l'expression des molécules d'efflux, mais n'induisent pas franchement l'expression d'un phénotype basé sur l'expression de molécules d'efflux, contrairement aux molécules utilisées classiquement dans les pratiques cliniques actuelles, notamment dans le cancer gastrique. La connaissance des mécanismes d'action et de résistance à ces agents dans les lignées cellulaires de cancers digestifs représentera une étape cruciale au développement de ces molécules à un échelon clinique.

4.3. Conclusion générale

Mon travail de thèse abordait le problème majeur de la résistance à la chimiothérapie dans les cancers digestifs. J'ai identifié des mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance à la chimiothérapie par 5-FU dans le CCR et participé à l'étude de nouvelles molécules de chimiothérapie lors de phases précliniques dans leur capacité à induire des phénomènes de résistance de type efflux à travers les transporteurs de la famille ABC. Ces résultats pourraient servir de rationnel pour des études ultérieures dans le cadre de la médecine personnalisée en cancérologie.



BIBLIOGRAPHIE

5. BIBLIOGRAPHIE

Anderson, L. A., A. Tavilla, H. Brenner, S. Luttmann, C. Navarro, A. T. Gavin, B. Holleczeck, et al. 2015. “Survival for Oesophageal, Stomach and Small Intestine Cancers in Europe 1999-2007: Results from EUROCORE-5.” *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 51 (15): 2144–57. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2015.07.026>.

Aoki, Koji, Yoshitaka Tamai, Shigeo Horiike, Masanobu Oshima, and Makoto M. Taketo. 2003. “Colonic Polyposis Caused by MTOR-Mediated Chromosomal Instability in *Apc*⁺/*Delta*716 *Cdx2*^{+/-} Compound Mutant Mice.” *Nature Genetics* 35 (4): 323–30. <https://doi.org/10.1038/ng1265>.

Baba, H., M. Watanabe, H. Okabe, Y. Miyamoto, Y. Sakamoto, Y. Baba, M. Iwatsuki, A. Chikamoto, and T. Beppu. 2012. “Upregulation of ERCC1 and DPD Expressions after Oxaliplatin-Based First-Line Chemotherapy for Metastatic Colorectal Cancer.” *British Journal of Cancer* 107 (12): 1950–55. <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.502>.

Baba, Yoshifumi, Katsuhiko Nosho, Kaori Shima, Ellen Freed, Natsumi Irahara, Juliet Philips, Jeffrey A. Meyerhardt, et al. 2009. “Relationship of CDX2 Loss with Molecular Features and Prognosis in Colorectal Cancer.” *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 15 (14): 4665–73. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0401>.

Bae, Jeong Mo, Tae Hun Lee, Nam-Yun Cho, Tae-You Kim, and Gyeong Hoon Kang. 2015. “Loss of CDX2 Expression Is Associated with Poor Prognosis in Colorectal Cancer Patients.” *World Journal of Gastroenterology* 21 (5): 1457–67. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i5.1457>.

Balbinot, Camille, Olivier Armant, Nabila Elarouci, Laetitia Marisa, Elisabeth Martin, Etienne De Clara, Alina Onea, et al. 2018. “The *Cdx2* Homeobox Gene Suppresses Intestinal Tumorigenesis through Non-Cell-Autonomous Mechanisms.” *The Journal of Experimental Medicine* 215 (3): 911–26. <https://doi.org/10.1084/jem.20170934>.

Barker, Nick. 2014. “Adult Intestinal Stem Cells: Critical Drivers of Epithelial Homeostasis and Regeneration.”

Nature Reviews. Molecular Cell Biology 15 (1): 19–33. <https://doi.org/10.1038/nrm3721>.

Beck, F., K. Chawengsaksophak, P. Waring, R. J. Playford, and J. B. Furness. 1999. “Reprogramming of Intestinal Differentiation and Intercalary Regeneration in Cdx2 Mutant Mice.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (13): 7318–23.

Belot, A., P. Grosclaude, N. Bossard, E. Jouglu, E. Benhamou, P. Delafosse, A.-V. Guizard, et al. 2008. “Cancer Incidence and Mortality in France over the Period 1980–2005.” *Revue D'épidémiologie Et De Santé Publique* 56 (3): 159–75. <https://doi.org/10.1016/j.respe.2008.03.117>.

Benahmed, Fairouz, Isabelle Gross, Stephen J. Gaunt, Felix Beck, Frédéric Jehan, Claire Domon-Dell, Elisabeth Martin, Michèle Kedinger, Jean-Noël Freund, and Isabelle Duluc. 2008. “Multiple Regulatory Regions Control the Complex Expression Pattern of the Mouse Cdx2 Homeobox Gene.” *Gastroenterology* 135 (4): 1238–47, 1247.e1-3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.06.045>.

Binkhathlan, Ziyad, and Afsaneh Lavasanifar. 2013. “P-Glycoprotein Inhibition as a Therapeutic Approach for Overcoming Multidrug Resistance in Cancer: Current Status and Future Perspectives.” *Current Cancer Drug Targets* 13 (3): 326–46.

Boisdron-Celle, M., G. Remaud, S. Traore, A. L. Poirier, L. Gamelin, A. Morel, and E. Gamelin. 2007. “5-Fluorouracil-Related Severe Toxicity: A Comparison of Different Methods for the Pretherapeutic Detection of Dihydropyrimidine Dehydrogenase Deficiency.” *Cancer Letters* 249 (2): 271–82. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2006.09.006>.

Boland, C. Richard, and Ajay Goel. 2010. “Microsatellite Instability in Colorectal Cancer.” *Gastroenterology* 138 (6): 2073–2087.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.12.064>.

Bonhomme, C., I. Duluc, E. Martin, K. Chawengsaksophak, M.-P. Chenard, M. Kedinger, F. Beck, J.-N. Freund, and C. Domon-Dell. 2003. “The Cdx2 Homeobox Gene Has a Tumour Suppressor Function in the Distal Colon in Addition to a Homeotic Role during Gut Development.” *Gut* 52 (10): 1465–71.

Boulangier, Jim, Anne Vézina, Sébastien Mongrain, Francois Boudreau, Nathalie Perreault, Benoît A. Auclair, Jean Lainé, Claude Asselin, and Nathalie Rivard. 2005. "Cdk2-Dependent Phosphorylation of Homeobox Transcription Factor CDX2 Regulates Its Nuclear Translocation and Proteasome-Mediated Degradation in Human Intestinal Epithelial Cells." *The Journal of Biological Chemistry* 280 (18): 18095–107. <https://doi.org/10.1074/jbc.M502184200>.

Boyd, Mette, Simon Bressendorff, Jette Møller, Jørgen Olsen, and Jesper T. Troelsen. 2009. "Mapping of HNF4alpha Target Genes in Intestinal Epithelial Cells." *BMC Gastroenterology* 9 (September): 68. <https://doi.org/10.1186/1471-230X-9-68>.

Boyer, John, Estelle G. McLean, Somaiah Aroori, Peter Wilson, Andrea McCulla, P. Declan Carey, Daniel B. Longley, and Patrick G. Johnston. 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): 2158–67.

Brabletz, Thomas, Simone Spaderna, Jochen Kolb, Falk Hlubek, Gerhard Faller, Christiane J. Bruns, Andreas Jung, et al. 2004. "Down-Regulation of the Homeodomain Factor Cdx2 in Colorectal Cancer by Collagen Type I: An Active Role for the Tumor Environment in Malignant Tumor Progression." *Cancer Research* 64 (19): 6973–77. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1132>.

Bruun, Jarle, Anita Sveen, Rita Barros, Peter W. Eide, Ina Eilertsen, Matthias Kolberg, Teijo Pellinen, et al. 2018. "Prognostic, Predictive and Pharmacogenomic Assessments of CDX2 Refine Stratification of Colorectal Cancer." *Molecular Oncology*, June. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12347>.

Cao, Dongxing, Shaolan Qin, Yifei Mu, and Ming Zhong. 2017. "The Role of MRP1 in the Multidrug Resistance of Colorectal Cancer." *Oncology Letters* 13 (4): 2471–76. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.5741>.

Chikazawa, Nobuhito, Haruo Tanaka, Takehiko Tasaka, Masafumi Nakamura, Masao Tanaka, Hideya Onishi, and Mitsuo Katano. 2010. "Inhibition of Wnt Signaling Pathway Decreases Chemotherapy-Resistant Side-Population

Colon Cancer Cells.” *Anticancer Research* 30 (6): 2041–48.

Choi, J.-H., H.-Y. Lim, H. J. Joo, H. S. Kim, J. W. Yi, H. C. Kim, Y. K. Cho, M. W. Kim, and K. B. Lee. 2002. “Expression of Multidrug Resistance-Associated Protein1, P-Glycoprotein, and Thymidylate Synthase in Gastric Cancer Patients Treated with 5-Fluorouracil and Doxorubicin-Based Adjuvant Chemotherapy after Curative Resection.” *British Journal of Cancer* 86 (10): 1578–85. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600305>.

Collège des universitaires en hépato-gastro-entérologie, Laurent Beaugerie, and Harry Sokol. 2014. *Les fondamentaux de la pathologie digestive: enseignement intégré, appareil digestif*. Issy-les-Moulineaux: Elsevier Masson.

Dalerba, Piero, Debashis Sahoo, Soonmyung Paik, Xiangqian Guo, Greg Yothers, Nan Song, Nate Wilcox-Fogel, et al. 2016. “CDX2 as a Prognostic Biomarker in Stage II and Stage III Colon Cancer.” *The New England Journal of Medicine* 374 (3): 211–22. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1506597>.

Dean, M., A. Rzhetsky, and R. Allikmets. 2001. “The Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily.” *Genome Research* 11 (7): 1156–66. <https://doi.org/10.1101/gr.184901>.

Dean, Michael. 2009. “ABC Transporters, Drug Resistance, and Cancer Stem Cells.” *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 14 (1): 3–9. <https://doi.org/10.1007/s10911-009-9109-9>.

Delhorme, J.-B., F. Severac, G. Averous, O. Glehen, G. Passot, N. Bakrin, F. Marchal, et al. 2018. “Cytoreductive Surgery and Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy for Pseudomyxoma Peritonei of Appendicular and Extra-Appendicular Origin.” *The British Journal of Surgery*, February. <https://doi.org/10.1002/bjs.10716>.

Drake, Richard L., and Henry Gray, eds. 2010. *Gray’s Anatomy for Students: Studentconsult ...* 2. ed. Philadelphia: Elsevier, Churchill Livingstone.

El-Awady, Raafat, Ekram Saleh, Amna Hashim, Nehal Soliman, Alaa Dallah, Azza Elrasheed, and Ghada Elakraa.

2016. “The Role of Eukaryotic and Prokaryotic ABC Transporter Family in Failure of Chemotherapy.” *Frontiers in Pharmacology* 7: 535. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00535>.

Elias, Dominique, François Gilly, Florent Boutitie, François Quenet, Jean-Marc Bereder, Baudouin Mansvelt, Gérard Lorimier, Pierre Dubè, and Olivier Glehen. 2010. “Peritoneal Colorectal Carcinomatosis Treated with Surgery and Perioperative Intraperitoneal Chemotherapy: Retrospective Analysis of 523 Patients from a Multicentric French Study.” *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 28 (1): 63–68. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.23.9285>.

Emmink, Benjamin L., Winan J. Van Houdt, Robert G. Vries, Frederik J. H. Hoogwater, Klaas M. Govaert, Andre Verheem, Maarten W. Nijkamp, et al. 2011. “Differentiated Human Colorectal Cancer Cells Protect Tumor-Initiating Cells from Irinotecan.” *Gastroenterology* 141 (1): 269–78. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.03.052>.

Esquivel, Jesus, Andrew M. Lowy, Maurie Markman, Terence Chua, Joerg Pelz, Dario Baratti, Joel M. Baumgartner, et al. 2014. “The American Society of Peritoneal Surface Malignancies (ASPSM) Multiinstitution Evaluation of the Peritoneal Surface Disease Severity Score (PSDSS) in 1,013 Patients with Colorectal Cancer with Peritoneal Carcinomatosis.” *Annals of Surgical Oncology* 21 (13): 4195–4201. <https://doi.org/10.1245/s10434-014-3798-z>.

Fan, K., D. Fan, L. F. Cheng, and C. Li. 2000. “Expression of Multidrug Resistance-Related Markers in Gastric Cancer.” *Anticancer Research* 20 (6C): 4809–14.

Fearon, E. R., and B. Vogelstein. 1990. “A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis.” *Cell* 61 (5): 759–67.

Findlay, J. M., M. R. Middleton, and I. Tomlinson. 2015. “A Systematic Review and Meta-Analysis of Somatic and Germline DNA Sequence Biomarkers of Esophageal Cancer Survival, Therapy Response and Stage.” *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 26 (4): 624–44. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu449>.

Franko, Jan, Qian Shi, Charles D. Goldman, Barbara A. Pockaj, Garth D. Nelson, Richard M. Goldberg, Henry C. Pitot, Axel Grothey, Steven R. Alberts, and Daniel J. Sargent. 2012. “Treatment of Colorectal Peritoneal

Carcinomatosis with Systemic Chemotherapy: A Pooled Analysis of North Central Cancer Treatment Group Phase III Trials N9741 and N9841.” *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 30 (3): 263–67. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.37.1039>.

Freund, J. N., C. Domon-Dell, M. Kedinger, and I. Duluc. 1998. “The Cdx-1 and Cdx-2 Homeobox Genes in the Intestine.” *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire* 76 (6): 957–69.

Gaiddon, C., P. Jeannequin, P. Bischoff, M. Pfeffer, C. Sirlin, and J. P. Loeffler. 2005. “Ruthenium (II)-Derived Organometallic Compounds Induce Cytostatic and Cytotoxic Effects on Mammalian Cancer Cell Lines through P53-Dependent and P53-Independent Mechanisms.” *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 315 (3): 1403–11. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.089342>.

Gao, Nan, and Klaus H. Kaestner. 2010. “Cdx2 Regulates Endo-Lysosomal Function and Epithelial Cell Polarity.” *Genes & Development* 24 (12): 1295–1305. <https://doi.org/10.1101/gad.1921510>.

Gao, Nan, Peter White, and Klaus H. Kaestner. 2009. “Establishment of Intestinal Identity and Epithelial-Mesenchymal Signaling by Cdx2.” *Developmental Cell* 16 (4): 588–99. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.02.010>.

Gerbe, F., and P. Jay. 2016. “Intestinal Tuft Cells: Epithelial Sentinels Linking Luminal Cues to the Immune System.” *Mucosal Immunology* 9 (6): 1353–59. <https://doi.org/10.1038/mi.2016.68>.

Gerbe, François, Catherine Legraverend, and Philippe Jay. 2012. “The Intestinal Epithelium Tuft Cells: Specification and Function.” *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 69 (17): 2907–17. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-0984-7>.

Glehen, O., F. Kwiatkowski, P. H. Sugarbaker, D. Elias, E. A. Levine, M. De Simone, R. Barone, et al. 2004. “Cytoreductive Surgery Combined with Perioperative Intraperitoneal Chemotherapy for the Management of Peritoneal Carcinomatosis from Colorectal Cancer: A Multi-Institutional Study.” *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 22 (16): 3284–92.

<https://doi.org/10.1200/JCO.2004.10.012>.

Gonzalez, F. J., and P. Fernandez-Salguero. 1995. "Diagnostic Analysis, Clinical Importance and Molecular Basis of Dihydropyrimidine Dehydrogenase Deficiency." *Trends in Pharmacological Sciences* 16 (10): 325–27.

Gourdier, Isabelle, Maguy Del Rio, Laure Crabbé, Laurent Candeil, Virginie Copois, Marc Ychou, Charles Auffray, et al. 2002. "Drug Specific Resistance to Oxaliplatin Is Associated with Apoptosis Defect in a Cellular Model of Colon Carcinoma." *FEBS Letters* 529 (2–3): 232–36.

Grainger, Stephanie, Joanne G. A. Savory, and David Lohnes. 2010. "Cdx2 Regulates Patterning of the Intestinal Epithelium." *Developmental Biology* 339 (1): 155–65. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.12.025>.

Gross, I., I. Duluc, T. Benameur, A. Calon, E. Martin, T. Brabletz, M. Kedinger, C. Domon-Dell, and J.-N. Freund. 2008. "The Intestine-Specific Homeobox Gene Cdx2 Decreases Mobility and Antagonizes Dissemination of Colon Cancer Cells." *Oncogene* 27 (1): 107–15. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210601>.

Gross, Isabelle, Benoit Lhermitte, Claire Domon-Dell, Isabelle Duluc, Elisabeth Martin, Christian Gaiddon, Michele Kedinger, and Jean-Noël Freund. 2005. "Phosphorylation of the Homeotic Tumor Suppressor Cdx2 Mediates Its Ubiquitin-Dependent Proteasome Degradation." *Oncogene* 24 (54): 7955–63. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208945>.

Guinney, Justin, Rodrigo Dienstmann, Xin Wang, Aurélien de Reyniès, Andreas Schlicker, Charlotte Sonesson, Laetitia Marisa, et al. 2015. "The Consensus Molecular Subtypes of Colorectal Cancer." *Nature Medicine* 21 (11): 1350–56. <https://doi.org/10.1038/nm.3967>.

Gunawardene, Ashok R., Bernard M. Corfe, and Carolyn A. Staton. 2011. "Classification and Functions of Enteroendocrine Cells of the Lower Gastrointestinal Tract." *International Journal of Experimental Pathology* 92 (4): 219–31. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2011.00767.x>.

Guo, Rong-Jun, Shinsuke Funakoshi, Hannah H. Lee, Jianping Kong, and John P. Lynch. 2010. "The Intestine-Specific Transcription Factor Cdx2 Inhibits Beta-Catenin/TCF Transcriptional Activity by Disrupting the Beta-

Catenin-TCF Protein Complex.” *Carcinogenesis* 31 (2): 159–66. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp213>.

Guo, Rong-Jun, Eun Ran Suh, and John P. Lynch. 2004. “The Role of Cdx Proteins in Intestinal Development and Cancer.” *Cancer Biology & Therapy* 3 (7): 593–601.

Guo, Yanping, Elena Kotova, Zhe-Sheng Chen, Kun Lee, Elizabeth Hopper-Borge, Martin G. Belinsky, and Gary D. Kruh. 2003. “MRP8, ATP-Binding Cassette C11 (ABCC11), Is a Cyclic Nucleotide Efflux Pump and a Resistance Factor for Fluoropyrimidines 2',3'-Dideoxycytidine and 9'-(2'-Phosphonylmethoxyethyl)Adenine.” *The Journal of Biological Chemistry* 278 (32): 29509–14. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304059200>.

Gürel, S., O. Yerci, G. Filiz, E. Dolar, T. Yilmazlar, S. G. Nak, M. Gülten, A. Zorluoğlu, and F. Memik. 1999. “High Expression of Multidrug Resistance-1 (MDR-1) and Its Relationship with Multiple Prognostic Factors in Gastric Carcinomas in Patients in Turkey.” *The Journal of International Medical Research* 27 (2): 79–84. <https://doi.org/10.1177/030006059902700204>.

Gustavsson, Bengt, Christopher Kaiser, Göran Carlsson, Yvonne Wettergren, Elisabeth Odin, Elinor Bexe Lindskog, Clet Niyikiza, and Doreen Ma. 2009. “Molecular Determinants of Efficacy for 5-FU-Based Treatments in Advanced Colorectal Cancer: MRNA Expression for 18 Chemotherapy-Related Genes.” *International Journal of Cancer* 124 (5): 1220–26. <https://doi.org/10.1002/ijc.23852>.

Hamzic, S., N. Wenger, T. K. Froehlich, M. Joerger, S. Aebi, C. R. Largiadèr, and U. Amstutz. 2017. “The Impact of ABCC11 Polymorphisms on the Risk of Early-Onset Fluoropyrimidine Toxicity.” *The Pharmacogenomics Journal* 17 (4): 319–24. <https://doi.org/10.1038/tpj.2016.23>.

He, T., A. Mo, K. Zhang, and L. Liu. 2013. “ABCB1/MDR1 Gene Polymorphism and Colorectal Cancer Risk: A Meta-Analysis of Case-Control Studies.” *Colorectal Disease: The Official Journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland* 15 (1): 12–18. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1318.2012.02919.x>.

Hinkel, Isabelle, Isabelle Duluc, Elisabeth Martin, Dominique Guenot, Jean-Noel Freund, and Isabelle Gross. 2012. “Cdx2 Controls Expression of the Protocadherin Mucdhl, an Inhibitor of Growth and β -Catenin Activity in

Colon Cancer Cells.” *Gastroenterology* 142 (4): 875-885.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.12.037>.

Hinoi, Takao, Galina Gesina, Aytekin Akyol, Rork Kuick, Samir Hanash, Thomas J. Giordano, Stephen B. Gruber, and Eric R. Fearon. 2005. “CDX2-Regulated Expression of Iron Transport Protein Hephastin in Intestinal and Colonic Epithelium.” *Gastroenterology* 128 (4): 946–61.

Hinoi, Takao, Peter C. Lucas, Rork Kuick, Samir Hanash, Kathleen R. Cho, and Eric R. Fearon. 2002. “CDX2 Regulates Liver Intestine-Cadherin Expression in Normal and Malignant Colon Epithelium and Intestinal Metaplasia.” *Gastroenterology* 123 (5): 1565–77.

Hlavata, I., B. Mohelnikova-Duchonova, R. Vaclavikova, V. Liska, P. Pitule, P. Novak, J. Bruha, et al. 2012. “The Role of ABC Transporters in Progression and Clinical Outcome of Colorectal Cancer.” *Mutagenesis* 27 (2): 187–96. <https://doi.org/10.1093/mutage/ger075>.

Hollande, Frédéric, Julie Pannequin, and Dominique Joubert. 2010. “The Long Road to Colorectal Cancer Therapy: Searching for the Right Signals.” *Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy* 13 (1–2): 44–56. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2009.01.002>.

Honorat, Mylène, Aurélie Mesnier, Julie Vendrell, Attilio Di Pietro, Valérie Lin, Charles Dumontet, Pascale Cohen, and Léa Payen. 2011. “MRP8/ABCC11 Expression Is Regulated by Dexamethasone in Breast Cancer Cells and Is Associated to Progesterone Receptor Status in Breast Tumors.” *International Journal of Breast Cancer* 2011: 807380. <https://doi.org/10.4061/2011/807380>.

Honorat, Mylène, Aurelia Mesnier, Julie Vendrell, Jérôme Guitton, Ivan Bieche, Rosette Lidereau, Gary D. Kruh, Charles Dumontet, Pascale Cohen, and Lea Payen. 2008. “ABCC11 Expression Is Regulated by Estrogen in MCF7 Cells, Correlated with Estrogen Receptor Alpha Expression in Postmenopausal Breast Tumors and Overexpressed in Tamoxifen-Resistant Breast Cancer Cells.” *Endocrine-Related Cancer* 15 (1): 125–38. <https://doi.org/10.1677/ERC-07-0189>.

Honorat, Mylène, Raphaël Terreux, Pierre Falson, Attilio Di Pietro, Charles Dumontet, and Lea Payen. 2013.

“Localization of Putative Binding Sites for Cyclic Guanosine Monophosphate and the Anti-Cancer Drug 5-Fluoro-2'-Deoxyuridine-5'-Monophosphate on ABCC11 in Silico Models.” *BMC Structural Biology* 13 (May): 7. <https://doi.org/10.1186/1472-6807-13-7>.

Houde, M., P. Laprise, D. Jean, M. Blais, C. Asselin, and N. Rivard. 2001. “Intestinal Epithelial Cell Differentiation Involves Activation of P38 Mitogen-Activated Protein Kinase That Regulates the Homeobox Transcription Factor CDX2.” *The Journal of Biological Chemistry* 276 (24): 21885–94. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100236200>.

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): 887–94. <https://doi.org/10.1124/mol.109.063172>.

Hsu, Hsi-Hsien, Ming-Cheng Chen, Rathinasamy Baskaran, Yueh-Min Lin, Cecilia H. Day, Yi-Jiun Lin, Chuan-Chou Tu, Viswanadha Vijaya Padma, Wei-Wen Kuo, and Chih-Yang Huang. 2017. “Oxaliplatin Resistance in Colorectal Cancer Cells Is Mediated via Activation of ABCG2 to Alleviate ER Stress Induced Apoptosis.” *Journal of Cellular Physiology*, December. <https://doi.org/10.1002/jcp.26406>.

Hu, Tao, Zhen Li, Chun-Ying Gao, and Chi Hin Cho. 2016. “Mechanisms of Drug Resistance in Colon Cancer and Its Therapeutic Strategies.” *World Journal of Gastroenterology* 22 (30): 6876–89. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i30.6876>.

Huang, Qi, Shu Li, Pu Cheng, Mei Deng, Xin He, Zhen Wang, Cheng-Hui Yang, Xiao-Ying Zhao, and Jian Huang. 2017. “High Expression of Anti-Apoptotic Protein Bcl-2 Is a Good Prognostic Factor in Colorectal Cancer: Result of a Meta-Analysis.” *World Journal of Gastroenterology* 23 (27): 5018–33. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i27.5018>.

Islam, Farhadul, Vinod Gopalan, Riajul Wahab, Robert A. Smith, and Alfred K.-Y. Lam. 2015. “Cancer Stem Cells in Oesophageal Squamous Cell Carcinoma: Identification, Prognostic and Treatment Perspectives.” *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 96 (1): 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.04.007>.

Jani, Márton, and Péter Krajcsi. 2014. "In Vitro Methods in Drug Transporter Interaction Assessment." *Drug Discovery Today. Technologies* 12 (June): e105-112. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2014.03.011>.

Jass, J. R., M. Barker, L. Fraser, M. D. Walsh, V. L. J. Whitehall, B. Gabrielli, J. Young, and B. A. Leggett. 2003. "APC Mutation and Tumour Budding in Colorectal Cancer." *Journal of Clinical Pathology* 56 (1): 69–73.

Jensen, Niels Frank, Keli Agama, Amit Roy, David Hersi Smith, Thomas D. Pfister, Maria Unni Rømer, Hong-Liang Zhang, et al. 2016. "Characterization of DNA Topoisomerase I in Three SN-38 Resistant Human Colon Cancer Cell Lines Reveals a New Pair of Resistance-Associated Mutations." *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR* 35 (March): 56. <https://doi.org/10.1186/s13046-016-0335-x>.

Jonckheere, Nicolas, Audrey Vincent, Michaël Perrais, Marie-Paule Ducourouble, Anita Korteland-van Male, Jean-Pierre Aubert, Pascal Pigny, et al. 2007. "The Human Mucin MUC4 Is Transcriptionally Regulated by Caudal-Related Homeobox, Hepatocyte Nuclear Factors, Forkhead Box A, and GATA Endodermal Transcription Factors in Epithelial Cancer Cells." *The Journal of Biological Chemistry* 282 (31): 22638–50. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700905200>.

Kataoka, Kozo, Akiyoshi Kanazawa, Akio Nakajima, Ayane Yamaguchi, and Akira Arimoto. 2015. "Prognostic Value of Biomarkers in Metastatic Colorectal Cancer Patients." *The Journal of Surgical Research* 194 (2): 343–50. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2014.10.006>.

Keller, Matthew S., Toshihiko Ezaki, Rong-Jun Guo, and John P. Lynch. 2004. "Cdx1 or Cdx2 Expression Activates E-Cadherin-Mediated Cell-Cell Adhesion and Compaction in Human COLO 205 Cells." *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 287 (1): G104-114. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00484.2003>.

Kellner, U., L. Hutchinson, A. Seidel, H. Lage, M. K. Danks, M. Dietel, and S. H. Kaufmann. 1997. "Decreased Drug Accumulation in a Mitoxantrone-Resistant Gastric Carcinoma Cell Line in the Absence of P-Glycoprotein." *International Journal of Cancer* 71 (5): 817–24.

Kerschner, Jenny L., and Ann Harris. 2012. "Transcriptional Networks Driving Enhancer Function in the CFTR Gene." *The Biochemical Journal* 446 (2): 203–12. <https://doi.org/10.1042/BJ20120693>.

Kim, Jung Ho, Ye-Young Rhee, Jeong Mo Bae, Nam-Yun Cho, and Gyeong Hoon Kang. 2013. "Loss of CDX2/CK20 Expression Is Associated with Poorly Differentiated Carcinoma, the CpG Island Methylator Phenotype, and Adverse Prognosis in Microsatellite-Unstable Colorectal Cancer." *The American Journal of Surgical Pathology* 37 (10): 1532–41. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e31829ab1c1>.

Kim, Sunghoon, Claire Domon-Dell, Qingding Wang, Dai H. Chung, Antonio Di Cristofano, Pier Paolo Pandolfi, Jean-Noel Freund, and B. Mark Evers. 2002. "PTEN and TNF-Alpha Regulation of the Intestinal-Specific Cdx-2 Homeobox Gene through a PI3K, PKB/Akt, and NF-KappaB-Dependent Pathway." *Gastroenterology* 123 (4): 1163–78.

Kim, Young S., and Samuel B. Ho. 2010. "Intestinal Goblet Cells and Mucins in Health and Disease: Recent Insights and Progress." *Current Gastroenterology Reports* 12 (5): 319–30. <https://doi.org/10.1007/s11894-010-0131-2>.

Knösel, Thomas, Yuan Chen, Stefanie Hotovy, Utz Settmacher, Annelore Altendorf-Hofmann, and Iver Petersen. 2012. "Loss of Desmocollin 1-3 and Homeobox Genes PITX1 and CDX2 Are Associated with Tumor Progression and Survival in Colorectal Carcinoma." *International Journal of Colorectal Disease* 27 (11): 1391–99. <https://doi.org/10.1007/s00384-012-1460-4>.

Koh, Iemasa, Takao Hinoi, Kazuhiro Sentani, Eiji Hirata, Suguru Nosaka, Hiroaki Niitsu, Masashi Miguchi, et al. 2016. "Regulation of Multidrug Resistance 1 Expression by CDX2 in Ovarian Mucinous Adenocarcinoma." *Cancer Medicine* 5 (7): 1546–55. <https://doi.org/10.1002/cam4.697>.

Konishi, T., S. Sasaki, T. Watanabe, J. Kitayama, and H. Nagawa. 2006. "Overexpression of HRFI Inhibits 5-Fluorouracil-Induced Apoptosis in Colorectal Cancer Cells via Activation of NF-KappaB and Upregulation of BCL-2 and BCL-XL." *Oncogene* 25 (22): 3160–69. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209342>.

Koopman, Miriam, Sabine Venderbosch, Harm van Tinteren, Marjolijn J. Ligtenberg, Iris Nagtegaal, Johan H. Van Krieken, and Cornelis J. Punt. 2009. "Predictive and Prognostic Markers for the Outcome of Chemotherapy in Advanced Colorectal Cancer, a Retrospective Analysis of the Phase III Randomised CAIRO Study." *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 45 (11): 1999–2006. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2009.04.017>.

Krizkova, V., M. Dubova, S. Susova, O. Vycital, J. Bruha, M. Skala, V. Liska, O. Daum, and P. Soucek. 2016. "Protein Expression of ATP-Binding Cassette Transporters ABCC10 and ABCC11 Associates with Survival of Colorectal Cancer Patients." *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 78 (3): 595–603. <https://doi.org/10.1007/s00280-016-3114-7>.

Krueger, Felix, Zofia Madeja, Myriam Hemberger, Martin McMahon, Simon J. Cook, and Stephen J. Gaunt. 2009. "Down-Regulation of Cdx2 in Colorectal Carcinoma Cells by the Raf-MEK-ERK 1/2 Pathway." *Cellular Signalling* 21 (12): 1846–56. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2009.07.020>.

Kruh, Gary D., Yanping Guo, Elizabeth Hopper-Borge, Martin G. Belinsky, and Zhe-Sheng Chen. 2007. "ABCC10, ABCC11, and ABCC12." *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology* 453 (5): 675–84. <https://doi.org/10.1007/s00424-006-0114-1>.

Lecomte, T André, F Bibeau, B Blanc, R Cohen, JP Lagasse, P Laurent-Puig, et al. 2017. "Cancer Du Côlon." *Thésaurus National de Cancérologie Digestive*, 2017. [<http://www.snfge.org/tncd>].

Lee, Adam M., Qian Shi, Emily Pavey, Steven R. Alberts, Daniel J. Sargent, Frank A. Sinicrope, Jeffrey L. Berenberg, Richard M. Goldberg, and Robert B. Diasio. 2014. "DPYD Variants as Predictors of 5-Fluorouracil Toxicity in Adjuvant Colon Cancer Treatment (NCCTG N0147)." *Journal of the National Cancer Institute* 106 (12). <https://doi.org/10.1093/jnci/dju298>.

Lepage, Côme, Riccardo Capocaccia, Monika Hackl, Valerie Lemmens, Esther Molina, Daniela Pierannunzio, Milena Sant, Annalisa Trama, Jean Faivre, and EURO CARE-5 Working Group: 2015. "Survival in Patients with Primary Liver Cancer, Gallbladder and Extrahepatic Biliary Tract Cancer and Pancreatic Cancer in Europe 1999-

2007: Results of EURO CARE-5.” *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 51 (15): 2169–78.
<https://doi.org/10.1016/j.ejca.2015.07.034>.

Licona, Cynthia, Marie-Elodie Spaety, Antonelle Capuozzo, Moussa Ali, Rita Santamaria, Olivier Armant, Francois Delalande, et al. 2017. “A Ruthenium Anticancer Compound Interacts with Histones and Impacts Differently on Epigenetic and Death Pathways Compared to Cisplatin.” *Oncotarget* 8 (2): 2568–84.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.13711>.

Lorentz, O., A. Cadoret, I. Duluc, J. Capeau, C. Gespach, G. Cherqui, and J. N. Freund. 1999. “Downregulation of the Colon Tumour-Suppressor Homeobox Gene Cdx-2 by Oncogenic Ras.” *Oncogene* 18 (1): 87–92.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202280>.

Magdy, Tarek, Rudolf Arlanov, Stefan Winter, Thomas Lang, Kathrin Klein, Yu Toyoda, Toshihisa Ishikawa, Matthias Schwab, and Ulrich M. Zanger. 2013. “ABCC11/MRP8 Polymorphisms Affect 5-Fluorouracil-Induced Severe Toxicity and Hepatic Expression.” *Pharmacogenomics* 14 (12): 1433–48.
<https://doi.org/10.2217/pgs.13.139>.

Mani, Sendurai A., Wenjun Guo, Mai-Jing Liao, Elinor Ng Eaton, Ayyakkannu Ayyanan, Alicia Y. Zhou, Mary Brooks, et al. 2008. “The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells.” *Cell* 133 (4): 704–15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.027>.

Manoochehri, Mehdi, Ashraf Karbasi, Mojgan Bandehpour, and Bahram Kazemi. 2014. “Down-Regulation of BAX Gene during Carcinogenesis and Acquisition of Resistance to 5-FU in Colorectal Cancer.” *Pathology Oncology Research: POR* 20 (2): 301–7. <https://doi.org/10.1007/s12253-013-9695-0>.

Marcil, Valérie, Noël Peretti, Edgard Delvin, and Emile Levy. 2004. “[Digestive and absorptive processes of lipids].” *Gastroenterologie Clinique Et Biologique* 28 (12): 1257–66.

Margalit, Y., S. Yarus, E. Shapira, Y. Gruenbaum, and A. Fainsod. 1993. “Isolation and Characterization of Target Sequences of the Chicken CdxA Homeobox Gene.” *Nucleic Acids Research* 21 (21): 4915–22.

Maring, J. G., H. J. M. Groen, F. M. Wachters, D. R. A. Uges, and E. G. E. de Vries. 2005. "Genetic Factors Influencing Pyrimidine-Antagonist Chemotherapy." *The Pharmacogenomics Journal* 5 (4): 226–43. <https://doi.org/10.1038/sj.tpj.6500320>.

Markowitz, Sanford D., Dawn M. Dawson, Joseph Willis, and James K. V. Willson. 2002. "Focus on Colon Cancer." *Cancer Cell* 1 (3): 233–36.

Mármol, Inés, Cristina Sánchez-de-Diego, Alberto Pradilla Dieste, Elena Cerrada, and María Jesús Rodríguez Yoldi. 2017. "Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer." *International Journal of Molecular Sciences* 18 (1). <https://doi.org/10.3390/ijms18010197>.

Masood, M. A., A. Loya, and M. A. Yusuf. 2016. "CDX2 as a Prognostic Marker in Gastric Cancer." *Acta Gastro-Enterologica Belgica* 79 (2): 197–200.

Medema, Jan Paul, and Louis Vermeulen. 2011. "Microenvironmental Regulation of Stem Cells in Intestinal Homeostasis and Cancer." *Nature* 474 (7351): 318–26. <https://doi.org/10.1038/nature10212>.

Meier-Menches, Samuel M., Christopher Gerner, Walter Berger, Christian G. Hartinger, and Bernhard K. Keppler. 2018. "Structure-Activity Relationships for Ruthenium and Osmium Anticancer Agents - towards Clinical Development." *Chemical Society Reviews* 47 (3): 909–28. <https://doi.org/10.1039/c7cs00332c>.

Meng, Xiangjun, Mili L. Leyva, Marjorie Jenny, Isabelle Gross, Samir Benosman, Bastien Fricker, Sébastien Harlepp, et al. 2009. "A Ruthenium-Containing Organometallic Compound Reduces Tumor Growth through Induction of the Endoplasmic Reticulum Stress Gene CHOP." *Cancer Research* 69 (13): 5458–66. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4408>.

Meyers, M., M. W. Wagner, H. S. Hwang, T. J. Kinsella, and D. A. Boothman. 2001. "Role of the HMLH1 DNA Mismatch Repair Protein in Fluoropyrimidine-Mediated Cell Death and Cell Cycle Responses." *Cancer Research* 61 (13): 5193–5201.

Miura, Koh, Hiroshi Shima, Naoko Takebe, Julie Rhie, Kennichi Satoh, Yoichiro Kakugawa, Masayuki Satoh, et al. 2017. "Drug Delivery of Oral Anti-Cancer Fluoropyrimidine Agents." *Expert Opinion on Drug Delivery* 14 (12): 1355–66. <https://doi.org/10.1080/17425247.2017.1316260>.

Miyamoto, Yuji, Yasuo Sakamoto, Naoya Yoshida, and Hideo Baba. 2014. "Efficacy of S-1 in Colorectal Cancer." *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 15 (12): 1761–70. <https://doi.org/10.1517/14656566.2014.937706>.

Morère, Jean-François, Françoise Mornex, and Denis Soulières. 2011. *Thérapeutique du cancer*. 2. éd. Paris: Springer.

Moskaluk, Christopher A., Hong Zhang, Steven M. Powell, Lisa A. Cerilli, Garret M. Hampton, and Henry F. Frierson. 2003. "Cdx2 Protein Expression in Normal and Malignant Human Tissues: An Immunohistochemical Survey Using Tissue Microarrays." *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 16 (9): 913–19. <https://doi.org/10.1097/01.MP.0000086073.92773.55>.

Muhale, Filipe A., Barbara A. Wetmore, Russell S. Thomas, and Howard L. McLeod. 2011. "Systems Pharmacology Assessment of the 5-Fluorouracil Pathway." *Pharmacogenomics* 12 (3): 341–50. <https://doi.org/10.2217/pgs.10.188>.

Mutoh, Hiroyuki, Hiroko Hayakawa, Hirotsugu Sakamoto, and Kentaro Sugano. 2007. "Homeobox Protein CDX2 Reduces Cox-2 Transcription by Inactivating the DNA-Binding Capacity of Nuclear Factor-KappaB." *Journal of Gastroenterology* 42 (9): 719–29. <https://doi.org/10.1007/s00535-007-2088-y>.

Nielsen, Dorte Lisbet, Jesper Andreas Palshof, Nils Brünner, Jan Stenvang, and Birgitte Martine Viuff. 2017. "Implications of ABCG2 Expression on Irinotecan Treatment of Colorectal Cancer Patients: A Review." *International Journal of Molecular Sciences* 18 (9). <https://doi.org/10.3390/ijms18091926>.

Nies, Anne T., Tarek Magdy, Matthias Schwab, and Ulrich M. Zanger. 2015. "Role of ABC Transporters in Fluoropyrimidine-Based Chemotherapy Response." *Advances in Cancer Research* 125: 217–43.

<https://doi.org/10.1016/bs.acr.2014.10.007>.

Nonaka, D., S. Kusamura, D. Baratti, P. Casali, R. Younan, and M. Deraco. 2006. "CDX-2 Expression in Pseudomyxoma Peritonei: A Clinicopathological Study of 42 Cases." *Histopathology* 49 (4): 381–87. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2006.02512.x>.

Oba, Takaaki, Hiroto Izumi, and Ken-Ichi Ito. 2016. "ABCB1 and ABCC11 Confer Resistance to Eribulin in Breast Cancer Cell Lines." *Oncotarget* 7 (43): 70011–27. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11727>.

Oguri, Tetsuya, Yuji Bessho, Hiroyuki Achiwa, Hiroaki Ozasa, Ken Maeno, Hiroyoshi Maeda, Shigeki Sato, and Ryuzo Ueda. 2007. "MRP8/ABCC11 Directly Confers Resistance to 5-Fluorouracil." *Molecular Cancer Therapeutics* 6 (1): 122–27. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0529>.

Olsen, J., S. Eiholm, L. T. Kirkeby, M. L. M. Espersen, P. Jess, I. Gögenür, J. Olsen, and J. T. Troelsen. 2016. "CDX2 Downregulation Is Associated with Poor Differentiation and MMR Deficiency in Colon Cancer." *Experimental and Molecular Pathology* 100 (1): 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2015.11.009>.

Olsen, J., M. L. M. Espersen, P. Jess, L. T. Kirkeby, and J. T. Troelsen. 2014. "The Clinical Perspectives of CDX2 Expression in Colorectal Cancer: A Qualitative Systematic Review." *Surgical Oncology* 23 (3): 167–76. <https://doi.org/10.1016/j.suronc.2014.07.003>.

Panczyk, Mariusz. 2014. "Pharmacogenetics Research on Chemotherapy Resistance in Colorectal Cancer over the Last 20 Years." *World Journal of Gastroenterology* 20 (29): 9775–9827. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i29.9775>.

Pereira, Bruno, Sofia Sousa, Rita Barros, Laura Carreto, Patrícia Oliveira, Carla Oliveira, Nicolas T. Chartier, et al. 2013. "CDX2 Regulation by the RNA-Binding Protein MEX3A: Impact on Intestinal Differentiation and Stemness." *Nucleic Acids Research* 41 (7): 3986–99. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt087>.

Phelip, JM, L Benhaim, O Bouché, N Christou, G Desolneux, A Dupré, D Léonard, et al. 2018. "Cancer Colorectal

Métastatique.” *Thésaurus National de Cancérologie Digestive*, February 2018. [<http://www.snfge.org/tncd>].

Pilati, C., J. Taieb, R. Balogoun, L. Marisa, A. de Reyniès, and P. Laurent-Puig. 2017. “CDX2 Prognostic Value in Stage II/III Resected Colon Cancer Is Related to CMS Classification.” *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 28 (5): 1032–35. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx066>.

Platet, Nadine, Isabelle Hinkel, Ludovic Richert, Devadarssen Murdamoothoo, Ahlam Moufok-Sadoun, Marie Vanier, Philippe Laval, et al. 2017. “The Tumor Suppressor CDX2 Opposes Pro-Metastatic Biomechanical Modifications of Colon Cancer Cells through Organization of the Actin Cytoskeleton.” *Cancer Letters* 386: 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.10.040>.

Qiu, Li-Xin, Qi-Yun Tang, Jian-Ling Bai, Xiao-Ping Qian, Ru-Tian Li, Bao-Rui Liu, and Ming-Hua Zheng. 2008. “Predictive Value of Thymidylate Synthase Expression in Advanced Colorectal Cancer Patients Receiving Fluoropyrimidine-Based Chemotherapy: Evidence from 24 Studies.” *International Journal of Cancer* 123 (10): 2384–89. <https://doi.org/10.1002/ijc.23822>.

Rawat, Vijay P. S., Monica Cusan, Aniruddha Deshpande, Wolfgang Hiddemann, Leticia Quintanilla-Martinez, R. Keith Humphries, Stefan K. Bohlander, Michaela Feuring-Buske, and Christian Buske. 2004. “Ectopic Expression of the Homeobox Gene Cdx2 Is the Transforming Event in a Mouse Model of t(12;13)(P13;Q12) Acute Myeloid Leukemia.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (3): 817–22. <https://doi.org/10.1073/pnas.0305555101>.

Renouf, Benjamin, Christine Soret, Thoueiba Saandi, François Delalande, Elisabeth Martin, Marie Vanier, Isabelle Duluc, Isabelle Gross, Jean-Noël Freund, and Claire Domon-Dell. 2012. “Cdx2 Homeoprotein Inhibits Non-Homologous End Joining in Colon Cancer but Not in Leukemia Cells.” *Nucleic Acids Research* 40 (8): 3456–69. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1242>.

Reya, T., S. J. Morrison, M. F. Clarke, and I. L. Weissman. 2001. “Stem Cells, Cancer, and Cancer Stem Cells.” *Nature* 414 (6859): 105–11. <https://doi.org/10.1038/35102167>.

Ribic, Christine M., Daniel J. Sargent, Malcolm J. Moore, Stephen N. Thibodeau, Amy J. French, Richard M.

Goldberg, Stanley R. Hamilton, et al. 2003. "Tumor Microsatellite-Instability Status as a Predictor of Benefit from Fluorouracil-Based Adjuvant Chemotherapy for Colon Cancer." *The New England Journal of Medicine* 349 (3): 247–57. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa022289>.

Rings, E. H., F. Boudreau, J. K. Taylor, J. Moffett, E. R. Suh, and P. G. Traber. 2001. "Phosphorylation of the Serine 60 Residue within the Cdx2 Activation Domain Mediates Its Transactivation Capacity." *Gastroenterology* 121 (6): 1437–50.

Robey, Robert W., Kenneth K. K. To, Orsolya Polgar, Marius Dohse, Patricia Fetsch, Michael Dean, and Susan E. Bates. 2009. "ABCG2: A Perspective." *Advanced Drug Delivery Reviews* 61 (1): 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.11.003>.

Ruzzo, A., F. Graziano, Fabio Galli, Francesca Galli, E. Rulli, S. Lonardi, M. Ronzoni, et al. 2017. "Dihydropyrimidine Dehydrogenase Pharmacogenetics for Predicting Fluoropyrimidine-Related Toxicity in the Randomised, Phase III Adjuvant TOSCA Trial in High-Risk Colon Cancer Patients." *British Journal of Cancer* 117 (9): 1269–77. <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.289>.

Saandi, T., F. Baraille, L. Derbal-Wolfrom, A.-L. Cattin, F. Benahmed, E. Martin, P. Cardot, et al. 2013. "Regulation of the Tumor Suppressor Homeogene Cdx2 by HNF4 α in Intestinal Cancer." *Oncogene* 32 (32): 3782–88. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.401>.

Sadeghi, B., C. Arvieux, O. Glehen, A. C. Beaujard, M. Rivoire, J. Baulieux, E. Fontaumard, et al. 2000. "Peritoneal Carcinomatosis from Non-Gynecologic Malignancies: Results of the EVOCAPE 1 Multicentric Prospective Study." *Cancer* 88 (2): 358–63.

Safaei, Roohangiz. 2006. "Role of Copper Transporters in the Uptake and Efflux of Platinum Containing Drugs." *Cancer Letters* 234 (1): 34–39. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.07.046>.

Saif, M. W., L. S. Rosen, K. Saito, C. Zergebel, L. Ravage-Mass, and D. S. Mendelson. 2011. "A Phase I Study Evaluating the Effect of CDHP as a Component of S-1 on the Pharmacokinetics of 5-Fluorouracil." *Anticancer*

Research 31 (2): 625–32.

Sakaguchi, Takanori, Xiubin Gu, Heidi M. Golden, EunRan Suh, David B. Rhoads, and Hans-Christian Reinecker. 2002. “Cloning of the Human Claudin-2 5’-Flanking Region Revealed a TATA-Less Promoter with Conserved Binding Sites in Mouse and Human for Caudal-Related Homeodomain Proteins and Hepatocyte Nuclear Factor-1alpha.” *The Journal of Biological Chemistry* 277 (24): 21361–70. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110261200>.

Salonga, D., K. D. Danenberg, M. Johnson, R. Metzger, S. Groshen, D. D. Tsao-Wei, H. J. Lenz, et al. 2000. “Colorectal Tumors Responding to 5-Fluorouracil Have Low Gene Expression Levels of Dihydropyrimidine Dehydrogenase, Thymidylate Synthase, and Thymidine Phosphorylase.” *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 6 (4): 1322–27.

San Roman, Adrianna K., Alessio Tovaglieri, David T. Breault, and Ramesh A. Shivdasani. 2015. “Distinct Processes and Transcriptional Targets Underlie CDX2 Requirements in Intestinal Stem Cells and Differentiated Villus Cells.” *Stem Cell Reports* 5 (5): 673–81. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.09.006>.

Schirripa, Marta, Letizia Procaccio, Sara Lonardi, and Fotios Loupakis. 2017. “The Role of Pharmacogenetics in the New ESMO Colorectal Cancer Guidelines.” *Pharmacogenomics* 18 (3): 197–200. <https://doi.org/10.2217/pgs-2016-0191>.

Scholl, Claudia, Dimple Bansal, Konstanze Döhner, Karina Eiwien, Brian J. P. Huntly, Benjamin H. Lee, Frank G. Rücker, et al. 2007. “The Homeobox Gene CDX2 Is Aberrantly Expressed in Most Cases of Acute Myeloid Leukemia and Promotes Leukemogenesis.” *The Journal of Clinical Investigation* 117 (4): 1037–48. <https://doi.org/10.1172/JCI30182>.

Shi, Hongcan, Dan Lu, Yusheng Shu, Weiping Shi, Shichun Lu, and Kang Wang. 2008. “Expression of Multidrug Resistance-Related Proteins p-Glycoprotein, Glutathione-s-Transferases, Topoisomerase-II and Lung Resistance Protein in Primary Gastric Cardiac Adenocarcinoma.” *Hepato-Gastroenterology* 55 (86–87): 1530–36.

Shirota, Y., J. Stoehlmacher, J. Brabender, Y. P. Xiong, H. Uetake, K. D. Danenberg, S. Groshen, D. D. Tsao-

Wei, P. V. Danenberg, and H. J. Lenz. 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. <https://doi.org/10.1200/JCO.2001.19.23.4298>.

Simabuco, Fernando M., Mirian G. Morale, Isadora C.B. Pavan, Ana P. Morelli, Fernando R. Silva, and Rodrigo E. Tamura. 2018. "P53 and Metabolism: From Mechanism to Therapeutics." *Oncotarget*, May. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25267>.

Sivagnanasundaram, S., I. Islam, I. Talbot, F. Drummond, J. R. Walters, and Y. H. Edwards. 2001. "The Homeobox Gene CDX2 in Colorectal Carcinoma: A Genetic Analysis." *British Journal of Cancer* 84 (2): 218–25. <https://doi.org/10.1054/bjoc.2000.1544>.

Smith, David Hersi, Ib Jarle Christensen, Niels Frank Jensen, Bo Markussen, Maria Unni Rømer, Sune Boris Nygård, Sven Müller, Hans Jørgen Nielsen, Nils Brünner, and Kirsten Vang Nielsen. 2013. "Mechanisms of Topoisomerase I (TOP1) Gene Copy Number Increase in a Stage III Colorectal Cancer Patient Cohort." *PloS One* 8 (4): e60613. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060613>.

Sodani, Kamlesh, Atish Patel, Rishil J. Kathawala, and Zhe-Sheng Chen. 2012. "Multidrug Resistance Associated Proteins in Multidrug Resistance." *Chinese Journal of Cancer* 31 (2): 58–72. <https://doi.org/10.5732/cjc.011.10329>.

Soret, Christine, Elisabeth Martin, Isabelle Duluc, Françoise Dantzer, Marie Vanier, Isabelle Gross, Jean-Noël Freund, and Claire Domon-Dell. 2016. "Distinct Mechanisms for Opposite Functions of Homeoproteins Cdx2 and HoxB7 in Double-Strand Break DNA Repair in Colon Cancer Cells." *Cancer Letters* 374 (2): 208–15. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.02.026>.

Stein, U., C. Fleuter, F. Siegel, J. Smith, A. Kopacek, D. A. Scudiero, K. M. Hite, P. M. Schlag, R. H. Shoemaker, and W. Walther. 2012. "Impact of Mutant β -Catenin on ABCB1 Expression and Therapy Response in Colon Cancer Cells." *British Journal of Cancer* 106 (8): 1395–1405. <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.81>.

Stringer, Emma J., Isabelle Duluc, Thoueiba Saandi, Irwin Davidson, Monika Bialecka, Toshiro Sato, Nick Barker, et al. 2012. "Cdx2 Determines the Fate of Postnatal Intestinal Endoderm." *Development (Cambridge, England)* 139 (3): 465–74. <https://doi.org/10.1242/dev.070722>.

Subtil, Clément, Eric Guérin, Anne Schneider, Marie-Pierre Chenard, Elisabeth Martin, Claire Domon-Dell, Isabelle Duluc, et al. 2007. "Frequent Rearrangements and Amplification of the CDX2 Homeobox Gene in Human Sporadic Colorectal Cancers with Chromosomal Instability." *Cancer Letters* 247 (2): 197–203. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2006.04.004>.

Szöllösi, Dániel, Dania Rose-Sperling, Ute A. Hellmich, and Thomas Stockner. 2018. "Comparison of Mechanistic Transport Cycle Models of ABC Exporters." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1860 (4): 818–32. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.10.028>.

Tagawa, Takanobu, Takeshi Haraguchi, Hiroaki Hiramatsu, Kazuyoshi Kobayashi, Kouhei Sakurai, Ken-Ichi Inada, and Hideo Iba. 2012. "Multiple MicroRNAs Induced by Cdx1 Suppress Cdx2 in Human Colorectal Tumour Cells." *The Biochemical Journal* 447 (3): 449–55. <https://doi.org/10.1042/BJ20120434>.

Takakura, Yuji, Takao Hinoi, Naohide Oue, Tatsunari Sasada, Yasuo Kawaguchi, Masazumi Okajima, Aytekin Akyol, Eric R. Fearon, Wataru Yasui, and Hideki Ohdan. 2010. "CDX2 Regulates Multidrug Resistance 1 Gene Expression in Malignant Intestinal Epithelium." *Cancer Research* 70 (17): 6767–78. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4701>.

Thiery, Jean Paul. 2002. "Epithelial-Mesenchymal Transitions in Tumour Progression." *Nature Reviews. Cancer* 2 (6): 442–54. <https://doi.org/10.1038/nrc822>.

Thoene, S., V. P. S. Rawat, B. Heilmeyer, E. Hoster, K. H. Metzeler, T. Herold, W. Hiddemann, et al. 2009. "The Homeobox Gene CDX2 Is Aberrantly Expressed and Associated with an Inferior Prognosis in Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia." *Leukemia* 23 (4): 649–55. <https://doi.org/10.1038/leu.2008.355>.

Tomonaga, M., M. Oka, F. Narasaki, M. Fukuda, R. Nakano, H. Takatani, K. Ikeda, et al. 1996. "The Multidrug

Resistance-Associated Protein Gene Confers Drug Resistance in Human Gastric and Colon Cancers.” *Japanese Journal of Cancer Research: Gann* 87 (12): 1263–70.

Toyota, Minoru, Hiromu Suzuki, Eiichiro Yamamoto, Hiroo Yamano, Kohzoh Imai, and Yasuhisa Shinomura. 2009. “Integrated Analysis of Genetic and Epigenetic Alterations in Cancer.” *Epigenomics* 1 (2): 291–99. <https://doi.org/10.2217/epi.09.20>.

Traber, P. G., G. D. Wu, and W. Wang. 1992. “Novel DNA-Binding Proteins Regulate Intestine-Specific Transcription of the Sucrase-Isomaltase Gene.” *Molecular and Cellular Biology* 12 (8): 3614–27.

Troelsen, J. T., C. Mitchelmore, N. Spodsberg, A. M. Jensen, O. Norén, and H. Sjöström. 1997. “Regulation of Lactase-Phlorizin Hydrolase Gene Expression by the Caudal-Related Homoeodomain Protein Cdx-2.” *The Biochemical Journal* 322 (Pt 3) (March): 833–38.

Tun-Yhong, Wisith, Chatchai Chinpaisal, Perayot Pamonsinlapatham, and Sindchai Kaewkitichai. 2017. “Tenofovir Disoproxil Fumarate Is a New Substrate of ATP-Binding Cassette Subfamily C Member 11.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 61 (4). <https://doi.org/10.1128/AAC.01725-16>.

Uesaka, Toshihiro, Noriko Kageyama, and Hiromitsu Watanabe. 2004. “Identifying Target Genes Regulated Downstream of Cdx2 by Microarray Analysis.” *Journal of Molecular Biology* 337 (3): 647–60. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.01.061>.

Vauthier, Virginie, Chantal Housset, and Thomas Falguières. 2017. “Targeted Pharmacotherapies for Defective ABC Transporters.” *Biochemical Pharmacology* 136: 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.02.020>.

Vermeulen, L., M. R. Sprick, K. Kemper, G. Stassi, and J. P. Medema. 2008. “Cancer Stem Cells—Old Concepts, New Insights.” *Cell Death and Differentiation* 15 (6): 947–58. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.20>.

Verwaal, Vic J., Serge van Ruth, Eecl de Bree, Gooike W. van Sloothen, Harm van Tinteren, Henk Boot, and Frans A. N. Zoetmulder. 2003. “Randomized Trial of Cytoreduction and Hyperthermic Intraperitoneal

Chemotherapy versus Systemic Chemotherapy and Palliative Surgery in Patients with Peritoneal Carcinomatosis of Colorectal Cancer.” *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 21 (20): 3737–43. <https://doi.org/10.1200/JCO.2003.04.187>.

Verzi, Michael P., Hyunjin Shin, Li-Lun Ho, X. Shirley Liu, and Ramesh A. Shivdasani. 2011. “Essential and Redundant Functions of Caudal Family Proteins in Activating Adult Intestinal Genes.” *Molecular and Cellular Biology* 31 (10): 2026–39. <https://doi.org/10.1128/MCB.01250-10>.

Vidimar, Vania, Xiangjun Meng, Marcelina Klajner, Cynthia Licon, Ludivine Fetzter, Sébastien Harlepp, Pascal Hébraud, et al. 2012. “Induction of Caspase 8 and Reactive Oxygen Species by Ruthenium-Derived Anticancer Compounds with Improved Water Solubility and Cytotoxicity.” *Biochemical Pharmacology* 84 (11): 1428–36. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.08.022>.

Wallner, J., D. Depisch, A. Gsur, M. Götzl, K. Haider, and R. Pirker. 1993. “MDR1 Gene Expression and Its Clinical Relevance in Primary Gastric Carcinomas.” *Cancer* 71 (3): 667–71.

Wang, Lei, Hui-Yi Yang, and Yong-Qing Zheng. 2012. “Personalized Medicine of Esophageal Cancer.” *Journal of Cancer Research and Therapeutics* 8 (3): 343–47. <https://doi.org/10.4103/0973-1482.103510>.

Wang, Yunshuai, Zhaohui Li, Wenxian Li, Shuaifeng Liu, and Baowei Han. 2018. “Methylation of CDX2 Gene Promoter in the Prediction of Treatment Efficacy in Colorectal Cancer.” *Oncology Letters* 16 (1): 195–98. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8670>.

Werling, Robert W., Hadi Yaziji, Carlos E. Bacchi, and Allen M. Gown. 2003. “CDX2, a Highly Sensitive and Specific Marker of Adenocarcinomas of Intestinal Origin: An Immunohistochemical Survey of 476 Primary and Metastatic Carcinomas.” *The American Journal of Surgical Pathology* 27 (3): 303–10.

Westover, David, and Fengzhi Li. 2015. “New Trends for Overcoming ABCG2/BCRP-Mediated Resistance to Cancer Therapies.” *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR* 34 (December): 159. <https://doi.org/10.1186/s13046-015-0275-x>.

Witek, Matthew E., Adam E. Snook, Jieru E. Lin, Erik S. Blomain, Bo Xiang, Michael S. Magee, Michael Magee, and Scott A. Waldman. 2014. "A Novel CDX2 Isoform Regulates Alternative Splicing." *PloS One* 9 (8): e104293. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104293>.

Wu, Xifeng, Jian Gu, Tsung-Teh Wu, Stephen G. Swisher, Zhongxin Liao, Arlene M. Correa, Jun Liu, et al. 2006. "Genetic Variations in Radiation and Chemotherapy Drug Action Pathways Predict Clinical Outcomes in Esophageal Cancer." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 24 (23): 3789–98. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.03.6640>.

Yabuuchi, H., H. Shimizu, S. Takayanagi, and T. Ishikawa. 2001. "Multiple Splicing Variants of Two New Human ATP-Binding Cassette Transporters, ABCC11 and ABCC12." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 288 (4): 933–39. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5865>.

Yamamoto, Hiroshi, Yun Qing Bai, and Yasuhito Yuasa. 2003. "Homeodomain Protein CDX2 Regulates Goblet-Specific MUC2 Gene Expression." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 300 (4): 813–18.

Yan, Kelley S., Luis A. Chia, Xingnan Li, Akifumi Ootani, James Su, Josephine Y. Lee, Nan Su, et al. 2012. "The Intestinal Stem Cell Markers Bmi1 and Lgr5 Identify Two Functionally Distinct Populations." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (2): 466–71. <https://doi.org/10.1073/pnas.1118857109>.

Yan, Lin-Hai, Wei-Yuan Wei, Wen-Long Cao, Xiao-Shi Zhang, Yu-Bo Xie, and Qiang Xiao. 2015. "Overexpression of CDX2 in Gastric Cancer Cells Promotes the Development of Multidrug Resistance." *American Journal of Cancer Research* 5 (1): 321–32.

Yuan, Jingsheng, Zhijie Yin, Kaixiong Tao, Guobing Wang, and Jinbo Gao. 2017. "Homeobox Protein CDX2 as a Prognostic Biomarker in Solid Malignancies: A Meta-Analysis." *Oncotarget* 8 (51): 89160–72. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20808>.

Zhang, Ben Y., Jeremy C. Jones, Andrew M. Briggler, Joleen M. Hubbard, Benjamin R. Kipp, Daniel J. Sargent, Jesse G. Dixon, and Axel Grothey. 2017. "Lack of Caudal-Type Homeobox Transcription Factor 2 Expression as a Prognostic Biomarker in Metastatic Colorectal Cancer." *Clinical Colorectal Cancer* 16 (2): 124–28. <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2016.09.003>.

Zhang, Dexin, and Daiming Fan. 2010. "New Insights into the Mechanisms of Gastric Cancer Multidrug Resistance and Future Perspectives." *Future Oncology (London, England)* 6 (4): 527–37. <https://doi.org/10.2217/fon.10.21>.

Zhang, Shuzhong, Katherine S. Lovejoy, James E. Shima, Leah L. Lagpacan, Yan Shu, Anna Lapuk, Ying Chen, et al. 2006. "Organic Cation Transporters Are Determinants of Oxaliplatin Cytotoxicity." *Cancer Research* 66 (17): 8847–57. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0769>.

Zhang, Ying, Hu Wang, Chao Bi, Yinping Xiao, and Zhaoyong Liu. 2016. "Expression of CDX2 in Gastric Cardia Adenocarcinoma and Its Correlation with H. Pylori and Cell Proliferation." *Oncotarget* 7 (34): 54973–82. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10362>.



COMMUNICATIONS

& AUTRES ARTICLES

6. COMMUNICATIONS ET AUTRES ARTICLES

6.1. Communications

Lors de cette période de thèse, j'ai été amené à présenter mes résultats de thèse dans différents congrès et réunions médicales et/ou scientifiques sous forme soit de présentation orale soit affichée dont le détail est développé ci-dessous :

- **Congrès du cancéropôle Grand-Est 2013, Novembre 2013, Strasbourg**

Communication orale : Le suppresseur de tumeur CDX2 augmente la chimiorésistance des cellules cancéreuses coliques au 5-Fluorouracile via le transporteur ABCC11

- **JFHOD 2014, 32^{ème} réunion du CECED, 20-21 mars 2014, Paris**

Communication orale : Le suppresseur de tumeur CDX2 augmente la chimiorésistance des cellules cancéreuses coliques au 5-Fluorouracile via le transporteur ABCC11

- **Congrès AFC 2014, 1-3 octobre 2014, Paris**

Communication orale : Le suppresseur de tumeur CDX2 augmente la chimiorésistance des cellules cancéreuses coliques au 5-Fluorouracile via le transporteur ABCC11

- **5^{èmes} Journées de la FMTS, 27-28 avril 2017, Strasbourg**

Communication orale : Le suppresseur de tumeur CDX2 augmente la chimiorésistance des cellules cancéreuses coliques au 5-fluorouracile via le transporteur ABCC11.

Prix de la meilleure communication orale

- **4th Workshop on Basic Science on Peritoneal Carcinomatosis, Paris, juin 2017**

Communication orale : The tumor suppressor gene CDX2 increases 5-Fluorouracile resistance

of colon cancer cells through the ABCC11 transporter

- **11th International Workshop on Peritoneal Surface Malignancy, Paris, 9-11 septembre 2018**

Communication affichée : The tumor suppressor gene CDX2 increases 5-Fluorouracile resistance of colon cancer cells through the ABCC11 transporter

6.2. Articles associés à la recherche clinique

Cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy for pseudomyxoma peritonei of appendicular and extra-appendicular origin. Delhorme JB, Severac F, Averous G, Glehen O, Passot G, Bakrin N, Marchal F, Pocard M, Lo Dico R, Eveno C, Carrere S, Sgarbura O, Quenet F, Ferron G, Goéré D, Brigand C; French National Network of Peritoneal Surface Malignancies (RENAPE). *Br J Surg* (2018).

Surgery is an efficient option after failure of chemoradiation in anal canal and anal margin cancers. JB. Delhorme, F. Severac, W. Waissi, D. Antoni, KC. Freel, C. Schumacher, S. Rohr, C. Brigand, G. Noel. *Oncology* (2017)

Management of rectal squamous cell carcinoma. Delhorme JB, Waissi W, Romain B, Schumacher C, Freel KC, Dufour P, Brigand C, Rohr S. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* (2017)

Prognostic factors of hemorrhagic complications after oxaliplatin-based HIPEC: toward routine preoperative dosage of Von Willebrand factor? JB. Delhorme, L. Sattler, E. Triki, F. Severac, B. Romain, S. Rohr, L. Grunebaum, C. Brigand. *Eur J Surg Oncol* (2017)

Renal Angiomyolipomas: at Least Two Diseases. A Series of Patients Treated at Two European Institutions. J.B Delhorme, A. Fontana, A. Levy, P. Terrier, M. Fiore, D.Tzanis, A. Gronchi, S. Bonvalot. *Eur J Surg Oncol* (2016)

Long-term survival after aggressive treatment of relapsed serosal or distant pseudomyxoma peritonei. Delhorme JB, Honoré C, Benhaim L, Dumont F, Dartigues P, Dromain C, Ducreux M, Elias D, Goéré. *Eur J Surg Oncol* (2017)

Treatment that follows guidelines closely dramatically improves overall survival of patients with anal canal and margin cancers. JB. Delhorme, D. Antoni, KS. Mak, F. Severac, KC. Freel, C. Schumacher, S. Rohr, C. Brigand, G. Noe. *Crit Rev Oncol Hematol* (2016)

Can a benefit be expected from surgical debulking of unresectable Pseudomyxoma Peritonei ? JB. Delhorme, D. Elias, S. Varatharajah, L. Benhaim, F. Dumont, C. Honoré, D. Goéré. *Ann Surg Oncol* (2015)

Peritoneal carcinomatosis with synchronous liver metastases from colorectal cancer: who will benefit from complete cytoreductive surgery? JB. Delhorme, L. Dupont-Kazma, P. Addeo, F. Lefebvre, E. Triki, B. Romain, N. Meyer, P. Bachellier, S. Rohr, C. Brigand. *Int J Surg.* (2015)

Preoperative detection of intrahepatic venovenous shunt treated by microwave precoagulation during right hepatectomy. JB. Delhorme, R. Méméo, J. Marescaux, P. Pessaux. *World J Gastrointest Pharmacol Ther* (2015)

Routine second-look after surgical treatment of colonic peritoneal carcinomatosis. JB. Delhorme, E. Triki, B. Romain, N. Meyer, S. Rohr, C. Brigand *Journal of visceral surgery* (2015)

Impact of Combination Chemotherapy in Peritoneal Mesothelioma Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy (HIPEC) : The RENAPE Study. Malgras B, Gayat E, Aoun O, Lo Dico R, Eveno C, Pautrat K, Delhorme JB, Passot G, Marchal F, Sgarbura O, Ferron G, Andre T, Pocard M ; RENAPE Network. *Ann Surg Oncol.* (2018)

Influence of preoperative life satisfaction on recovery and outcomes after colorectal cancer surgery - a prospective pilot study. Romain B, Rohmer O, Schimchowitsch S, Hübner M, Delhorme JB, Brigand C, Rohr S, Guenot D. *Health Qual Life Outcomes.* (2018)

Proposal of a new preliminary scoring tool for early identification of significant blunt bowel and mesenteric injuries in patients at risk after road traffic crashes. Raharimanantsoa M, Zingg T, Thiery A, Brigand C, Delhorme JB, Romain B. *Eur J Trauma Emerg Surg.* (2017)

Could a Feeding Jejunostomy be Integrated into a Standardized Preoperative Management of Oeso-gastric Junction Adenocarcinoma? Manfredelli S, Delhorme JB, Venkatasamy A, Gaidon C, Brigand C, Rohr S, Romain B. *Ann Surg Oncol.* (2017)

Patterns of care and clinical outcomes in primary oesophageal gastrointestinal stromal tumours (GIST): A retrospective study of the French Sarcoma Group (FSG). Duffaud F,

Meeus P, Bertucci F, Delhorme JB, Stoeckle E, Isambert N, Bompas E, Gagniere J, Bouché O, Toulmonde M, Salas S, Blay JY, Bonvalot S; French Sarcoma Group. *Eur J Surg Oncol.* (2017)

Abdominal desmoplastic small round cell tumor without extraperitoneal metastases: Is there a benefit for HIPEC after macroscopically complete cytoreductive surgery? Honoré C, Atallah V, Mir O, Orbach D, Ferron G, LePéchoux C, Delhorme JB, Philippe-Chomette P, Sarnacki S, Msika S, Terrier P, Glehen O, Martelli H, Minard-Colin V, Bertucci F, Blay JY, Bonvalot S, Elias D, LeCesne A, Sargos P; French Network for Rare Peritoneal Malignancies (RENAPE), French Pediatric Cancer Society (SFCE), French Reference Network in Sarcoma Pathology (RRePS) French Sarcoma Clinical Network (NETSARC). *PlosOne* (2017)

Outcomes of hypnosis combined with local anesthesia during inguinal repair: a pilot study. Romain B, Rodriguez M, Story F, Delhorme JB, Brigand C, Rohr S. *Hernia* (2016)

Comparative study between biologic porcine dermal meshes: risk factors of postoperative morbidity and recurrence. Romain B, Story F, Meyer N, Delhorme JB, Brigand C, Rohr S. *J Wound Care* (2016)

Prise en charge des fistules périanales dans la maladie de Crohn. Berdugo Y, Ngimpi-Tambou M, Delhorme JB, Besch C, Brigand C, Rohr S, Duclos B, Reimund. *JM Hepato Gastro* (2016)

Huge pseudomyxoma peritonei: Surgical strategies and procedures to employ to optimize the rate of complete cytoreductive surgery. Benhaim L, Honoré C, Goéré D, Delhorme JB, Elias D. *Eur J Surg Oncol.* (2016)

Pseudozyma aphidis fungemia after abdominal surgery: First adult case. Herb A, Sabou M, Delhorme JB, Pessaux P, Mutter D, Candolfi E, Letscher-Bru V. *Med Mycol Case Rep.* (2015)

A case-control study of pre-operative levels of serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin and other potential inflammatory markers in colorectal cancer. Duvillard L, Ortega-Deballon P, Bourredjem A, Scherrer ML, Manton G, Delhorme JB, Deguelte-Lardiére S, Petit JM, Bonithon-Kopp C; AGARIC study group. *BMC Cancer* (2014)

Fatty acid composition of adipose tissue and colorectal cancer: a case-control study. Cottet V, Vaysse C, Scherrer ML, Ortega-Deballon P, Lakkis Z, Delhorme JB, Deguelte-Lardière S, Combe N, Bonithon-Kopp C. *Am J Clin Nutr.* (2015)



Jean-Baptiste DELHORME

**Étude des mécanismes de chimiorésistance dans les cancers digestifs : impact de CDX2
et des transporteurs ABC**

Résumé

La chimiorésistance est un enjeu majeur dans la prise en charge des patients atteints de cancers digestifs et peut se manifester par l'efflux de molécules cytotoxiques via la surexpression des transporteurs ABC. Le facteur de transcription CDX2 est un régulateur important de l'identité intestinale et agit comme gène suppresseur de tumeur dans le côlon. Il pourrait être impliqué dans des phénomènes de chimiorésistance des cancers colorectaux (CCR) car le transporteur MDR1/ABCB1 correspond à un de ses gènes cibles. Nous avons confirmé le rôle de CDX2 dans la chimiorésistance des CCR. Nous avons montré par une approche translationnelle, que la surexpression de CDX2 était impliquée dans la résistance au 5-fluorouracile (5-FU) dans les CCR. Le transporteur du 5-FU ABCC11 a été identifié comme gène cible de CDX2 dont l'activité contribue à la résistance au 5-FU des cellules cancéreuses coliques. L'expression d'ABCC11 corrèle avec celle de CDX2 dans les CCR humains mais également avec celle de la DPYD, enzyme impliquée dans le catabolisme du 5-FU. Cette étude montre pour la première fois que CDX2 contribue à la chimiorésistance au 5-FU en impliquant des mécanismes régulant son métabolisme.

Mots Clés : CDX2; cancer colorectal; chimiorésistance; ABCC11; DPYD

Abstract

Chemoresistance represents a major drawback in digestive cancers' management and may be achieved particularly through active efflux of the drug through overexpression of ABC transporters. The transcription factor CDX2 is a master regulator of intestinal identity that acts as a tumor suppressor in the colon and may be important for drug resistance in colorectal cancer (CRC) as MDR1/ABCB1 was recently identified as one of its target genes. Here, we confirmed the role of CDX2 in the chemoresistance of CRC. We showed through a translational approach that CDX2 overexpression is implicated in 5-fluorouracil (5-FU) chemoresistance in CRC and described the molecular mechanisms implicated in this finding. We identified the 5-FU transporter ABCC11 as a new transcriptional target of CDX2 whose activity contributes to the 5-FU-chemoresistance of colon cancer cells. Remarkably, CDX2 expression correlates with the expression of ABCC11 in human colon tumors, but also with the one of the DPYD, enzyme involved in the 5-FU break down. Thus, our study links for the first time CDX2 to the 5-FU metabolism and provides a molecular mechanism for its impact on 5-FU-based chemotherapy.

Keywords : CDX2; colorectal cancer; chemoresistance; ABCC11; DPYD