



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



**Ecole Doctorale BioSE (Biologie, Environnement et Santé)**

**Thèse**

**Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de**

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE**

par **Esma YAGDI EFE**

**Analyse du rôle des dérivés de polysulfanes de l'ail dans le réseau microtubulaire et l'autophagie : l'effet anticancéreux dans le cancer colorectal**

**Le 18 décembre 2017**

**Membres du jury :**

**Rapporteurs :**

**Madame Carine Michiels  
Madame Lina Ghibelli**

**Professeur, Université de Namur, Belgique, France  
Professeur Associé, Université de Rome Tor Vergata, Italie**

**Examineurs :**

**Monsieur Mario Dicato  
Monsieur Norbert Latruffe  
Monsieur Stéphane Flament**

**Professeur, Centre Hospitalier de Luxembourg, Luxembourg  
Professeur, Université de Bourgogne, France  
Professeur, Université de Lorraine, France**

**Invitée :**

**Madame Anna Ivana Scovassi**

**Professeur, IGM-CNR de Pavia, Italie**

**Encadrants :**

**Madame Claudia Cerella  
Monsieur Marc Diederich**

**Docteur, LBMCC, Luxembourg  
Professeur, Université Nationale de Séoul, Corée du Sud**

**Laboratoire de biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer (LBMCC)  
9, rue Edward Steichen, L2540 Luxembourg**



## REMERCIEMENTS

**Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés**

*au « Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer »  
à l'Hôpital Kirchberg, Luxembourg*

**Ce travail n'aurait pu aboutir sans le soutien financier de:**

*« Télévie Luxembourg » (bourse de formation-recherche Télévie)*

*la Fondation « Recherche Cancer et Sang (FRCS) »*

*l'association « Recherches Scientifiques Luxembourg (RSL) »*

*l'association Action Lions « Vaincre le Cancer »*

*et l'association « Een Häerz fir Kriibskrank Kanner »  
(Un cœur pour les enfants atteints d'un cancer)*



## REMERCIEMENTS

*La valeur d'un homme tient dans sa capacité à donner et non dans sa capacité à recevoir.*

*Albert Einstein*

Au terme de ce projet de grande haleine, c'est avec enthousiasme que je tiens à remercier vivement et sincèrement tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements à **mon Directeur de thèse, Professeur Marc Diederich** pour avoir cru en moi et m'avoir accueilli au sein de son équipe au Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer. Merci Marc de m'avoir donné une structure idéale pour la réalisation de ce projet de thèse et pour tous les moyens que vous avez mis à ma disposition. Je vous remercie également pour l'opportunité que vous m'avez accordée pour la réalisation de mon stage à l'Université Nationale de Séoul en Corée du Sud.

J'adresse notamment toute ma gratitude à ma co-directrice de thèse, **Docteur Claudia Cerella** qui m'a aidé à mener à bien ce projet. Merci d'avoir partagé ta passion pour la recherche. Je te remercie sincèrement pour tous les conseils que tu m'as donnés.

Je remercie les membres de mon comité de suivi de thèse, **Professeur Stéphane Flament** et **Professeur Norbert Latruffe**. Toute ma reconnaissance pour vos remarques et vos suggestions qui nous ont permis d'améliorer la qualité de ce travail.

Je remercie aussi **Professeur Carine Michiels** et **Professeur Lina Ghibelli** pour l'honneur d'avoir accepté d'examiner et de juger ce travail en tant que rapporteurs. Veuillez recevoir ici ma sincère reconnaissance pour votre participation à mon jury de thèse.

Je remercie notamment **Professeur Anna Ivana Scovassi** d'avoir accepté d'être membre invité de mon jury de thèse.

Je remercie notamment les personnes avec lesquelles j'ai collaboré tout au long de ma thèse :

**Docteur Flavia Radogna**, je te remercie pour nos discussions enrichissantes sur l'autophagie.

**Docteur Sébastien Chateauvieux**, je te remercie de m'avoir transmis ton savoir-faire sur la réalisation de PCR.

**Docteur Anthoula Gaigneaux**, je te remercie pour toutes les analyses bioinformatiques que tu as mené. Merci également pour nos discussions enrichissantes sur les statistiques.

**Professeur Christo Christov**, je vous remercie de nous avoir fait part de votre savoir-faire sur la réalisation et l'analyse des images de microscopie électronique à transmission.

**Professeur Patrick Chaimbault**, je vous remercie pour l'analyse de spectrométrie en masse que vous avez réalisé.

Ces remerciements seraient incomplets si je n'en adressais pas **à l'ensemble des membres du LBMCC** pour le climat sympathique qu'ils ont apporté au sein du laboratoire et pour ces nombreuses discussions intéressantes. Un grand merci donc à **Flavia, Cristina, Franck, Cindy, Sébastien, Barbora, Anthoula, Marie Hélène, Michael et Laurent**. Je voudrais exprimer particulièrement toute mon amitié aux jeunes doctorantes **Marion, Manon, Hélène** et **Naira** pour leurs gentillesse et leurs bonnes humeurs.

Je profite de cette occasion pour remercier également toute **ma famille** et **mes amis**. Un merci affectueux à **mes parents** pour avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Leur confiance, leur soutien et leur amour sans faille m'ont toujours guidé.

Un dernier merci, et non pas des moindres **à mon mari Arif** de m'avoir épaulé tout au long de ma thèse. Merci Arifim pour toute ta patience, ton soutien affectif et ton fervent encouragement même lorsque mon travail affectait mon humeur. Merci infiniment pour cet amour sans conditions. Sans toi je n'en serai pas arrivée au bout.

# Table des matières

|   |           |
|---|-----------|
| <b>INTRODUCTION.....</b>  | <b>21</b> |
| <b>1.1. Les caractéristiques du cancer .....</b>                          | <b>21</b> |
| <b>1.2. Le cancer colorectal.....</b>                                     | <b>24</b> |
| 1.2.1. Les différents stades du cancer colorectal .....                   | 26        |
| 1.2.2. Les différents sous-groupes moléculaires du cancer colorectal..... | 27        |
| 1.2.2.1 La voie de l'instabilité chromosomique .....                      | 27        |
| 1.2.2.2 La voie de l'instabilité des microsatellites .....                | 30        |
| 1.2.2.3 La voie de la méthylation des îlots CpG .....                     | 31        |
| 1.2.3. Thérapie du cancer du côlon.....                                   | 33        |
| 1.2.3.1 Chimiothérapie classique .....                                    | 33        |
| 1.2.3.2 Thérapies ciblées .....   | 35        |
| 1.2.3.2.1 Les inhibiteurs angiogéniques .....                             | 35        |
| 1.2.3.2.2 Les anticorps anti-EGFR .....                                   | 35        |
| 1.2.3.2.3 Les inhibiteurs multikinase.....                                | 36        |
| <b>1.3. Le cycle cellulaire.....</b>                                      | <b>37</b> |
| 1.3.1. Les kinases cyclines-dépendantes régulent le cycle cellulaire..... | 37        |
| 1.3.2. L'expression des cyclines au cours du cycle cellulaire .....       | 38        |
| 1.3.3. Les inhibiteurs des kinases cyclines-dépendantes .....             | 40        |
| 1.3.4. La dérégulation du cycle cellulaire dans le cancer .....           | 40        |
| <b>1.4. Les microtubules.....</b>   | <b>41</b> |
| 1.4.1. Formation des microtubules.....                                    | 41        |
| 1.4.2. La tubuline .....  | 42        |
| 1.4.3. Rôle des microtubules pendant la mitose.....                       | 47        |
| 1.4.4. Les poisons du fuseau .....  | 48        |
| 1.4.4.1 Les agents déstabilisants les microtubules .....                  | 50        |
| 1.4.4.2 Les agents stabilisants les microtubules .....                    | 50        |
| 1.4.4.3 Mécanismes de résistance liés aux poisons du fuseau .....         | 51        |
| 1.4.4.3.1 Les isotypes tubuline $\beta$ .....                             | 51        |
| 1.4.4.3.2 Les protéines associées aux microtubules .....                  | 53        |
| 1.4.4.3.3 Les glycoprotéines P.....                                       | 53        |
| 1.4.4.3.4 Les poisons du fuseau et le cancer du côlon.....                | 54        |
| <b>1.5. L'apoptose .....</b>  | <b>54</b> |
| <b>1.6. L'autophagie .....</b>  | <b>59</b> |
| 1.6.1. Les étapes de l'autophagie.....                                    | 59        |

|  |  |           |
|--|--|-----------|
| 1.6.2.   | Le flux autophagique .....   | 60        |
| 1.6.3.   | L'activité anti-tumorale de l'autophagie.....                                | 63        |
| 1.6.4.   | L'activité pro-tumorale de l'autophagie.....                                 | 65        |
| 1.6.5.   | L'autophagie et le cancer du côlon.....                                      | 66        |
| 1.6.6.   | La protéine p62/séquestosome 1 .....   | 67        |
| 1.6.6.1  | La protéine p62 : marqueur de l'autophagie .....                             | 67        |
| 1.6.6.2  | Régulation intracellulaire de p62.....                                       | 70        |
| 1.6.6.3  | La protéine p62 et le cancer .....   | 71        |
| <b>1.7.</b>  | <b>Le système ubiquitine protéasome .....</b>                                | <b>74</b> |
| 1.7.1.   | Généralités .....  | 74        |
| 1.7.2.   | Le système ubiquitine protéasome dans le cancer du côlon .....               | 78        |
| <b>1.8.</b>  | <b>Les composés naturels : une source de molécules anticancéreuses .....</b> | <b>80</b> |
| 1.8.1.   | Les composés naturels dans le cancer du côlon.....                           | 80        |
| 1.8.2.   | L'ail et les composés de la famille des organosulfurés .....                 | 82        |
| 1.8.3.   | Etudes épidémiologiques .....  | 83        |
| 1.8.4.   | Propriétés chimiques des composés organosulfurés .....                       | 84        |
| 1.8.5.   | Mécanisme d'action anticancéreux des dérivés organosulfurés .....            | 85        |
| 1.8.5.1  | Inhibition de la prolifération.....  | 86        |
| 1.8.5.2  | L'organisation des microtubules .....  | 87        |
| 1.8.5.3  | Les protéines de la famille Bcl-2.....                                       | 87        |
| 1.8.5.4  | Les voies de signalisation kinase.....                                       | 88        |
| 1.8.5.5  | L'équilibre rédox .....  | 89        |
| 1.8.6.   | Le TTSDDB, dérivé synthétique du TTSDA .....                                 | 90        |
| <b>OBJECTIFS .....</b>   | <b>93</b>  |           |
| <b>MATÉRIELS ET MÉTHODES .....</b>                                   | <b>96</b>  |           |
| <b>1.1. Culture cellulaire .....</b>                                 | <b>96</b>  |           |
| <b>1.2. Traitements .....</b>  | <b>97</b>  |           |
| 1.2.1.   | Traitements avec les composés organosulfurés .....                           | 97        |
| 1.2.2.   | Autres traitements .....   | 97        |
| 1.2.2.1  | Agents altérant les microtubules .....                                       | 97        |
| <b>1.3. Inhibition de l'autophagie .....</b>                         | <b>97</b>  |           |
| 1.3.1.1  | Inhibition de la synthèse des protéines .....                                | 98        |
| 1.3.1.2  | Inhibition du protéasome.....  | 98        |
| <b>1.4. Evaluation de la viabilité cellulaire.....</b>               | <b>98</b>  |           |
| 1.4.1.   | Coloration d'exclusion au bleu de Trypan.....                                | 98        |
| 1.4.2.   | Test de viabilité MTT .....  | 98        |
| <b>1.5. Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux .....</b> | <b>99</b>  |           |

|              |  |            |
|--------------|--|------------|
| 1.5.1.       | Principe .....   | 99         |
| 1.5.2.       | Analyse du cycle cellulaire par marquage à l'iodure de propidium .....                 | 100        |
| <b>1.6.</b>  | <b>Evaluation de l'apoptose .....</b>  | <b>101</b> |
| 1.6.1.       | Quantification de l'apoptose par microscopie .....                                     | 101        |
| 1.6.2.       | Mesure de l'activité enzymatique des caspases .....                                    | 101        |
| 1.6.3.       | Mesure de l'activité protéolytique du protéasome .....                                 | 101        |
| <b>1.7.</b>  | <b>Etude de l'autophagie.....</b>  | <b>102</b> |
| <b>1.8.</b>  | <b>Etude des altérations morphologiques liées à l'autophagie .....</b>                 | <b>102</b> |
| 1.8.1.       | Evaluation du flux autophagique par microscopie à fluorescence.....                    | 103        |
| 1.8.2.       | Analyse de l'expression des protéines par western blot .....                           | 103        |
| 1.8.2.1      | Principe .....   | 103        |
| 1.8.2.2      | Extraction des protéines .....   | 103        |
| 1.8.2.3      | Dosage des protéines par la méthode de Bradford .....                                  | 104        |
| 1.8.2.4      | Transfert et hybridation.....  | 104        |
| <b>1.9.</b>  | <b>Evaluation de l'expression des ARNm par RT-PCR en temps réel .....</b>              | <b>106</b> |
| 1.9.1.       | Extraction de l'ARNm.....  | 106        |
| 1.9.2.       | PCR en temps réel.....   | 106        |
| 1.9.2.1      | Transcription inverse .....  | 106        |
| 1.9.2.2      | Amplification par PCR en temps réel.....   | 107        |
| <b>1.10.</b> | <b>Evaluation de l'extinction de gène par le mécanisme de l'ARN interférence .....</b> | <b>107</b> |
| <b>1.11.</b> | <b>Evaluation de l'équilibre rédox .....</b>   | <b>108</b> |
| 1.11.1.      | Mesure de la production d'espèces réactives de l'oxygène .....                         | 108        |
| <b>1.12.</b> | <b>Evaluation de l'effet du TTSDB dans un modèle 3D.....</b>                           | <b>108</b> |
| 1.12.1.      | Test de viabilité d'un sphéroïde .....   | 108        |
| 1.12.1.1     | Formation d'un sphéroïde selon la technique «goutte suspendue».....                    | 108        |
| 1.12.1.2     | Mesure de la viabilité.....  | 109        |
| 1.12.2.      | Test clonogénique.....   | 109        |
| <b>1.13.</b> | <b>Analyse Bioinformatique .....</b>   | <b>110</b> |
| 1.13.1.      | Analyse transcriptomique différentielle des lignées cellulaires choisies.....          | 110        |
| 1.13.2.      | Analyse de l'association entre l'autophagie et la survie du patient .....              | 110        |
| <b>1.14.</b> | <b>Analyse de spectrométrie de masse : MALDI-TOF .....</b>                             | <b>111</b> |
| 1.14.1.      | Principe.....  | 111        |
| 1.14.2.      | Produits chimiques et réactifs.....  | 111        |
| 1.14.3.      | Analytes.....  | 112        |
| 1.14.4.      | Tubuline.....  | 112        |
| 1.14.5.      | Matrice.....   | 112        |
| 1.14.6.      | SM-MALDI-TOF .....   | 113        |

|  |            |
|--|------------|
| 1.15. Analyse statistique.....   | 114        |
| <b>RESULTATS.....</b>  | <b>115</b> |
| 1.1. Le TTSDA et le TTSDB sont des ligands de la tubuline .....  | 115        |
| 1.2. Evaluation de la sensibilité du TTSDA/TTSDB dans les cellules du cancer du côlon.....   | 119        |
| 1.2.1. Effet des polysulfures sur le métabolisme des cellules du cancer du côlon.....  | 119        |
| 1.2.2. Analyse de l'expression différentielle de la tubuline .....   | 121        |
| 1.2.3. Le TTSDB perturbe l'organisation du microtubule .....   | 121        |
| 1.3. Analyse du mécanisme d'action des polysulfures dans le cancer du côlon.....   | 123        |
| 1.3.1. Le TTSDB altère le cycle cellulaire et induit une accumulation des cellules du cancer du côlon en phase G2/M.....                       | 123        |
| 1.3.2. Le TTSDB induit l'apoptose dans les cellules HT-29.....   | 128        |
| 1.4. Modulation de la protéine Bcl-xL par le TTSDB.....  | 132        |
| 1.5. Analyse de l'impact du flux autophagique sur la survie de patients atteints du cancer du côlon.....                                       | 134        |
| 1.5.1. Le TTSDB module l'autophagie dans les cellules HT-29 .....  | 134        |
| 1.5.2. Effet du TTSDB sur le flux autophagique dans les cellules SW480 et SW620. ....  | 139        |
| 1.6. Analyse comparative du TTSDB et des inhibiteurs de la polymérisation des microtubules (vincristine et vinblastine) .....                  | 143        |
| 1.7. Analyse de l'activité du protéasome dans les cellules HT-29 .....   | 150        |
| 1.8. Evaluation de l'accumulation de la protéine p62.....  | 153        |
| 1.8.1. Etude de la distribution cellulaire de la protéine p62.....   | 153        |
| 1.8.2. Analyse de l'expression des ARNm de la protéine p62 .....   | 155        |
| 1.8.3. Evaluation de l'équilibre rédox dans les cellules HT-29 traitées par le TTSDB.....  | 157        |
| 1.9. Analyse de la modulation de la protéine p62.....  | 161        |
| 1.9.1. Etude du rôle de l'inhibition de la biosynthèse de protéine dans l'accumulation de la protéine p62 et l'arrêt du cycle cellulaire ..... | 161        |
| 1.9.2. Etude du rôle de l'inhibition du protéasome dans l'accumulation de la protéine p62 et l'arrêt du cycle cellulaire .....                 | 163        |
| 1.9.3. Evaluation de l'effet de l'extinction du gène p62 dans les cellules HT-29.....  | 165        |
| 1.10. Etude translationnelle du potentiel anticancéreux du TTSDB .....   | 170        |
| 1.10.1. Analyse de l'effet du TTSDB sur la formation de colonie.....   | 170        |
| 1.10.2. Analyse de l'effet du TTSDB sur la formation d'un sphéroïde issu des cellules HT-29.   | 175        |
| 1.10.3. Analyse de l'activité anticancéreuse du TTSDB <i>in vivo</i> .....   | 178        |
| <b>DISCUSSION .....</b>  | <b>181</b> |
| 1.1. Le TTSDB cible le réseau microtubulaire. ....   | 181        |

|  |            |
|--|------------|
| 1.2. Le TTSDDB présente une activité anticancéreuse dans le CCR.....   | 182        |
| 1.3. Le TTSDDB module l'autophagie en fonction du type cellulaire.....                                       | 183        |
| 1.4. La protéine p62 joue un rôle de survie dans les cellules HT-29.....                                     | 184        |
| 1.5. L'autophagie et le protéasome.....  | 186        |
| <b>CONCLUSION .....</b>  | <b>188</b> |
| <b>PERSPECTIVES .....</b>  | <b>189</b> |
| 1.1. Evaluation de l'activité anticancéreuse du TTSDDB dans des organoïdes dérivés de tumeurs humaines.....  | 189        |
| 1.2. Evaluation de combinaisons thérapeutiques .....   | 190        |
| 1.3. Evaluation du rôle de l'accumulation de la protéine p62 par le TTSDDB sur la toxicité neurologique..... | 191        |
| 1.4. Evaluation du rôle de la phosphorylation de la protéine Bcl-xL par le TTSDDB.....                       | 192        |
| 1.5. Evaluation du potentiel du TTSDDB à générer le sulfure d'hydrogène (H <sub>2</sub> S) .....             | 193        |
| <b>Références.....</b>   | <b>200</b> |



## Abréviations

|           |  |
|-----------|--|
| 5-FU :    | 5-Fluorouracile  |
| 5-FUTP :  | 5-Fluorouridine Triphosphate                               |
| - A -     |  |
| ABC :     | ATP-Binding Cassette                                       |
| ACVR2A :  | Activin Receptor type 2A                                   |
| ADN :     | Acide Désoxyribonucléique                                  |
| AIF :     | Apoptosis Inducing Factor                                  |
| AKT :     | AKT8 virus oncogene cellular homolog                       |
| Ambra 1 : | Activating molecule in BECN1-regulated autophagy protein 1 |
| AMPK :    | 5'-Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase        |
| AP-1 :    | Activator Protein-1  |
| APAF :    | Apoptosis Protease Activating Factor                       |
| APC :     | Anaphase-Promoting Complex                                 |
| APC :     | Adenomatous Polyposis coli                                 |
| ARAF :    | A-Raf proto-oncogene                                       |
| ARN :     | Acide Ribonucléique  |
| ASK1 :    | Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1                       |
| ATG :     | Autophagy Related Gene                                     |
| ATM :     | Ataxia Telangiectasia Mutated protein                      |
| ATP :     | Adénosine Triphosphate                                     |
| - B -     |  |
| Bad :     | Bcl-2 associated death promoter                            |
| Bag :     | Bcl-2 associated athanogene                                |
| Bak :     | Bcl-2 homologous antagonist killer                         |
| Bax :     | Bcl-2-associated X protein                                 |
| Bcl-2 :   | B-cell lymphoma 2  |
| Bcl-10 :  | B-cell lymphoma 10   |
| Bcl-xL :  | B-cell lymphoma like extra large                           |
| BH :      | Bcl-2 Homologue  |
| Bid :     | Bcl-2 interacting-domain death                             |
| BIM :     | Bcl-2 Interacting Mediator                                 |

BRAF : B-Raf proto-oncogene  
β-TRCP : β-Transducin Repeat-Containing Protein

- C -

CAP-Gly : Cytoskeleton-Associated Protein-Glycine-rich  
CASP8 : Caspase 8  
C-Term : Carboxyle-Terminale  
CD : Cluster de Différenciation  
Cdc : Cell division control  
CDK : Cyclin-Dependent Kinase  
Chk1/2 : Checkpoint kinase 1/2  
CI50 : Concentration Inhibitrice 50  
CIMP : CpG Island Methylation Pathway  
CIN : Chromosome Instability  
c-Myc : Avian myelocytomatosis virus oncogene cellular homolog  
CMS : Consensus Molecular Subtype  
COMT : Centre Organisateur des Microtubules  
COS : Composés Organosulfurés  
CTNNB1 : Catenin β

- D -

DCC : Deleted in Colorectal Carinoma  
DCFDA : Dichlorofluorescéine Diacétate  
DCX : Doublecortin  
DDI1 : DNA damage inducible 1  
DHE : Dihydroéthidium  
DIABLO : Direct IAP Binding protein with Low pI  
DISC : Death-Inducing Signaling Complex  
DMSO : Diméthylsulfoxyde  
DSDA : Disulfure de Diallyle  
DSK2 : Dominant Suppressor Karl 2

- E -

E2F : Elongation 2 Factor  
ECL : Enhanced Chemiluminescence  
EDNRB : Endothelin Receptor type B  
EDTA : Ethylene Diamine Tetraacetic Acid

|         |                                       |
|---------|---------------------------------------|
| EGF :   | Epithelial Growth Factor              |
| EGFR :  | Epidermal Growth Factor Receptor      |
| ERK :   | Extracellular signal Regulated Kinase |
| ERO :   | Espèce Réactive d'Oxygène             |
| ESR :   | Espèce de Soufre Réactif              |
| Ets-1 : | Erythroblastosis                      |

**- F -**

|           |                                      |
|-----------|--------------------------------------|
| FADD :    | Fas Associated Death Domain          |
| FAM123B : | Family with sequence similarity 123B |
| FasL :    | Fas Ligand                           |
| FBXW7 :   | F Box WD40 domain protein 7          |
| FdUMP :   | Fluorodeoxyuridine Monophosphate     |
| FdUTP :   | Fluorodeoxyuridine Triphosphate      |
| FLD :     | Flexible Loop Domain                 |
| FOLFOX :  | 5-FU, Leucovorine et Oxaliplatine    |
| FRA-1 :   | Fos-Related Antigen-1                |
| FSC :     | Forward Scatter                      |
| FZD :     | Frizzled                             |

**- G -**

|                |                                    |
|----------------|------------------------------------|
| GAP :          | GTPase activating protein          |
| GDP :          | Guanosine Diphosphate              |
| GEGC :         | Gallate EpiGalloCatéchine          |
| GPC6 :         | GPC6 - Glypican-6 precursor        |
| GPP :          | Glycoprotéine-P                    |
| GSK3 $\beta$ : | Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$ |
| GTP :          | Guanosine Triphosphate             |

**- H -**

|                    |  |
|--------------------|--|
| H <sub>2</sub> S : | Hydrogène de Sulfure                     |
| HBSS :             | Hank's Buffered Salt Solution            |
| HDAC6 :            | Histone Deacetylase family member 6      |
| HECT :             | Homologous to the E6AP Carboxyl Terminus |
| HER :              | Human Epidermal Growth Factor Receptor   |
| HER2 :             | Human ErbB2                              |
| HIF-1 $\alpha$ :   | Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$      |

hMLH1 : Human MutL Homolog 1  
HRP : Horseradish Peroxidase  
HtrA2 : High temperature requirement protein A2

**- I -**

IAP : Inhibitor of Apoptosis Protein  
iBMK : immortalized Baby Mouse Kidney  
ICG : Ilots CpG  
IKK : Inhibitor of Kappa B  
INK : Inhibitor of Kinase  
IPS-1 : Interferon-  $\beta$  Promotor Stimulator 1

**- J -**

JNK : c-Jun N-terminal Kinase

**- K -**

K5 : Kringle 5  
KC1 : Kinase Caséine 1  
KEAP-1 : Kelch-like ECH-associated protein-1  
KGS-3 $\beta$  : Kinase Glycogène Synthase-3 $\beta$   
KIAA1804 : Mitogen-activated protein kinase kinase kinase MLK4  
Kif2A : Kinesin family member 2A  
Kif2B : Kinesin family member 2B  
Kif2C : Kinesin family member 2C  
KIP : Kinase Inhibitor Protein  
KIR : Keap-1 Interaction Domain  
KLF4 : Kruppel-like factor 4  
KRAS : V-Ki-ras2 Kirsten Rat Sarcoma

**- L -**

LAMP1 : Lysosomal-associated Membrane Protein 1  
LC3 : Light Chain 3  
LIR : LC3 Interaction Region  
LRP5/6 : Low density lipoprotein Receptor-related Protein 5/6

**- M -**

M-PER : Mammalian Protein Extraction Reagent  
MAP : Microtubule-Associated Protein

|         |  |
|---------|--|
| MAPK :  | Mitogen-Activated Protein Kinase                                 |
| MBR :   | Membrane-Binding Region  |
| Mcl-1 : | Myeloid cell leukemia-1  |
| MDR :   | Multidrug Resistance   |
| MIER3 : | Mesoderm Induction Early Response protein 3                      |
| MMP :   | Mitochondrial Membrane Permeabilization                          |
| MMR :   | Mismatch Repair  |
| MOMP :  | Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization                    |
| MPT :   | Modifications Post-Transcriptionnelles                           |
| MSH3 :  | MutS Homolog 3   |
| MSH6 :  | MutS Homolog 6   |
| MSI :   | Microsatellite Instability                                       |
| MSI-H : | Microsatellite Instability-High                                  |
| MSI-L : | Microsatellite Instability-Low                                   |
| MSS :   | Microsatellite Stable  |
| mTOR :  | Mammalian Target Of Rapamycin                                    |
| MTT :   | bromure de 3-(4,5- diméthylthiazol-2-yl)-2,5diphenyl tetrazolium |
| MUC2 :  | Mucin2   |
| MYO1B : | Myosin 1B  |
| MYT1 :  | Myelin Transcription factor-1 like                               |

- N -

|         |   |
|---------|---|
| NAC :   | N-Acétyl Cystéine                           |
| NADPH : | Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate |
| NBR1 :  | Neighbor of BRCA1 gene 1                    |
| NF-κB : | Nuclear Factor-κ B                          |
| NRAS :  | Neuroblastoma Ras viral oncogene homolog    |
| NRF2 :  | Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 |

- O -

|        |  |
|--------|--|
| OCT4 : | Octamer-binding transcription factor 4 |
| OMS :  | Organisation Mondiale de la Santé      |

- P -

|         |                                    |
|---------|------------------------------------|
| PACLI : | Paclitaxel                         |
| PAM :   | Protéine Associée aux Microtubules |
| PB1 :   | Phox1 and Bem1p                    |

|          |   |
|----------|---|
| PBS :    | Phosphate Buffered Saline                             |
| PBS-T :  | Phosphate Buffered Saline – Tween                     |
| PFKFB3 : | 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3 |
| PI3 :    | Phosphatidyl-Inositol-3                               |
| PI3K :   | Phosphatidyl-Inositol 3 Kinase                        |
| PKA :    | Protéine Kinase A                                     |
| PKB :    | Protéine Kinase B                                     |
| PKC :    | Protéine Kinase C                                     |
| Plk :    | Polo-like kinase 1                                    |
| PMA :    | 13-acétate de phorbol 12-myristate                    |
| PS :     | Phosphatidylsérine                                    |
| PTPN12 : | Protein Tyrosine Phosphatase, Non-receptor type 12    |
| PTEN :   | Phosphatase and Tensin homolog                        |
| PVDF :   | Polyvinylidifluoride                                  |

**- R -**

|                  |                                       |
|------------------|---------------------------------------|
| RAD23 :          | Radiation Sensistive 23               |
| RAF :            | Rapidly Accelerated Fibrosarcoma      |
| RAS :            | Rat Sarcoma                           |
| Rb :             | Retinoblastoma protein                |
| Rbl :            | Rétinoblastome like                   |
| RIG-I :          | Retinoic acid-Inducible Gene I        |
| RIP1 :           | Receptor-Interacting Protein 1        |
| RPMI :           | Roswell Park Memorial Institute       |
| RPN1/2/5/10/10 : | Regulatory Particle Non-ATPase        |
| RPT1-RPT6 :      | Regulatory Particle Triple A 1-6      |
| RPTOR :          | Regulatory-associated Protein of mTOR |

**- S -**

|            |   |
|------------|---|
| SAB :      | Sérum Albumine Bovine                                     |
| SAPK :     | Stress Activated Protein Kinases                          |
| SCF :      | Skp Cullin F-box containing                               |
| SDA :      | Sulfure de Diallyle                                       |
| SDS :      | Sodium Dodecyl Sulfate                                    |
| SDS-Page : | Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide gel electrophoresis |
| Ser :      | Serine  |

|           |  |
|-----------|--|
| SIRT2 :   | Sirtuin Type 2                                   |
| Skp1/2 :  | S-phase kinase-associated protein 1/2            |
| SLC9A9 :  | Solute Carrier Family 9 Subfamily A Member 9     |
| SMAC :    | Second Mitochondria-derived Activator of caspase |
| SMAD2/4 : | Smad family member number 2/4                    |
| SOX2 :    | SRY (sex-determining region Y)- box 2            |
| SOX9 :    | SRY (sex-determining region Y)-box 9 protein     |
| SP-1 :    | Specificity Protein-1                            |
| Spk :     | S-phase associated-protein                       |
| Src :     | Sarcome de Roux                                  |
| SSC :     | Side Scatter                                     |
| SUP :     | Système Ubiquitine-Protéasome                    |
| SVF :     | Sérum de veau foetal                             |

- T -

|                  |   |
|------------------|---|
| TBD :            | TRAF-6 Binding Domain   |
| TCERG1 :         | Transcription Elongation Regulator 1                          |
| TCF4 :           | T-Cell Factor 4   |
| TCF7L2 :         | Transcription Factor 7-Like 2                                 |
| TGF $\alpha$ :   | Transforming Growth Factor $\alpha$                           |
| TGF $\beta$ :    | Transforming Growth Factor $\beta$                            |
| TGFBR2 :         | Transforming Growth Factor $\beta$ Receptor 2                 |
| TLL :            | Tubulin Tyrosine ligase                                       |
| TNF :            | Tumor Necrosis Factor   |
| TNM :            | Tumor, Nodes, Metastasis                                      |
| TP53 :           | Tumor Protein p53   |
| TNFR :           | Tumor Necrosis Factor Receptor                                |
| TRADD :          | Tumor necrosis factor Receptor type 1-Associated Death Domain |
| TRAF2/6 :        | TNF Receptor-Associated Factor 2                              |
| TRAIL :          | TNF Related Apoptosis Inducing Ligand                         |
| TRAIL-R :        | TRAIL-Receptor  |
| TRIM5 $\alpha$ : | Tripartite Motif containing 5 $\alpha$                        |
| TSDA :           | Trisulfure de Diallyle  |
| TTN :            | Titin   |

TTSDA : Tétrasulfure de Diallyle  
TTSDB : Tétrasulfure de Dibenzyle  
TUBA : Tubulin  $\alpha$   
TUBAL : Tubulin  $\alpha$ -like  
TUBB : Tubulin  $\beta$

- U -

UBA : Ubiquitin Associated  
UBL : Ubiquitin-Like  
ULK1 : Unc-51-like 1

- V -

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor  
VEGFR : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor  
VINB : Vinblastine  
VINC : Vincristine

- W -

Wnt : Wingless-type

- X -

XELFOX : Capecitabine et Oxaliplatine  
XKCM1 : Xenopus Kinesin Catastrophe Modulator-1

# INTRODUCTION

## 1.1. Les caractéristiques du cancer

Le cancer est une maladie associée à une prolifération anormale des cellules somatiques aboutissant à la formation d'un nouveau tissu dit tumeur ou néoplasme. Une tumeur peut être bénigne ou maligne. La tumeur bénigne n'est pas cancéreuse, car elle présente un développement limité et ne forme pas de métastases. La tumeur maligne est quant à elle cancéreuse, elle envahit tout l'organe et s'infiltré dans les organes avoisinants. Le cancer est caractérisé par une prolifération incontrôlée, il échappe à tout stimuli pro-apoptotiques et a tendance à quitter le tissu d'origine pour envahir d'autres tissus avoisinants et créer ainsi des foyers cancéreux secondaires.

La transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse est un processus long qui s'étend sur de nombreuses années voire décennies. La cancérogenèse est caractérisée par plusieurs étapes, il y a classiquement une initiation, une promotion et une progression (**Figure 1**). L'initiation est induite par de nombreux facteurs exogènes et endogènes favorisant la formation de mutations ponctuelles dans les gènes impliqués dans la prolifération et la différenciation cellulaire, et provoquant ainsi l'activation des oncogènes ou l'inactivation des anti-oncogènes. De nombreux promoteurs tumoraux (facteurs de croissance, cytokines, hormones) favorisent la promotion du cancer. La progression du cancer se caractérise par son invasion et par la formation de métastases.

L'identification des caractéristiques tumorales est en constante évolution ; Hanahan et Weinberg (Hanahan and Weinberg 2011) ont décrits les nombreuses caractéristiques acquises par la cellule cancéreuse durant la cancérogenèse :

- l'indépendance vis-à-vis des facteurs de croissance provenant de l'environnement ; en effet une cellule normale nécessite un stimulus particulier pour se diviser alors que la cellule cancéreuse en est indépendante ;
- l'insensibilité aux signaux antiprolifératifs ;
- la résistance à l'apoptose, la cellule tumorale est capable d'inactiver la mort cellulaire programmée ;
- la capacité proliférative illimitée grâce à l'activité accrue de la télomérase de la cellule cancéreuse ;

- la capacité à induire l'angiogenèse ;
- la capacité d'invasion tissulaire et de diffusion métastatique ;
- la capacité de perturber le métabolisme énergétique et
- d'échapper au système immunitaire.

Ces caractéristiques principales ou « hallmarks » sont sous le contrôle ou le résultat de deux caractéristiques habilitantes « enabling characteristics » (Hanahan and Weinberg 2011) :

- l'inflammation favorisant les tumeurs et
- l'instabilité due aux mutations du génome.

Selon le type de cellule, de tissu ou d'organe, il existe cinq grands types de cancer :

- les carcinomes sont les plus fréquents (plus de 85 %) en touchant les tissus épithéliaux de la peau ou des organes internes tels que le système digestif,
- les sarcomes sont très rares (moins de 1 %) et touchent les tissus conjonctifs de soutien (osseux, cartilagineux, musculaires, adipeux, vasculaires),
- les lymphomes sont des cancers du système lymphatique qui participe aux réactions de défenses de l'organisme,
- les leucémies touchent les tissus de la moelle osseuse avec une production massive de globules blancs anormaux et
- les cancers neurologiques touchent le système nerveux central et périphérique.

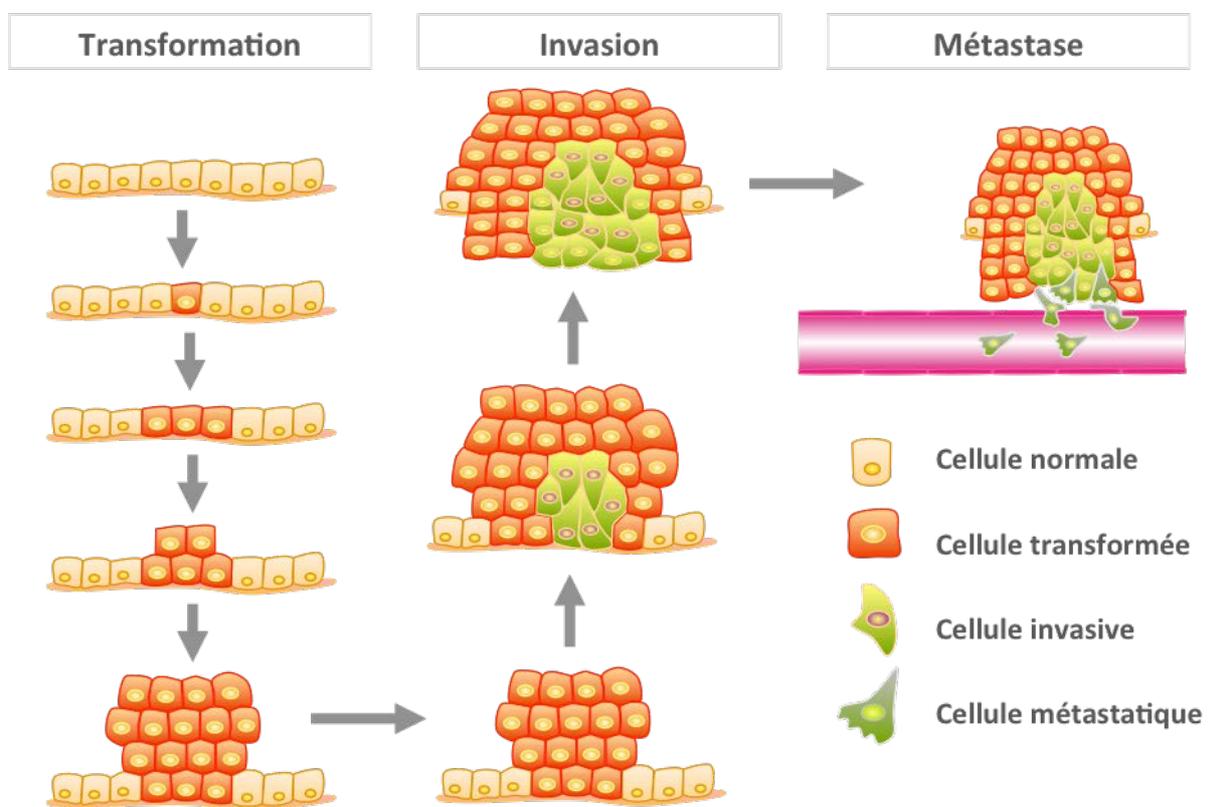


Figure 1 : Principales étapes de la progression de la cancérogenèse. Figure réalisée avec ScienceSlides.

## 1.2. Le cancer colorectal

Dans le cadre de ce projet de thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés au cancer du côlon, véritable fléau des pays occidentaux. L'incidence du cancer du côlon est en effet très variable dans le monde. Les pays occidentaux et industrialisés sont les plus concernés avec une forte fréquence dans le Nord et l'Ouest de l'Europe, l'Amérique du Nord, de l'Australie et le Japon. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) ([http : //www.who.int/cancer/country-profiles/fr/](http://www.who.int/cancer/country-profiles/fr/)), au Luxembourg, le cancer du côlon représente une incidence de 14 % chez l'homme par an. Chez la femme, il représente 12 % de nouveaux cas par an (**Figure 2**). Ainsi, sa fréquence le place en deuxième position, après le cancer de la prostate chez l'homme et en troisième position après le cancer du sein, et de l'utérus chez la femme.

L'incidence du cancer du côlon augmente significativement après l'âge de 50 ans, l'âge moyen au diagnostic est de 62 ans au Luxembourg. Le cancer du côlon représente un problème majeur de santé public par sa fréquence, sa sévérité et son coût. En effet, au Luxembourg le taux de mortalité est de 12 % pour l'homme et de 13 % pour la femme par an. En Europe, le cancer colorectal (CCR) constitue la seconde cause de mortalité par cancer, chez l'homme et chez la femme. Le CCR est le deuxième cancer le plus fréquent chez la femme après le cancer du sein, et le troisième type de cancer le plus fréquent chez l'homme après le cancer du poumon et de la prostate. Pour l'ensemble des cancers colorectaux, la survie est directement corrélée au stade de la maladie au moment du diagnostic (statistiques OMS 2014) ([http : //www.who.int/cancer/country-profiles/fr/](http://www.who.int/cancer/country-profiles/fr/)).

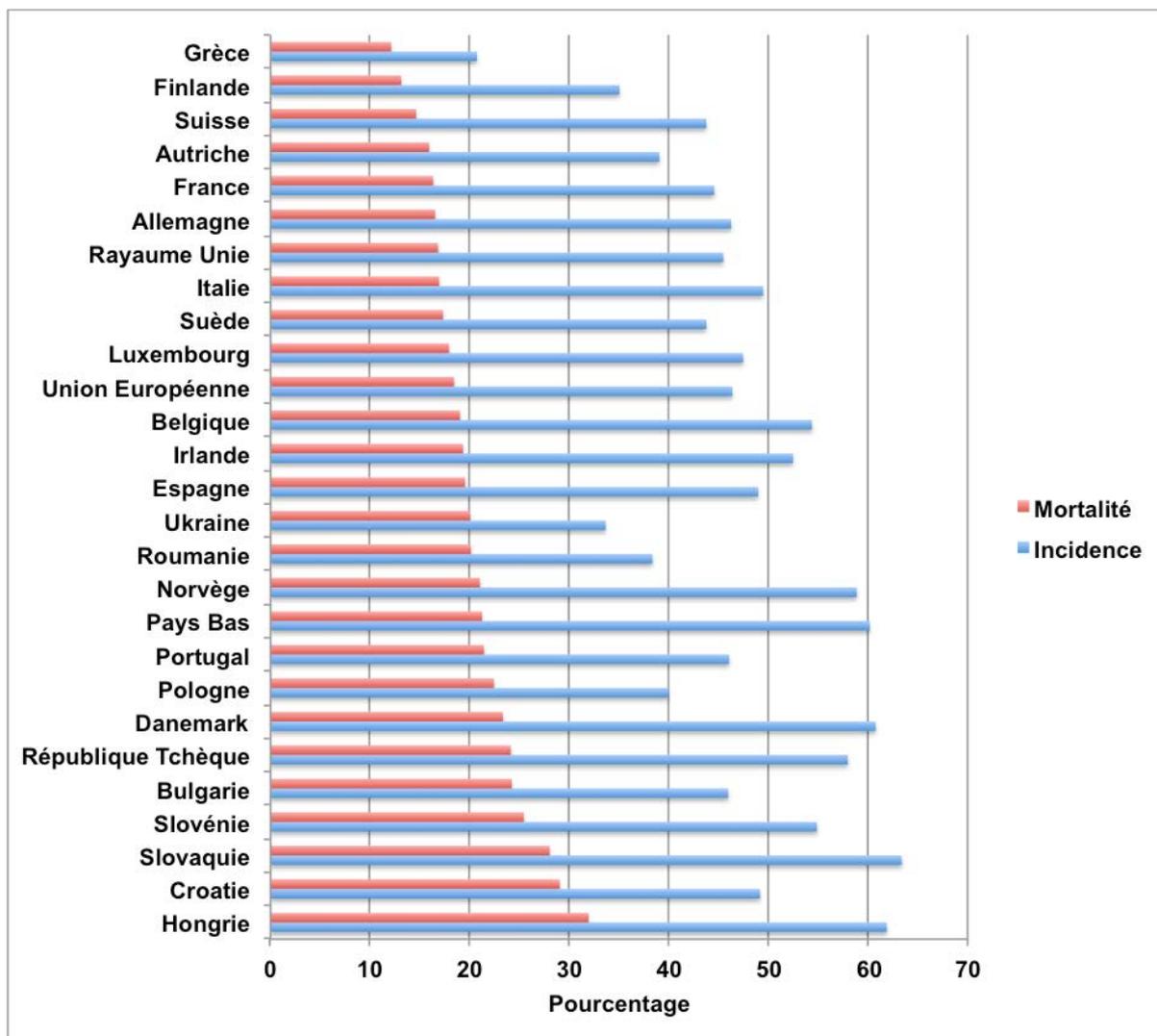


Figure 2 : Représentation graphique du taux d'incidence et de mortalité du cancer du côlon en Europe (OMS 2014).

Le projet « Cancer Genome Atlas » a permis de révéler la complexité des altérations géniques impliquées dans le développement du CCR induisant la dérégulation de nombreuses voies cellulaires (Cancer Genome Atlas 2012). En effet, le séquençage de 97 tumeurs a reporté 15 mutations somatiques dans les formes de CCR hypermutées contre 17 dans les formes non-hypermutées. Les gènes mutés sont représentés dans le **Tableau I**. (Cancer Genome Atlas 2012, Blanco-Calvo et al. 2015).

*Tableau I : Liste des gènes mutés dans les formes de CCR hypermutées et non-hypermutées.*

| <b>Cancers Colorectaux Hypermutés</b> | <b>Cancers Colorectaux Non-Hypermutés</b> |
|---------------------------------------|---|
| APC                                   | TP53                                      |
| BRAF                                  | APC                                       |
| ACVR2A                                | KRAS                                      |
| TGFBR2                                | TTN                                       |
| MSH3                                  | PI3K                                      |
| MSH6                                  | FBXW7                                     |
| MYO1B                                 | SMAD4                                     |
| CDC27                                 | NRAS                                      |
| FZD3                                  | TCF7L2                                    |
| MIER3                                 | FAM123B                                   |
| MAP7                                  | SMAD2                                     |
| PTPN12                                | CTNNB1                                    |
| TCERG1                                | MAPK                                      |
| CASP8                                 | SOX9                                      |
| TCF7L2                                | ACVR1B                                    |
|                                       | GPC6                                      |
|                                       | EDNRB                                     |

### **1.2.1. Les différents stades du cancer colorectal**

Le stade du cancer est identifié selon la classification « Tumor, Nodes, Metastasis » (TNM) soit « tumeur, ganglions lymphatiques, métastases » selon « American Joint Committee on Cancer ». Cette classification repose sur l'évaluation de la taille de la tumeur, de la profondeur de la tumeur, de l'atteinte ou non des ganglions lymphatiques, du nombre de

ganglions atteints, et de la présence ou non de métastases. Au cours du diagnostic, le stade des cancers colorectaux est généralement exprimé par un chiffre allant de 0 à 4 :

Au stade 0 : la tumeur est très superficielle, elle n'envahit pas la sous-muqueuse, les ganglions lymphatiques ne sont pas atteints et il n'y a pas de métastases à distance.

Au stade I : la tumeur envahit la sous-muqueuse ou la couche musculaire (muscleuse) de la paroi du côlon, les ganglions lymphatiques ne sont pas atteints et il n'y a pas de métastase à distance.

Au stade II : les cellules cancéreuses ont traversé plusieurs couches de la paroi du côlon, mais aucun ganglion n'est atteint et il n'y a pas de métastase.

Au stade III : les cellules cancéreuses ont atteint les ganglions lymphatiques proches de la tumeur.

Au stade IV : le cancer s'est propagé au-delà du côlon, les métastases se sont formées au niveau du foie ou des poumons.

## **1.2.2. Les différents sous-groupes moléculaires du cancer colorectal**

L'accumulation progressive de mutations géniques, l'activation d'oncogènes et l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs tels que « Tumor Protein p53 » (TP53), « V-Ki-ras2 Kirsten Rat Sarcoma » (KRAS), « Adenomatous polyposis coli » (APC), « B-Raf Proto-Oncogene » (BRAF) et « SMAD family member 4 » (SMAD4) favorisent la progression d'un adénome vers un cancer colorectal (Vogelstein et al. 1988). En effet, la majorité des CCR sont d'origine sporadique et seulement 15-30 % des CCR sont d'origine héréditaire (Fearon 2011). Parmi les cancers sporadiques, il existe trois types de voies moléculaires. La plus fréquente repose sur la voie de l'instabilité chromosomique, la seconde repose sur la voie de l'instabilité des locus microsattellites, et la troisième repose sur la voie de la méthylation des îlots CpG (Kaemmerer et al. 2013).

### **1.2.2.1 La voie de l'instabilité chromosomique**

La voie de l'instabilité chromosomique est le mécanisme moléculaire de cancérogenèse du côlon le plus fréquent et concerne 80 à 85 % des cancers colorectaux sporadiques (Deschoolmeester et al. 2010). Ce sous-type de CCR résulte essentiellement

d'une instabilité numérique et structurelle des chromosomes menant à une perte d'hétérozygotie conduisant alors à l'accumulation de mutations ponctuelles des oncogènes spécifiques et des gènes suppresseurs de tumeurs. Ces mutations sont fréquentes sur les gènes KRAS, APC, TP53 et « Deleted in Colorectal Carcinoma » (DCC). Ces mutations comprennent également des pertes des chromosomes 5q (APC), 17p (TP53) et 18q (DCC ou SMAD4).

Le gène APC est un gène suppresseur de tumeurs qui joue le rôle du gardien du génome. Plus de 80 % des adénomes et CCR présentent une mutation du gène APC menant à son inactivation. La protéine APC joue un rôle majeur de régulateur négatif dans le contrôle de l'activité de la voie de signalisation « Wiggless-type » (Wnt). Cette voie aboutit à la formation du complexe de transactivation  $\beta$ -caténine-TCF4, qui active la transcription de nombreux gènes cibles, en particulier l'oncogène « Avian myelocytomatosis virus oncogene cellular homolog » (c-Myc) ou la cycline D1. La protéine APC favorise la dégradation de la  $\beta$ -caténine au sein d'un complexe dégradosome-axine-glycogène synthase kinase 3  $\beta$ . Si ce complexe est défectueux en raison de l'inactivation par mutation de l'APC, l'excès de  $\beta$ -caténine dans la cellule mène à l'activation de Myc et de nombreux autres gènes. La mutation du gène APC est notamment responsable de la polypose adénomateuse familiale (Half et al. 2009). La perturbation de la voie du WNT entraîne une dérégulation de la prolifération et de la différenciation avec le développement de cryptes dysplasiques, qui progressent vers des adénomes présentant une dysplasie croissante en raison de la perte d'autres gènes suppresseurs de tumeurs.

La mutation de l'oncogène KRAS apparaît dans 30 - 40 % des CCR. La protéine KRAS, est membre de la superfamille de protéines de Ras. Elle est située sur le chromosome humain 12 et codée par 189 acides aminés, elle contient quatre exons codants et un exon non codant 5' (Malumbres and Barbacid 2003). KRAS est une protéine de liaison à la guanosine triphosphate/guanosine diphosphate (GTP/GDP) ancrée dans la membrane. Les mutations KRAS altèrent l'activité intrinsèque de la GTPase de KRAS et empêchent les « GTPase activating protein » (GAP) de favoriser l'inactivation de KRAS par hydrolyse de la GTP de KRAS, entraînant l'accumulation de protéines KRAS sous la forme active, liées à la GTP et l'activation en aval de voies de signalisation pro-prolifératives (Schubbert et al. 2007). Les protéines Ras régulent les réponses cellulaires aux nombreux stimuli extracellulaires, y compris les facteurs de croissance solubles. KRAS est impliqué dans la transduction du signal intracellulaire et principalement responsable de l'activation de la signalisation « Epidermal Growth Factor Receptor » (EGFR). Elle entraîne l'activation de la voie « Mitogen-

activated protein kinases » (MAPK) composée de la cascade de signalisation MAPK- « Extracellular signal-Regulated Kinase » (ERK) qui se place en aval du récepteur EGFR et de son ligand le facteur de croissance « Transforming Growth Factor  $\alpha$  » (TGF $\alpha$ ). KRAS est aussi impliquée dans la voie de signalisation « Phosphatidyl-Inositol 3 Kinase » (PI3K)- « AKT8 virus oncogene cellular homolog » (AKT)- « Mammalian Target Of Rapamycin » (mTOR) qui régule la traduction des protéines et la survie cellulaire (Rodriguez-Viciano et al. 1994), (Castellano and Downward 2011). La mutation activatrice de KRAS est précoce dans la séquence adénome-cancer, sa mutation activatrice entraîne une hyperprolifération des cellules épithéliales formant des adénomes. Les mutations concernant les codons 12 et 13 de l'exon 2 représentent 95 % des mutations du gène KRAS. Ce sont des mutations ponctuelles à un seul nucléotide et les modèles les plus fréquents sont G12D, G12A, G12R, G12C, G12S, G12V et G13D. Les mutations sur le codon 12 : p.G12D, pG12V et le codon 13 : p.G13D sont les plus fréquentes, il s'agit de la substitution de la glycine (G) à l'aspartate (D) ou de la substitution de la glycine (G) à la valine (V) (Neumann et al. 2009). L'identification de la mutation KRAS est fondamentale pour l'introduction d'anticorps monoclonaux dans le traitement clinique des patients atteints du cancer du côlon. En effet, les anticorps monoclonaux dirigés contre l'EGFR : cetuximab et panitumumab présentent un avantage de survie chez les patients sans mutation KRAS (Lievre et al. 2006). En combinaison avec la chimiothérapie telle que FOLFOX (leucovorine, 5-Fluorouracile (5-FU) et oxaliplatine) ou FOLFIRI (leucovorine, 5-FU et irinotecan) ces thérapies augmentent la survie chez les patients atteints de tumeurs de type sauvage (WT) pour KRAS et NRAS (Bokemeyer et al. 2009, Van Cutsem et al. 2011). Aucun bénéfice n'est observé chez les patients présentant une mutation KRAS / NRAS. Cependant, l'absence de cette mutation ne suffit pas pour prédire la réponse thérapeutique, car seulement 40 à 50% des patients atteints du cancer du côlon avec KRAS / NRAS (WT) répondent aux anticorps monoclonaux anti-EGFR (De Roock et al. 2011). Parmi les patients KRAS (WT), une mutation de BRAF ou PI3KCA, ou la perte de « Phosphatase and Tensin homolog » (PTEN) peut notamment être associée à une résistance aux composés anti-EGFR (Siena et al. 2009).

La mutation BRAF concerne environ 15 % des CCR. La mutation V600E est la plus fréquente (80 %), elle induit l'activation constitutive de la protéine sérine/thréonine kinase BRAF, membre de la famille de gènes « Rapidly Accelerated Fibrosarcome » (RAF) (BRAF, ARAF1 et RAF1). La protéine BRAF agit en aval de KRAS pour activer la voie de signalisation MAPK qui est impliquée dans la régulation de la prolifération, la motilité et la différenciation cellulaire à travers la phosphorylation des substrats de ERK. Les mutations

BRAF sont souvent associées au phénotype de méthylation des îlots CpG et à l'instabilité des microsatellites (Lochhead et al. 2013). Au niveau clinique, la mutation BRAF a un pronostic négatif dans les CCR métastatiques traités par les anticorps monoclonaux, inhibiteurs de BRAF : vemurafenib et dabrafenib (Yuan et al. 2013). En effet, l'activation de la voie de signalisation MAPK par EGFR contribue à l'insensibilité des CCR mutants BRAF contre vemurafenib (Corcoran et al. 2012).

A noter que les mutations KRAS et BRAF sont mutuellement exclusives dans le CCR (Rajagopalan et al. 2002).

La mutation inactivatrice du gène suppresseur de tumeurs TP53 est quant à elle plus tardive dans le développement du CCR autorisant l'accumulation d'altérations génétiques multiples. Sur le plan clinique, les cancers de type « Chromosome Instability » (CIN) sont prédominants dans le côlon distal et sont généralement associés à un mauvais pronostic (Takayama et al. 2006, Li and Lai 2009, Domingo et al. 2013, Moreno and Sanz-Pamplona 2015).

### **1.2.2.2 La voie de l'instabilité des microsatellites**

Ce mécanisme moléculaire de cancérogenèse concerne 10 % à 15 % des cancers colorectaux sporadiques et est observé dans le cadre du syndrome de Lynch « hereditary nonpolyposis colorectal cancer » (Iacopetta et al. 2010). Ce sous-type de cancer résulte de la dérégulation des gènes de réparation des mésappariements. Ces cancers sont appelés « Microsatellite Instability » (MSI). Les microsatellites sont des courtes séquences de nucléotides de 1-6 paires de bases particulièrement sujettes aux erreurs de réplication (insertion et délétion) conduisant à des mutations ponctuelles ou des erreurs du cadre de lecture. La méthylation de l'ADN est considérée comme un mécanisme de régulation épigénétique crucial dans le développement du carcinome colorectal. Environ 90 % des tumeurs sporadiques de type MSI pourraient être expliquées par l'hyperméthylation du gène de réparation « human MutL Homolog 1 » (hMLH1) qui fait parti du complexe de réparation des mésappariements de l'ADN. La mutation ou la méthylation de la région promotrice des gènes « Mismatch Repair » (MMR) induit une déficience du système de réparation. Ainsi des mutations peuvent s'accumuler préférentiellement au niveau des séquences de microsatellites. La cellule acquiert un phénotype hypermutateur qui prédispose à la survenue de mutations d'oncogènes comme le gène pro-apoptotique « Bcl-2-associated X protein » (Bax) ou des gènes suppresseurs de tumeurs tel que le gène du récepteur de type II du «

Transforming Growth Factor  $\beta$  » (TGF $\beta$ ). Sur le plan clinique, les cancers MSI sont plus souvent localisés dans le côlon proximal (transverse et droit). Les cancers colorectaux peuvent être classés en 3 trois groupes selon le degré d'instabilité des microsatellites (Li and Lai 2009) :

- les cancers « Microsatellite Instability-High » (MSI-H) ont un haut niveau d'instabilité,
- les cancers « Microsatellite Instability-Low » (MSI-L) ont un faible niveau d'instabilité,
- les cancers « Microsatellite Stable » (MSS) n'ont pas d'instabilité.

Les cancers MSI-H ont un meilleur pronostic spontané que les cancers MSI-L et MSS, indépendamment du stade tumoral, ils sont associés à un risque de métastases plus faible (Bogaert and Prenen 2014).

### **1.2.2.3 La voie de la méthylation des îlots CpG**

L'instabilité épigénétique est observée dans la cancérogenèse des tumeurs de phénotype « CpG Island Methylation Pathway » (CIMP). Les îlots CpG (ICG) sont de courtes séquences riches en dinucléotides CpG présentes au niveau des régions 5' de la moitié des gènes du codes humain (Bird 1986). La méthylation de la cytosine de la région 5' au niveau des ICG est associée à la perte de l'expression spécifique. Cette modification est notamment présente en condition physiologique comme pour l'inactivation du chromosome X. Il existe deux types de CIMP : « CIMP-high » est associé à une mutation de BRAF, et « CIMP-low » est associé à une mutation KRAS. Par ailleurs la méthylation des îlots CpG est aussi associée au CCR MSI-H (Toyota et al. 1999).

Il convient d'ajouter que les CCR d'origine sporadique présentent les caractéristiques de chaque voie. Ces voies moléculaires ne s'excluent pas mutuellement révélant ainsi la complexité du réseau moléculaire impliqué dans la pathogenèse des CCR (Bogaert and Prenen 2014).

Par ailleurs, Sadanandam et al., (Sadanandam et al. 2013) redéfinissent pour la première fois cette classification moléculaire en associant le profil d'expression génétique des CCR et la réponse thérapeutique à partir d'une base de données comportant 1290 tumeurs.

Ainsi, ils identifient premièrement cinq sous-type selon l'analyse des gènes préférentiellement exprimés dans 387 tumeurs représentatives :

- le type « cellule caliciforme », définie par l'expression élevée d'ARNm de « Mucin 2 » MUC2 et « Trefoil Factor 3 » (TFF3) spécifiques aux cellules caliciformes ;
- le type « entérocytes », définis par une forte expression de gènes spécifiques d'entérocyte ;
- le type « cellule-souche », avec une forte expression des gènes cibles de la voie de signalisation Wnt, gènes myoépithéliaux, mésenchymateux et faible expression des marqueurs de différenciation ;
- le type « inflammatoire », marqué par une expression relativement élevée de chimiokines et de gènes liés à l'interféron ;
- et le type « amplification transitoire », une collection hétérogène d'échantillons avec une expression variable des gènes de cellules souches et de la voie Wnt.

Ensuite, afin d'établir une corrélation entre les sous-types du CCR et la réponse à l'anticorps monoclonal cetuximab anti-EGFR, un ensemble de données microarray de métastases hépatiques du CCR (Khambata-Ford et al. 2007) sont signés avec des réponses thérapeutiques au cetuximab chez 80 patients.

Récemment, un Consortium International a établi une classification consensus des CCR basée sur les données d'expression des gènes (Guinney et al. 2015). L'étude porte sur l'analyse des données de plus de 4000 échantillons tumoraux, et a permis de former un consensus sur l'existence de 4 sous-types moléculaires de cancers colorectaux « Consensus Molecular Subtype » (CMS) 1 à 4, très finement caractérisés sur le plan clinique et moléculaire :

- CMS1 : le type « MSI immune » (14 % des cas) : tumeurs hypermutées, dont la majorité présentent une instabilité microsatellitaire (MSI) et une forte infiltration immunitaire,
- CMS2 : le type « Canonique » (37 % des cas) : tumeurs présentant une instabilité chromosomique et les mutations des gènes APC et TP53, caractéristiques de la voie de carcinogénèse canonique décrite par Fearon et Vogelstein en 1990, (Fearon and Vogelstein 1990)

- CMS3 : le type « Métabolique » (13 % des cas) : tumeurs dont la grande majorité sont mutées pour l'oncogène KRAS et présentent une surexpression des voies métaboliques,
- CMS4 : le type « Mésenchymateux » (23 % des cas), de mauvais pronostic : tumeurs très infiltrées par le stroma et surexprimant les gènes impliqués dans la transition épithélio-mésenchymateuse.

Bien que ces classifications ne soient pas actuellement considérées dans la prise en charge des patients, elles révèlent l'importance de la biologie moléculaire pour la réponse thérapeutique.

### **1.2.3. Thérapie du cancer du côlon**

Le traitement du cancer du côlon repose essentiellement sur le stade de la tumeur. La thérapie du cancer du côlon repose sur une combinaison de chimiothérapie et de chirurgie. Cependant la chirurgie représente le principal traitement de première ligne et il n'est pas commun d'utiliser la radiothérapie dans le traitement du cancer du côlon. En revanche, il est possible de l'utiliser en combinaison avec une chirurgie afin d'éliminer l'ensemble des cellules cancéreuses restantes ou chez le patient très faible atteint d'un cancer avancé douloureux ou afin d'éradiquer les foyers cancéreux secondaires.

#### **1.2.3.1 Chimiothérapie classique**

La chimiothérapie est un traitement général dont l'objectif est de réduire les récurrences, elle peut être systémique ou régionale. La chimiothérapie peut avoir lieu après (adjuvante) ou avant (néo-adjuvante) la chirurgie. Les cancers du stade 0 et I ne sont pas concernés par la chimiothérapie. Dans le cas des cancers avancés au stade II, III et IV, la chimiothérapie est administrée après la chirurgie. On compte de nombreux composés utilisés en combinaison pour augmenter l'efficacité du traitement (Stintzing 2014). Le traitement du cancer dépend donc du stade du cancer :

- **Stade 0 :**

Pour les cancers au stade précoce et n'ayant pas migré vers des foyers secondaires, la chirurgie est utilisée en première ligne de traitement pour enlever le polype.

- **Stade I :**

Les cancers au stade I ne se sont pas propagés dans les ganglions lymphatiques voisins. Le traitement standard repose alors sur la chirurgie ou la colectomie partielle. Il n'y a généralement aucun traitement supplémentaire.

- **Stade II :**

La chirurgie ou la colectomie partielle est le traitement unique, en revanche une chimiothérapie adjuvante peut l'accompagner.

- **Stade III :**

La colectomie partielle suivie de la chimiothérapie adjuvante est le traitement standard à ce stade. Pour la chimiothérapie, les combinaisons FOLFOX (5-FU, leucovorine et oxaliplatine) ou CapeOx (capecitabine et oxaliplatine) sont utilisées le plus souvent, mais certains patients peuvent avoir du 5-FU associé à la leucovorine ou de la capécitabine seule en fonction de leur âge et de leurs besoins en matière de santé.

- **Stade IV :**

Le cancer s'est propagé au-delà du côlon, dans des foyers secondaires, plus généralement le poumon, le foie ou le cerveau. La chirurgie reste fondamentale pour éliminer les cancers et/ou les métastases. En revanche, si le cancer est trop propagé, la chimiothérapie reste le traitement principal, elle peut toujours être accompagnée par une chirurgie. Au stade IV, la chimiothérapie et/ou la thérapie ciblée peut être prescrite.

Le 5-FU est considéré comme le traitement de référence dans le CCR, c'est un médicament de la classe des anti-métabolites et de la sous-classe des analogues de la pyrimidine. La structure chimique du 5-FU est très similaire à celle de l'uracile, l'hydrogène en position 5 du noyau de pyrimidine est remplacé par un atome de fluor. Le 5-FU est une pro-drogue transformée au sein de la cellule en différents métabolites cytotoxiques. Le 5-FUTP (5-fluorouridine triphosphate) s'incorpore dans l'ARN et bloque ainsi sa synthèse. Le FdUMP (fluorodeoxyuridine monophosphate) se lie à la thymidilate synthase pour inhiber la synthèse d'ADN. Et le FdUTP (fluorodeoxyuridine triphosphate) s'incorpore dans l'ADN pour inhiber son élongation. La capécitabine est la forme orale du 5-FU (Labianca et al. 2013). L'oxaliplatine est un dérivé du platine, elle inhibe la synthèse d'ADN en interagissant avec l'ADN pour former des ponts intra- et inter-brins par alkylation.

La chimiothérapie conventionnelle repose sur l'utilisation de différents composés (Labianca, Nordlinger et al. 2013). Parmi les nombreux médicaments systémiques présentant une activité anti-tumorale dans le CCR se trouve le 5-FU, l'irinotécan inhibiteur de l'ADN

topoisomérase I, l'antineoplasique oxaliplatine, l'anticorps monoclonal anti-VEGF bevacizumab, les anticorps monoclonaux anti-EGFR cetuximab et panitumumab, et enfin la capécitabine de la famille des fluoropyrimidines. Différentes combinaisons de ces médicaments, tels que le schéma FOLFOX (leucovorine, 5-FU et oxaliplatine), le schéma FOLFIRI (leucovorine, 5-FU et irinotecan), CapeOX (capecitabine et oxaliplatine) ou FOLFOXIRI (leucovorin, 5-FU, oxaliplatine, et irinotecan) couplées ou pas à un agent anticorps monoclonal sont envisagés pour augmenter l'efficacité des traitements anticancéreux, en revanche les effets secondaires restent importants.

### **1.2.3.2 Thérapies ciblées**

Il existe trois classes de thérapies ciblées approuvées pour le traitement du CCR. L'utilisation de thérapies ciblées n'est pas recommandée dans les thérapies adjuvantes en raison des effets secondaires plus sévères ou de l'absence de bénéfice (Tobin et al. 2015).

#### **1.2.3.2.1 Les inhibiteurs angiogéniques**

Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire « Vascular Endothelial Growth Factor » (VEGF) est crucial pour l'angiogenèse dans la progression tumorale. Le VEGF est sécrété par les cellules cancéreuses en raison de l'hypoxie présente au sein de la cellule tumorale. Ce dernier se fixe au domaine extracellulaire de son récepteur « Vascular Endothelial Growth Factor Receptor » (VEGFR), qui stimule ensuite une cascade de signalisation résultant dans l'activation d'une réponse angiogénique. Etant donnée l'importance de l'angiogenèse dans la progression tumorale, la suppression de ce mécanisme est essentielle pour le traitement du cancer. Le bevacizumab est un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre le VEGF, le premier inhibiteur angiogénique approuvé pour la thérapie ciblée du cancer. Le bevacizumab est notamment utilisé en combinaison avec la chimiothérapie telle que FOLFOX ou FOLFIRI (Rolfo et al. 2014).

#### **1.2.3.2.2 Les anticorps anti-EGFR**

EGFR est un récepteur transmembranaire, il appartient à la famille « Human Epidermal Growth Factor Receptor » (HER) à activité tyrosine kinase. Sa liaison au facteur de croissance épidermique induit sa dimérisation et l'activation des voies de signalisation des

kinases RAS, PI3K et « sarcome de Roux » (Src). L'activation de ces voies cellulaires conduit à la prolifération cellulaire, la migration et la différenciation favorisant la survie cellulaire. Les anticorps monoclonaux anti-EGFR cetuximab et panitumumab sont utilisés dans le traitement du CCR métastatique. Ces molécules perturbent sélectivement les voies de signalisation par liaison spécifique sur les EGFR, limitant ainsi la liaison des ligands EGF et TGF $\alpha$  et donc l'activation des voies de signalisation en aval. La combinaison de la chimiothérapie avec la thérapie ciblée anti-EGFR est plus effective, bien qu'elle dépende du statut mutationnel du gène KRAS, activant la GTPase impliquée dans l'activation de EGFR. L'évaluation du statut mutationnel de KRAS est essentielle pour décider de la thérapie. En effet, les patients qui présentent une mutation du gène KRAS ne répondent pas au traitement anti-EGFR (Linnekamp et al. 2015).

#### 1.2.3.2.3

#### Les inhibiteurs multikinase

Le regorafenib est un inhibiteur des protéines kinase angiogéniques, stromales et oncogènes. Cette molécule est utilisée dans le traitement du cancer colorectal métastatique ayant échoué au traitement FOLFOX. Dabrafenib et vemurafenib sont utilisés dans le cas de mutation spécifique du proto-oncogène BRAF (Krishnamoorthy et al. 2015).

Malgré les nombreuses molécules pouvant intervenir dans la thérapie ciblée du cancer colorectal, le succès thérapeutique reste limité, et le temps de survie des patients atteints d'un cancer colorectal est très court. Les métastases représentent la cause principale de l'échec thérapeutique, de la morbidité et de la mortalité. L'invasion cellulaire est une étape-clé pour la formation de foyers cancéreux secondaires. En effet, la circulation des cellules cancéreuses à travers le système lymphatique ou la circulation sanguine permet la croissance tumorale à distance du site initiale principalement au niveau des poumons, du foie et du péritoine. L'invasion cellulaire est fortement liée à la dynamique des structures du cytosquelette (Sun et al. 2015) et les microtubules sont donc indispensables à la migration des cellules cancéreuses et donc à la formation des métastases. Par là, les microtubules représentent une cible thérapeutique-clé pour le traitement du cancer.

## 1.3. Le cycle cellulaire

Une pléthore d'études montre que le cycle cellulaire se trouve au cœur du cancer. Le cycle cellulaire est un processus crucial contrôlant la division cellulaire. Par ailleurs les microtubules sont essentiels pour la progression du cycle cellulaire. Tout dysfonctionnement du cycle cellulaire contribue à l'oncogenèse (Malumbres and Barbacid 2001).

### 1.3.1. Les kinases cyclines-dépendantes régulent le cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est divisé en quatre phases G1, S, G2 et M (**Figure 3**). Chaque phase étant séparée par des points de contrôles, le cycle cellulaire est régulé par des protéines de la famille des « Cycline Dependent Kinases » (CDK) (Malumbres and Barbacid 2005). Lorsqu'elles ne se divisent pas, les cellules sont dites quiescentes et stagnent en phase G0 où elles peuvent quitter le cycle cellulaire pour se différencier. Au cours de la phase G1, les CDK 2, 4, et 6 se lient à la cycline D, et conduisent la progression de la phase de quiescence G0 en G1. Les cellules se préparent à la synthèse d'ADN. L'activation des complexes cycline D/CDK 2, 4, 6 induit l'inhibition partielle des protéines poches « Retinoblastoma protein » (Rb), « Retinoblastoma like protein » Rbl 1, et Rbl 2. Ainsi les cyclines E1 et 2 s'expriment et activent la CDK 2 en se liant. Le complexe cycline E1/CDK 2 complète la phosphorylation des protéines Rb, Rbl 1 et Rbl 2 induisant l'inactivation de ces protéines (Harbour et al. 1999). L'inactivation des protéines Rb conduit à la libération du facteur de transcription « Elongation-2 Factor » (E2F). Ce dernier active de nombreux gènes spécifiques à la phase S et donc nécessaires à la réplication de l'ADN et au déroulement de la phase S. Le complexe cycline A/CDK 2 est activé et permet la progression de la phase S et la transition en mitose, en phase G2. La dégradation de la cycline A conduit à l'activation du complexe cycline B1/CDK 1 et de la phosphatase Cdc25C, ensemble ils régulent la progression de la phase G2 à la phase M (Malumbres and Barbacid 2009). La kinase CDK 1 est indispensable et suffisante à elle seule pour la progression du cycle cellulaire (Santamaria et al. 2007).

### **1.3.2. L'expression des cyclines au cours du cycle cellulaire**

Le cycle cellulaire est soigneusement régulé par une série d'événements orchestrée par les différentes cyclines et CDK. Les cyclines sont les protéines clés de la progression du cycle cellulaire, l'expression des cyclines varie selon le stade du cycle cellulaire. En effet, la cycline B1 se lie à CDK 1 pour former le facteur de promotion de la mitose, elle est essentielle pour le passage de la phase G2 à la mitose. La cycline B1 commence à s'accumuler dès la sortie de la phase S, elle atteint son pic maximal lorsque la cellule entre en mitose, et elle se dégrade à la transition vers l'anaphase. La cycline A s'associe à la CDK 2 afin de permettre à la cellule de traverser les phases S et G2. L'accumulation cellulaire de la cycline A commence au milieu de la phase S, et atteint son maximale à la fin de la phase S, la protéine est dégradée en pro-métaphase. La cycline E se lie à la CDK 2 pour former un complexe essentiel pour l'entrée de la cellule en phase S. La cycline E commence à s'accumuler au milieu de la phase G1, son pic maximal apparaît au moment de l'entrée en phase S, suivie de sa dégradation progressive au cours de la phase S. La cycline D est exprimée au maximum après la stimulation mitogène des cellules en phase de quiescence G0 pour favoriser l'entrée de la cellule dans le cycle cellulaire. Le niveau de la cycline D diminue au cours de la croissance exponentielle des cellules (Darzynkiewicz et al. 1996).

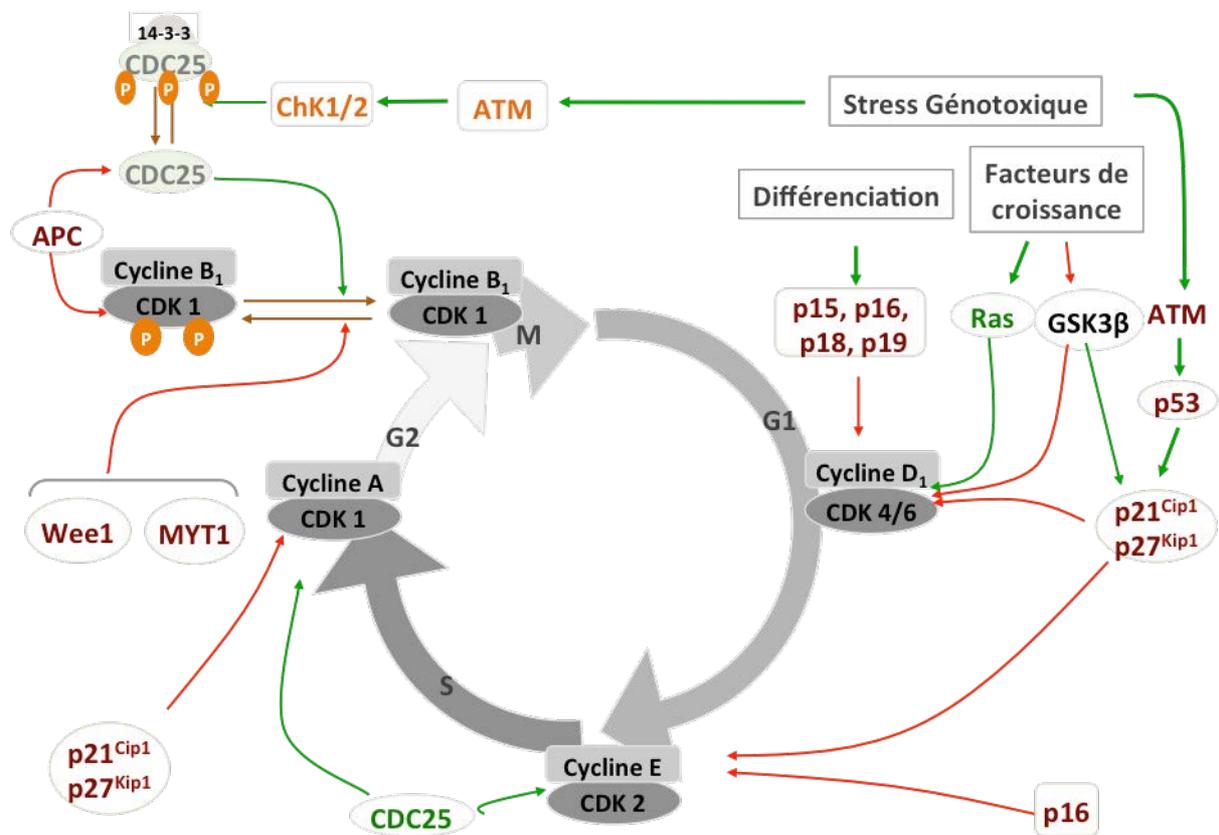


Figure 3 : Vue générale des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire. APC : anaphase-promoting complexe ; ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated protein ; Cdc25 : cell division control 25 ; CDK : Cyclin-Dependent Kinase ; Chk1/2 : Checkpoint kinase 1/2 ; GSK3β : Glycogen synthase kinase 3 β ; MYT1 : Myelin transcription factor-1 like. Figure réalisée avec ScienceSlides.

### **1.3.3. Les inhibiteurs des kinases cyclines-dépendantes**

L'activité des CDK est régulée par deux familles d'inhibiteurs. D'une part, la famille des protéines « Inhibitors of CDK 4 » (INK4) est composée de p15Ink4b, p16Ink4a, p18Ink4c et p19Ink4d. Elle interfère avec les monomères de CDK 4 ou 6 et bloque la fixation de la cycline D sur les CDK 4 ou CDK 6 et la progression en G1. D'autre part, la famille « Kinase Inhibitor Protein » (KIP), comprend p21cip1, p27kip1 et p57kip2. Ces protéines inactivent les complexes cycline-CDK en les fixant (Malumbres and Barbacid 2005). p21cip1, p27kip1 sont principalement des inhibiteurs du complexe cycline E/CDK 2, elles permettent ainsi la formation des complexes cycline D/CDK 4, tout en retardant l'activation des complexes cycline E/CDK 2 (Carlson et al. 2008). A la fin de la phase G1, cycline E/CDK 2 phosphoryle p27KIP1 et conduit ainsi à son ubiquitinylation par « S-phase kinase-associated protein 1/2 » (Skp1/2) et à sa destruction par le protéasome. L'élimination de p27 assure donc l'entrée en phase S.

### **1.3.4. La dérégulation du cycle cellulaire dans le cancer**

Malgré les contrôles limitant l'incorporation de dommage liés à l'ADN dans le cycle cellulaire, de nombreuses mutations vont toucher les complexes CDK-cycline afin de favoriser une prolifération cellulaire continue des cellules cancéreuses. L'altération de nombreuses protéines du cycle cellulaire ont été observées dans différents types de cancers. L'hyperactivation des CDK 4 (Schmidt et al. 1994, Wolfel et al. 1995), CDK 6 et CDK 2 (Scaltriti et al. 2011, Etemadmoghadam et al. 2013) la surexpression des gènes de la cycline D, (Beroukhim et al. 2010), E (Alexander et al. 2017) et des kinases Aurora (Yan et al. 2016) et « polo-like kinase » (Plk) (Weiss and Efferth 2012) sont parmi les plus fréquemment rencontrées. Les inhibiteurs des CDK jouent un rôle essentiel dans la restauration des altérations liées au cycle cellulaire faisant d'eux d'idéals candidats thérapeutiques. Parmi les premiers pan-inhibiteurs se trouvent : flavopiridol, roscovitine, dinaciclib, PD-0332991, SNS-032 et LY-2835219 (Asghar et al. 2015). Des inhibiteurs spécifiques des CDK ont été aussi développés tels que : dinaciclib AT5719, R547, et AZD5438 (Asghar et al. 2015). Le flavopiridol est le plus investigué dans le domaine avec de nombreux essais cliniques. Malheureusement cet inhibiteur est caractérisé par le manque de spécificité et l'absence de biomarqueurs sélectifs limite son succès en clinique. Ainsi, le développement des inhibiteurs

spécifiques des CDK 4 et CDK 6 tels que palbociclib, ribociclib et abemaciclib ont permis de surmonter ces problèmes, en revanche le mécanisme d'action reste mal connu et ces traitements ne peuvent être utilisés en combinaison avec la chimiothérapie ou la radiothérapie qui requière des cellules en division.

## **1.4. Les microtubules**

Les microtubules jouent un rôle essentiel dans l'intégrité cellulaire, le transport intracellulaire, la ségrégation des chromosomes et la mitose. Les microtubules sont des structures cylindriques, filamenteuses et creuses, essentielles dans les cellules eucaryotes. Ils jouent un rôle structural et constitutif dans la formation du cytosquelette et du fuseau mitotique lors de la mitose (Nogales 2000). Ils sont composés d'un assemblage de 13 protofilaments qui sont des dimères de tubuline  $\alpha$  et  $\beta$ . Arrangées en tête de queue, les sous unités  $\alpha$  et  $\beta$  de la tubuline confèrent une polarité intrinsèque au microtubule. La tubuline  $\alpha$  se trouve à l'extrémité négative et la tubuline  $\beta$  se trouve à l'extrémité positive (Walker et al. 1988). Bien que ces deux sous-unités soient issues de gènes différents ( $\alpha$  et  $\beta$ ), elles présentent de grandes similarités structurales. Toutes les deux sont composées d'un feuillet central  $\beta$  entouré par des hélices  $\alpha$  (Nogales 2000). Chaque monomère de tubuline est constitué d'une extrémité carboxyle-terminale (C-term), d'un domaine intermédiaire et d'une extrémité-amino-terminale (N-term) possédant un site de fixation pour la GTP. La fixation de la GTP à la tubuline  $\alpha$  est irréversible, elle se situe sur le site N-term, emprisonnée entre les deux monomères et elle n'est jamais hydrolysée. Cependant lors de la formation des protofilaments, la GTP qui se fixe sur le site échangeable dit -E de la tubuline  $\beta$  s'hydrolyse en GDP grâce à sa propre GTPase activante (Erickson and O'Brien 1992). L'énergie générée par l'hydrolyse de la GTP est essentielle pour la dynamique des microtubules. Ainsi l'énergie produite sera convertie en une mécanique.

### **1.4.1. Formation des microtubules**

La formation des microtubules repose sur deux étapes :  
Premièrement, de multiples hétérodimères de tubuline  $\alpha/\beta$  s'unissent pour former un noyau à partir duquel les microtubules peuvent s'allonger, il s'agit de la nucléation. Ce noyau est appelé centre organisateur des microtubules et renferme le centrosome, composé d'une paire

de centrioles centrale entourée du matériel péricentriolaire (Brinkley 1985). La tubuline  $\gamma$  est présente à la surface du centrosome sous forme d'anneau et agit comme une matrice pour initier l'assemblage ordonné des tubulines  $\alpha$  et  $\beta$  (**Figure 4**).

Deuxièmement, l'élongation repose sur l'assemblage des microtubules pour former des protofilaments à partir des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  de la tubuline. Les 13 protofilaments forment le cylindre des microtubules qui s'allonge par addition des sous-unités supplémentaires aux extrémités accompagnées de l'hydrolyse de la GTP de la tubuline  $\beta$  en GDP (Erickson and O'Brien 1992).

Enfin, les microtubules ne sont pas des polymères stables, ils présentent une dynamique complexe qui repose sur la polymérisation et la dépolymérisation de chaque extrémité (Desai and Mitchison 1997). La dynamique des microtubules présente deux sortes d'instabilité, la plus fréquente correspond à une différence au niveau des extrémités, l'extrémité « plus » (+) s'allonge et se raccourcit plus rapidement que l'extrémité « moins » (-). Le second type de dynamique consiste à l'addition d'un dimère de tubuline à l'extrémité (+) du microtubule pendant que des dimères sont éliminés à l'extrémité (-) (Mandelkow and Mandelkow 1995, Margolis and Wilson 1998).

La dynamique des microtubules est influencée par différentes protéines. Il existe deux types de protéines. D'une part les protéines stabilisantes des microtubules dites « Microtubule-Associated Proteins » (MAP) limitent les catastrophes, favorisent la croissance et décroissance de la vitesse de raccourcissement. Ces protéines sont MAP1, MAP2, MAP4, tau et « doublecortin » (DCX). MAP4 est la protéine ubiquitaire la plus abondante, elle est présente dans les cellules non-neuronales qui stabilise les microtubules. La protéine tau est une principale protéine stabilisante, capable d'antagoniser l'activité déstabilisante de la protéine « Xenopus Kinesin Catastrophe Modulator-1 » (XKCM1). D'autre part, les protéines déstabilisantes sont les protéines dépolymérase de la famille de la Kinésine (Mandelkow and Mandelkow 1995).

### **1.4.2. La tubuline**

L'assemblage des microtubules est essentiellement motivé par l'association spontanée longitudinale et latérale des hétérodimères tubuline  $\alpha/\beta$  qui interagissent avec de nombreuses protéines associées aux microtubules (PAM) pour exercer diverses fonctions cellulaires, y compris le transport intracellulaire et la division cellulaire. La tubuline est parmi

les gènes les plus conservés tout au long de l'évolution chez les eucaryotes. Le clonage des premiers gènes de tubuline a permis d'identifier l'existence de nombreux gènes codant pour la tubuline  $\alpha$  ou  $\beta$  (Sirajuddin et al. 2014). Chez l'homme, on compte au moins 9 gènes codant la sous-unité  $\alpha$  et 9 gènes codant la sous-unité  $\beta$  (**Tableau II**). Les isotypes de la tubuline partagent un degré d'homologie élevé (95 % et 97 % d'identité parmi les gènes de tubuline  $\alpha$  et  $\beta$ , respectivement) des acides aminés du noyau structurel (environ 400), ils se distinguent essentiellement par les 15 derniers résidus des queues carboxy-terminales (QCT) uniques (Janke 2014). Les isotypes de tubuline  $\beta$  ont les QCT les plus diverses et l'expression de ces isotypes diffère selon le type cellulaire ou tissulaire. Par exemple, la tubuline  $\beta$ II (TUBB2A/B) est abondante dans les cellules cérébrales et épithéliales (Banerjee et al. 1988), la tubuline  $\beta$ III (TUBB3) dans des cellules neuronales spécifiques (Burgoyne et al. 1988), la tubuline  $\beta$ IV (TUBB4) dans des structures ciliaires et flagellaires (Raff et al. 1997) et la tubuline  $\beta$ VI (TUBB1) dans les plaquettes et les cellules hématopoïétiques (Leandro-Garcia et al. 2012). En plus des variations génétiques, la tubuline est soumise à de nombreuses modifications post-transcriptionnelles (MPT) telles que l'acétylation, la phosphorylation, la détyrosination/tyrosination, la polyglutamylation, la polyglycylation et la modification des résidus thiols.

- L'acétylation de la tubuline a été découverte chez *Chlamydomonas reinhardtii*, sur la lysine 40 (K40) de la tubuline  $\alpha$  de la face intérieure du microtubule (L'Hernault and Rosenbaum 1985). Les enzymes impliquées dans l'acétylation de la tubuline sont « Histone Deacetylase family member 6 » (HDAC6) et « Sirtuin type 2 » (SIRT2). Le rôle fonctionnel direct de l'acétylation de la tubuline reste méconnu.
- Par ailleurs, la majorité des QCT de la tubuline  $\alpha$  présente un résidu tyrosine qui peut subir une détyrosination *via* un cycle régulé dans lequel il est clivé à l'état polymère par une carboxy-peptidase inconnue pour produire la « Glu-tubuline » (ou tubuline détyrosinée) puis ajouté par la « Tubulin Tyrosine Ligase » (TTL). La présence ou l'absence de la tyrosine C-terminale a été impliquée dans la régulation des protéines motrices et le domaine « Cytoskeleton-Associated Protein-Glycine-rich » (CAP-Gly) contenant des protéines de liaison à l'extrémité supérieure des microtubules (Sirajuddin et al. 2014).
- La glutamylation est une autre MPT de tubuline bien connue qui consiste à l'addition de résidus de glutamate sur la chaîne latérale  $\gamma$ -carboxyle. Cette modification a été découverte pour la première fois sur la QCT de la tubuline  $\alpha$  et  $\beta$  du cerveau. Les

enzymes de la famille TLL catalysent la polyglutamylolation. La polyglutamylolation est abondante dans les neurones et les structures axonémiques. Le nombre de résidus de glutamate attachés en tant que branches varie de 1 à 6 dans les cellules neuronales et peut être plus élevé dans les structures ciliaires et flagellaires. La polyglutamylolation a été démontrée pour améliorer l'activité de la spastine, la katanine et des PAM dans la séparation des microtubules, en revanche leur contribution aux moteurs moléculaires reste inconnue.

- La polyglycylation ou la glycylation de la tubuline, comme la polyglutamylolation, génère des chaînes latérales de résidus de glycine dans les QCT de la tubuline  $\alpha$  et  $\beta$ . Les sites de modification de la glycylation sont considérés comme étant principalement les mêmes que pour la glutamylolation et, en effet, les MPT se sont avérés être interdépendants dans la cellule (Janke 2014).
- La tubuline  $\alpha$  et la tubuline  $\beta$  contiennent respectivement 12 et 8 résidus cystéines très réactifs, chacun de ces résidus peut être oxydé par des agents oxydants endogènes ou exogènes, rendant ainsi les tubulines extrêmement sensibles au stress oxydatif (Luduena 2013). L'oxydation des groupements thiols de la cystéine peut altérer la fonction de la tubuline en induisant la glutathionylation, la nitrosylation et la formation de liaisons dissulfure (Wilson and Gonzalez-Billault 2015). En effet, ces résidus cystéine sont impliqués dans la liaison au GTP, la polymérisation des microtubules et la réponse aux médicaments (Luduena and Roach 1991). En effet, l'oxydation des groupes cystéine sulfhydryle peut engendrer la réticulation entre la tubuline  $\alpha$  et  $\beta$  par la formation des ponts disulfure, empêchant ainsi l'assemblage des microtubules. En présence d'oxyde nitrique ou de donneur de nitroxyl et de monomères de tubulines, les groupements thiols de la tubuline sont oxydés, réduisant ainsi la polymérisation des microtubules *in vitro* (Landino et al. 2007).

Tableau II : Liste des gènes de la tubuline

|   |                           | <b>Nom du gène</b> |
|---|---------------------------|--------------------|
| <b>Isotypes de tubuline <math>\alpha</math></b> | Tubuline $\alpha$ 1A      | TUBA1A             |
|   | Tubuline $\alpha$ 1B      | TUBA1B             |
|   | Tubuline $\alpha$ 1C      | TUBA1C             |
|   | Tubuline $\alpha$ 3C      | TUBA3C             |
|   | Tubuline $\alpha$ 3E      | TUBA3E             |
|   | Tubuline $\alpha$ 4A      | TUBA4A             |
|   | Tubuline $\alpha$ 8       | TUBA8              |
|   | Tubuline $\alpha$ -like-3 | TUBAL3             |
| <b>Isotypes de tubuline <math>\beta</math></b>  | Tubuline $\beta$ I        | TUBB               |
|   | Tubuline $\beta$ II       | TUBB2A<br>TUBB2B   |
|   | Tubuline $\beta$ III      | TUBB3              |
|   | Tubuline $\beta$ IVa      | TUBB4              |
|   | Tubuline $\beta$ IVb      | TUBB2C             |
|   | Tubuline $\beta$ V        | TUBB6              |
|   | Tubuline $\beta$ VI       | TUBB1              |

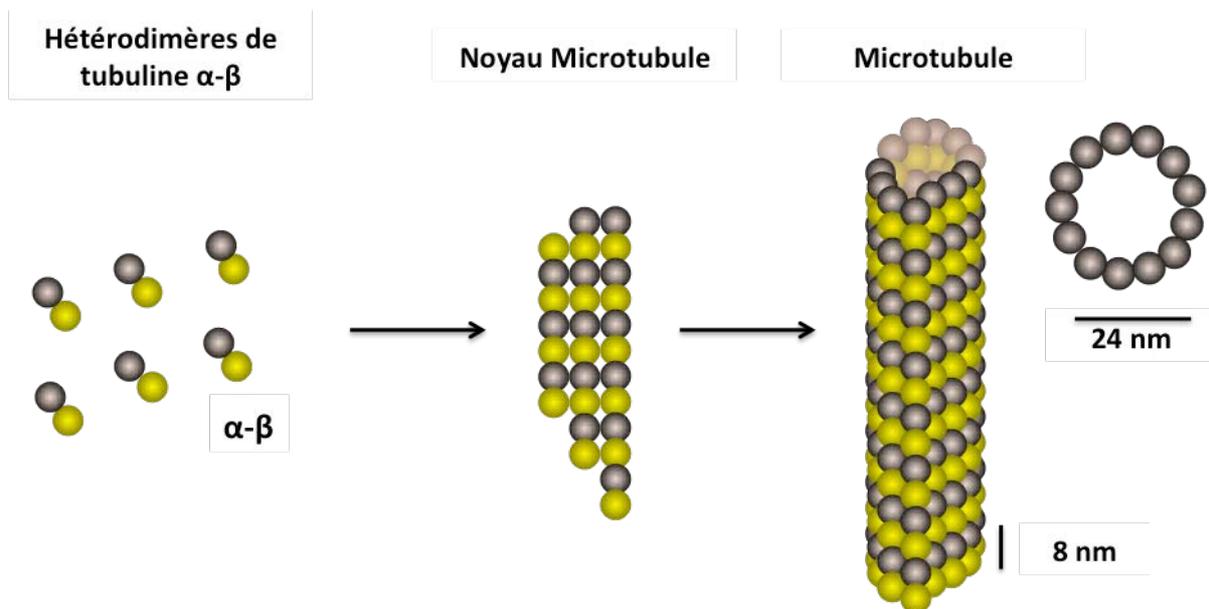


Figure 4 : Polymérisation des microtubules.

La polymérisation débute par la formation d'hétérodimères  $\alpha$ - $\beta$  formant le noyau du microtubule. Cette étape de nucléation est suivie de l'élongation du microtubule sur les deux extrémités (+ et -) par l'ajout de monomère  $\alpha$ - $\beta$  de la tubuline. Le microtubule formé est cylindrique et composé de 13 protofilaments. La figure est réalisée avec ScienceSlides selon (Jordan and Wilson 2004).

### **1.4.3. Rôle des microtubules pendant la mitose**

De nombreuses études ont démontré l'importance des microtubules dans la dynamique des fuseaux mitotiques. Par exemple, au cours de l'interphase, les microtubules échangent leurs filaments de tubulines très lentement, avec une demi-vie allant de quelques minutes à quelques heures. Au cours de la mitose, le réseau microtubulaire est remplacé par un fuseau mitotique plus dynamique que les microtubules constituant le cytosquelette de l'interphase (Rusan et al. 2001). La mitose est un processus rapide qui nécessite la dynamique des microtubules à chaque étape :

En pro-métaphase, l'enveloppe nucléaire se fragmente et les chromatides-sœurs se condensent au niveau du centromère. Le centrosome contient deux centrioles qui se divisent en deux et chacun des deux centrioles migre vers un pôle opposé de la cellule à partir desquels les microtubules se projettent vers le centre de la cellule pour former le fuseau mitotique. Par des phénomènes de polymérisation et dépolymérisation, les microtubules explorent le cytoplasme et se fixent aux chromatides au niveau des kinétochores (Hayden et al. 1990).

L'entrée en mitose nécessite la phosphorylation de l'histone 3 (H3) pour induire la condensation de l'ADN en prophase (Wei et al. 1999).

Au cours de la métaphase, l'expression de la cycline B1 augmente (Clute and Pines 1999). En métaphase, les chromosomes sont positionnés le long de la zone équatoriale de la cellule grâce aux microtubules.

La transition en anaphase nécessite la dégradation de la cycline B1 (Chang et al. 2003). En anaphase, les chromosomes dupliqués sont séparés et migrent en sens opposé vers les pôles pour former les futures cellules-filles.

En télophase, les chromosomes ont atteint les pôles et l'enveloppe nucléaire se reforme autour des nouveaux noyaux de chaque moitié de la cellule. Enfin, la cellule se divise. Les chromosomes ont atteint les pôles et les microtubules constituent l'enveloppe nucléaire

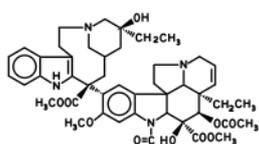
Etant donné le rôle des microtubules au cours de la mitose, ces derniers sont devenus de véritables cibles thérapeutiques pour le traitement du cancer.

#### 1.4.4. Les poisons du fuseau

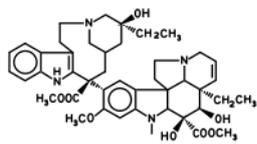
De part ses propriétés évoquées précédemment, les microtubules sont considérés comme des cibles idéales pour la thérapie anticancéreuse. D'origine naturelle, les poisons du fuseau sont des médicaments anticancéreux qui se fixent sur la tubuline des microtubules et qui perturbent la fonction du fuseau mitotique essentielle à la division cellulaire. Ils inhibent ainsi la prolifération cellulaire en agissant sur la dynamique des microtubules conduisant au blocage de la progression des cellules de la métaphase à l'anaphase et induisant la mort cellulaire apoptotique. Chaque poison du fuseau a un effet spécifique complexe sur la masse, la dynamique et la stabilité des microtubules. Les poisons du fuseau se distinguent selon le site de fixation sur la tubuline, en effet, il existe trois sites de fixation sur la tubuline : le site du taxol, le site des *Vinca*-alcaloïdes et le site de la colchicine. Bien que simpliste, les poisons du fuseau sont répartis en deux familles principales : les agents stabilisants de la famille des taxanes qui stimulent la polymérisation et les agents déstabilisants de la famille des *Vinca*-alcaloïdes et de la colchicine qui inhibent la polymérisation (**Figure 5**). Pour illustrer nos propos, les mécanismes d'action des principales classes sont décrits ci-dessous. Par ailleurs, les poisons du fuseau sont indiqués dans le traitement d'une grande variété de cancers, en revanche ils sont limités par l'apparition de mécanismes de résistance et de toxicité.

a)

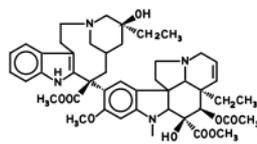
**Vincristine**  
Oncovin™



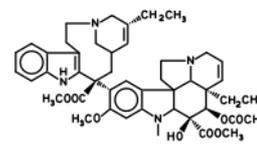
**Vindésine**  
Eldisine™



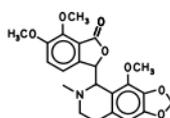
**Vinblastine**  
Velbe™



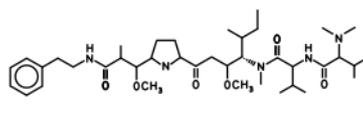
**Vinorelbine**  
Navelbine™



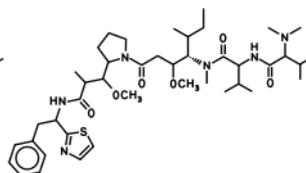
**Noscapine**  
Tussisédal®



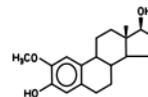
**Auristatine**



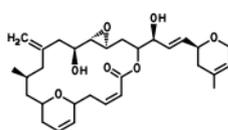
**Dolastatine 10**



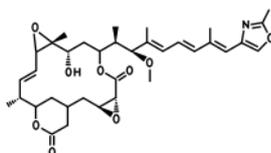
**2-Méthoxyestradiol**  
Panzem®



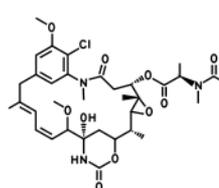
**Laulimalide**



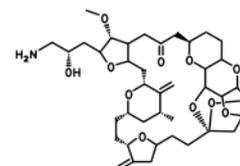
**Rhizoxine**



**Maytansine**

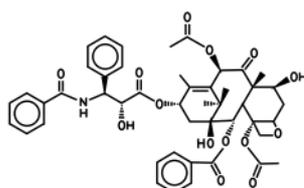


**Eribuline**

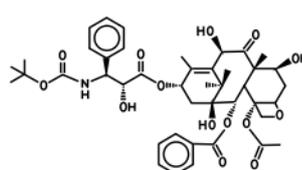


b)

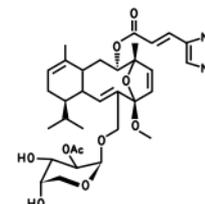
**Paclitaxel**  
Taxol®



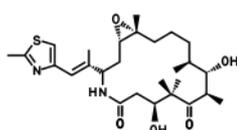
**Docétaxel**  
Taxotere®



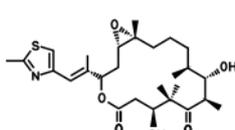
**Eleuthérobine**



**Ixabépilone**  
Ixempra®



**Epothilone B**  
Patupilone



**Epothilone D**  
KOS-862

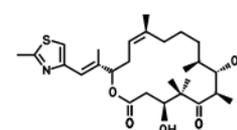


Figure 5 : Structures chimiques des poisons du fuseau : a) les inhibiteurs de la polymérisation. b) les promoteurs de la polymérisation. Figure réalisée avec ScienceSlides.

#### 1.4.4.1 Les agents déstabilisants les microtubules

Introduits en clinique à la fin des années 50, les premiers agents de la famille des *Vinca*-alcaloïdes sont la vinblastine et la vincristine extraites de la Pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus*). Ces agents étaient premièrement utilisés dans le traitement des leucémies et tumeurs solides de l'enfant. Leurs succès thérapeutiques chez l'enfant et l'adulte ont favorisé le développement d'analogues semi-synthétiques tels que la vindésine, la vinorelbine et la vinflunine (Chen et al. 2010). Le domaine *Vinca* se trouve sur la tubuline  $\beta$  et est la principale cible des agents de la famille *Vinca*-alcaloïdes. Ces agents agissent par interaction avec la sous-unité  $\beta$  de la tubuline proche du site de liaison à la GTP. Ainsi, ils altèrent la conformation des dimères de tubuline, inhibent l'hydrolyse de la GTP et l'échange GDP-GTP. A faible concentration, ces agents se lient à l'extrémité (+) des microtubules et réduisent la dynamique des microtubules conduisant à l'arrêt mitotique en prométaphase. A forte concentration, les *Vinca*-alcaloïdes ont une affinité pour les hétérodimères de tubulines libres qui peuvent induire la formation de paracristaux de tubuline (agrégats de cristallin composés de tubuline et molécule *Vinca*-alcaloïdes) (Jordan and Wilson 2004, Stanton et al. 2011). Ces composés sont limités par les effets secondaires tels que : les neuropathies périphériques et la myéлоdépression. Les neuropathies pourraient résulter de l'inhibition du transport axonal, due à l'absence ou à l'altération de la dynamique des microtubules, essentielle à la réponse des neurones aux signaux entrant.

#### 1.4.4.2 Les agents stabilisants les microtubules

Le paclitaxel et son analogue semi-synthétique docétaxel ont rejoint l'arsenal des agents anticancéreux en 1995. Extrait de l'écorce d'if en 1967 par Wall et Wani, le paclitaxel stimule la polymérisation des microtubules. Le paclitaxel est utilisé dans le traitement du cancer du sein, de l'ovaire, du poumon et le sarcome de Kaposi. Le paclitaxel se lie à la tubuline  $\beta$  sur la face interne (lumen) du microtubule, cette fixation stabilise le microtubule et augmente l'affinité des tubulines entre elles accélérant ainsi sa polymérisation (Morris and Fornier 2008). Chaque molécule de tubuline possède un site de fixation au paclitaxel avec une stoechiométrie d'une mole de taxol pour une mole de tubuline. La suppression de la dynamique des microtubules par le paclitaxel conduit, comme les agents de la famille des *Vinca*-alcaloïdes, à un arrêt en prométaphase empêchant ainsi la transition métaphase/télophase (Yvon et al. 1999). Malgré le succès thérapeutique du paclitaxel, ce

dernier est limité par l'apparition de résistance due à son incapacité de se lier à la tubuline et d'effets secondaires nécessitant la découverte de nouveaux composés stabilisant les microtubules tels que l'épothilone B, la discordermolide, la sarcodictyine A, l'éleuthérobine et le laulimalide (Bollag et al. 1995, Nicolaou et al. 2009, de Lemos et al. 2011). L'épothilone B et le paclitaxel se fixent sur le même domaine de liaison, en revanche l'épothilone B a une affinité plus élevée pour ce domaine de liaison. L'épothilone B est un inhibiteur compétitif de la liaison du paclitaxel à la tubuline, ainsi les cellules du cancer ovarien résistantes au paclitaxel ont montré une sensibilité accrue à l'épothilone B (Kowalski et al. 1997). De même que les agents de la famille des *Vinca*-alcaloïdes, ses principaux effets secondaires sont la neuropathie périphérique et la myéлоdépression. Nous développerons ci-dessous les mécanismes de résistance liés aux poisons du fuseau.

### **1.4.4.3 Mécanismes de résistance liés aux poisons du fuseau**

#### 1.4.4.3.1 Les isotypes tubuline $\beta$

La modification du profil d'expression des isotypes de tubulines a été observée dans plusieurs types de cancers. La majorité des études ont porté sur la tubuline  $\beta$ , en grande partie en raison de la spécificité des agents de liaison à la tubuline pour les protéines de la tubuline  $\beta$ . L'expression élevée de plusieurs isotypes de tubuline, à savoir  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\beta$ III,  $\beta$ IVa et  $\beta$ V, est souvent liée à un pronostic médical médiocre dû à la chimiorésistance des patients dans de nombreux cancers. Par exemple, dans le cancer du sein, l'augmentation de l'expression des ARNm de la tubuline  $\beta$ I et  $\beta$ III a été associée à la résistance au docétaxel (Hasegawa et al. 2003) et paclitaxel (Paradiso et al. 2005). Dans le cancer ovarien, une forte expression de la tubuline  $\beta$ III (Roque et al. 2014) et  $\beta$ IV (Kavallaris et al. 1997) est aussi associée à une résistance au taxol. L'expression aberrante de la tubuline  $\beta$ III a été largement caractérisée dans ce contexte car de nombreuses études soulèvent son implication dans la résistance aux taxanes et aux *Vinca*-alcaloïdes dans plusieurs types de tumeurs tels que les cancers du poumon, du sein, de l'ovaire et gastrique (Mozzetti et al. 2005, Urano et al. 2006, Tommasi et al. 2007, Powell et al. 2014). Les études portant sur la surexpression d'autres isotypes de la tubuline  $\beta$  ont donné des résultats contradictoires. Bien que dans l'adénocarcinome des cellules claires d'ovaires, la surexpression de la tubuline  $\beta$ III semble prédire une bonne réponse à la chimiothérapie à base de taxane (Aoki et al. 2009). L'expression et

l'incorporation de différents isotopes de tubuline dans le réseau microtubulaire peuvent avoir deux fonctions principales : (i) soit la structure du noyau hautement conservée de la protéine - tubuline  $\alpha$  ou  $\beta$  est légèrement modifiée, ce qui affecte l'assemblage, la dynamique et les propriétés mécaniques des microtubules, (ii) soit la région flexible, en particulier la queue C-terminale qui se trouve à la surface des microtubules, varie en raison des MPT, et affecte ainsi les interactions des microtubules avec les PAM. Ainsi, l'altération du profil d'expression des isotopes de tubulines dans les cellules cancéreuses peut influencer la dynamique du réseau microtubulaire et la sensibilité des microtubules aux agents de chimiothérapie liés à la tubuline. Les différentes propriétés dynamiques des isotopes de la tubuline  $\beta$  ainsi que les différentes conformations des domaines de liaison des microtubules (Feyen et al. 2008, Matesanz et al. 2008) peuvent altérer la sensibilité des microtubules à ces agents et expliquer ainsi la résistance de certains types de cancers à ces composés. Pour ce faire, l'analyse *in vitro* de certains microtubules riches en isotype  $\beta$ III de la tubuline ont révélé être plus dynamiques que les isotopes  $\beta$ II ou  $\beta$ IV qui sont plus stables (Panda et al. 1994). De cette manière, la présence de la tubuline  $\beta$ III favoriserait la dynamique des microtubules même en présence de poisons du fuseau, responsable donc de la résistance contre ces agents. De même, les PAM peuvent influencer la dynamique des microtubules en fonction de l'isotype de la tubuline. Ainsi, l'assemblage des microtubules est inhibé et se déroule plus rapidement en présence de la tubuline  $\beta$ III par rapport à d'autres isotopes (Lu and Luduena 1993). Par ailleurs, plusieurs études ont montré que la tubuline  $\beta$ III peut être impliquée dans la signalisation d'oncogènes afin de favoriser la progression tumorale. En effet, l'expression de KRAS et de son homologue EGFR seraient corrélées à l'hyperexpression de l'isotype  $\beta$ III dans le cancer du poumon (Levallet et al. 2012). Dans le cancer de la prostate, l'isotype  $\beta$ III est associé à la délétion de l'oncogène PTEN, responsable de la différenciation tumorale. Ainsi, l'isotype  $\beta$ III serait important dans le pronostic médical du cancer de la prostate (Levallet et al. 2012). Dans le cancer du côlon, la suppression des oncogènes AKT et ERK réduiraient l'expression de l'isotype  $\beta$ III, suggérant ainsi sa régulation (Xiao et al. 2016). De plus, de nombreuses études ont accordé un rôle pour les protéines de tubulines dans la progression métastatique du cancer. Le niveau d'expression des isotopes de tubuline est considéré comme potentiels marqueur pronostique dans les tumeurs primaires. La tubuline  $\beta$ III est particulièrement corrélée au comportement clinique agressif et aux résultats médiocres dans de nombreuses formes de cancer y compris le sein (Kanojia et al. 2015), l'ovaire (Roque et al. 2014), l'estomac (Hwang et al. 2013), le glioblastome (Katsetos et al. 2007), la prostate (Egevad et

al. 2010), le côlon (Zhao et al. 2016), le pancréas (McCarroll et al. 2015) et le poumon (Reiman et al. 2012).

#### 1.4.4.3.2 Les protéines associées aux microtubules

Les microtubules sont des structures très dynamiques et cette dynamique est étroitement contrôlée par une variété de protéines associées aux microtubules qui stimulent ou inhibent leur polymérisation. Par conséquent, l'expression aberrante de PAM pourrait avoir une incidence sur la sensibilité des agents altérants les microtubules. En effet, l'expression élevée de la protéine Tau est associée à la résistance des cellules cancéreuses du sein au paclitaxel étant donné que l'inhibition de la protéine Tau les sensibilisent au paclitaxel (Rouzier et al. 2005). De même, la protéine Tau semble avoir un rôle pronostique et prédictif dans le cancer épithélial de l'ovaire traité par le platineum et le paclitaxel (Smoter et al. 2013). La protéine MAP2 est fortement exprimée dans le cancer du pancréas, sa protéolyse par la cathépsine D semble augmenter l'altération des microtubules et l'activité anti-tumorale du docétaxel (Veitia et al. 2000). De plus, l'altération de l'expression de la protéine MAP4 qui joue un rôle stabilisant a aussi été associée à la modulation de la sensibilité des cellules cancéreuses aux agents altérant les microtubules (Zhang et al. 1998).

#### 1.4.4.3.3 Les glycoprotéines P

Les glycoprotéines-P (GPP) sont des pompes à efflux membranaires de la famille des transporteurs « ATP-Binding Cassette » (ABC). En 1976, la présence des GPP est associée à une réduction de la sensibilité des cellules tumorales aux agents anticancéreux (Juliano and Ling 1976). La surexpression de la GPP dans le cancer est soit un processus physiologique soit un processus acquis par la présence des agents anticancéreux. Les GPP confèrent une résistance en réduisant la concentration intracellulaire des agents anticancéreux dans la cellule cancéreuse, évitant ainsi leurs effets cytotoxiques. En effet, les GPP agissent en tant que pompes ATPases, permettant d'expulser l'agent anticancéreux à travers la membrane plasmique contre les gradients de concentration grâce à l'énergie fournie par l'ATP (Fojo and Bates 2003). Les GPP sont ainsi responsables du phénotype dit « Multidrug Resistance » (MDR) facteur majeur limitant l'efficacité de la plupart des agents ciblant les microtubules (Gottesman 2002). Par conséquent, les nouveaux agents ciblant les microtubules impliquent

la capacité à contourner ce mécanisme de résistance commun. Ainsi de nombreux inhibiteurs de GPP tels que le verapamil et la cyclosporine A ont révélé inverser le phénotype MDR (Amin 2013).

#### 1.4.4.3.4 Les poisons du fuseau et le cancer du côlon

En clinique, les agents ciblant les microtubules sont utilisés dans le traitement de divers cancers solides tels que le sein, l'ovaire et la prostate. Ces molécules ne sont pas utilisées dans le traitement du cancer du côlon. Les essais cliniques de phase I/II n'ont pas pu aboutir à des résultats bénéfiques à la suite d'un traitement comprenant les taxanes tels que paclitaxel et docétaxel. En effet, ces molécules ont montré une activité anti-tumorale minimale dans le traitement du cancer colorectal (Pazdur et al. 1994, Seibel et al. 1999). La question sur l'explication de la résistance n'est pas clairement abordée dans la littérature. En revanche, certaines études portant sur le rôle des principaux régulateurs du point de contrôle du fuseau mitotique pendant la mitose peuvent expliquer ces résultats décevants. Ce processus est souvent associé au phénotype CIN qui présente une forte incidence dans les cancers colorectaux. En effet, l'inhibition de BUBR1 comme la surexpression de la kinase Aurora A, sont décrits comme causes de résistance aux agents altérant les microtubules dans le cancer colorectal (Swanton et al. 2006). De plus, la protéine GPP semble aussi être impliquée dans le mécanisme de résistance en raison de sa forte concentration dans l'intestin limitant la biodisponibilité du paclitaxel par excrétion (Sparreboom et al. 1997).

## 1.5. L'apoptose

La mort cellulaire est un processus physiologique et pathologique conduisant à la destruction de la cellule. La mort cellulaire joue un rôle pivot dans la physiopathologie de nombreuses maladies, en effet un excès de mort cellulaire va conduire aux maladies neurodégénératives par exemple ; à l'opposé, un défaut de mort cellulaire va contribuer à l'émergence d'un cancer. A ce jour, différents types de morts cellulaires sont identifiés. L'apoptose est un mécanisme caractérisé par des changements morphologiques touchant le noyau et le cytoplasme. Ces altérations morphologiques sont remarquablement semblables pour tous les types cellulaires. Les principales caractéristiques morphologiques de l'apoptose sont la condensation de la chromatine, la fragmentation nucléaire, la réduction du volume

cellulaire (pycnose) et la rétraction des pseudopodes. La condensation de la chromatine commence à partir de la périphérie de la membrane nucléaire, formant un croissant ou une structure semblable à un anneau (Kerr et al. 1972). La chromatine se condense en outre jusqu'à ce qu'elle se fragmente à l'intérieur d'une cellule entourée d'une membrane intacte. *In vitro*, la membrane plasmique reste intacte tout au long de l'apoptose, en revanche à un stade avancé de l'apoptose, la membrane cellulaire bourgeonne et perd son intégrité. Les organites cytoplasmiques subissent également une modification ultrastructurale. Habituellement, les phagocytes englobent les cellules apoptotiques avant que les corps apoptotiques ne se produisent. Les débris de cellules apoptotiques ne sont pas phagocytés dans le milieu de culture cellulaire artificiel, ainsi ils forment l'objet d'une nécrose secondaire. De manière générale, les principaux changements biochimiques observés au cours de l'apoptose sont : 1) l'activation des protéases, 2) la fragmentation de l'ADN et des protéines, 3) l'altération membranaire et la reconnaissance par les cellules phagocytaires. Au début de l'apoptose, la cellule expose la phosphatidylsérine (PS) sur son feuillet externe. Il s'agit d'un phospholipide du feuillet interne qui permet la reconnaissance précoce des cellules mortes par les macrophages, permettant ainsi la phagocytose sans provoquer d'inflammation. Ce phénomène est suivi par une digestion caractéristique de l'ADN en fragments de 50 à 300 kilobases. Puis, l'ADN est clivé par des endonucléases en fragments de 180 à 200 paires de base.

Une autre caractéristique spécifique de l'apoptose est l'activation des enzymes appartenant à la famille des caspases ou cystéine protéases. L'activation des caspases engendre le clivage de nombreuses protéines vitales pour la cellule, la fragmentation de l'enveloppe nucléaire et cytoplasmique. Les caspases activent également les ADNases qui dégradent l'ADN nucléaire.

La caractérisation des mécanismes apoptotiques est cruciale pour la compréhension des pathologies résultant d'une anomalie de mort cellulaire (Elmore 2007). Les caspases jouent un rôle central dans l'apoptose, en effet ils sont à la fois les initiateurs et les effecteurs de l'apoptose. Nous distinguons deux voies par lesquelles les caspases peuvent être activées. Les deux voies d'initiation souvent décrites sont les voies intrinsèques (ou mitochondriales) et extrinsèques (ou récepteurs de mort) de l'apoptose. Ces deux voies aboutissent à une voie commune dite phase d'exécution de l'apoptose (**Figure 6**).

La voie extrinsèque, dite physiologique, débute à la suite d'un signal extracellulaire transmis par les récepteurs transmembranaires spécifiques à la mort cellulaire. Bien que plusieurs récepteurs de la mort ont été décrits, les récepteurs de mort les plus connus sont «

Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  Receptor 1 » (TNFR1), le récepteur Fas/CD95, et le récepteur « TNF-related apoptosis inducing ligand » TRAIL et leurs ligands respectifs sont TNF $\alpha$ , « Fas ligand » (FasL) and TRAIL (Locksley et al. 2001). Ces récepteurs de mort ont un domaine de mort intracellulaire « Death Domain » qui recrute des protéines adaptatrices comme TNF, « Receptor Associated Death Domain » (TRADD) et « Fas Associated Death Domain » (FADD), ainsi que la caspase-8. La liaison du ligand de la mort au récepteur de la mort résulte en un site de liaison pour la protéine adaptatrice, l'ensemble du complexe de protéine ligand-récepteur-protéine adaptatrice est connue comme le complexe induisant la signalisation de la mort « Death Inducing Signaling Complex » (DISC). Le DISC initie alors l'assemblage et l'activation des pro-caspases-8 et/ou -10. La forme activée des enzymes, la caspase-8 et-10 sont des caspases activatrices, qui déclenchent l'apoptose par clivage des caspase-3, -6 et -7 effectrices en aval (Wong 2011).

La voie intrinsèque est initiée dans la cellule suite à un stress interne tels que l'altération de l'ADN, l'altération du réseau microtubulaire, l'hypoxie, des concentrations extrêmement élevées en calcium (Ca<sup>2+</sup>) cytosolique et le stress oxydatif sévère. Cette voie est régulée par la famille de protéine pro-apoptotique BH3, qui une fois active entraîne l'augmentation de la perméabilité de la membrane mitochondriale externe « Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization » (MOMP), la perte du potentiel membranaire mitochondrial « Mitochondrial Membrane Permeabilization » (MMP) et l'inhibition des protéines anti-apoptotiques appartenant à la famille « B-cell lymphoma 2 » (Bcl-2) du nom du gène BCL2 initialement observée au point de rupture chromosomique de la translocation de chromosome 18 à 14, dans lymphome folliculaire non hodgkinien (Tsujiimoto et al. 1984) telles que « B-cell lymphoma like extra large » (Bcl-xL), et « Myeloid cell leukemia protein 1 » (Mcl-1) (Czabotar et al. 2014). Cette famille comporte aussi des protéines pro-apoptotiques telles que Bax, et « Bcl-2 homologous antagonist killer » (Bak). Ces modifications de la membrane mitochondriale vont conduire au relargage des molécules pro-apoptotiques tels que le cytochrome c dans le cytoplasme. De façon générale, la formation d'un hétérodimère entre Bax et Bcl-2 va empêcher le relargage du cytochrome c tandis que la formation d'un homodimère ou hétérodimère Bax et Bak va favoriser l'entrée en apoptose (**Figure 6**). Cependant, ce mécanisme est souvent controversé et nécessite encore des travaux.

De nombreux facteurs apoptotiques sont libérés dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie : « Apoptosis Inducing Factor » (AIF), « Second Mitochondria-derived Activator of Caspase » (SMAC), « Direct IAP Binding protein with Low pI » (DIABLO) et « High temperature requirement protein A2 » (HtrA2). Les facteurs SMAC, DIABLO

(Verhagen et al. 2000) et HtrA2 (Suzuki et al. 2001) neutralisent l'effet inhibiteur des « Inhibitor of Apoptosis Protein » (IAP) permettant ainsi l'activation des caspases. L'AIF lie l'ADN chromosomique et provoque la condensation et le remodelage de la chromatine, ce qui facilite la fragmentation de l'ADN par des nucléases telle que les endonucléases G (Nagata et al. 2003).

Une fois relargué le cytochrome c va former un complexe avec la pro-caspase-9 et « Apoptosis Protease Activating Factor » (APAF) pour former l'apoptosome. (Li et al. 2014). La pro-caspase-9 est ensuite activée en caspase-9. L'exécution de l'apoptose nécessite l'activation d'une série de caspases. La caspase en amont de la voie intrinsèque est la caspase-9, tandis que celle de la voie extrinsèque est la caspase-8. Les voies intrinsèques et extrinsèques aboutissent à la caspase-3 qui clive l'inhibiteur de la désoxyribonucléase de la caspase-active, qui est responsable de l'apoptose. En outre, les caspases en aval induisent le clivage de protéines kinases, des protéines du cytosquelette, des protéines de réparation d'ADN et des sous-unités inhibitrices de la famille des endonucléases. Ils ont également un effet sur le cytosquelette, le cycle cellulaire et les voies de signalisation, ce qui contribue en même temps à des changements morphologiques typiques de l'apoptose.

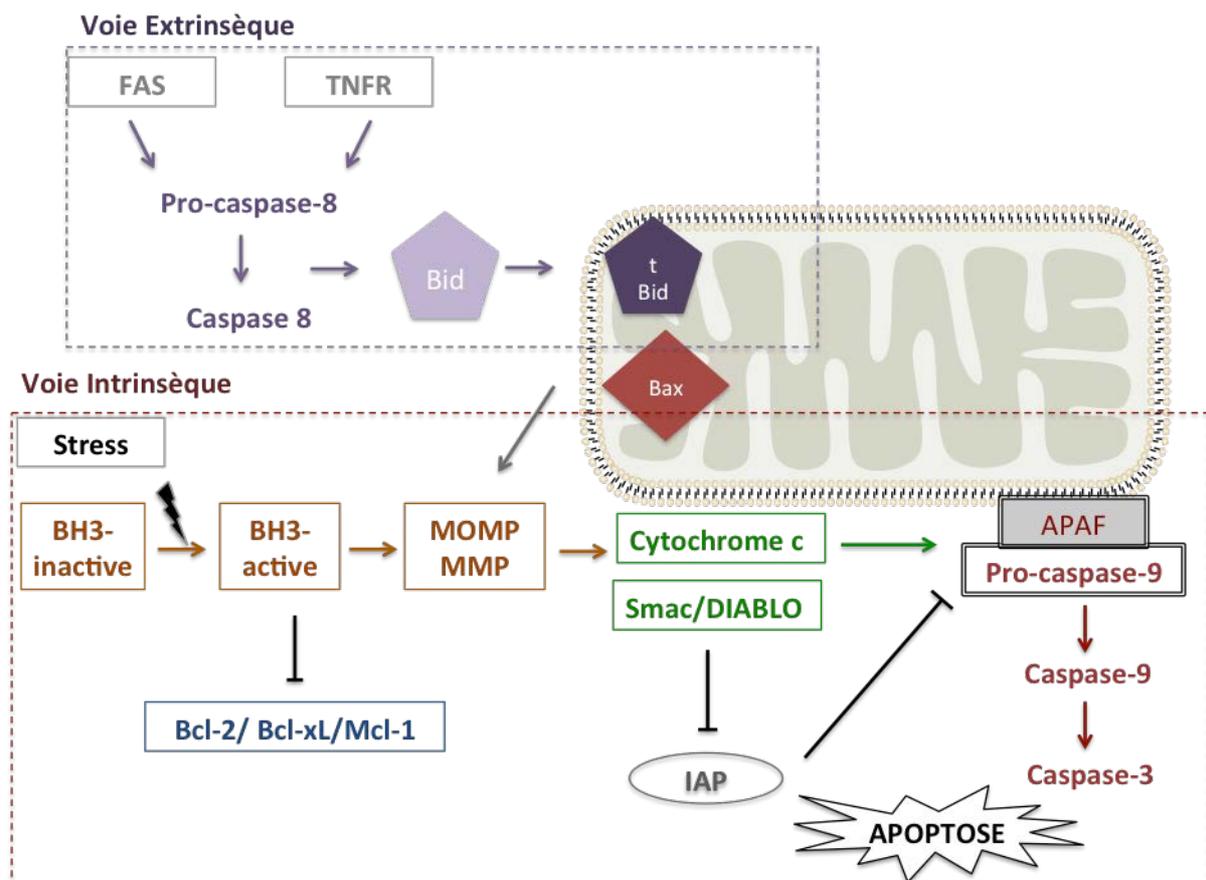


Figure 6 : Cascade des mécanismes moléculaires impliqués dans l'apoptose.

La voie intrinsèque qui dépend de la caspase-8 est représentée en pointillé violet. La voie extrinsèque dépendante de la caspase-9 est représentée en pointillé rouge. APAF-1 : Apoptotic peptidase activating factor-1 ; Bax : Bcl-2 associated X ; Bcl-2 : B cell lymphoma-2 ; Bcl-xL : B cell lymphoma-extra-large ; Bid : BH3-interacting domain death ; IAP : Inhibitor of Apoptosis Protein ; MMP : Mitochondrial Membrane Permeabilization ; MOMP : Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization. Figure réalisée avec ScienceSlides.

## 1.6. L'autophagie

### 1.6.1. Les étapes de l'autophagie

L'autophagie a été décrite pour la première fois chez la levure, elle permet de maintenir un équilibre cellulaire par recyclage des composants non essentiels de la cellule dans des conditions de stress telles que l'absence de nutriments, l'hypoxie ou la thérapie ciblée. De multiples formes de l'autophagie existent dans les cellules de mammifères, chacune avec des mécanismes bien caractérisés qui diffèrent dans le matériel destiné à la dégradation. La macroautophagie représente la forme d'autophagie la plus polyvalente et la mieux décrite dans la littérature (**Figure 7**). (Li et al. 2014).

Selon les mécanismes moléculaires impliqués dans la biogenèse des autophagosomes, l'autophagie peut être caractérisée comme canonique ou non canonique.

L'autophagie canonique est régie par les gènes « Autophagie Related Protein » (ATG) et les protéines non-ATG tels que la classe PI3K, p150 et Ambra1 qui orchestrent les étapes de l'initiation, de l'élongation, de la maturation et de la fusion. L'autophagie non canonique n'est pas aussi bien comprise, l'autophagosome peut être créé indépendamment de ATG 5 ou ATG 7.

- L'autophagie canonique est initiée par la formation de l'autophagosome sous le contrôle de la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR et le complexe «Unc-51-like 1» (ULK1). Dans des conditions normales, lorsque les facteurs de croissance et les nutriments tels que les acides aminés sont abondants dans l'espace extracellulaire, la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR est très active et mTORC1 inhibe la formation du complexe ULK1 constitué de ULK1, FIP200 et ATG 13 à travers la phosphorylation de la sérine 757 et bloque ainsi l'autophagie. Toutefois, lorsque les facteurs de croissance deviennent limitant, « Mammalian Target Of Rapamycin Complexe 1 » (mTORC1) devient inactif et ne peut plus réprimer la formation du complexe ULK1, ce qui favorise l'initiation de l'autophagie. En réponse à une carence en glucose ou en acides aminés, AMPK peut également réguler l'activité de ULK1. Une fois activé, ULK1 forme un complexe avec bécline 1 à l'aide de « Tripartite Motif containing 5  $\alpha$  » (TRIM5 $\alpha$ ), qui permet la phosphorylation et l'activation de la bécline 1. Une fois active, la bécline 1 active Vps34 à son tour. Vps34 n'est pas inhibée par la rapamycine qui est un inhibiteur de mTORC1, ce qui suggère que

Vps34 peut également fonctionner en amont de mTOR, servant de véhicule pour mTOR pour surveiller les niveaux des nutriments critiques pour la survie cellulaire (Yuan et al. 2013).

- A la suite de l'activation de Vps34, le phagophore est formé par l'isolation des membranes cytoplasmiques dérivées du réticulum endoplasmique, la membrane plasmique, la mitochondrie ou l'appareil de Golgi. La nucléation marque le début de la formation de l'autophagosome avec la nucléation des membranes par bécline 1-Vps34 et ATG14L, Rubicon et Ambra.
- L'allongement et la maturation permet la maturation de l'autophagosome et nécessite deux voies ubiquitine ligase. La première voie consiste à la formation du complexe ATG 5-ATG 12-ATG16L (formé à l'aide d'ATG 7 et ATG 10). La deuxième voie implique la protéine « Light Chain 3 » (LC3) analogue à l'ATG 8. LC3-I est conjuguée à la phosphatidyléthanolamine à la surface de la membrane lipidique de l'autophagosome en présence de l'ATG 7 et 3 pour former LC3-II (Amaya et al. 2015). Une fois intégrée dans la bicouche lipidique, LC3-II est maintenue à la surface de l'autophagosome mature pour interagir avec des protéines adaptatrices (récepteurs de l'autophagie), telles que p62 qui permet la dégradation d'agrégats ubiquitinés.
- Une fois que l'autophagosome a englouti les composés cellulaires à dégrader, il va fusionner avec le lysosome et former l'autophagolysosome. Cette dégradation est permise grâce à l'environnement acide de l'autophagolysosome riche en hydrolases. Les perméase des lysosomes permettent la libération des produits de la dégradation sous forme de métabolites (sucres, acides aminés et acides nucléiques) dans le cytosol en vue de leur réutilisation par la cellule (Mathew et al. 2007, Klionsky et al. 2012).

### **1.6.2. Le flux autophagique**

L'autophagie est un processus dynamique qui repose sur plusieurs étapes. Le flux autophagique englobe l'ensemble du processus d'autophagie, y compris la formation du phagophore, la formation de l'autophagosome, la livraison de ce dernier aux lysosomes pour former l'autolysosome, la décomposition et enfin la libération des macromolécules des organelles dégradées dans le cytosol. Ainsi, l'évaluation du flux autophagique nécessite une analyse multiparamétrique qui englobe ces différentes étapes de l'autophagie. Dans des conditions physiologiques normales, l'autophagie basale se produit. Lorsque l'autophagie est

induite, par exemple par privation de nutriments ou molécule chimique telle que la rapamycine, on observe une augmentation de toutes les structures autophagiques caractéristiques de chaque étape, on parle alors de flux autophagique accru. Lorsque l'autophagie est inhibée en amont, aucunes structures autophagiques ne sont générées. Si l'autophagie est réprimée après la formation de l'autophagosome, seuls les autophagosomes s'accumulent, on parle ici de flux autophagique réduit. Du point de vue méthodologique, différents critères sont à prendre en compte, l'analyse peut reposer sur un régime permanent ou sur un régime dynamique. Par exemple, l'analyse de l'expression de la conversion de la protéine LC3, marqueur de l'autophagosome par western blot ne suffit pas à elle seule pour conclure sur le flux autophagique. En effet, une accumulation de LC3-I/II peut refléter l'induction de l'autophagie ou l'inhibition de la clairance de l'autophagosome. Ainsi, l'utilisation d'un inhibiteur de la fusion lysosomale tel que la bafylomycine A1 ou la chloroquine permettra ici d'évaluer le turn-over de la protéine LC3 et de conclure sur le flux autophagique. Similairement, l'analyse des structures autophagiques par microscopie électronique à transmission doit être réalisé en présence d'inhibiteur de la fusion lysosomale (Mizushima et al. 2010).

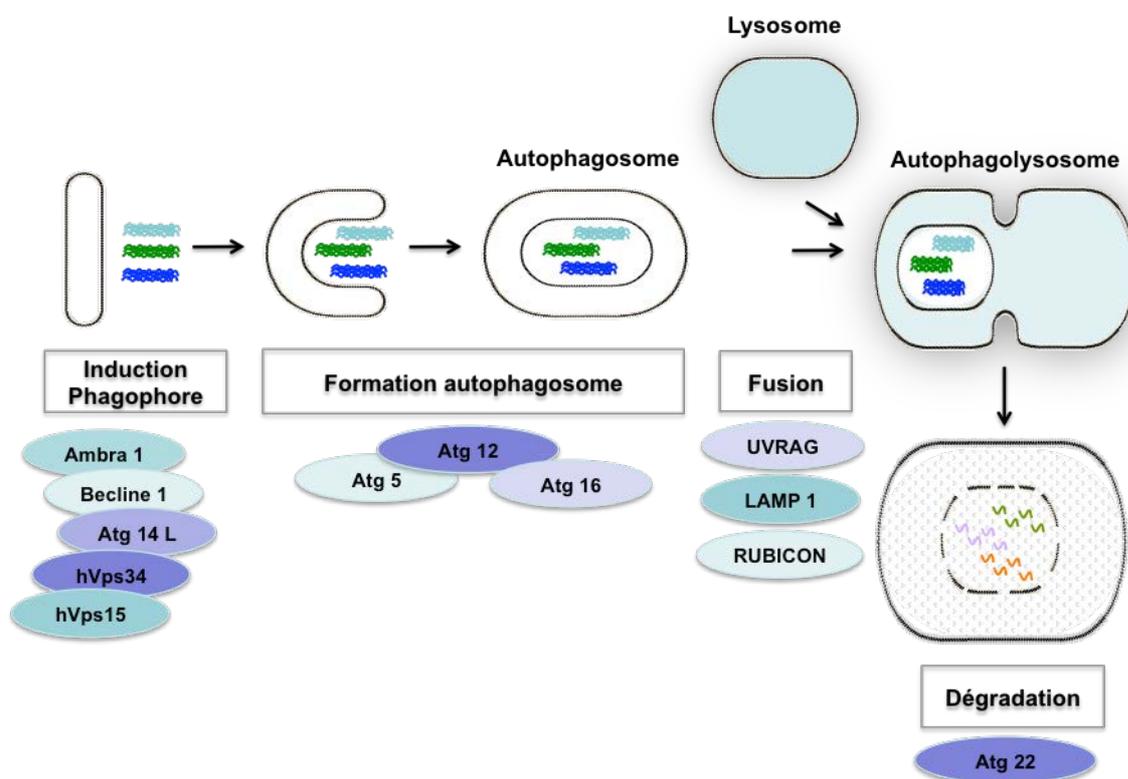


Figure 7 : Mécanismes moléculaires impliqués dans la macroautophagie.

L'autophagie est constituée de 3 étapes principales : Induction du phagophore, formation de l'autophagosome contenant les macroéléments à dégrader, et fusion de l'autophagosome précoce avec le lysosome avant la dégradation. Les complexes protéiques impliqués sont décrits sous chaque étape. Ambra 1 : Activating molecule in BECN1-regulated autophagy protein 1 ; ATG : Autophagy-related gene ; LAMP1 : Lysosomal-associated Membrane Protein 1 ; RUBICON : RUN domain protein as Beclin-1 Interacting and cysteine-rich Containing ; UVRAG : UV radiation Resistance-Associated Gene. Figure réalisée avec ScienceSlides.

### 1.6.3. L'activité anti-tumorale de l'autophagie

L'autophagie est physiologiquement impliquée dans l'homéostasie de la muqueuse intestinale normale. L'analyse de l'expression des protéines LC3, p62 et bécline 1 a montré que l'autophagie était plus active à la base des glandes intestinales là où les cellules indifférenciées et progénitrices résident contrairement à la surface épithéliale différenciée (Groulx et al. 2012). Les études sur la souris ont permis de mettre en évidence l'importance des gènes liés à l'autophagie dans la cancérogenèse. La délétion monoallélique du gène bécline 1, fondamental pour l'initiation de l'autophagie, augmenterait la prolifération cellulaire et réduirait l'autophagie *in vivo*. Cette mutation augmenterait la fréquence d'apparition de tumeurs malignes induite par le virus de l'hépatite B, faisant de bécline 1 un gène tumeur suppresseur haplo-insuffisant (Qu et al. 2003). De même, la délétion du gène ATG4C serait impliquée dans la progression tumorale chez la souris (Marino et al. 2007). Les souris déficientes pour Atg4c seraient plus susceptibles de développer des fibrosarcomes induits par des agents chimiques cancérogènes. Différentes études ont rapporté le rôle tumeur suppresseur de l'autophagie :

- **Stabilité du génome**

Compte tenu de son rôle homéostatique précédemment évoqué, l'autophagie va permettre la dégradation des organelles endommagées, des protéines mal pliées, ubiquitinées et des agrégats de protéines. L'ensemble de ces dommages va conduire à un stress environnemental associé à la production d'ERO responsable de l'activation de certains oncogènes. Pour ce faire, les travaux de Mathew et al, ont révélé l'implication de l'autophagie dans l'instabilité chromosomale. Ainsi l'autophagie défective accompagnée de la perte allélique de bécline 1 et la délétion d'Atg5 a conduit à un stress métabolique des cellules « immortalized Baby Mouse Kidney » (iBMK) entraînant l'augmentation du taux de mutation et de l'instabilité chromosomique. Ces dommages de l'ADN conduisent à une aneuploïdie importante caractéristique de la progression tumorale (Mathew et al. 2007). Similairement, la délétion mosaïque d'ATG 5 et la délétion d'Atg7 ont induit la formation d'adénome hépatique multiple associée au gonflement des mitochondries, à l'accumulation de la protéine p62, au stress oxydatif et à la réponse aux dommages génomiques. Cette étude a montré que l'autophagie était importante pour la suppression de la tumeur dans le foie et que l'accumulation de la protéine p62 était nécessaire à la progression tumorale (Takamura et al. 2011). L'altération du flux autophagique *via* la délétion monoallélique de bécline 1 a conduit à la progression

tumorale mammaire en activant la réponse aux dommages de l'ADN *in vitro* et *in vivo* (Karantza-Wadsworth et al. 2007).

- **Inhibition de l'inflammation**

L'inflammation est un constituant essentiel du microenvironnement tumoral caractérisée par la production d'ERO (Mantovani et al. 2008). Différentes études ont rapporté l'implication de l'autophagie dans l'inhibition de l'inflammation. En effet, le complexe ATG 5/ATG 12 va inhiber l'immunité innée *via* la réduction de la formation d'interféron de type I en s'associant directement sur « Retinoic acid-Inducible Gene I » (RIG-I) et « Interferon-  $\beta$  Promoter Stimulator » 1 (IPS-1) (Jounai et al. 2007). L'autophagie est notamment impliquée dans la dégradation de « B-cell lymphoma 10 » (Bcl-10) en empêchant ainsi l'activation de la cascade de signalisation de présentation du ligand impliquant « Nuclear Factor-Kappa B » (NF- $\kappa$ B) (Paul et al. 2012). L'altération du flux autophagique a aussi été associée à la maladie inflammatoire de Crohn dans des souris déficientes d'ATG16L.

- **Autophagie et sénescence cellulaire**

La sénescence est un arrêt cellulaire prolongé qui consiste à réduire le risque de cancer. En réponse au stress, à la toxicité et aux dommages tissulaires, la sénescence va empêcher l'entrée des cellules dans le cycle de division. L'induction de la sénescence par l'oncogène RAS est associée à l'augmentation de l'autophagie, et du gène ULK3 responsable de l'induction de l'autophagie et de la sénescence. De plus, l'inhibition de l'autophagie par extinction du gène ATG 5 et ATG 7 empêche l'initiation de la sénescence (Young et al. 2009).

- **Autophagie et angiogenèse**

L'angiogenèse est fondamentale pour la croissance et la dissémination tumorale. Elle permet l'apport de nutriments et d'oxygène en s'infiltrant dans la tumeur. Différentes études ont rapporté le rôle de l'autophagie dans l'inhibition de l'angiogenèse. Kringle 5 (K5) et l'endostatine sont des inhibiteurs angiogéniques bien caractérisés dans la littérature. Ces deux inhibiteurs angiogéniques induisent l'autophagie et la mort cellulaire dans les cellules endothéliales (Ramakrishnan et al. 2007). De même, la rapamycine qui est connue pour son activité inductrice de l'autophagie, inhibe notamment le développement tumoral primaire et métastatique en inhibant l'angiogenèse *via* la réduction de la production du VEGF (Guba et al. 2002).

#### **1.6.4. L'activité pro-tumorale de l'autophagie**

De nombreuses études soulignent le rôle dual et contradictoire de l'autophagie dans le cancer. L'autophagie constitutive au niveau basal joue un rôle homéostatique et protecteur. Elle va empêcher la transformation d'une cellule normale en cellule maligne (Sui et al. 2013). En revanche, au sein du cancer, l'autophagie joue un rôle pro-tumoral, car elle devient une source d'énergie fondamentale pour la survie et la progression tumorale.

- **L'autophagie et les métastases**

Au cours de la dissémination tumorale, les cellules cancéreuses subissent une transition épithélio-mésenchymale qui consiste à réduire les protéines d'adhésion et augmenter l'expression des protéines impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC) telles que : les métalloprotéinases (Nieto et al. 2016). L'anoïkis est un processus de mort cellulaire qui survient à la suite d'un détachement prolongé des cellules de la MEC et les cellules métastatiques sont caractérisées par une résistance à l'anoïkis. Fung et al. ont (Fung et al. 2008) montré que l'induction de l'autophagie permet la survie cellulaire des cellules détachées de la MEC alors que la réduction de l'autophagie par extinction des gènes ATG 5, ATG 6 et ATG 7 induit la mort cellulaire par anoïkis. La mobilité et la capacité d'invasion des cellules sont deux critères cruciaux pour conquérir de nouveaux foyers secondaires. Lock et al. ont montré que l'autophagie était requise pour la production de l'interleukine 6, cytokine pro-migratoire essentielle dans l'invasion cellulaire (Lock et al. 2014).

- **L'autophagie et la dormance cellulaire**

Après dissémination, les cellules cancéreuses métastatiques ne se mettent pas immédiatement à proliférer une fois atteint le foyer secondaire. Elles entrent dans un état de quiescence dit dormance cellulaire. En clinique, la dormance cellulaire est un problème redoutable à l'origine de la récurrence métastatique qui peut apparaître des années après le traitement de la tumeur primitive souvent observée dans le cancer de l'ovaire et du sein (Galluzzi et al. 2015). L'autophagie est un mécanisme clé de la dormance cellulaire, elle permet aux cellules tumorales résiduelles de s'adapter aux restrictions métaboliques. Les études menées dans une souris KRAS-mutante ont révélé que les cellules dormantes de l'adénome du pancréas ayant survécu à l'ablation de l'oncogène présentaient une activité autophagique élevée (Viale et al. 2014). Ainsi, combattre la dormance cellulaire est essentielle pour éradiquer complètement le cancer (Aguirre-Ghiso 2006).

- **L'autophagie et le métabolisme**

L'altération du métabolisme du glucose dans le cancer a été décrite pour la première fois par Warburg. Les cellules cancéreuses vont changer le métabolisme énergétique du sucre, des protéines et des lipides pour alimenter leur demande en énergie nécessaire à la croissance tumorale. Le stress métabolique prolongé va conduire à la mort cellulaire capable de supprimer la tumorigénèse. De nombreux travaux ont mis en évidence le rôle de l'autophagie dans le maintien de la survie cellulaire à la suite d'un stress métabolique, révélant son rôle pro-tumoral (Degenhardt et al. 2006). En effet, dans les cellules cancéreuses dérivées de la mutation de l'oncogène RAS, l'autophagie promeut la croissance tumorale en activant le métabolisme glycolytique (Lock et al. 2011). De même, l'activation de l'oncogène nécessite l'autophagie pour le maintien du métabolisme oxydatif et la croissance tumorale (Guo et al. 2011). Par ailleurs, l'inactivation de l'autophagie par délétion de l'allèle bécline 1 dans le cancer du sein favorise la progression tumorale (Karantza-Wadsworth et al. 2007). L'hypoxie est caractéristique du microenvironnement tumoral, *in vivo* l'autophagie est préférentiellement active dans les régions hypoxiques, l'inhibition de l'autophagie par la chloroquine va sensibiliser les cellules tumorales aussi bien à l'hypoxie qu'au traitement anti-tumoral (Rouschop et al. 2010).

### **1.6.5. L'autophagie et le cancer du côlon**

Le côlon est un organe caractérisé par un turn-over cellulaire important. Le côlon est une barrière délicate entre tolérance et défense contre les bactéries présentes dans le flux intestinal. Il présente une niche de cellule souche qui permet un renouvellement continu et dynamique de l'épithélium intestinal qui se trouve à l'interface entre la flore microbienne et le système immunitaire, l'homéostasie de l'épithélium intestinal repose étroitement sur l'autophagie. L'autophagie joue un rôle physiologique crucial dans les cellules de Paneth, les cellules caliciformes, les entérocytes et les microvillosités intestinales (Baxt and Xavier 2015). Comme nous l'avons évoqué plus haut, l'autophagie présente un rôle paradoxal dans le cancer. Il semble tout de même évident que l'autophagie est fondamentale pour la survie de la cellule cancéreuse en condition de stress métabolique et de dissémination cellulaire. Pour maintenir leur capacité proliférative, les cellules cancéreuses doivent fournir en permanence suffisamment d'énergie tels que les acides aminés, les lipides et les sucres. Ainsi l'inhibition de l'autophagie est une stratégie qui vise à sensibiliser les cellules tumorales au stress

métabolique. Dans le cancer du côlon, l'autophagie est activée et elle protège la cellule cancéreuse de la carence en nutriments (Sato et al. 2007). L'autophagie est aussi activée à la suite de traitement cytotoxique à base de 5-FU, et l'inhibition de l'autophagie augmente la sensibilité des cellules du CCR à la chimiothérapie (Li et al. 2010). De même, le traitement des cellules cancéreuses du côlon par l'oxaliplatine et le bevacizumab active l'autophagie dans les xénogreffes murins dérivés des cellules d'adénocarcinome du côlon (Selvakumaran et al. 2013). La chloroquine et son dérivé hydroxychloroquine font parmi des inhibiteurs de l'autophagie les plus investigués dans la thérapie du cancer. L'inhibition de l'autophagie après traitement avec la chloroquine ou par réduction de la régulation des gènes ATG 5 et bécline 1 sensibilise les cellules d'adénocarcinome du côlon au traitement anti-angiogénèse et cytotoxique (Selvakumaran et al. 2013). Similairement, la combinaison de la chloroquine avec le 5-FU a permis de surmonter la résistance au 5-FU dans le cancer du côlon *in vivo* (Sasaki et al. 2012). Ensemble, l'inhibition de l'autophagie semble réduire la chimiorésistance induite par l'activation de l'autophagie. Par ailleurs, récemment l'utilisation régulière de l'aspirine est associée à la prévention du cancer colorectale par un mécanisme d'action mal connu (Andreotti et al. 2017). Din et al., se sont intéressés à la question et ils ont montré que l'aspirine activait l'autophagie *via* l'inhibition de la voie de signalisation mTOR et l'activation de la voie AMPK (Din et al. 2012). Ils supposent ainsi que l'activation de l'autophagie est à l'origine de l'activité chimiopréventive de l'aspirine. De nombreux composés cytotoxiques utilisés en clinique induisent l'autophagie, cependant, il n'a pas été démontré que ces composés induisaient la mort par autophagie. Parmi ces composés, on compte le tamoxifen, l'endostatine, le sorafenib, et la rapamycine (Kung et al. 2011).

Pour conclure, une meilleure élucidation du contexte cellulaire permettra d'identifier le rôle pro-tumoral ou anti-tumoral de l'autophagie dans le cancer du côlon avant d'envisager une combinaison thérapeutique.

## **1.6.6. La protéine p62/séquestosome 1**

### **1.6.6.1 La protéine p62 : marqueur de l'autophagie**

La protéine p62 aussi appelée « séquestosome 1 » est couramment trouvée dans les corps d'inclusion contenant des agrégats protéiques polyubiquitinés. Cette protéine p62 a de multiples domaines d'interactions, faisant d'elle un partenaire de liaison impliqué dans divers

événements cellulaires tels que l'autophagie et les différentes voies de signalisation impliquées dans la réponse antioxydante, le métabolisme et le cancer. La protéine p62 a largement été étudiée comme protéine de cargaison, fonctionnant comme un récepteur d'autophagie sélectif pour la dégradation des substrats ubiquitinés. Néanmoins p62 peut également délivrer des cargaisons ubiquitinées au protéasome, bien qu'elles soient principalement dégradées par l'autophagie (Korolchuk et al. 2010), (Korolchuk et al. 2009).

La protéine p62 est distribuée non seulement dans le cytoplasme, mais aussi dans le noyau de la cellule. Dans le cadre du processus autophagique la protéine p62 peut être localisée dans les autophagosomes et lysosomes.

Parmi les nombreux domaines d'interaction de la protéine p62 figure le domaine N-terminal « Phox1 and Bem1p » (PB1) favorisant son auto-agrégation ou son hétérodimérisation avec d'autres adaptateurs tels que NBR1 (Wilson et al. 2003). Ce domaine PB1 est également impliqué dans la liaison de p62 à PKC « Protéine Kinase C » (Sanz et al. 2000) ou à ERK (Lee et al. 2010). Ensuite un doigt zinc central (ZZ) et un domaine de liaison « TRAF-6 binding domain » (TBD) interagissent respectivement avec « Receptor-Interacting Protein » (RIP1) et « TNF-receptor associated factor » (TRAF6) (Duran et al. 2008). Entre ces deux domaines se trouve la région interagissant avec la protéine adaptatrice RPTOR « Regulatory-associated Protein of mTOR » impliquée dans l'activation de la kinase métabolique mTOR (Duran et al. 2011). La région d'interaction « Keap-1 Interacting Region » (KIR) lie Keap1 pour induire la translocation nucléaire du facteur de transcription NRF2 impliqué dans la réponse anti-oxydante (Komatsu et al. 2010). La protéine p62 interfère avec l'autophagie en recrutant les protéines ubiquitinées grâce au domaine « Ubiquitin-associated domain » (UBA) (Vadlamudi et al. 1996) et favorisant leur dégradation grâce au domaine « LC3-Interacting Region » (LIR) un domaine d'interaction avec LC3 (Pankiv et al. 2007) (**Figure 8**). L'affinité du domaine UBA pour les résidus de lysine ubiquitinées est modulée par la phosphorylation de la serine 403 de la protéine 62 conduite par la caséine kinase 2 (CK2) (Matsumoto et al. 2011). En réponse à divers facteurs de stress, la protéine p62 contribue à l'autophagie sélective des agrégats protéiques et mal repliés, des mitochondries défectueuses et excédentaires (mitophagie) et des pathogènes intracellulaires tels que les bactéries, les protozoaires ou les virus (xénophagie) à travers la signalisation ubiquitine (Johansen and Lamark 2011).

La protéine p62 joue différents rôles au cours du processus autophagique tels que :

- **Rôle régulateur du flux autophagique**

La protéine p62 joue un rôle adaptateur dans de nombreuses voies de signalisation cellulaire notamment l'autophagie. A travers son domaine d'interaction avec raptor (Duran et al. 2011), la protéine p62 intègre le complexe mTORC1, inhibiteur de l'autophagie. Ainsi, la protéine p62 détecte les signaux nutritifs et active le complexe mTORC1 qui va à son tour inhiber l'autophagie et créer une boucle de rétroaction qui induit l'accumulation de la protéine p62. De même, l'extinction génique de p62 conduit à l'inactivation de mTORC1 et donc à l'induction de l'autophagie dans le nématode *C. elegans* (Duran et al. 2011). Par ailleurs, le stress et la rapamycine inhibent aussi le complexe mTORC1 pour conduire à l'activation de l'autophagie. Ces résultats suggèrent que l'expression de la protéine p62 joue un rôle de rétrocontrôle sur l'autophagie *via* le complexe mTORC1. En outre, étant donné que la protéine p62 est dégradée par l'autophagie, le taux cytoplasmique de la protéine p62 est devenu un indicateur clé du niveau d'autophagie. Ainsi, lorsque le flux autophagique est déficient dans différents modèles tels que la souris (Komatsu et al. 2007) ou la drosophile (Nezis et al. 2008), la protéine p62 s'accumule dans les agrégats positifs à l'ubiquitine, et lorsque p62 est inhibée ces agrégats disparaissent. Ces résultats montrent le lien étroit entre l'autophagie et la protéine p62 impliquée dans la formation des corps d'inclusion positifs à l'ubiquitine caractéristique de nombreuses maladies neurodégénératives et hépatiques (Rodriguez-Viciana et al. 1994). En routine, l'augmentation de l'expression de la protéine p62 évaluée par western blot est en corrélation inverse avec l'activité autophagique. Des paramètres additionnels tels que la conversion de LC3-I/II et la microscopie électronique à transmission évaluant le flux autophagique permettent de le confirmer, car p62 tend à s'auto-agrégérer.

- **Rôle dans la biogenèse de l'autophagosome**

L'étape initiale de l'autophagie repose sur la formation et l'allongement subséquent du phagophore qui enveloppe ensuite divers constituants cytoplasmiques jusqu'à former une structure à double membrane appelée autophagosome. La protéine p62 transporte les protéines ubiquitinées vers l'autophagosome afin d'induire leur dégradation. Le concept basique consistant à la livraison des protéines ubiquitinées par l'intermédiaire de la chaîne latérale polyubiquitine de p62 et la présence de la protéine LC3 à la surface du phagophore est en train de changer. En fait, l'oligomérisation de la protéine p62 à travers son domaine PB1 serait essentielle pour la biogenèse de l'autophagosome. Ainsi les multiples protéines ATG viennent se lier sur les agrégats de protéines positifs à p62 à l'ubiquitine en amont (Itakura and Mizushima 2011).

### 1.6.6.2 Régulation intracellulaire de p62

Le niveau intracellulaire de p62 repose sur un équilibre adéquat entre la régulation transcriptionnelle et la dégradation autophagique post-traductionnelle. Le principal mode de régulation transcriptionnelle repose sur le facteur de transcription « Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 » (NRF2). En cas de stress endogène ou exogène responsable de stress oxydatif, NRF2 se lie spécifiquement à l'« Antioxydant Response Element » (ARE) situé dans la région promoteur de p62 pour favoriser l'expression de l'ARNm p62 (Jain et al. 2010). En absence de stress oxydant, le facteur de transcription NRF2 est réprimé par liaison à son principal inhibiteur « Kelch-like ECH-Associated Protein 1 » (KEAP-1) qui favorise sa dégradation par la voie ubiquitine du protéasome (Taguchi et al. 2011). De plus, p62 peut interagir directement avec KEAP-1 *via* son domaine KIR, ainsi p62 est capable de dissocier NRF2 de KEAP-1, et favoriser l'activation et donc la translocation nucléaire de NRF2, on parle alors de « positive feedback loop » (Jain et al. 2010). Ce processus repose sur l'induction d'une boucle de retour positive dans laquelle p62 active NRF2 pour générer sa propre transcription. La dégradation post-traductionnelle de p62 se fait par l'autophagie par interaction directe entre p62 et LC3 (Pankiv et al. 2007). Ainsi, on peut supposer qu'une altération du flux autophagique peut entraîner une accumulation de la protéine p62 suivie d'une augmentation de l'activité transcriptionnelle de NRF2. Lau et al., ont montré qu'un défaut d'autophagie induirait une activation de la voie de signalisation NRF2 par un mécanisme non canonique qui nécessite une interaction entre p62 et KEAP-1 (Lau et al. 2010). Dans les cellules de carcinome hépatocellulaire, l'inhibition de l'autophagie induit la formation d'agrégats de p62 conduisant à l'activation de NRF2 (Inami et al. 2011). Par ailleurs, la transcription de p62 ne dépend pas seulement de l'activité NRF2. D'autres stimuli, tels que le 13-acétate de phorbol 12-myristate (PMA), le calcium et l'interleukin-3 augmentent rapidement l'expression de l'ARNm de p62 (Lee et al. 1998). La présence des divers domaines d'interaction de p62 avec plusieurs facteurs de transcription, tels que « Specificity Protein-1 » (SP-1), « Activator Protein-1 » (AP-1), NF- $\kappa$ B et « Erythroblastosis » (Ets-1) témoigne de leurs implications dans la régulation de la transcription de p62 (Vadlamudi and Shin 1998). L'activation constitutive de la voie Ras/MEK/ERK régule aussi la transcription p62 *via* le domaine de liaison AP-1 présent dans son promoteur (Duran et al. 2008). D'autres études ont rapporté, le rôle de la voie de signalisation JNK/c-Jun dans la régulation de la synthèse *de novo* de p62. Dans les cellules chroniques de leucémie myéloïde (CML), le resvératrol augmente l'expression de p62 par l'activation de la voie JNK, le

traitement des cellules CML avec SP600125, inhibiteur de JNK, renverse l'effet du resvératrol (Puissant et al. 2010).

### 1.6.6.3 La protéine p62 et le cancer

Bien que la protéine p62 a été décrite comme la première protéine adaptatrice de l'autophagie, p62 joue un rôle central dans de nombreuses voies de signalisation cellulaire. Les premières études menées dans le domaine ont associé l'accumulation de la protéine p62 à la suite de l'inhibition de l'autophagie à des lésions hépatiques. L'ablation du gène p62 a permis de rétablir ces lésions suggérant un rôle pro-tumeur de p62 (Komatsu et al. 2007). L'étude menée par Mathew et al. a permis d'identifier le rôle tumeur suppresseur de l'autophagie à travers la protéine p62 (Mathew et al. 2009). En effet, dans les cellules déficientes en autophagie et incompétentes en apoptose, le stress métabolique a induit l'accumulation de la protéine p62 et des mitochondries endommagées accompagnées de la production d'ERO responsable de la tumorigenèse (Mathew et al. 2009). Plus récemment, les travaux de Imemura et al. ont réconforté ces résultats en montrant que l'augmentation de l'expression de la protéine p62 induit la carcinogénèse dans les cellules hépatiques (Umemura et al. 2016). En effet, la protéine p62 active la voie anti-oxydante NRF2 et la voie mTORC1 pour contrer la mort cellulaire induite par le stress oxydatif (Umemura et al. 2016). L'accumulation de la protéine p62 est observée dans différents types de cancer tels que le côlon, poumon, rein et foie. En effet, son expression serait régulée par différents oncogènes tels que « Human ErbB2 (HER2) et PI3K. Ainsi, p62 joue un rôle d'antigène de sélection tumorale qui peut être ciblé par vaccination à ADN (Venanzi et al. 2013). Elenagen® est un vaccin à ADN anti-p62 ayant finalisé les essais cliniques de phase I/II ([www.curelaboncology.com](http://www.curelaboncology.com)).

Paradoxalement, les travaux de Valencia et al. ont mis en évidence une réduction d'expression de la protéine p62 dans les cellules stromales du cancer de la prostate comparées aux cellules stromales normales (Valencia et al. 2014). L'absence de p62 est associée à l'augmentation de la tumorigenèse de la prostate. p62 exerce un rôle tumeur suppresseur en réduisant l'activité inflammatoire, p62 régule la cascade IL-6/TGF $\beta$  impliquée dans l'invasion tumorale en réduisant la voie mTORC/c-Myc qui à son tour va réduire la détoxification métabolique accompagnée de la répression d'ERO (Valencia et al. 2014).

Ensemble, compte tenu du rôle de p62 dans différentes voies de signalisation, beaucoup de pistes restent mal connu à ce jour. Il est donc fondamental de bien élucider le rôle de p62 en fonction du contexte cellulaire et d'identifier ses cibles.

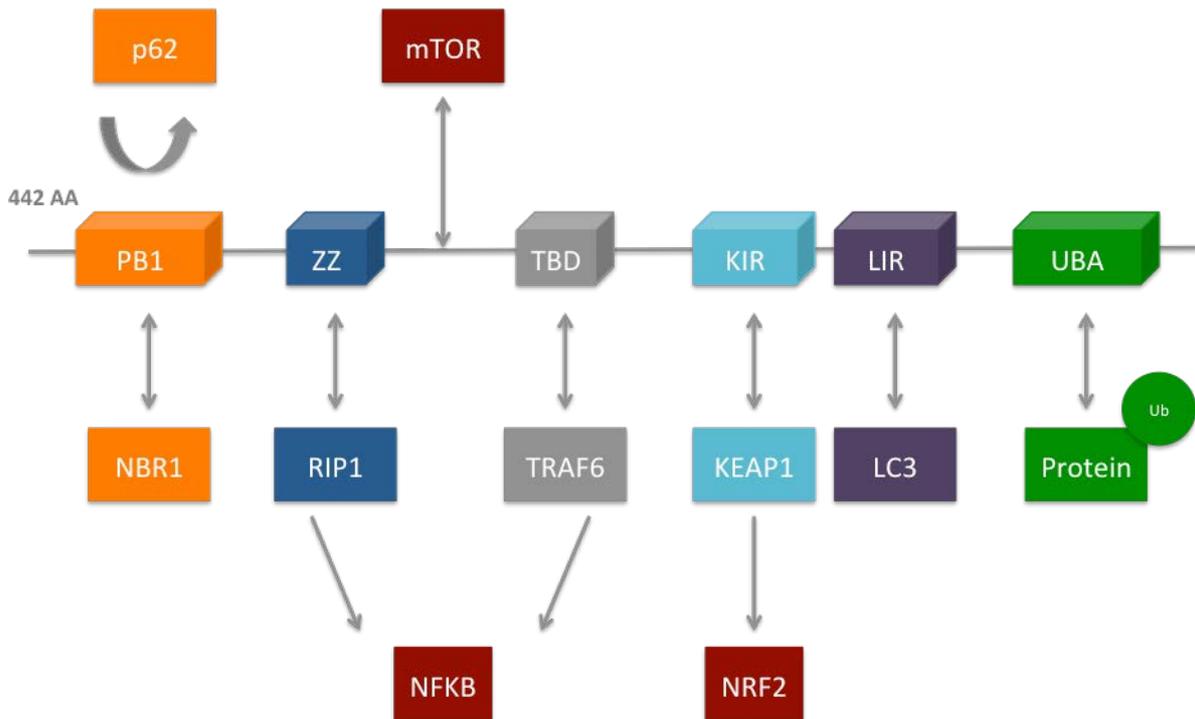


Figure 8 : Représentation schématique des domaines d'interaction de la protéine p62.

KEAP-1 : Kelch-like ECH-associated protein 1 ; KIR : Keap-1 interacting region ; LC3 : Microtubule-associated 1A/1B-light chain 3 ; LIR : LC3-interacting region ; NF- $\kappa$ B : Nuclear Factor-Kappa B ; NBR1 : Neighbor of BRCA1 gene 1 protein ; NRF2 : Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 ; PB1 : Phox and Bem1 domain ; RIP1 : Receptor Interacting Protein 1 ; TBD : TRAF-6 binding domain ; TRAF6 : TNF receptor-associated factor 6 ; UBA : Ubiquitin associated domain ; ZZ : Zinc finger domain.

## 1.7. Le système ubiquitine protéasome

### 1.7.1. Généralités

Le protéasome, une protéase de plus de 2,5 méga daltons, consiste principalement à dégrader les protéines préalablement modifiées par la fixation de la protéine ubiquitine. Le Système ubiquitine-protéasome (SUP) est le principal système protéolytique cytosolique chez les eucaryotes, avec des fonctions essentielles dans le contrôle du cycle cellulaire, l'apoptose, l'inflammation, la transcription, la transduction du signal, le contrôle de la qualité des protéines et de nombreux autres processus biologiques. Le SUP est considéré comme une voie de dégradation spécifique et sélective contrairement à l'autophagie principalement déclenchée en réponse au stress. Le SUP consiste à l'ubiquitination de substrats et à leur dégradation ultérieure précise, et rapide et donc à l'inactivation irréversible des protéines ciblées. La chaîne ubiquitine (Ub) est considérée comme le signal prédominant pour la reconnaissance du substrat par le protéasome. Une cascade d'enzymes E1, E2 et E3, conjuguent l'Ub *via* son extrémité C-terminale aux résidus lysine dans les protéines cibles (**Figure 9**) :

- E1 est l'enzyme activant l'Ub,
- E2 est une enzyme porteuse d'Ub dite « enzyme conjuguant l'Ub »,
- E3 est une enzyme Ub-ligase.

La conjugaison de l'Ub commence par l'activation ATP-dépendante de son résidu glycine C-terminal (G76), l'Ub est ensuite transférée à E2, enfin, l'ubiquitination du substrat est réalisée par la formation d'un complexe constitué d'E2 chargée par l'Ub et d'un E3 spécifique auquel la protéine substrat est liée. L'Ub est transférée du E2 soit directement au résidu lysine du substrat lorsque l'E3 est du type doigt RING, soit au résidu cystéine interne de l'E3 lorsque l'enzyme a un domaine du type HECT « Homologus to the E6AP Carboxyl Terminus ». La conjugaison de l'Ub au substrat se réalise soit sous forme de fragment unique, on parle alors de « monoubiquitination », soit sous forme de plusieurs fragments simples sur différents sites, dits « monoubiquitination multiple », soit sous forme de chaîne, dite « polyubiquitination » (Ciechanover 1994, Finley 2009). Bien que seule les protéines de courtes durées de vies marquées sélectivement par des chaînes Ub sur leurs site K48 semblent être dégradées par le protéasome, il a été montré plus tard que tous les types de chaînes d'Ub seraient impliqués dans la dégradation protéasomique (Saeki et al. 2009, Xu et

al. 2009). La protéine polyubiquitinée est alors transférée au protéasome 26S, le cœur catalytique du SUP.

Le protéasome est constitué de deux assemblages majeurs, la particule de noyau à 28 sous-unités (CP, également connue sous le nom de particule 20S) et une particule régulatrice de 19-20 sous-unités selon l'espèce (RP, également connu sous le nom de 19S et PA700). Le protéasome 20S est une structure en forme de cylindre dont les sous-unités sont disposées en quatre anneaux à sept chaînons empilés. Les sites protéolytiques du protéasome sont séquestrés dans l'espace interne du 20S. Le protéasome 20S possède trois activités protéolytiques différentes telles que la chymotrypsine, la trypsine et la caspase. Le 20S libre contrôle l'accès au substrat dans la chambre protéolytique par un mécanisme qui repose sur la topologie. La particule catalytique 20S se lie avec le complexe régulateur 19S à l'une ou les deux extrémités du cylindre pour former l'holoenzyme 20S-19S, le protéasome 26S. En forme de canal ouvert le protéasome 26S dégrade les protéines polyubiquitinées par hydrolyse de l'ATP. L'unité régulatrice de 19S se lie et élimine les chaînes d'ubiquitine présentes sur les protéines cibles. Les ATPases permettent le déploiement du substrat et l'ouverture du canal des anneaux  $\alpha$  préalable à la translocation des polypeptides dépliés dans le noyau 20S (Murata et al. 2009). Le canal de translocation du substrat est étroit pour empêcher une mauvaise dégradation massive de protéines cytoplasmiques. Ce canal impose le dépliement des protéines par le 19S avant la translocation dans le 20S. De nombreuses protéines permettent la reconnaissance de l'Ub par le protéasome 19S : les sous-unités protéiques du protéasomes 19S peuvent être subdivisées en deux zones : la base et le couvercle. La base présente six sous-unités homologues AAA ATPase : « Regulatory Particle Triple A 1-6 » (RPT1-RPT6) et trois sous-unités non-ATPase « Regulatory Particle Non-ATPase » (RPN1, RPN2 et RPN13). RPN1, RPN13, RPT5 et RPN10 capturent les protéines ubiquitinées soit directement, soit par l'intermédiaire de protéines qui contiennent à la fois des domaines « Ubiquitin-Like » (UBL) et des domaines « Ubiquitin associated » (UBA), tels que « Radiation Sensitive 23 » (RAD23), « Dominant Suppressor Karl 2 » (DSK2), et « DNA damage inducible 1 » (DDI1). Les protéines UBL ou UBA ne sont pas des composantes intégrales du protéasome, elles ne se lient que faiblement au protéasome et sont principalement des composants substochiométriques (Gallastegui and Groll 2010). Le couvercle est composé de neuf sous-unités non-ATPase : RPN3, RPN5-RPN9, RPN11-RPN12 et RPN15. L'activité biochimique du couvercle consiste à déubiquitiner les substrats

capturés par le protéasome 19S pour faciliter leur dégradation, la métalloisopeptidase RPN11 joue un rôle essentiel dans ce processus (Murata et al. 2009).

Par ailleurs, il existe plusieurs mécanismes alternatifs à la dégradation canonique dépendante de l'Ub et de l'ATP qui ne nécessite pas d'ubiquitination et/ou d'hydrolyse de l'ATP.

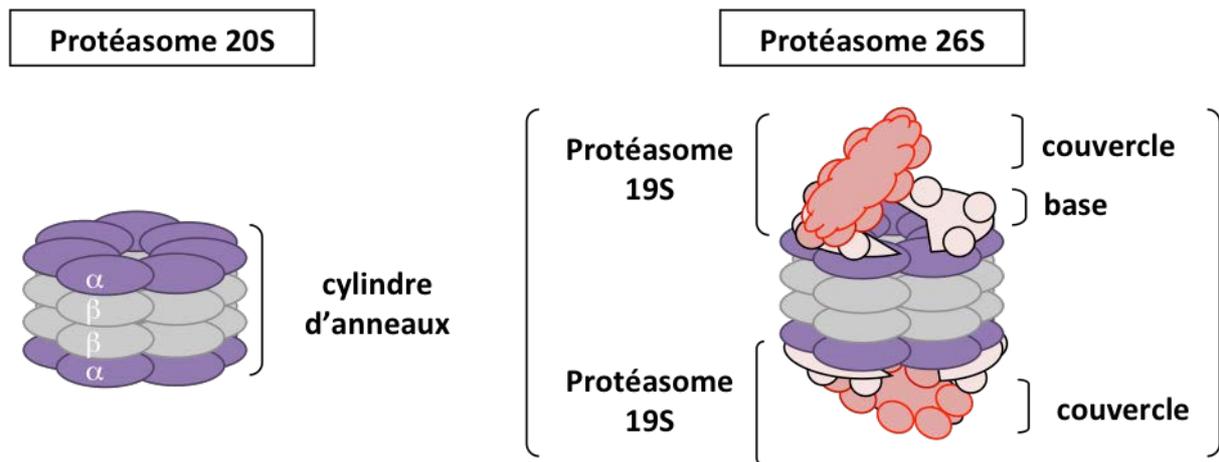


Figure 9 : Représentation schématique de la structure du protéasome 26S. Le protéasome 26S comprend deux sous-complexes : la particule catalytique 20S et la particule régulatrice 19S. Figure réalisée avec SciencesSlides

### **1.7.2. Le système ubiquitine protéasome dans le cancer du côlon**

La plupart des lésions moléculaires menant à la carcinogenèse colorectale sont directement liées au SUP. La voie de signalisation Wnt est une voie de transduction de signal avec une importance particulière dans le développement colorectal et dans la régulation de la prolifération et le renouvellement continu de l'épithélium colorectal (Deitrick and Pruitt 2016). La voie de signalisation Wnt commence par sa liaison au récepteur membranaire « Frizzled » (FZD) composé de sept domaines transmembranaires, et au corécepteur « Low density lipoprotein Receptor-related Protein 5/6 » (LRP5/6) conduisant à la transcription des gènes cibles de Wnt accompagnée de la translocation nucléaire de la  $\beta$ -caténine. En absence d'activation de la voie de signalisation Wnt, la  $\beta$ -caténine est dégradée par le protéasome, grâce au complexe composé d'Axin, APC, la kinase caséine 1 (KC1) et la kinase glycogène synthase-3 $\beta$  (KGS-3 $\beta$ ) permettant l'ubiquitination. KGS-3 $\beta$  et KC1 jouent ensemble un rôle majeur dans la phosphorylation de la  $\beta$ -caténine sur ses résidus sérine et thréonine menant à la polyubiquitination induite par la «  $\beta$ -Transducin repeat-Containing Protein » ( $\beta$ -TrCP). Une fois transloquée la  $\beta$ -caténine s'associe au « T-Cell Factor 4 » (TCF4) qui passe d'un profil répresseur à un profil activateur. La voie de signalisation Wnt joue un rôle important dans le maintien des populations souches. Les nombreuses cibles de Wnt telles que les facteurs de transcription « Octamer-binding transcription factor 4 » (OCT4), « SRY-related - box 2 » (SOX2) et « Kruppel-like factor 4 » (KLF4) sont impliquées dans la pluripotence. Parmi les cibles de Wnt figurent les sous-unités cycline D, c-Myc, AKT kinase et le facteur de transcription AP-1, c-Jun et « Fos-related antigen-1 » (FRA-1), tous importants dans la croissance cellulaire et la prolifération. La voie canonique Wnt est essentielle pour maintenir l'homéostasie dans l'épithélium intestinal. L'activité de la  $\beta$ -caténine est augmentée dans les cellules souches épithéliales ayant une forte prolifération dans le fond des cryptes coliques alors que les cellules des villosités présentent une activité  $\beta$ -caténine plus faible. C'est pourquoi les mutations de la voie de signalisation Wnt sont liées à la cancérogenèse colorectale (Polakis 2007). Les mutations de l'APC sont présentes dans la majorité des cancers colorectaux, cependant les cancers avec APC non-muté présentent souvent des mutations de gain de fonction dans le gène « Catenin  $\beta$  » (CTNNB1), codant pour la  $\beta$ -caténine (Polakis 2012).

De même, d'autres voies de signalisation sont impliquées dans la cancérogenèse colorectale, et elles sont directement liées au SUP.

L'activation de la voie KRAS dans le cancer colorectal conduit à l'activation de plusieurs voies de transduction. La RAF kinase est activée par KRAS et déclenche la cascade MAPK qui conduit à l'activation de facteurs de transcription tels que AP-1. Les composants de ce facteur de transcription tels que c-Jun et c-Fos ainsi que les kinases de la cascade tels que ERK3 sont des substrats du SUP (Voutsadakis 2008). La PI3K kinase est également une cible d'activation KRAS et son activation conduit à l'activation de la kinase AKT. AKT est une sérine / thréonine kinase qui inhibe l'apoptose et favorise la prolifération cellulaire à travers ses multiples cibles, l'AKT (Adachi et al. 2003) et son inhibiteur PTEN sont notamment des substrats de SUP (Wu et al. 2003). Similairement, dans un modèle murin, la protéine en doigt de zinc 149 (RNF149) interagit avec la région C-terminale de l'oncogène BRAF muté dans 10-15 % des cancers colorectaux pour induire son ubiquitination et enfin sa dégradation par le SUP (Hong et al. 2012).

La voie de signalisation TGF $\beta$  est fréquemment impliquée dans le cancer colorectal. Les mutations au sein des tumeurs supprimeur SMAD2 et SMAD4 engendrent leur dégradation par le protéasome (Xu and Attisano 2000). De même, le gène tumeur supprimeur p53 est aussi substrat du protéasome (Tsvetkov et al. 2010, Oren and Kotler 2016). Enfin, le facteur de transcription induisant l'hypoxie « Hypoxia-Inducible Factor-1  $\alpha$  » (HIF-1 $\alpha$ ) est impliqué dans l'angiogenèse et la survie cellulaire. Ce dernier est notamment dégradé par le protéasome en condition normoxique.

## 1.8. Les composés naturels : une source de molécules anticancéreuses

Les produits naturels sont une source d'innovation pour la découverte de nouvelles molécules thérapeutiques. Ainsi, de nombreuses molécules anticancéreuses utilisées en clinique dans la thérapie du cancer sont d'origine naturelle.

### 1.8.1. Les composés naturels dans le cancer du côlon

Les produits naturels présentent des vertus thérapeutiques contre différentes maladies y compris le cancer depuis des milliers d'années (Miyata 2007). Une variété de fruits, de légumes ou de boissons présentent une activité protectrice vis à vis du cancer (Lila 2007). Des études épidémiologiques ont notamment reporté une corrélation inverse entre la consommation de certains aliments et la réduction du risque du cancer (Vainio and Weiderpass 2006). L'activité biologique des produits naturels repose essentiellement sur la présence de composés phytochimiques biologiquement actif tels que : les acides phénoliques, les flavonoïdes, les caroténoïdes, les alcaloïdes et les composés organosulfurés (Wang et al. 2012). L'activité chimiopréventive des composés naturels repose sur différents mécanismes d'action dans le traitement du CCR. Brièvement, les composés naturels présentent la capacité à induire : l'arrêt du cycle cellulaire en inhibant ainsi la prolifération cellulaire ; l'apoptose ; l'inhibition de l'angiogénèse fondamentale pour la croissance tumorale ; la modulation de divers voie de signalisation impliquées dans la progression du cancer telles que MAPK, ERK, JNK, PI3K, AKT ; l'inhibition de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$  caténine fortement activée dans le cancer du côlon, et la réduction de la voie de signalisation de l'oxygénase (Rajamanickam and Agarwal 2008). De nombreux composés naturels exercent une activité anticancéreuse dans le cancer du côlon, parmi eux on compte :

- **L'apigénine**, est l'un des flavonoïdes le plus répandu dans les fruits et légumes. Elle réduit la progression tumorale du cancer du côlon *in vitro* et *in vivo* (Wang et al. 2004, Zhong et al. 2010).
- **La fisétine** est aussi un flavonoïde présent dans de nombreuses plantes. Elle provoque l'apoptose par induction de p53 dans les cellules cancéreuses du côlon (Lim and Park 2009).

- **La curcumine** est un diarylheptanoïde trouvé dans le curcuma. Elle exerce une activité anticancéreuse dans le cancer du côlon *in vitro* et *in vivo* (Prasad et al. 2014), (Jeong et al. 2004).
- **Le resvératrol** est un stilbène, inhibiteur naturel de la prolifération cellulaire, synthétisé par les plantes en réponse au stress environnemental et à l'invasion pathogène (Singh et al. 2013). Le resvératrol induit la suppression de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$  caténine et l'augmentation de la mort cellulaire dans les cellules souches du cancer colorectal (Singh et al. 2013). La combinaison du resvératrol avec la molécule conventionnelle 5-FU augmente l'activité cytotoxique des cellules du cancer du côlon (Fulda and Debatin 2004, Santandreu et al. 2011).
- **Le gallate d'épigallocatechine (GEGC)** est la principale catéchine présente dans le thé vert, c'est un très puissant anti-oxydant. Chez la souris, le GEGC supprime les lésions précancéreuses après traitement par le carcinogène à l'azoxyméthane montrant ainsi son activité chimiopréventive (Shimizu et al. 2008).
- **Le lycopène** est un caroténoïde provenant de la tomate. Il démontre essentiellement une activité anti-oxydante et des effets chimiopréventifs dans le cancer de la prostate mais aussi dans le cancer du côlon (Narisawa et al. 1996).
- **La cocoplume** membre de la famille des anthocyanidols, présente une activité anti-inflammatoire et cytotoxique dans les cellules du cancer du côlon (Venancio et al. 2017).
- **Le sulforaphane** est un composé organosulfuré dérivé des légumes crucifères tels que le brocoli et les choux. Il est connu pour ses propriétés anticancéreuses et anti-oxydantes notamment à travers l'activation de la voie NRF2 (Catanzaro et al. 2017). Dans le cancer du côlon, il induit l'apoptose (Liu et al. 2016, Lan et al. 2017).
- **Le gingérol du gingembre** affecte la progression des cellules cancéreuses du côlon en ciblant la leucotriène A4 hydrolase impliquée dans l'inflammation (Jeong et al. 2009).

En plus de l'évidence expérimentale de l'activité anticancéreuse des composés naturels dans le cancer du côlon, des études cliniques sont en cours (**Tableau III**). Pour illustrer nos propos, la curcumine, a montré l'absence de toxicité à une concentration de 8 mg/jour sur une durée de 3 mois et la présence d'une activité chimiopréventive contre le cancer au cours d'un essai clinique de phase I (Cheng et al. 2001). La curcumine est actuellement évaluée en

combinaison avec l'irinotecan (NCT01859858) ou le 5-FU (NCT02724202). Le resvératrol a aussi montré un effet chimiopréventif chez 20 patients atteints du CCR, son ingestion a induit la réduction de la prolifération tumorale de 5 % (Patel et al. 2010). Toutefois, certaines études cliniques n'ont pas révélé de bénéfices directs entre l'utilisation de composés naturels et la réduction du risque du cancer comme la supplémentation en bêta-carotène qui n'influence pas l'incidence du cancer colorectal (Albanes et al. 2000).

*Tableau III : Tableau récapitulatif des essais cliniques portant sur les composés naturels dans le cancer du côlon.*

| Composés naturels |              | Identifiant essai clinique | Cancer                    | Phase clinique |
|-------------------|--------------|----------------------------|---------------------------|----------------|
| Thé vert          | Catéchine    | NCT01606124                | adénome colorectal avancé | Phase II       |
|                   | GEGC         | NCT02891538                | côlon                     | Phase I        |
|                   |              | NCT01360320                | colorectal                | Phase II       |
| Soja              | Génistéine   | NCT01985763                | côlon                     | Phase I        |
|                   |              |                            | rectal                    | Phase II       |
| Raisin            | Resvératrol  | NCT00256334                | côlon                     | Phase I        |
| Curcuma           | Curcumine    | NCT02724202                | côlon métastatique        | Phase I        |
|                   |              | NCT01859858                | colorectal avancé         | Phase I        |
|                   | Quercétine   | NCT00003365                | colorectal                | Phase I        |
|                   | Anthocyanine | NCT01948661                | adénome colorectal        | Phase II       |

### **1.8.2. L'ail et les composés de la famille des organosulfurés**

Plante aux multiples vertus, l'ail est utilisé depuis des millénaires tant pour ses talents culinaires que ses propriétés thérapeutiques. Le nom scientifique *Allium sativum* désigne l'ail commun, une sous-espèce d'ail appartenant à la famille des liliacées, sous-famille des alliées. L'ail et d'autres plantes de la famille *Allium* sont connus pour leurs vertus thérapeutiques depuis des siècles et de nombreuses propriétés pharmacologiques (hypocholestérolémiant, anticoagulant, anti-oxydant, antibactérien, antiviral et anticarcinogène) sont attribuées à cette famille de plantes. Toutes les grandes civilisations (chinoises, égyptiennes, grecques et romaines) en ont fait l'apologie, en effet les premières

traces écrites remontent à quelques 5000 ans au Moyen-Orient et 3800 ans en Inde. En Egypte ancienne, l'ail était considéré comme le symbole de la force, c'est pourquoi les esclaves participant à la construction des pyramides d'Egypte avaient droit à une ration d'ail quotidienne, pour maintenir et augmenter leurs forces, et leur permettre ainsi d'être plus productif. Les propriétés médicinales de l'ail repose sur le grand nombre de composés sulfurés qu'il détient (Cerella et al. 2011).

Les principaux composés présent dans le bulbe de l'ail sont : **l'alliine (S-allylcystéine sulfoxyde)**, **la  $\gamma$ -glutamyl-S-allylcystéine**, **la méthiin (S-méthylcystéine sulfoxyde)**, **l'isoalliin (S-trans-1-propenylcystéine sulfoxyde)**, **la S-2 et S-carboxypropylglutathione-allylcystéine**, et **la thiacrémone (2,4-dihydroxy-2,5-diméthyl-thiophène-3-one)** (Cerella et al. 2011). Le principal composé soufré, **l'alliine (2)**, est une substance végétale pratiquement dépourvue d'odeur, présente dans le bulbe d'ail frais intact. **L'alliine (2)** est obtenu au cours de l'hydrolyse et l'oxydation de la  **$\gamma$ -glutamyl-S-allylcystéine (9)**, cette réaction est catalysée par l'enzyme  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase. Lorsque la gousse d'ail crue est fraîchement coupée ou broyée, **l'alliine (2)** entre en contact avec l'enzyme vacuolaire **alliinase** qui lyse les cystéines sulfoxydes cytosoliques, et se convertit en **allicine (1)** qui confère son odeur si particulière à l'ail, et surtout ses propriétés pharmacologiques et thérapeutiques, notamment antibactériennes. Rapidement oxydée à l'air, **l'allicine (1)** se transforme elle-même en présence d'eau en polysulfure d'allyle tels que le **sulfure de diallyle (SDA) (3)**, le **disulfure de diallyle (DSDA) (4)**, le **trisulfure de diallyle (TSDA) (5)**, et le **tétrasulfure de diallyle (TTSDA) (8)** (**Figure 10**). Ces molécules sont responsables de l'odeur fortement marquée de l'essence d'ail. E-ajoène, Z-ajoène 2 thioacroléine, et vinylidithine sont d'autres dérivés de **l'allicine (1)** (Cerella et al. 2011).

### 1.8.3. Etudes épidémiologiques

Des preuves épidémiologiques du rôle chimiopréventif et anticancéreux de l'ail montrent une corrélation inverse entre l'apport régulier d'ail et le risque de développer un cancer du côlon (Zhou, Zhuang et al. 2011, Turati, Guercio et al. 2014) un cancer du sein (Challier, Perarnau et al. 1998, Galeone, Pelucchi et al. 2006), un cancer de la prostate (Hsing, Chokkalingam et al. 2002, Galeone, Pelucchi et al. 2006) ou un cancer du poumon (Myneni, Chang et al. 2016). En particulier, un nombre important d'études épidémiologiques a indiqué qu'un régime riche en ail était corrélé à un faible risque de cancer du tractus gastro-

intestinal (Millen, Subar et al. 2007, Zhou, Zhuang et al. 2011, Kodali and Eslick 2015, Turati, Pelucchi et al. 2015). La plupart des études épidémiologiques sont liées à des études cas-témoins documentant la relation inverse entre la consommation d'ail et le risque de cancer. Récemment, une étude cas-témoin italienne et une méta-analyse de 230 cas de cancer et 547 contrôles ont rapporté une relation entre la consommation élevée d'ail et la réduction du risque de cancer gastrique (Turati, Pelucchi et al. 2015). Une importante méta-analyse d'un total de 8621 patients cancéreux et 14889 témoins a confirmé l'association de la consommation de légumes alliés et un faible risque de cancer gastrique (Kodali and Eslick 2015). En outre, une étude bulgare sur 166 patients a décrit l'effet protecteur de la consommation d'ail contre les polypes du gros intestin (Kotzev, Mirchev et al. 2008) en ligne avec les publications précédentes. La question demeure cependant controversée, car la méta-analyse portant sur 5 études prospectives de cohortes a montré que la consommation d'ail cru et cuit ou même de suppléments d'ail n'était pas significativement associée à un risque réduit du cancer colorectal (Dorant, van den Brandt et al. 1996, Satia, Littman et al. 2009, McCullough, Jacobs et al. 2012, Meng, Zhang et al. 2013). En outre, plusieurs études montrent également des associations incohérentes entre la réduction du risque du CCR et la prise de suppléments d'ail (Heine-Broring, Winkels et al. 2015, Chiavarini, Minelli et al. 2016). Néanmoins, de vastes études *in vitro* ont démontré que les COS dérivés de l'ail présentent des propriétés anticancéreuses.

#### **1.8.4. Propriétés chimiques des composés organosulfurés**

L'ail contient des composés organosulfurés (COS) solubles dans l'huile et dans l'eau. Les COS solubles dans l'huile sont le **SDA (3)**, le **DSDA (4)**, le **TSDA (5)** et l'**ajoène (6)**. L'ail a une composition chimique particulièrement diversifiée, lui permettant ainsi d'avoir de nombreux effets thérapeutiques. La présence d'atomes de soufre hautement réactifs joue un rôle crucial dans l'activité biologique des COS. De nombreuses études rapportent une corrélation entre le nombre d'atomes de sulfures et l'activité biologique des polysulfides. Ainsi, les travaux au sein de notre laboratoire et d'autres ont montré que les motifs tri- et tétrasulfane sont les molécules les plus actives (Hosono et al. 2008, Czepukojc et al. 2014). **L'allicine (1)** est une espèce de soufre réactif (ESR) capable d'oxyder les thiols cellulaires tels que les résidus cystéine des protéines et le glutathion. Un pool de glutathion oxydé conduit à un potentiel redox cellulaire ultérieur. L'oxydation des thiols des protéines peut

entraîner des changements structurels des protéines par la formation de ponts disulfures. Par analogie avec **l'allicine (1)**, les disulfures et les polysulfures sont souvent considérés comme oxydants capables de modifier les thiols de protéines induisant ainsi une perturbation concomitante de la fonction des protéines et réponses cellulaires ultérieures, y compris la mort cellulaire. La réaction d'un thiol ( $R'SH$ ) avec un polysulfide ( $RSxR$ ) mène à la formation d'un sulfide mixte ( $RSxR'$ ) et d'un perthiol ( $RSSH$ ). Munchberg et al, (Munchberg et al. 2007) rapportent l'ensemble des réactions chimiques et biochimiques menées par le **TSDA (5)**. Nous pouvons citer brièvement le clivage homolytique des ponts disulfures, les réactions de transfert  $Sx$ , les liaisons hydrophobiques et enfin les liaisons métalliques. Par ailleurs, notre laboratoire et d'autres ont rapporté que les composés organosulfurés affectent le réseau microtubulaire des cellules cancéreuses qui induisent l'arrêt mitotique suivie de l'apoptose (Hosono et al. 2008). En effet, Hosono et al, rapportent une réaction de thiolation entre le **TSDA (5)** et les cystéines C12 et C354 de la tubuline  $\beta$  (Hosono et al. 2008). Ainsi, cette réaction de thiolation avec la tubuline altère la formation d'un axe normal du microtubule au cours de la mitose, et déclenche l'arrêt du cycle cellulaire. Les réactions thiols-polysulfides génèrent des espèces  $RSxH$ , principalement des perthiols, le **TSDA (5)** est donc un générateur du stress oxydatif *via* la production d'ERO d'où, de nombreuses études soulèvent que l'anti-oxydant NAC neutralise l'effet biologique des COS (Munchberg et al. 2007).

### **1.8.5. Mécanisme d'action anticancéreux des dérivés organosulfurés**

Les mécanismes d'action anticancéreux de l'ail ne sont pas encore bien connus, bien que de nombreuses hypothèses existent. Nous distinguons différentes cibles moléculaires telles que la modulation des enzymes anti-oxydantes, la modulation des protéines anti-apoptotiques, l'induction de la mort cellulaire et l'inhibition du cycle cellulaire.

En effet, de nombreuses études ont rapporté que les COS dérivés de l'ail peuvent inhiber la croissance cellulaire du cancer associé à un arrêt mitotique, principalement en phase G2/M. C'est pour la première fois en 1998 que Milner et ses collègues ont montré que le traitement des cellules cancéreuses du côlon HCT-115 avec le **DSDA (4)** provoquait une accumulation qui dépendait de la dose et du temps des cellules en phase G2/M du cycle cellulaire. L'arrêt en phase G2/M est accompagnée d'une diminution de l'activité de la kinase du complexe

cycline B1/CDK 1, une réduction du complexe de formation entre CDK 1 et la cycline B1, et une diminution de la protéine Cdc25C. Ces résultats ne sont pas spécifiques au **DSDA (4)** ou aux cellules HCT-115, en effet les COS inhibent la prolifération de nombreuses lignées cellulaires du cancer (U937, MCF-7, SH-SY5Y). Par ailleurs, Hosono et al., ont démontré que le **TSDA (5)** inhibe la polymérisation de la tubuline  $\beta$  *via* l'oxydation des résidus cystéine C12 et C354 de la tubuline  $\beta$  conduisant à l'arrêt mitotique. De plus, la littérature rapporte que les dérivés de l'oxygène jouent un rôle essentiel dans le processus apoptotique induit par le **DSDA (4)**. Ainsi, le **DSDA (4)** favorise la production des dérivés de l'oxygène dans les cellules du cancer de la prostate PC3 (Chen et al. 2010). Le traitement des cellules de cancer du poumon A549 avec la NAC supprime complètement l'apoptose induite par le **DSDA (4)** révélant ainsi le rôle du stress oxydatif dans l'apoptose induite par le **DSDA (4)** (Wu et al. 2005). En outre, le **DSDA (4)** induit l'apoptose dépendante de la caspase-3 et de la voie mitochondriale (Nagaraj et al. 2010).

#### 1.8.5.1 Inhibition de la prolifération

Selon Hanahan et Weinberg, les cellules cancéreuses acquièrent un potentiel répliatif illimité en raison de l'autonomie du signal de croissance, de l'indifférence aux signaux inhibiteurs de la croissance et de la résistance à l'apoptose (Hanahan and Weinberg 2011). En conséquence, la thérapie anticancéreuse vise à affecter ces caractéristiques pour réduire éventuellement la prolifération incontrôlée de cellules cancéreuses en altérant le processus de division cellulaire, mais aussi en déclenchant la mort cellulaire ou en favorisant la réponse immunitaire (Hanahan and Weinberg 2011). Une propriété anticancéreuse essentielle des COS dérivés de l'ail est associée à sa capacité à inhiber la prolifération cellulaire en induisant l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M (Cerella et al. 2011). Par exemple, la **S-allylmercaptocysteine (SAMC) (7)** bloque la croissance cellulaire de cellules métastatiques de cancer du côlon SW620 et de cellules hépatiques HepG2 par activation de la voie TGF $\beta$  (Tong et al. 2014). De même, le **DADS (4)** inhibe la viabilité cellulaire en induisant l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M suivie de l'apoptose par clivage de la caspase-3 (Yin et al. 2014). Le **DADS (4)** induit l'arrêt mitotique en phase G2/M en diminuant la cycline B1, Cdc2 et ainsi que Cdc25C en activant la voie p21/p53 dans le carcinome épidermoïde œsophagien ECA109. L'arrêt du cycle cellulaire induit par le **DADS (4)** est suivi d'une apoptose par activation des caspases, d'une altération du rapport Bcl-2/Bax et de l'inhibition de la protéine kinase activée par la voie MAPK/ERK (Yin et al. 2014). De plus, le **TSDA (5)** induit l'arrêt

en phase G2/M dans les cellules du cancer de la prostate LNCAP et les lignées cellulaires de cancer du côlon HCT-116 en réduisant CDK 1, Cdc25B et C menant à l'inactivation de CDK 1 par phosphorylation de son résidu Tyr 15. L'exposition au **TSDA (5)** conduit à l'accumulation de la cycline B1 et de la sécurine, qui contrôle la transition métaphase-anaphase. Finalement, la fragmentation de l'ADN apoptotique s'est produite dans les deux lignées cellulaires (Xiao et al. 2009).

### 1.8.5.2 L'organisation des microtubules

Plusieurs études ont décrit les microtubules comme la principale cible des COS. Les microtubules des composants clés du cytosquelette, essentiels à l'intégrité cellulaire, au trafic intracellulaire, à la transduction du signal, à la division cellulaire et à la mitose. Compte tenu de leur rôle important dans la prolifération cellulaire et la réponse au stress, les microtubules sont devenus des cibles importantes dans le développement de médicaments anticancéreux (Parker et al. 2014). Hosono et al. ont montré dans un système sans cellules que le **TSDA (5)** induit la dépolymérisation de la tubuline bien que le **DSDA (4)** et le **DAS (3)** n'aient pas montré d'effet sur la polymérisation de tubuline. Dans les cellules d'adénocarcinome colorectal DLD-1, **TSDA (5)** dépolymérise l'organisation du réseau microtubulaire, l'analyse de masse peptidique a révélé une oxydation des résidus de cystéine par le **TSDA (5)** sur les résidus Cys-12 $\beta$  et Cys-354 $\beta$  (Hosono et al., 2005). Dans notre laboratoire, Kelkel et al. ont montré que le tétrasulfure de diallyle (**TTSDA (8)**) inhibe la polymérisation de la tubuline *in vitro* (Kelkel et al. 2012). En comparant l'effet des poly-allyl sulfures sur la dépolymérisation des tubulines, les auteurs ont démontré que l'inhibition *in vitro* de la polymérisation des tubulines dépend essentiellement du nombre d'atomes de soufre et que le **TTSDA (8)** présente le meilleur potentiel anticancéreux.

### 1.8.5.3 Les protéines de la famille Bcl-2

D'autre part, les protéines de la famille Bcl-2 sont impliquées dans la voie apoptotique mitochondriale, et constituent donc une cible attrayante dans le développement de médicaments anticancéreux. Les COS modulent les trois classes principales de protéines de la famille Bcl-2. Les COS induisent une régulation négative de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Cerella et al. 2009). Dans les cellules U937 de leucémie myéloïde aiguë le **TTSDA (8)** réduit les taux d'expression des protéines Bcl-2 concomitantes à l'apparition des produits de

protéolyse Bcl-2 (Kelkel et al. 2012). En outre, Shin et coll., ont montré que le **DSDA (4)** réduit l'expression de la protéine Bcl-2 dans les cellules DU145 du carcinome de la prostate humaine, et que le domaine interagissant avec la protéine pro-apoptotique BH3 déclenche l'apoptose (Shin et al. 2012). De même, Wang et al. ont démontré que le **TSDA (5)** modifie les protéines de la famille Bcl-2 par l'augmentation du rapport Bax/Bcl-2 conduisant à une apoptose améliorée dans les cellules de cancer de la vessie T24 (Wang et al. 2010). Les COS activent les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak qui sont impliquées dans la perméabilisation de la membrane mitochondriale conduisant à la libération du cytochrome c. De manière intéressante, le **TTSDA (8)** induit des changements conformationnels de la protéine Bcl-2 conduisant ainsi à l'activation des deux protéines pro-apoptotiques Bak et Bax dans les cellules U937 (Cerella et al. 2009). Ces résultats montrent un rôle non-redondant de Bak et Bax dans la mort cellulaire induite par le **TTSDA (8)**. Le **TTSDA (8)** induit notamment la phosphorylation multisite de la protéine Bcl-2 en activant la voie JNK dans les cellules U937, la phosphorylation de Bcl-2 est suivie de sa protéolyse (Kelkel et al. 2012).

#### 1.8.5.4 Les voies de signalisation kinase

Le rôle pro-apoptotique des COS dérivés de l'ail est décrit dans une large gamme de lignées cellulaires cancéreuses. L'arrêt mitotique en phase G2/M est généralement suivi d'apoptose. De nombreuses découvertes mettent en évidence que les COS affectent des voies kinase-dépendantes précédant et modulant l'apoptose. L'activation de la voie JNK est commune à plusieurs COS dans divers modèles cellulaires. L'**allicine (1)** (**Figure 10**) active la voie JNK dans les cellules cancéreuses ovariennes (Xu et al. 2014), la **SAMC (7)** l'active dans les cellules cancéreuses colorectales humaines (Zhang et al. 2015) et le **TSDA (5)** l'active dans des cellules de cancer de la vessie humaine pour déclencher l'apoptose (Shin et al. 2014). L'**ajoène (6)** induit une génération d'ERO par l'activation de la voie JNK contribuant ainsi partiellement à l'apoptose dans les cellules d'adénocarcinome pulmonaire (Wang et al. 2015). Similairement, le **DSDA (4)** inhibe la voie MAPK/ERK dans les xénogreffes ECA109 (Yin et al. 2014) et dans le carcinome épidermoïde œsophagien (Yin et al. 2014). Le **DAS (3)** inhibe la voie MAPK/ERK dans les cellules cancéreuses du côlon humain Colo 320 DM (Sriram et al. 2008). Les COS inhibent également les lipides kinases, le **DSDA (4)** et le **TSDA (5)** induisent une apoptose par inhibition de la voie PI3K/AKT dans la prostate (Shin et al. 2012) et des cellules de cancer de la vessie (Shin et al. 2014), respectivement. Plus récemment, le potentiel du **TSDA (5)** à induire l'apoptose en supprimant

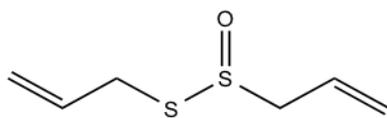
la voie NF- $\kappa$ B par la dégradation protéasomique de TRAF6 dans le lymphome d'effusion (Shigemi et al. 2016).

#### 1.8.5.5 L'équilibre rédox

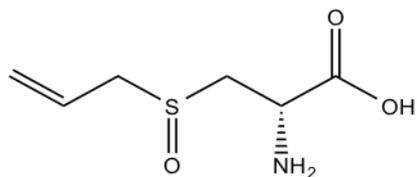
L'équilibre rédox est crucial pour l'homéostasie cellulaire et les altérations de cet équilibre conduisent au stress oxydatif (Durackova 2010). Contrairement aux cellules normales, les cellules tumorales ont un seuil plus élevé de stress oxydatif (Reuter et al. 2010). Les ERO favorisent la survie cellulaire et la prolifération cellulaire par l'activation de plusieurs voies de survie telles que NF- $\kappa$ B, MAPK/ERK et PI3K/AKT cibles des COS (Durackova 2010). Récemment, Kim et al., ont montré que le **TSDA (5)** induit une réponse anti-oxydante à travers la voie NRF2/KEAP-1 en ciblant la cystéine 288 de KEAP-1 dans les cellules épithéliales gastriques humaines. Les auteurs ont indiqué que le potentiel anti-oxydant de **DAS (3)**, **DSDA (4)** et **TSDA (5)** dépend du nombre d'atomes de soufre selon l'ordre suivant : TSDA > DSDA > DAS (Kim et al. 2014). Ces résultats sont en ligne avec les résultats antérieurs de Liu et al. (Liu et al. 2006) où le **TSDA (5)** réduit le stress oxydatif à travers l'activation de la voie de signalisation NRF2/hème oxydase (HO) -1 par l'intermédiaire de la voie PI3K/AKT dans des cellules neurales B35 (Xu et al. 2015). Les COS dérivés de l'ail ont également des propriétés prooxydantes (Xiao et al. 2005, Das et al. 2007, Kim et al. 2007, Busch et al. 2010, Na et al. 2012). L'inhibition des ERO avec le traitement par la NAC supprime l'induction de l'apoptose par l'**ajoène (6)** montrant le rôle important de la génération d'ERO pour induire l'apoptose dans les cellules cancéreuses d'adénocarcinome pulmonaire (Wang et al. 2015). De façon similaire, le **TSDA (5)** induit la production d'ERO suivie de l'apoptose dans les cellules de cancer du sein humain (MCF-7 et MDA-MB-231). La surexpression de la superoxyde dismutase (SOD) réduit la production des ERO en renversant l'effet apoptotique du **TSDA (5)** (Chandra-Kuntal et al. 2013). Outre les ERO, la modulation des thiols pourrait être déterminant dans les activités biologiques attribuées aux COS. L'interaction des COS avec des groupes thiols tels que les cystéines et le GSH conduit à la modification de l'équilibre redox et induit des changements conformationnels des protéines de tubuline et Bcl-2, cibles connues des COS. Le **TTSDA (8)** n'induit pas de génération d'ERO dans les cellules U937, en revanche l'anti-oxydant NAC reverse l'effet du **TTSDA (8)** sur le cycle cellulaire suggérant un effet oxydatif lié à la diminution du pool de GSH anti-oxydant (Kelkel et al. 2012).

### 1.8.6. Le TTSDDB, dérivé synthétique du TTSDA

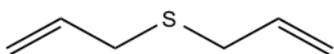
Le **TTSDA** et le **TSDA** font parmi les polysulfanes les plus prometteurs dans la recherche contre le cancer. Le mécanisme d'action de ces molécules repose sur l'interaction des groupements des polysulfanes avec les résidus de cystéine présents à la surface de nombreuses protéines ou enzymes particulièrement réactives et abondantes dans les cellules (Czepukojc et al. 2014). D'un point de vue pharmacologique, ces composés sont des huiles qui limitent leur solubilité. De plus, ces composés sont peu stables à température ambiante et ils dégagent une forte odeur désagréable qui rend difficile son application clinique. Afin de surmonter ces inconvénients inhérents, Czepukojc et al. (Czepukojc et al. 2014) ont investi dans le développement de nouveaux dérivés qui conservent le motif biologiquement actif du **TTSDA** (tétra sulfure), cependant ils ont remplacé les deux groupements allyle par différents groupements afin d'améliorer les propriétés liées à l'odeur, la stabilité et la solubilité. L'analyse comparative des différents dérivés tels que : diethyl-3,3' -dipropionate-tétrasulfane, 3,3' -Dipropanoic acid tétrasulfane, 1,4-Dibenzyltétrasulfane (**TTSDB**) e, 1,4-Bis(2-ethoxyethyl)-tétrasulfane a mis en évidence que le **TTSDB** est le polysulfane le plus performant dans l'induction de la cytotoxicité dans les cellules cancéreuses hématopoïétiques (Czepukojc et al. 2014). Le **TTSDB** présente une meilleure solubilité que le **TTSDA**. Sous forme de poudre, le **TTSDB** est moins volatile et sent moins fort. Son absorption est notamment augmentée grâce à sa lipophilie appropriée. Pour ce faire, nous avons choisi d'investiguer le rôle du **TTSDA/TTSDB** dans le traitement du cancer du côlon.



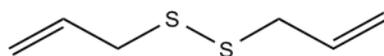
**Allicine (1)**



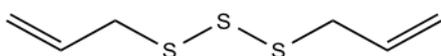
**Alliine (2)**



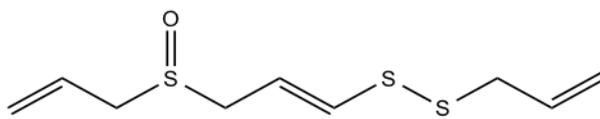
**Sulfide diallyle (SDA) (3)**



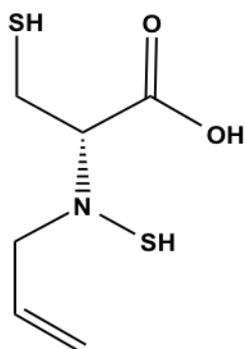
**Disulfide diallyle (DSDA) (4)**



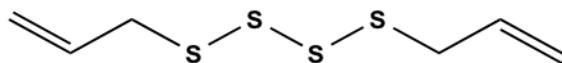
**Trisulfide diallyle (TSDA) (5)**



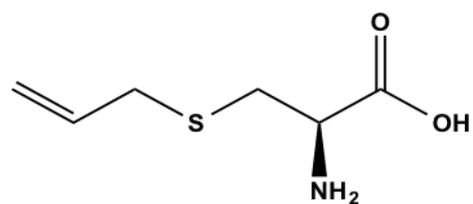
**Ajoène (6)**



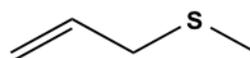
**S-allylmercaptocystéine (SAMC) (7)**



**Tétrасulfide diallyle (TTSDA) (8)**



**S-allylcystéine (SAC) (9)**



**Sulfide méthyl allyle (SMA) (10)**

Figure 10 : Structures chimiques des principaux composés organosulfurés.

**En conclusion de l'introduction :**

**- Le CCR est parmi le cancer le plus fréquent au Luxembourg comme en Europe. De nombreux travaux ont permis d'établir une stratification du CCR selon le contexte génétique afin de faciliter la prise en charge des patients en personnalisant le traitement. En plus des chimiothérapies conventionnelles telles que le 5-FU et l'oxaliplatine, de nouvelles thérapies ciblées (anti-EGFR, anti-VEGF) ont intégré l'arsenal thérapeutique du CCR. Cependant, la prise en charge des CCR au delà du stade II est limitée par la résistance aux chimiothérapies.**

**- Les microtubules sont les éléments clés de la mitose, ils sont essentiels dans la progression du cancer. De nombreuses molécules anticancéreuses ciblant les microtubules sont utilisés dans le traitement de différentes tumeurs solides. Cependant, les poisons du fuseau ne sont pas utilisés dans le traitement du CCR en raison de plusieurs facteurs de résistance liés aux isoformes de la tubuline ou à la surexpression de la GPP.**

**- Les voies cataboliques telles que l'autophagie et le protéasome sont mutuellement impliquées dans l'homéostasie cellulaire. De nombreuses molécules anticancéreuses modulent ces voies cataboliques. L'autophagie est un processus physiologique fondamental pour l'homéostasie de l'épithélium intestinale. Cependant, l'autophagie joue un rôle dual en fonction du stade du cancer. Il semble judicieux d'évaluer le rôle de l'autophagie dans le traitement du CCR.**

**- De nombreuses études décrivent l'effet des polysulfanes sur le cancer. Ces propriétés révèlent le potentiel anticancéreux des COS et leurs nombreuses cibles moléculaires encouragent à élucider les mécanismes d'actions impliqués par les COS en vue d'une utilisation thérapeutique ou chimiopréventive. La découverte de nouvelles molécules ciblant les microtubules permettra de cibler la thérapie du cancer et même de designer de nouvelles combinaisons thérapeutiques.**

# OBJECTIFS

D'un point de vue épidémiologique, un régime alimentaire riche en polysulfanes est relié à une réduction du risque d'incidence du cancer du côlon suggérant le potentiel préventif des polysulfanes contre le cancer du côlon (Turati et al. 2014). De nombreuses études ont confirmé l'activité anticancéreuse des COS dans différentes lignées cellulaires *in vitro* et *in vivo*. Une caractéristique mécanistique commune des COS est leur capacité à inhiber la prolifération cellulaire conduisant à une accumulation des cellules en phase G2-M suivie de la mort cellulaire par apoptose (Kelkel et al. 2012, Yin et al. 2014). En collaboration avec Pr. Claus Jacob (Université de la Sarre, Saarbrücken, Allemagne), nous avons synthétisé le dérivé dibenzyl du tétrasulfure de diallyl (TTSDA), le tétrasulfure de dibenzyle (TTSDB). Nous avons montré *in vitro* que la tubuline est une cible thérapeutique du TTSDA/TTSDB responsable de l'arrêt mitotique dans les cellules hématopoïétiques (Kelkel et al. 2012) suggérant une éventuelle interaction entre les polysulfides de TTSDA/TTSDB et la tubuline. Les molécules ciblant les microtubules représentent une classe de médicaments largement utilisés dans les combinaisons de traitement de divers types de tumeurs cependant, ils ne sont pas en usage clinique dans le traitement du cancer du côlon en raison de leur chimiorésistance. Cette résistance est associée à la réduction de la captation-intracellulaire et à l'augmentation de l'efflux de ces agents anticancéreux, expliquant la diminution de leur concentration intracellulaire et l'augmentation de l'expression de la GPP (Sparreboom et al. 1997). De plus, les différents isoformes de tubuline n'ont pas la même susceptibilité vis à vis des agents ciblant les microtubules. Ensuite, de nombreux travaux ont attribué un rôle de résistance à l'autophagie dans la réponse thérapeutique du cancer du côlon, alors que la perturbation du flux autophagique sensibilise ces cellules à la mort (Li et al. 2010).

L'autophagie joue un rôle pro-tumeur dans les stades avancés du cancer du côlon, et la dynamique des microtubules est fondamentale à ce stade. D'une part les microtubules vont permettre à la cellule d'atteindre des foyers secondaires et d'autre part ils vont favoriser la progression de l'autophagie qui est un moyen nutritif essentiel à la survie de la cellule détachée de sa matrice extracellulaire.

L'hypothèse de ce projet de thèse est que les polysulfures de diallyl (TTSDA et TTSDB) interagissent avec la tubuline pour altérer l'organisation du réseau microtubulaire, responsable de l'inhibition de la croissance des cellules du cancer du côlon et de la modulation du flux autophagique, qui finalement induisent les cellules du cancer du côlon à la mort par apoptose.

Pour ce faire, nos travaux auront les objectifs spécifiques suivants :

**a) Tout d'abord nous analyserons l'interaction du TTSDA et du TTSDB avec la tubuline :**

- a. Afin d'évaluer la cible pharmacologique primaire du TTSDA/TTSDB, dans un premier temps, nous évaluerons la liaison du TTSDA et du TTSDB avec la tubuline par spectrométrie de masse MALDI-TOF-MS.
- b. Ensuite, nous analyserons l'impact du TTSDA et du TTSDB sur l'organisation des microtubules dans différentes lignées cellulaires. Nous choisirons différentes lignées cellulaires mutées sur différents oncogènes (KRAS et BRAF) et à des stades différents (métastatique et non-métastatique).

**b) Nous évaluerons le rôle anticancéreux du TTSDA/TTSDB dans le cancer du côlon :**

- a. Les microtubules sont fondamentaux dans le cycle de division cellulaire. Nous évaluerons l'effet du TTSDA/TTSDB sur la prolifération cellulaire des lignées cellulaires choisies. Premièrement, par l'analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux (marquage à l'iodure de propidium), puis par l'analyse de l'expression de la protéine cycline B1, marqueur du cycle cellulaire par western blot. Aussi, nous évaluerons l'activité anticancéreuse du TTSDA/TTSDB *via* l'évaluation de l'apoptose : par l'étude de la morphologie du noyau, par l'analyse du clivage des protéines caspases-3/-7 et de l'activité enzymatique liée à ces protéines.
- b. Nous supposons pouvoir cibler le cancer du côlon avec le TTSDA/TTSDB. Pour ce faire, nous envisagerons d'analyser son effet sur différentes lignées de cellules dans un milieu de culture tridimensionnel. Nous évaluerons l'impact du TTSDA/TTSDB sur la formation de colonies puis sur la formation de sphéroïdes. Comme modèle *in vivo*, nous envisagerons d'utiliser les poissons zèbre (*Danio rerio*) auxquels nous

introduirons les cellules HT-29 préalablement traitées avec le TTSDA/TTSDB.

- c. Nous comparerons l'effet du TTSDA/TTSDB à celui de la vinblastine, et de la vincristine connues pour leurs propriétés d'agents altérants les microtubules.

**c) Nous analyserons l'effet de l'altération du réseau microtubulaire sur la progression de l'autophagie et le rôle de cette dernière au cours d'un arrêt mitotique prolongé :**

- a. Nous analyserons dans un premier temps la morphologie des cellules HT-29 traitées avec le TTSDA et le TTSDB par microscopie électronique à transmission afin de surveiller la formation de vésicules autophagiques et leur modulation. En même temps, nous analyserons la conversion de la protéine LC3-I en LC3-II, marqueur des autophagosomes par western blot. Nous confirmerons nos résultats par la formation de point GFP-LC3, marqueur des autophagosomes après transfection des cellules HT-29 avec le plasmide GFP-LC3. Nous analyserons aussi l'expression la protéine p62, un marqueur-clé de l'autophagie, par western blot. Afin d'évaluer l'effet du TTSDB sur le flux autophagique, nous utiliserons la bafilomycine, inhibiteur des pompes à protons.
- b. Finalement, nous essayerons d'élucider le rôle de la modulation de l'autophagie dans la réponse thérapeutique du TTSDA et du TTSDB en ciblant la protéine p62 après extinction du gène séquestosome 1 codifiant la protéine p62.
- c. Nous comparerons aussi l'effet du TTSDA et du TTSDB sur l'autophagie à celui de la vinblastine et vincristine.

En résumé, ce projet vise à évaluer le rôle de l'autophagie comme mécanisme de survie lors d'un arrêt mitotique prolongé induit à la suite de l'altération du réseau microtubulaire et d'identifier la réponse thérapeutique selon les différents sous-types génétiques du cancer du côlon. Ce projet permettra notamment d'envisager un ciblage thérapeutique selon le profil génétique du cancer du côlon.

# MATÉRIELS ET MÉTHODES

## 1.1. Culture cellulaire

Les cellules HT-29 sont des cellules épithéliales établies en 1964 à partir des cellules d'adénocarcinome du cancer du côlon humain d'une femme caucasienne âgée de 44 ans (Huet et al. 1987). Ces cellules non polarisées présentent un phénotype indifférencié et une mutation du gène BRAF. La différenciation des cellules HT-29 peut conduire à la formation de différentes sous-populations avec des phénotypes différents. La différenciation peut être induite par de nombreuses méthodes dont les substances anticancéreuses telles que le méthotrexate ou le 5-FU.

Les lignées cellulaires SW480 et SW620 sont des cellules épithéliales dérivées d'un adénocarcinome du cancer du côlon humain d'un même patient mâle caucasien âgé de 50 ans. Les cellules SW480 sont issues de l'adénocarcinome primaire alors que les cellules SW620 sont issues d'un ganglion lymphatique d'un site métastatique du cancer du côlon. Les cellules SW480 présentent les caractéristiques des entérocytes. Une fois différenciées, elles présentent une polarisation cellulaire et une morphologie cylindrique avec des microvillosités sur la surface apicale. Les cellules SW620 sont quant à elles moins différenciées, de forme sphérique avec l'absence de microvillosités à leurs surfaces. Les cellules SW620 au caractère invasif, présentent un cycle de division cellulaire plus rapide que les cellules SW480 (Leibovitz et al. 1976). Ces deux lignées cellulaires présentent une mutation du gène KRAS et une amplification du gène c-Myc (Donzelli et al. 1999).

Les cellules U937 sont dérivées d'un lymphome histiocytique diffus d'un homme de 37 ans datant de 1974 (Sundstrom and Nilsson 1976). Ces cellules ont les propriétés et caractéristiques des monocytes. Elles peuvent aussi se différencier en macrophages matures sous l'action de nombreux stimuli tels que l'ester de phorbol.

Les cellules K562 sont originaires d'une leucémie myéloïde chronique développée par une femme âgée de 53 ans (Lozzio and Lozzio 1975). Cette lignée est immortalisée. Toutes ces cellules sont cultivées dans un milieu RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*, Lonza, Verviers, Belgique) supplémenté avec 1 % de pénicilline/streptomycine et 10 % de sérum de veau foetal (SVF), et placées dans une atmosphère à 37 °C et 5 % de CO<sub>2</sub>. Pour la maintenance, le passage des cellules est réalisé en fonction de leur confluence. Après

trypsination et centrifugation, les cellules adhérentes sont ensemencées à une concentration de  $3 \times 10^5$  cellules/ml à raison de deux passages par semaine. Le passage des cellules en suspension est aussi réalisé à raison de deux passages par semaine et à une concentration de  $2 \times 10^5$  cellules/ml.

## **1.2. Traitements**

### **1.2.1. Traitements avec les composés organosulfurés**

Le TTSDB et le TTSDA sont synthétisés par le laboratoire du Professeur Claus Jacob de l'Université de la Sarre (Allemagne) (Czepukojc et al. 2014). Ils sont solubilisés dans du diméthyle sulfoxyde (DMSO, Sigma-Aldrich, Bornem, Belgique) à une concentration stock de 50 mM conservés à  $-80$  °C.

### **1.2.2. Autres traitements**

#### **1.2.2.1 Agents altérant les microtubules**

La vinblastine, la vincristine et le paclitaxel (Teva® Pharma, Petach Tikva, Israël) sont dissouts en solution injectable. Le traitement des cellules HT-29, SW480 et SW620 a été effectué sur les cellules en phase exponentielle de croissance.

## **1.3. Inhibition de l'autophagie**

Afin d'analyser le flux autophagique dans les cellules HT-29, SW480 et SW620, nous avons utilisé la bafilomycine A1 (Sigma-Aldrich), inhibiteur de la fusion autophagosome- lysosome à une concentration de 10 nM pendant 2 heures à la fin du traitement par le TTSDB. Nous avons aussi utilisé PP242 (Sigma-Aldrich), inhibiteur de la voie mTOR à une concentration de 10  $\mu$ M pendant 12 heures de traitement comme contrôle positif. Nous avons aussi maintenu les cellules HT-29, SW480 et SW620 dans la solution « Hank's Buffered Salt Solution » (HBBS) (NaCl : 8,0 g ; KCl : 0,4 g ; CaCl<sub>2</sub> : 0,14 g ; MgSO<sub>4</sub> : 0,1 g ; MgCl<sub>2</sub> : 0,1 g ; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : 0,06 g ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 0,06 g ; NaHCO<sub>3</sub> : 0,35 g ; H<sub>2</sub>O à compléter pour 1 litre) pendant 12 h et 24 h afin d'induire l'autophagie par privation de nutriments comme contrôle positif.

### **1.3.1.1 Inhibition de la synthèse des protéines**

Afin d'analyser l'effet de l'inhibition de la synthèse des protéines dans les cellules HT-29, nous avons utilisé l'inhibiteur de la traduction protéique la cycloheximide (Sigma-Aldrich) 10  $\mu$ M pendant 8 heures avant le traitement par le TTSDB ou pendant 24 h en co-traitement avec le TTSDB.

### **1.3.1.2 Inhibition du protéasome**

Afin d'évaluer l'activité enzymatique du protéasome dans les cellules HT-29 nous avons utilisé l'inhibiteur MG132 ciblant l'activité catalytique du protéasome (Millipore, Calbiochem, Louvain, Belgique) comme contrôle positif à une concentration effective de 5  $\mu$ M pendant 4 heures avant le traitement par le TTSDB ou pendant 24 h en co-traitement avec le TTSDB.

## **1.4. Evaluation de la viabilité cellulaire**

### **1.4.1. Coloration d'exclusion au bleu de Trypan**

Au cours de la maintenance cellulaire, la viabilité cellulaire est mesurée par coloration d'exclusion au bleu de Trypan. Nous avons prélevé 20  $\mu$ l de cellules auxquelles nous avons ajouté 20  $\mu$ l de bleu de Trypan (BioWhittaker®, Lonza). En s'infiltrant dans les membranes plasmiques endommagées, le bleu de Trypan colore les cellules mortes, à l'opposé les cellules vivantes, dont la membrane intacte rejette activement le colorant dans le milieu extracellulaire, apparaissent incolores. Les cellules sont comptées de manière semi-automatique par un compteur de cellules Cedex XS (Innovatis, Roche, Indianapolis, Indiana, USA) qui fournit la concentration cellulaire (cellules/ml) ainsi que le pourcentage de viabilité selon le principe de la coloration au bleu de Trypan.

### **1.4.2. Test de viabilité MTT**

La viabilité cellulaire est notamment évaluée par le test MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5diphenyl tetrazolium) qui consiste à doser l'activité métabolique de la cellule. Le sel de tétrazolium MTT est réduit en formazan par la succinate déshydrogénase mitochondriale de la cellule vivante. Ce produit forme alors un précipité violet dans la

mitochondrie, la quantité de précipité formée est proportionnelle à la quantité de cellules actives métaboliquement. L'expérience est réalisée en plaque de 96 puits, les cellules HT-29, SW480 et SW620 ont étéensemencées à une concentration de 10 000 cellules/puits dans un volume de 100 µl puis incubées pendant 24 heures avant d'être traitées pendant 24, 48 et 72 h avec le TTSDB, le TTSDA (0, 1, 5, 10, 25, 50, 75 et 100 µM), la vincristine, la vinblastine et le paclitaxel (0, 1, 5, 10, 20, 50, 75, et 100 nM).

Nous avons ajouté 100 µl de réactif MTT (5 mg/ml) dans chaque puits, que nous avons laissé incuber pendant 4 heures à 37 °C. Après l'incubation, le réactif est remplacé par 50 µl de DMSO afin de dissoudre les précipités de formazan. L'absorbance optique est mesurée par spectrophotométrie (SpectraMax Gemini EM, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) à 540 nm. Le calcul de la concentration d'inhibition (CI<sub>50</sub>) est déterminé par interpolation d'une courbe logarithmique établie à partir des données d'absorbance optique en fonction de la concentration donnée sur logiciel Excel.

## **1.5. Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux**

### **1.5.1. Principe**

La cytométrie en flux est une technique permettant d'étudier rapidement les caractéristiques individuelles de chaque particule telles que la taille, la forme et la complexité. Les signaux optiques émis par la cellule sont acheminés vers des systèmes de détection.

Les signaux recueillis donnent des informations sur les propriétés physiques intrinsèques de la cellule telles que:

- « Forward Scatter » (FSC) : lumière diffuse aux petits angles qui renseigne sur la taille des particules
- « Side Scatter » (SSC) : lumière diffusée à 90 ° qui renseigne sur la forme, la structure interne et la granularité des particules.

Les signaux détectés donnent notamment des informations relatives aux propriétés optiques induites par la fluorescence, à la suite de marquages spécifiques des structures ou des fonctions cellulaires. Les filtres lumineux et dichroïques permettent l'analyse de trois fluorescences en plus de la lumière blanche:

- FLH-1 : capteur qui détecte les fluorescences émises dans le vert (530/540 nm)

- FLH-2 : capteur qui détecte les fluorescences émises dans l'orange (575/625 nm)
- FLH-3 : capteur qui détecte les fluorescences émises dans le rouge (613/720 nm)

Les données ainsi recueillies se présentent sous forme de nuages de points (dots plots) ou d'histogrammes auxquels s'ajoutent des statistiques concernant les populations cellulaires et les paramètres étudiés.

### **1.5.2. Analyse du cycle cellulaire par marquage à l'iodure de propidium**

Pour chaque échantillon, environ un million de cellules sont détachées pas trypsine, puis lavées au tampon phosphate salin (phosphate buffered saline) (PBS 1X) (NaCl 8 g/l, KCl 0,2 g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,44 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 g/l) puis fixées à l'éthanol 70 % pendant minimum 30 minutes à 4°C. Après incubation, les cellules fixées sont lavées deux fois au PBS 1X par centrifugation (5 minutes, 1200 rpm), puis incubées pendant 20 minutes dans une solution d'iodure de propidium (1 µg/ml) supplémentée avec 10 µg/ml d'ARNase. La distribution du cycle cellulaire de chaque échantillon est étudiée par cytométrie en flux (Becton Dickinson FACScalibur) pilotée par son logiciel Cell Quest Pro® (Becton Dickinson, Erembodegen\_Aalst, Belgium) qui intègre les paramètres de taille, de granulosité et de fluorescence de chaque cellule. L'interprétation des résultats est réalisée grâce au logiciel d'analyse FlowJo® (FlowJO LCC, Oregon, USA). L'intensité de la fluorescence émise augmente en fonction de la quantité d'ADN permettant ainsi de distinguer les différentes phases du cycle cellulaire. En effet, chaque cellule génère une impulsion de fluorescence dont nous mesurons l'amplitude. La fonction FLW considère la largeur alors que la fonction FL2A considère l'aire. Dans le cas du marquage à l'iodure de propidium, l'aire est analogue au contenu de l'ADN et la largeur correspond au temps mis par la cellule pour franchir entièrement le laser. Les doublets sont des cellules accolées considérées comme particule unique, elles sont source d'erreur. Pour les éliminer nous utilisons les deux paramètres FLW et FL2A.

## **1.6. Evaluation de l'apoptose**

### **1.6.1. Quantification de l'apoptose par microscopie**

L'analyse morphologique du noyau repose sur un marquage au colorant Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, Bornem, Belgique). Un million de cellules sont marqués pendant 15 minutes à 37° C avec une solution de Hoechst 33342 (1 µg/ml), un dérivé de benzimidazole qui se lie préférentiellement aux bases adénine-thymine de l'ADN. Le colorant Hoechst 33342 permet ainsi d'observer la morphologie nucléaire par microscopie fluorescence (Leica, Luxembourg, Luxembourg). Le Hoechst émet une fluorescence bleue à la suite d'une excitation à l'UV. Le noyau des cellules apoptotiques apparaît condensé et/ou fragmenté, à l'opposé les cellules vivantes présentent un noyau circulaire avec une chromatine homogène et moins dense. La quantification des cellules apoptotiques repose sur le comptage d'au moins 300 cellules dans trois champs optiques indépendants, et permet d'obtenir le pourcentage de cellules apoptotiques.

### **1.6.2. Mesure de l'activité enzymatique des caspases**

L'analyse de l'activité enzymatique des caspases est réalisée à l'aide du kit « Caspase-3/7 Glo Assay », « Caspase-8 Glo Assay » et « Caspase-9 Glo Assay » (Promega, Madison, USA). Chaque kit fournit un substrat de caspase luminogène, un système tampon optimisé pour l'activité de la caspase, de la luciférase et de la lyse cellulaire. La réaction consiste à la lyse des cellules, suivie du clivage du substrat par la caspase permettant de libérer l'aminoluciférine luminescente, qui émet une lumière après avoir été transformée par la luciférase. 300 000 cellules/puits sontensemencées 24 heures avant le traitement avec les concentrations respectives du TTSDB (10 µM, 50 µM et 100 µM) à des temps respectifs (24, 48 et 72 heures). Après le détachement des cellules par la trypsination, nous prélevons de chaque puits 20 000 cellules que nous transférons dans un volume de 50 µl dans une plaque de 96 puits. Après mélange du tampon et du substrat présents dans le kit, 50 µl de ce mélange sont ajoutés aux cellules. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, la lumière émise est détectée par luminomètre.

### **1.6.3. Mesure de l'activité protéolytique du protéasome**

L'activité protéolytique du protéasome a été déterminée à l'aide du kit « Proteasome-Glo™ Chymotrypsine-like, Trypsin-like and Caspase-like Cell-Based Assays » (Promega, Madison, USA) constitué de trois essais bioluminescents homogènes qui mesurent séparément les trois activités protéolytiques associées au protéasome. Le protéasome est un complexe multicatalytique situé dans le noyau et le cytosol de toutes les cellules eucaryotes responsable de la protéolyse de protéines ubiquitinées (Murata et al. 2009). Le « Proteasome-Glo Assay » contient trois substrats peptidiques luminescents : Succinyl-leucine-leucine-valine-tyrosine-aminoluciférine, Z-leucine-arginine-arginine-aminoluciférine et Z-norleucine-norleucine-proline-aspartate-aminoluciférine correspondant aux activités chymotrypsine, trypsine et caspase respectivement. Les cellules HT-29 sontensemencées à raison de 10 000 cellules par puits dans une plaque 96 puits. Après 24 heures d'incubation à 37 °C les cellules sont traitées avec 50 µM de TTSDB pendant, 3, 6, 9, 24 et 48 heures. En parallèle, les cellules HT-29 sont traitées avec 5 et 10 µM de l'inhibiteur protéasomique MG132 pour servir de contrôle négatif. Le tampon de réaction est ajouté aux cellules traitées ou non (dilution 1 : 1), puis l'ensemble est incubé à température ambiante pendant 10 minutes sous agitation dans l'obscurité. Le signal lumineux est ensuite mesuré au luminomètre (Orion Microplate Luminometer, Berthold, Pforzheim, Germany). En présence d'activité protéolytique le substrat est clivé et induit la génération d'un signal luminescent produit par la luciférase proportionnel à l'activité du protéasome dans la cellule.

## **1.7. Etude de l'autophagie**

### **1.7.1. Etude des altérations morphologiques liées à l'autophagie**

Après 24 heures d'ensemencement de 300 000 cellules/puits, les cellules HT-29 ont été traitées avec 50 µM de TTSDB, 3 nM de vinblastine et 5 nM de vincristine et pendant 24, 48 et 72 heures. Pour chaque échantillon, un million de cellules sont détachées à la trypsine et lavées au PBS 1X. Les cellules ont été fixées au glutaraldéhyde 2,5 % dilué dans le tampon cacodylate 0,1 M (pH 7,2) pendant 1 heure à 4 °C. Une fois fixées, les cellules sont lavées deux fois avec le tampon cacodylate 0,1 M (pH 7,2). Les cellules sont conservées jusqu'à l'analyse à 4 °C. La préparation des images (inclusion, coupe, et observation) a été réalisé en collaboration avec le service de microscopie de la Faculté de Médecine, Université de

Lorraine, France sous la direction de Pr. Christo Christov ainsi que l'Université Nationale de Séoul, Corée du Sud.

### **1.7.2. Evaluation du flux autophagique par microscopie à fluorescence**

Les cellules HT-29 ont étéensemencées dans les chambres de culture sur lame « Millicell® EZ slide » (Merck Millipore Ltd, Cork, Ireland) à raison de 130 000 cellules par chambre. Le lendemain, le jour de la transfection, 0,75 µg d'ADN plasmidique pSELECT-GFP-hLC3 (psetz-gfplc3, Invivogen, Toulouse, France) est dilué dans 100 µl de milieu RPMI 1640 en l'absence de sérum et d'antibiotiques. Ensuite, 4 µl de réactif Lipofectamine LTX® (ThermoFisher Scientific, Gent, Belgique), est ajouté à l'ADN dilué afin de former le complexe ADN-Lipofectamine qui sera incubé pendant 30 minutes avant d'être ajouté aux cellules. La transfection dure 30 heures minimum à 37 ° C, puis les cellules sont traitées au TTSDB pendant 24 heures. Ensuite les cellules ont été lavées, la lame a été démontée du système lame-chambre puis les lamelles déposées avant la quantification des points GFP-LC3 dans les cellules GFP-LC3 positives grâce au microscope à fluorescence (Olympus, Aartselaar, Belgium) en présence ou en absence de bafilomycine A1 (10 nM).

## **1.8. Analyse de l'expression des protéines par western blot**

### **1.8.1. Principe**

Le western blot ou transfert de protéines permet la détection et l'identification de la quantité et de la taille d'un extrait protéique. Soumis à un champ électrique les protéines préalablement dénaturées migrent sur le gel polyacrylamide selon leur taille.

### **1.8.2. Extraction des protéines**

Pour chaque échantillon dix millions de cellules adhérentes sont détachées à l'aide d'un scrapeur. Les cellules sont lavées au PBS 1X et centrifugées à 1 200 g pendant 5 minutes. Ces culots sont suspendus dans une solution tampon de lyse MPER® (Mammalian Protein extraction Reagent, Perbio, Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) supplémenté

d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases : Complete (Roche), Phénylméthylsulfonylfluoride (PMSF) à 5 mM (Sigma) et d'inhibiteurs de phosphatases : PhosphoStop (Roche) 10 mM, fluorure de sodium (NaF) à 5 mM et d'ortho-vanadate (Sigma) à 1 mM. Ces échantillons sont placés sous agitation forte à 4 °C pendant 15 minutes, puis centrifugés à 15 000 g pendant 15 minutes à 4 °C. Le surnageant de chaque échantillon est prélevé et dosé par la méthode de Bradford, puis stocké à -80 °C.

### **1.8.3. Dosage des protéines par la méthode de Bradford**

Toutes les protéines sont dosées selon la méthode de Bradford basée sur le changement d'absorbance se manifestant par le changement de la couleur du bleu de Coomassie après liaison aux acides aminés des protéines. Chaque échantillon est dilué dans un volume de 160 µl auquel 40 µl de réactif de Bradford (Biorad, Temse, Belgique) est ajouté. Après incubation de 20 minutes sur glace, l'absorbance est lue à 590 nm avec un photospectromètre SpectraCount™ (Hewlett Packard, Santa Rosa, CA, USA) pilotée par le logiciel Plate-Reader. La concentration de chaque échantillon est déterminée grâce à l'équation de droite de la gamme standard du sérum albumine bovine (SAB, de 1 à 20 µg/ml).

### **1.8.4. Transfert et hybridation**

Pour la migration, un volume d'extrait protéique correspondant à 20 ou 40 µg de protéines est ajouté à un volume de tampon de chargement concentré 4X composé de β-mercaptoéthanol, de glycérol, de sodium dodecyl sulfate (SDS) et de bleu de bromophénol. Les protéines sont dénaturées par chauffage à 100 °C pendant 5 minutes. Elles sont ensuite chargées sur le gel polyacrylamide (composé du gel de concentration à 4 % et du gel de séparation 10 % ou 15 %), dans lequel elles migrent pendant 1,30 h à 150 Volt. Les protéines sont transférées sur une membrane de polyvinylidène de difluorure (PVDF) (GE Healthcare, Diegem, Belgique) dans une cuve sous tension à 100 Volt.

Pour l'hybridation, les membranes sont saturées dans une solution PBS-tween 1X (PBS-T) (Sigma-Aldrich, Bornem, Belgique) contenant 5 % de lait ou de SAB, puis incubée avec l'anticorps primaire et secondaire couplé à la peroxydase de Raifort (« horseradish peroxydase » (HRP)) selon les conditions décrites dans le **Tableau IV**. Les membranes sont lavées entre chaque incubation par 3 bains successifs dans du tampon de lavage PBS-T 1X.

La révélation se fait grâce au substrat ECL (enhanced chemiluminescence) (GE Healthcare, Diegem, Belgique) étalé sur la membrane. La luminescence émise est enregistrée et quantifiée par le système ImageQuant LAS 4 000 mini (GE Healthcare, Diegem, Belgique).

*Tableau IV : Liste des anticorps primaires utilisés*

*(PN : pendant la nuit, TA : température ambiante, SAB : sérum albumine bovine, PBS : phosphate buffered solution)*

| Anticorps Primaire | Fournisseur    | Référence | Origine | Blocage                 | Dilution        | Temps d'incubation | Dilution Secondaire      | Temps d'incubation | Poids Protéine kDa |
|--------------------|----------------|-----------|---------|-------------------------|-----------------|--------------------|--------------------------|--------------------|--------------------|
| Actine $\beta$     | Sigma          | A5316     | Souris  | Lait 5% PBS-Tween-1h-TA | 1/10000 lait 5% | 1h- TA             | 1/10000-lait-anti-souris | 1h-TA              | 42                 |
| Bcl-XL             | BD Pharmingen  | 610212    | Lapin   | Lait 5% PBS-Tween-1h-TA | 1/1000 lait 5%  | PN 4°C             | 1/4000-lait-anti-lapin   | 1h-TA              | 33-30              |
| Caspase-3          | Santa Cruz     | sc-56052  | Souris  | Lait 5% PBS-Tween-1h-TA | 1/1000 lait 5%  | PN 4°C             | 1/4000-lait-anti-souris  | 1h-TA              | 30/17/10           |
| Caspase-7          | Cell Signaling | 9494      | Souris  | Lait 5% PBS-Tween-1h-TA | 1/1000 lait 5%  | PN 4°C             | 1/4000-lait-anti-souris  | 1h-TA              | 35/30/20           |
| Caspase-8          | Cell Signaling | 9746      | Souris  | Lait 5% PBS-Tween-1h-TA | 1/1000 SAB 5%   | PN 4°C             | 1/4000-lait-anti-souris  | 1h-TA              | 57/43/18           |
| Caspase-9          | Cell Signaling | 9502      | Lapin   | Lait 5% PBS-Tween-1h-TA | 1/1000 lait 5%  | PN 4°C             | 1/5000-lait-anti-lapin   | 1h-TA              | 47/37/35           |
| Cycline B1         | Millipore      | 92590     | Souris  | Lait 5% PBS-Tween-1h-TA | 1/1000 lait 5%  | PN 4°C             | 1/4000-lait-anti-souris  | 1h-TA              | 58                 |
| LC3                | Sigma          | 27755     | Lapin   | Lait 5% PBS-Tween-ON-4° | 1/1000 lait 5%  | 2h TA              | 1/20000-lait-anti-lapin  | 1h-TA              | 13-15              |
| p62                | Santa Cruz     | sc-28359  | Souris  | Lait 5% PBS-Tween-1h-TA | 1/1000 lait 5%  | PN 4°C             | 1/4000-lait-anti-souris  | 1h-TA              | 62                 |
| p-Bcl-xL           | Santa Cruz     | sc-101644 | Lapin   | Lait 5% PBS-Tween-1h-TA | 1/1000 SAB 5%   | PN 4°C             | 1/4000-SAB-anti-lapin    | 1h-TA              | 26                 |
| Lamine B           | Santa Cruz     | sc-6216   | Chèvre  | Lait 5% PBS-Tween-1h-TA | 1/1000 lait 5%  | 2h TA              | 1/4000-lait-anti-chèvre  | 1h-TA              | 67                 |
| Tubuline alpha     | CallBiochem    | CP06      | Souris  | Lait 5% PBS-Tween-1h-TA | 1/5000-PBS-T    | 1h- TA             | 1/5000-lait-anti-souris  | 1h-TA              | 60                 |

## **1.9. Evaluation de l'expression des ARNm par RT-PCR en temps réel**

### **1.9.1. Extraction de l'ARNm**

Deux millions de cellules HT-29 sont lysées dans 500 µl de TRIzol® (Invitrogen). Une fois homogénéisées, 100 µl de 1-bromo-3-chloropropane est ajouté au mélange cellules-TRIzol, le tout est mixé au vortex puis incubé à température ambiante pendant 3 minutes. Ensuite, le mélange est centrifugé à 14 000 g pendant 15 minutes, à 4 °C. La phase aqueuse contient les ARNm, qui sont récupérés puis précipités avec 250 µl d'isopropanol. Mixés par vortex les échantillons sont placés 30 minutes à -20 °C. Ensuite, les échantillons sont centrifugés pendant 10 minutes à 14 000 g à 4 °C. Les culots sont séchés et lavés avec 500 µl d'éthanol 75 % dilué à l'eau ultra pure. Puis ce mélange est centrifugé pendant 5 minutes à 8600 g à 4 °C. Les culots sont placés à 40 °C pendant 3 minutes afin d'éliminer complètement l'éthanol. Les ARNm sont resuspendus dans 60 µl d'eau ultra pure, la concentration des ARN est calculée à partir de l'absorbance des échantillons à 260 nm à l'aide du spectromètre Nanodrop (ThermoFisher Scientific, Gent, Belgique).

### **1.9.2. PCR en temps réel**

#### **1.9.2.1 Transcription inverse**

La transcription inverse consiste à former l'ADNc complémentaire à partir d'ARNm totaux selon le kit « SuperScript First-Strand » (Synthesis System, Invitrogen, ThermoFisher Scientific). On ajoute un mix de 2 µl de dNTP et « Random Hexamers » dans 2 µg d'ARN, incubé pendant 5 minutes à 65 °C, puis transféré sur la glace pour pendant 5 minutes. Ensuite, un second mélange contenant 2 µl de DTT (DL-Dithiothreitol), 4 µl de MgCL<sub>2</sub>, 2 µl de « 10X RT buffer », 1 µl « Rnase Out » et 1 µl « Superscript III » (Synthesis System, Invitrogen, ThermoFisher Scientific) est ajouté dans chaque échantillon. Ces derniers sont incubés pendant 10 minutes à 25 °C, puis 50 minutes à 50 °C et enfin 5 minutes à 85 °C. Enfin les ARN sont digérés avec 1 µl d'ARNase H à 37 °C pendant 20 minutes. Les ADNc sont conservés à -20 °C.

Tableau V : Séquence des oligonucléotides utilisés lors de l'amplification des gènes par PCR.

| Gène<br>Cible  | Séquence sens                | Séquence anti-sens          |
|----------------|------------------------------|-----------------------------|
| SQSTM1         | 5'-GAGGATCCGAGTGTGAATTCCT-3' | 5'-CTTCTTTTCCCTCCGTGCTCC-3' |
| HO-1           | 5'- TGAACTCCCTGGAGATGACTC-3' | 5'-AGCTCCTGCAACTCCTCAAA-3'  |
| Actine $\beta$ | 5'-CTCTTCCAGCCTTCCTTCCT-3'   | 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'  |

### 1.9.2.2 Amplification par PCR en temps réel.

L'amplification de 2 ng d'ADNc est réalisée en présence de Power SYBR® Green PCR Master Mix 1x (Applied Biosystems, Halle, Belgium), de 0.1  $\mu$ M d'amorces sens et anti-sens spécifiques du gène d'intérêt (**Tableau V**). L'amplification de l'ADN est réalisée par PCR (Polymerase Chain Reaction) en temps réel (7300 Real Time PCR System, Applied Biosystems) piloté par le logiciel « 7300 System » suivant le programme de 40 cycles:

- dénaturation à 95 °C pendant 15 secondes
- hybridation et amplification à 60 °C pendant 60 secondes

Une courbe de dissociation est réalisée afin de vérifier l'absence d'amplification de produits aspécifiques, et l'absence de formation de dimères d'amorces. Les données sont obtenues sous formes de Ct (Cycle threshold) qui correspond au seuil de détection des produits de PCR.

Les résultats sont analysés selon les deux équations suivantes à chaque temps indiqué:

- $2^{-\Delta Ct} = 2^{-(Ct \text{ gène cible} - Ct \text{ gène rapporteur})}$
- $2^{-\Delta(\Delta Ct)} = 2^{-((Ct \text{ gène cible traité} - Ct \text{ gène rapporteur traité}) - (Ct \text{ gène cible contrôle} - Ct \text{ gène rapporteur contrôle}))}$

Le gène rapporteur est l'actine  $\beta$ .

## 1.10. Evaluation de l'extinction de gène par le mécanisme de l'ARN interférence

Nous avons choisi les siARN de Qiagen (Qiagen, Venlo, Pays Bas) ciblant des transcrits spécifiques du gène SQSTM1 pour induire son extinction. Nous avons utilisé siARN 5 et siARN 6 ciblant les transcrits suivants : NM\_001142298 (2931 pb), NM\_001142299 (2848 pb) et NM\_003900 (2923 pb). Pour ce faire, les cellules HT-29 sontensemencées à raison de 150 000 cellules/puits dans une plaque de culture de 6 puits. Les cellules HT-29 ont été transfectées 24 heures après l'ensemencement en utilisant 10  $\mu$ l du

réactif INTERFERin® (Polyplus transfection®, Strasbourg, France) et une concentration finale de siARN de 25nM, puis incubées pendant 72 heures. Ces mêmes cellules transfectées ont été réensemencées à raison de 150 000 cellules/puits puis transfectées une seconde fois le lendemain. Les cellules ont été traitées avec le composé d'intérêt 48 heures après la transfection. L'analyse de l'expression de la protéine du gène cible a été réalisée par western blot.

## **1.11. Evaluation de l'équilibre rédox**

### **1.11.1. Mesure de la production d'espèces réactives de l'oxygène**

La sonde diacétate de 2', 7' dichlorofluorescéine (H<sub>2</sub>DCFDA) a permis de mesurer le taux d'espèces réactives de l'oxygène générées dans la cellule. Dès que H<sub>2</sub>DCFDA pénètre dans la cellule, il est la cible d'estérases qui le déacétylent en dichlorofluorescéine non – fluorescente (DCFH). En présence d'ERO DCFH est oxydée en dichlorofluorescéine fluorescente (DCF). Les cellules HT-29 sont ensemencées dans un plaque 96 puits à raison de 10 000 cellules par puits, après 24 heures d'incubation à 37°C, les cellules HT-29 sont traitées à rebours au TTSDB pendant 30 minutes, 1, 3, 6, 9 et 24 heures. Avant la fin du traitement, les cellules sont marquées avec 10 µM de H<sub>2</sub>DCFDA (D-399, Life technologies Invitrogen, Gent, Belgique) pendant 20 minutes, à l'abri de la lumière et à 37°C. La plaque 96 puits est ensuite analysée au fluoromètre SpectraMax Gemini EM piloté par le logiciel SoftmaxPro5 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Les cellules HT-29 sont traitées avec 100 µM de tert butyl hydroperoxide (Sigma-Aldrich, Bornem, Belgium) pendant 4 heures pour servir de contrôle positif.

## **1.12. Evaluation de l'effet du TTSDB dans un modèle 3D**

### **1.12.1. Test de viabilité d'un sphéroïde**

#### **1.12.1.1 Formation d'un sphéroïde selon la technique «goutte suspendue»**

Les cellules HT-29 ont été ensemencées à raison de 1000 cellules/30 µl de milieu RPMI-1640 avec différentes concentrations de TTSDB (10 µM, 50 µM et 100 µM). Ce volume est déposé sur le couvercle d'une boîte de pétri retourné permettant ainsi la suspension de la goutte et favorisant le regroupement des cellules HT-29 induisant la

formation d'un sphéroïde. Après 4 jours d'incubation, les images du sphéroïde sont prises par le microscope Olympus, et l'aire du sphéroïde est calculée par Image J.

#### **1.12.1.2 Mesure de la viabilité**

La viabilité des sphéroïdes est mesurée à l'aide du kit « CellTiter-Glo® 3D » qui consiste à mesurer le taux de cellules viables en quantifiant l'ATP qui sert d'indicateur d'activité métabolique. Les sphéroïdes formés par la technique de la «goutte suspendue» sont transférés dans une plaque 96 puits et le tampon de réaction est ajouté aux cellules traitées ou non (volume/volume), puis l'ensemble est incubé à température ambiante pendant 10 min sous agitation à l'abri de la lumière. Le signal luminescent est mesuré grâce à un luminomètre (Orion Microplate Luminometer, Berthold, Pforzheim, Germany), et est proportionnel au taux d'ATP présent dans le milieu et à la viabilité des cellules.

#### **1.12.2. Test clonogénique**

Le test de survie cellulaire clonogénique permet d'évaluer la capacité proliférative d'une cellule à former un clone et des colonies viables. Le potentiel cytotoxique d'un composé est directement corrélé à sa capacité à inhiber le potentiel clonogénique d'une cellule. Ainsi, 3000 cellules dans le cas des cellules HT-29 et SW380 ou 2000 cellules dans le cas des cellules SW620 sontensemencées dans le milieu semi-solide Methocult™ (STEMCELL™ technologies, Vancouver, Canada) avec différentes concentrations de TTSDB (10 µM pour les cellules SW480 et SW620 et 50 µM pour les cellules HT-29). Ces cellules sont incubées pendant 10 jours, après incubation 200 µl (12 mM) de MTT (Life Technologies, Paisley, United Kingdom) sont ajoutés aux cellules afin de visualiser les cellules viables. Les puits sont photographiés par Gel Doc™ XR (Biorad, California, USA), puis le nombre de colonies/puits est quantifié par Image J.

## 1.13. Analyse Bioinformatique

### 1.13.1. Analyse transcriptomique différentielle des lignées cellulaires choisies

Les analyses ont été réalisées en utilisant la plate-forme R et Bioconductor (Team 2014). Les données ont été récupérées en utilisant *GEOquery* (Davis and Meltzer 2007). Notre étude a porté sur l'ensemble de données GSE20298 (Spitzner et al. 2010), contenant 44 échantillons de 12 lignées cellulaires. L'expression différentielle a été calculée pour les comparaisons suivantes : SW620 contre SW480, SW620 contre HT-29 et SW480 contre HT-29 en utilisant le paquet *limma* (Ritchie et al. 2015) et la méthode TREAT. Les p-valeurs ont été ajustées pour les comparaisons multiples en utilisant la méthode de Benjamini et Hochberg (FDR) (Benjamini and Hochberg 1995). Nous avons considéré les gènes ayant une multiplication d'expression supérieure à 2 et une p-valeur ajustée inférieure à 0,05 comme significatifs (McCarthy and Smyth 2009).

### 1.13.2. Analyse de l'association entre l'autophagie et la survie du patient

L'analyse de l'autophagie est réalisée à partir des données d'expression des protéines impliquées dans l'autophagie. Les données ont été extraites de l'ensemble provisoire de données du cancer du côlon du TGCA (Cancer Genome Atlas 2012) en utilisant le paquet *cgdsr* (Jacobsen 2017). Les groupes ont été définis sur la base de niveaux normalisés d'expression des protéines (score  $z$ ) : les patients ont été définis comme ayant un profil d'expression faible ( $z$ -score  $< 0$ ) ou élevé ( $z$ -score  $> 0$ ). Pour l'autophagie, les groupes ont été définis à partir de la combinaison des expressions de bécline 1 et p62 les échantillons avec des niveaux élevés de bécline 1 et des niveaux faibles de p62 ont été considérés comme une « autophagie élevée » ( $N = 104$ ), alors que les échantillons avec des niveaux de bécline 1 faible et de p62 élevés étaient considérés comme une « autophagie basse » ( $N = 120$ ). Les échantillons avec des niveaux mixtes pour ces protéines ont été placés dans le groupe intermédiaire ( $N = 260$ ). Les courbes de survie ont été analysées via le test log-rank (Mantel-Haenszel), en utilisant le paquet *survival* (Therneau 2015). Toutes les analyses ont été réalisées dans l'environnement R (Team 2014).

## 1.14. Analyse de spectrométrie de masse : MALDI-TOF

### 1.14.1. Principe

La spectrométrie de masse MALDI-TOF (SM-MALDI-TOF) (matrix-associated LASER desorption and ionisation, time of flight) est une technique analytique permettant de détecter et d'identifier les molécules par l'analyse de la masse et de la charge de leurs ions. Typiquement, un spectromètre de masse comporte : une source d'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI), un analyseur à temps de vol (TOF), un détecteur et un système informatique pour traiter le signal.

Son principe repose sur la séparation en phase gazeuse des molécules en fonction du rapport masse/charge ( $m/z$ ).

MALDI : L'échantillon à analyser est d'abord cristallisé avec une matrice pour le protéger d'un contact direct avec le faisceau ionisant et éviter sa dégradation. L'échantillon est ensuite soumis à une source laser qui consiste à ioniser les molécules de l'échantillon. Les ions générés seront libérés des protéines puis accélérés dans un champ électrique.

TOF : Après leur passage dans le champ électrique, les ions sont séparés en fonction de leur charge et de leurs poids moléculaire. Les ions sont ensuite détectés en fonction du temps qu'ils mettent pour atteindre le détecteur. Les grosses molécules mettront plus de temps à atteindre le détecteur que les petites molécules. Une fois que l'ion atteint le détecteur, le signal est amplifié, informatisé et transposé dans un spectre.

Spectre : Les données obtenues génèrent un spectre où chaque pic correspond à un type de molécule. L'axe des ordonnées correspond à l'intensité relative du signal de chaque ion et l'axe des abscisses représente la taille de la molécule détectée en Daltons. Ce spectre de masse peut être comparé à d'autres spectres de référence intégrés dans la base de données.

### 1.14.2. Produits chimiques et réactifs

Tous les solvants étaient de qualité HPLC. L'acétonitrile provient de ThermoFisher Scientific (Geel, Belgique). Le méthanol (MeOH) et l'eau ont été achetés auprès de VWR International (Louvain, Belgique). L'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB) et l'acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxy-cinnamique (ACHC) ont été obtenus auprès de Sigma-Aldrich (St Quentin-

Fallavier, France). Le Trifluoroacetic acid (TFA) a été acheté auprès de Merck Schuchardt (Hohenbrunn, Allemagne). La tubuline HTS (pureté de 97 %) et le tampon de la tubuline proviennent de Cytoskeleton (Boechout, Belgique). Pour les échantillons incubés, les étapes de séparation ont été réalisées en utilisant un filtre centrifuge MICROCON avec une coupure de masse de 30 000 Da sur un MiniSpin d'Eppendorf (Millipore, Molsheim, France).

#### **1.14.2.1 Analytes**

Le TTSDA et le TTSDB ont été dissous dans du méthanol pur pour obtenir une solution mère de  $10^{-2}$  M. Les solutions filles ont été préparées dans de l'eau avec 5% de méthanol à raison de  $10^{-3}$  M,  $10^{-4}$  M et  $10^{-5}$  M. En raison de leur instabilité, les solutions filles ont été préparées quotidiennement.

#### **1.14.2.2 Tubuline**

Le tampon a été mis en suspension dans 10 ml d'eau déionisée pour donner un tampon de 100 mM de force (PIPES 80 mM,  $MgCl_2$  2 mM, EGTA 0,5 mM pH 7,0). La tubuline a été reconstituée dans un tampon G-PEM dans différentes proportions conduisant à des concentrations de  $7,3 \times 10^{-5}$ ,  $1,45 \times 10^{-4}$  M et  $2 \times 10^{-5}$  M.

#### **1.14.2.3 Matrice**

Différentes matrices et conditions de solvants ont été évaluées pour analyser l'interaction du TTSDA et du TTSDB avec la tubuline par SM-MALDI-TOF. Ils sont listés dans le **Tableau VI**. Tous les dépôts ont été réalisés en utilisant la méthode des gouttelettes séchées avec un rapport analyte/matrice de 1 à 1.

Tableau VI : Liste des matrices testées et des conditions de solvant (DHB = Acide DiHydroxyBenzoïque, ACHC = Acide  $\alpha$ -Cyano Hydroxy Cinamique).

| N° | Composition   |
|----|---|
| 1  | 2,5-DHB 1M dans MeOH - eau (50/50, v/v) + TFA 0,1 %   |
| 2  | 2,5-DHB 0.1M dans MeOH - eau (50/50, v/v) + TFA 0,1 % |
| 3  | 2,5-DHB 1M dans MeOH - eau (50/50, v/v).              |
| 4  | 2,5-DHB 1M dans ACN - eau (50/50, v/v) + TFA 0,1 %    |
| 5  | 2,5-DHB 0.1M dans ACN - eau (50/50, v/v) + TFA 0,1 %  |
| 6  | 2,5-DHB 1M dans ACN - eau (50/50, v/v).               |
| 7  | ACHC 1M dans ACN - eau (50/50, v/v) + TFA 0,1 %       |
| 8  | ACHC 0.1M dans ACN - eau (50/50, v/v) + TFA 0,1 %     |
| 9  | ACHC 1M dans ACN - eau (50/50, v/v).                  |
| 10 | ACHC 1M dans MeOH - eau (50/50, v/v) + TFA 0,1 %      |
| 11 | ACHC 0.1M dans MeOH - eau (50/50, v/v) + TFA 0,1 %    |
| 12 | ACHC 1M dans MeOH - eau (50/50, v/v).                 |

### 1.14.3. SM-MALDI-TOF

L'analyse SM-MALDI-TOF a été réalisée sur un spectromètre de masse TOF/TOF ultraflex Bruker II (Bruker Daltonik GmbH, Brème, Allemagne) équipée d'une source d'ions de type SCOUT 384, et d'un laser pulsé à azote (337 nm, modèle VSD- 337ND, Laser Science Inc., Boston, Massachusetts, USA) avec une énergie de sortie de 400  $\mu$  J/impulsion. Les ions ont été accélérés sans conditions d'extraction retardée en mode réflectron de masse d'ions positifs avec la source d'ions 1 (IS1) fixé à 25,13 kV, la source d'ions 2 à 21,18 kV (84,4 % IS1), la lentille à 9,05 kV (36 % IS1) et le réflecteur étant réglé à 26,43 kV (13,87 kV [réflexion 52,5 %]), en utilisant la méthode « RP\_0-1kDa.par ». Toutes les données spectrales résultent de quatre séries de 200 prises de vues laser provenant de quatre endroits différents ([M + H] + pour les différentes espèces). Les ions positifs ont été accélérés avec un délai d'extraction de 200 ns. La pression de la source était de 10<sup>-6</sup> mbar et la pression de l'analyseur était de 10<sup>-7</sup> mbar. Les spectres de masse ont été acquis manuellement, en

utilisant le logiciel FlexControl (Bruker Daltonik GmbH), en accumulant quatre séries de 1000 images laser, et l'analyse respective a été effectuée en utilisant le logiciel FlexAnalysis. L'étalonnage interne a été effectué en utilisant des pics de matrice DHB ou ACHC, en fonction de la matrice utilisée. Les pics de DHB utilisés étaient : le pic monoisotopique DHB, m/z 154,02606 ( $M^+$ ), m/z 155,03389 ( $[M + H]^+$ ), m/z 273,03936 ( $[2M-2H_2O]^+$ ), m/z 137,0233 ( $[M-OH]^+$ ), m/z 308,0532 ( $[2M]^+$ ) et les valeurs des adduits de DHB avec des ions tels que  $Na^+$  (m/z 177,0158) et  $K^+$  (m/z 192,9898). Les pics ACHC utilisés étaient : le pic de monoisotopique ACHC, m/z 189,0420 ( $M^+$ ), m/z 190,0454 ( $[M + H]^+$ ), m/z 379,0925 ( $[2M]^+$ ) et m/z valeurs des adduits de ACHC avec  $K^+$  m/z 228,00575.

### **1.15. Analyse statistique**

Les analyses statistiques reposent sur la moyenne d'au moins trois expériences indépendantes  $\pm$  écart type. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 6.0 (La Jolla, Californie, États-Unis) ; les test statistiques correspondent à l'ANOVA à sens unique ou bidirectionnel suivi d'analyses post-hoc indiquées ou au test de Student. Les valeurs p inférieures à 0,05 ont été considérées comme statistiquement significatives.  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$ (\*\*),  $p < 0,001$ (\*\*\*) et  $p < 0,0001$ (\*\*\*\*).

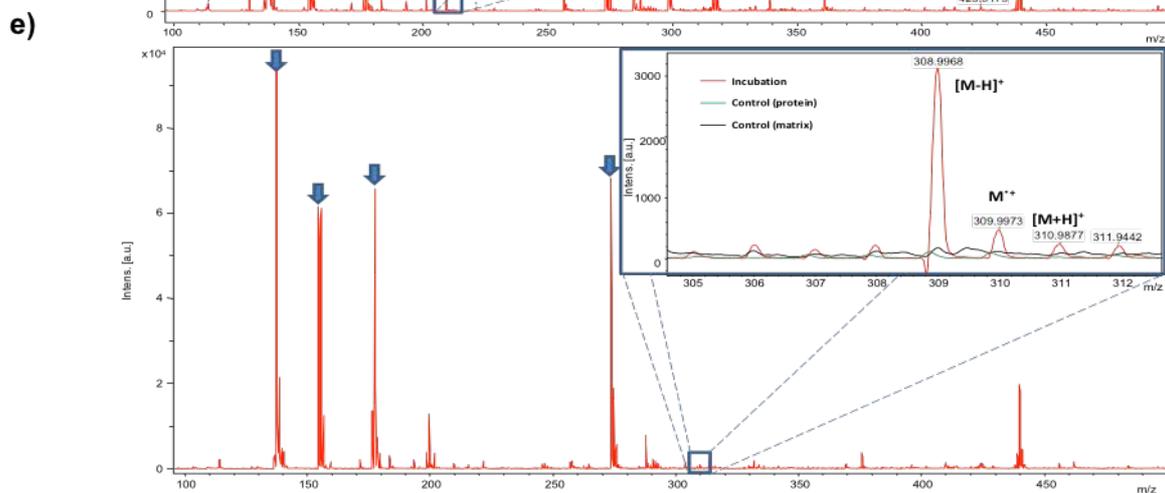
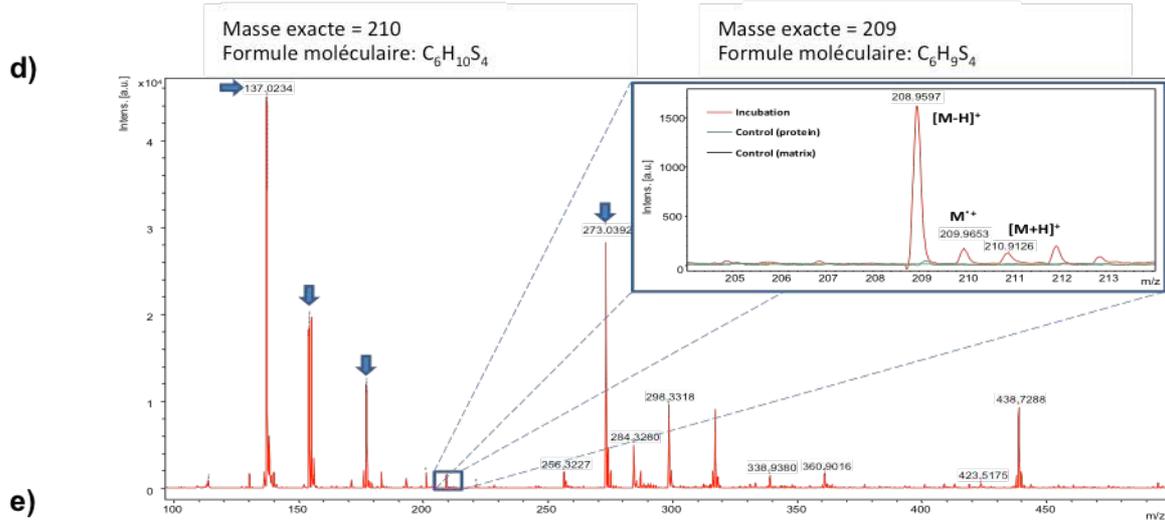
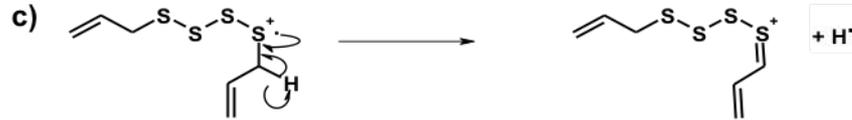
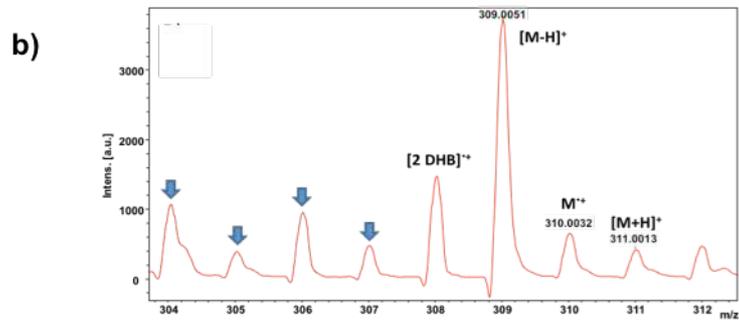
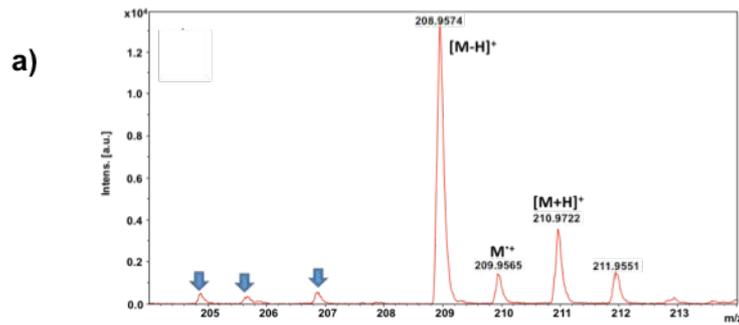
# RESULTATS

## 1.1. Le TTSDA et le TTSDB sont des ligands de la tubuline

Nous avons préalablement identifié la tubuline comme potentielle cible du TTSDA/TTSDB *in vitro*. Afin d'évaluer la cible pharmacologique primaire du TTSDA/TTSDB, nous avons évalué la liaison du TTSDA/TTSDB à la tubuline par la spectrométrie de masse MALDI-TOF-MS (collaboration avec l'équipe de Prof. Patrick Chaimbault, Laboratoire de Chimie et Physique Approche Multiéchelle des Milieux Complexes, Université de Lorraine, Metz, France). L'incubation des peptides de tubuline avec le TTSDA/TTSDB a mis en évidence une interaction directe et réversible entre les deux composés et la tubuline. Les ions observés sont résumés dans le **Tableau VII**. Les spectres de masse pour le TTSDA/TTSDB sont représentés dans les **Figure 11a-b**. Les ions attendus,  $M^+$  et  $[M + H]^+$  ont été observés pour les deux composés avec le pic principal correspondant à un fragment avec une perte de proton, indiquant une formation possible de l'ion fragment  $[M + H]^+$  à 209 m/z à partir de l'ion moléculaire  $M^+$  pour le TTSDA (**Figure 11c**). Le même mécanisme peut être observée à 309 m/z pour le TTSDB. Les signaux obtenus pour le TTSDA nous permettent de conclure que le TTSDA se comporte comme un inhibiteur réversible de la tubuline (**Figure 11d**). Des résultats similaires peuvent être conclus pour le TTSDB, bien que l'interférence de la matrice soit plus abondante autour de 300 m/z qu'autour de 200 m/z. De plus, les rapports signaux-bruit étaient plus faibles que ceux obtenus avec TTSDA (**Figure 11e**).

Tableau VII : Développement et optimisation de SM MALDI-TOF. Récapitulatif des ions observés par SM MALDI-TOF pour le TTSDA et TTSDB.

| Composés     | Ions observés      | m/z observé | m/z théorique | $\Delta m$ (ppm) |
|--------------|--------------------|-------------|---------------|------------------|
| <b>TTSDA</b> | [M-H] <sup>+</sup> | 208,9597    | 208,9587      | 4,8              |
|              | M <sup>+</sup>     | 209,9653    | 209,9665      | 5,7              |
| <b>TTSDB</b> | [M+H] <sup>+</sup> | 210,9126    | 210,9685      | -28              |
|              | [M-H] <sup>+</sup> | 308,0051    | 308,9968      | 22               |
|              | M <sup>+</sup>     | 310,0032    | 309,9973      | -1,6             |
|              | [M+H] <sup>+</sup> | 311,0013    | 310,9877      | -57              |



(La légende se trouve sur la page suivante)

Figure 11 : Le TTSDA et le TTSDB interagissent avec la tubuline de façon réversible. MALDI-TOF-MS de a) TTSDA et b) TTSDB.  $[2 \text{ DHB}]^{*+}$  correspond à un ion impair de la matrice (acide 2,5-dihydroxybenzoïque) et les flèches bleues correspondent à d'autres interférences. c) Formation possible de l'ion fragment  $[M-H]^+$  à 209 m/z à partir de l'ion moléculaire  $M^{*+}$  pour le TTSDA. d) MALDI-TOF-MS de l'incubation de la tubuline avec le TTSDA. La fenêtre est un zoom dans la zone 204 à 214 m/z correspondant aux ions du TTSDA. Les flèches bleues correspondent aux pics matriciels. e) MALDI-TOF-MS de l'incubation de la tubuline avec le TTSDB. La fenêtre est un zoom dans la zone 304 à 313 m/z correspondant aux ions de TTSDB. Dans les deux fenêtres, le signal de la matrice (matrice seule) apparaît en noir, le signal de la protéine apparaît en vert (matrice + tubuline), et l'incubation (matrice + TTSDA ou TTSDB incubée avec de la tubuline) apparaît en rouge. Les flèches bleues correspondent aux pics matriciels.

## **1.2. Evaluation de la sensibilité du TTSDA/TTSDB dans les cellules du cancer du côlon**

### **1.2.1. Effet des polysulfures sur le métabolisme des cellules du cancer du côlon**

Afin de déterminer le mécanisme d'action des polysulfures dans l'optique d'une nouvelle approche thérapeutique dans le cancer du côlon, nous avons sélectionné les lignes cancéreuses d'origine épithéliale HT-29, SW480 et SW620 comme modèle cellulaire. Les cellules HT-29 et SW480 sont dérivées d'un adénocarcinome du côlon. Les cellules SW620 sont dérivées d'une métastase ganglionnaire du cancer du côlon. Les cellules SW480 et SW620 sont dérivées du même patient. Les cellules HT-29 présentent une mutation de l'oncogène BRAF tandis que les cellules SW480 et SW620 présentent une mutation KRAS. Nous avons comparé l'effet du TTSDA et du TTSDB (Kelkel, Cerella et al. 2012, Czepukojc, Baltés et al. 2014) sur le métabolisme des cellules HT-29, SW480 et SW620 à l'aide d'un test de viabilité MTT. Les cellules HT-29, SW480, SW620 ont été traitées pendant 24 h, 48 h, et 72 h avec des concentrations allant de 10 à 100  $\mu\text{M}$  pour TTSDA et TTSDB. Les valeurs des  $\text{CI}_{50}$  calculées après 24 h, 48 h et 72 h de traitement sont présentées dans le **Tableau VIII**. Nous avons constaté que les cellules HT-29 ainsi que les cellules SW480 et SW620 étaient plus sensibles au TTSDB qu'au TTSDA. En revanche, le TTSDB est actif seulement dès 48 h de traitement avec une  $\text{CI}_{50}$  de  $41,5 \pm 4,9 \mu\text{M}$  dans les cellules HT-29 alors qu'il est actif dès 24 h dans les cellules SW480 et SW620 avec une  $\text{CI}_{50}$  de  $26,6 \pm 8,9$  et  $7,7 \pm 5,5$  respectivement. La susceptibilité des lignées cellulaires au TTSDB corrèle avec le taux de prolifération : les cellules SW480 et SW620 présentent un taux de prolifération plus élevé comparées aux cellules HT-29. Nous avons sélectionné le TTSDB pour nos études ultérieures dans le cancer du côlon, en utilisant des concentrations dans la gamme des valeurs  $\text{CI}_{50}$  estimées après 48 h pour chaque lignée cellulaire (**Tableau VIII**).

Tableau VIII : Le TTSDB affecte le cancer du côlon. Tableau récapitulatif des valeurs  $CI_{50}$  des différents composés TTSDA et TTSDB après 24 h, 48 h et 72 h de traitement dans les cellules HT-29, SW480 et SW620. L'effet de ces substances sur l'activité métabolique des cellules a été analysé par le test de viabilité MTT. Ces résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes +/- ES (erreur standard).

|              | $CI_{50}$               |                 |                 |                         |                |                 |
|--------------|-------------------------|-----------------|-----------------|-------------------------|----------------|-----------------|
|              | TTSDA ( $\mu\text{M}$ ) |                 |                 | TTSDB ( $\mu\text{M}$ ) |                |                 |
|              | 24 h                    | 48 h            | 72 h            | 24 h                    | 48 h           | 72 h            |
| <b>HT-29</b> | > 100                   | > 100           | > 100           | > 100                   | 41,5 $\pm$ 4,9 | 23,4 $\pm$ 10,5 |
| <b>SW489</b> | > 100                   | > 100           | > 100           | 26,6 $\pm$ 8,9          | 9,4 $\pm$ 5,6  | 7,7 $\pm$ 3,2   |
| <b>SW629</b> | > 100                   | 37,1 $\pm$ 13,0 | 24,9 $\pm$ 12,5 | 7,7 $\pm$ 5,5           | 1,5 $\pm$ 0,2  | 1,1 $\pm$ 0,7   |

### 1.2.2. Analyse de l'expression différentielle de la tubuline

Compte tenu de la capacité du TTSDA/TTSDDB à agir comme ligand de la tubuline, la sensibilité différentielle des lignées cellulaires au TTSDA et TTSDDB, et l'importance du profil d'expression des certain isotypes de tubulines dans la réponse thérapeutique aux autres agents ciblant la tubuline (Sirajuddin et al. 2014), nous nous sommes intéressés au profil d'expression différentielle des tubulines dans les trois lignées cellulaires : HT-29, SW480 et SW620. Nous avons choisi une approche *in silico* en utilisant un ensemble de données publiquement disponible (GSE20298) (Spitzner et al. 2010). Nous avons identifié 204 gènes (**Suppl. Figure 1a**) exprimés différemment dans des lignées cellulaires sélectionnées. Il est intéressant de noter que de nombreux gènes liés à la tubuline (**Suppl. Figure 1b**) présentent un profil d'expression différent : TUBB6 (tubuline beta 6 classe V), TUBB2B (tubuline beta 2B classe IIb) et TUBB4A (tubuline beta 4A classe IVa) sont fortement exprimés dans les lignées SW480 et SW620 plus sensibles, par rapport aux cellules HT-29, plus résistantes.

### 1.2.3. Le TTSDDB perturbe l'organisation du microtubule

Afin de confirmer que la tubuline est la cible du TTSDDB, nous avons traité les cellules HT-29, SW480 et SW620 avec le TTSDDB (HT-29 : 50  $\mu$ M ; SW480/SW620 : 10  $\mu$ M) respectivement pendant 24 h. Nous avons marqué les cellules traitées avec un anticorps anti-tubuline  $\alpha$ , puis nous avons observé par microscopie à fluorescence l'impact du TTSDDB sur l'organisation du réseau microtubulaire. Les résultats ont mis en évidence un signal diffus de la tubuline dans les trois lignées cellulaires après le traitement par le TTSDDB pendant 24 h par rapport au contrôle. Ces résultats suggèrent l'altération de l'organisation des microtubules en ligne avec l'analyse MALDI-TOF-MS (**Figure 12**). De plus, le marquage du noyau au Hoechst a révélé un phénotype nucléaire typique de la prométaphase suggérant un arrêt mitotique.

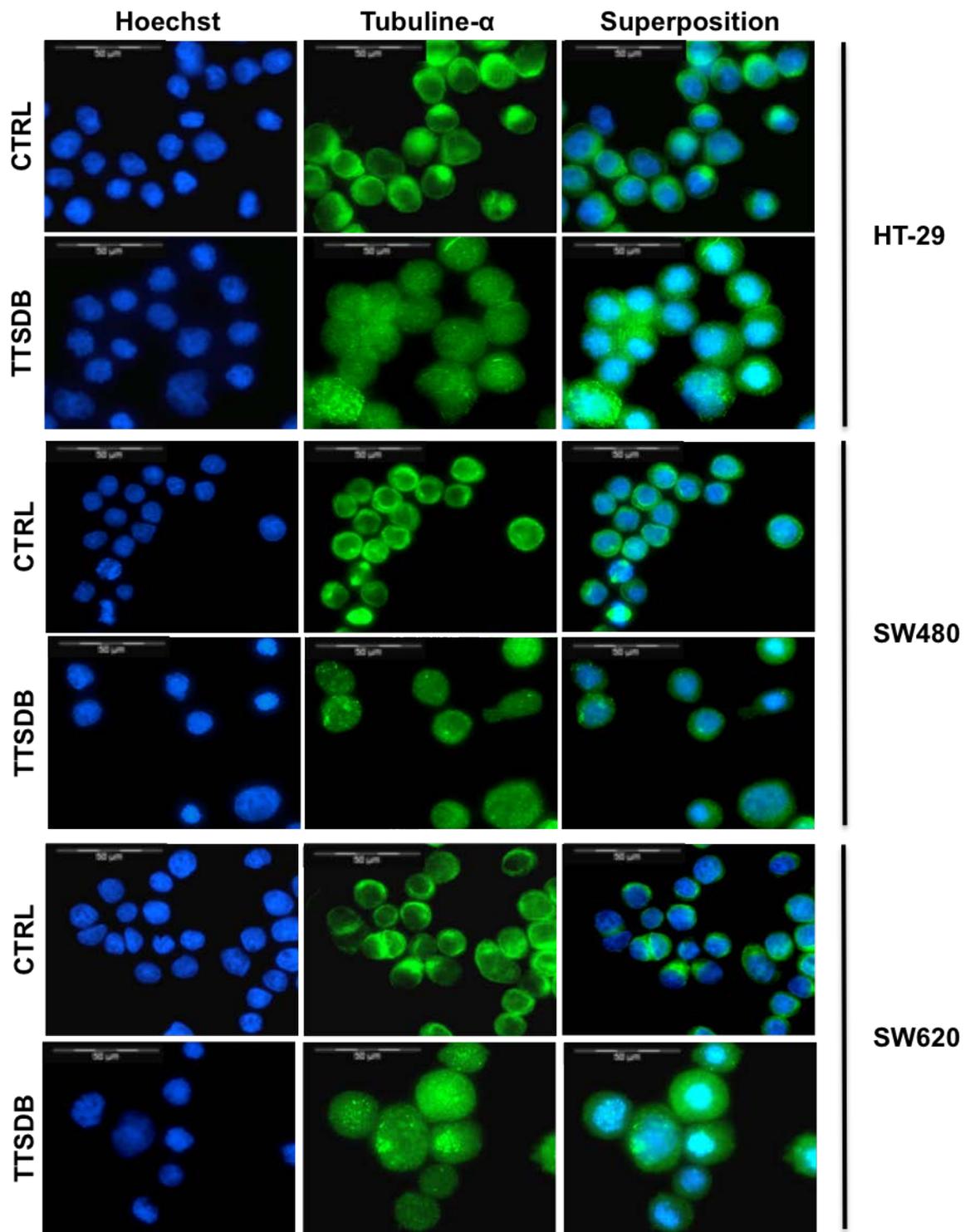


Figure 12 : Le TTSDB altère l'organisation des microtubules. Les cellules HT-29, SW480 et SW620 ont été traitées avec le TTSDB (HT-29 : 50  $\mu$ M ; SW480/SW620 : 10  $\mu$ M) pendant 24 h. L'organisation des microtubules a été mise en évidence par immunofluorescence après marquage avec un anticorps anti-tubuline  $\alpha$ , et le noyau a été marqué au Hoechst. Images représentatives de trois expériences indépendantes.

## **1.3. Analyse du mécanisme d'action des polysulfures dans le cancer du côlon**

### **1.3.1. Le TTSDB altère le cycle cellulaire et induit une accumulation des cellules du cancer du côlon en phase G2/M**

Afin d'évaluer l'impact du TTSDB dans le cancer du côlon, nous avons analysé le cycle cellulaire des cellules HT-29 traitées par le TTSDB avec 50  $\mu\text{M}$  pendant 3 h, 6 h, 9 h, 24 h, 48 h et 72 h par cytométrie en flux, à l'aide d'un marquage à l'iodure de propidium (**Figure 13a**). Nous avons ainsi détecté une accumulation des cellules en phase G2/M du cycle cellulaire dès 9 h de traitement, significative à 24 h et 48 h. Pour 24 h de traitement, le pourcentage de cellules en G2/M dans le contrôle est de  $14,6 \pm 1,0$  % contre  $64,9 \pm 8,2$  % pour les cellules traitées par le TTSDB (50  $\mu\text{M}$ ). Après 48 h de traitement, le pourcentage de cellules en phase G2/M reste élevé ( $12,3 \pm 1,3$  % pour le contrôle contre  $50,0 \pm 17,8$  % pour les cellules traitées). Après 72 h de traitement, le pourcentage de cellules en phase G2/M passe de  $8,2 \pm 0,9$  % pour le contrôle à  $29,7 \pm 9,6$  % après traitement. En même temps, nous observons le passage des cellules en phase sub-G1, de  $4,1 \pm 2,9$  % pour le contrôle à  $22,2 \pm 10,5$  % pour les cellules traitées. De même, nous avons analysé le cycle cellulaire des cellules SW480 et SW620 traitées par le TTSDB avec 10  $\mu\text{M}$  (**Figure 13b et 3c**). Nous observons un effet similaire du TTSDB 10  $\mu\text{M}$ , sur le cycle cellulaire des cellules SW480 (**Figure 13b**). En effet, dès 6 h de traitement les cellules SW480 accumulent en phase G2/M, le nombre de cellules en phase G2/M passe de  $27,2 \pm 4,7$  % pour le contrôle à  $72,1 \pm 3,1$  % pour les cellules traitées par 10  $\mu\text{M}$  de TTSDB à 24 h. Après 48 h de traitement, le nombre de cellule en phase sub-G1 augmente de  $6,0 \pm 5,2$  % dans le contrôle à  $20,0 \pm 10,2$  % pour le traitement par 10  $\mu\text{M}$  de TTSDB. Le TTSDB réduit le nombre de cellules en phase G2/M qui passe de  $72,1 \pm 3,1$  % à 24 h à  $36,6 \pm 20,6$  % à 48 h pour le traitement de 10  $\mu\text{M}$  de TTSDB suggérant un effet réversible. Après 72 h de traitement, le nombre de cellules en phase sub-G1 passe de  $6,0 \pm 5,2$  % dans le contrôle à  $30,3 \pm 4,5$  % dans le traitement à 72 h. Dans les cellules SW620, le TTSDB (10  $\mu\text{M}$ ) induit aussi l'accumulation des cellules en phase G2/M dès 6 h de traitement avec le plus haut pic à 24 h (**Figure 13c**). Le nombre de cellules en phase G2/M passe de  $25,9 \pm 3,9$  % dans le contrôle à  $83,8 \pm 3,0$  % dans les cellules traitées à 24 h. Après 48 h de traitement la proportion de cellules accumulées en phase G2/M est réduit alors que le nombre de cellules en phase sub-G1 passe de  $3,4 \pm 2,5$  % dans le contrôle à  $30,3 \pm 12,2$  %

dans le traitement de 10  $\mu\text{M}$  de TTSDB. Après 72 h de traitement, le profil du cycle cellulaire des cellules SW620 est similaire à celui des cellules SW480. L'analyse du cycle cellulaire montre que les cellules SW480 et SW620 sont plus sensibles au TTSDB avec une concentration à raison de 10  $\mu\text{M}$  contre 50  $\mu\text{M}$  dans le cas des cellules HT-29, par ailleurs le nombre de cellules en phase sub-G1 augmente significativement dès 48 h de traitement dans les cellules SW620.

L'observation des cellules HT-29, SW480 et SW620 marquées au Hoechst sous le microscope à fluorescence après traitement avec le TTSDB (50 et 10  $\mu\text{M}$  respectivement) pendant 24 h a mis en évidence le blocage des cellules en prométaphase (**Figure 14**).

Afin de confirmer le blocage des cellules HT-29 en phase G2/M du cycle cellulaire à la suite du traitement par le TTSDB, l'expression de la cycline B1, principal acteur de la transition G2/M du cycle cellulaire (Hwang et al. 1995), a été analysée par western blot (Kelkel et al. 2012). Ainsi, le western blot révèle l'accumulation de la cycline B1 à 24 h et 48 h, qui devient toujours plus significative avec la concentration de 50  $\mu\text{M}$  (**Figure 15a**). Nous avons aussi observé l'accumulation de la cycline B1 dans les cellules SW480 et SW620 traitées par 10  $\mu\text{M}$  de TTSDB avec un pic à 24 h de traitement (**Figure 15b**). L'ensemble de ces données confirme l'arrêt mitotique en phase précoce comme première réponse induite par le TTSDB dans le cancer du côlon.

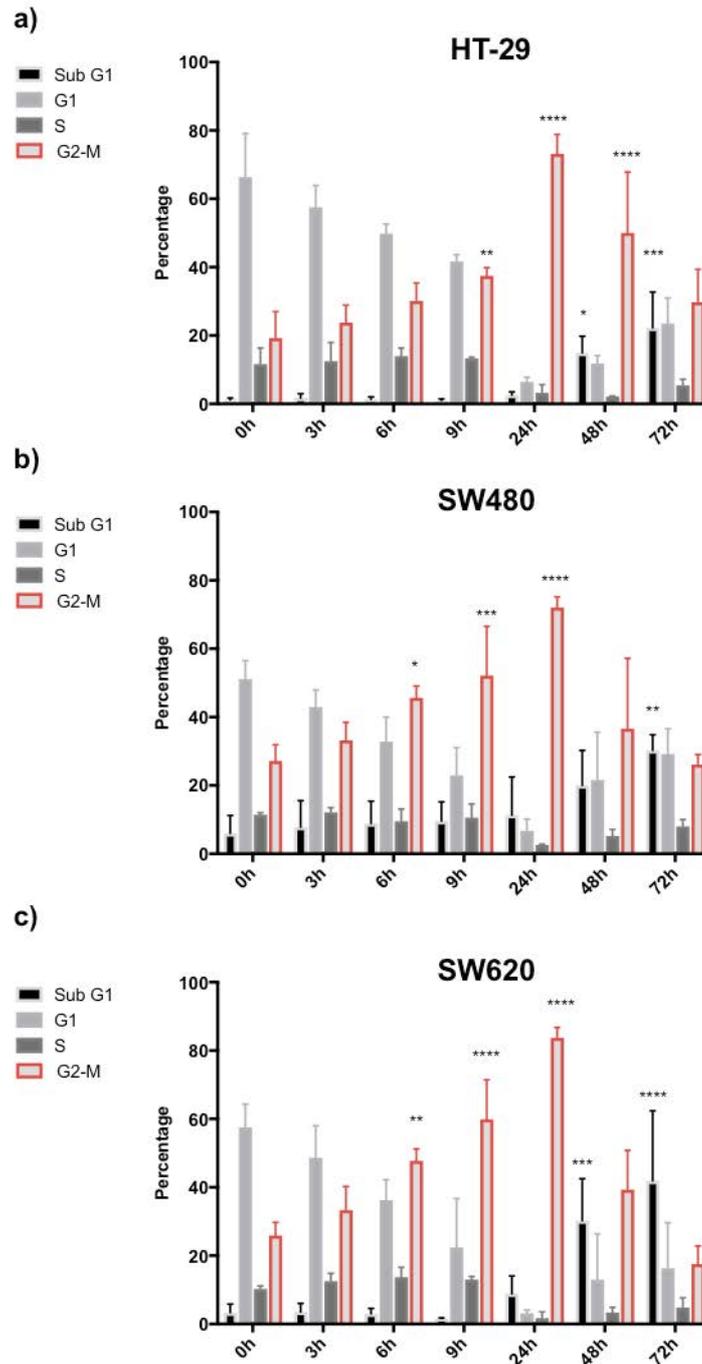


Figure 13 : Le TTSDB induit une accumulation des cellules HT-29, SW480 et SW620 en phase G2/M. Les cellules HT-29 (a), SW480 (b) et SW620 (c) ont été traitées avec le TTSDB pendant 72 h (HT-29 : 50  $\mu$ M ; SW480/SW620 : 10  $\mu$ M). L'analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux a été effectuée aux différents temps indiqués après marquage des cellules, traitées ou non, avec l'iodure de propidium. Les résultats représentent la moyenne +/- ES (erreur standard) de trois expériences indépendantes.  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*) et  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*) par ANOVA 2- Dunnett, comparés au contrôle respectif.

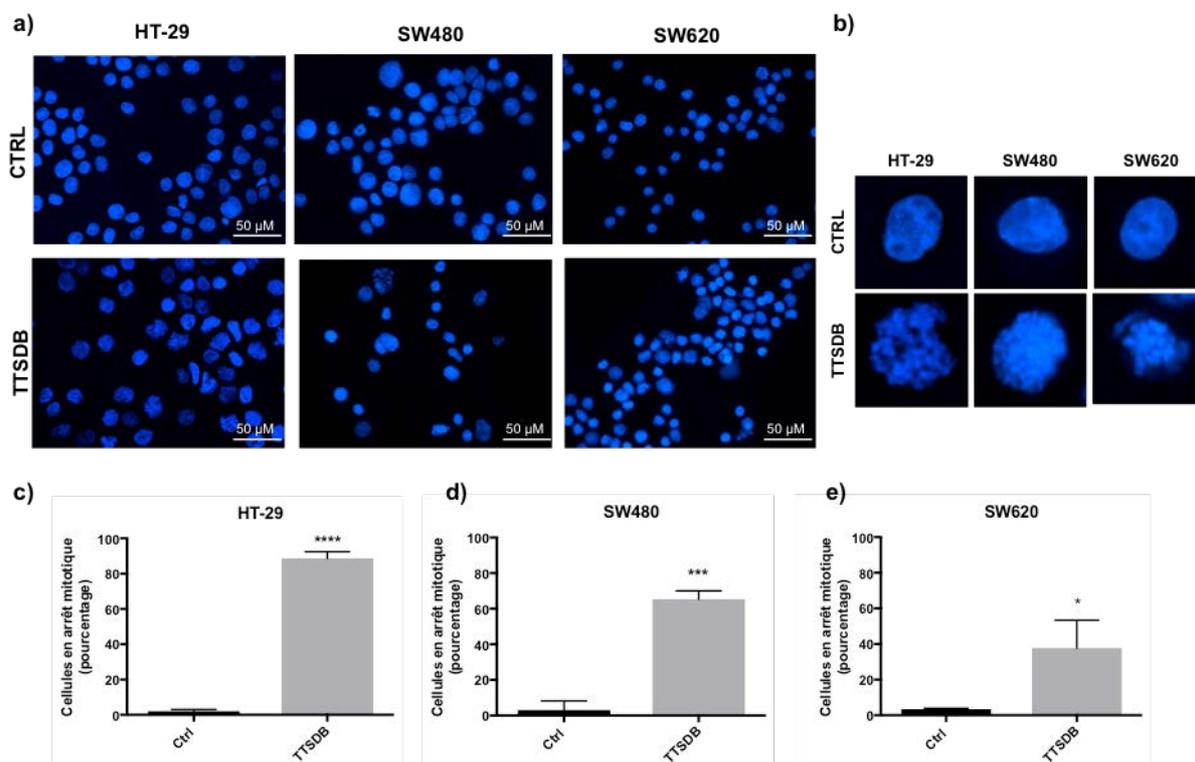


Figure 14 : Le TTSDB bloque les cellules en prométaphase. Analyse de la morphologie nucléaire par microscopie à fluorescence après marquage au Hoechst des cellules HT-29, SW480 et SW620 traitées par le TTSDB (50  $\mu$ M et 10  $\mu$ M respectivement) pendant 24 h. a-b) Représentation des cellules bloquées en phase G2/M dès 24 h de traitement. Images représentatives de trois expériences indépendantes. c-d-e) Représentation graphique du pourcentage de cellules en arrêt mitotique dans les cellules contrôles (ctrl) ou traitées (TTSDB). Les résultats représentent la moyenne de pourcentage des cellules en arrêt mitotique +/- ES (erreur standard) de trois expériences indépendantes.  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$ (\*\*),  $p < 0,001$ (\*\*\*), et  $p < 0,0001$ (\*\*\*\*) par le test de Student, comparée au contrôle respectif.

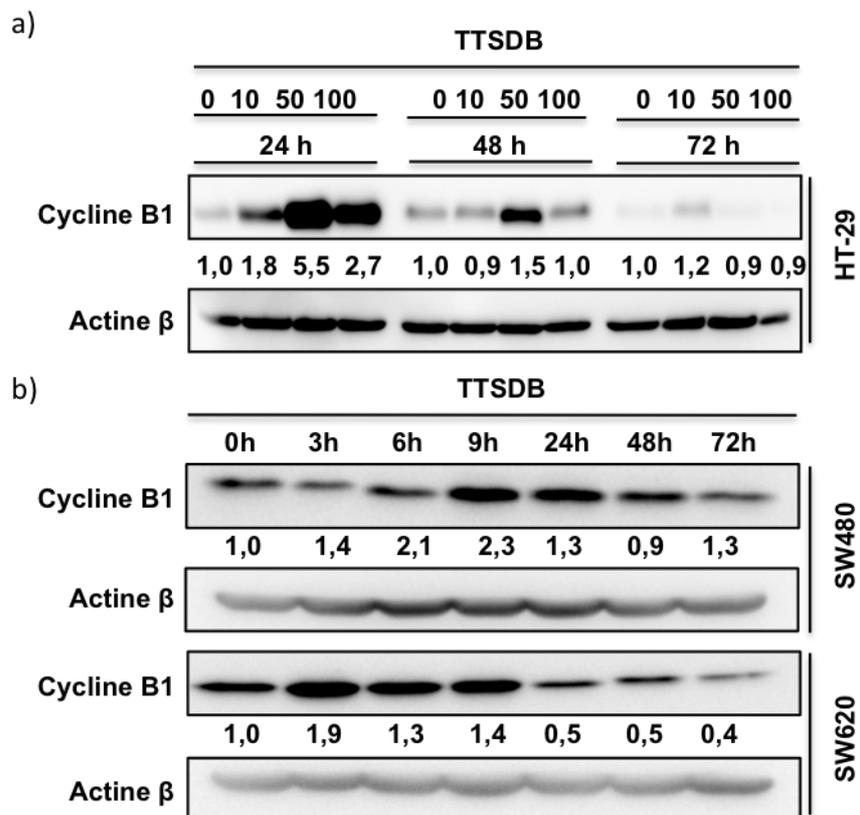
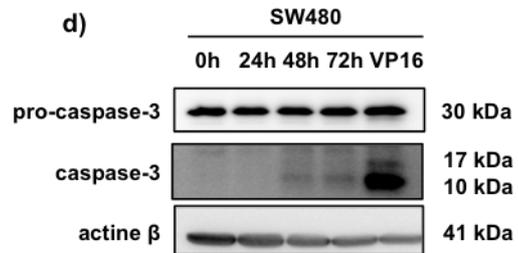
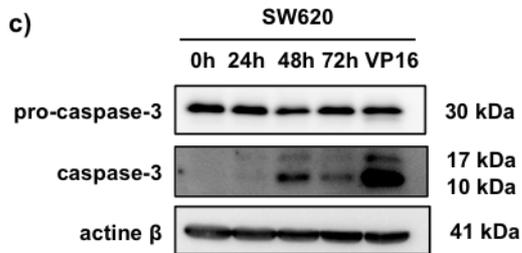
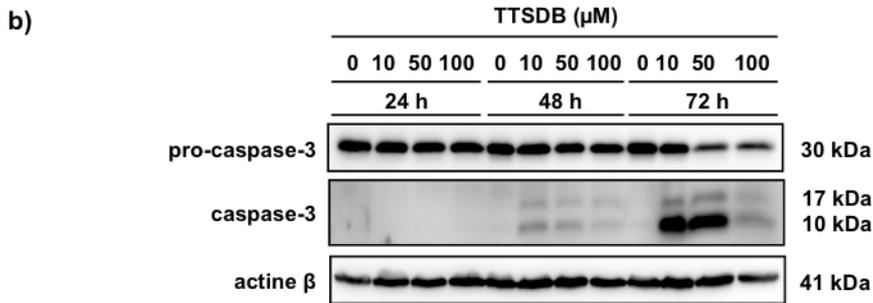
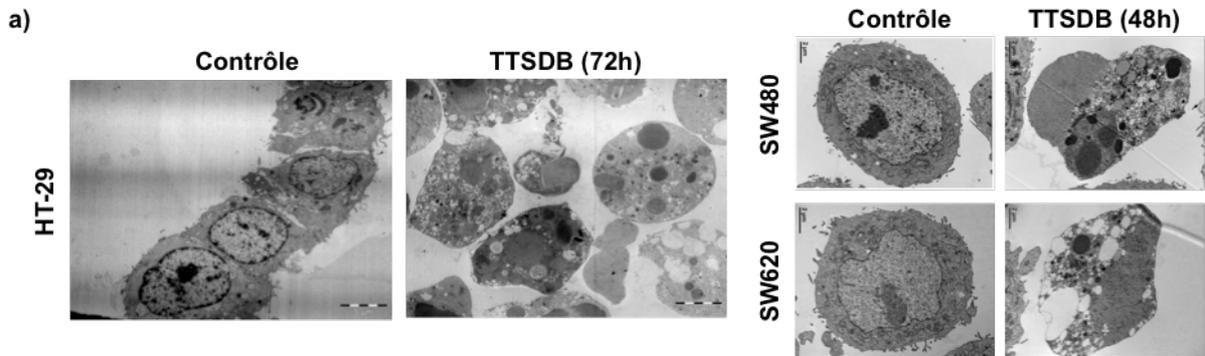


Figure 15 : Le TTSDDB induit une accumulation de l'expression de la cycline B1 dans les cellules du cancer du côlon. a) Analyse de l'expression de la cycline B1 par western blot après traitement des cellules HT-29 avec différentes concentrations de TTSDDB (10  $\mu$ M, 50  $\mu$ M et 100  $\mu$ M) pendant 24 h, 48 h et 72 h. b) Analyse de l'expression de la cycline B1 par western blot après traitement des cellules SW480 et SW620 avec 10  $\mu$ M de TTSDDB pendant 3 h, 6 h, 9 h, 24 h, 48 h et 72 h. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

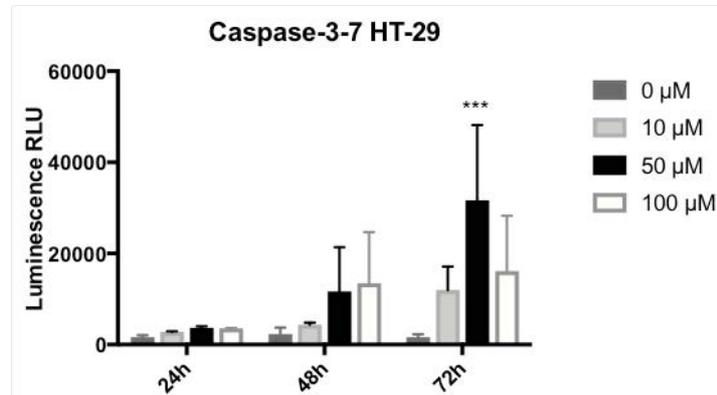
### 1.3.2. Le TTSDB induit l'apoptose dans les cellules HT-29

L'analyse de la morphologie nucléaire des cellules HT-29, SW480 et SW620 par la microscopie électronique à transmission (MET) a mis en évidence l'accumulation de noyaux apoptotiques à 72 h de traitement (**Figure 16a**). Ensuite, nous avons étudié le clivage des caspases effectrices -3 et -7, par western blot. Nous avons traité les cellules HT-29 avec 10, 50 et 100  $\mu\text{M}$  pendant 24 h, 48 h, et 72 h. L'analyse par western blot révèle ainsi le clivage des caspases-3 et -7 après 72 h de traitement, avec 10  $\mu\text{M}$  et 50  $\mu\text{M}$  (**Figure 16b**). Dans les cellules SW620, le clivage de la caspase-3 apparaît dès 48 h de traitement (**Figure 16d**). Dans les cellules SW480, le clivage de la caspase-3 est modérément détectable au cours du traitement. L'analyse de l'activité enzymatique des caspases-3-7, par luminométrie a confirmé les résultats obtenus par western blot avec une activation significative des caspases après 72 h de traitement avec 50  $\mu\text{M}$  de TTSDB dans les cellules HT-29 (**Figure 16e**). Dans les cellules SW480, nous observons, une faible augmentation non-significative à 48 h et 72 h (**Figure 16f**). Dans les cellules SW620, nous observons l'activation significative des caspases-3-7 dès 48 h de traitement (**Figure 16g**). Ces données montrent que le TTSDB induit la mort cellulaire par apoptose dans le cancer du côlon.

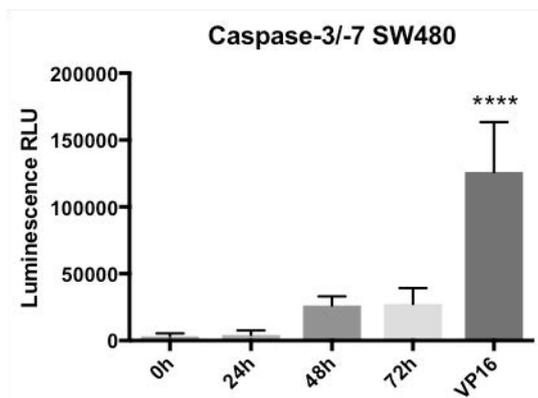


(La légende se trouve sur la page suivante)

e)



f)



g)

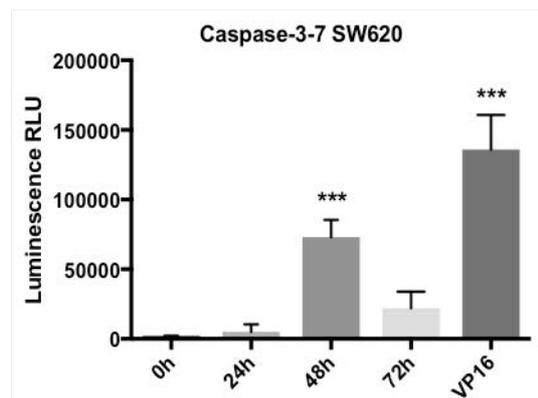


Figure 16 : Le TTSDB induit l'apoptose dans le lignées cellulaires du cancer du côlon. a) Analyse par TEM de la condensation et fragmentation nucléaire des cellules HT-29, SW480 et SW620 traitées avec le TTSDB (50 et 10  $\mu\text{M}$  respectivement). Les cellules HT-29 ont été traitées avec différentes concentrations de TTSDB pendant 24 h, 48 h et 72 h. Le clivage de la pro-caspases-3 a été déterminé : par western blot dans les cellules HT-29 (b) et les cellules SW480 (c) et SW620 (d) ; par activité enzymatique des caspases-3, -7, -8 et -9 évalué par les kits Caspase-Glo® 3/7, 8 et 9 Assay dans les cellules HT-29 (e), SW480 (f) et SW620 (g). Les résultats représentent la moyenne +/- ES (erreur standard) de trois expériences indépendantes.  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$ (\*\*),  $p < 0,001$ (\*\*\*), et  $p < 0,0001$ (\*\*\*\*) par ANOVA 2-Dunnett, comparés au contrôle respectif.

**En conclusion de cette partie :**

- **Nous avons montré que le TTSDA et le TTSDB se lie directement et réversiblement à la tubuline.**
- **Nous avons montré que le TTSDB cible l'organisation des microtubules et que le marquage nucléaire témoigne d'un arrêt en prométaphase.**
- **Le TTSDB induit l'accumulation des cellules HT-29, SW480 et SW620 en phase G2/M du cycle cellulaire, accompagnée de l'accumulation de la cycline B1 à 24 h et 48 h.**
- **Nous avons montré que le TTSDB (10  $\mu$ M) induit à 72 h une mort cellulaire apoptotique dans les cellules HT-29 et SW480 et à 48 h dans les cellules SW620.**

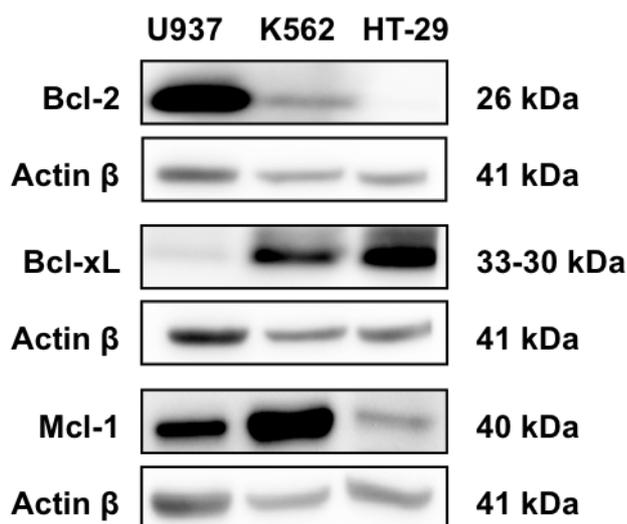
## 1.4. Modulation de la protéine Bcl-xL par le TTSDB

La surexpression des protéines de la famille Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1) dans de nombreux cancers est liée à un faible taux de survie, une progression accélérée de la maladie et une résistance à la chimiothérapie (Yip and Reed 2008). De plus, nos résultats antérieurs avaient rapporté la modulation de la protéine Bcl-2 *via* sa phosphorylation suivie de sa protéolyse par le TTSDA dans les cellules hématopoïétiques où la phosphorylation de la protéine Bcl-2 suivie de sa dégradation joue un rôle de transition entre l'arrêt mitotique prolongé et l'apoptose (Kelkel et al. 2012). Ainsi, nous voulions étudier le potentiel modulateur du TTSDB sur les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 dans les cellules HT-29.

D'abord, nous avons analysé par western blot l'expression basale des protéines de la famille Bcl-2 dans les cellules HT-29 en comparaison aux lignées hématopoïétiques U937 et K562 (Figure 16a). L'analyse par western blot montre une absence d'expression de la protéine Bcl-2 dans les cellules HT-29 contrairement aux cellules U937. La protéine Mcl-1 est très faiblement exprimée dans les cellules HT-29 comparées aux cellules K562. En revanche, la protéine Bcl-xL est fortement exprimée dans les cellules HT-29 contrairement aux cellules U937 (**Figure 17a**). Les protéines de la famille Bcl-2 représentent un rôle crucial dans la balance survie/mort, ainsi une régulation stricte de l'expression et l'activité des protéines de la famille Bcl-2 est cruciale.

Ensuite, nous avons vérifié l'effet du TTSDB sur la modulation de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL surexprimée dans notre modèle cellulaire. Les cellules HT-29 ont été traitées pendant 24 h, 48 h et 72 h avec des concentrations de 10  $\mu$ M, 50  $\mu$ M et 100  $\mu$ M. L'analyse par western blot a mis en évidence une seconde bande de plus haut poids moléculaire, détectable à 24 h à 10  $\mu$ M et 50  $\mu$ M du TTSDB comparé au contrôle et persiste à 48 h avec 50  $\mu$ M de TTSDB (**Figure 17b**). Cette seconde bande apparaît pendant l'arrêt mitotique en phase G2/M du cycle cellulaire révélée par la cytométrie en flux. Ces données suggèrent que le TTSDB induit une phosphorylation de Bcl-xL sur sa sérine 62. L'analyse par western blot de l'expression de la phosphorylation de la protéine Bcl-xL sur son site serine 62 a confirmé notre hypothèse. Ces résultats sont en ligne avec ceux obtenus dans les lignées hématopoïétiques (Kelkel et al. 2012).

a)



b)

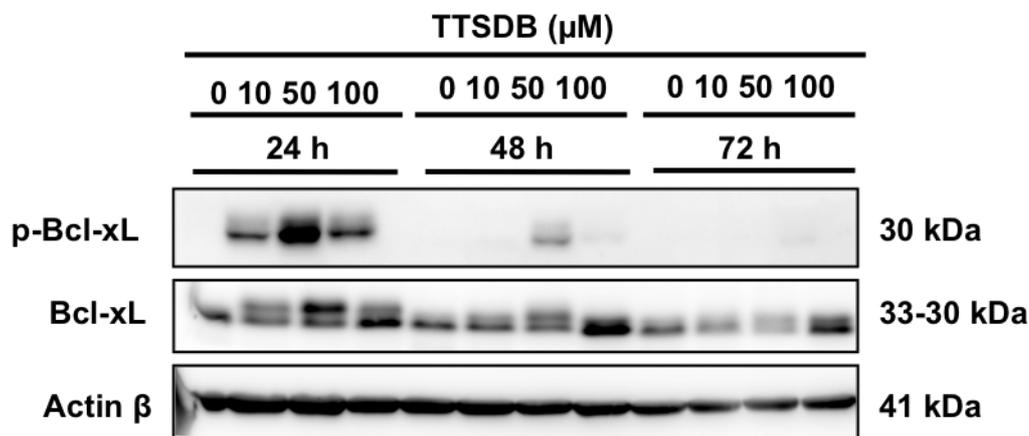


Figure 17 : Le TTSDB module l'expression de la protéine Bcl-xL. a) Expression basale des principales protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 dans différentes lignées cancéreuses par western blot. b) Analyse de l'effet de TTSDB sur l'expression de Bcl-xL et phospho-Bcl-xL par western blot. Les cellules HT-29 sont traitées avec différentes concentrations de TTSDB (10  $\mu$ M, 50  $\mu$ M et 100  $\mu$ M) pendant 24 h, 48 h et 72 h. Ces résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

## 1.5. Analyse de l'impact du flux autophagique sur la survie de patients atteints du cancer du côlon

### 1.5.1. Le TTSDB module l'autophagie dans les cellules HT-29

Nous avons montré que le TTSDB induit une altération du réseau microtubulaire essentiel pour la progression du flux autophagique (Kochl et al. 2006). Nous présumons un effet du TTSDB sur l'autophagie. Afin d'étudier l'impact du TTSDB sur l'autophagie nous avons eu recours à différentes approches méthodologiques.

Les images obtenues par MET ont mis en évidence l'accumulation massive d'autophagosomes et de phagophores dans les cellules HT-29 en arrêt mitotique après le traitement par 50  $\mu$ M de TTSDB pendant 24 h, 48 h et 72 h. Ces images suggèrent ainsi une modulation de l'autophagie (**Figure 18a**).

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons analysé par western blot l'expression des marqueurs de l'autophagie. La protéine LC3 est le marqueur d'identification des autophagosomes le mieux caractérisé et le plus utilisé chez les mammifères. L'analyse par western blot révèle la conversion de LC3-I en LC3-II, après 24 h, 48 h et 72 h de traitement par le TTSDB 50  $\mu$ M (**Figure 18b**). En effet, le rapport LC3-II/-I augmente de  $0,5 \pm 0,1$  fois dans le contrôle à  $1,1 \pm 0,3$  fois pour les cellules traitées à 24 h soit une hausse de  $120 \pm 20$  %. Nous observons une augmentation du rapport LC3-II/-I de  $57 \pm 14,7$  % à 48 h. Cette conversion confirme l'accumulation des complexes de pré-fusion observés par microscopie électronique à transmission. L'analyse par western blot de la protéine p62 a mis en évidence une augmentation de  $100 \pm 30,3$  % à 24 h et une augmentation de  $150 \pm 23,8$  % à 48 h de traitement avec 50  $\mu$ M de TTSDB (**Figure 18b**). Ensemble, ces observations suggèrent une déficience dans le flux autophagique étant donné que la protéine p62 est dégradée par le processus autophagique, ainsi la protéine p62 joue le rôle de marqueur d'autophagie (Komatsu and Ichimura 2010).

Afin d'évaluer l'effet du TTSDB sur le flux autophagique, nous avons analysé l'autophagie en présence de l'inhibiteur de l'acidification des lysosomes, la bafilomycine A1 (Bafilo) (10 nM). Tout d'abord, l'analyse par MET a révélé l'accumulation de vacuoles autophagiques aussi bien dans les cellules HT-29 traitées au TTSDB seul que les cellules traitées au TTSDB suivi d'un post-traitement par la Bafilo suggérant un effet similaire dû à une inhibition du flux autophagique par le TTSDB à 24 h de traitement (**Figure 18c**). Lorsque l'on compare les

cellules contrôles seules à celles traitées par la Bafilo, nous observons l'accumulation de vacuoles autophagiques dans ces dernières témoignant d'un flux autophagique normal. Ensuite, nous avons effectué une analyse cinétique à des temps de traitement plus court. L'analyse par Western blot a montré une réponse biphasée du TTSDB (50  $\mu$ M) sur le flux autophagique (**Figure 18d**). En effet, nous avons observé une augmentation de  $63,7 \pm 5,3$  % ou  $60 \pm 3,0$  % du rapport LC3-II/-I pour le traitement TTSDB et Bafilo contre le traitement par le TTSDB seul entre 3 h et 9 h de traitement respectivement, suggérant un flux autophagique actif. Cependant, à 24 h de traitement, le rapport LC3-II/-I est identique en présence de TTSDB et Bafilo et de TTSDB seul, soutenant l'hypothèse d'une inhibition ou d'une saturation du flux autophagique dès 24 h de traitement lorsque la majorité des cellules accumulent en phase G2/M (**Figure 13**). De plus, l'expression de la protéine p62 ne varie pas entre le traitement par le TTSDB seul et la présence de Bafilo entre 3 h et 24 h de traitement (**Figure 18e**). Néanmoins, on observe une accumulation dès 9 h de traitement.

D'autre part, afin de compléter notre analyse portant sur le flux autophagique, nous avons transfecté nos cellules HT-29 avec le plasmide GFP-LC3 pour quantifier le nombre de points GFP-LC3, représentatif de la formation des autophagosomes dans les cellules traitées par le TTSDB (50  $\mu$ M) contre les cellules non-traitées (**Figure 18f**). Nos résultats montrent une augmentation de  $116,1 \pm 21,5$  % du pourcentage des cellules GFP-positives présentant des points GFP-LC3 dans le cas du traitement par le TTSDB (50  $\mu$ M) contre le contrôle à 24 h (**Figure 18g**). Lorsque l'on compare le traitement TTSDB seul au TTSDB en présence de bafilomycine A1, la différence est statistiquement non significatif.

Ces premiers résultats nous permettent d'émettre l'hypothèse d'un blocage du flux autophagique à 24 h de traitement, suggérant ainsi une progression incomplète ou retardée de l'autophagie. Il semble judicieux de lier ici l'inhibition de la progression du flux autophagique observée dès 24 h de traitement à l'altération des microtubules conduisant à l'accumulation des cellules en phase G2/M dès 9 h et à la phosphorylation de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL.

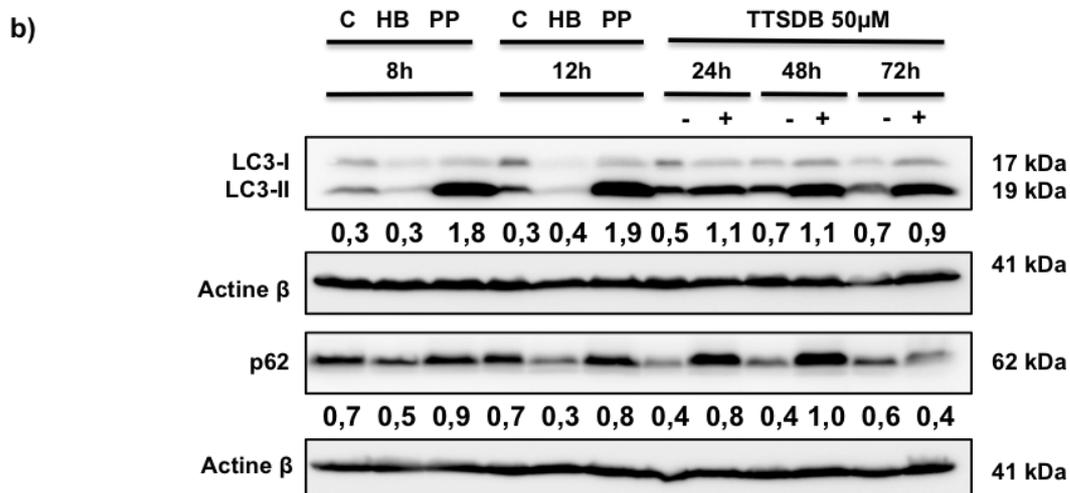
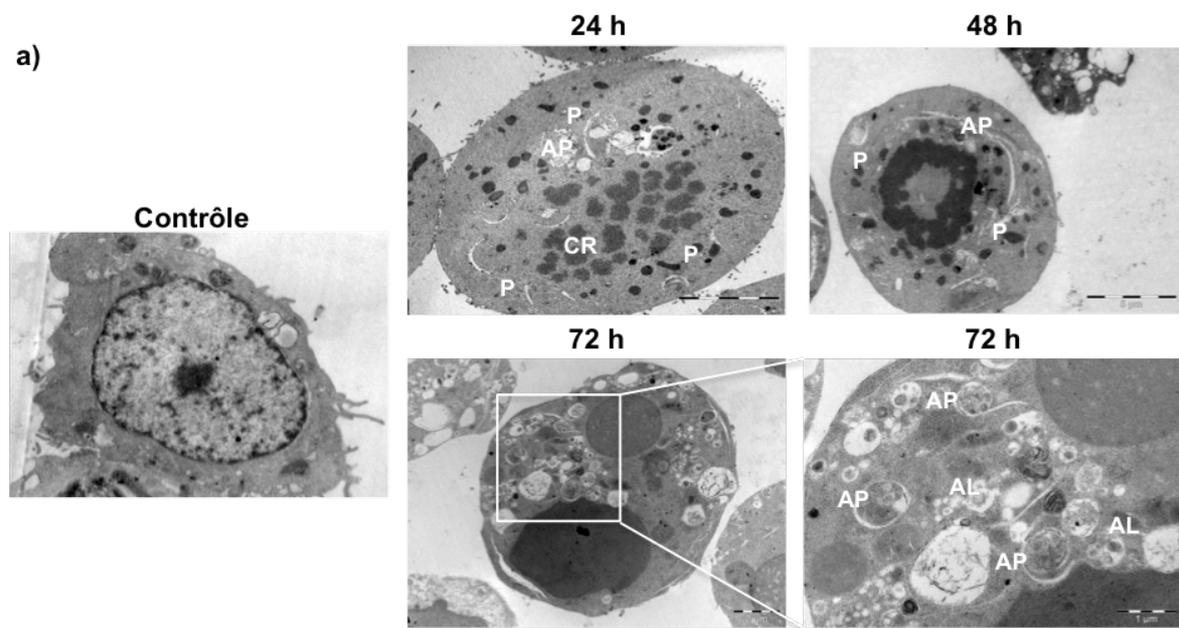


Figure 18 : Le TTSDB module l'autophagie. a) Images de microscopie électronique à transmission (MET) représentatives de l'ultrastructure des cellules HT-29 traitées par le TTSDB (50  $\mu$ M) pendant 24 h, 48 h et 72 h. Les images montrent l'accumulation massive de vacuoles autophagiques. AL : autolysosome, AP : autophagosome, CR : chromatine, et P : phagophore. b). L'expression des marqueurs de l'autophagie, LC3 et p62 est étudiée par western blot dans les cellules HT-29 traitées par le TTSDB 50  $\mu$ M pendant 24 h, 48 h et 72 h. Ces résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes. Les cellules HT-29 cultivées dans un milieu privé de sérum et d'acides aminés (HB) ou traitées avec PP242 (10  $\mu$ M) (PP), inhibiteur sélectif de la kinase mTOR, sont utilisées comme contrôle positif (n=3).

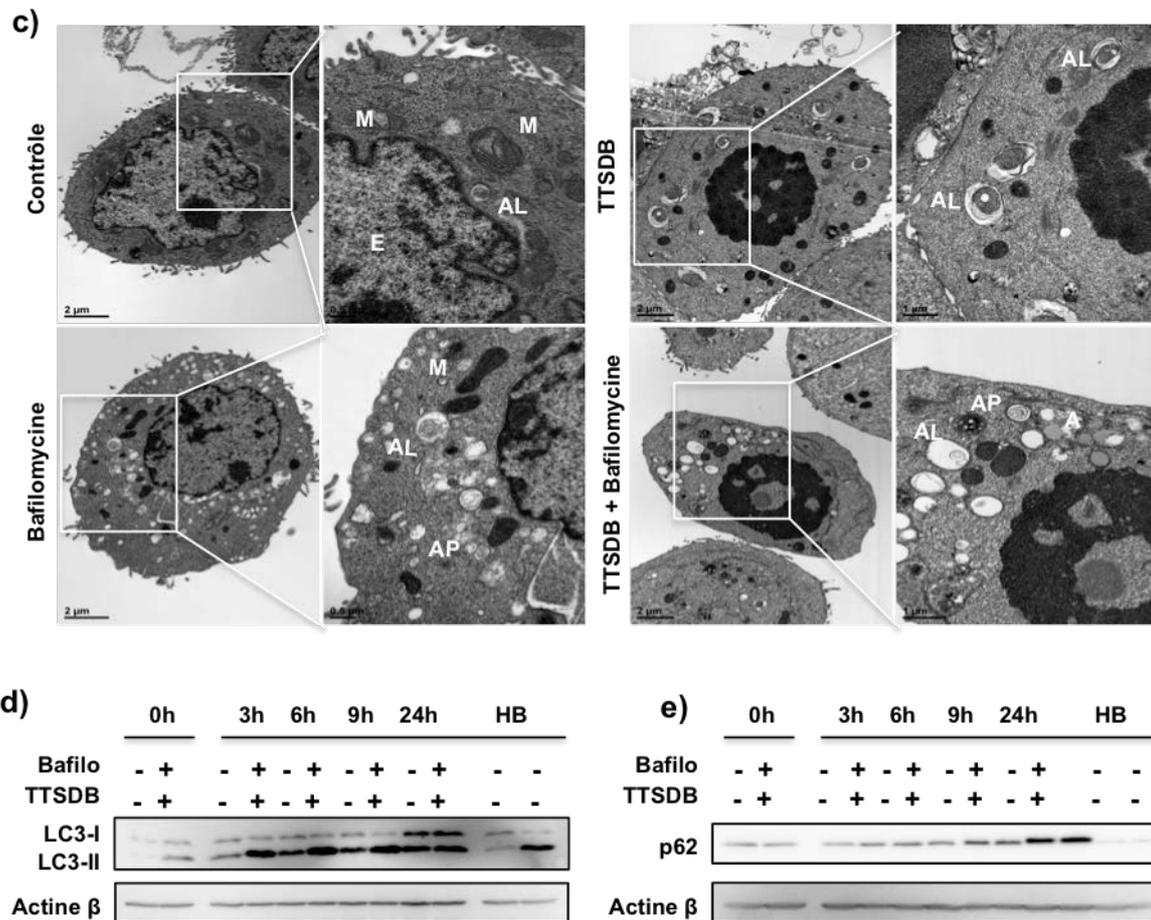


Figure 18 : Le TTSDB module l'autophagie. c) Image de MET représentant l'ultrastructure des cellules HT-29 traitées au TTSDB pendant 24 h, puis à la bafilomycine en post-traitement (2 h). AL : autolysosome, AP : autophagosome, E : euchromatine, et M : mitochondrie. L'analyse de la conversion LC3-I en LC3-II (d) et du niveau d'expression de la protéine p62 (e) est étudiée par western blot dans les cellules HT-29 traitées par le TTSDB (50  $\mu$ M) pendant 3 h, 6 h, 9 h et 24 h puis soumis à un post-traitement à la bafilomycine (10 nM) pendant 2 h. Les cellules HT-29 cultivées dans un milieu privé de sérum et d'acides aminés sont utilisées comme contrôle positif (n=3).

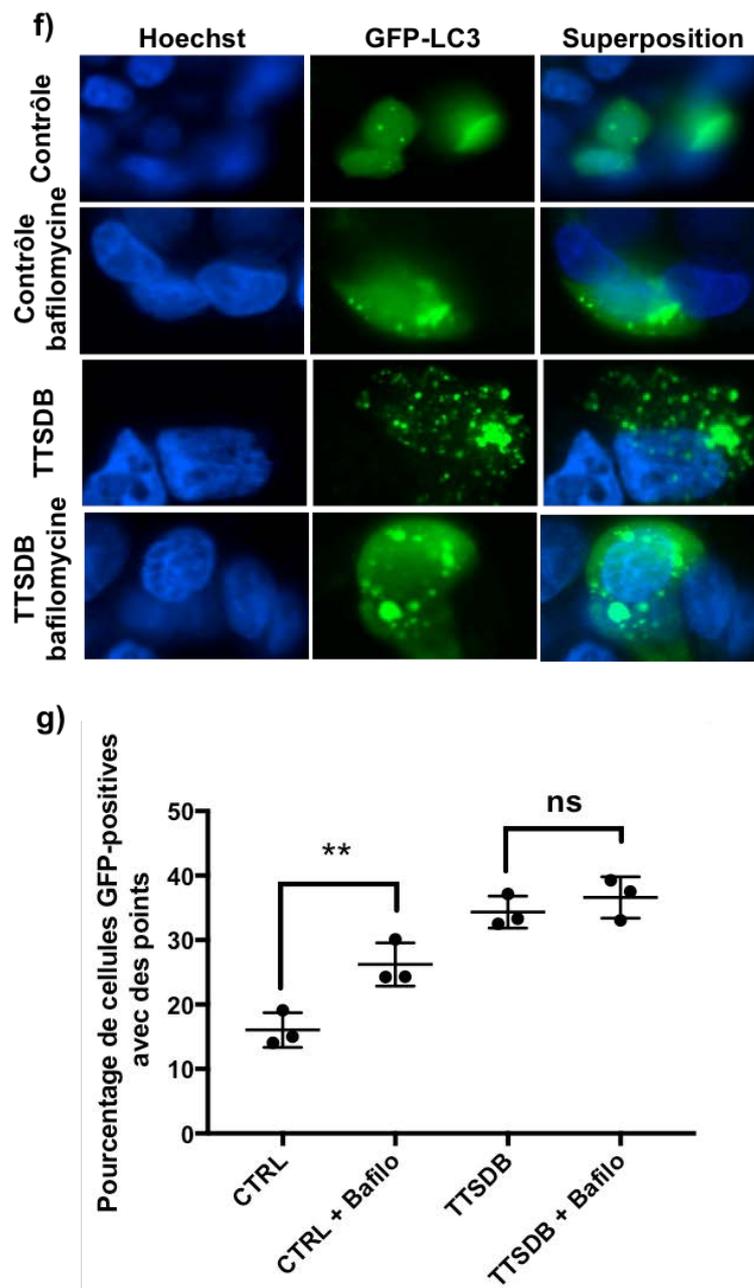


Figure 18 : f) Image de microscopie à fluorescence représentant la formation de points GFP-LC3 dans les cellules HT-29 transfectées avec les plasmide GFP-LC3 puis traitées par le TTSDB (50  $\mu$ M) pendant 24 h suivies d'un traitement par la bafilomycine ou pas. g) représentation graphique du pourcentage de cellules transfectées avec le plasmide GFP-LC3 et formant des points GFP-LC3 après le traitement par le TTSDB (n=3). Les résultats représentent la moyenne +/- ES (erreur standard) de trois expériences indépendantes  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*) et  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*) par ANOVA 2- Sidak, comparés au contrôle respectif.

### 1.5.2. Effet du TTSDDB sur le flux autophagique dans les cellules SW480 et SW620.

Compte tenu de la sensibilité plus importante des cellules SW480 et SW620 au TTSDDB comparé aux cellules HT-29, nous nous sommes intéressés à vérifier l'effet du TTSDDB sur l'autophagie dans les cellules SW480 et SW620. Comme mentionné précédemment, ces deux lignées sont dérivées du même patient et présentent une mutation de l'oncogène KRAS très fréquente dans le CCR. La mutation de l'oncogène KRAS contribue à l'augmentation du flux autophagique et à la survie cellulaire du CCR (Alves et al. 2015).

Nous avons premièrement analysé par MET la présence de vacuoles autophagiques dans les cellules SW480 et SW620 traitées par le TTSDDB (10  $\mu$ M) pendant 24 h, 48 h et 72 h. Les images de MET ont révélé l'absence de formation des structures autophagiques à la suite du traitement par le TTSDDB dans les cellules SW480 (**Figure 19a**) et SW620 (**Figure 19b**). Afin de confirmer cette première observation, nous avons analysé, les marqueurs autophagiques LC3-I/-II et p62 par western blot dans les cellules SW480 (**Figure 19c**) et SW620 (**Figure 19d**) traitées avec le TTSDDB (10  $\mu$ M) pendant 6 h, 9 h, et 24 h. Le contrôle respectif de tout les temps de traitement sélectionnés présente un flux autophagique très élevé. Par exemple, dans les cellules SW480 à 9 h de traitement, le ratio LC3-II/-I augmente de 120 % dans le contrôle traité à la bafilomycine A1 contre le contrôle seule. De même, dans les cellules SW620, à 9 h de traitement, le ratio LC3-II/-I augmente de  $100 \pm 21,6$  % dans le contrôle traité à la bafilomycine A1 contre le traitement seul. En revanche, dans le cas du traitement par le TTSDDB, l'accumulation de la protéine LC3-II est réduite dans les cellules SW480 (**Figure 19c**) et SW620 (**Figure 19d**). De plus, lorsque l'on compare le niveau d'expression de la protéine p62, marqueur de l'autophagie, on observe une augmentation de  $42,5 \pm 8,9$  % dans les cellules traitées par le TTSDDB suivi d'un post-traitement à la bafilomycine A1 contre le TTSDDB seul (**Figure 19a**). Dans les cellules SW620, le profil d'expression de la protéine p62 est similaire, on observe une augmentation de  $57,1 \pm 6,3$  % dans le traitement par le TTSDDB suivi de la bafilomycine A1 contre le TTSDDB seul (**Figure 19b**). Contrairement aux cellules HT-29, ces résultats mettent en évidence une absence d'inhibition de l'autophagie dans les cellules SW480 et SW620 plus sensibles au TTSDDB.

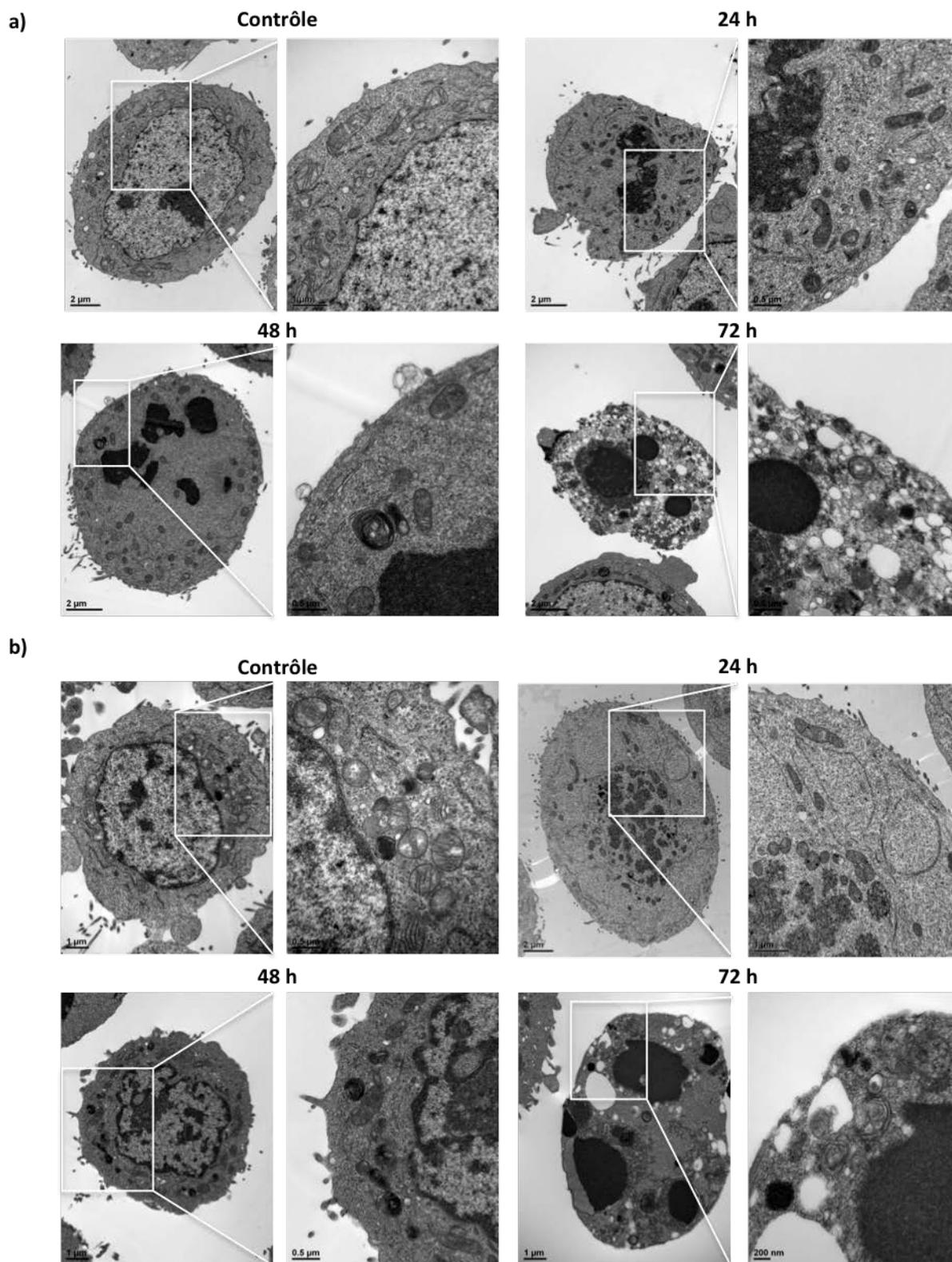


Figure 19 : L'effet du TTSDB sur l'autophagie dans les cellules SW480 et SW620. a) Image de MET représentatives des cellules SW480 (a) et des cellules SW620 (b) traitées avec le TTSDB (10  $\mu$ M) pendant 24 h, 48 h et 72 h.

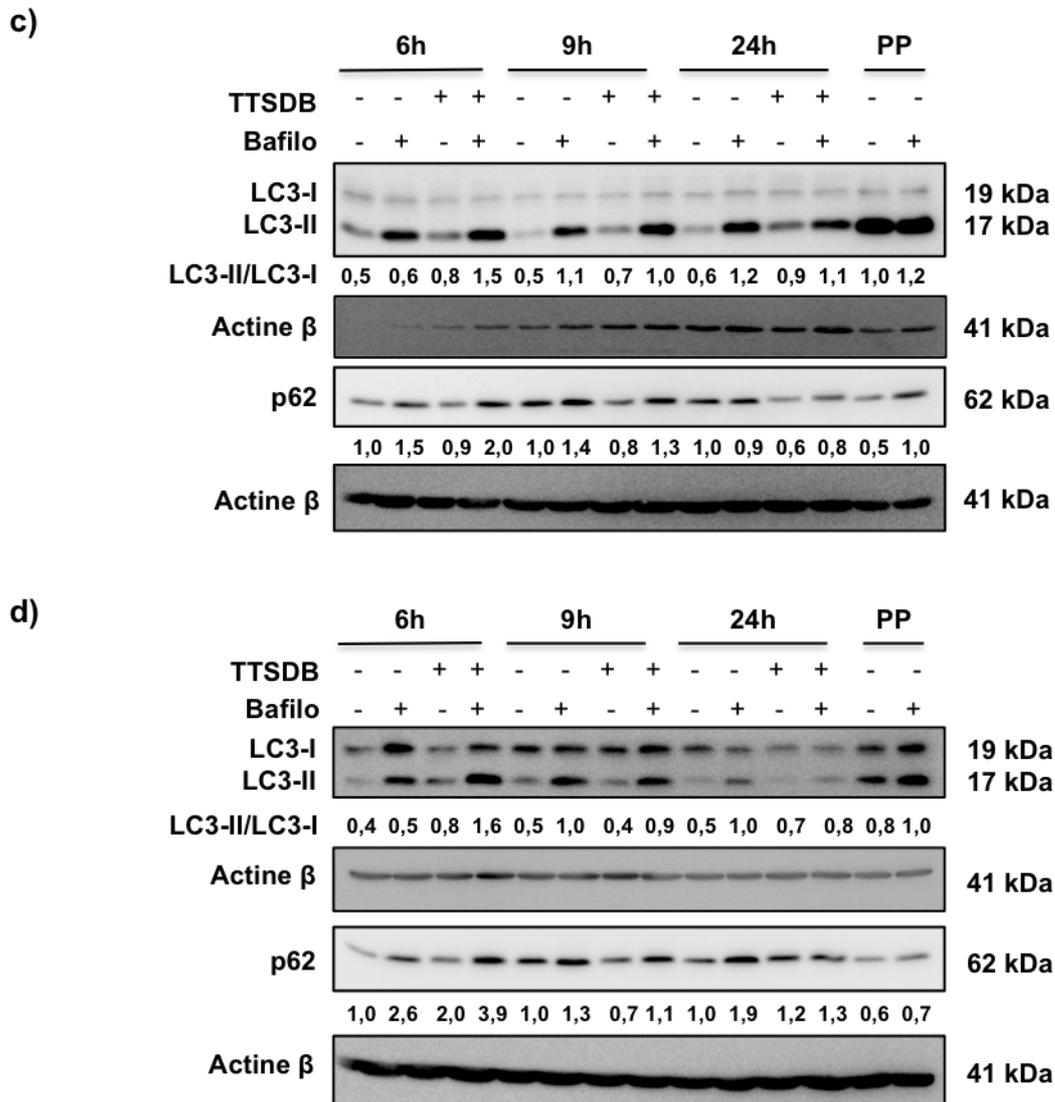


Figure 19 : Effet du TTSDB sur l'autophagie dans les cellules SW480 et SW620. Analyse de l'expression des protéines LC3-I/-II et p62 dans les cellules SW480 (c) et SW620 (d) traitées par le TTSDB (10  $\mu$ M) pendant 6 h, 9 h, et 24 h en présence ou absence de la bafilomycine A1 avec les contrôles respectifs. Les cellules traitées avec l'inhibiteur PP242 (PP) de la voie mTOR pendant 16 h sont utilisées comme contrôle positif (n=3).

**En conclusion de cette partie :**

- Le TTSDB (50  $\mu$ M) induit l'accumulation de vacuoles autophagiques au niveau des phagophores et des autophagosomes, accompagnée de la conversion de LC3-I en LC3-II et de l'accumulation de la protéine p62 à 24 h et 48 h dans les cellules HT-29.**
- Le TTSDB (50  $\mu$ M) induit l'accumulation des autophagosomes (GFP-LC3) dès 24 h de traitement dans les cellules HT-29.**
- Le TTSDB module la progression de l'autophagie dès 24 h de traitement, similairement à la bafilomycine A1, suggérant une inhibition du flux autophagique dans les cellules HT-29.**
- Le TTSDB n'affecte pas le flux autophagique dans les cellules SW480 et SW620.**

## 1.6. Analyse comparative du TTSDA et des inhibiteurs de la polymérisation des microtubules (vincristine et vinblastine)

Nos travaux précédents avaient démontré une inhibition de la polymérisation de la tubuline par le TTSDA (Kelkel et al. 2012). De plus, le TTSDB a montré un effet similaire sur l'organisation des microtubules dans les lignées hématopoïétiques (Czepukojc et al. 2014). Ici nous avons voulu comparer le TTSDB aux agents ciblant la tubuline, comme la vincristine et la vinblastine, utilisées en clinique dans le traitement de tumeur solide. Nous avons d'abord déterminé la  $CI_{50}$  grâce au test de viabilité MTT (**Tableau IX**), puis nous avons traité nos cellules HT-29 avec les  $CI_{50}$  obtenues à 48 h pour l'analyse du cycle cellulaire en cytométrie en flux. A 24 h, le pourcentage de cellules HT-29 en phase G2/M passe de  $16,9 \% \pm 3,7 \%$  dans le contrôle contre  $64,6 \% \pm 15,1 \%$  ;  $66,4 \% \pm 17,5 \%$  et  $61,3 \% \pm 6,3 \%$  pour les cellules traitées avec le TTSDB, la vinblastine et la vincristine, respectivement. L'accumulation des cellules en phase G2/M persiste à 48 h de traitement pour tous les composés étudiés. A 72 h, le pourcentage de cellules HT-29 en phase Sub-G1 passe de  $3,0 \% \pm 1,7 \%$  dans le contrôle à  $41,1 \% \pm 18,6 \%$  ;  $51,6 \% \pm 19,0 \%$  et  $56,5 \% \pm 6,5 \%$  dans les cellules traitées avec le TTSDB, la vincristine et la vinblastine, respectivement. Comme attendu, l'analyse révèle la similarité des effets du TTSDB, de la vincristine et de la vinblastine sur la distribution du cycle cellulaire (**Figure 20**). Nous avons aussi comparé le TTSDB à la vincristine et vinblastine dans leur pouvoir de réduire la formation de sphéroïdes dérivés des cellules HT-29 (**Figure 21**). Nos résultats ont mis en évidence un effet similaire. Nous avons aussi visualisé l'impact de chaque composé sur les cellules HT-29 grâce à la microscopie électronique à transmission. Les images montrent la similarité des effets du TTSDB, de la vincristine et de la vinblastine sur les cellules HT-29 (**Figure 22**). En effet, les cellules HT-29 traitées avec le TTSDB, la vincristine et la vinblastine présentent toutes un arrêt mitotique à 24 h et 48 h de traitement. De plus, les vacuoles autophagiques et les phagophores sont prédominants à 24 h et 48 h des trois traitements. Etant donné le rôle de la protéine p62 dans la réponse du TTSDB, nous nous sommes intéressés à l'effet du traitement de la vincristine et de la vinblastine sur l'expression de la protéine p62 en comparaison au TTSDB (**Figure 23**). Nos résultats montrent que le TTSDB induit une forte accumulation de la protéine p62 comparée à la vincristine et la vinblastine, néanmoins ils induisent tous l'apparition d'une seconde bande de plus grand poids moléculaire.

*Tableau IX : Tableau récapitulatif des valeurs  $CI_{50}$  des composés vincristine et vinblastine après 24 h, 48 h et 72 h de traitement des cellules HT-29. L'effet de ces substances sur l'activité métabolique des cellules a été analysé par le test de viabilité MTT. Ces résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes +/- ES (erreur standard).*

|                    | <b>CI<sub>50</sub> (nM)</b> |             |             |
|--------------------|-----------------------------|-------------|-------------|
|                    | <b>24 h</b>                 | <b>48 h</b> | <b>72 h</b> |
| <b>Vincristine</b> | 9,9 ± 4,4                   | 4,5 ± 2,3   | 8,1 ± 4,3   |
| <b>Vinblastine</b> | 13,3 ± 5,4                  | 4,7 ± 1,1   | 5,0 ± 0,2   |

**En conclusion de cette partie :**

**- L'analyse comparative du TTSDB aux agents altérant les microtubules (vincristine et vinblastine) montre l'effet similaire de ces substances sur la distribution du cycle cellulaire, sur la morphologie cellulaire montrant l'accumulation de vacuoles autophagiques à 24 h et 48 h de traitement et sur l'inhibition de la formation de sphéroïde dans les cellules HT-29.**

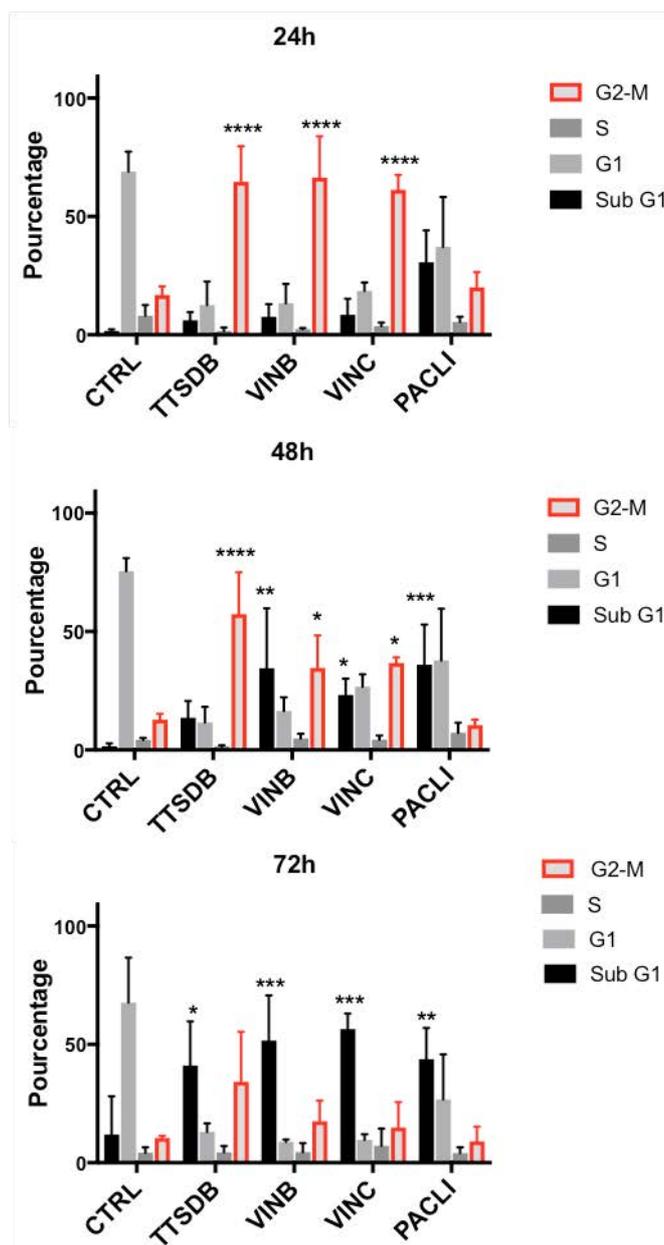


Figure 20 : Effet similaire du TTSDB, de la vincristine et de la vinblastine sur le cycle cellulaire. Analyse de la distribution du cycle cellulaire par cytométrie de flux des cellules HT-29 traitées avec les  $CI_{50}$  du TTSDB, de la vincristine (VINC) et de la vinblastine (VINB) pendant 24 h, 48 h et 72 h. Le TTSDB, la vincristine et la vinblastine induisent une accumulation des cellules HT-29 en phase G2/M du cycle cellulaire à 24 h et 48 h suivi d'une augmentation des cellules en phase Sub-G1 à 72 h ( $n=3$ ). Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  ES (erreur standard) de trois expériences indépendantes.  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$ (\*\*),  $p < 0,001$ (\*\*\*), et  $p < 0,0001$ (\*\*\*\*) par ANOVA 2- Dunnett, comparés au contrôle respectif.

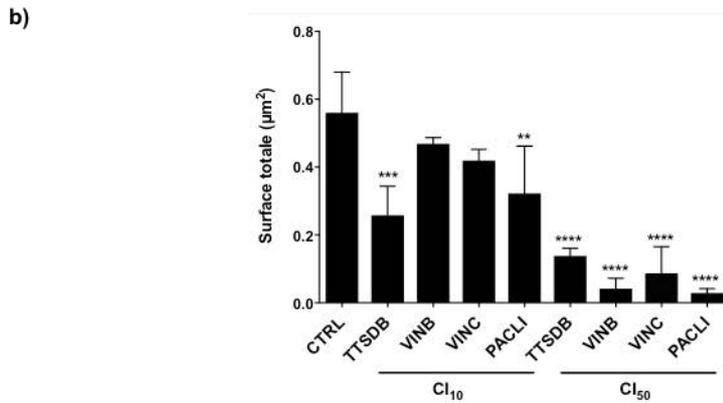
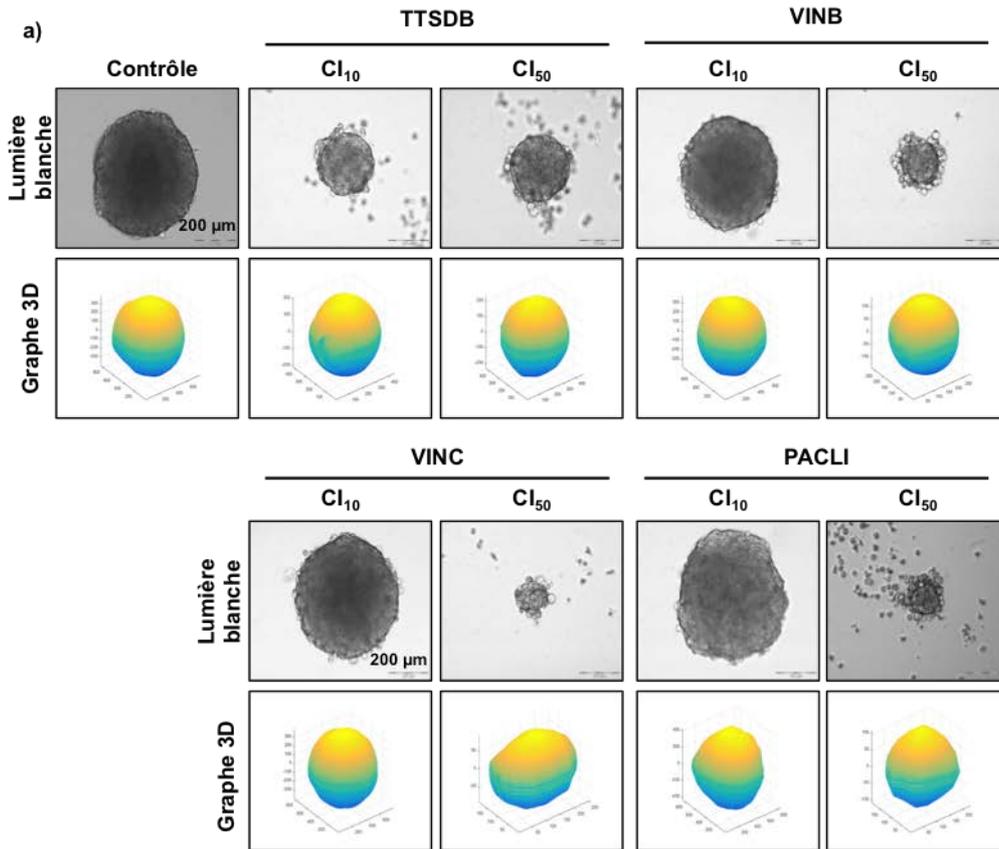


Figure 21 : Etude comparative de l'impact du TTSDDB, de la vinblastine (VINB), vincristine (VINC) et paclitaxel (PACLI) sur la formation et la viabilité de sphéroïdes issus des cellules HT-29. Les cellules HT-29 ont étéensemencées avec différentes concentrations (CI<sub>50</sub> et CI<sub>10</sub>) des composés indiqués pendant 4 jours. a) Images de microscopie et représentation graphique 3D montrant la réduction comparative du diamètre du sphéroïde. b) Représentation graphique de la surface totale du sphéroïde en (µm<sup>2</sup>) mesurée par Image J en fonction de la concentration du TTSDDB. Les résultats représentent la moyenne +/- ES (erreur standard) de trois expériences indépendantes.  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$ (\*\*),  $p < 0,001$ (\*\*\*), et  $p < 0,0001$ (\*\*\*\*) par ANOVA 2- Dunnett, comparé au contrôle respectif.

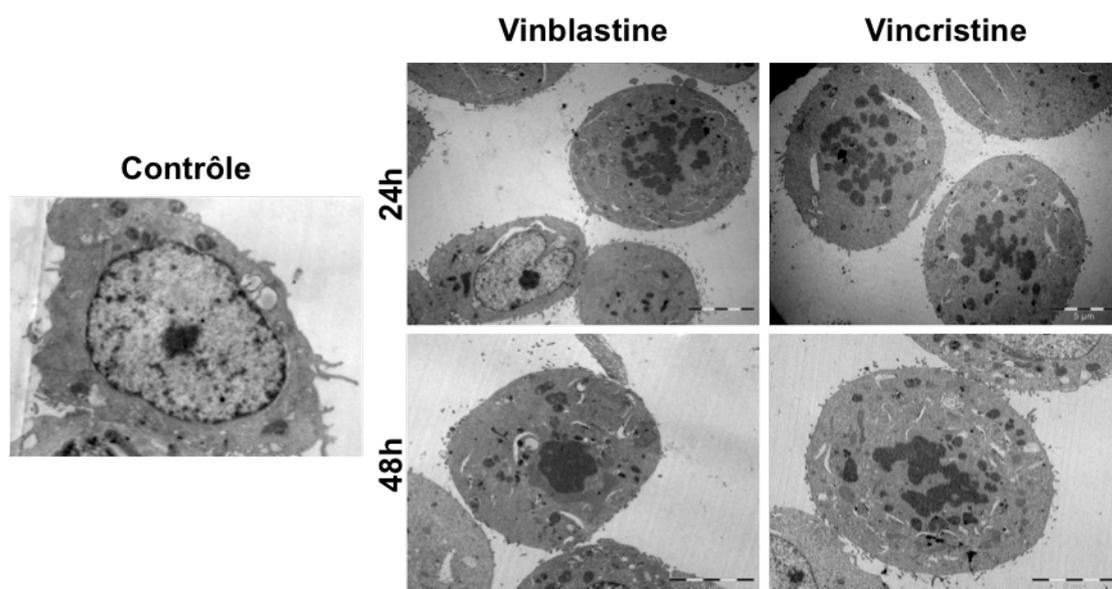


Figure 22 : Effets similaires du TTSDDB, de la vincristine et de la vinblastine sur les cellules HT-29. Images de microscopie électronique à transmission représentant l'ultrastructure des cellules HT-29 traitées avec les  $CI_{50}$  du TTSDDB, de la vincristine, et de la vinblastine pendant 24 h, et 48 h. Les images représentatives des cellules HT-29 en arrêt mitotique montrant l'accumulation massive de vacuoles autophagiques tout traitement confondus.

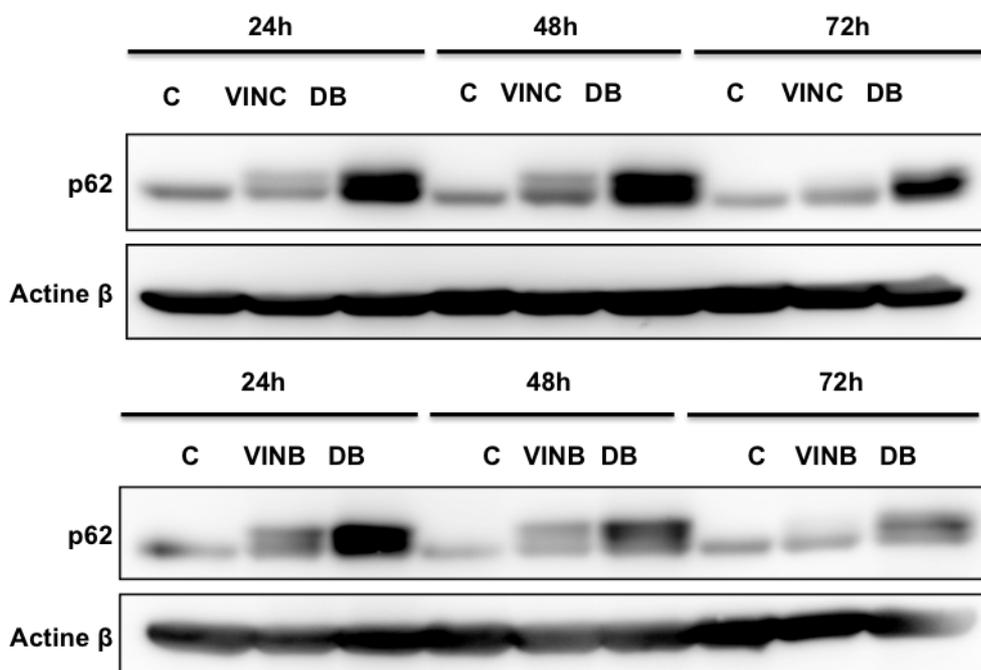


Figure 23 : Etude comparative de l'effet du TTSDB, de la vincristine et de la vinblastine sur l'expression de la protéine p62 dans les cellules HT-29. Les cellules HT-29 ont été traitées par le TTSDB (50  $\mu$ M) (DB), la vincristine (5 nM) (VINC), la vinblastine (3 nM) (VINB) pendant 24 h, 48 h et 72 h. Ces résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

## 1.7. Analyse de l'activité du protéasome dans les cellules HT-29

La voie ubiquitine-protéasome et l'autophagie sont les deux piliers du catabolisme cellulaire impliqué dans la physiologie et l'homéostasie cellulaire. Bien que de nombreuses études présentent un consensus général sur un lien entre ces deux voies cataboliques (Komatsu et al. 2006, Ding et al. 2007, Pandey et al. 2007, Korolchuk et al. 2010), les mécanismes sous-jacents qui relient ces deux processus restent mal connus à ce jour. Nous avons montré que le TTSDB induit une inhibition de l'autophagie. Nous supposons que le TTSDB promeut l'activation de l'autre voie catabolique majeure qu'est la voie de l'ubiquitine-protéasome. Pour ce faire, nous avons traité les cellules HT-29 par le TTSDB (50  $\mu$ M) pendant 30 min, 1 h, 3 h, 6 h, 9 h, 24 h et 48 h, puis nous avons évalué l'activité protéolytique des trois enzymes impliquées dans l'activité du protéasome (caspase, chymotrypsine et trypsine) grâce au kit Promega (**Figure 24**). Nos résultats montrent une augmentation sélective de l'activité protéolytique de la chymotrypsine dans les cellules traitées par le TTSDB (50  $\mu$ M) comparées au contrôle. Cette activité augmente en fonction du temps. Ces résultats supposent un rôle compensatoire entre les deux principales voies cataboliques : activation du protéasome vis à vis de l'inhibition de l'autophagie induite par le TTSDB.

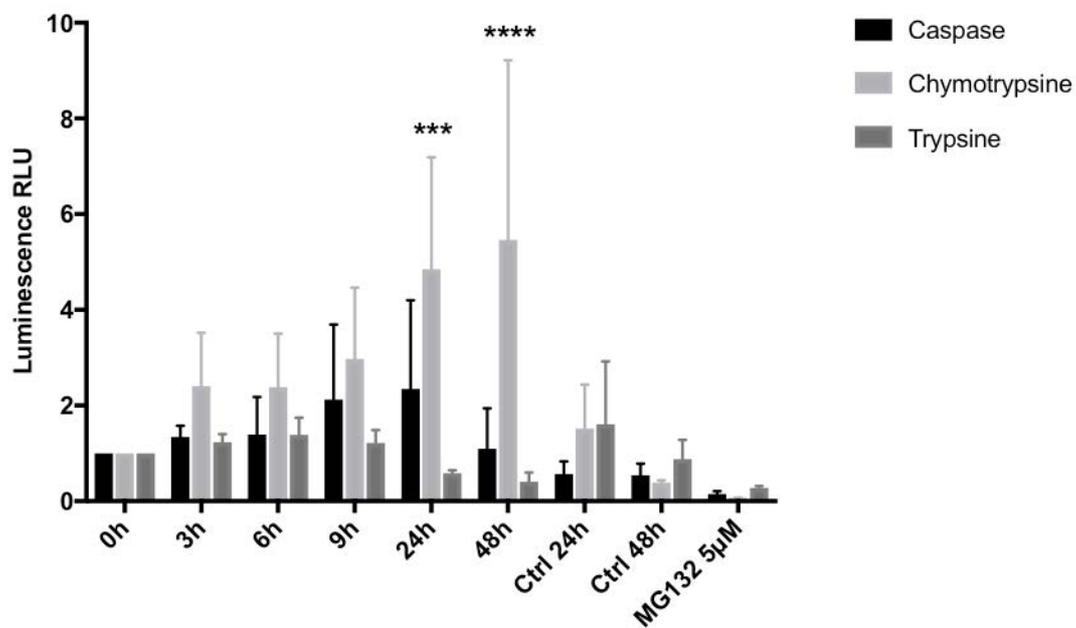


Figure 24 : Le TTSDB induit l'augmentation de l'activité protéolytique liée à la chymotrypsine dans le protéasome 26S. Les cellules HT-29 sont traitées par le TTSDB (50 µM) pendant 30 min, 1 h, 3 h, 6 h, 9 h, 24 h, et 48 h. L'activité protéolytique de la caspase, chymotrypsine et trypsine est mesurée par le kit Cell-based Proteasome-Glo™ Promega, les valeurs obtenues sont normalisées par le test de viabilité CellTiter-Glo® Promega. (n=3). Les résultats représentent la moyenne +/- ES (erreur standard) de trois expériences indépendantes.  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$ (\*\*),  $p < 0,001$ (\*\*\*), et  $p < 0,0001$ (\*\*\*\*) par ANOVA 2- Dunnett, comparés au contrôle respectif.

**En conclusion de cette partie :**

**- Le TTSDB (50  $\mu$ M) induit l'augmentation de l'activité protéolytique de la chymotrypsine dès 24 h de traitement dans les cellules HT-29.**

## **1.8. Evaluation de l'accumulation de la protéine p62**

### **1.8.1. Etude de la distribution cellulaire de la protéine p62**

Précédemment, nous avons observé une augmentation de l'expression de la protéine p62 par western-blot. Marqueur essentiel de la dégradation par l'autophagie, la protéine p62 est un substrat important dans l'autophagie. Ainsi, l'augmentation de p62 est souvent reliée à une inhibition ou une déficience de l'autophagie (Bjorkoy et al. 2005). Afin de mieux comprendre cette accumulation, nous nous sommes intéressés premièrement à la localisation intracellulaire de la protéine p62 par immunofluorescence à l'aide d'un anticorps spécifique de p62 dans les cellules HT-29 traitées par le TSSDB (50  $\mu$ M) pendant 24 h (**Figure 25a**). Les images de microscopie montrent une forte accumulation cytoplasmique de p62 sous forme de points après le traitement par le TSSDB comparé au contrôle similaire à l'accumulation des points GFP-LC3 (**Figure 25b**).

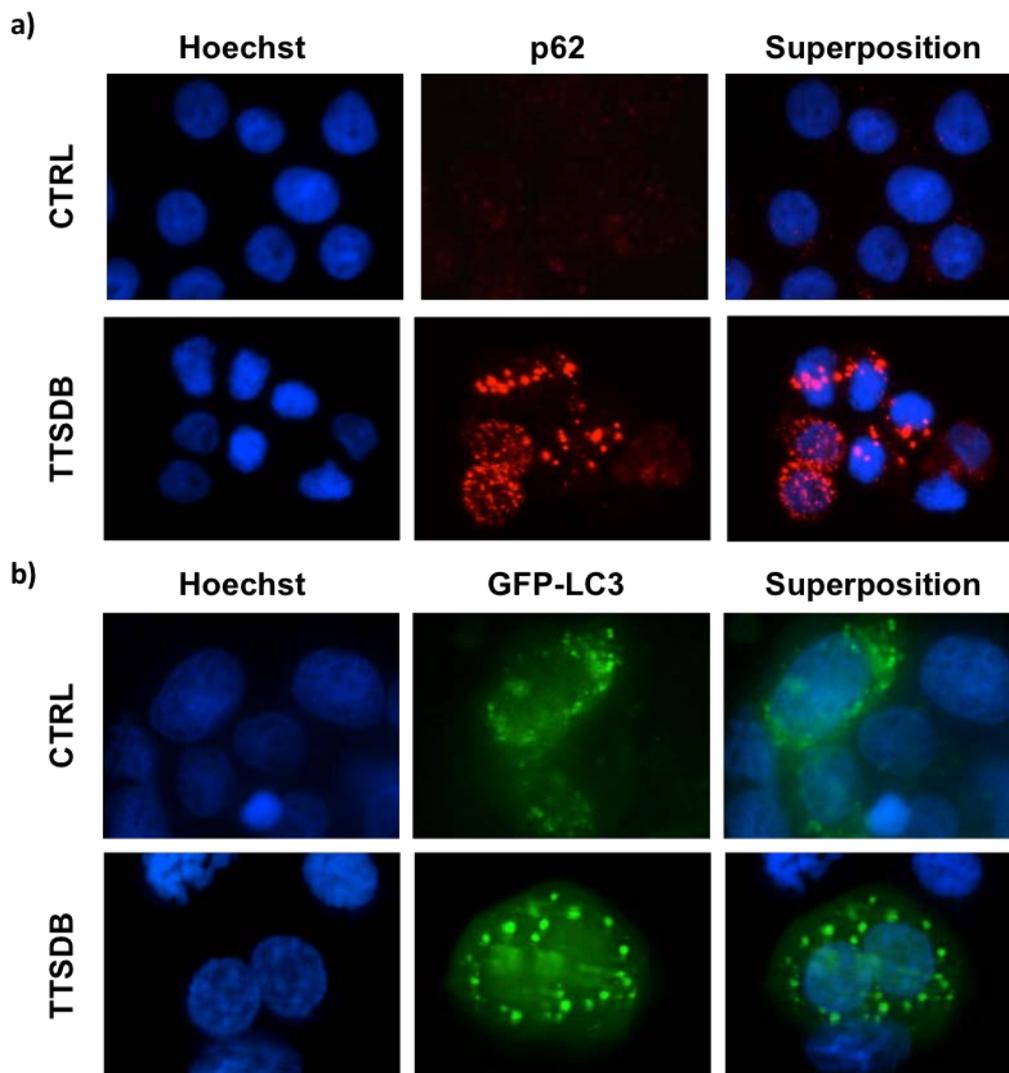


Figure 25 : Le TTSDB induit l'accumulation de la protéine p62 similaire à la formation de points GFP-LC3 dans les cellules HT-29. Les cellules HT-29 ont été traitées par le TTSDB (50  $\mu$ M) pendant 24 h. a) Analyse de la distribution cellulaire de la protéine p62 analysée par immunofluorescence en comparaison avec de cellules de contrôle (n=3). b) Analyse de la distribution cellulaire de la formation de points GFP-LC3 dans le cellules HT-29 transfectées avec le plasmide GFP-LC3 et traitées par le TTSDB (50  $\mu$ M) pendant 24 h (n=3).

### 1.8.2. Analyse de l'expression des ARNm de la protéine p62

L'accumulation de la protéine p62 peut être liée à une altération de la progression de l'autophagie ou à une synthèse *de novo*. Afin d'identifier les facteurs liés à l'accumulation de la protéine p62, nous avons analysé l'expression de son ARNm par PCR en temps réel (**Figure 26**). Ainsi, les cellules HT-29 ont été traitées pendant 3 h, 6 h, 9 h, 16 h et 24 h par le TTSDB (50  $\mu$ M). Les résultats de la PCR ont montré l'augmentation de l'expression des ARNm de p62 dès 3 h de traitement comparé au contrôle normalisé. Néanmoins l'augmentation de l'expression de l'ARNm de p62 présente une fluctuation au cours du temps (**Figure 26a**) avec une réduction dès 9 h de traitement, temps à partir duquel nous observons une accumulation de la protéine. En effet l'accumulation de la protéine p62 observée en premier lieu dès 3 heures de traitement résulterait de l'augmentation de la synthèse de l'expression des ARNm de la protéine p62, d'autre part, l'accumulation de la protéine p62 observée dès 16h de traitement résulterait de l'inhibition du flux autophagique étant donné les résultats portant sur le flux autophagique en présence de la bafilomycine A1 (**Figure 18**). Afin de compléter notre analyse nous avons poursuivi de même dans les cellules SW480 et SW620 traitées avec le TTSDB (10  $\mu$ M) pendant 1h, 3 h, 6 h, 9 h et 24 h. Les résultats montrent l'absence d'augmentation représentative dans les cellules SW480 (**Figure 26b**), et l'absence de modulation dans les cellules SW620 (**Figure 26c**).

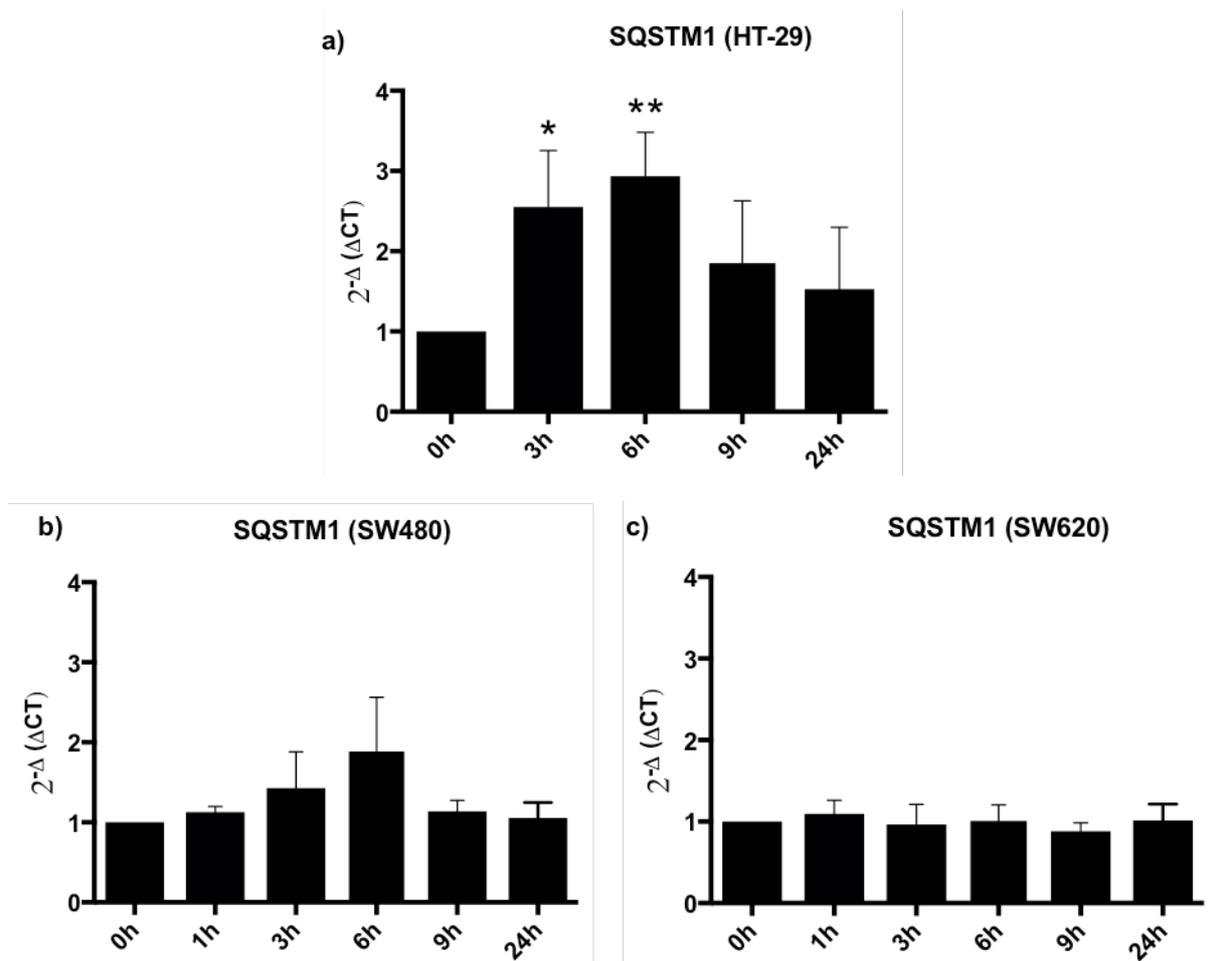


Figure 26 : Le TTSDB induit l'augmentation de l'expression de l'ARNm de la protéine p62 dans les cellules HT-29. L'expression des ARNm de la protéine p62 a été étudiée par PCR en temps réel. a) Les cellules HT-29 ont été traitées pendant 3 h, 6 h, 9 h et 24 h par le TTSDB (50  $\mu$ M). Les cellules SW480 (b) et SW620 (c) ont été traitées pendant 1 h, 3 h, 6 h, 9 h et 24 h par le TTSDB (10  $\mu$ M). Les résultats de PCR représentent la différence de la différence relative de la quantité de transcrite du gène cible par rapport à la quantité de transcrite du gène de référence (l'actine  $\beta$ ) selon la formule  $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$  à chaque temps indiqués. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  ES (erreur standard) de trois expériences indépendantes.  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$ (\*\*\*) et  $p < 0,0001$ (\*\*\*\*) par ANOVA 1- Dunnett, comparés au contrôle respectif.

### 1.8.3. Evaluation de l'équilibre rédox dans les cellules HT-29 traitées par le TTSDB.

De nombreuses études rapportent l'activité anti-oxydante des COS (Kim et al. 2014, Schafer and Kaschula 2014). Parmi les voies de détoxification, la voie NRF2 est une voie majeure qui joue un rôle clé dans la défense anti-oxydante (Kim and Keum 2016). De plus, la protéine p62 est un gène cible du facteur de transcription NRF2, cette dernière possède un domaine de liaison avec KEAP-1 (KIR), protéine senseur qui inhibe le facteur de transcription NRF2 en absence de stress oxydatif. Ainsi l'accumulation de p62 favoriserait la séquestration de KEAP-1 et conduirait à l'activation de NRF2, induisant l'activation de p62 dans une boucle rétroactive positive (Kansanen et al. 2012). Pour ce faire, nous nous sommes premièrement intéressés à l'expression des ARNm de la protéine hème-oxygénase-1 (HO-1), connue pour ses propriétés anti-oxydantes. Les cellules HT-29, SW480 et SW620 ont été traitées pendant 1h, 3 h, 6 h, 9 h, et 24 h par le TTSDB (50  $\mu$ M et 10  $\mu$ M respectivement). L'analyse par PCR en temps réel montre l'augmentation de l'expression de l'HO-1 dès 3 h de traitement par le TTSDB dans les cellules HT-29 (**Figure 27a**). Nous avons observé l'absence d'augmentation dans les cellules SW480 et SW620 (**Figure 27b et c**). Afin d'évaluer le stress oxydatif potentiellement responsable de l'augmentation de la transcription d'HO-1 et p62, nous avons vérifié la production d'ERO dans notre modèle. Nous avons analysé le niveau d'ERO produit par les cellules HT-29, SW480 et SW620 traitées par le TTSDB (50  $\mu$ M et 10  $\mu$ M respectivement) pendant différents temps 30 min, 1 h, 3 h, 6 h, 9 h et 24 h par fluorométrie en utilisant la sonde diacétate de dichloro-fluorescéine (H<sub>2</sub>DADCF) qui permet la détection de différentes ERO tels que le radical hydroxyl, l'acide hypochlorique, l'oxyde nitrique, radical peroxy (**Figure 27d, e, f**). Nous avons observé l'absence de production d'ERO dans toutes lignées confondues. Ensemble, ces résultats suggèrent une modulation de l'équilibre rédox dans les cellules HT-29 potentiellement due à l'augmentation de l'expression de l'ARNm de l'HO-1, bien que le TTSDB n'induit pas la production d'ERO.

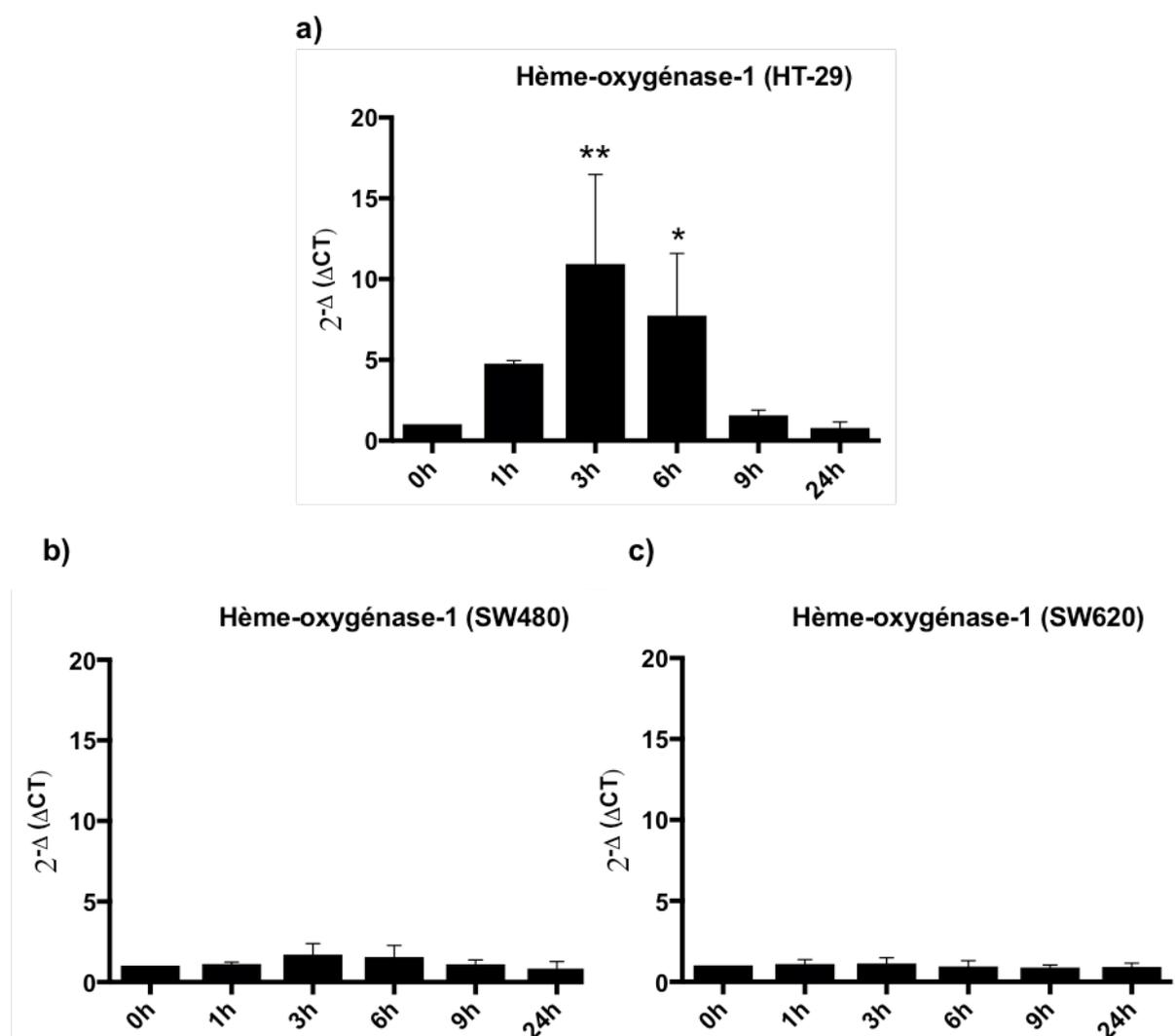


Figure 27 : Etude de l'effet du TTSDB sur le stress oxydatif. L'expression de l'ARNm de la protéine anti-oxydante HO-1 a été étudiée par PCR en temps réel. Les cellules HT-29 (a), SW480 (b) et SW620 (c) ont été traitées pendant 1h, 3 h, 6 h, 9 h, et 24 h par le TTSDB (50  $\mu$ M et 10  $\mu$ M respectivement) ( $n=3$ ). Les résultats de PCR représentent la différence de la différence relative de la quantité de transcrite du gène cible par rapport à la quantité de transcrite du gène de référence (l'actine  $\beta$ ) selon la formule  $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$  à chaque temps indiqués. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  ES (erreur standard) de trois expériences indépendantes.  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$ (\*\*),  $p < 0,001$ (\*\*\*), et  $p < 0,0001$ (\*\*\*\*) par ANOVA 1-Dunnett, comparés au contrôle respectif.

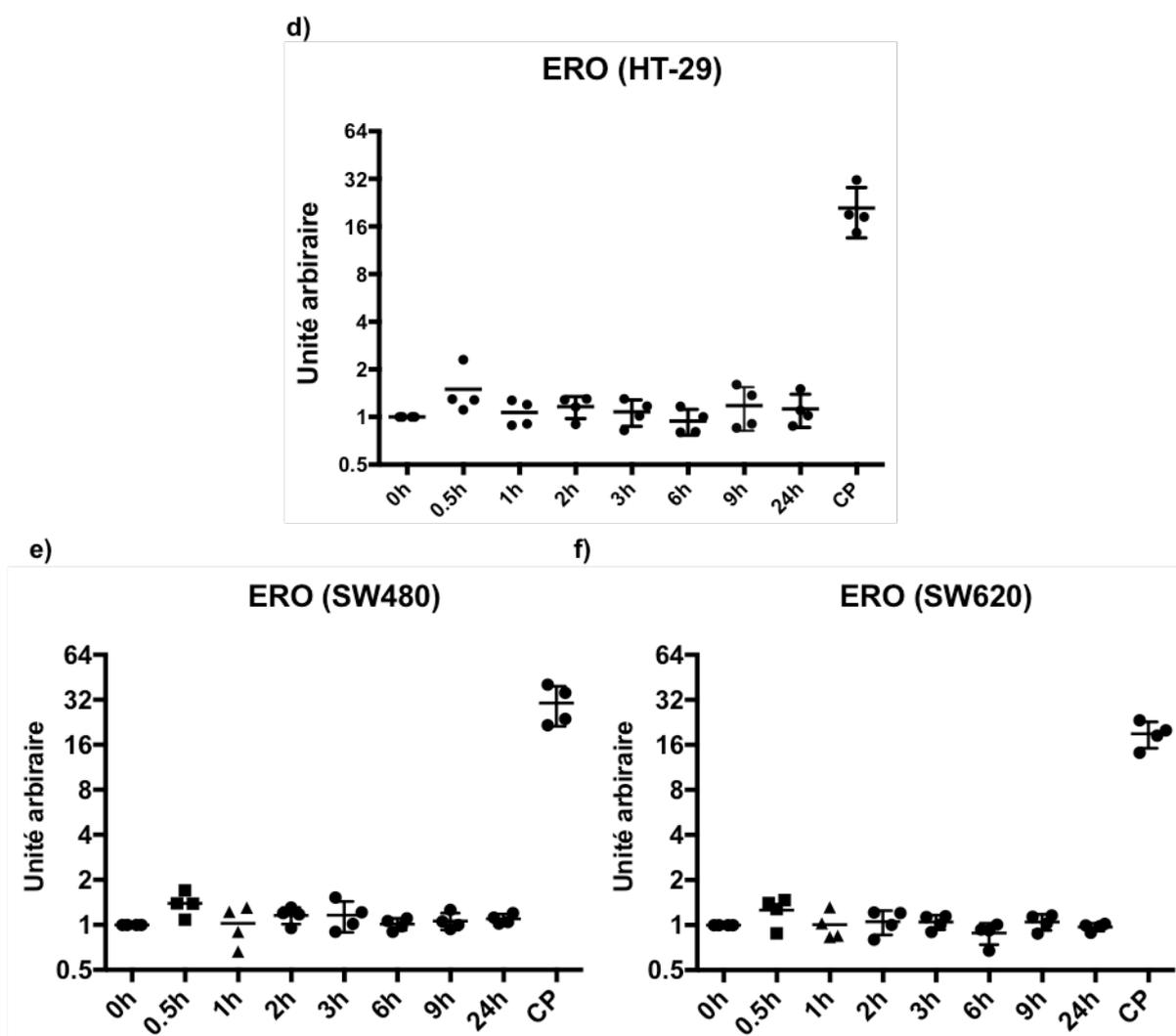


Figure 27 : Représentation graphique de la mesure des espèces réactives d'oxygène. Les cellules HT-29 (d), SW480 (e) et SW620 (f) ont été traitées par le TTSDB (50  $\mu\text{M}$  et 10  $\mu\text{M}$  respectivement) à rebours pendant 30 min, 1 h, 3 h, 6 h, 9 h et 24 h, le niveau d'espèces réactives d'oxygènes a été mesuré par fluorométrie après marquage au diacétate de dichlorofluoréscéine ( $\text{H}_2\text{DADCF}$ ) pendant 20 min. L'hydrogène peroxide (100  $\mu\text{M}$ , 4 h) a été utilisé comme contrôle positif (CP). Les résultats représentent la différence relative par rapport au contrôle. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences  $\pm$  ES (erreur standard).

**En conclusion de cette partie :**

- **Nous avons montré que le TTSDDB induit à 24 h de traitement une accumulation de la protéine p62 similaire à la formation de points GFP-LC3 dans les cellules HT-29.**
- **Le TTSDDB augmente l'expression de l'ARNm de la protéine p62 et HO-1 dès 3 h et 1 h de traitement respectivement dans les cellules HT-29.**
- **Le TTSDDB n'induit pas la formation d'ERO dans les lignées HT-29, SW480 et SW620.**

## **1.9. Analyse de la modulation de la protéine p62**

### **1.9.1. Etude du rôle de l'inhibition de la biosynthèse de protéine dans l'accumulation de la protéine p62 et l'arrêt du cycle cellulaire**

Les résultats de la PCR ont montré l'augmentation de l'expression de l'ARNm de la protéine p62 par le TTSDB. Afin de comprendre le rôle de la néosynthèse dans l'accumulation de la protéine p62 et l'arrêt du cycle cellulaire. Nous avons inhibé la synthèse protéique par la cycloheximide (CHX), un pan inhibiteur ciblant un large spectre de protéines selon plusieurs combinaisons de traitement. Pour ce faire, nous avons premièrement procédé à un pré-traitement de 8 h par la CHX suivi d'un traitement par le TTSDB de 24 h pour identifier l'effet de l'inhibition préalable de la synthèse protéique sur l'expression de la protéine p62 et l'arrêt du cycle cellulaire. Ensuite, nous avons conduit un traitement concomitant du TTSDB et de la CHX de 24 h. L'analyse par western blot révèle que le pré-traitement par la CHX suivi du traitement par le TTSDB pendant 24 h ainsi que le traitement concomitant par le TTSDB et la CHX réduisent l'expression de la protéine p62 de  $27,6 \pm 5,4$  % et  $36,4 \pm 4,2$  % respectivement par rapport au TTSDB seul (**Figure 28**). Le traitement concomitant du TTSDB et de la CHX abolit l'accumulation des cellules HT-29 en phase G2/M, le pourcentage des cellules en phase G2/M passe de  $85,2 \pm 4,1$  % dans le cas du traitement par le TTSDB seul à  $34,2 \pm 9,8$  % dans le cas du traitement concomitant (TTSDB et CHX) et à  $46,5 \pm 21,5$  % pour le pré-traitement par la CHX suivi du TTSDB (**Figure 29**). Ces résultats nous laissent supposer que la synthèse en amont de certaines protéines essentielles dans la régulation du cycle cellulaire est requise dans l'activité du TTSDB à induire l'arrêt mitotique. En revanche, ces résultats ne nous permettent pas de conclure sur un effet direct sur la modulation de la protéine p62.

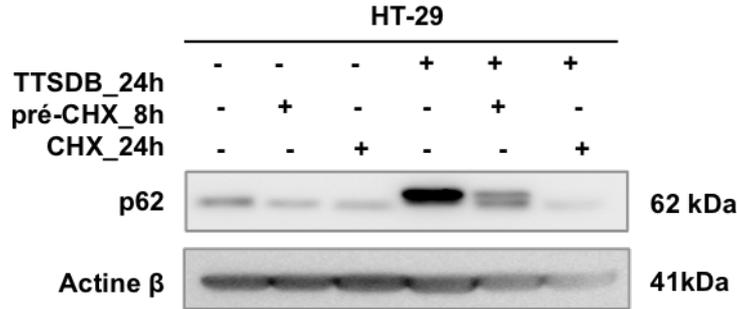


Figure 28 : L'inhibition de la synthèse protéique réduit l'expression de la protéine p62. Western blot des cellules HT-29 traitées selon différentes combinaisons : traitement par le TTSDB (50  $\mu$ M) seul pendant 24 h, pré-traitement par la CHX de 8 h (10  $\mu$ M) (pré-CHX\_8h) suivi d'un traitement par le TTSDB (50  $\mu$ M) pendant 24 h et co-traitement par le TTSDB (50  $\mu$ M) et la CHX (10 mM) pendant 24 h (n=3).

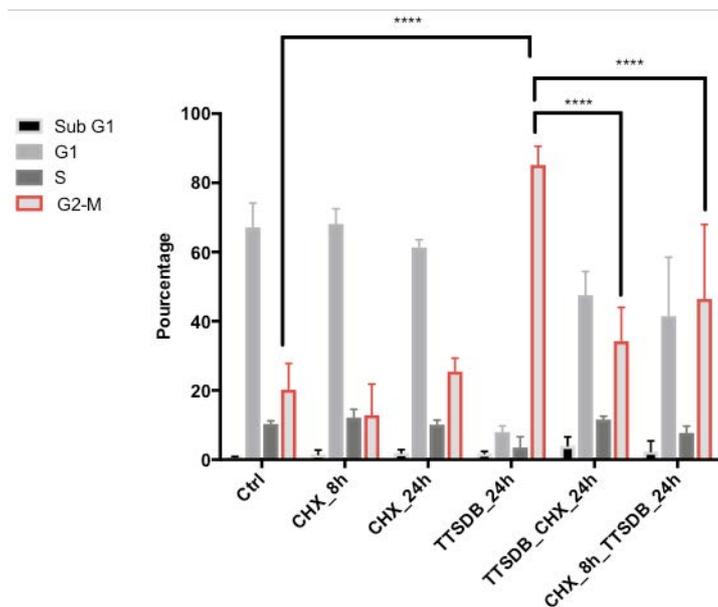


Figure 29 : L'inhibition de la synthèse des protéines altère l'effet du TTSDB sur la distribution du cycle cellulaire. Les cellules HT-29 ont été traitées selon différentes combinaisons : traitement par le TTSDB seul (TTSDB\_24h), co-traitement par le TTSDB et la CHX pendant 24 h (TTSDB\_CHX\_24h), pré-traitement par la CHX de 8 h suivi d'un traitement par le TTSDB pendant 24 h (CHX\_8h\_TTSDB\_24h) (n=3). Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  ES (erreur standard) de trois expériences indépendantes.  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$ (\*\*),  $p < 0,001$ (\*\*\*), et  $p < 0,0001$ (\*\*\*\*) par ANOVA 2- Dunnett, comparés au contrôle respectif.

### 1.9.2. Etude du rôle de l'inhibition du protéasome dans l'accumulation de la protéine p62 et l'arrêt du cycle cellulaire

Nous avons montré que le TTSDB induit une augmentation de l'activité protéolytique liée à la chymotrypsine dans le protéasome et que le TTSDB inhibait l'autophagie à 24 h de traitement. Conjointement, la protéine p62 atteint une accumulation de  $150 \pm 18,4 \%$  à 24 h alors qu'elle semble jouer un rôle de liaison entre l'autophagie et le système ubiquitine-protéasome (Kirkin et al. 2009). Afin de comprendre le lien entre l'activation du protéasome, l'accumulation de la protéine p62 et l'arrêt du cycle cellulaire nous avons procédé à différentes combinaisons de traitement avec l'inhibiteur sélectif du protéasome MG132. Premièrement, nous avons procédé à un pré-traitement de 4 h par le MG132 à raison de  $5 \mu\text{M}$  (concentration et temps nécessaire pour inhiber l'activité du protéasome), suivi de 24 h de traitement par le TTSDB afin de déterminer si l'inactivation préalable du protéasome pourrait conduire à une prévention de l'accumulation de la protéine p62 et l'arrêt mitotique induits par le TTSDB. Deuxièmement, nous avons procédé à un traitement concomitant du TTSDB ( $50 \mu\text{M}$ ) et du MG132 ( $5 \mu\text{M}$ ) pendant 24 h pour identifier si l'inactivation concomitante du protéasome au traitement par le TTSDB pourrait contrer ces deux événements. Les résultats obtenus par western blot montrent que le pré-traitement par MG132 suivi de 24 h de traitement par le TTSDB réduit de  $74,4 \pm 10,3 \%$  l'expression de la protéine p62 (**Figure 30**) contre le traitement par le TTSDB seul. Le co-traitement TTSDB et MG132 réduit de  $64,2 \pm 8,4 \%$  l'expression de la protéine p62 comparée au traitement par le TTSDB seul. L'analyse par cytométrie en flux montre que le co-traitement (TTSDB et le MG132) et le pré-traitement par MG132 ( $5 \mu\text{M}$ ) inhibent l'accumulation des cellules en phase G2/M induite par le TTSDB seul. Le pourcentage de cellules en phase G2/M passe de  $85,2 \pm 5,4 \%$  dans le cas du traitement par le TTSDB seul à  $33,8 \pm 8,4 \%$  dans le cas du co-traitement puis à  $31,9 \pm 4,9 \%$  dans le cas du pré-traitement par le MG132 (**Figure 27**). Ces résultats montrent que l'inhibition du protéasome bloque l'accumulation des cellules en phase G2-M induites par le TTSDB dans les cellules HT-29. Cependant, il est difficile de conclure d'un lien entre l'activation du protéasome et l'augmentation de l'expression de la protéine p62 induite par l'altération du flux autophagique (**Figure 31**).

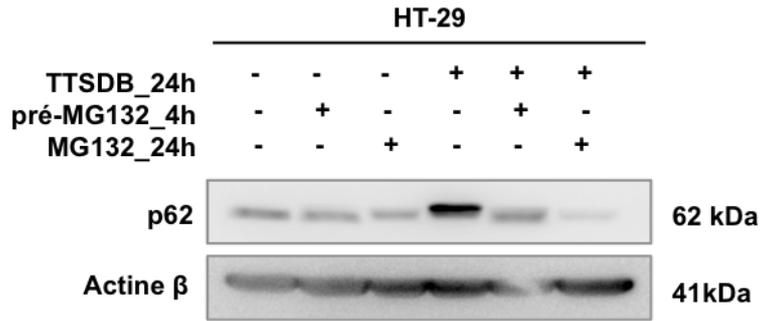


Figure 30 : L'inhibition du protéasome réduit l'expression de la protéine p62. Western blot des cellules HT-29 traitées selon différentes combinaisons : traitement par le TTSDDB (50  $\mu$ M) seul pendant 24 h, pré-traitement par le MG132 (5  $\mu$ M) de 4 h (pré-MG132\_4h) suivi d'un traitement par le TTSDDB pendant 24 h, co-traitement par le TTSDDB (50  $\mu$ M) et MG132 (5  $\mu$ M) pendant 24 h (n=3).

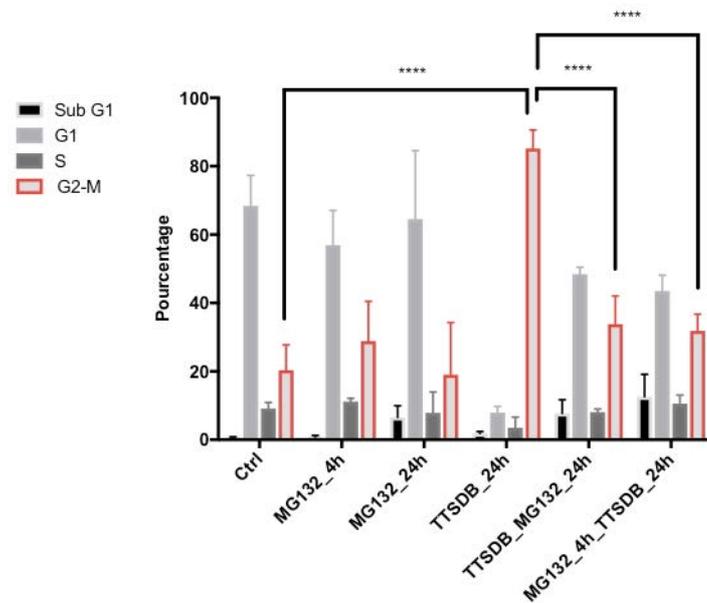
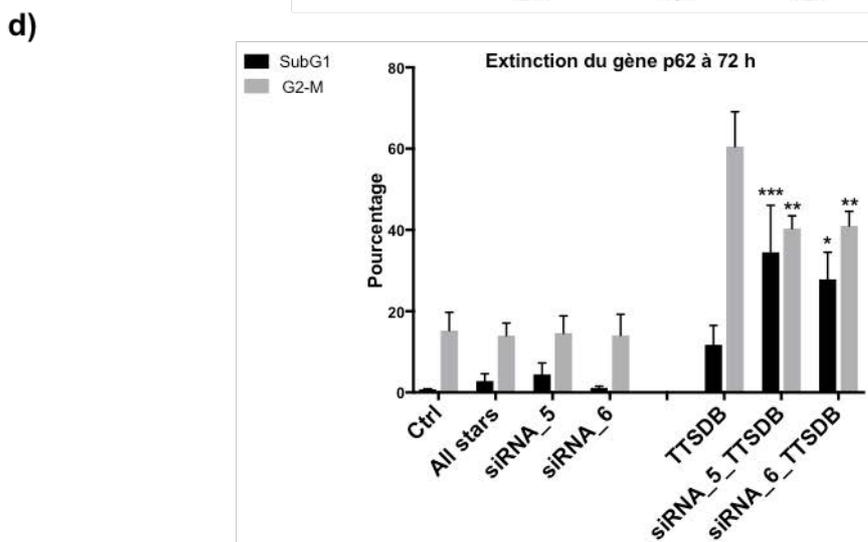
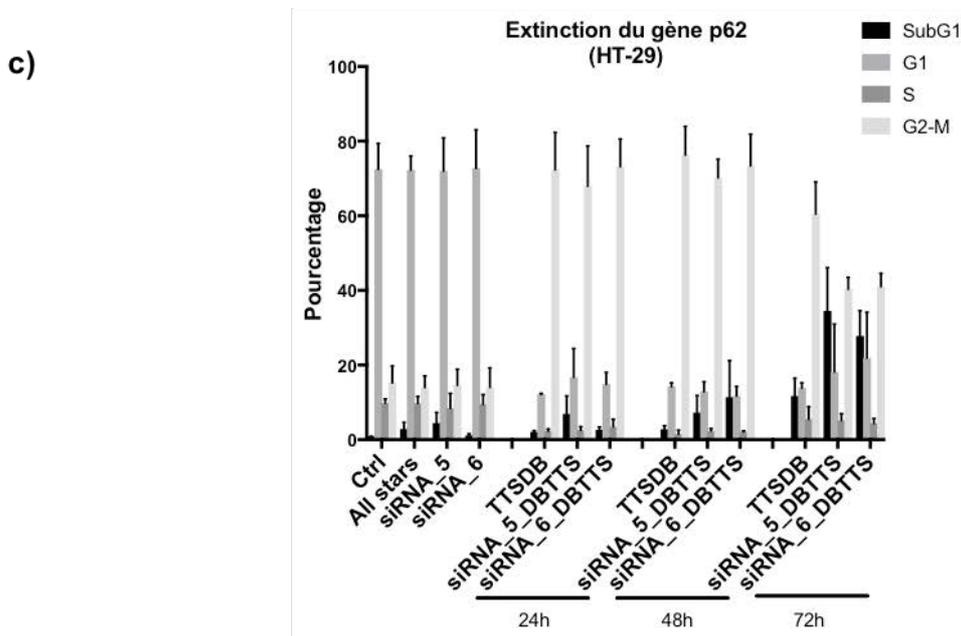
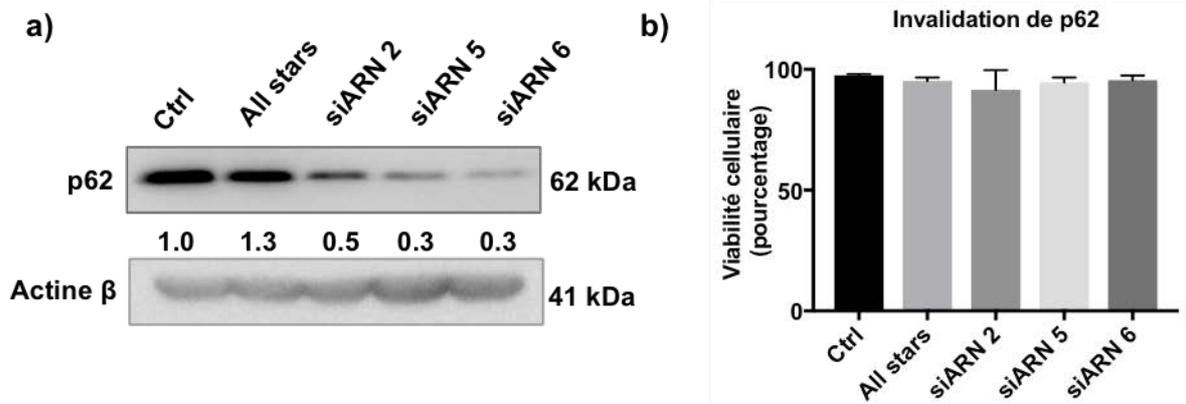


Figure 31 : L'inhibition du protéasome renverse l'effet du TTSDDB sur la progression du cycle cellulaire. Les cellules HT-29 ont été traitées selon différentes combinaisons : co-traitement par le TTSDDB et MG132 pendant 24 h (TTSDDB\_MG\_24h), pré-traitement par le MG132 suivi d'un traitement par le TTSDDB pendant 24 h (MG\_4h\_TTSDDB\_24h) (n=3). Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  ES (erreur standard) de trois expériences indépendantes.  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$ (\*\*),  $p < 0,001$ (\*\*\*), et  $p < 0,0001$ (\*\*\*\*) par ANOVA 2- Dunnett, comparés au contrôle respectif.

### 1.9.3. Evaluation de l'effet de l'extinction du gène p62 dans les cellules HT-29

De nombreuses études ont accordé un rôle pro-tumeur à la protéine p62 comme décrit plus haut. Afin d'identifier le rôle précis de l'augmentation de la protéine p62 dans la réponse thérapeutique du TTSDB dans les cellules HT-29, nous avons éteint l'expression de la protéine p62 avec les siARNs (ici appelé siARN5 et siARN6). Tout d'abord, nous avons vérifié l'extinction du gène par western blot (**Figure 32a**) et son impact sur la viabilité cellulaire par le bleu de trypan (**Figure 32b**) puis nous nous sommes intéressés à l'effet de l'extinction de p62 sur la distribution du cycle cellulaire des cellules HT-29 traitées par le TTSDB (50  $\mu$ M) pendant 24 h, 48 h et 72 h. Nos résultats ont mis en évidence l'absence d'effet différentiel représentatif entre les cellules HT-29 non-transfectées et transfectées avec siARN5/6 entre 24 h et 48 h de traitement (**Figure 32c**). En revanche, à 72 h de traitement, les cellules transfectées avec siARN 5/6 présentent une réduction significative des cellules en phase G2-M et une augmentation significative du pourcentage de cellules en phase Sub G1 suggérant ainsi une sensibilisation des cellules HT-29 au TTSDB en absence de la protéine p62 (**Figure 32d**). Afin de compléter notre analyse, nous nous sommes intéressés à l'effet de l'extinction de p62 sur le clivage de la caspase-3. L'analyse western blot n'a pas révélé d'effet différentiel remarquable dans les cellules non-transfectées vs. transfectées avec siARN 5/6 (**Figure 32e**). Nous avons aussi évalué l'analyse de l'activité enzymatique des caspases effectrices -3 et -7 par luminométrie. Cette analyse a mis en évidence une différence significative entre les cellules non-transfectées et transfectées avec siARN 5/6 (**Figure 32f**). En effet, les cellules p62-knock-down augmentent l'activité enzymatique des caspases-3 et -7. Ensemble ces résultats suggèrent une sensibilisation des cellules HT-29 à la mort cellulaire en absence de la protéine p62.



(La légende se trouve sur la page suivante)

Figure 32 : Effet de l'extinction de p62 dans les cellules HT-29. a) Analyse de l'expression de p62 par western-blot dans les cellules HT-29 transfectées ou non avec siARN2, siARN5 ou siARN6. b) Analyse de la viabilité cellulaire des cellules HT-29 transfectées avec siARN2, siARN5 ou siARN6 par le bleu de Trypan. c) Analyse du cycle cellulaire des cellules HT-29 transfectées ou non avec siARN 5 ou siARN 6 puis traitées par le TTSDB (50  $\mu$ M) pendant 24 h, 48 h et 72 h. b) Graphique représentant les cellules en phase G2-M et sub-G1 à 72 h de traitement. (n=3). Les résultats représentent la moyenne +/- ES (erreur standard) de trois expériences indépendantes.  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$ (\*\*),  $p < 0,001$ (\*\*\*), et  $p < 0,0001$ (\*\*\*\*) par ANOVA 2- Dunnnett (cycle cellulaire), test de Student (viabilité) comparés au contrôle indiqué.

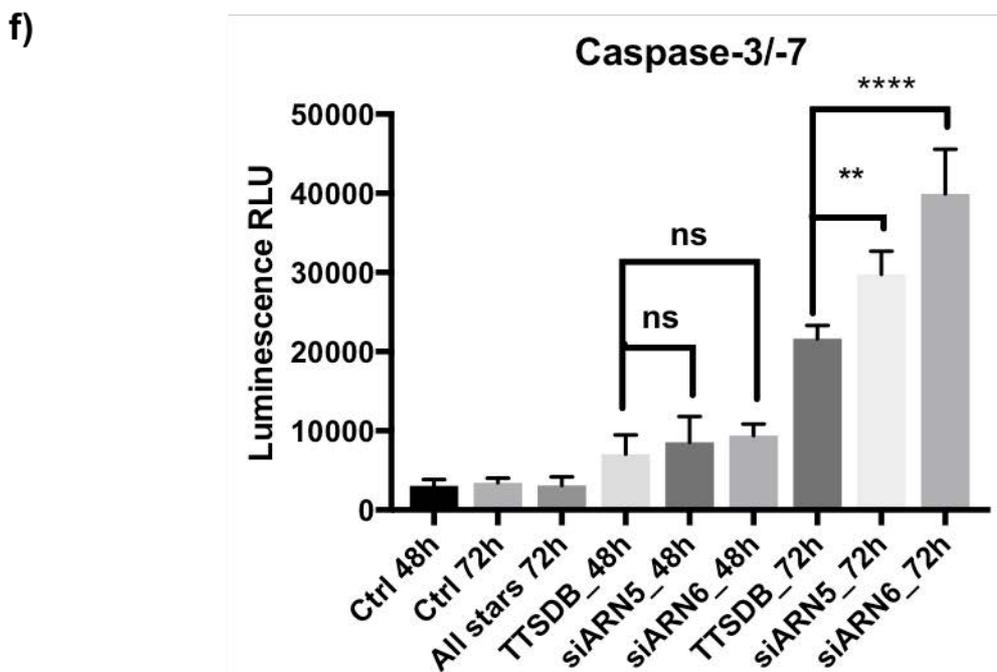
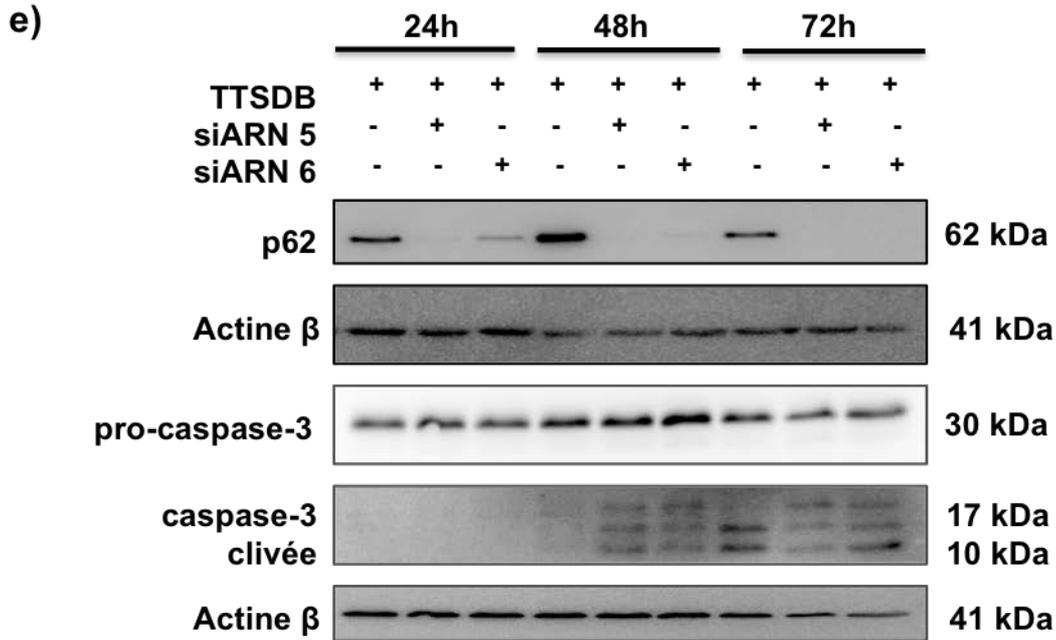


Figure 32 : Effet de l'extinction de p62 dans les cellules HT-29. e) Analyse de l'expression de la caspase-3 par western-blot dans les cellules HT-29 transfectées ou non avec siARN5 ou siARN6 puis traitées avec le TTSDB 50 ( $\mu$ M) ( $n=3$ ). L'expression de p62 est utilisée comme contrôle de l'extinction. f) Analyse de l'activité enzymatique des caspases-3 et -7 par luminométrie ( $n=3$ ). Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  ES (erreur standard) de trois expériences indépendantes.  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*) et  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*) par ANOVA 2- Dunnnett, comparés au contrôle indiqué.

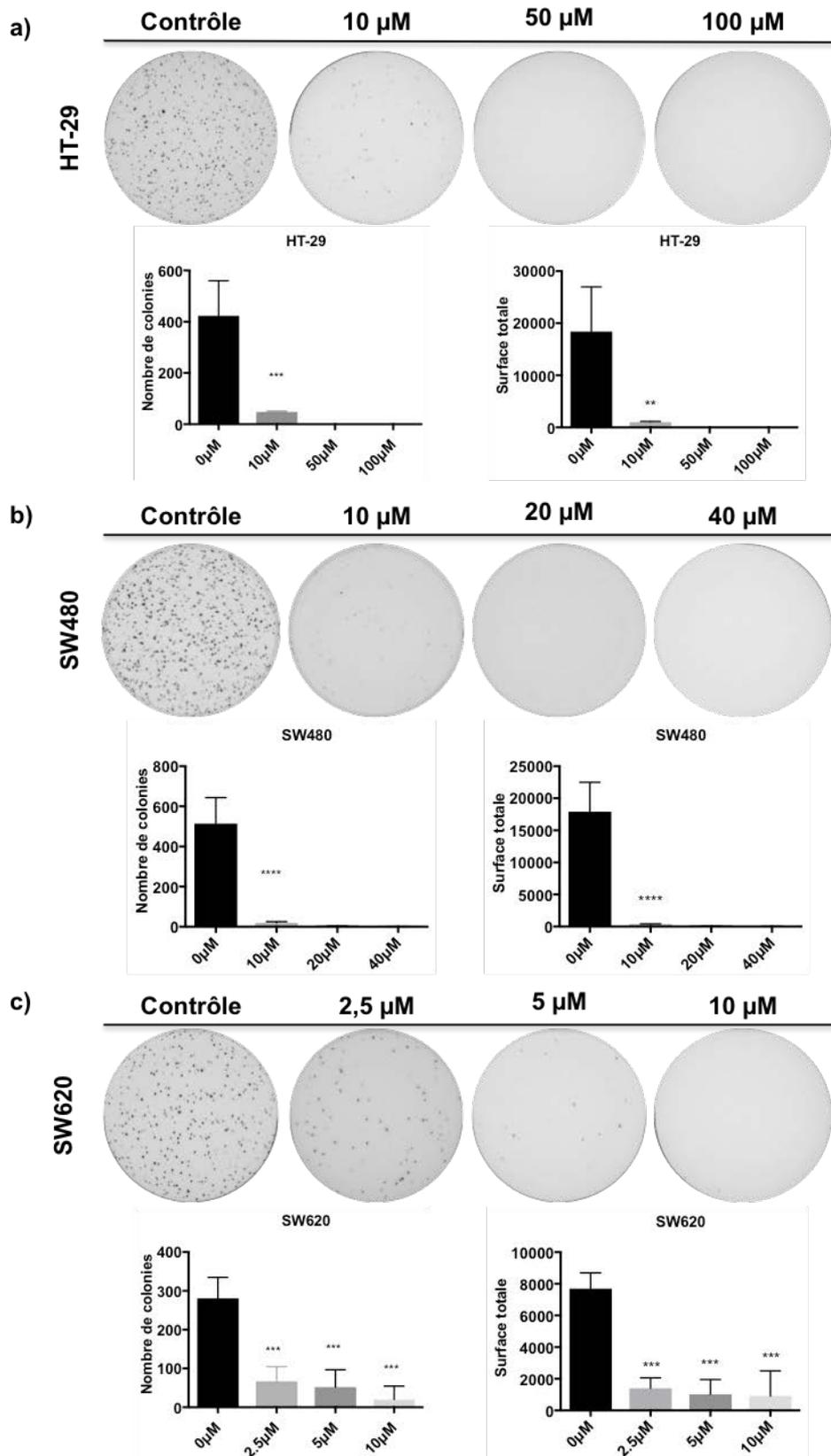
**En conclusion de cette partie :**

- L'inhibition de la synthèse protéique par la CHX contre l'accumulation de la protéine p62 et l'augmentation du pourcentage des cellules HT-29 en phase G2-M induites par le TTSDB après 24 h de traitement.**
- L'inhibition du protéasome par MG132 réduit l'accumulation de la protéine p62 et le pourcentage de cellules HT-29 en phase G2-M induits par le TTSDB après 24 h de traitement.**
- L'extinction de la protéine p62 sensibilise les cellules HT-29 à la mort cellulaire induite par le TTSDB après 72 h de traitement sans moduler les effets de TTSDB sur le cycle cellulaire.**

## **1.10. Etude translationnelle du potentiel anticancéreux du TTSDB**

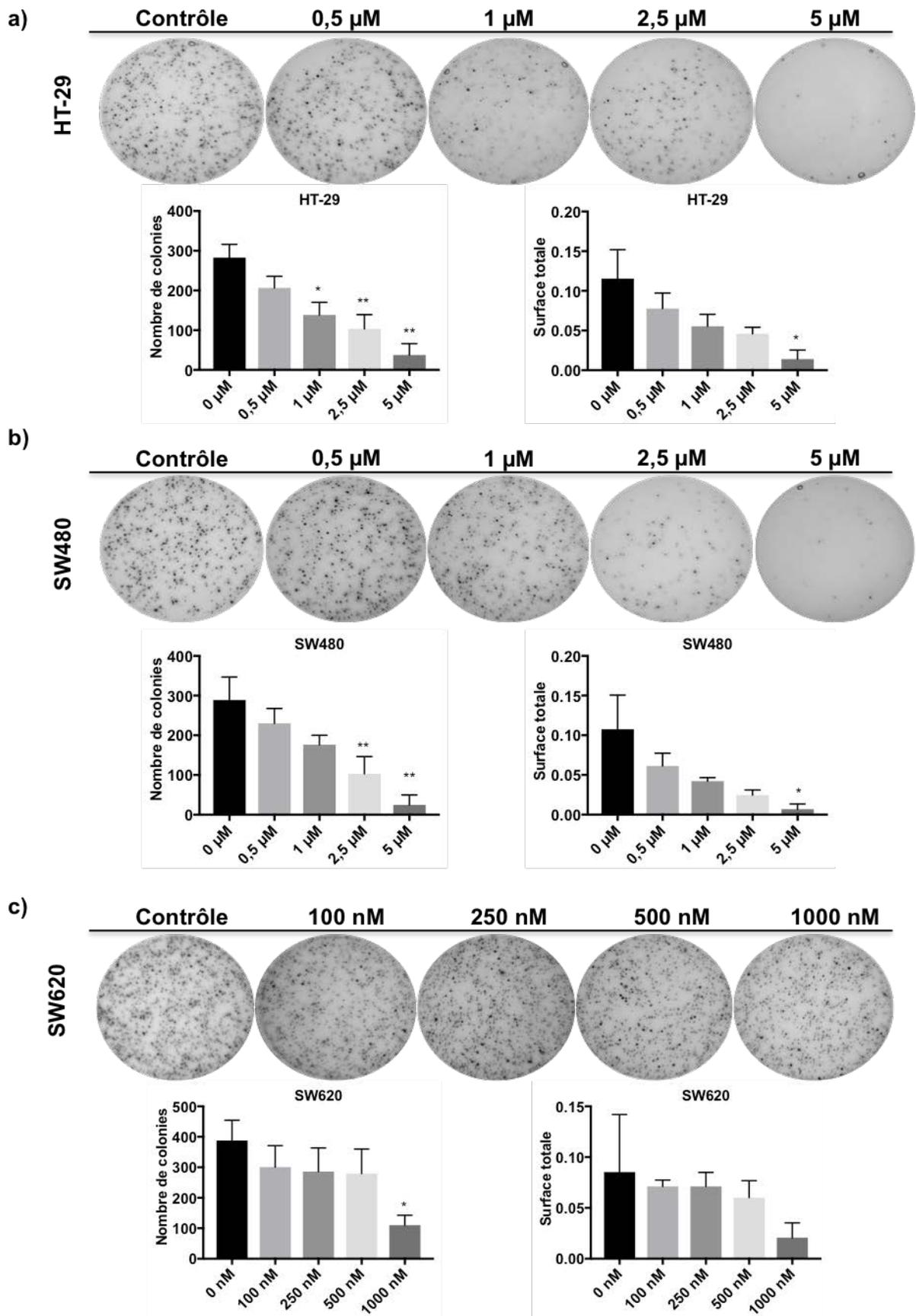
### **1.10.1. Analyse de l'effet du TTSDB sur la formation de colonie**

Afin de mieux comprendre les modalités de réponse du TTSDB dans le cancer du côlon nous avons étudié la capacité du TTSDB à réduire la formation de colonies à partir des cellules HT-29, SW480 et SW620. Nous avons utilisé différentes concentrations de la  $CI_{50}$  déterminée préalablement par le test MTT. Nous avons traité les cellules HT-29 par 10, 50 et 100  $\mu\text{M}$ , les cellules SW480 par 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  et 40  $\mu\text{M}$ , et enfin les cellules SW620 par 2,5 ; 5 et 10  $\mu\text{M}$ . Nos résultats montrent un robuste effet antiprolifératif du TTSDB sur les trois lignées cellulaires confondues (**Figure 33**). En effet, 10  $\mu\text{M}$  de TTSDB suffisent pour réduire fortement le nombre de colonies contre le contrôle dans les cellules HT-29 (**Figure 33a**). Au delà de 10  $\mu\text{M}$ , le TTSDB abolit complètement la formation de colonies. Similairement, dans les cellules SW480, 10  $\mu\text{M}$  de TTSDB réduit très fortement le nombre de colonies comparées au contrôle (**Figure 33b**). Dans les cellules SW620, le nombre de colonies est réduit par le TTSDB 2,5  $\mu\text{M}$  (**Figure 33c**). Ces paramètres sont en ligne avec le nombre de colonies dans toutes les lignées confondues. Néanmoins afin d'identifier un effet concentration-dépendant, nous avons évalué l'effet du TTSDB à des concentrations plus faibles telles que 0,5 ; 1 ; 2,5 et 5  $\mu\text{M}$  pour les cellules HT-29 et SW480 et 100 ; 250 ; 500 et 1000 nM pour les cellules SW620 (**Figure 34**). Ainsi, la formation de colonies des cellules HT-29 (**Figure 33a**) et SW480 (**Figure 34b**) est affectée dès 2,5  $\mu\text{M}$  contre 1  $\mu\text{M}$  pour les cellules SW620 (**Figure 34c**).



*(La légende se trouve sur la page suivante)*

*Figure 33 : Effet du TTSDB sur la formation de colonies dans les cellules du cancer du côlon. Test clonogénique des cellules HT-29 (a), SW480 (b) traitées par 10, 50 et 100  $\mu$ M de TTSDB et des cellules SW620 (c) traitées par 2,5 ; 5 et 10  $\mu$ M pendant 10 jours. Représentation des images des colonies et des graphiques respectifs des paramètres du nombre de colonies et de la surface totale. Les résultats représentent la moyenne +/- ES (erreur standard) de trois expériences indépendantes.  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$ (\*\*),  $p < 0,001$ (\*\*\*), et  $p < 0,0001$ (\*\*\*\*) par ANOVA 1- Dunnett, comparés au contrôle respectif.*



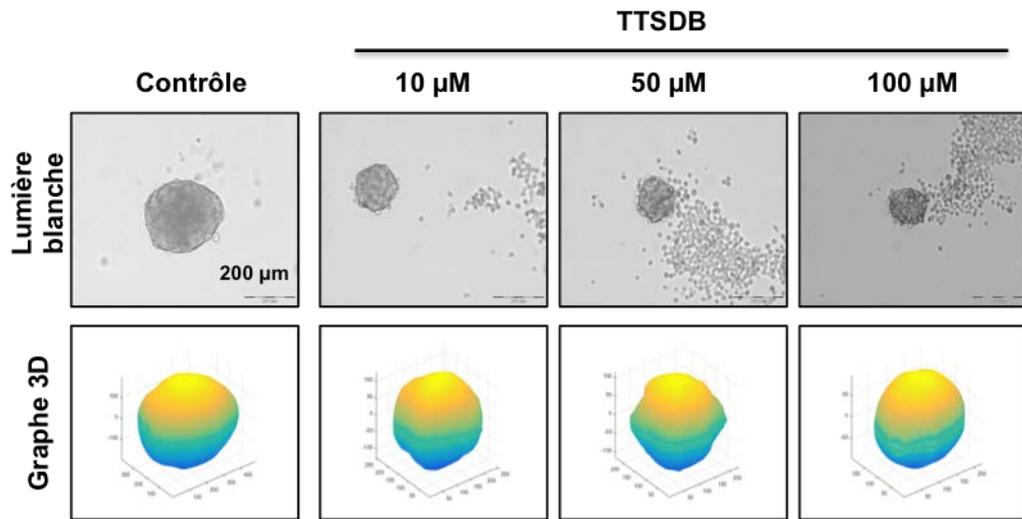
(La légende se trouve sur la page suivante)

*Figure 34 : Effet des faibles concentration du TTSDB sur la formation de colonies dans les cellules du cancer du côlon représenté par les images des puits contrôles et traités ainsi que les graphiques des paramètres du nombre de colonies et de la surface totale. a) Test clonogénique des cellules HT-29 (a) et SW480 (b) traitées par 0,5 ; 1 ; 2,5 ; et 5  $\mu$ M de TTSDB et des cellules SW620 traitées par 100, 250, 500 et 1000 nM de TTSDB pendant 10 jours. Les résultats représentent la moyenne +/- ES (erreur standard) de trois expériences indépendantes.  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$ (\*\*),  $p < 0,001$ (\*\*\*), et  $p < 0,0001$ (\*\*\*\*) par ANOVA 1-Dunnett, comparés au contrôle respectif.*

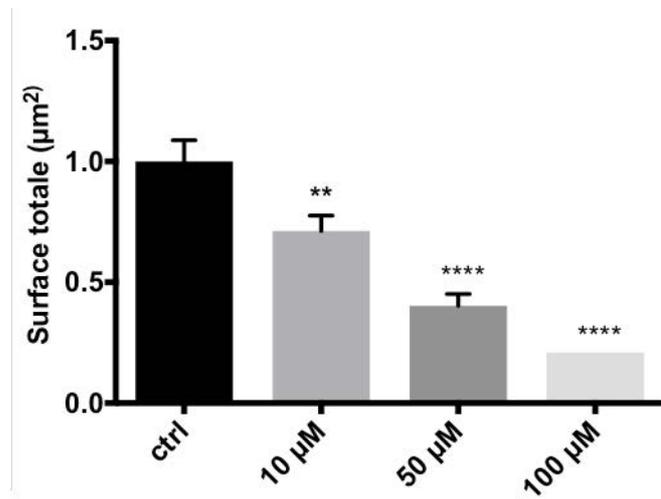
### **1.10.2. Analyse de l'effet du TTSDDB sur la formation d'un sphéroïde issu des cellules HT-29.**

Pour fournir des preuves supplémentaires sur le potentiel antiprolifératif du TTSDDB dans des conditions tridimensionnelles du cancer du côlon, nous avons évalué l'effet du TTSDDB sur la formation de sphéroïde. Les sphéroïdes sont des modèles intermédiaires entre la culture 2D et la tumeur *in vivo*. Ce modèle tridimensionnel *in vitro* mime l'organisation et l'hétérogénéité du microenvironnement tumoral *in vivo*. Nous avons évalué l'effet de différentes concentrations du TTSDDB (10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  et 100  $\mu\text{M}$ ) sur la prolifération cellulaire en 3D au sein des sphéroïdes issus des cellules HT-29 mises en culture pendant quatre jours (**Figure 35a**). En parallèle, nous avons évalué l'impact de ces mêmes concentrations du TTSDDB sur la viabilité cellulaire des sphéroïdes. Ainsi nous avons montré que le TTSDDB (50  $\mu\text{M}$ ) réduit significativement l'aire (**Figure 35b**) et la viabilité du sphéroïde issu des cellules HT-29 (**Figure 35c**). Ces résultats ouvrent les perspectives pour l'application du TTSDDB *in vivo*.

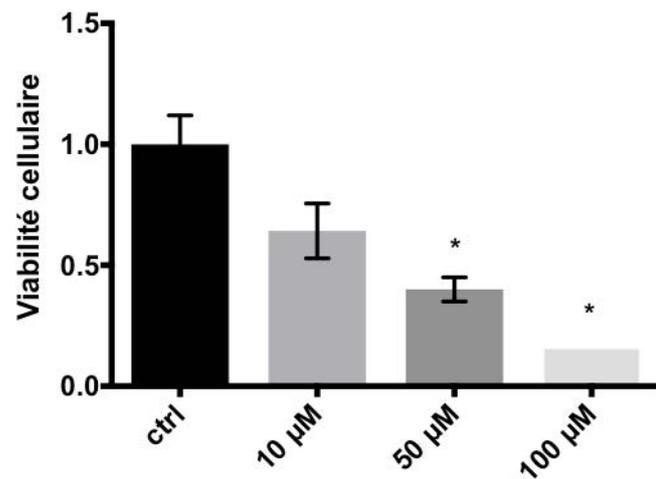
a)



b)



c)



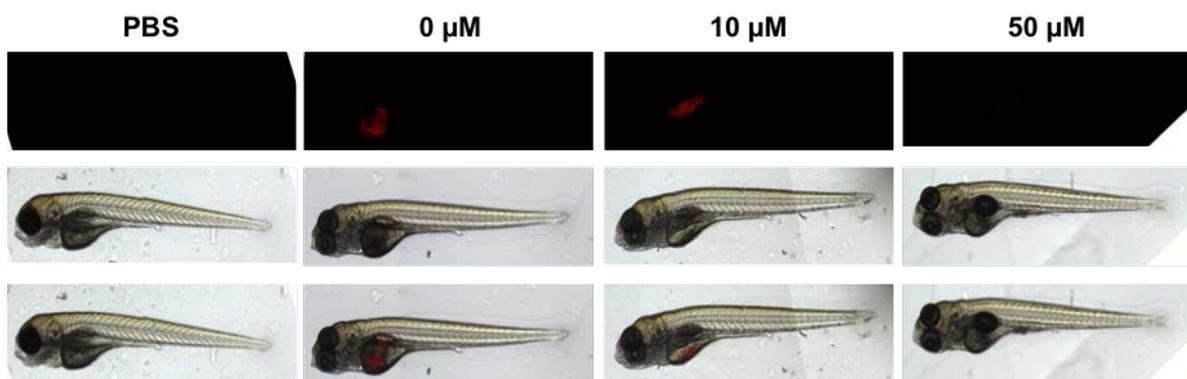
(La légende se trouve sur la page suivante)

*Figure 35 : Etude de l'impact du TTSDB sur la formation et la viabilité de sphéroïdes issus des cellules HT-29. Les cellules HT-29 ont étéensemencées avec différentes concentrations du TTSDB 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  et 100  $\mu\text{M}$  pendant 4 jours. a) Images de microscopie et représentation graphique 3D montrant la réduction du diamètre du sphéroïde. b) Représentation graphique de la surface totale du sphéroïde en ( $\mu\text{m}^2$ ) mesurée par Image J en fonction de la concentration du TTSDB. c) Représentation graphique de la viabilité des sphéroïdes en fonction des différentes concentrations du TTSDB. Les résultats représentent la moyenne +/- ES (erreur standard) de trois expériences indépendantes.  $p < 0,05$  (\*) par ANOVA 2- Dunnnett, comparé au contrôle respectif. Les résultats représentent la moyenne +/- ES (erreur standard) de trois expériences indépendantes.  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$ (\*\*),  $p < 0,001$ (\*\*\*), et  $p < 0,0001$ (\*\*\*\*) par ANOVA 1- Dunnnett, comparés au contrôle respectif.*

### **1.10.3. Analyse de l'activité anticancéreuse du TTSDB *in vivo***

Nous avons montré que le TTSDB inhibait la prolifération des 3 lignées cellulaires du cancer du côlon dans des conditions de culture 3D. Afin d'identifier au mieux le potentiel thérapeutique du TTSDB, nous avons évalué son activité anticancéreuse *in vivo*. Pour ce faire, nous avons choisi le poisson zèbre (*Danio rerio*) comme modèle. Nous avons préalablement traité les cellules HT-29 par le TTSDB pendant 30 h, temps où la majorité des cellules sont en arrêt mitotique mais ne sont pas touchées par la mort cellulaire. Nous avons marqué les lipides de ces cellules traitées au CM-Dil afin de visualiser la formation tumorale de la xénogreffe. Nous avons injecté à raison de 100 cellules HT-29 traitées ou contrôles dans la membrane vitelline des embryons de poissons zèbres âgés de 24 h. A la suite de 72 h d'incubation, nous avons évalué par microscopie à fluorescence la masse tumorale de la xénogreffe (**Figure 36a**). La quantification de la masse tumorale montre une réduction significative avec 50  $\mu$ M (**Figure 36b**). Ces résultats sont en ligne avec ceux obtenus d'une culture 2D. Ensemble, cette analyse montre la capacité du TTSDB à réduire la formation tumorale *in vivo*.

a)



b)

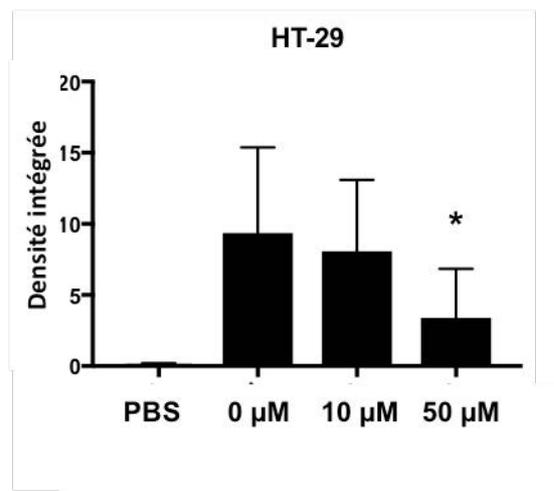


Figure 36 : Effet anticancéreux du TTSDB in vivo. a) Images de la masse tumorale de la xénogreffe dérivée des cellules HT-29 traitées par le TTSDB (10 et 50  $\mu\text{M}$ ) puis marquées au CM-Dil, implantées dans le poisson zèbre. b) Représentation graphique de la quantification de la masse tumorale. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  ES (erreur standard) de trois expériences indépendantes.  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$ (\*\*),  $p < 0,001$ (\*\*\*), et  $p < 0,0001$ (\*\*\*\*) par ANOVA 1- Dunnett, comparés au contrôle indiqué.

**En conclusion de cette partie :**

- **Le TTSDB inhibe de manière dose-dépendante la formation de colonies dans les lignées cellulaires, HT-29, SW480 et SW620.**
- **Le TTSDB (50  $\mu$ M) réduit la surface et la viabilité des sphéroïdes dérivés des cellules HT-29.**
- **Le TTSDB (50  $\mu$ M) réduit significativement la masse tumorale dans les poissons zèbres *in vivo*.**

# DISCUSSION

## 1.1. Le TTSDDB cible le réseau microtubulaire.

Au cours de notre projet de thèse, nous avons validé pour la première fois que le TTSDDB et le TTSDA agissent comme des ligands directs de la tubuline par spectrométrie en masse (**Figure 11**). Nous avons montré que les trois lignées cellulaires cancéreuses humaines du cancer du côlon (HT-29, SW480 et SW620) étaient plus sensibles au dérivé TTSDDB comparé au TTSDA. De plus les cellules SW480 et SW620 ont présenté une sensibilité accrue au TTSDDB comparé aux cellules HT-29 (**Tableau VIII**). L'analyse par immunofluorescence de la tubuline a confirmé le rôle du TTSDDB à induire l'altération du réseau microtubulaire des cellules cancéreuses du côlon choisies dès 24 h de traitement (**Figure 12**). Afin de mieux comprendre les facteurs génétiques impliqués dans la sensibilité des cellules SW480 et SW620, nous avons mené une analyse bioinformatique comparative sur plus de 204 gènes, de nombreux gènes liés à la tubuline étaient différemment exprimés (**Suppl. Figure 1**). Notre analyse a montré une expression plus importante de la tubuline  $\beta$ III dans les cellules SW480 et SW620. La tubuline  $\beta$ III est bien décrite dans la littérature. Contrairement à diverses études sur la surexpression de la tubuline  $\beta$ III comme cause de résistance liée aux agents microtubulaires dans de nombreux cancers (Lobert and Correia 2000), dans notre modèle, les cellules SW480 et SW620 sont plus sensibles au TTSDDB. Cependant, notre analyse par spectrométrie de masse n'a pas permis d'identifier le site de liaison spécifique du TTSDDB sur la tubuline  $\beta$ . Ainsi, l'implication de cet isotype de tubuline dans la réponse différentielle au traitement par le TTSDDB reste à confirmer. Il est intéressant de noter que l'analyse des voies de signalisation a révélé que les voies associées au métabolisme des lipides étaient exacerbées dans les cellules SW480/SW620 par rapport aux cellules HT-29 (**Suppl. Figure 1**). Ceci pouvant être lié à la vitesse de croissance plus importante des cellules SW480 et SW620 comparées aux cellules HT-29.

## 1.2. Le TTSDDB présente une activité anticancéreuse dans le CCR.

Cette étude a fourni des preuves pour soutenir le potentiel anticancéreux du TTSDDB pour le traitement de formes spécifiques du CCR. Nous avons choisi les cellules dérivées de l'adénocarcinome du côlon HT-29 et SW480 mutées sur l'oncogène BRAF et KRAS respectivement. Nous avons aussi sélectionné les cellules plus invasives telles que la lignée cellulaire SW620 métastatique dérivée de nœud lymphatique du cancer du côlon. Nos résultats ont montré la capacité du TTSDDB à perturber l'organisation des microtubules et à inhiber la prolifération cellulaire en induisant une accumulation des cellules en phase G2/M du cycle cellulaire à 24 h et 48 h de traitement, mis en évidence par la cytométrie en flux dans les cellules HT-29, SW480 et SW620 (**Figures 13-15**). Cet arrêt mitotique est suivi d'une apoptose après 72 h de traitement dans les cellules HT-29 et SW480 contre 48 h dans les cellules SW620 (**Figure 16**). Le clivage de la caspase-3 effectrice, l'activation enzymatique des caspases-3, et -7, puis nos observations en microscopie à fluorescence (fragmentation nucléaire) confirment l'induction de l'apoptose dans les cellules du cancer du côlon. Les mécanismes d'action observés sont communs à ceux décrits dans la littérature. Nous avons montré l'effet du TTSDDB sur l'inhibition de la formation de sphéroïde et de colonie à partir des cellules HT-29, SW480 et SW620. Puis nous avons validé *in vivo* les mécanismes d'action définis *in cellulo* à travers l'étude de l'effet du TTSDDB sur la formation de xénogreffes issues des cellules HT-29 dans le poisson zèbre (*Danio rerio*) (**Figures 34-36**).

La comparaison du TTSDDB aux poisons du fuseau (vinblastine, vincristine et paclitaxel) montre un effet similaire sur la progression du cycle cellulaire consistant à une inhibition de la prolifération cellulaire par arrêt mitotique (**Figure 10**). De même pour l'analyse 3D qui a révélé le potentiel du TTSDDB à inhiber similairement la croissance du sphéroïde dérivé des cellules HT-29 (**Figure 11**). Le TTSDDB interagit avec la tubuline similairement à la vinblastine, la vincristine et le paclitaxel. Néanmoins, le site de liaison du TTSDDB est inconnu et réversible alors que le site de liaison des taxanes repose sur la tubuline  $\beta$  à l'intérieur de la lumière microtubulaire, et le domaine de liaison des molécules Vincas se trouve sur le site de liaison GTP de la tubuline  $\beta$ . La liaison réversible du TTSDDB avec la tubuline pourrait peut-être limiter l'efficacité thérapeutique du TTSDDB néanmoins elle permettrait aussi de réduire la toxicité systémique. Par ailleurs, les mutations sur le site de

liaison des taxanes et vincas sont à l'origine de résistance thérapeutique dans de nombreux cancers.

Ensemble, ces résultats nous encouragent à poursuivre nos études sur l'effet du TTSDB sur des échantillons de patients atteints du cancer du côlon et d'envisager une approche thérapeutique en fonction du contexte génétique

### **1.3. Le TTSDB module l'autophagie en fonction du type cellulaire.**

Les microtubules sont essentiels pour la dynamique autophagique, nous émettons ici l'hypothèse que l'altération du réseau microtubulaire par le TTSDB (et potentiellement par d'autres agents ciblant l'organisation des microtubules) conduirait à une déficience autophagique (Kochl et al. 2006). De plus, les cellules cancéreuses exacerbent l'autophagie en tant que réponse au stress contre le traitement anticancéreux (Chen and Karantza 2011). Le rôle de l'autophagie change selon le tissu considéré, le contexte génétique ou le stade du cancer. En effet, les lignées cellulaires mutées pour l'oncogène KRAS, SW480 et SW620 présentent un flux autophagique basale exacerbé (Guo et al. 2011). L'inhibition des protéines impliquées dans l'autophagie altère la croissance cellulaire de ces lignées, suggérant que l'autophagie joue un rôle essentiel dans la survie cellulaire au cours de la tumorigenèse. Les CCR présentent une forte prévalence de mutations activatrices de Ras associées à un pronostic clinique particulièrement mauvais (Phipps et al. 2013). Souvent l'activation du flux autophagique dans le CCR est reliée à une résistance aux agents thérapeutiques conventionnels tels que le 5-FU (Li et al. 2010). Cependant, dans notre modèle d'étude, bien que les cellules SW480 et SW620 présentent un flux autophagique basal élevé contrairement aux cellules HT-29, ces lignées cellulaires sont plus sensibles au TTSDB. L'étude multiparamétrique établi dans les cellules HT-29 mutées sur l'oncogène BRAF a mis en évidence le potentiel du TTSDB à altérer le flux autophagique en induisant la conversion de LC3-I en LC3-II, l'accumulation de la protéine de cargaison p62, et l'accumulation des vacuoles autophagiques telles que les phagophores et l'autophagosomes dès 24 h de traitement (**Figures 8-9**). De plus, la transfection des cellules HT-29 avec le plasmide GFP-LC3, a permis de confirmer l'accumulation des autophagosomes dans les cellules HT-29. Nos résultats nous permettent de supposer que le TTSDB inhibe l'autophagie en fonction du contexte cellulaire, et génétique. Ces données permettent notamment d'envisager l'utilisation

du TTSDDB comme modulateur de l'autophagie en combinaison avec d'autres agents anticancéreux dans une perspective thérapeutique en fonction du type génétique.

Par ailleurs, le TTSDDB induit une forte accumulation de la protéine p62 contrairement à la vincristine et la vinblastine dans les cellules HT-29 supposant un effet plus important sur l'inhibition de l'autophagie (**Figure 13**). L'accumulation de la protéine p62 tend à former des agrégats de protéines mal repliées responsable de stress oxydatif accrue à l'interface de nombreuses maladies neurodégénératives et toxicité chronique. Les neuropathies se trouvent parmi les principaux effets secondaires liés au traitement par les agents altérant les microtubules. Les agrégats pathologiques positifs pour p62 se trouvent à la fois dans le cytoplasme et le noyau des cellules neuronales et gliales, ces agrégats concernent les protéines primaires de tau, d'alpha-synucléine, ou de la polyglutamine (Kuusisto et al. 2008). La formation d'agrégats de p62 peut être délétère pour le tissu neurologique (Kuusisto et al. 2002). De plus, les neuropathies sont dose-dépendantes et les concentrations inhibitrices du TTSDDB sont plus élevées que celles des autres agents (micromolaire vs. nanomolaire) suggérant un risque de toxicité plus élevé. Ainsi, l'évaluation de l'impact du TTSDDB sur le système nerveux lié à la protéotoxicité de la protéine p62 est un point crucial à élucider afin d'identifier le potentiel applicatif du TTSDDB en clinique.

#### **1.4. La protéine p62 joue un rôle de survie dans les cellules HT-29.**

Récepteur essentiel à la dégradation par l'autophagie, la protéine p62 est un substrat important de l'autophagie. La protéine p62 possède un domaine de liaison avec la protéine LC3 (LIR) facilitant son interaction directe et induisant la dégradation de p62 en autophagie. Ainsi, l'augmentation de p62 est souvent reliée à une inhibition ou une déficience de l'autophagie (Bjorkoy et al. 2005). A noter que la surexpression de la protéine p62 peut aussi être associée à une synthèse *de novo* dû à l'augmentation de l'ARNm de la protéine p62 comme observé dans les cellules HT-29. Etant donné que l'accumulation de la protéine p62 a lieu pendant l'arrêt mitotique et ne chevauche pas avec l'apoptose qui se produit à des périodes ultérieures dans le temps, nous avons émis l'hypothèse que l'augmentation de l'ARNm de la protéine p62 couplée à l'accumulation de la protéine p62 serait une réponse de survie à un stress induit par le TTSDDB.

Compte tenu des nombreux domaines d'interaction de la protéine p62 avec de multiple voie de signalisation cellulaire, l'identification du rôle précis de l'augmentation de la protéine p62 dans la réponse du TTSDB semble essentielle. Par ailleurs, le rôle de la protéine p62 dans le cancer suscite un intérêt grandissant. Différentes études discutent de l'activité pro-oncogénique de la protéine p62. Cette dernière est surexprimée dans de nombreux cancers tel que le cancer du poumon où elle joue un rôle de survie. La protéine p62 joue un rôle de médiateur entre l'oncogène RAS et la voie NF- $\kappa$ B par l'activation de la voie « Inhibitor of Kappa B » (IKK) *via* la polyubiquitination de TRAF6 (Duran et al. 2008). L'absence de la protéine p62 montre qu'elle est essentielle pour l'activation de l'oncogène RAS et du facteur de transcription NF- $\kappa$ B responsable de la survie cellulaire et la transformation cellulaire dans le cancer du poumon. Similairement Mathew et al. ont fourni la preuve que dans les cellules déficientes en autophagie, l'accumulation de p62 favorise la tumorigenèse. L'altération de l'autophagie conduit à l'accumulation de protéines mal repliées ou agrégées conduisant au stress oxydatif qui induit l'accumulation de la protéine p62 responsable de la perturbation de la signalisation du facteur NF- $\kappa$ B, et l'induction de dommages de l'ADN favorisant la croissance tumorale (Mathew et al. 2009). Wei et al. ont montré que l'extinction de p62 synergise avec la suppression de l'autophagie pour inhiber la croissance tumorale, suggérant que le développement de thérapies cancéreuses plus efficaces devrait prendre en considération l'inhibition de ces deux marqueurs (Wei et al. 2014). En outre, les caspases sont parmi les partenaires de liaison de p62 (Zeng et al. 2014). Ces résultats indiquent un effet modulateur de p62 sur les médiateurs de la mort cellulaire ; mais ils mettent également en évidence un double rôle jouée par cette protéine dans l'équilibre survie et mort. La sensibilisation des cellules HT-29 à la mort cellulaire après l'extinction de la protéine p62 soutient l'idée que l'accumulation de p62 agit comme une réponse pro-survie (**Figure 22**). Ici, nous avons montré clairement que l'accumulation de p62 *via* l'altération de l'autophagie était dépendante du type cellulaire, car le TTSDB était incapable de moduler le flux autophagique dans les cellules SW480 et SW620, présentant un niveau d'autophagie basale stable. De même, l'ARNm de p62 a été augmenté à la suite du TTSDB dans les cellules HT-29 mais pas dans les cellules SW480 et SW620 plus sensibles (**Figure 16**). Dans les cellules HT-29, l'accumulation de la protéine p62 paraît en pointillées similaires à la formation de points GFP-LC3 (**Figure 15**). Dans l'ensemble, nous supposons que l'augmentation de la protéine p62 résulte d'une synthèse *de novo* combinée à une agrégation protéique dans des zones subcellulaires spécifiques. La voie NRF2/KEAP-1 est la principale voie régulatrice d'une réponse cytoprotective en cas de stress endogène ou exogène. p62

module la protéine KEAP-1 associée au facteur nucléaire *via* son domaine de liaison KIR. De plus, KEAP-1 est une protéine très riche en cystéines, chez l'homme il y a 27 résidus de cystéine, dont la plupart peuvent être modifiées *in vitro* par des différents oxydants et des agents électrophiles (Kansanen et al. 2009). En absence de stress oxydant, le facteur de transcription NRF2 est réprimé par liaison à son principal inhibiteur KEAP-1 qui favorise sa dégradation par la voie ubiquitine du protéasome (Taguchi et al. 2011). Trois de ses résidus, C151, C273 et C288, jouent un rôle fonctionnel en modifiant la conformation de KEAP-1 conduisant à la translocation nucléaire de NRF2 et à l'activation ultérieure de l'expression des gènes cibles (Taguchi et al. 2011). En effet, le résidu C288 de KEAP-1 est une cible potentielle du trisulfure de diallyle (TDA) dans l'activation de la voie NRF2. Le TDA inactiverait KEAP-1 *via* la modification des thiols (Kim et al. 2014). De même, la présence d'atomes de sulfures actifs dans la molécule de TTSDB nous laisse présumer une éventuelle interaction de ses atomes de sulfure avec les groupes cystéine présents à la surface de KEAP-1. L'accumulation de p62 pourrait appartenir à une réponse anti-oxydante dans les cellules HT-29 traitées par TTSDB. L'augmentation significative de l'expression de l'ARNm de l'HO-1 anti-oxydante concomitante avec l'expression accrue de l'ARNm de p62 suggère un potentiel stress oxydatif dans les cellules HT-29, mais pas dans les lignées cellulaires SW480 et SW620 (**Figure 17**). Cependant, nous n'avons pas détecté de génération d'ERO dans les trois lignées cellulaires étudiées (**Figure 17**) en ligne avec les résultats antérieurs du laboratoire montrant l'implication du potentiel d'oxydo-réduction dans l'effet du TTSDA par une réduction du niveau de GSH (Kelkel et al. 2012). En revanche, une modification potentielle du pool de thiol peut déclencher des niveaux accrus de l'ARNm de la HO-1 ou de p62 (Kelkel et al. 2012). Des investigations complémentaires sont nécessaires pour élucider ce point en tenant compte du fait que les atomes de soufre réactifs du TTSDB interagissent directement avec les résidus cystéine de KEAP-1 induisant une modification de sa conformation et la libération de NRF2.

## 1.5. L'autophagie et le protéasome

Le protéasome et l'autophagie sont les principaux mécanismes cataboliques impliqués dans la dégradation des protéines. Ces deux systèmes de dégradation travaillent en coopération pour maintenir l'homéostasie cellulaire. L'inhibition de l'autophagie compromet le système ubiquitine-protéasome en raison de l'accumulation de la protéine p62. En effet,

l'excès de la protéine p62 inhibe la clairance des protéines ubiquitinées, en retardant la livraison des substrats ubiquitinés au protéasome sans modification de l'activité catalytique du protéasome (Korolchuk et al. 2009). D'autre part, l'inhibition pharmacologique ou génétique de l'autophagie peut activer le protéasome, comme en témoigne l'augmentation des activités protéasomales et la régulation positive des sous-unités protéasomiques en condition de carence nutritive (Wang et al. 2013). Les inhibiteurs du protéasome ont émergé comme nouvelle stratégie thérapeutique contre le cancer (Crawford et al. 2011). Les inhibiteurs de l'autophagie sont également évalués comme potentielles thérapies anti-tumorales. Dans la présente étude, l'altération du flux autophagique et l'activation de l'activité protéolytique liée à la chymotrypsine du protéasome survient de façon concomitante à 24 h de traitement par le TTSDB (**Figure 24**). Ces deux évènements suggèrent un mécanisme de balance pour le renouvellement protéique essentiel à la survie de la cellule cancéreuse. Nous avons montré que le co-traitement des cellules HT-29 par le TTSDB et l'inhibiteur du protéasome MG132 a réduit l'accumulation de la protéine p62 et l'accumulation des cellules HT-29 en phase G2-M sans pour autant sensibiliser ces cellules à la mort cellulaire (**Figures 30-21**). Compte tenu, du rôle activateur de MG132 dans l'autophagie (Bao et al. 2016). Nous supposons ici que l'utilisation de MG132 réduit l'expression de p62 en activant l'autophagie cependant nous n'avons pas évalué les marqueurs de l'autophagie pour le confirmer. Ce résultat montre l'interdépendance de ces évènements dans le maintien de l'activité protéolytique essentielle pour la survie des cellules HT-29.

# CONCLUSION

Ce projet de recherche a permis de montrer la capacité du TTSDDB dérivé hémisynthétique du TTSDA à inhiber la prolifération des cellules cancéreuses du côlon par interaction avec la tubuline. La sensibilité au TTSDDB diffère selon le modèle cellulaire, les cellules SW480 et SW620 présentant une mutation du gène KRAS étaient plus sensibles au TTSDDB que les cellules HT-29 mutées sur le gène BRAF. La modulation de l'autophagie par le TTSDDB dépend aussi du modèle cellulaire. L'accumulation de la protéine p62 induite par la synthèse *de novo* et l'altération du flux autophagique joue un rôle pro-tumoral dans les cellules HT-29. Dans l'ensemble, cette étude suggère l'avantage du TTSDDB pour le traitement CRC, et de son potentiel à stratifier la réponse selon le CCR. En revanche, de nombreux points liés à son potentiel applicatif restent mal connus. Pour ce faire, nous envisageons plusieurs perspectives décrites ci-dessous.

# PERSPECTIVES

## **1.1. Evaluation de l'activité anticancéreuse du TTSDB dans des organoïdes dérivés de tumeurs humaines.**

La caractérisation de la tumeur est devenue fondamentale dans la prise en charge du cancer compte tenu de la variation de la réponse thérapeutique en fonction du sous-type moléculaire. L'analyse des biomarqueurs tumoraux (p. ex : RAS, BRAF) du CCR ont une place prédominante dans la pratique clinique. Dans notre modèle d'étude, les cellules SW480 et SW620 mutées sur l'oncogène KRAS ont présenté une sensibilité plus élevée au TTSDB que les cellules HT-29 mutées sur l'oncogène BRAF. De plus, les cellules SW480 et SW620 présentent une amplification du proto-oncogène c-Myc, ces cellules ont notamment un taux de prolifération plus élevé que les cellules HT-29 (Donzelli et al. 1999). Afin de valider par une approche translationnelle la sensibilité différentielle du TTSDB selon le contexte génétique, nous envisageons de tester ce composé sur un modèle cellulaire quasi physiologique similaire à l'intestin.

L'organoïde englobe toutes les cultures organotypiques 3D dérivées de tissus primaires, cellules souches embryonnaires et cellules souches pluripotentes induites (Sato et al. 2009). Un organoïde est un amas de cellules capable d'auto-renouvellement et d'auto-organisation, présentant des fonctionnalités organiques similaires à celles du tissu d'origine. Ces organoïdes reposent sur une matrice extracellulaire artificielle qui leurs permet d'adopter une conformation 3D facilitant leur organisation spatiale selon les structures tissulaires natives. Contrairement aux cultures *in vitro*, les organoïdes sont similaires aux tissus primaires dans leur composition et leur architecture, ils contiennent des populations de cellules souches génétiquement stables et auto-renouvelées permettant une progéniture complètement différenciée comprenant tous les types cellulaires majeures similaire à celles du tissu vivant (Sato et al. 2011). Cependant, l'absence de mésenchyme ou de stroma limite l'étude de l'interaction avec le microenvironnement local. Les organoïdes sont tout de même physiologiquement plus pertinents que les modèles de culture monocouche et sont beaucoup plus compatibles à la manipulation des composants de la niche et l'analyse des voies de signalisation. Ensemble, l'étude sur les organoïdes nous permettra de créer un pont entre nos résultats obtenus *in cellulo/in vivo* et l'homme dans l'optique d'un ciblage thérapeutique.

Nous envisageons de tester le TTSDB sur des organoïdes générés à partir de tumeurs de patients présentant des altérations génétiques variantes afin d'explorer de nouvelles stratégies thérapeutiques, et d'élaborer une stratification des patients basées sur la sensibilité au TTSDB *in vitro*. Nous pourrions ainsi associer l'hétérogénéité génomique et la fonction des gènes à la réactivité au TTSDB *in vitro* et améliorer les stratégies thérapeutiques. Pour ce faire, nous avons à notre disposition une banque de plus de 300 échantillons de tumeur du cancer du côlon datant de 2008. Nous envisageons premièrement de dissocier les tumeurs avec un réactif approprié (Gentle Cell Dissociation Reagent, StemCell Technologies, Vancouver, Canada) puis de les mettre en culture avec le milieu IntestiCult™ (StemCell) enrichi en facteurs de croissance essentiels pour la maintenance des organoïdes. En cas d'échec dû à l'ancienneté des échantillons, nous envisageons de collaborer avec une biobanque spécialisée dans la génération des organoïdes (Fondation Hubrecht Organoid Technology, Utrecht, Pays bas).

## **1.2. Evaluation de combinaisons thérapeutiques**

Dans le cadre clinique, les patients atteints du CCR avec une mutation BRAF (V600E) présentent un phénotype clinique agressif. Le statut mutationnel de BRAF est prédictif d'une survie globale faible. Compte tenu des échecs thérapeutiques des composés cytotoxiques sur ce type de cancer, le développement de nouvelles thérapies ciblant la mutation BRAF ont vu le jour. Cependant, les thérapies ciblées (vemurafenib, dabrafenib) ont donné jusqu'à présent des résultats décevants dans les CCR BRAF mutés par rapport au traitement des mélanomes BRAF mutés (Thiel and Ristimaki 2013, Cicenas et al. 2017). L'activation dramatique du récepteur à tyrosine kinase EGFR à la suite du traitement par des inhibiteurs spécifiques de BRAF relève d'un mécanisme de résistance accompagné d'une activation des voies de signalisation AKT et PI3K en plus de la voie MAPK (Prahallad et al. 2012). Dans le cadre clinique, les mutations BRAF sont clairement des facteurs pathogènes de la maladie agressive, à la différence du mélanome, le ciblage efficace de BRAF dans le CCR nécessitera également le blocage de diverses voies de rétroaction en parallèle. Ici, nous supposons que la combinaison du TTSDB qui inhibe la prolifération des cellules HT-29 mutées sur l'oncogène BRAF (V600E) et PI3K (P449T), aux inhibiteurs de BRAF pourraient améliorer les résultats obtenus dans les cellules HT-29. Nous proposons, d'évaluer l'efficacité

thérapeutique synergétique d'une combinaison du TTSDB avec le vemurafenib/dabrafenib afin de potentiellement rétablir une cytotoxicité efficace.

En clinique, 50 à 60 % des CCR présentent une mutation du gène RAS et 40 à 50 % des CCR présentent une mutation du gène KRAS. Les cancers CCR sont conditionnés au génotypage RAS, car la mutation RAS est associée à une résistance aux anticorps monoclonaux ciblant l'EGFR : cetuxiamb (IgG1 chimérique) et le panitumumab (IgG2 humain) (Ohhara et al. 2016). Dans notre projet d'étude, le TTSDB était plus sensible dans les cellules SW480 et SW620 KRAS mutées, dans cette optique nous envisageons de combiner le TTSDB avec le 5-FU, afin d'évaluer l'activité synergétique de ces deux composés.

### **1.3. Evaluation du rôle de l'accumulation de la protéine p62 par le TTSDB sur la toxicité neurologique**

La protéine p62 se trouve à l'interface des lésions neurologiques. Elle est essentielle pour la formation des corps d'inclusion dans les souris déficientes d'autophagie. L'accumulation de la protéine p62 par altération de l'autophagie est délétère pour le tissu neurologique et hépatique, elle induit la mort des cellules neuronales à l'origine de maladies neurodégénératives et des lésions hépatiques suggérant un rôle toxique de la protéine p62 (Komatsu et al. 2007). Nous avons montré que l'extinction de la protéine p62 exacerbait la mort cellulaire à 72 h de traitement par le TTSDB dans les cellules HT-29 suggérant un rôle pro-cancer de la protéine p62 dans les cellules HT-29. Nous avons aussi montré que le TTSDB (50  $\mu$ M) réduisait la masse tumorale des cellules HT-29 préalablement traitées par le TTSDB puis injectées dans les poissons zèbres *in vivo*. Cependant, cette approche expérimentale ne nous permettait pas d'évaluer la toxicité du TTSDB étant donné qu'il n'est pas ingéré directement par le poisson et que les cellules HT-29 traitées étaient lavées avant l'injection dans le poisson. Nous envisageons ici d'élucider le rôle neurotoxique de l'accumulation de la protéine p62. Premièrement on ajoutera directement différentes concentrations de TTSDB dans le milieu de culture des poissons zèbres à différents temps d'incubation. Ensuite, nous évaluerons l'effet toxique du TTSDB par injection du composé dans le sac vitellin des embryons de poissons zèbres, l'analyse de l'apoptose des cellules neuronales reposera sur le marquage au TUNNEL du cerveau. Le marquage fluorescent de la protéine p62 permettra d'identifier son implication dans la mort neuronale (Cole and Ross

2001). Par ailleurs, l'extinction de la protéine p62 par injection de siARN (Liu et al. 2005) ou de morpholinos (Bill et al. 2009) dans le poisson zèbre après le traitement par le TTSDDB permettra d'identifier le rôle fonctionnel de la protéine p62 dans la mort neuronale chez le poisson zèbre. Cette première approche permettra d'évaluer le besoin d'investigation supplémentaire sur ce point.

#### **1.4. Evaluation du rôle de la phosphorylation de la protéine Bcl-xL par le TTSDDB**

Les protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1 sont surexprimées dans de nombreux cancers. Ces protéines protègent la cellule cancéreuse de la mort cellulaire et provoquent ainsi des résistances aux traitements anticancéreux. Nous avons montré que le TTSDDB induisait la phosphorylation de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL sur son site sérine 62 de façon concomitante avec l'accumulation des cellules en phase G2/M dans les cellules HT-29 (Figure 7). De même, les agents mitotiques ciblant la polymérisation de la tubuline tels que le paclitaxel, la vincristine et la vinblastine induisent l'arrêt mitotique prolongé accompagné de la phosphorylation des protéines de la famille Bcl-2 (Srivastava et al. 1999). Le mécanisme impliqué dans la transition entre l'arrêt mitotique et la mort cellulaire à la suite de ces traitements n'est pas connu à ce jour. Cependant la modulation des protéines anti-apoptotiques joue un rôle médiateur dans cette transition. En effet, les mutants du site de phosphorylation sérine 62 de la protéine Bcl-xL sont incapables de libérer la protéine proapoptotique Bax à la suite de traitement antimitotique suggérant que la phosphorylation de la protéine Bcl-xL est essentielle pour contrer son effet anti-apoptotique et pour induire la mort cellulaire (Upreti et al. 2008, Terrano et al. 2010).

De plus, la phosphorylation de Bcl-xL est un médiateur-clé dans l'autophagie. La protéine anti-apoptotique Bcl-xL forme un complexe avec la protéine bécline 1, initiateur de l'autophagie. La phosphorylation de la protéine Bcl-xL par l'activation de la voie de signalisation JNK, altère son interaction avec la bécline 1 conduisant ainsi à la libération de la bécline 1 qui pourra initier alors l'autophagie (Wei et al. 2008). Dans les cellules HT-29, nous supposons que la phosphorylation de la protéine Bcl-xL favoriserait dans les heures précoces du traitement (> 9 h) l'activation de l'autophagie qui sera à son tour réprimée par la polymérisation de la tubuline empêchant la progression de l'autophagie dans les cellules en arrêt mitotique (> 9 h). Pour ce faire, afin d'identifier le rôle de la phosphorylation de la

protéine Bcl-xL dans l'autophagie, nous envisageons d'inhiber la voie JNK avec l'inhibiteur chimique SP600125 (Calbiochem, Louvain, Belgique) et d'évaluer ensuite l'effet sur l'expression de la conversion de LC3-I/II et p62, marqueurs de l'autophagie dans les cellules HT-29. De plus, l'interaction de Bcl-xL et bécline 1 peut être vérifiée par immunoprécipitation.

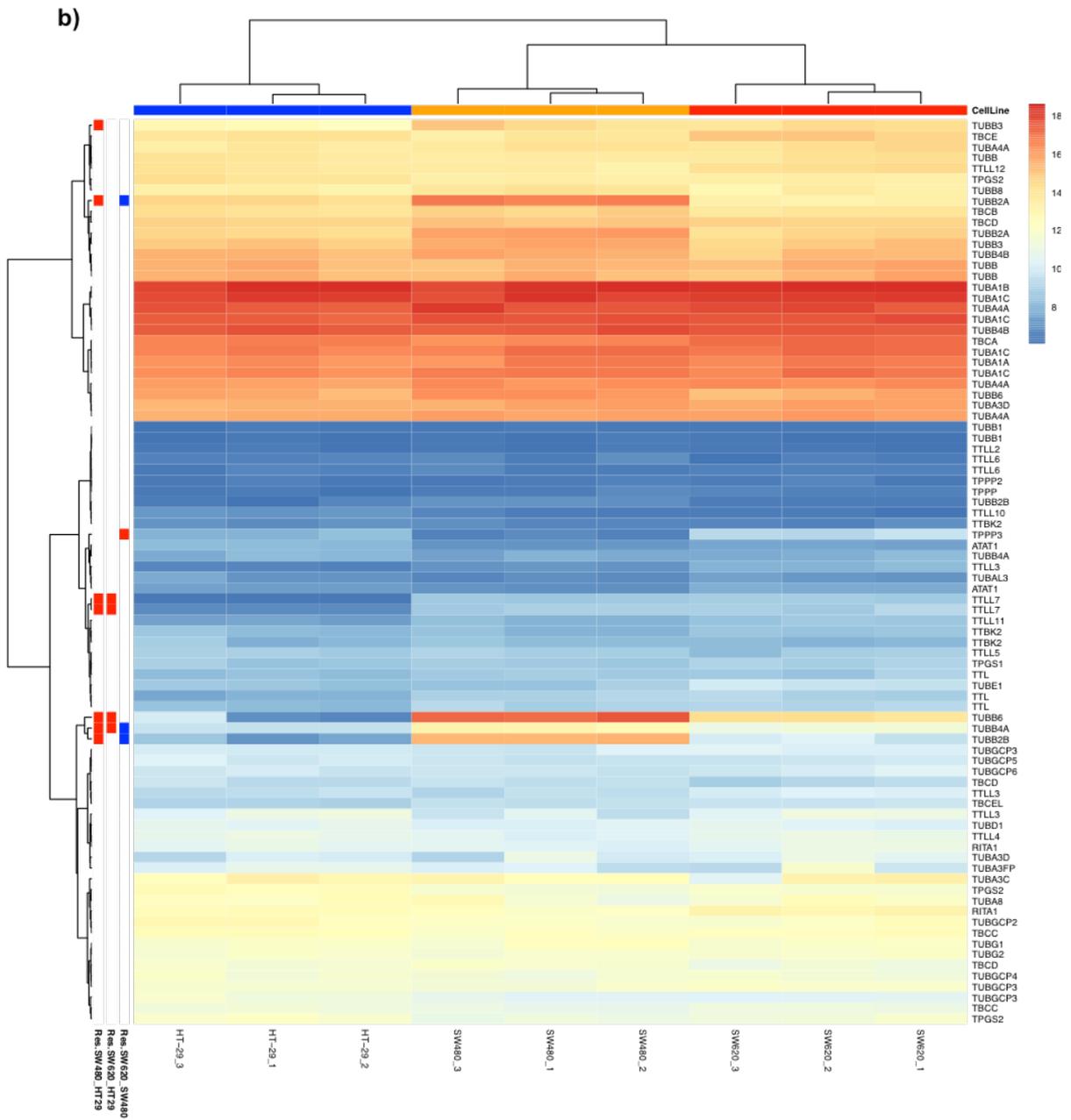
## **1.5. Evaluation du potentiel du TTSDB à générer le sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S)**

De nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ont attribué l'activité biologique des COS dérivés de l'ail au nombre d'atomes de soufre réactifs. Dans la littérature, les COS sont acceptés comme donneurs de l'H<sub>2</sub>S organiques dans plusieurs revues (Yagdi et al. 2016). Cependant, peu d'études ont confirmé le potentiel des composés dérivés de l'ail à libérer l'H<sub>2</sub>S. Il est intéressant de noter que Benavides *et al.* ont attribué pour la première fois l'efficacité chimique des COS dérivés de l'ail dans la vasorelaxation à leur potentiel de libérer l'H<sub>2</sub>S chez le rat. Ce potentiel varie d'une molécule à l'autre, maximal pour le TSDA et minimal pour l'allylméthylsulfure. La vasorelaxation des anneaux de l'aorte était dépendante de la concentration et de la molécule. Elle était maximale avec le DATS suivi du DADS, DAS et AMS (Benavides et al. 2007). Les travaux de Liang *et al.* ont rapporté que DATS est un donneur rapide de H<sub>2</sub>S alors que le DADS est un donneur lent dans les systèmes chimiques et biologiques (Liang et al. 2015). Dans l'ensemble, même si les COS sont acceptés comme donneurs de l'H<sub>2</sub>S et que peu d'études ai décrit une corrélation entre la cardioprotection des polysulfanes et la libération de l'H<sub>2</sub>S, aucune recherche n'est encore liée à la relation spécifique entre l'H<sub>2</sub>S et les propriétés anticancéreuses des polysulfanes. Ici, nous émettons l'hypothèse que les propriétés anticancéreuses des COS reposent sur la libération de l'H<sub>2</sub>S car de nombreuses actions biologiques de l'H<sub>2</sub>S et des COS sont produites, au moins en partie, par la sulphydratation des protéines contenant de la cystéine (Yagdi et al. 2016). Nous analyserons la génération de l'H<sub>2</sub>S dans différentes lignées cellulaire du cancer du côlon traitées par le TTSDB pour des temps d'incubation variables par un test ELISA permettant de quantifier la concentration de l'H<sub>2</sub>S dans le surnageant des cellules traitées par le TTSDB (test disponible chez Antibodies Online, Aachen, Allemagne) puis nous confirmerons ces résultats par l'analyse de l'expression des enzymes de transsulfuration, « Cystathionine β-Synthase » (CBS) (Sigma-Aldrich) par western blot. Les enzymes de

transsulfuration, CBS et « Cystathionine  $\gamma$ -lyase » (CSE), sont impliquées dans la synthèse endogène de l' $\text{H}_2\text{S}$ , une régulation positive de ces enzymes a été associée à un effet pro-cancer dans plusieurs tumeurs (Yagdi et al. 2016). Ce double rôle de l' $\text{H}_2\text{S}$  pourrait être lié à la biodisponibilité et à la biodégradation de l' $\text{H}_2\text{S}$ . La biosynthèse continue de l' $\text{H}_2\text{S}$  due à une hyperactivation des enzymes CBS/CSE pourrait favoriser la carcinogenèse dans les cellules alors que les concentrations micromolaires de l' $\text{H}_2\text{S}$  administrées de manière exogène pourraient plutôt avoir des effets bénéfiques. La biodisponibilité de l' $\text{H}_2\text{S}$  devrait être plus courte en raison d'une dégradation rapide alors que l'exposition à des doses plus élevées peut exacerber ou prolonger la réponse au stress, les transformant en un résultat non plus protecteur mais plutôt préjudiciable dans les cellules cancéreuses. Il existe une différence subtile entre les gammes de concentrations déterminant les résultats physiologiques par rapport aux résultats pathologiques. L'identification des effets anticancéreux des COS liés à la libération de l' $\text{H}_2\text{S}$  après un traitement par le TTSDB est ici fondamentale.







*(La légende se trouve sur la page suivante)*

*Figure Supplémentaire 1 : Carte thermique de l'expression différentielle des gènes dans les lignées cellulaires colorectales. a) Carte thermique des valeurs d'expression des différents gènes entre les trois lignées cellulaires sélectionnées (HT-29, SW480 et SW620). Les couleurs représentent le niveau d'expression (échelle log2). Les gènes ont été nommés comme symboles ou ID. Les noms redondants reflètent les gènes redondants sur le tableau. b) Carte thermique des valeurs d'expression des différents gènes apparentés à la tubuline entre les trois lignées cellulaires sélectionnées (HT-29, SW480 et SW620). Les couleurs représentent les niveaux d'expression (échelle log2). L'annotation « Res\_Y\_X » en bas à gauche indique une surexpression de gènes significatifs (rouge) ou une sous-expression (bleu) dans Y (X) par rapport à X.*



# Références

- Adachi, M., K. R. Katsumura, K. Fujii, S. Kobayashi, H. Aoki and M. Matsuzaki (2003). "Proteasome-dependent decrease in Akt by growth factors in vascular smooth muscle cells." FEBS Lett **554**(1-2): 77-80.
- Aguirre-Ghiso, J. A. (2006). "The problem of cancer dormancy: understanding the basic mechanisms and identifying therapeutic opportunities." Cell Cycle **5**(16): 1740-1743.
- Albanes, D., N. Malila, P. R. Taylor, J. K. Huttunen, J. Virtamo, B. K. Edwards, M. Rautalahti, A. M. Hartman, M. J. Barrett, P. Pietinen, T. J. Hartman, P. Sipponen, K. Lewin, L. Teerenhovi, P. Hietanen, J. A. Tangrea, M. Virtanen and O. P. Heinonen (2000). "Effects of supplemental alpha-tocopherol and beta-carotene on colorectal cancer: results from a controlled trial (Finland)." Cancer Causes Control **11**(3): 197-205.
- Alexander, A., C. Karakas, X. Chen, J. P. Carey, M. Yi, M. Bondy, P. Thompson, K. L. Cheung, I. O. Ellis, Y. Gong, S. Krishnamurthy, R. H. Alvarez, N. T. Ueno, K. K. Hunt and K. Keyomarsi (2017). "Cyclin E overexpression as a biomarker for combination treatment strategies in inflammatory breast cancer." Oncotarget **8**(9): 14897-14911.
- Alves, S., L. Castro, M. S. Fernandes, R. Francisco, P. Castro, M. Priault, S. R. Chaves, M. P. Moyer, C. Oliveira, R. Seruca, M. Corte-Real, M. J. Sousa and A. Preto (2015). "Colorectal cancer-related mutant KRAS alleles function as positive regulators of autophagy." Oncotarget **6**(31): 30787-30802.
- Amaya, C., C. M. Fader and M. I. Colombo (2015). "Autophagy and proteins involved in vesicular trafficking." FEBS Lett.
- Amin, M. L. (2013). "P-glycoprotein Inhibition for Optimal Drug Delivery." Drug Target Insights **7**: 27-34.
- Andreotti, F., R. De Caterina and F. Crea (2017). "Aspirin and the prevention of a common disease: Colorectal cancer." Int J Cardiol **248**: 394-395.
- Aoki, D., Y. Oda, S. Hattori, K. Taguchi, Y. Ohishi, Y. Basaki, S. Oie, N. Suzuki, S. Kono, M. Tsuneyoshi, M. Ono, T. Yanagawa and M. Kuwano (2009). "Overexpression of class III beta-tubulin predicts good response to taxane-based chemotherapy in ovarian clear cell adenocarcinoma." Clin Cancer Res **15**(4): 1473-1480.
- Asghar, U., A. K. Witkiewicz, N. C. Turner and E. S. Knudsen (2015). "The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy." Nat Rev Drug Discov **14**(2): 130-146.

Banerjee, A., M. C. Roach, K. A. Wall, M. A. Lopata, D. W. Cleveland and R. F. Luduena (1988). "A monoclonal antibody against the type II isotype of beta-tubulin. Preparation of isotypically altered tubulin." J Biol Chem **263**(6): 3029-3034.

Bao, W., Y. Gu, L. Ta, K. Wang and Z. Xu (2016). "Induction of autophagy by the MG132 proteasome inhibitor is associated with endoplasmic reticulum stress in MCF7 cells." Mol Med Rep **13**(1): 796-804.

Baxt, L. A. and R. J. Xavier (2015). "Role of Autophagy in the Maintenance of Intestinal Homeostasis." Gastroenterology **149**(3): 553-562.

Benavides, G. A., G. L. Squadrito, R. W. Mills, H. D. Patel, T. S. Isbell, R. P. Patel, V. M. Darley-Usmar, J. E. Doeller and D. W. Kraus (2007). "Hydrogen sulfide mediates the vasoactivity of garlic." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(46): 17977-17982.

Benjamini, Y. and Y. Hochberg (1995). "Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing." J. R. Statistic. Soc. B **57**: 289-300.

Beroukhi, R., C. H. Mermel, D. Porter, G. Wei, S. Raychaudhuri, J. Donovan, J. Barretina, J. S. Boehm, J. Dobson, M. Urashima, K. T. Mc Henry, R. M. Pinchback, A. H. Ligon, Y. J. Cho, L. Haery, H. Greulich, M. Reich, W. Winckler, M. S. Lawrence, B. A. Weir, K. E. Tanaka, D. Y. Chiang, A. J. Bass, A. Loo, C. Hoffman, J. Prensner, T. Liefeld, Q. Gao, D. Yecies, S. Signoretti, E. Maher, F. J. Kaye, H. Sasaki, J. E. Tepper, J. A. Fletcher, J. Taberner, J. Baselga, M. S. Tsao, F. Demichelis, M. A. Rubin, P. A. Janne, M. J. Daly, C. Nucera, R. L. Levine, B. L. Ebert, S. Gabriel, A. K. Rustgi, C. R. Antonescu, M. Ladanyi, A. Letai, L. A. Garraway, M. Loda, D. G. Beer, L. D. True, A. Okamoto, S. L. Pomeroy, S. Singer, T. R. Golub, E. S. Lander, G. Getz, W. R. Sellers and M. Meyerson (2010). "The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers." Nature **463**(7283): 899-905.

Bill, B. R., A. M. Petzold, K. J. Clark, L. A. Schimmenti and S. C. Ekker (2009). "A primer for morpholino use in zebrafish." Zebrafish **6**(1): 69-77.

Bird, A. P. (1986). "CpG-rich islands and the function of DNA methylation." Nature **321**(6067): 209-213.

Bjorkoy, G., T. Lamark, A. Brech, H. Outzen, M. Perander, A. Overvatn, H. Stenmark and T. Johansen (2005). "p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death." J Cell Biol **171**(4): 603-614.

Blanco-Calvo, M., A. Concha, A. Figueroa, F. Garrido and M. Valladares-Ayerbes (2015). "Colorectal Cancer Classification and Cell Heterogeneity: A Systems Oncology Approach." Int J Mol Sci **16**(6): 13610-13632.

Bogaert, J. and H. Prenen (2014). "Molecular genetics of colorectal cancer." Ann Gastroenterol **27**(1): 9-14.

Bokemeyer, C., I. Bondarenko, A. Makhson, J. T. Hartmann, J. Aparicio, F. de Braud, S. Donea, H. Ludwig, G. Schuch, C. Stroh, A. H. Loos, A. Zobel and P. Koralewski (2009). "Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer." J Clin Oncol **27**(5): 663-671.

Bollag, D. M., P. A. McQueney, J. Zhu, O. Hensens, L. Koupal, J. Liesch, M. Goetz, E. Lazarides and C. M. Woods (1995). "Epothilones, a new class of microtubule-stabilizing agents with a taxol-like mechanism of action." Cancer Res **55**(11): 2325-2333.

Brinkley, B. R. (1985). "Microtubule organizing centers." Annu Rev Cell Biol **1**: 145-172.

Burgoyne, R. D., M. A. Cambray-Deakin, S. A. Lewis, S. Sarkar and N. J. Cowan (1988). "Differential distribution of beta-tubulin isotypes in cerebellum." EMBO J **7**(8): 2311-2319.

Busch, C., C. Jacob, A. Anwar, T. Burkholz, L. Aicha Ba, C. Cerella, M. Diederich, W. Brandt, L. Wessjohann and M. Montenarh (2010). "Diallylpolysulfides induce growth arrest and apoptosis." Int J Oncol **36**(3): 743-749.

Cancer Genome Atlas, N. (2012). "Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer." Nature **487**(7407): 330-337.

Carlson, M. E., M. Hsu and I. M. Conboy (2008). "Imbalance between pSmad3 and Notch induces CDK inhibitors in old muscle stem cells." Nature **454**(7203): 528-532.

Castellano, E. and J. Downward (2011). "RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway." Genes Cancer **2**(3): 261-274.

Catanzaro, E., C. Calcabrini, E. Turrini, P. Sestili and C. Fimognari (2017). "Nrf2: a potential therapeutic target for naturally occurring anticancer drugs?" Expert Opin Ther Targets **21**(8): 781-793.

Cerella, C., M. Dicato, C. Jacob and M. Diederich (2011). "Chemical properties and mechanisms determining the anti-cancer action of garlic-derived organic sulfur compounds." Anticancer Agents Med Chem **11**(3): 267-271.

Cerella, C., M. Kelkel, E. Viry, M. Dicato, C. Jacob and M. Diederich (2011). Naturally Occurring Organic Sulfur Compounds: An Example of a Multitasking Class of Phytochemicals in Anti-Cancer Research. Phytochemicals. P. I. Rasooli. **1**: 1-40.

Cerella, C., C. Scherer, S. Cristofanon, E. Henry, A. Anwar, C. Busch, M. Montenarh, M. Dicato, C. Jacob and M. Diederich (2009). "Cell cycle arrest in early mitosis and induction of caspase-dependent apoptosis in U937 cells by diallyltetrasulfide (Al2S4)." Apoptosis **14**(5): 641-654.

Chandra-Kuntal, K., J. Lee and S. V. Singh (2013). "Critical role for reactive oxygen species in apoptosis induction and cell migration inhibition by diallyl trisulfide, a cancer chemopreventive component of garlic." Breast Cancer Res Treat **138**(1): 69-79.

Chang, D. C., N. Xu and K. Q. Luo (2003). "Degradation of cyclin B is required for the onset of anaphase in Mammalian cells." J Biol Chem **278**(39): 37865-37873.

Chen, N. and V. Karantza (2011). "Autophagy as a therapeutic target in cancer." Cancer Biol Ther **11**(2): 157-168.

Chen, S. M., L. H. Meng and J. Ding (2010). "New microtubule-inhibiting anticancer agents." Expert Opin Investig Drugs **19**(3): 329-343.

Cheng, A. L., C. H. Hsu, J. K. Lin, M. M. Hsu, Y. F. Ho, T. S. Shen, J. Y. Ko, J. T. Lin, B. R. Lin, W. Ming-Shiang, H. S. Yu, S. H. Jee, G. S. Chen, T. M. Chen, C. A. Chen, M. K. Lai, Y. S. Pu, M. H. Pan, Y. J. Wang, C. C. Tsai and C. Y. Hsieh (2001). "Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions." Anticancer Res **21**(4B): 2895-2900.

Cicenas, J., L. Tamosaitis, K. Kvederaviciute, R. Tarvydas, G. Staniute, K. Kalyan, E. Meskinyte-Kausiliene, V. Stankevicius and M. Valius (2017). "KRAS, NRAS and BRAF mutations in colorectal cancer and melanoma." Med Oncol **34**(2): 26.

Ciechanover, A. (1994). "The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway." Cell **79**(1): 13-21.

Clute, P. and J. Pines (1999). "Temporal and spatial control of cyclin B1 destruction in metaphase." Nat Cell Biol **1**(2): 82-87.

Cole, L. K. and L. S. Ross (2001). "Apoptosis in the developing zebrafish embryo." Dev Biol **240**(1): 123-142.

Corcoran, R. B., H. Ebi, A. B. Turke, E. M. Coffee, M. Nishino, A. P. Cogdill, R. D. Brown, P. Della Pelle, D. Dias-Santagata, K. E. Hung, K. T. Flaherty, A. Piris, J. A. Wargo, J. Settleman, M. Mino-Kenudson and J. A. Engelman (2012). "EGFR-mediated re-activation of MAPK signaling contributes to insensitivity of BRAF mutant colorectal cancers to RAF inhibition with vemurafenib." Cancer Discov **2**(3): 227-235.

Crawford, L. J., B. Walker and A. E. Irvine (2011). "Proteasome inhibitors in cancer therapy." J Cell Commun Signal **5**(2): 101-110.

Czabotar, P. E., G. Lessene, A. Strasser and J. M. Adams (2014). "Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy." Nat Rev Mol Cell Biol **15**(1): 49-63.

Czepukojc, B., A. K. Baltes, C. Cerella, M. Kelkel, U. M. Viswanathan, F. Salm, T. Burkholz, C. Schneider, M. Dicato, M. Montenarh, C. Jacob and M. Diederich (2014).

"Synthetic polysulfane derivatives induce cell cycle arrest and apoptotic cell death in human hematopoietic cancer cells." Food Chem Toxicol **64**: 249-257.

Darzynkiewicz, Z., J. Gong, G. Juan, B. Ardel and F. Traganos (1996). "Cytometry of cyclin proteins." Cytometry **25**(1): 1-13.

Das, A., N. L. Banik and S. K. Ray (2007). "Garlic compounds generate reactive oxygen species leading to activation of stress kinases and cysteine proteases for apoptosis in human glioblastoma T98G and U87MG cells." Cancer **110**(5): 1083-1095.

Davis, S. and P. S. Meltzer (2007). "GEOquery: a bridge between the Gene Expression Omnibus (GEO) and BioConductor." Bioinformatics **23**(14): 1846-1847.

de Lemos, E., E. Agouridas, G. Sorin, A. Guerreiro, A. Commercon, A. Pancrazi, J. F. Betzer, M. I. Lannou and J. Ardisson (2011). "Conception, synthesis, and biological evaluation of original discodermolide analogues." Chemistry **17**(36): 10123-10134.

De Roock, W., V. De Vriendt, N. Normanno, F. Ciardiello and S. Tejpar (2011). "KRAS, BRAF, PIK3CA, and PTEN mutations: implications for targeted therapies in metastatic colorectal cancer." Lancet Oncol **12**(6): 594-603.

Degenhardt, K., R. Mathew, B. Beaudoin, K. Bray, D. Anderson, G. Chen, C. Mukherjee, Y. Shi, C. Gelinas, Y. Fan, D. A. Nelson, S. Jin and E. White (2006). "Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis." Cancer Cell **10**(1): 51-64.

Deitrick, J. and W. M. Pruitt (2016). "Wnt/beta Catenin-Mediated Signaling Commonly Altered in Colorectal Cancer." Prog Mol Biol Transl Sci **144**: 49-68.

Desai, A. and T. J. Mitchison (1997). "Microtubule polymerization dynamics." Annu Rev Cell Dev Biol **13**: 83-117.

Deschoolmeester, V., M. Baay, P. Specenier, F. Lardon and J. B. Vermorken (2010). "A review of the most promising biomarkers in colorectal cancer: one step closer to targeted therapy." Oncologist **15**(7): 699-731.

Din, F. V., A. Valanciute, V. P. Houde, D. Zibrova, K. A. Green, K. Sakamoto, D. R. Alessi and M. G. Dunlop (2012). "Aspirin inhibits mTOR signaling, activates AMP-activated protein kinase, and induces autophagy in colorectal cancer cells." Gastroenterology **142**(7): 1504-1515 e1503.

Ding, W. X., H. M. Ni, W. Gao, T. Yoshimori, D. B. Stolz, D. Ron and X. M. Yin (2007). "Linking of autophagy to ubiquitin-proteasome system is important for the regulation of endoplasmic reticulum stress and cell viability." Am J Pathol **171**(2): 513-524.

Domingo, E., R. Ramamoorthy, D. Oukrif, D. Rosmarin, M. Presz, H. Wang, H. Pulker, H. Lockstone, T. Hveem, T. Cranston, H. Danielsen, M. Novelli, B. Davidson, Z. Z. Xu, P. Molloy, E. Johnstone, C. Holmes, R. Midgley, D. Kerr, O. Sieber and I. Tomlinson (2013). "Use of multivariate analysis to suggest a new molecular classification of colorectal cancer." J Pathol **229**(3): 441-448.

Donzelli, M., R. Bernardi, C. Negri, E. Prosperi, L. Padovan, C. Lavielle, O. Brison and A. I. Scovassi (1999). "Apoptosis-prone phenotype of human colon carcinoma cells with a high level amplification of the c-myc gene." Oncogene **18**(2): 439-448.

Durackova, Z. (2010). "Some current insights into oxidative stress." Physiol Res **59**(4): 459-469.

Duran, A., R. Amanchy, J. F. Linares, J. Joshi, S. Abu-Baker, A. Porollo, M. Hansen, J. Moscat and M. T. Diaz-Meco (2011). "p62 is a key regulator of nutrient sensing in the mTORC1 pathway." Mol Cell **44**(1): 134-146.

Duran, A., J. F. Linares, A. S. Galvez, K. Wikenheiser, J. M. Flores, M. T. Diaz-Meco and J. Moscat (2008). "The signaling adaptor p62 is an important NF-kappaB mediator in tumorigenesis." Cancer Cell **13**(4): 343-354.

Egevad, L., A. Valdman, N. P. Wiklund, P. Seve and C. Dumontet (2010). "Beta-tubulin III expression in prostate cancer." Scand J Urol Nephrol **44**(6): 371-377.

Elmore, S. (2007). "Apoptosis: a review of programmed cell death." Toxicol Pathol **35**(4): 495-516.

Erickson, H. P. and E. T. O'Brien (1992). "Microtubule dynamic instability and GTP hydrolysis." Annu Rev Biophys Biomol Struct **21**: 145-166.

Etemadmoghadam, D., B. A. Weir, G. Au-Yeung, K. Alsop, G. Mitchell, J. George, G. Australian Ovarian Cancer Study, S. Davis, A. D. D'Andrea, K. Simpson, W. C. Hahn and D. D. Bowtell (2013). "Synthetic lethality between CCNE1 amplification and loss of BRCA1." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(48): 19489-19494.

Fearon, E. R. (2011). "Molecular genetics of colorectal cancer." Annu Rev Pathol **6**: 479-507.

Fearon, E. R. and B. Vogelstein (1990). "A genetic model for colorectal tumorigenesis." Cell **61**(5): 759-767.

Feyen, F., F. Cachoux, J. Gertsch, M. Wartmann and K. H. Altmann (2008). "Epothilones as lead structures for the synthesis-based discovery of new chemotypes for microtubule stabilization." Acc Chem Res **41**(1): 21-31.

Finley, D. (2009). "Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome." Annu Rev Biochem **78**: 477-513.

Fojo, T. and S. Bates (2003). "Strategies for reversing drug resistance." *Oncogene* **22**(47): 7512-7523.

Fulda, S. and K. M. Debatin (2004). "Sensitization for anticancer drug-induced apoptosis by the chemopreventive agent resveratrol." *Oncogene* **23**(40): 6702-6711.

Fung, C., R. Lock, S. Gao, E. Salas and J. Debnath (2008). "Induction of autophagy during extracellular matrix detachment promotes cell survival." *Mol Biol Cell* **19**(3): 797-806.

Gallastegui, N. and M. Groll (2010). "The 26S proteasome: assembly and function of a destructive machine." *Trends Biochem Sci* **35**(11): 634-642.

Galluzzi, L., F. Pietrocola, J. M. Bravo-San Pedro, R. K. Amaravadi, E. H. Baehrecke, F. Cecconi, P. Codogno, J. Debnath, D. A. Gewirtz, V. Karantza, A. Kimmelman, S. Kumar, B. Levine, M. C. Maiuri, S. J. Martin, J. Penninger, M. Piacentini, D. C. Rubinsztein, H. U. Simon, A. Simonsen, A. M. Thorburn, G. Velasco, K. M. Ryan and G. Kroemer (2015). "Autophagy in malignant transformation and cancer progression." *EMBO J* **34**(7): 856-880.

Gottesman, M. M. (2002). "Mechanisms of cancer drug resistance." *Annu Rev Med* **53**: 615-627.

Groulx, J. F., T. Khalfaoui, Y. D. Benoit, G. Bernatchez, J. C. Carrier, N. Basora and J. F. Beaulieu (2012). "Autophagy is active in normal colon mucosa." *Autophagy* **8**(6): 893-902.

Guba, M., P. von Breitenbuch, M. Steinbauer, G. Koehl, S. Flegel, M. Hornung, C. J. Bruns, C. Zuelke, S. Farkas, M. Anthuber, K. W. Jauch and E. K. Geissler (2002). "Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor." *Nat Med* **8**(2): 128-135.

Guinney, J., R. Dienstmann, X. Wang, A. de Reynies, A. Schlicker, C. Soneson, L. Marisa, P. Roepman, G. Nyamundanda, P. Angelino, B. M. Bot, J. S. Morris, I. M. Simon, S. Gerster, E. Fessler, E. M. F. De Sousa, E. Missiaglia, H. Ramay, D. Barras, K. Homicsko, D. Maru, G. C. Manyam, B. Broom, V. Boige, B. Perez-Villamil, T. Laderas, R. Salazar, J. W. Gray, D. Hanahan, J. Tabernero, R. Bernards, S. H. Friend, P. Laurent-Puig, J. P. Medema, A. Sadanandam, L. Wessels, M. Delorenzi, S. Kopetz, L. Vermeulen and S. Tejpar (2015). "The consensus molecular subtypes of colorectal cancer." *Nat Med* **21**(11): 1350-1356.

Guo, J. Y., H. Y. Chen, R. Mathew, J. Fan, A. M. Strohecker, G. Karsli-Uzunbas, J. J. Kamphorst, G. Chen, J. M. Lemons, V. Karantza, H. A. Coller, R. S. Dipaola, C. Gelinas, J. D. Rabinowitz and E. White (2011). "Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis." *Genes Dev* **25**(5): 460-470.

Half, E., D. Bercovich and P. Rozen (2009). "Familial adenomatous polyposis." *Orphanet J Rare Dis* **4**: 22.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-674.

Harbour, J. W., R. X. Luo, A. Dei Santi, A. A. Postigo and D. C. Dean (1999). "Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1." Cell **98**(6): 859-869.

Hasegawa, S., Y. Miyoshi, C. Egawa, M. Ishitobi, T. Taguchi, Y. Tamaki, M. Monden and S. Noguchi (2003). "Prediction of response to docetaxel by quantitative analysis of class I and III beta-tubulin isotype mRNA expression in human breast cancers." Clin Cancer Res **9**(8): 2992-2997.

Hayden, J. H., S. S. Bowser and C. L. Rieder (1990). "Kinetochores capture astral microtubules during chromosome attachment to the mitotic spindle: direct visualization in live newt lung cells." J Cell Biol **111**(3): 1039-1045.

Hong, S. W., D. H. Jin, J. S. Shin, J. H. Moon, Y. S. Na, K. A. Jung, S. M. Kim, J. C. Kim, K. P. Kim, Y. S. Hong, J. L. Lee, E. K. Choi, J. S. Lee and T. W. Kim (2012). "Ring finger protein 149 is an E3 ubiquitin ligase active on wild-type v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1 (BRAF)." J Biol Chem **287**(28): 24017-24025.

Hosono, T., T. Hosono-Fukao, K. Inada, R. Tanaka, H. Yamada, Y. Iitsuka, T. Seki, I. Hasegawa and T. Ariga (2008). "Alkenyl group is responsible for the disruption of microtubule network formation in human colon cancer cell line HT-29 cells." Carcinogenesis **29**(7): 1400-1406.

Huet, C., C. Sahuquillo-Merino, E. Coudrier and D. Louvard (1987). "Absorptive and mucus-secreting subclones isolated from a multipotent intestinal cell line (HT-29) provide new models for cell polarity and terminal differentiation." J Cell Biol **105**(1): 345-357.

Hwang, A., A. Maity, W. G. McKenna and R. J. Muschel (1995). "Cell cycle-dependent regulation of the cyclin B1 promoter." J Biol Chem **270**(47): 28419-28424.

Hwang, J. E., J. Y. Hong, K. Kim, S. H. Kim, W. Y. Choi, M. J. Kim, S. H. Jung, H. J. Shim, W. K. Bae, E. C. Hwang, K. H. Lee, J. H. Lee, S. H. Cho and I. J. Chung (2013). "Class III beta-tubulin is a predictive marker for taxane-based chemotherapy in recurrent and metastatic gastric cancer." BMC Cancer **13**: 431.

Iacopetta, B., F. Grieco and B. Amanuel (2010). "Microsatellite instability in colorectal cancer." Asia Pac J Clin Oncol **6**(4): 260-269.

Inami, Y., S. Waguri, A. Sakamoto, T. Kouno, K. Nakada, O. Hino, S. Watanabe, J. Ando, M. Iwadate, M. Yamamoto, M. S. Lee, K. Tanaka and M. Komatsu (2011). "Persistent

activation of Nrf2 through p62 in hepatocellular carcinoma cells." J Cell Biol **193**(2): 275-284.

Itakura, E. and N. Mizushima (2011). "p62 Targeting to the autophagosome formation site requires self-oligomerization but not LC3 binding." J Cell Biol **192**(1): 17-27.

Jacobsen, A. (2017). "cgdsr: R-Based API for Accessing the MSKCC Cancer Genomics Data Server (CGDS)."

Jain, A., T. Lamark, E. Sjøttem, K. B. Larsen, J. A. Awuh, A. Overvatn, M. McMahon, J. D. Hayes and T. Johansen (2010). "p62/SQSTM1 is a target gene for transcription factor NRF2 and creates a positive feedback loop by inducing antioxidant response element-driven gene transcription." J Biol Chem **285**(29): 22576-22591.

Janke, C. (2014). "The tubulin code: molecular components, readout mechanisms, and functions." J Cell Biol **206**(4): 461-472.

Jeong, C. H., A. M. Bode, A. Pugliese, Y. Y. Cho, H. G. Kim, J. H. Shim, Y. J. Jeon, H. Li, H. Jiang and Z. Dong (2009). "[6]-Gingerol suppresses colon cancer growth by targeting leukotriene A4 hydrolase." Cancer Res **69**(13): 5584-5591.

Jeong, W. S., I. W. Kim, R. Hu and A. N. Kong (2004). "Modulation of AP-1 by natural chemopreventive compounds in human colon HT-29 cancer cell line." Pharm Res **21**(4): 649-660.

Johansen, T. and T. Lamark (2011). "Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins." Autophagy **7**(3): 279-296.

Jordan, M. A. and L. Wilson (2004). "Microtubules as a target for anticancer drugs." Nat Rev Cancer **4**(4): 253-265.

Jounai, N., F. Takeshita, K. Kobiyama, A. Sawano, A. Miyawaki, K. Q. Xin, K. J. Ishii, T. Kawai, S. Akira, K. Suzuki and K. Okuda (2007). "The Atg5 Atg12 conjugate associates with innate antiviral immune responses." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(35): 14050-14055.

Juliano, R. L. and V. Ling (1976). "A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants." Biochim Biophys Acta **455**(1): 152-162.

Kaemmerer, E., C. Klaus, M. K. Jeon and N. Gassler (2013). "Molecular classification of colorectal carcinomas: the genotype-to-phenotype relation." World J Gastroenterol **19**(45): 8163-8167.

Kanojia, D., R. A. Morshed, L. Zhang, J. M. Miska, J. Qiao, J. W. Kim, P. Pytel, I. V. Balyasnikova, M. S. Lesniak and A. U. Ahmed (2015). "betaIII-Tubulin Regulates Breast Cancer Metastases to the Brain." Mol Cancer Ther **14**(5): 1152-1161.

Kansanen, E., H. K. Jyrkkanen and A. L. Levonen (2012). "Activation of stress signaling pathways by electrophilic oxidized and nitrated lipids." *Free Radic Biol Med* **52**(6): 973-982.

Kansanen, E., A. M. Kivela and A. L. Levonen (2009). "Regulation of Nrf2-dependent gene expression by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2." *Free Radic Biol Med* **47**(9): 1310-1317.

Karantza-Wadsworth, V., S. Patel, O. Kravchuk, G. Chen, R. Mathew, S. Jin and E. White (2007). "Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis." *Genes Dev* **21**(13): 1621-1635.

Katsetos, C. D., E. Draberova, B. Smejkalova, G. Reddy, L. Bertrand, J. P. de Chadarevian, A. Legido, J. Nissanov, P. W. Baas and P. Draber (2007). "Class III beta-tubulin and gamma-tubulin are co-expressed and form complexes in human glioblastoma cells." *Neurochem Res* **32**(8): 1387-1398.

Kavallaris, M., D. Y. Kuo, C. A. Burkhart, D. L. Regl, M. D. Norris, M. Haber and S. B. Horwitz (1997). "Taxol-resistant epithelial ovarian tumors are associated with altered expression of specific beta-tubulin isotypes." *J Clin Invest* **100**(5): 1282-1293.

Kelkel, M., C. Cerella, F. Mack, T. Schneider, C. Jacob, M. Schumacher, M. Dicato and M. Diederich (2012). "ROS-independent JNK activation and multisite phosphorylation of Bcl-2 link diallyl tetrasulfide-induced mitotic arrest to apoptosis." *Carcinogenesis* **33**(11): 2162-2171.

Kerr, J. F., A. H. Wyllie and A. R. Currie (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." *Br J Cancer* **26**(4): 239-257.

Khambata-Ford, S., C. R. Garrett, N. J. Meropol, M. Basik, C. T. Harbison, S. Wu, T. W. Wong, X. Huang, C. H. Takimoto, A. K. Godwin, B. R. Tan, S. S. Krishnamurthi, H. A. Burris, 3rd, E. A. Poplin, M. Hidalgo, J. Baselga, E. A. Clark and D. J. Mauro (2007). "Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab." *J Clin Oncol* **25**(22): 3230-3237.

Kim, J. and Y. S. Keum (2016). "NRF2, a Key Regulator of Antioxidants with Two Faces towards Cancer." *Oxid Med Cell Longev* **2016**: 2746457.

Kim, S., H. G. Lee, S. A. Park, J. K. Kundu, Y. S. Keum, Y. N. Cha, H. K. Na and Y. J. Surh (2014). "Keap1 cysteine 288 as a potential target for diallyl trisulfide-induced Nrf2 activation." *PLoS One* **9**(1): e85984.

Kim, Y. A., D. Xiao, H. Xiao, A. A. Powolny, K. L. Lew, M. L. Reilly, Y. Zeng, Z. Wang and S. V. Singh (2007). "Mitochondria-mediated apoptosis by diallyl trisulfide in human

prostate cancer cells is associated with generation of reactive oxygen species and regulated by Bax/Bak." *Mol Cancer Ther* **6**(5): 1599-1609.

Kirkin, V., D. G. McEwan, I. Novak and I. Dikic (2009). "A role for ubiquitin in selective autophagy." *Mol Cell* **34**(3): 259-269.

Klionsky, D. J., F. C. Abdalla, H. Abeliovich, R. T. Abraham, A. Acevedo-Aroza, K. Adeli, L. Agholme, M. Agnello, P. Agostinis, J. A. Aguirre-Ghiso, H. J. Ahn, O. Ait-Mohamed, S. Ait-Si-Ali, T. Akematsu, S. Akira, H. M. Al-Younes, M. A. Al-Zeer, M. L. Albert, R. L. Albin, J. Alegre-Abarategui, M. F. Aleo, M. Alirezaei, A. Almasan, M. Almonte-Becerril, A. Amano, R. Amaravadi, S. Amarnath, A. O. Amer, N. Andrieu-Abadie, V. Anantharam, D. K. Ann, S. Anoopkumar-Dukie, H. Aoki, N. Apostolova, G. Arancia, J. P. Aris, K. Asanuma, N. Y. Asare, H. Ashida, V. Askanas, D. S. Askew, P. Auberger, M. Baba, S. K. Backues, E. H. Baehrecke, B. A. Bahr, X. Y. Bai, Y. Bailly, R. Baiocchi, G. Baldini, W. Balduini, A. Ballabio, B. A. Bamber, E. T. Bampton, G. Banhegyi, C. R. Bartholomew, D. C. Bassham, R. C. Bast, Jr., H. Batoko, B. H. Bay, I. Beau, D. M. Bechet, T. J. Begley, C. Behl, C. Behrends, S. Bekri, B. Bellaire, L. J. Bendall, L. Benetti, L. Berliocchi, H. Bernardi, F. Bernassola, S. Besteiro, I. Bhatia-Kissova, X. Bi, M. Biard-Piechaczyk, J. S. Blum, L. H. Boise, P. Bonaldo, D. L. Boone, B. C. Bornhauser, K. R. Bortoluci, I. Bossis, F. Bost, J. P. Bourquin, P. Boya, M. Boyer-Guittaut, P. V. Bozhkov, N. R. Brady, C. Brancolini, A. Brech, J. E. Brenman, A. Brennand, E. H. Bresnick, P. Brest, D. Bridges, M. L. Bristol, P. S. Brookes, E. J. Brown, J. H. Brumell, N. Brunetti-Pierri, U. T. Brunk, D. E. Bulman, S. J. Bultman, G. Bultynck, L. F. Burbulla, W. Bursch, J. P. Butchar, W. Buzgariu, S. P. Bydlowski, K. Cadwell, M. Cahova, D. Cai, J. Cai, Q. Cai, B. Calabretta, J. Calvo-Garrido, N. Camougrand, M. Campanella, J. Campos-Salinas, E. Candi, L. Cao, A. B. Caplan, S. R. Carding, S. M. Cardoso, J. S. Carew, C. R. Carlin, V. Carmignac, L. A. Carneiro, S. Carra, R. A. Caruso, G. Casari, C. Casas, R. Castino, E. Cebollero, F. Cecconi, J. Celli, H. Chaachouay, H. J. Chae, C. Y. Chai, D. C. Chan, E. Y. Chan, R. C. Chang, C. M. Che, C. C. Chen, G. C. Chen, G. Q. Chen, M. Chen, Q. Chen, S. S. Chen, W. Chen, X. Chen, X. Chen, X. Chen, Y. G. Chen, Y. Chen, Y. Chen, Y. J. Chen, Z. Chen, A. Cheng, C. H. Cheng, Y. Cheng, H. Cheong, J. H. Cheong, S. Cherry, R. Chess-Williams, Z. H. Cheung, E. Chevet, H. L. Chiang, R. Chiarelli, T. Chiba, L. S. Chin, S. H. Chiou, F. V. Chisari, C. H. Cho, D. H. Cho, A. M. Choi, D. Choi, K. S. Choi, M. E. Choi, S. Chouaib, D. Choubey, V. Choubey, C. T. Chu, T. H. Chuang, S. H. Chueh, T. Chun, Y. J. Chwae, M. L. Chye, R. Ciarcia, M. R. Ciriolo, M. J. Clague, R. S. Clark, P. G. Clarke, R. Clarke, P. Codogno, H. A. Coller, M. I. Colombo, S. Comincini, M. Condello, F. Condorelli, M. R. Cookson, G. H. Coombs, I.

Coppens, R. Corbalan, P. Cossart, P. Costelli, S. Costes, A. Coto-Montes, E. Couve, F. P. Coxon, J. M. Cregg, J. L. Crespo, M. J. Cronje, A. M. Cuervo, J. J. Cullen, M. J. Czaja, M. D'Amelio, A. Darfeuille-Michaud, L. M. Davids, F. E. Davies, M. De Felici, J. F. de Groot, C. A. de Haan, L. De Martino, A. De Milito, V. De Tata, J. Debnath, A. Degterev, B. Dehay, L. M. Delbridge, F. Demarchi, Y. Z. Deng, J. Dengjel, P. Dent, D. Denton, V. Deretic, S. D. Desai, R. J. Devenish, M. Di Gioacchino, G. Di Paolo, C. Di Pietro, G. Diaz-Araya, I. Diaz-Laviada, M. T. Diaz-Meco, J. Diaz-Nido, I. Dikic, S. P. Dinesh-Kumar, W. X. Ding, C. W. Distelhorst, A. Diwan, M. Djavaheri-Mergny, S. Dokudovskaya, Z. Dong, F. C. Dorsey, V. Dosenko, J. J. Dowling, S. Doxsey, M. Dreux, M. E. Drew, Q. Duan, M. A. Duchosal, K. Duff, I. Dugail, M. Durbeej, M. Duszenko, C. L. Edelstein, A. L. Edinger, G. Egea, L. Eichinger, N. T. Eissa, S. Ekmekcioglu, W. S. El-Deiry, Z. Elazar, M. Elgendy, L. M. Ellerby, K. E. Eng, A. M. Engelbrecht, S. Engelender, J. Erenpreisa, R. Escalante, A. Esclatine, E. L. Eskelinen, L. Espert, V. Espina, H. Fan, J. Fan, Q. W. Fan, Z. Fan, S. Fang, Y. Fang, M. Fanto, A. Fanzani, T. Farkas, J. C. Farre, M. Faure, M. Fechheimer, C. G. Feng, J. Feng, Q. Feng, Y. Feng, L. Fesus, R. Feuer, M. E. Figueiredo-Pereira, G. M. Fimia, D. C. Fingar, S. Finkbeiner, T. Finkel, K. D. Finley, F. Fiorito, E. A. Fisher, P. B. Fisher, M. Flajolet, M. L. Florez-McClure, S. Florio, E. A. Fon, F. Fornai, F. Fortunato, R. Fotedar, D. H. Fowler, H. S. Fox, R. Franco, L. B. Frankel, M. Fransen, J. M. Fuentes, J. Fueyo, J. Fujii, K. Fujisaki, E. Fujita, M. Fukuda, R. H. Furukawa, M. Gaestel, P. Gailly, M. Gajewska, B. Galliot, V. Galy, S. Ganesh, B. Ganetzky, I. G. Ganley, F. B. Gao, G. F. Gao, J. Gao, L. Garcia, G. Garcia-Manero, M. Garcia-Marcos, M. Garmyn, A. L. Gartel, E. Gatti, M. Gautel, T. R. Gawriluk, M. E. Gegg, J. Geng, M. Germain, J. E. Gestwicki, D. A. Gewirtz, S. Ghavami, P. Ghosh, A. M. Giammarioli, A. N. Giatromanolaki, S. B. Gibson, R. W. Gilkerson, M. L. Ginger, H. N. Ginsberg, J. Golab, M. S. Goligorsky, P. Golstein, C. Gomez-Manzano, E. Goncu, C. Gongora, C. D. Gonzalez, R. Gonzalez, C. Gonzalez-Estevez, R. A. Gonzalez-Polo, E. Gonzalez-Rey, N. V. Gorbunov, S. Gorski, S. Goruppi, R. A. Gottlieb, D. Gozuacik, G. E. Granato, G. D. Grant, K. N. Green, A. Gregorc, F. Gros, C. Grose, T. W. Grunt, P. Gual, J. L. Guan, K. L. Guan, S. M. Guichard, A. S. Gukovskaya, I. Gukovsky, J. Gunst, A. B. Gustafsson, A. J. Halayko, A. N. Hale, S. K. Halonen, M. Hamasaki, F. Han, T. Han, M. K. Hancock, M. Hansen, H. Harada, M. Harada, S. E. Hardt, J. W. Harper, A. L. Harris, J. Harris, S. D. Harris, M. Hashimoto, J. A. Haspel, S. Hayashi, L. A. Hazelhurst, C. He, Y. W. He, M. J. Hebert, K. A. Heidenreich, M. H. Helfrich, G. V. Helgason, E. P. Henske, B. Herman, P. K. Herman, C. Hetz, S. Hilfiker, J. A. Hill, L. J. Hocking, P. Hofman, T. G. Hofmann, J. Hohfeld, T. L. Holyoake, M. H. Hong, D. A. Hood, G. S. Hotamisligil, E.

J. Houwerzijl, M. Hoyer-Hansen, B. Hu, C. A. Hu, H. M. Hu, Y. Hua, C. Huang, J. Huang, S. Huang, W. P. Huang, T. B. Huber, W. K. Huh, T. H. Hung, T. R. Hupp, G. M. Hur, J. B. Hurley, S. N. Hussain, P. J. Hussey, J. J. Hwang, S. Hwang, A. Ichihara, S. Ilkhanizadeh, K. Inoki, T. Into, V. Iovane, J. L. Iovanna, N. Y. Ip, Y. Isaka, H. Ishida, C. Isidoro, K. Isobe, A. Iwasaki, M. Izquierdo, Y. Izumi, P. M. Jaakkola, M. Jaattela, G. R. Jackson, W. T. Jackson, B. Janji, M. Jendrach, J. H. Jeon, E. B. Jeung, H. Jiang, H. Jiang, J. X. Jiang, M. Jiang, Q. Jiang, X. Jiang, X. Jiang, A. Jimenez, M. Jin, S. Jin, C. O. Joe, T. Johansen, D. E. Johnson, G. V. Johnson, N. L. Jones, B. Joseph, S. K. Joseph, A. M. Joubert, G. Juhasz, L. Juillerat-Jeanneret, C. H. Jung, Y. K. Jung, K. Kaarniranta, A. Kaasik, T. Kabuta, M. Kadowaki, K. Kagedal, Y. Kamada, V. O. Kaminsky, H. H. Kampinga, H. Kanamori, C. Kang, K. B. Kang, K. I. Kang, R. Kang, Y. A. Kang, T. Kanki, T. D. Kanneganti, H. Kanno, A. G. Kanthasamy, A. Kanthasamy, V. Karantza, G. P. Kaushal, S. Kaushik, Y. Kawazoe, P. Y. Ke, J. H. Kehrl, A. Kelekar, C. Kerkhoff, D. H. Kessel, H. Khalil, J. A. Kiel, A. A. Kiger, A. Kihara, D. R. Kim, D. H. Kim, D. H. Kim, E. K. Kim, H. R. Kim, J. S. Kim, J. H. Kim, J. C. Kim, J. K. Kim, P. K. Kim, S. W. Kim, Y. S. Kim, Y. Kim, A. Kimchi, A. C. Kimmelman, J. S. King, T. J. Kinsella, V. Kirkin, L. A. Kirshenbaum, K. Kitamoto, K. Kitazato, L. Klein, W. T. Klimecki, J. Klucken, E. Knecht, B. C. Ko, J. C. Koch, H. Koga, J. Y. Koh, Y. H. Koh, M. Koike, M. Komatsu, E. Kominami, H. J. Kong, W. J. Kong, V. I. Korolchuk, Y. Kotake, M. I. Koukourakis, J. B. Kouri Flores, A. L. Kovacs, C. Kraft, D. Krainc, H. Kramer, C. Kretz-Remy, A. M. Krichevsky, G. Kroemer, R. Kruger, O. Krut, N. T. Ktistakis, C. Y. Kuan, R. Kucharczyk, A. Kumar, R. Kumar, S. Kumar, M. Kundu, H. J. Kung, T. Kurz, H. J. Kwon, A. R. La Spada, F. Lafont, T. Lamark, J. Landry, J. D. Lane, P. Lapaquette, J. F. Laporte, L. Laszlo, S. Lavandero, J. N. Lavoie, R. Layfield, P. A. Lazo, W. Le, L. Le Cam, D. J. Ledbetter, A. J. Lee, B. W. Lee, G. M. Lee, J. Lee, J. H. Lee, M. Lee, M. S. Lee, S. H. Lee, C. Leeuwenburgh, P. Legembre, R. Legouis, M. Lehmann, H. Y. Lei, Q. Y. Lei, D. A. Leib, J. Leiro, J. J. Lemasters, A. Lemoine, M. S. Lesniak, D. Lev, V. V. Levenson, B. Levine, E. Levy, F. Li, J. L. Li, L. Li, S. Li, W. Li, X. J. Li, Y. B. Li, Y. P. Li, C. Liang, Q. Liang, Y. F. Liao, P. P. Liberski, A. Lieberman, H. J. Lim, K. L. Lim, K. Lim, C. F. Lin, F. C. Lin, J. Lin, J. D. Lin, K. Lin, W. W. Lin, W. C. Lin, Y. L. Lin, R. Linden, P. Lingor, J. Lippincott-Schwartz, M. P. Lisanti, P. B. Liton, B. Liu, C. F. Liu, K. Liu, L. Liu, Q. A. Liu, W. Liu, Y. C. Liu, Y. Liu, R. A. Lockshin, C. N. Lok, S. Lonial, B. Loos, G. Lopez-Berestein, C. Lopez-Otin, L. Lossi, M. T. Lotze, P. Low, B. Lu, B. Lu, B. Lu, Z. Lu, F. Luciano, N. W. Lukacs, A. H. Lund, M. A. Lynch-Day, Y. Ma, F. Macian, J. P. MacKeigan, K. F. Macleod, F. Madeo, L. Maiuri, M. C. Maiuri, D. Malagoli, M. C. Malicdan, W. Malorni, N. Man, E. M.

Mandelkow, S. Manon, I. Manov, K. Mao, X. Mao, Z. Mao, P. Marambaud, D. Marazziti, Y. L. Marcel, K. Marchbank, P. Marchetti, S. J. Marciniak, M. Marcondes, M. Mardi, G. Marfe, G. Marino, M. Markaki, M. R. Marten, S. J. Martin, C. Martinand-Mari, W. Martinet, M. Martinez-Vicente, M. Masini, P. Matarrese, S. Matsuo, R. Matteoni, A. Mayer, N. M. Mazure, D. J. McConkey, M. J. McConnell, C. McDermott, C. McDonald, G. M. McInerney, S. L. McKenna, B. McLaughlin, P. J. McLean, C. R. McMaster, G. A. McQuibban, A. J. Meijer, M. H. Meisler, A. Melendez, T. J. Melia, G. Melino, M. A. Mena, J. A. Menendez, R. F. Menna-Barreto, M. B. Menon, F. M. Menzies, C. A. Mercer, A. Merighi, D. E. Merry, S. Meschini, C. G. Meyer, T. F. Meyer, C. Y. Miao, J. Y. Miao, P. A. Michels, C. Michiels, D. Mijaljica, A. Milojkovic, S. Minucci, C. Miracco, C. K. Miranti, I. Mitroulis, K. Miyazawa, N. Mizushima, B. Mograbi, S. Mohseni, X. Molero, B. Mollereau, F. Mollinedo, T. Momoi, I. Monastyrska, M. M. Monick, M. J. Monteiro, M. N. Moore, R. Mora, K. Moreau, P. I. Moreira, Y. Moriyasu, J. Moscat, S. Mostowy, J. C. Mottram, T. Motyl, C. E. Moussa, S. Muller, S. Muller, K. Munger, C. Munz, L. O. Murphy, M. E. Murphy, A. Musaro, I. Mysorekar, E. Nagata, K. Nagata, A. Nahimana, U. Nair, T. Nakagawa, K. Nakahira, H. Nakano, H. Nakatogawa, M. Nanjundan, N. I. Naqvi, D. P. Narendra, M. Narita, M. Navarro, S. T. Nawrocki, T. Y. Nazarko, A. Nemchenko, M. G. Netea, T. P. Neufeld, P. A. Ney, I. P. Nezis, H. P. Nguyen, D. Nie, I. Nishino, C. Nislow, R. A. Nixon, T. Noda, A. A. Noegel, A. Nogalska, S. Noguchi, L. Notterpek, I. Novak, T. Nozaki, N. Nukina, T. Nurnberger, B. Nyfeler, K. Obara, T. D. Oberley, S. Oddo, M. Ogawa, T. Ohashi, K. Okamoto, N. L. Oleinick, F. J. Oliver, L. J. Olsen, S. Olsson, O. Opota, T. F. Osborne, G. K. Ostrander, K. Otsu, J. H. Ou, M. Ouimet, M. Overholtzer, B. Ozpolat, P. Paganetti, U. Pagnini, N. Pallet, G. E. Palmer, C. Palumbo, T. Pan, T. Panaretakis, U. B. Pandey, Z. Papackova, I. Papassideri, I. Paris, J. Park, O. K. Park, J. B. Parys, K. R. Parzych, S. Patschan, C. Patterson, S. Patingre, J. M. Pawelek, J. Peng, D. H. Perlmutter, I. Perrotta, G. Perry, S. Pervaiz, M. Peter, G. J. Peters, M. Petersen, G. Petrovski, J. M. Phang, M. Piacentini, P. Pierre, V. Pierrefite-Carle, G. Pierron, R. Pinkas-Kramarski, A. Piras, N. Piri, L. C. Plataniias, S. Poggeler, M. Poirot, A. Poletti, C. Pous, M. Pozuelo-Rubio, M. Praetorius-Ibba, A. Prasad, M. Prescott, M. Priault, N. Produit-Zengaffinen, A. Progulsk-Fox, T. Proikas-Cezanne, S. Przedborski, K. Przyklenk, R. Puertollano, J. Puyal, S. B. Qian, L. Qin, Z. H. Qin, S. E. Quaggin, N. Raben, H. Rabinowich, S. W. Rabkin, I. Rahman, A. Rami, G. Ramm, G. Randall, F. Randow, V. A. Rao, J. C. Rathmell, B. Ravikumar, S. K. Ray, B. H. Reed, J. C. Reed, F. Reggiori, A. Regnier-Vigouroux, A. S. Reichert, J. J. Reiners, Jr., R. J. Reiter, J. Ren, J. L. Revuelta, C. J. Rhodes, K. Ritis, E. Rizzo, J. Robbins, M. Roberge, H. Roca, M. C.

Roccheri, S. Rocchi, H. P. Rodemann, S. Rodriguez de Cordoba, B. Rohrer, I. B. Roninson, K. Rosen, M. M. Rost-Roszkowska, M. Rouis, K. M. Rouschop, F. Rovetta, B. P. Rubin, D. C. Rubinsztein, K. Ruckdeschel, E. B. Rucker, 3rd, A. Rudich, E. Rudolf, N. Ruiz-Opazo, R. Russo, T. E. Rusten, K. M. Ryan, S. W. Ryter, D. M. Sabatini, J. Sadoshima, T. Saha, T. Saitoh, H. Sakagami, Y. Sakai, G. H. Salekdeh, P. Salomoni, P. M. Salvaterra, G. Salvesen, R. Salvioli, A. M. Sanchez, J. A. Sanchez-Alcazar, R. Sanchez-Prieto, M. Sandri, U. Sankar, P. Sansanwal, L. Santambrogio, S. Saran, S. Sarkar, M. Sarwal, C. Sasakawa, A. Sasnauskiene, M. Sass, K. Sato, M. Sato, A. H. Schapira, M. Scharl, H. M. Schatzl, W. Scheper, S. Schiaffino, C. Schneider, M. E. Schneider, R. Schneider-Stock, P. V. Schoenlein, D. F. Schorderet, C. Schuller, G. K. Schwartz, L. Scorrano, L. Sealy, P. O. Seglen, J. Segura-Aguilar, I. Seiliez, O. Seleverstov, C. Sell, J. B. Seo, D. Separovic, V. Setaluri, T. Setoguchi, C. Settembre, J. J. Shacka, M. Shanmugam, I. M. Shapiro, E. Shaulian, R. J. Shaw, J. H. Shelhamer, H. M. Shen, W. C. Shen, Z. H. Sheng, Y. Shi, K. Shibuya, Y. Shidoji, J. J. Shieh, C. M. Shih, Y. Shimada, S. Shimizu, T. Shintani, O. S. Shirihai, G. C. Shore, A. A. Sibirny, S. B. Sidhu, B. Sikorska, E. C. Silva-Zacarin, A. Simmons, A. K. Simon, H. U. Simon, C. Simone, A. Simonsen, D. A. Sinclair, R. Singh, D. Sinha, F. A. Sinicrope, A. Sirko, P. M. Siu, E. Sivridis, V. Skop, V. P. Skulachev, R. S. Slack, S. S. Smaili, D. R. Smith, M. S. Soengas, T. Soldati, X. Song, A. K. Sood, T. W. Soong, F. Sotgia, S. A. Spector, C. D. Spies, W. Springer, S. M. Srinivasula, L. Stefanis, J. S. Steffan, R. Stendel, H. Stenmark, A. Stephanou, S. T. Stern, C. Sternberg, B. Stork, P. Stralfors, C. S. Subauste, X. Sui, D. Sulzer, J. Sun, S. Y. Sun, Z. J. Sun, J. J. Sung, K. Suzuki, T. Suzuki, M. S. Swanson, C. Swanton, S. T. Sweeney, L. K. Sy, G. Szabadkai, I. Tabas, H. Taegtmeier, M. Tafani, K. Takacs-Vellai, Y. Takano, K. Takegawa, G. Takemura, F. Takeshita, N. J. Talbot, K. S. Tan, K. Tanaka, K. Tanaka, D. Tang, D. Tang, I. Tanida, B. A. Tannous, N. Tavernarakis, G. S. Taylor, G. A. Taylor, J. P. Taylor, L. S. Terada, A. Terman, G. Tettamanti, K. Thevissen, C. B. Thompson, A. Thorburn, M. Thumm, F. Tian, Y. Tian, G. Tocchini-Valentini, A. M. Tolkovsky, Y. Tomino, L. Tonges, S. A. Tooze, C. Tournier, J. Tower, R. Towns, V. Trajkovic, L. H. Travassos, T. F. Tsai, M. P. Tschan, T. Tsubata, A. Tsung, B. Turk, L. S. Turner, S. C. Tyagi, Y. Uchiyama, T. Ueno, M. Umekawa, R. Umemiya-Shirafuji, V. K. Unni, M. I. Vaccaro, E. M. Valente, G. Van den Berghe, I. J. van der Klei, W. van Doorn, L. F. van Dyk, M. van Egmond, L. A. van Grunsven, P. Vandenabeele, W. P. Vandenberghe, I. Vanhorebeek, E. C. Vaquero, G. Velasco, T. Vellai, J. M. Vicencio, R. D. Vierstra, M. Vila, C. Vindis, G. Viola, M. T. Viscomi, O. V. Voitsekhojskaja, C. von Haefen, M. Votruba, K. Wada, R. Wade-Martins, C. L. Walker, C. M. Walsh, J. Walter, X. B. Wan, A. Wang, C. Wang, D. Wang, F.

Wang, F. Wang, G. Wang, H. Wang, H. G. Wang, H. D. Wang, J. Wang, K. Wang, M. Wang, R. C. Wang, X. Wang, X. Wang, Y. J. Wang, Y. Wang, Z. Wang, Z. C. Wang, Z. Wang, D. G. Wansink, D. M. Ward, H. Watada, S. L. Waters, P. Webster, L. Wei, C. C. Weihl, W. A. Weiss, S. M. Welford, L. P. Wen, C. A. Whitehouse, J. L. Whitton, A. J. Whitworth, T. Wileman, J. W. Wiley, S. Wilkinson, D. Willbold, R. L. Williams, P. R. Williamson, B. G. Wouters, C. Wu, D. C. Wu, W. K. Wu, A. Wytttenbach, R. J. Xavier, Z. Xi, P. Xia, G. Xiao, Z. Xie, Z. Xie, D. Z. Xu, J. Xu, L. Xu, X. Xu, A. Yamamoto, A. Yamamoto, S. Yamashina, M. Yamashita, X. Yan, M. Yanagida, D. S. Yang, E. Yang, J. M. Yang, S. Y. Yang, W. Yang, W. Y. Yang, Z. Yang, M. C. Yao, T. P. Yao, B. Yeganeh, W. L. Yen, J. J. Yin, X. M. Yin, O. J. Yoo, G. Yoon, S. Y. Yoon, T. Yorimitsu, Y. Yoshikawa, T. Yoshimori, K. Yoshimoto, H. J. You, R. J. Youle, A. Younes, L. Yu, L. Yu, S. W. Yu, W. H. Yu, Z. M. Yuan, Z. Yue, C. H. Yun, M. Yuzaki, O. Zabirnyk, E. Silva-Zacarin, D. Zacks, E. Zacksenhaus, N. Zaffaroni, Z. Zakeri, H. J. Zeh, 3rd, S. O. Zeitlin, H. Zhang, H. L. Zhang, J. Zhang, J. P. Zhang, L. Zhang, L. Zhang, M. Y. Zhang, X. D. Zhang, M. Zhao, Y. F. Zhao, Y. Zhao, Z. J. Zhao, X. Zheng, B. Zhitovovsky, Q. Zhong, C. Z. Zhou, C. Zhu, W. G. Zhu, X. F. Zhu, X. Zhu, Y. Zhu, T. Zoladek, W. X. Zong, A. Zorzano, J. Zschocke and B. Zuckerbraun (2012). "Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy." Autophagy **8**(4): 445-544.

Kochl, R., X. W. Hu, E. Y. Chan and S. A. Tooze (2006). "Microtubules facilitate autophagosome formation and fusion of autophagosomes with endosomes." Traffic **7**(2): 129-145.

Komatsu, M. and Y. Ichimura (2010). "Physiological significance of selective degradation of p62 by autophagy." FEBS Lett **584**(7): 1374-1378.

Komatsu, M., H. Kurokawa, S. Waguri, K. Taguchi, A. Kobayashi, Y. Ichimura, Y. S. Sou, I. Ueno, A. Sakamoto, K. I. Tong, M. Kim, Y. Nishito, S. Iemura, T. Natsume, T. Ueno, E. Kominami, H. Motohashi, K. Tanaka and M. Yamamoto (2010). "The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1." Nat Cell Biol **12**(3): 213-223.

Komatsu, M., S. Waguri, T. Chiba, S. Murata, J. Iwata, I. Tanida, T. Ueno, M. Koike, Y. Uchiyama, E. Kominami and K. Tanaka (2006). "Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice." Nature **441**(7095): 880-884.

Komatsu, M., S. Waguri, M. Koike, Y. S. Sou, T. Ueno, T. Hara, N. Mizushima, J. Iwata, J. Ezaki, S. Murata, J. Hamazaki, Y. Nishito, S. Iemura, T. Natsume, T. Yanagawa, J. Uwayama, E. Warabi, H. Yoshida, T. Ishii, A. Kobayashi, M. Yamamoto, Z. Yue, Y.

Uchiyama, E. Kominami and K. Tanaka (2007). "Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice." Cell **131**(6): 1149-1163.

Korolchuk, V. I., A. Mansilla, F. M. Menzies and D. C. Rubinsztein (2009). "Autophagy inhibition compromises degradation of ubiquitin-proteasome pathway substrates." Mol Cell **33**(4): 517-527.

Korolchuk, V. I., F. M. Menzies and D. C. Rubinsztein (2009). "A novel link between autophagy and the ubiquitin-proteasome system." Autophagy **5**(6): 862-863.

Korolchuk, V. I., F. M. Menzies and D. C. Rubinsztein (2010). "Mechanisms of cross-talk between the ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome systems." FEBS Lett **584**(7): 1393-1398.

Kowalski, R. J., P. Giannakakou and E. Hamel (1997). "Activities of the microtubule-stabilizing agents epothilones A and B with purified tubulin and in cells resistant to paclitaxel (Taxol(R))." J Biol Chem **272**(4): 2534-2541.

Krishnamoorthy, S. K., V. Relias, S. Sebastian, V. Jayaraman and M. W. Saif (2015). "Management of regorafenib-related toxicities: a review." Therap Adv Gastroenterol **8**(5): 285-297.

Kung, C. P., A. Budina, G. Balaburski, M. K. Bergenstock and M. Murphy (2011). "Autophagy in tumor suppression and cancer therapy." Crit Rev Eukaryot Gene Expr **21**(1): 71-100.

Kuusisto, E., T. Kauppinen and I. Alafuzoff (2008). "Use of p62/SQSTM1 antibodies for neuropathological diagnosis." Neuropathol Appl Neurobiol **34**(2): 169-180.

Kuusisto, E., A. Salminen and I. Alafuzoff (2002). "Early accumulation of p62 in neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease: possible role in tangle formation." Neuropathol Appl Neurobiol **28**(3): 228-237.

L'Hernault, S. W. and J. L. Rosenbaum (1985). "Chlamydomonas alpha-tubulin is posttranslationally modified by acetylation on the epsilon-amino group of a lysine." Biochemistry **24**(2): 473-478.

Labianca, R., B. Nordlinger, G. D. Beretta, S. Mosconi, M. Mandala, A. Cervantes, D. Arnold and E. G. W. Group (2013). "Early colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up." Ann Oncol **24 Suppl 6**: vi64-72.

Lan, H., H. Yuan and C. Lin (2017). "Sulforaphane induces p53deficient SW480 cell apoptosis via the ROSMAPK signaling pathway." Mol Med Rep.

- Landino, L. M., M. T. Koumas, C. E. Mason and J. A. Alston (2007). "Modification of tubulin cysteines by nitric oxide and nitroxyl donors alters tubulin polymerization activity." Chem Res Toxicol **20**(11): 1693-1700.
- Lau, A., X. J. Wang, F. Zhao, N. F. Villeneuve, T. Wu, T. Jiang, Z. Sun, E. White and D. D. Zhang (2010). "A noncanonical mechanism of Nrf2 activation by autophagy deficiency: direct interaction between Keap1 and p62." Mol Cell Biol **30**(13): 3275-3285.
- Leandro-Garcia, L. J., S. Leskela, L. Inglada-Perez, I. Landa, A. A. de Cubas, A. Maliszewska, I. Comino-Mendez, R. Leton, A. Gomez-Grana, R. Torres, J. C. Ramirez, S. Alvarez, J. Rivera, C. Martinez, M. L. Lozano, A. Cascon, M. Robledo and C. Rodriguez-Antona (2012). "Hematologic beta-tubulin VI isoform exhibits genetic variability that influences paclitaxel toxicity." Cancer Res **72**(18): 4744-4752.
- Lee, S. J., P. T. Pfluger, J. Y. Kim, R. Nogueiras, A. Duran, G. Pages, J. Pouyssegur, M. H. Tschop, M. T. Diaz-Meco and J. Moscat (2010). "A functional role for the p62-ERK1 axis in the control of energy homeostasis and adipogenesis." EMBO Rep **11**(3): 226-232.
- Lee, Y. H., J. Ko, I. Joung, J. H. Kim and J. Shin (1998). "Immediate early response of the p62 gene encoding a non-proteasomal multiubiquitin chain binding protein." FEBS Lett **438**(3): 297-300.
- Leibovitz, A., J. C. Stinson, W. B. McCombs, 3rd, C. E. McCoy, K. C. Mazur and N. D. Mabry (1976). "Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines." Cancer Res **36**(12): 4562-4569.
- Levallet, G., E. Bergot, M. Antoine, C. Creveuil, A. O. Santos, M. Beau-Faller, F. de Fraipont, E. Brambilla, J. Levallet, F. Morin, V. Westeel, M. Wislez, E. Quoix, D. Debieuvre, F. Dubois, I. Rouquette, J. L. Pujol, D. Moro-Sibilot, J. Camonis, G. Zalcman and T. Intergroupe Francophone de Cancerologie (2012). "High TUBB3 expression, an independent prognostic marker in patients with early non-small cell lung cancer treated by preoperative chemotherapy, is regulated by K-Ras signaling pathway." Mol Cancer Ther **11**(5): 1203-1213.
- Li, F. Y. and M. D. Lai (2009). "Colorectal cancer, one entity or three." J Zhejiang Univ Sci B **10**(3): 219-229.
- Li, J., N. Hou, A. Faried, S. Tsutsumi and H. Kuwano (2010). "Inhibition of autophagy augments 5-fluorouracil chemotherapy in human colon cancer in vitro and in vivo model." Eur J Cancer **46**(10): 1900-1909.

- Li, K., D. Wu, X. Chen, T. Zhang, L. Zhang, Y. Yi, Z. Miao, N. Jin, X. Bi, H. Wang, J. Xu and D. Wang (2014). "Current and emerging biomarkers of cell death in human disease." Biomed Res Int **2014**: 690103.
- Liang, D., H. Wu, M. W. Wong and D. Huang (2015). "Diallyl Trisulfide Is a Fast H<sub>2</sub>S Donor, but Diallyl Disulfide Is a Slow One: The Reaction Pathways and Intermediates of Glutathione with Polysulfides." Org Lett **17**(17): 4196-4199.
- Lievre, A., J. B. Bachet, D. Le Corre, V. Boige, B. Landi, J. F. Emile, J. F. Cote, G. Tomasic, C. Penna, M. Ducreux, P. Rougier, F. Penault-Llorca and P. Laurent-Puig (2006). "KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer." Cancer Res **66**(8): 3992-3995.
- Lila, M. A. (2007). "From beans to berries and beyond: teamwork between plant chemicals for protection of optimal human health." Ann N Y Acad Sci **1114**: 372-380.
- Lim, D. Y. and J. H. Park (2009). "Induction of p53 contributes to apoptosis of HCT-116 human colon cancer cells induced by the dietary compound fisetin." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **296**(5): G1060-1068.
- Linnekamp, J. F., X. Wang, J. P. Medema and L. Vermeulen (2015). "Colorectal cancer heterogeneity and targeted therapy: a case for molecular disease subtypes." Cancer Res **75**(2): 245-249.
- Liu, K. C., T. Y. Shih, C. L. Kuo, Y. S. Ma, J. L. Yang, P. P. Wu, Y. P. Huang, K. C. Lai and J. G. Chung (2016). "Sulforaphane Induces Cell Death Through G<sub>2</sub>/M Phase Arrest and Triggers Apoptosis in HCT 116 Human Colon Cancer Cells." Am J Chin Med **44**(6): 1289-1310.
- Liu, K. L., H. W. Chen, R. Y. Wang, Y. P. Lei, L. Y. Sheen and C. K. Lii (2006). "DATS reduces LPS-induced iNOS expression, NO production, oxidative stress, and NF-kappaB activation in RAW 264.7 macrophages." J Agric Food Chem **54**(9): 3472-3478.
- Liu, W. Y., Y. Wang, Y. H. Sun, Y. Wang, Y. P. Wang, S. P. Chen and Z. Y. Zhu (2005). "Efficient RNA interference in zebrafish embryos using siRNA synthesized with SP6 RNA polymerase." Dev Growth Differ **47**(5): 323-331.
- Lobert, S. and J. J. Correia (2000). "Energetics of vinca alkaloid interactions with tubulin." Methods Enzymol **323**: 77-103.
- Lochhead, P., A. Kuchiba, Y. Imamura, X. Liao, M. Yamauchi, R. Nishihara, Z. R. Qian, T. Morikawa, J. Shen, J. A. Meyerhardt, C. S. Fuchs and S. Ogino (2013). "Microsatellite instability and BRAF mutation testing in colorectal cancer prognostication." J Natl Cancer Inst **105**(15): 1151-1156.

Lock, R., C. M. Kenific, A. M. Leidal, E. Salas and J. Debnath (2014). "Autophagy-dependent production of secreted factors facilitates oncogenic RAS-driven invasion." Cancer Discov **4**(4): 466-479.

Lock, R., S. Roy, C. M. Kenific, J. S. Su, E. Salas, S. M. Ronen and J. Debnath (2011). "Autophagy facilitates glycolysis during Ras-mediated oncogenic transformation." Mol Biol Cell **22**(2): 165-178.

Locksley, R. M., N. Killeen and M. J. Lenardo (2001). "The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology." Cell **104**(4): 487-501.

Lozzio, C. B. and B. B. Lozzio (1975). "Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome." Blood **45**(3): 321-334.

Lu, Q. and R. F. Luduena (1993). "Removal of beta III isotype enhances taxol induced microtubule assembly." Cell Struct Funct **18**(3): 173-182.

Luduena, R. F. (2013). "A hypothesis on the origin and evolution of tubulin." Int Rev Cell Mol Biol **302**: 41-185.

Luduena, R. F. and M. C. Roach (1991). "Tubulin sulfhydryl groups as probes and targets for antimitotic and antimicrotubule agents." Pharmacol Ther **49**(1-2): 133-152.

Malumbres, M. and M. Barbacid (2001). "To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer." Nat Rev Cancer **1**(3): 222-231.

Malumbres, M. and M. Barbacid (2003). "RAS oncogenes: the first 30 years." Nat Rev Cancer **3**(6): 459-465.

Malumbres, M. and M. Barbacid (2005). "Mammalian cyclin-dependent kinases." Trends Biochem Sci **30**(11): 630-641.

Malumbres, M. and M. Barbacid (2009). "Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm." Nat Rev Cancer **9**(3): 153-166.

Mandelkow, E. and E. M. Mandelkow (1995). "Microtubules and microtubule-associated proteins." Curr Opin Cell Biol **7**(1): 72-81.

Mantovani, A., P. Allavena, A. Sica and F. Balkwill (2008). "Cancer-related inflammation." Nature **454**(7203): 436-444.

Margolis, R. L. and L. Wilson (1998). "Microtubule treadmilling: what goes around comes around." Bioessays **20**(10): 830-836.

Marino, G., N. Salvador-Montoliu, A. Fueyo, E. Knecht, N. Mizushima and C. Lopez-Otin (2007). "Tissue-specific autophagy alterations and increased tumorigenesis in mice deficient in Atg4C/autophagin-3." J Biol Chem **282**(25): 18573-18583.

Matesanz, R., I. Barasoain, C. G. Yang, L. Wang, X. Li, C. de Ines, C. Coderch, F. Gago, J. J. Barbero, J. M. Andreu, W. S. Fang and J. F. Diaz (2008). "Optimization of taxane binding to microtubules: binding affinity dissection and incremental construction of a high-affinity analog of paclitaxel." Chem Biol **15**(6): 573-585.

Mathew, R., V. Karantza-Wadsworth and E. White (2007). "Role of autophagy in cancer." Nat Rev Cancer **7**(12): 961-967.

Mathew, R., C. M. Karp, B. Beaudoin, N. Vuong, G. Chen, H. Y. Chen, K. Bray, A. Reddy, G. Bhanot, C. Gelinas, R. S. Dipaola, V. Karantza-Wadsworth and E. White (2009). "Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62." Cell **137**(6): 1062-1075.

Mathew, R., S. Kongara, B. Beaudoin, C. M. Karp, K. Bray, K. Degenhardt, G. Chen, S. Jin and E. White (2007). "Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability." Genes Dev **21**(11): 1367-1381.

Matsumoto, G., K. Wada, M. Okuno, M. Kurosawa and N. Nukina (2011). "Serine 403 phosphorylation of p62/SQSTM1 regulates selective autophagic clearance of ubiquitinated proteins." Mol Cell **44**(2): 279-289.

McCarroll, J. A., G. Sharbeen, J. Liu, J. Youkhana, D. Goldstein, N. McCarthy, L. F. Limbri, D. Dischl, G. O. Ceyhan, M. Erkan, A. L. Johns, A. V. Biankin, M. Kavallaris and P. A. Phillips (2015). "betaIII-tubulin: a novel mediator of chemoresistance and metastases in pancreatic cancer." Oncotarget **6**(4): 2235-2249.

McCarthy, D. J. and G. K. Smyth (2009). "Testing significance relative to a fold-change threshold is a TREAT." Bioinformatics **25**(6): 765-771.

Miyata, T. (2007). "Pharmacological basis of traditional medicines and health supplements as curatives." J Pharmacol Sci **103**(2): 127-131.

Mizushima, N., T. Yoshimori and B. Levine (2010). "Methods in mammalian autophagy research." Cell **140**(3): 313-326.

Moreno, V. and R. Sanz-Pamplona (2015). "Altered pathways and colorectal cancer prognosis." BMC Med **13**: 76.

Morris, P. G. and M. N. Fornier (2008). "Microtubule active agents: beyond the taxane frontier." Clin Cancer Res **14**(22): 7167-7172.

Mozzetti, S., C. Ferlini, P. Concolino, F. Filippetti, G. Raspaglio, S. Prislei, D. Gallo, E. Martinelli, F. O. Ranelletti, G. Ferrandina and G. Scambia (2005). "Class III beta-tubulin overexpression is a prominent mechanism of paclitaxel resistance in ovarian cancer patients." Clin Cancer Res **11**(1): 298-305.

Munchberg, U., A. Anwar, S. Mecklenburg and C. Jacob (2007). "Polysulfides as biologically active ingredients of garlic." Org Biomol Chem **5**(10): 1505-1518.

Murata, S., H. Yashiroda and K. Tanaka (2009). "Molecular mechanisms of proteasome assembly." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(2): 104-115.

Na, H. K., E. H. Kim, M. A. Choi, J. M. Park, D. H. Kim and Y. J. Surh (2012). "Diallyl trisulfide induces apoptosis in human breast cancer cells through ROS-mediated activation of JNK and AP-1." Biochem Pharmacol **84**(10): 1241-1250.

Nagaraj, N. S., K. R. Anilakumar and O. V. Singh (2010). "Diallyl disulfide causes caspase-dependent apoptosis in human cancer cells through a Bax-triggered mitochondrial pathway." J Nutr Biochem **21**(5): 405-412.

Nagata, S., H. Nagase, K. Kawane, N. Mukae and H. Fukuyama (2003). "Degradation of chromosomal DNA during apoptosis." Cell Death Differ **10**(1): 108-116.

Narisawa, T., Y. Fukaura, M. Hasebe, M. Ito, R. Aizawa, M. Murakoshi, S. Uemura, F. Khachik and H. Nishino (1996). "Inhibitory effects of natural carotenoids, alpha-carotene, beta-carotene, lycopene and lutein, on colonic aberrant crypt foci formation in rats." Cancer Lett **107**(1): 137-142.

Neumann, J., E. Zeindl-Eberhart, T. Kirchner and A. Jung (2009). "Frequency and type of KRAS mutations in routine diagnostic analysis of metastatic colorectal cancer." Pathol Res Pract **205**(12): 858-862.

Nezis, I. P., A. Simonsen, A. P. Sagona, K. Finley, S. Gaumer, D. Contamine, T. E. Rusten, H. Stenmark and A. Brech (2008). "Ref(2)P, the Drosophila melanogaster homologue of mammalian p62, is required for the formation of protein aggregates in adult brain." J Cell Biol **180**(6): 1065-1071.

Nicolaou, K. C., J. S. Chen and S. M. Dalby (2009). "From nature to the laboratory and into the clinic." Bioorg Med Chem **17**(6): 2290-2303.

Nieto, M. A., R. Y. Huang, R. A. Jackson and J. P. Thiery (2016). "Emt: 2016." Cell **166**(1): 21-45.

Nogales, E. (2000). "Structural insights into microtubule function." Annu Rev Biochem **69**: 277-302.

Ohhara, Y., N. Fukuda, S. Takeuchi, R. Honma, Y. Shimizu, I. Kinoshita and H. Dosaka-Akita (2016). "Role of targeted therapy in metastatic colorectal cancer." World J Gastrointest Oncol **8**(9): 642-655.

Oren, M. and E. Kotler (2016). "p53 mutations promote proteasomal activity." Nat Cell Biol **18**(8): 833-835.

Panda, D., H. P. Miller, A. Banerjee, R. F. Luduena and L. Wilson (1994). "Microtubule dynamics in vitro are regulated by the tubulin isotype composition." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(24): 11358-11362.

Pandey, U. B., Z. Nie, Y. Batlevi, B. A. McCray, G. P. Ritson, N. B. Nedelsky, S. L. Schwartz, N. A. DiProspero, M. A. Knight, O. Schuldiner, R. Padmanabhan, M. Hild, D. L. Berry, D. Garza, C. C. Hubbert, T. P. Yao, E. H. Baehrecke and J. P. Taylor (2007). "HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS." Nature **447**(7146): 859-863.

Pankiv, S., T. H. Clausen, T. Lamark, A. Brech, J. A. Bruun, H. Outzen, A. Overvatn, G. Bjorkoy and T. Johansen (2007). "p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy." J Biol Chem **282**(33): 24131-24145.

Paradiso, A., A. Mangia, A. Chiriatti, S. Tommasi, A. Zito, A. Latorre, F. Schittulli and V. Lorusso (2005). "Biomarkers predictive for clinical efficacy of taxol-based chemotherapy in advanced breast cancer." Ann Oncol **16 Suppl 4**: iv14-19.

Parker, A. L., M. Kavallaris and J. A. McCarroll (2014). "Microtubules and their role in cellular stress in cancer." Front Oncol **4**: 153.

Patel, K. R., V. A. Brown, D. J. Jones, R. G. Britton, D. Hemingway, A. S. Miller, K. P. West, T. D. Booth, M. Perloff, J. A. Crowell, D. E. Brenner, W. P. Steward, A. J. Gescher and K. Brown (2010). "Clinical pharmacology of resveratrol and its metabolites in colorectal cancer patients." Cancer Res **70**(19): 7392-7399.

Paul, S., A. K. Kashyap, W. Jia, Y. W. He and B. C. Schaefer (2012). "Selective autophagy of the adaptor protein Bcl10 modulates T cell receptor activation of NF-kappaB." Immunity **36**(6): 947-958.

Pazdur, R., Y. Lassere, L. T. Soh, J. A. Ajani, B. Bready, E. Soo, S. Sugarman, Y. Patt, J. L. Abbruzzese and B. Levin (1994). "Phase II trial of docetaxel (Taxotere) in metastatic colorectal carcinoma." Ann Oncol **5**(5): 468-470.

Phipps, A. I., D. D. Buchanan, K. W. Makar, A. K. Win, J. A. Baron, N. M. Lindor, J. D. Potter and P. A. Newcomb (2013). "KRAS-mutation status in relation to colorectal cancer survival: the joint impact of correlated tumour markers." Br J Cancer **108**(8): 1757-1764.

Polakis, P. (2007). "The many ways of Wnt in cancer." Curr Opin Genet Dev **17**(1): 45-51.

Polakis, P. (2012). "Wnt signaling in cancer." Cold Spring Harb Perspect Biol **4**(5).

Powell, S., A. Kaizer, J. S. Koopmeiners, C. Iwamoto and M. Klein (2014). "High expression of class III beta-tubulin in small cell lung carcinoma." Oncol Lett **7**(2): 405-410.

Prahallad, A., C. Sun, S. Huang, F. Di Nicolantonio, R. Salazar, D. Zecchin, R. L. Beijersbergen, A. Bardelli and R. Bernards (2012). "Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E) inhibition through feedback activation of EGFR." Nature **483**(7387): 100-103.

Prasad, S., A. K. Tyagi and B. B. Aggarwal (2014). "Recent developments in delivery, bioavailability, absorption and metabolism of curcumin: the golden pigment from golden spice." Cancer Res Treat **46**(1): 2-18.

Puissant, A., G. Robert, N. Fenouille, F. Luciano, J. P. Cassuto, S. Raynaud and P. Auberger (2010). "Resveratrol promotes autophagic cell death in chronic myelogenous leukemia cells via JNK-mediated p62/SQSTM1 expression and AMPK activation." Cancer Res **70**(3): 1042-1052.

Qu, X., J. Yu, G. Bhagat, N. Furuya, H. Hibshoosh, A. Troxel, J. Rosen, E. L. Eskelinen, N. Mizushima, Y. Ohsumi, G. Cattoretti and B. Levine (2003). "Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene." J Clin Invest **112**(12): 1809-1820.

Raff, E. C., J. D. Fackenthal, J. A. Hutchens, H. D. Hoyle and F. R. Turner (1997). "Microtubule architecture specified by a beta-tubulin isoform." Science **275**(5296): 70-73.

Rajagopalan, H., A. Bardelli, C. Lengauer, K. W. Kinzler, B. Vogelstein and V. E. Velculescu (2002). "Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status." Nature **418**(6901): 934.

Rajamanickam, S. and R. Agarwal (2008). "Natural products and colon cancer: current status and future prospects." Drug Dev Res **69**(7): 460-471.

Ramakrishnan, S., T. M. Nguyen, I. V. Subramanian and A. Kelekar (2007). "Autophagy and angiogenesis inhibition." Autophagy **3**(5): 512-515.

Reiman, T., R. Lai, A. S. Veillard, E. Paris, J. C. Soria, R. Rosell, M. Taron, S. Graziano, R. Kratzke, L. Seymour, F. A. Shepherd, J. P. Pignon, P. Seve and L. A.-B. Group (2012). "Cross-validation study of class III beta-tubulin as a predictive marker for benefit from adjuvant chemotherapy in resected non-small-cell lung cancer: analysis of four randomized trials." Ann Oncol **23**(1): 86-93.

Reuter, S., S. C. Gupta, M. M. Chaturvedi and B. B. Aggarwal (2010). "Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?" Free Radic Biol Med **49**(11): 1603-1616.

Ritchie, M. E., B. Phipson, D. Wu, Y. Hu, C. W. Law, W. Shi and G. K. Smyth (2015). "limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies." Nucleic Acids Res **43**(7): e47.

Rodriguez-Viciano, P., P. H. Warne, R. Dhand, B. Vanhaesebroeck, I. Gout, M. J. Fry, M. D. Waterfield and J. Downward (1994). "Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras." Nature **370**(6490): 527-532.

Rolfo, C., G. Bronte, G. Sortino, K. Papadimitriou, F. Passiglia, E. Fiorentino, G. Marogy, A. Russo and M. Peeters (2014). "The role of targeted therapy for gastrointestinal tumors." Expert Rev Gastroenterol Hepatol **8**(8): 875-885.

Roque, D. M., N. Buza, M. Glasgow, S. Bellone, I. Bortolomai, S. Gasparrini, E. Cocco, E. Ratner, D. A. Silasi, M. Azodi, T. J. Rutherford, P. E. Schwartz and A. D. Santin (2014). "Class III beta-tubulin overexpression within the tumor microenvironment is a prognostic biomarker for poor overall survival in ovarian cancer patients treated with neoadjuvant carboplatin/paclitaxel." Clin Exp Metastasis **31**(1): 101-110.

Rouschop, K. M., T. van den Beucken, L. Dubois, H. Niessen, J. Bussink, K. Savelkoul, T. Keulers, H. Mujcic, W. Landuyt, J. W. Voncken, P. Lambin, A. J. van der Kogel, M. Koritzinsky and B. G. Wouters (2010). "The unfolded protein response protects human tumor cells during hypoxia through regulation of the autophagy genes MAP1LC3B and ATG5." J Clin Invest **120**(1): 127-141.

Rouzier, R., R. Rajan, P. Wagner, K. R. Hess, D. L. Gold, J. Stec, M. Ayers, J. S. Ross, P. Zhang, T. A. Buchholz, H. Kuerer, M. Green, B. Arun, G. N. Hortobagyi, W. F. Symmans and L. Pusztai (2005). "Microtubule-associated protein tau: a marker of paclitaxel sensitivity in breast cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(23): 8315-8320.

Rusan, N. M., C. J. Fagerstrom, A. M. Yvon and P. Wadsworth (2001). "Cell cycle-dependent changes in microtubule dynamics in living cells expressing green fluorescent protein-alpha tubulin." Mol Biol Cell **12**(4): 971-980.

Sadanandam, A., C. A. Lyssiotis, K. Homicsko, E. A. Collisson, W. J. Gibb, S. Wullschleger, L. C. Ostos, W. A. Lannon, C. Grotzinger, M. Del Rio, B. Lhermitte, A. B. Olshen, B. Wiedenmann, L. C. Cantley, J. W. Gray and D. Hanahan (2013). "A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy." Nat Med **19**(5): 619-625.

Saeki, Y., T. Kudo, T. Sone, Y. Kikuchi, H. Yokosawa, A. Toh-e and K. Tanaka (2009). "Lysine 63-linked polyubiquitin chain may serve as a targeting signal for the 26S proteasome." EMBO J **28**(4): 359-371.

Santamaria, D., C. Barriere, A. Cerqueira, S. Hunt, C. Tardy, K. Newton, J. F. Caceres, P. Dubus, M. Malumbres and M. Barbacid (2007). "Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle." Nature **448**(7155): 811-815.

Santandreu, F. M., A. Valle, J. Oliver and P. Roca (2011). "Resveratrol potentiates the cytotoxic oxidative stress induced by chemotherapy in human colon cancer cells." Cell Physiol Biochem **28**(2): 219-228.

Sanz, L., M. T. Diaz-Meco, H. Nakano and J. Moscat (2000). "The atypical PKC-interacting protein p62 channels NF-kappaB activation by the IL-1-TRAF6 pathway." EMBO J **19**(7): 1576-1586.

Sasaki, K., N. H. Tsuno, E. Sunami, K. Kawai, K. Hongo, M. Hiyoshi, M. Kaneko, K. Muro, N. Tada, T. Nirei, K. Takahashi and J. Kitayama (2012). "Resistance of colon cancer to 5-fluorouracil may be overcome by combination with chloroquine, an in vivo study." Anticancer Drugs **23**(7): 675-682.

Sato, K., K. Tsuchihara, S. Fujii, M. Sugiyama, T. Goya, Y. Atomi, T. Ueno, A. Ochiai and H. Esumi (2007). "Autophagy is activated in colorectal cancer cells and contributes to the tolerance to nutrient deprivation." Cancer Res **67**(20): 9677-9684.

Sato, T., D. E. Stange, M. Ferrante, R. G. Vries, J. H. Van Es, S. Van den Brink, W. J. Van Houdt, A. Pronk, J. Van Gorp, P. D. Siersema and H. Clevers (2011). "Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium." Gastroenterology **141**(5): 1762-1772.

Sato, T., R. G. Vries, H. J. Snippert, M. van de Wetering, N. Barker, D. E. Stange, J. H. van Es, A. Abo, P. Kujala, P. J. Peters and H. Clevers (2009). "Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche." Nature **459**(7244): 262-265.

Scaltriti, M., P. J. Eichhorn, J. Cortes, L. Prudkin, C. Aura, J. Jimenez, S. Chandralapaty, V. Serra, A. Prat, Y. H. Ibrahim, M. Guzman, M. Gili, O. Rodriguez, S. Rodriguez, J. Perez, S. R. Green, S. Mai, N. Rosen, C. Hudis and J. Baselga (2011). "Cyclin E amplification/overexpression is a mechanism of trastuzumab resistance in HER2+ breast cancer patients." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(9): 3761-3766.

Schafer, G. and C. H. Kaschula (2014). "The immunomodulation and anti-inflammatory effects of garlic organosulfur compounds in cancer chemoprevention." Anticancer Agents Med Chem **14**(2): 233-240.

Schmidt, E. E., K. Ichimura, G. Reifenberger and V. P. Collins (1994). "CDKN2 (p16/MTS1) gene deletion or CDK4 amplification occurs in the majority of glioblastomas." Cancer Res **54**(24): 6321-6324.

Schubbert, S., K. Shannon and G. Bollag (2007). "Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer." Nat Rev Cancer **7**(4): 295-308.

Seibel, N. L., S. M. Blaney, M. O'Brien, M. Krailo, R. Hutchinson, R. B. Mosher, F. M. Balis and G. H. Reaman (1999). "Phase I trial of docetaxel with filgrastim support in pediatric patients with refractory solid tumors: a collaborative Pediatric Oncology Branch, National Cancer Institute and Children's Cancer Group trial." Clin Cancer Res **5**(4): 733-737.

Selvakumaran, M., R. K. Amaravadi, I. A. Vasilevskaya and P. J. O'Dwyer (2013). "Autophagy inhibition sensitizes colon cancer cells to antiangiogenic and cytotoxic therapy." Clin Cancer Res **19**(11): 2995-3007.

Shigemi, Z., Y. Furukawa, K. Hosokawa, S. Minami, J. Matsuhiro, S. Nakata, T. Watanabe, H. Kagawa, K. Nakagawa, H. Takeda and M. Fujimuro (2016). "Diallyl trisulfide induces apoptosis by suppressing NF-kappaB signaling through destabilization of TRAF6 in primary effusion lymphoma." Int J Oncol **48**(1): 293-304.

Shimizu, M., Y. Shirakami, H. Sakai, S. Adachi, K. Hata, Y. Hirose, H. Tsurumi, T. Tanaka and H. Moriwaki (2008). "(-)-Epigallocatechin gallate suppresses azoxymethane-induced colonic premalignant lesions in male C57BL/KsJ-db/db mice." Cancer Prev Res (Phila) **1**(4): 298-304.

Shin, D. Y., G. Y. Kim, H. J. Hwang, W. J. Kim and Y. H. Choi (2014). "Diallyl trisulfide-induced apoptosis of bladder cancer cells is caspase-dependent and regulated by PI3K/Akt and JNK pathways." Environ Toxicol Pharmacol **37**(1): 74-83.

Shin, D. Y., G. Y. Kim, J. H. Lee, B. T. Choi, Y. H. Yoo and Y. H. Choi (2012). "Apoptosis induction of human prostate carcinoma DU145 cells by diallyl disulfide via modulation of JNK and PI3K/AKT signaling pathways." Int J Mol Sci **13**(11): 14158-14171.

Siena, S., A. Sartore-Bianchi, F. Di Nicolantonio, J. Balfour and A. Bardelli (2009). "Biomarkers predicting clinical outcome of epidermal growth factor receptor-targeted therapy in metastatic colorectal cancer." J Natl Cancer Inst **101**(19): 1308-1324.

Singh, C. K., J. George and N. Ahmad (2013). "Resveratrol-based combinatorial strategies for cancer management." Ann N Y Acad Sci **1290**: 113-121.

Sirajuddin, M., L. M. Rice and R. D. Vale (2014). "Regulation of microtubule motors by tubulin isotypes and post-translational modifications." Nat Cell Biol **16**(4): 335-344.

Smoter, M., L. Bodnar, B. Grala, R. Stec, K. Zieniuk, W. Kozlowski and C. Szczylik (2013). "Tau protein as a potential predictive marker in epithelial ovarian cancer patients treated with paclitaxel/platinum first-line chemotherapy." J Exp Clin Cancer Res **32**: 25.

Sparreboom, A., J. van Asperen, U. Mayer, A. H. Schinkel, J. W. Smit, D. K. Meijer, P. Borst, W. J. Nooijen, J. H. Beijnen and O. van Tellingen (1997). "Limited oral bioavailability

and active epithelial excretion of paclitaxel (Taxol) caused by P-glycoprotein in the intestine." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(5): 2031-2035.

Spitzner, M., G. Emons, F. Kramer, J. Gaedcke, M. Rave-Frank, J. G. Scharf, P. Burfeind, H. Becker, T. Beissbarth, B. M. Ghadimi, T. Ried and M. Grade (2010). "A gene expression signature for chemoradiosensitivity of colorectal cancer cells." Int J Radiat Oncol Biol Phys **78**(4): 1184-1192.

Sriram, N., S. Kalayarasan, P. Ashokkumar, A. Sureshkumar and G. Sudhandiran (2008). "Diallyl sulfide induces apoptosis in Colo 320 DM human colon cancer cells: involvement of caspase-3, NF-kappaB, and ERK-2." Mol Cell Biochem **311**(1-2): 157-165.

Srivastava, R. K., Q. S. Mi, J. M. Hardwick and D. L. Longo (1999). "Deletion of the loop region of Bcl-2 completely blocks paclitaxel-induced apoptosis." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(7): 3775-3780.

Stanton, R. A., K. M. Gernert, J. H. Nettles and R. Aneja (2011). "Drugs that target dynamic microtubules: a new molecular perspective." Med Res Rev **31**(3): 443-481.

Stintzing, S. (2014). "Management of colorectal cancer." F1000Prime Rep **6**: 108.

Sui, X., R. Chen, Z. Wang, Z. Huang, N. Kong, M. Zhang, W. Han, F. Lou, J. Yang, Q. Zhang, X. Wang, C. He and H. Pan (2013). "Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment." Cell Death Dis **4**: e838.

Sun, B. O., Y. Fang, Z. Li, Z. Chen and J. Xiang (2015). "Role of cellular cytoskeleton in epithelial-mesenchymal transition process during cancer progression." Biomed Rep **3**(5): 603-610.

Sundstrom, C. and K. Nilsson (1976). "Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937)." Int J Cancer **17**(5): 565-577.

Suzuki, Y., Y. Imai, H. Nakayama, K. Takahashi, K. Takio and R. Takahashi (2001). "A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death." Mol Cell **8**(3): 613-621.

Swanton, C., I. Tomlinson and J. Downward (2006). "Chromosomal instability, colorectal cancer and taxane resistance." Cell Cycle **5**(8): 818-823.

Taguchi, K., H. Motohashi and M. Yamamoto (2011). "Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution." Genes Cells **16**(2): 123-140.

Takamura, A., M. Komatsu, T. Hara, A. Sakamoto, C. Kishi, S. Waguri, Y. Eishi, O. Hino, K. Tanaka and N. Mizushima (2011). "Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors." Genes Dev **25**(8): 795-800.

Takayama, T., K. Miyanishi, T. Hayashi, Y. Sato and Y. Niitsu (2006). "Colorectal cancer: genetics of development and metastasis." J Gastroenterol **41**(3): 185-192.

Team, R. C. (2014). A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria, R Foundation for Statistical Computing.

Terrano, D. T., M. Upreti and T. C. Chambers (2010). "Cyclin-dependent kinase 1-mediated Bcl-xL/Bcl-2 phosphorylation acts as a functional link coupling mitotic arrest and apoptosis." Mol Cell Biol **30**(3): 640-656.

Therneau, T. M. (2015). A Package for Survival Analysis in S.

Thiel, A. and A. Ristimaki (2013). "Toward a Molecular Classification of Colorectal Cancer: The Role of BRAF." Front Oncol **3**: 281.

Tobin, N. P., T. Foukakis, L. De Petris and J. Bergh (2015). "The importance of molecular markers for diagnosis and selection of targeted treatments in patients with cancer." J Intern Med.

Tommasi, S., A. Mangia, R. Lacalamita, A. Bellizzi, V. Fedele, A. Chiriatti, C. Thomssen, N. Kendzierski, A. Latorre, V. Lorusso, F. Schittulli, F. Zito, M. Kavallaris and A. Paradiso (2007). "Cytoskeleton and paclitaxel sensitivity in breast cancer: the role of beta-tubulins." Int J Cancer **120**(10): 2078-2085.

Tong, D., H. Qu, X. Meng, Y. Jiang, D. Liu, S. Ye, H. Chen, Y. Jin, S. Fu and J. Geng (2014). "S-allylmercaptocysteine promotes MAPK inhibitor-induced apoptosis by activating the TGF-beta signaling pathway in cancer cells." Oncol Rep **32**(3): 1124-1132.

Toyota, M., N. Ahuja, M. Ohe-Toyota, J. G. Herman, S. B. Baylin and J. P. Issa (1999). "CpG island methylator phenotype in colorectal cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(15): 8681-8686.

Tsujimoto, Y., L. R. Finger, J. Yunis, P. C. Nowell and C. M. Croce (1984). "Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation." Science **226**(4678): 1097-1099.

Tsvetkov, P., N. Reuven and Y. Shaul (2010). "Ubiquitin-independent p53 proteasomal degradation." Cell Death Differ **17**(1): 103-108.

Turati, F., V. Guercio, C. Pelucchi, C. La Vecchia and C. Galeone (2014). "Colorectal cancer and adenomatous polyps in relation to allium vegetables intake: a meta-analysis of observational studies." Mol Nutr Food Res **58**(9): 1907-1914.

Umemura, A., F. He, K. Taniguchi, H. Nakagawa, S. Yamachika, J. Font-Burgada, Z. Zhong, S. Subramaniam, S. Raghunandan, A. Duran, J. F. Linares, M. Reina-Campos, S. Umemura, M. A. Valasek, E. Seki, K. Yamaguchi, K. Koike, Y. Itoh, M. T. Diaz-Meco, J. Moscat and

M. Karin (2016). "p62, Upregulated during Preneoplasia, Induces Hepatocellular Carcinogenesis by Maintaining Survival of Stressed HCC-Initiating Cells." Cancer Cell **29**(6): 935-948.

Upreti, M., E. N. Galitovskaya, R. Chu, A. J. Tackett, D. T. Terrano, S. Granell and T. C. Chambers (2008). "Identification of the major phosphorylation site in Bcl-xL induced by microtubule inhibitors and analysis of its functional significance." J Biol Chem **283**(51): 35517-35525.

Urano, N., Y. Fujiwara, Y. Doki, S. J. Kim, Y. Miyoshi, S. Noguchi, H. Miyata, S. Takiguchi, T. Yasuda, M. Yano and M. Monden (2006). "Clinical significance of class III beta-tubulin expression and its predictive value for resistance to docetaxel-based chemotherapy in gastric cancer." Int J Oncol **28**(2): 375-381.

Vadlamudi, R. K., I. Joung, J. L. Strominger and J. Shin (1996). "p62, a phosphotyrosine-independent ligand of the SH2 domain of p56lck, belongs to a new class of ubiquitin-binding proteins." J Biol Chem **271**(34): 20235-20237.

Vadlamudi, R. K. and J. Shin (1998). "Genomic structure and promoter analysis of the p62 gene encoding a non-proteasomal multiubiquitin chain binding protein." FEBS Lett **435**(2-3): 138-142.

Vainio, H. and E. Weiderpass (2006). "Fruit and vegetables in cancer prevention." Nutr Cancer **54**(1): 111-142.

Valencia, T., J. Y. Kim, S. Abu-Baker, J. Moscat-Pardos, C. S. Ahn, M. Reina-Campos, A. Duran, E. A. Castilla, C. M. Metallo, M. T. Diaz-Meco and J. Moscat (2014). "Metabolic reprogramming of stromal fibroblasts through p62-mTORC1 signaling promotes inflammation and tumorigenesis." Cancer Cell **26**(1): 121-135.

Van Cutsem, E., C. H. Kohne, I. Lang, G. Folprecht, M. P. Nowacki, S. Cascinu, I. Shchepotin, J. Maurel, D. Cunningham, S. Tejpar, M. Schlichting, A. Zubel, I. Celik, P. Rougier and F. Ciardiello (2011). "Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status." J Clin Oncol **29**(15): 2011-2019.

Veitia, R., S. David, P. Barbier, M. Vantard, P. Gounon, M. C. Bissery and A. Fellous (2000). "Proteolysis of microtubule associated protein 2 and sensitivity of pancreatic tumours to docetaxel." Br J Cancer **83**(4): 544-549.

Venancio, V. P., P. A. Cipriano, H. Kim, L. M. Antunes, S. T. Talcott and S. U. Mertens-Talcott (2017). "Cocoplum (*Chrysobalanus icaco* L.) anthocyanins exert anti-inflammatory activity in human colon cancer and non-malignant colon cells." Food Funct **8**(1): 307-314.

Venanzi, F., V. Shifrin, M. Sherman, V. Gabai, O. Kiselev, A. Komissarov, M. Grudin, M. Shartukova, E. A. Romanovskaya-Romanko, Y. Kudryavets, N. Bezdenezhnykh, O. Lykhova, N. Semesyuk, A. Concetti, A. Tsyb, M. Filimonova, V. Makarchuk, R. Yakubovsky, A. Chursov, V. Shcherbinina and A. Shneider (2013). "Broad-spectrum anti-tumor and anti-metastatic DNA vaccine based on p62-encoding vector." *Oncotarget* **4**(10): 1829-1835.

Verhagen, A. M., P. G. Ekert, M. Pakusch, J. Silke, L. M. Connolly, G. E. Reid, R. L. Moritz, R. J. Simpson and D. L. Vaux (2000). "Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins." *Cell* **102**(1): 43-53.

Viale, A., P. Pettazoni, C. A. Lyssiotis, H. Ying, N. Sanchez, M. Marchesini, A. Carugo, T. Green, S. Seth, V. Giuliani, M. Kost-Alimova, F. Muller, S. Colla, L. Nezi, G. Genovese, A. K. Deem, A. Kapoor, W. Yao, E. Brunetto, Y. Kang, M. Yuan, J. M. Asara, Y. A. Wang, T. P. Heffernan, A. C. Kimmelman, H. Wang, J. B. Fleming, L. C. Cantley, R. A. DePinho and G. F. Draetta (2014). "Oncogene ablation-resistant pancreatic cancer cells depend on mitochondrial function." *Nature* **514**(7524): 628-632.

Vogelstein, B., E. R. Fearon, S. R. Hamilton, S. E. Kern, A. C. Preisinger, M. Leppert, Y. Nakamura, R. White, A. M. Smits and J. L. Bos (1988). "Genetic alterations during colorectal-tumor development." *N Engl J Med* **319**(9): 525-532.

Voutsadakis, I. A. (2008). "The ubiquitin-proteasome system in colorectal cancer." *Biochim Biophys Acta* **1782**(12): 800-808.

Walker, R. A., E. T. O'Brien, N. K. Pryer, M. F. Soboeiro, W. A. Voter, H. P. Erickson and E. D. Salmon (1988). "Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants and transition frequencies." *J Cell Biol* **107**(4): 1437-1448.

Wang, H., T. O. Khor, L. Shu, Z. Y. Su, F. Fuentes, J. H. Lee and A. N. Kong (2012). "Plants vs. cancer: a review on natural phytochemicals in preventing and treating cancers and their druggability." *Anticancer Agents Med Chem* **12**(10): 1281-1305.

Wang, W., P. C. VanAlstyne, K. A. Irons, S. Chen, J. W. Stewart and D. F. Birt (2004). "Individual and interactive effects of apigenin analogs on G2/M cell-cycle arrest in human colon carcinoma cell lines." *Nutr Cancer* **48**(1): 106-114.

Wang, X. J., J. Yu, S. H. Wong, A. S. Cheng, F. K. Chan, S. S. Ng, C. H. Cho, J. J. Sung and W. K. Wu (2013). "A novel crosstalk between two major protein degradation systems: regulation of proteasomal activity by autophagy." *Autophagy* **9**(10): 1500-1508.

- Wang, Y., Z. Sun, S. Chen, Y. Jiao and C. Bai (2015). "ROS-mediated activation of JNK/p38 contributes partially to the pro-apoptotic effect of ajoene on cells of lung adenocarcinoma." Tumour Biol.
- Wang, Y. B., J. Qin, X. Y. Zheng, Y. Bai, K. Yang and L. P. Xie (2010). "Diallyl trisulfide induces Bcl-2 and caspase-3-dependent apoptosis via downregulation of Akt phosphorylation in human T24 bladder cancer cells." Phytomedicine **17**(5): 363-368.
- Wei, H., C. Wang, C. M. Croce and J. L. Guan (2014). "p62/SQSTM1 synergizes with autophagy for tumor growth in vivo." Genes Dev **28**(11): 1204-1216.
- Wei, Y., S. Pattingre, S. Sinha, M. Bassik and B. Levine (2008). "JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy." Mol Cell **30**(6): 678-688.
- Wei, Y., L. Yu, J. Bowen, M. A. Gorovsky and C. D. Allis (1999). "Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation." Cell **97**(1): 99-109.
- Weiss, L. and T. Efferth (2012). "Polo-like kinase 1 as target for cancer therapy." Exp Hematol Oncol **1**(1): 38.
- Wilson, C. and C. Gonzalez-Billault (2015). "Regulation of cytoskeletal dynamics by redox signaling and oxidative stress: implications for neuronal development and trafficking." Front Cell Neurosci **9**: 381.
- Wilson, M. I., D. J. Gill, O. Perisic, M. T. Quinn and R. L. Williams (2003). "PB1 domain-mediated heterodimerization in NADPH oxidase and signaling complexes of atypical protein kinase C with Par6 and p62." Mol Cell **12**(1): 39-50.
- Wolfel, T., M. Hauer, J. Schneider, M. Serrano, C. Wolfel, E. Klehmann-Hieb, E. De Plaen, T. Hankeln, K. H. Meyer zum Buschenfelde and D. Beach (1995). "A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma." Science **269**(5228): 1281-1284.
- Wong, R. S. (2011). "Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment." J Exp Clin Cancer Res **30**: 87.
- Wu, W., X. Wang, W. Zhang, W. Reed, J. M. Samet, Y. E. Whang and A. J. Ghio (2003). "Zinc-induced PTEN protein degradation through the proteasome pathway in human airway epithelial cells." J Biol Chem **278**(30): 28258-28263.
- Wu, X. J., F. Kassie and V. Mersch-Sundermann (2005). "The role of reactive oxygen species (ROS) production on diallyl disulfide (DADS) induced apoptosis and cell cycle arrest in human A549 lung carcinoma cells." Mutat Res **579**(1-2): 115-124.

Xiao, D., A. Herman-Antosiewicz, J. Antosiewicz, H. Xiao, M. Brisson, J. S. Lazo and S. V. Singh (2005). "Diallyl trisulfide-induced G(2)-M phase cell cycle arrest in human prostate cancer cells is caused by reactive oxygen species-dependent destruction and hyperphosphorylation of Cdc 25 C." Oncogene **24**(41): 6256-6268.

Xiao, D., Y. Zeng and S. V. Singh (2009). "Diallyl trisulfide-induced apoptosis in human cancer cells is linked to checkpoint kinase 1-mediated mitotic arrest." Mol Carcinog **48**(11): 1018-1029.

Xiao, M., Y. Tang, W. W. Chen, Y. L. Wang, L. Yang, X. Li, G. L. Song and J. Kuang (2016). "Tubb3 regulation by the Erk and Akt signaling pathways: a mechanism involved in the effect of arginine ADP-ribosyltransferase 1 (Art1) on apoptosis of colon carcinoma CT26 cells." Tumour Biol **37**(2): 2353-2363.

Xu, J. and L. Attisano (2000). "Mutations in the tumor suppressors Smad2 and Smad4 inactivate transforming growth factor beta signaling by targeting Smads to the ubiquitin-proteasome pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(9): 4820-4825.

Xu, L., J. Yu, D. Zhai, D. Zhang, W. Shen, L. Bai, Z. Cai and C. Yu (2014). "Role of JNK Activation and Mitochondrial Bax Translocation in Allicin-Induced Apoptosis in Human Ovarian Cancer SKOV3 Cells." Evid Based Complement Alternat Med **2014**: 378684.

Xu, P., D. M. Duong, N. T. Seyfried, D. Cheng, Y. Xie, J. Robert, J. Rush, M. Hochstrasser, D. Finley and J. Peng (2009). "Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation." Cell **137**(1): 133-145.

Xu, X. H., G. L. Li, B. A. Wang, Y. Qin, S. R. Bai, J. Rong, T. Deng and Q. Li (2015). "Diallyl trisulfide protects against oxygen glucose deprivation -induced apoptosis by scavenging free radicals via the PI3K/Akt -mediated Nrf2/HO-1 signaling pathway in B35 neural cells." Brain Res **1614**: 38-50.

Yagdi, E., C. Cerella, M. Dicato and M. Diederich (2016). "Garlic-derived natural polysulfanes as hydrogen sulfide donors: Friend or foe?" Food Chem Toxicol **95**: 219-233.

Yan, M., C. Wang, B. He, M. Yang, M. Tong, Z. Long, B. Liu, F. Peng, L. Xu, Y. Zhang, D. Liang, H. Lei, S. Subrata, K. W. Kelley, E. W. Lam, B. Jin and Q. Liu (2016). "Aurora-A Kinase: A Potent Oncogene and Target for Cancer Therapy." Med Res Rev **36**(6): 1036-1079.

Yin, X., J. Zhang, X. Li, D. Liu, C. Feng, R. Liang, K. Zhuang, C. Cai, X. Xue, F. Jing, X. Wang, J. Wang, X. Liu and H. Ma (2014). "DADS suppresses human esophageal xenograft tumors through RAF/MEK/ERK and mitochondria-dependent pathways." Int J Mol Sci **15**(7): 12422-12441.

Yin, X., R. Zhang, C. Feng, J. Zhang, D. Liu, K. Xu, X. Wang, S. Zhang, Z. Li, X. Liu and H. Ma (2014). "Diallyl disulfide induces G2/M arrest and promotes apoptosis through the p53/p21 and MEK-ERK pathways in human esophageal squamous cell carcinoma." Oncol Rep **32**(4): 1748-1756.

Yip, K. W. and J. C. Reed (2008). "Bcl-2 family proteins and cancer." Oncogene **27**(50): 6398-6406.

Young, A. R., M. Narita, M. Ferreira, K. Kirschner, M. Sadaie, J. F. Darot, S. Tavares, S. Arakawa, S. Shimizu, F. M. Watt and M. Narita (2009). "Autophagy mediates the mitotic senescence transition." Genes Dev **23**(7): 798-803.

Yuan, H. X., R. C. Russell and K. L. Guan (2013). "Regulation of PIK3C3/VPS34 complexes by MTOR in nutrient stress-induced autophagy." Autophagy **9**(12): 1983-1995.

Yuan, Z. X., X. Y. Wang, Q. Y. Qin, D. F. Chen, Q. H. Zhong, L. Wang and J. P. Wang (2013). "The prognostic role of BRAF mutation in metastatic colorectal cancer receiving anti-EGFR monoclonal antibodies: a meta-analysis." PLoS One **8**(6): e65995.

Yvon, A. M., P. Wadsworth and M. A. Jordan (1999). "Taxol suppresses dynamics of individual microtubules in living human tumor cells." Mol Biol Cell **10**(4): 947-959.

Zeng, R. X., Y. B. Zhang, Y. Fan and G. L. Wu (2014). "p62/SQSTM1 is involved in caspase-8 associated cell death induced by proteasome inhibitor MG132 in U87MG cells." Cell Biol Int **38**(10): 1221-1226.

Zhang, C. C., J. M. Yang, E. White, M. Murphy, A. Levine and W. N. Hait (1998). "The role of MAP4 expression in the sensitivity to paclitaxel and resistance to vinca alkaloids in p53 mutant cells." Oncogene **16**(12): 1617-1624.

Zhang, X., Y. Zhu, W. Duan, C. Feng and X. He (2015). "Allicin induces apoptosis of the MGC-803 human gastric carcinoma cell line through the p38 mitogen-activated protein kinase/caspase-3 signaling pathway." Mol Med Rep **11**(4): 2755-2760.

Zhao, X., C. Yue, J. Chen, C. Tian, D. Yang, L. Xing, H. Liu and Y. Jin (2016). "Class III beta-Tubulin in Colorectal Cancer: Tissue Distribution and Clinical Analysis of Chinese Patients." Med Sci Monit **22**: 3915-3924.

Zhong, Y., C. Krisanapun, S. H. Lee, T. Nualsanit, C. Sams, P. Peungvicha and S. J. Baek (2010). "Molecular targets of apigenin in colorectal cancer cells: involvement of p21, NAG-1 and p53." Eur J Cancer **46**(18): 3365-3374.



## Invited review

## Garlic-derived natural polysulfanes as hydrogen sulfide donors: Friend or foe?

Esma Yagdi <sup>a</sup>, Claudia Cerella <sup>a</sup>, Mario Dicato <sup>a</sup>, Marc Diederich <sup>b,\*</sup><sup>a</sup> Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer, Hôpital Kirchberg, 9, rue Edward Steichen, 2540, Luxembourg, Luxembourg<sup>b</sup> College of Pharmacy, Seoul National University, 1 Gwanak-ro, Gwanak-gu, Seoul, 08826, South Korea

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 14 May 2016

Received in revised form

13 July 2016

Accepted 14 July 2016

Available online 16 July 2016

## Keywords:

Cancer

Organosulfur compounds

Hydrogen sulfide

Anti-cancer

Biosynthesis

## ABSTRACT

*In vitro* and *in vivo* studies reported the anti-cancer potential of organosulfur compounds (OSCs) as they trigger biological effects leading to cell cycle arrest with accumulation of cells in G2/M, alteration of the microtubular network, modulation of Bcl-2 family protein expression patterns and changes of the redox status. Despite these well-described effects, no OSC derivative is yet undergoing clinical trials even though their chemistry is well understood as OSCs act as hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) donors. H<sub>2</sub>S is a biological mediator, synthesized through cysteine degradation and modulates vasodilation, cytoprotection, inflammation and angiogenesis. It is well accepted that H<sub>2</sub>S plays a biphasic pharmacological role: the inhibition of endogenous synthesis of H<sub>2</sub>S and paradoxically also the use of H<sub>2</sub>S donors to increase H<sub>2</sub>S concentration, induce both anti-cancer effects leading therefore to controversial discussions. Altogether, the role of H<sub>2</sub>S in the anti-cancer action of OSCs remains poorly understood. In this review, we hypothesize that OSCs act through H<sub>2</sub>S signaling pathways in cancer cells, and that a clearer understanding of the mechanism of action of H<sub>2</sub>S in OSC-mediated anti-cancer activity is required for further application of these compounds in translational medicine.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## Contents

|   |     |
|---|-----|
| 1. Introduction .....   | 220 |
| 2. Chemopreventive and anti-cancer role of garlic-derived organic sulfur compounds .....                                  | 221 |
| 2.1. Epidemiological evidence of anti-cancer effects .....  | 221 |
| 2.2. Effect of organic sulfur compounds on cancer hallmarks .....   | 222 |
| 2.3. In vivo effect of organic sulfur compounds .....   | 224 |
| 3. Endogenous hydrogen sulfide synthesis and pathophysiological functions .....   | 224 |
| 3.1. General properties and endogenous synthesis .....  | 224 |
| 3.2. H <sub>2</sub> S detection .....   | 225 |
| 3.3. Physiological and pathophysiological functions .....   | 225 |
| 4. Garlic-derived organic sulfur compounds act as natural hydrogen sulfide donors .....                                   | 228 |
| 5. Anti-cancer potential of garlic-derived organic sulfur compounds is limited by the dual role of hydrogen sulfide ..... | 229 |
| 6. Conclusions .....  | 229 |
| Conflicts of interest .....   | 230 |
| Acknowledgments .....   | 230 |
| Transparency document .....   | 230 |
| References .....  | 230 |

\* Corresponding author. Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Seoul National University, Building 29, Room 233, 1 Gwanak-ro, Gwanak-gu, Seoul, 08826, South Korea.

E-mail address: [marcdiederich@snu.ac.kr](mailto:marcdiederich@snu.ac.kr) (M. Diederich).

### Abbreviations

|                  |   |                   |   |
|------------------|---|-------------------|---|
| 3-MP             | 3-mercaptopyruvate                                    | MAP1LC3           | microtubule-associated protein light chain 3  |
| 3-MST            | 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase                  | MAPK              | mitogen-activated protein kinase              |
| AML              | acute myeloid leukemia                                | MEK               | MAPK/ERK kinase                               |
| AOAA             | aminoxyacetic acid                                    | MMP-9             | matrix metalloproteinase-9                    |
| Bax              | Bcl-2-associated X protein                            | MnSOD             | manganese superoxide dismutase                |
| BCA              | $\beta$ -cyano-L-alanine                              | MPST              | mercaptopyruvate sulfurtransferase            |
| Bcl-2            | B-cell lymphoma 2                                     | MRP               | multidrug resistance associated protein       |
| Bid              | BH3 interacting domain death agonist                  | NAC               | N-acetyl cysteine                             |
| CAT              | cysteine aminotransferase                             | NAHS              | sodium hydrosulfide                           |
| CBP              | CREB-binding protein                                  | NA <sub>2</sub> S | sodium sulfide                                |
| CBS              | cystathionine $\beta$ -synthase                       | NF- $\kappa$ B    | nuclear factor-kB                             |
| CDC              | cell division cycle                                   | NO                | nitric oxide                                  |
| CDK1             | cyclin-dependent kinase 1                             | Nrf2              | nuclear factor erythroid 2-related factor 2   |
| CGRP             | calcitonin gene-related protein                       | NSAIDs            | non-steroidal anti-inflammatory drugs         |
| CO               | carbon oxide  | OSCs              | organosulfur compounds                        |
| Cox-2            | cyclooxygenase-2                                      | PAG               | D,L-propargyl glycine                         |
| CSE              | cystathionine $\gamma$ -lyase                         | PARP-1            | poly(ADP-ribose) polymerase-1                 |
| Cys              | cysteine  | PERK              | protein-kinase RNA-like ER kinase             |
| DADS             | diallyl disulfide                                     | PTPB1             | protein Tyr phosphatase B1                    |
| DAS              | diallyl sulfide                                       | PI3K/AKT          | phosphatidylinositol-3-kinase/AKT             |
| DATS             | diallyl trisulfide                                    | PIP2              | phosphatidylinositol-4-5-bisphosphate         |
| DATTS            | diallyl tetrasulfide                                  | ROS               | reactive oxygen species                       |
| eiF2 $\alpha$    | eukaryotic translational initiation factor 2 $\alpha$ | SAC               | S-allylcysteine                               |
| ER               | endoplasmic reticulum                                 | SAMC              | S-allylmercaptocysteine                       |
| ERK              | extracellular signal regulated-kinase                 | SH                | thiol   |
| GAPDH            | glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase              | Snail             | zinc finger protein                           |
| GSH              | glutathione   | SNO               | S-nitrosothiol                                |
| GS-SH            | glutathione persulfide                                | SO                | sulfite oxidase                               |
| HDAC             | histone deacetylase                                   | SOD               | superoxide dismutase                          |
| H <sub>2</sub> S | hydrogen sulfide                                      | SQOR              | sulfide quinone oxidoreductase                |
| HNO              | nitroxyl  | SSH               | perthiol                                      |
| HO               | heme-oxygenase  | TGF- $\beta$      | transforming growth factor- $\beta$           |
| IGFR1            | insulin-like growth factor 1 receptor                 | TNF- $\alpha$     | tumor necrosis factor- $\alpha$               |
| Il-1,-6          | interleukin-1,-6                                      | TRAF6             | TNF receptor associated factor 6              |
| JNK              | c-Jun terminal kinase                                 | TRPA1             | receptor potential channel A1                 |
| Keap1            | Kelch ECH-associated protein 1                        | TST               | thiosulfate glutathione sulfurtransferase     |
| Kir6.1           | inwardly rectifying potassium channel 6.1             | Tyr               | tyrosine                                      |
| K <sub>v</sub> 7 | voltage-gated potassium channel 7                     | UPR               | unfolded protein response                     |
| LPS              | lipopolysaccharide                                    | VEGFR2            | vascular endothelial growth factor receptor 2 |
|                  |   | XIAP              | X-linked inhibitor of apoptosis.              |

## 1. Introduction

Dietary garlic (*Allium sativum*) exhibits numerous medicinal benefits such as reduction of cholesterol levels and has antibacterial, antifungal, antiviral, hypotensive and cardioprotective properties (Trio et al., 2014). Numerous epidemiological studies reported a correlation between garlic consumption and reduction of cancer incidence (Nicastro et al., 2015). The pharmacological activity of garlic is mainly related to the presence of active sulfur atoms in organosulfur compounds (OSCs). The main garlic OSC is **allicin (1)** that is synthesized from **alliin (2)** after release of alliinase when garlic is crushed. **Allicin (1)**, known as diallyl thiosulfinate, is rapidly metabolized in aqueous solutions into **diallyl sulfide (DAS) (3)**, **diallyl disulfide (DADS) (4)**, **diallyl trisulfide (DATS) (5)** and **ajoene (6)** (Iciek et al., 2009) (Fig. 1). These agents are among the most active compounds in garlic and were previously investigated in *in vitro* and *in vivo* studies that reported their anti-cancer potential in a wide range of cancer types (Anwar et al., 2011; Busch et al., 2010; Czepukojc et al., 2014; Filomeni et al., 2003; Kim et al., 2016; Liu et al., 2015; Wang et al., 2016a). Various biological

activities of OSCs were described and the chemistry of OSCs *in vitro* is well known; within the cell, OSCs react with thiol groups such as cysteine and glutathione (GSH) to form intracellular cysteine/glutathione (Cys/GSH) mixed disulfide-conjugates (Stuedel, 2002). Benavides et al., were the first to show that garlic-derived OSCs release hydrogen sulfide (**H<sub>2</sub>S**) which is in turn responsible for the vasoactivity of garlic in human blood cells (Benavides et al., 2007). More recently, Liang and coworkers showed that **DATS (5)** is a fast H<sub>2</sub>S donor in opposition to **DADS (4)** (Liang et al., 2015).

The emerging physiological and pathophysiological functions of **H<sub>2</sub>S** and the promising potential of OSCs to release **H<sub>2</sub>S** triggered intense research activities worldwide. Numerous studies about the role of **H<sub>2</sub>S** in cancer led to controversial conclusions that became an important limit in translational applications. In this review, we will discuss both benefits and toxicology of natural polysulfides as H<sub>2</sub>S donors. We will describe the anti-cancer and chemopreventive role of garlic-derived OSCs and discuss recent studies related to their mechanism of action. Then, we will describe **H<sub>2</sub>S** synthesis and metabolism in the human body to further discuss the role of **H<sub>2</sub>S** in cancer by highlighting the dual role of **H<sub>2</sub>S** as a major

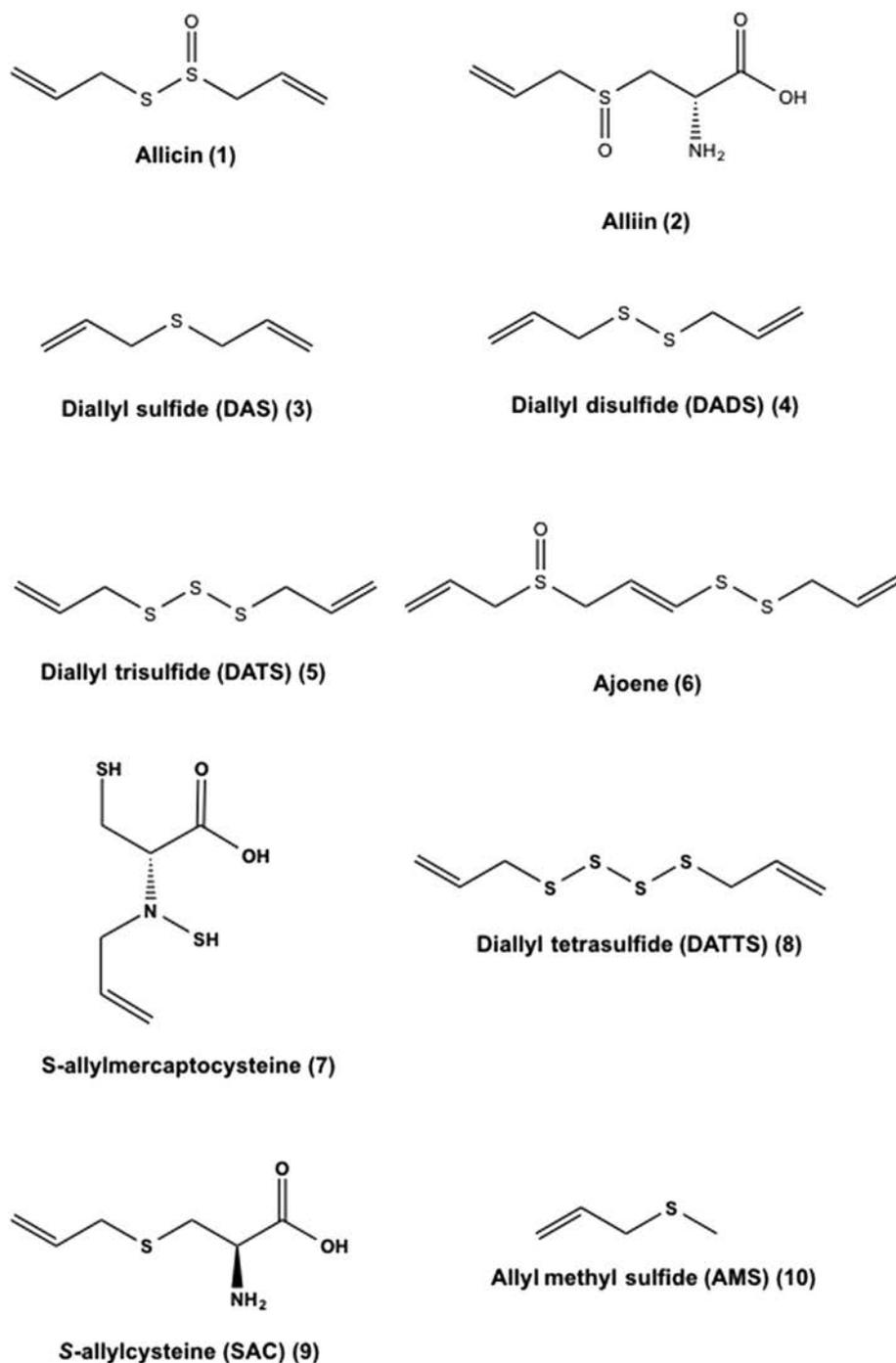


Fig. 1. Chemical structures of main OSCs.

obstacle for the pharmacological use of natural polysulfanes in cancer therapy.

## 2. Chemopreventive and anti-cancer role of garlic-derived organic sulfur compounds

### 2.1. Epidemiological evidence of anti-cancer effects

Epidemiological evidence of the chemopreventive and anti-cancer role of garlic shows an inverse correlation between regular intake of garlic and the risk of developing stomach (Gonzalez et al., 2006; Zhou et al., 2011), colon (Turati et al., 2014), breast (Challier

et al., 1998; Galeone et al., 2006), prostate (Galeone et al., 2006; Hsing et al., 2002) or lung (Myneni et al., 2016) cancer. In particular, an important number of epidemiological studies reported that a garlic-rich diet is correlated to a low risk of cancer of the gastrointestinal tract (Kodali and Eslick, 2015; Millen et al., 2007; Turati et al., 2015; Zhou et al., 2011). Most epidemiological studies are related to case-control studies documenting the inverse relationship between garlic consumption and cancer risk. Recently, an Italian case-control study and meta-analysis of 230 cancer cases and 547 controls reported a relationship between elevated garlic consumption and reduced gastric cancer risk (Turati et al., 2015). An important meta-analysis of a total of 8621 cancer patients and

14,889 controls confirmed the association of high allium vegetables consumption and a low risk of gastric cancer (Kodali and Eslick, 2015). Furthermore, a Bulgarian study on 166 patients described the protective effect of garlic consumption against large bowel polyps (Kotzev, 2012) in line with previous publications (Turati et al., 2015). The issue remains, however, controversial, as the meta-analysis of a total of 5 prospective cohort studies showed that consumption of raw and cooked garlic or even garlic supplements was not significantly associated with a reduced colorectal-cancer risk (Clancy et al., 2014; Dorant et al., 1996; McCullough et al., 2012; Meng et al., 2013; Satia et al., 2009). Moreover, several studies also show inconsistent associations for colorectal cancer and garlic supplements (Chiavarini et al., 2016; Heine-Broring et al., 2015).

## 2.2. Effect of organic sulfur compounds on cancer hallmarks

Nevertheless, extensive cell-based *in vitro* studies demonstrated that the garlic-derived OSCs trigger a wide range of cancer hallmarks. According to Hanahan and Weinberg, cancer cells acquire a limitless replicative potential due to growth signal autonomy, indifference to growth-inhibiting signals and resistance to apoptosis (Hanahan and Weinberg, 2011). Accordingly, anti-cancer therapy aims to affect these hallmarks to eventually reduce the uncontrolled proliferation of cancer cells by altering the cell division process, but also by triggering cell death or favoring immune response (Hanahan and Weinberg, 2011). In Fig. 2, we represent the anti-cancer potential of OSCs targeting cancer hallmarks based on Hanahan and Weinberg's representation with modifications.

An essential anti-cancer property of garlic-derived OSCs is associated to its ability to inhibit cell proliferation by inducing cell cycle arrest in G2/M phase (Cerella et al., 2011). For example, **S-allylmercaptocysteine (SAMC) (7)** blocked cell growth of metastatic colon cancer SW620 cells and liver HepG2 cancer cells by activation of transforming growth factor (TGF)- $\beta$  pathway (Tong

et al., 2014). In addition, **DADS (4)** inhibits cell viability by inducing cell cycle arrest in G2/M phase followed by apoptosis via caspase-3 cleavage (Yin et al., 2014b). **DADS (4)** induces mitotic arrest in G2/M phase by decreasing cyclin B1, cell division cycle (CDC)-2, and its phosphorylated form as well as CDC25C by activating the p21/p53-mediated pathway in ECA109 esophageal squamous cell carcinoma. DADS-induced cell cycle arrest is followed by apoptosis via activation of caspases, alteration of Bcl-2 (B-cell lymphoma 2)/Bax (Bcl-2-associated X protein) ratio and inhibition of mitogen-activated protein kinase (MAPK)/extracellular signal regulated-kinase (ERK) pathway (Yin et al., 2014a). Moreover, **DATS (5)** induced G2/M arrest in LNCAP prostate cancer and HCT-116 colon cancer cell lines by down-regulating CDK1, CDC25B and C leading to inactivation of CDK1 by phosphorylation of its Tyr 15 residue. **DATS (5)** exposure subsequently led to accumulation of cyclin B1 and securin, which controls metaphase-anaphase transition. Eventually, apoptotic DNA fragmentation occurred in both cell lines (Xiao et al., 2009).

Several studies described microtubules as the main target of OSCs. Microtubules are heterodimers composed of  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin subunits (Nogales, 2000). They are highly dynamic, and are constantly polymerizing and depolymerizing. They are key components of the cytoskeleton, essential for cellular integrity, intracellular trafficking, signal transduction, cell division and mitosis. Considering their important role in cell proliferation and stress response, microtubules became important targets in cancer drug development (Parker et al., 2014). Hosono et al. showed in a cell-free system that **DATS (5)** induced tubulin depolymerization although **DADS (4)** and **DAS (3)** did not show any effect on the tubulin polymerization. In DLD-1 colorectal adenocarcinoma cells, **DATS (5)** depolymerized the microtubular network organization. Peptide mass analysis revealed an oxidation of cysteine residues by **DATS (5)** at Cys-12 $\beta$  and Cys-354 $\beta$  (Hosono et al., 2005). In addition, Kelkel et al. showed that **diallyl tetrasulfide (DATTS) (8)** inhibits tubulin polymerization by using a tubulin turbidity assay. By

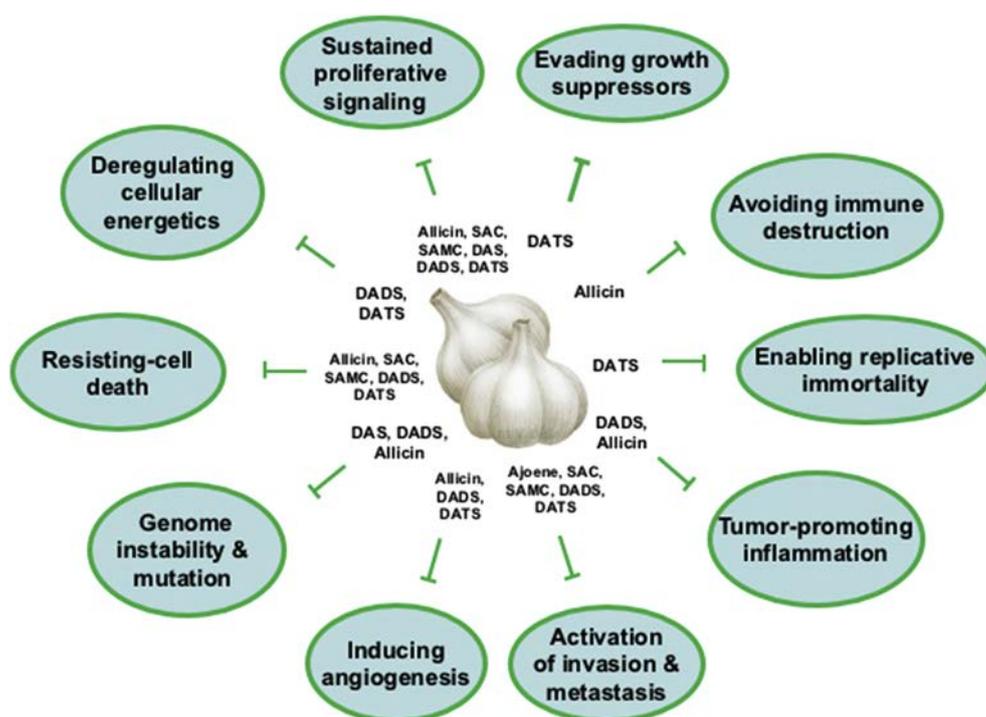


Fig. 2. Overview of anticancer potential of OSCs targeting cancer hallmarks based on Hanahan and Weinberg (Hanahan and Weinberg, 2011) with modifications. DAS: diallyl sulfide; DADS: diallyl disulfide; DATS: diallyl trisulfide; SAC: S-allylcysteine; SAMC: S-allylmercaptocysteine.

comparing the effect of poly-allyl sulfides on tubulin depolymerization, authors demonstrated that the *in vitro* inhibition of tubulin polymerization depends essentially on the number of sulfur atoms and that **DATTS (8)** had the best anticancer potential (Kelkel et al., 2012).

On the other hand, Bcl-2 family proteins are involved in the mitochondrial apoptotic pathway, and constitute therefore an attractive target in anti-cancer drug development. OSCs modulate all the three major classes of Bcl-2 family proteins. OSCs induce downregulation of the anti-apoptotic Bcl-2 protein. In acute myeloid leukemia (AML) U937 cells **DATTS (8)** reduced Bcl-2 protein expression levels concomitant with the appearance of Bcl-2 proteolysis products (Cerella et al., 2009). In addition, Shin et al. showed that **DADS (4)** markedly reduced Bcl-2 protein expression in human prostate carcinoma DU145 cells, and that the pro-apoptotic protein BH3-interacting domain (Bid) was activated triggering therefore apoptosis (Shin et al., 2012). Similarly, Wang et al. demonstrated that **DATS (5)** altered Bcl-2 family proteins through increase of Bax/Bcl-2 ratio leading to enhanced apoptosis in T24 bladder cancer cells (Wang et al., 2010e). OSCs activate Bax and Bak pro-apoptotic proteins, which are involved in mitochondrial membrane permeabilisation leading to release cytochrome c. Interestingly, **DATTS (8)** triggered conformational changes and activation of both pro-apoptotic Bcl-2 family members sequentially in U937 cells, with early activation of Bak overlapping with cytochrome c release followed by Bax activation, this latter event culminating in caspase activation (Cerella et al., 2009). These results point at a non-redundant role of Bak and Bax in **DATTS (8)**-induced cell death. OSCs also caused post-translational modification of Bcl-2 protein: Kelkel et al. showed that **DATTS (8)** induced a c-Jun N-terminal kinase (JNK)-dependent multisite phosphorylation of Bcl-2 protein in U937 cells preceding its proteolysis (Kelkel et al., 2012).

The pro-apoptotic role of garlic-derived OSCs is described in wide range of cancer cell lines (Table 1). Mitotic arrest in G2/M phase is generally followed by apoptosis. Many findings highlight kinase-dependent pathways preceding and modulating OSC-mediated apoptosis (Fig. 3). JNK activation is commonly observed in several cell models as **allicin (1)** activates this pathway in ovarian cancer cells (Xu et al., 2014), **SAMC (7)** in human colorectal cancer cells (Zhang et al., 2014b) and **DATS (5)** in human bladder cancer cells to trigger apoptosis (Shin et al., 2014). **Ajoene (6)** induces reactive oxygen species (ROS) generation *via* activation of JNK/p38 pathway thereby partially contributing to apoptosis in lung adenocarcinoma cells (Wang et al., 2016c). Other MAP kinases are also affected by OSCs. **DADS (4)** inhibits the MAPK/ERK pathway in ECA109 xenografts (Yin et al., 2014a) and in esophageal squamous cell carcinoma (Yin et al., 2014a). **DAS (3)** down-regulates the MAPK/ERK pathway in Colo 320 DM human colon cancer cells (Sriram et al., 2008). OSCs inhibit the lipid kinases too, **DADS (4)** and **DATS (5)** induce apoptosis *via* inhibition of the phosphoinositide-3 (PI3)/AKT pathway in prostate (Shin et al., 2012) and bladder cancer cells (Shin et al., 2014), respectively. More recently, the potential of **DATS (5)** to mediate apoptosis by suppressing the nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) pathway through proteasomal degradation of tumor necrosis factor (TNF) receptor associated factor 6 (TRAF6) has been reported in effusion lymphoma cells (Shigemitsu et al., 2016).

The redox balance is crucial for the cellular homeostasis and alterations of this balance lead to oxidative stress (Durackova, 2010). Compared to normal cells, tumor cells have a higher threshold for oxidative stress associated to increased ROS levels (Reuter et al., 2010). ROS promote cell survival and cell proliferation through activation of several survival pathways such as NF- $\kappa$ B,

MAPK/ERK and PI3K/AKT (Durackova, 2010). Interestingly, OSCs modulate these signaling pathways as described above. Recently, Kim et al. showed that **DATS (5)** induces anti-oxidant enzymes through nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)/Kelch-like ECH-associated protein (Keap1) pathway by targeting cysteine 288 of Keap-1 in AGS human gastric epithelial cells. The authors reported that the anti-oxidant potential of **DAS (3)**, **DADS (4)** and **DATS (5)** depends on the number of sulfur atoms and is in the order DATS > DADS > DAS (Kim et al., 2014). These results are in line with previous results of Liu et al. (Liu et al., 2006) where **DATS (5)** reduces oxidative stress through PI3/AKT-mediated Nrf2/heme oxidase (HO)-1 signaling pathway activation in B35 neural cells (Xu et al., 2015b).

In contrast pro-oxidant activities of garlic-derived OSCs were also reported (Busch et al., 2010; Das et al., 2007; Kim et al., 2007; Na et al., 2012; Wang et al., 2010a; Xiao et al., 2005). The inhibition of ROS with N-acetyl cysteine (NAC) treatment suppresses the induction of apoptosis by **ajoene (6)** showing the important role of ROS generation to induce apoptosis in lung adenocarcinoma cancer cells (Wang et al., 2016b). Similarly, **DATS (5)** induces ROS generation and apoptosis in human breast cancer cells (MCF-7 and MDA-MB-231) and overexpression of superoxide dismutase (SOD): Copper/Zinc superoxide dismutase (Cu/Zn SOD) and manganese-dependent superoxide dismutase (MnSOD) reduce ROS production by abolishing **DATS (5)**-induced apoptosis (Chandra-Kuntal et al., 2013).

Besides ROS, modulation of thiols might be an important determinant in the biological activities ascribed to OSCs, potentially contributing to explain modulation of the cellular targets mentioned above. The interaction of OSCs with thiol groups such as cysteines and GSH leads to the modification of the redox balance and induces conformational changes of several protein families including tubulin and Bcl-2 proteins, two known targets of OSCs. **DATTS (8)** does not induce ROS generation in leukemia cell models but rather a status of oxidative stress related to the decrease of the anti-oxidant GSH pool (Kelkel et al., 2012), which is *per se* essential for the modulatory role of **DATTS (8)** as well as **DATS (5)** on tubulin polymerization. The anti-oxidant thiol donor NAC reverses in turn **DATTS (8)**-induced mitotic arrest in G2/M phase as monitored by analysis of nuclear morphology and histone H3 phosphorylation in U937 leukemia cells (Kelkel et al., 2012).

Similarly, redox modulation affects conformational changes and mitochondrial translocation of Bcl-2 proteins. The oxidation of cysteine thiols has been described as one of the causative mechanisms (D'Alessio et al., 2005). This aspect implies the co-existence of essential dual modulatory mechanisms at different levels in OSC-mediated signaling pathways. Bcl-2 proteins, indeed, may be controlled by phosphorylation (e.g., *via* early kinase activation) as well as by a direct interaction and modification of cysteines by OSCs. Similarly, the early observed activation of several kinases might be in turn controlled by multiple mechanisms. For example, besides its well-known redox-dependent activation, JNK, commonly activated by OSCs as an early event, is known to physically interact with cytoskeleton components (Nagata et al., 1998). Also mechanical stress is known to activate JNK (Pereira et al., 2011). In principle, the inhibition of cytoskeleton polymerization might also play a role in OSC-dependent modulation. Such diversified modulatory mechanisms might therefore also co-exist, by working in a concerted or a mutual (and sequential?) fashion, and make the difference between an early pro-survival stress response and the late commitment to death, both promoted by OSCs.

Overall, the role of garlic-derived OSCs in redox modulation remains controversial; OSCs exhibit pro-oxidant as well as anti-

**Table 1**  
Overview of the anti-cancer effect of OSCs in cancer cell lines.

| Compound                          | Cancer cell model   | Reference                                      |
|-----------------------------------|---|--|
| Allicin (1)                       | Human neuroblastoma cells (SK-N-SH)                             | (Zhuang et al., 2016)                          |
|                                   | Human hepatocellular carcinoma cells (SK-Hep-1, BEL-7402)       | (Zou et al., 2016)                             |
|                                   | Human gastric carcinoma cell (MGC-803)                          | (Zhang et al., 2015b)                          |
|                                   | Human ovarian cancer cells (SKOV3)                              | (Xu et al., 2014)                              |
|                                   | Human glioblastoma cells (U87MG)                                | (Cha et al., 2012)                             |
| Ajoene (6)                        | Human colon cancer cells (HCT-116)                              | (Bat-Chen et al., 2010)                        |
|                                   | Human lung adenocarcinoma cells (A549, NCI-H1373, NC-H1395)     | (Wang et al., 2016b)                           |
| SAC (9)                           | Human hepatocellular carcinoma cells (MHCC97L)                  | (Ng et al., 2012)                              |
|                                   | Human prostate cancer cells (PC-3)                              | (Liu et al., 2012)                             |
| SAMC (7)                          | Colon cancer cells (SW620, SW480, Caco-2)                       | (Liang et al., 2011; Zhang et al., 2014b)      |
|                                   | Human breast cancer cells (MCF-7)                               | (Zhang et al., 2014b)                          |
|                                   | Hepatocellular carcinoma cells (HepG2)                          | (Tong et al., 2014)                            |
| DAS (3)                           | Human gastric cancer cells (SGC7901)                            | (Yan, 2014)                                    |
|                                   | Human cervical cancer cells (HeLa)                              | (Wu et al., 2011a)                             |
| DADS (4)                          | Human colon adenocarcinoma cells (Colo 320 DM)                  | (Sriram et al., 2008)                          |
|                                   | Human gastric cancer cells (SGC-7901)                           | (Wang et al., 2016a)                           |
| DATS (5)                          | Human gastric cancer cells (MGC803)                             | (Su et al., 2016)                              |
|                                   | Human cervical cancer cells (HeLa)                              | (Di et al., 2015)                              |
|                                   | Human breast cancer cells (MDA-MB-23)                           | (Xiao et al., 2014)                            |
|                                   | Human esophageal squamous cell carcinoma (ESCC)                 | (Yin et al., 2014a)                            |
|                                   | Human prostate carcinoma (DU145)                                | (Shin et al., 2012)                            |
|                                   | Human breast cancer (MCF-7)                                     | (Altonsy et al., 2012)                         |
|                                   | Human melanoma cells (B16-F10)                                  | (Pratheeshkumar et al., 2010)                  |
|                                   | Hepatocellular carcinoma cells (HepG2)                          | (Ji et al., 2010)                              |
|                                   | Osteosarcoma cells (MG63, MNNG/HOS)                             | (Wang et al., 2016b)                           |
|                                   | Human gastric cancer cells (BGC823, SGC7901 and AGS)            | (Pan et al., 2016)                             |
|                                   | Triple negative human breast cancer cells (MDA-MB-231, HS 578T) | (Liu et al., 2015)                             |
|                                   | Human breast cancer cells (MCF-7, SUM 159)                      | (Kim et al., 2016)                             |
|                                   | Primary effusion lymphoma cells (PEL)                           | (Shigemi et al., 2016)                         |
| Pancreatic cancer cells (Capan-2) | (Ma et al., 2014)   |  |
| DATTS (8)                         | Human bladder cancer cells (T24)                                | (Shin et al., 2014)                            |
|                                   | Human histiocytic lymphoma cells (U937)                         | (Czepukojc et al., 2014)                       |
|                                   | Human breast cancer (MDA-MB-23, MCF-7)                          | (Chandra-Kuntal et al., 2013; Na et al., 2012) |
|                                   | Primary colorectal cancer cells                                 | (Yu et al., 2012)                              |
|                                   | Human lung adenocarcinoma cells (A549)                          | (Li et al., 2012)                              |
|                                   | Human colon cancer cells (HTC-116)                              | (Busch et al., 2010)                           |
|                                   | Human histiocytic lymphoma cells (U937)                         | (Czepukojc et al., 2014; Kelkel et al., 2012)  |
|                                   | Human colon cancer cells (HTC-116)                              | (Busch et al., 2010)                           |

oxidant activities, depending on the nature of kinases that are modulated (activation vs. inhibition) upstream of apoptosis.

### 2.3. *In vivo* effect of organic sulfur compounds

Recently, numerous *in vivo* studies reported the anti-cancer potential of garlic-derived OSCs in animal models. In Table 2 we present an overview of anti-cancer activities of OSCs in animal models. OSCs are mostly studied in mice and in various organs. They typically exhibit anti-cancer activities by blocking tumor growth, and by reducing tumor size and weight.

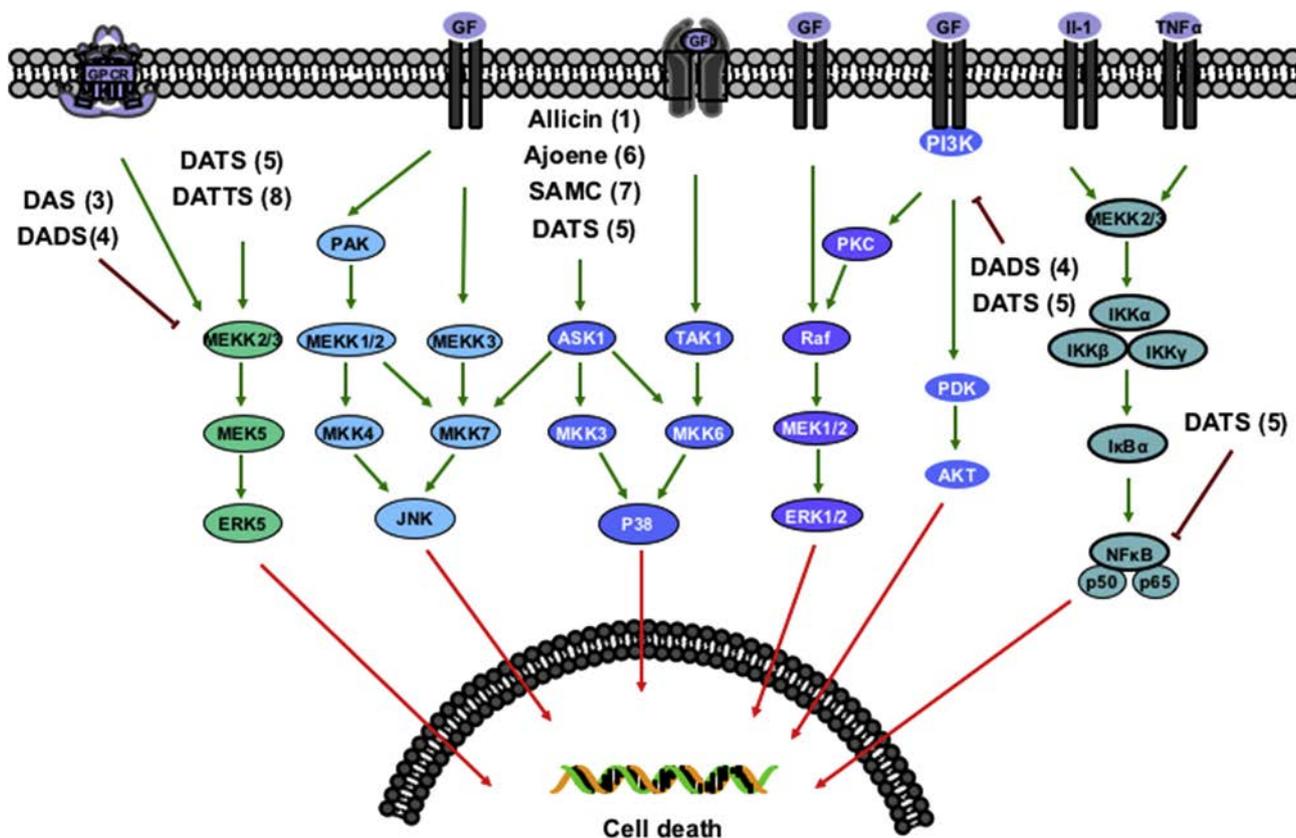
Altogether, a wide range of studies described the antitumor effect of garlic-derived OSCs through various signaling pathways. Here we reported an exhaustive list of mechanisms of action of OSCs described recently in the literature (Fig. 2). Even though there is an important preclinical research interest in favor of cancer treatment with garlic-derived polysulfanes, none of these derivatives, so far, underwent clinical trials. The lack of studies about the specificity of these compounds towards selected cancer models, the assessment of toxicity towards healthy non-cancerous cells/tissues, the pharmacokinetic and pharmacodynamic properties and the compound metabolism were so far major obstacles for applications of OSCs in translational medicine. In recent years, OSCs are accepted as H<sub>2</sub>S donors. However, no research is related to the role of H<sub>2</sub>S release in the anti-cancer activity of OSCs. Here we aim to highlight the role of H<sub>2</sub>S synthesis in human physiological and pathophysiological functions to provide a better understanding of OSCs mechanism of action as H<sub>2</sub>S donor.

## 3. Endogenous hydrogen sulfide synthesis and pathophysiological functions

### 3.1. General properties and endogenous synthesis

Hydrogen sulfide has been considered as a toxic environmental pollutant for several centuries. H<sub>2</sub>S is a flammable colorless gas with a characteristic odor of rotten eggs (Abe and Kimura, 1996). Over the past decades H<sub>2</sub>S was emerging as an important biological gas, and is considered now as the third essential endogenous gasotransmitter besides nitric oxide (NO) and carbon monoxide (CO) in mammals (Wang, 2003). H<sub>2</sub>S is a weak acid soluble in water, with a first dissociation pK<sub>a</sub> of 6.88 at 37 °C and a second dissociation pK<sub>a</sub> of 19 at 37°. Under physiological conditions (pH = 7.4 and 37 °C), H<sub>2</sub>S is referring to the total sulfide species, essentially consisting in the two main forms, the neutral molecular form H<sub>2</sub>S (less than 20%) and the predominant nucleophile form HS<sup>-</sup>; the sulfide anion S<sup>2-</sup> is at a very low concentration. H<sub>2</sub>S is very instable in solution and easily oxidized in presence of O<sub>2</sub> with a high volatility (Hughes et al., 2009).

In mammals, cysteine biosynthesis is the main pathway involved in H<sub>2</sub>S production. Cystathionine β-synthase (CBS), cystathionine γ-lyase (CSE) and 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3-MST) in combination with cysteine amino transferase (CAT) are the main three enzymes taking part in the desulfhydration of cysteine by using cysteine as their biological substrates (Li et al., 2011) (Fig. 4). CBS and CSE are two pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes present in the cytosol. CBS is expressed



**Fig. 3.** Representation of molecular pathways involved in the pro-apoptotic effect of OSCs. ASK: apoptosis signal-regulating kinase; DADS: diallyl disulfide; DAS: diallyl sulfide; DATS: diallyl trisulfide; ERK: extracellular signal-regulated kinase; GF: growth factor; GPCR: G protein-coupled receptor; IKK: I-kappa B kinase; II-1: interleukin-1; MEK: mitogen activated protein kinase kinase; MEKK: mitogen activated protein kinase kinase kinase; MKK: mitogen activated protein kinase kinase; PAK: p21-activated kinase; PDK: 3-phosphoinositide-dependent kinase; PI3K: phosphatidylinositol 3 kinase; PKC: protein kinase C; RAF: rapidly accelerated fibrosarcoma; SAMC: S-allylmercaptocysteine; TAK: Tat-associated kinase; TGF- $\beta$ : transforming growth factor- $\beta$ ; TNF- $\alpha$ : tumor necrosis factor- $\alpha$ .

predominantly in the central nervous system (Miles and Kraus, 2004) and catalyzes the release of  $\text{H}_2\text{S}$  and cystathionine from homocysteine and *via* cysteine degradation (Huang and Moore, 2015a). CSE is mainly expressed in the cardiovascular system and generates cysteine,  $\alpha$ -ketobutyrate and ammonia from cystathionine and  $\text{H}_2\text{S}$  from cysteine metabolism (Huang and Moore, 2015b). The third enzymatic pathway includes 3-MST and CAT, which are mainly located in mitochondria and cytosol of various tissues such as kidney, liver, cardiac and neuroglia cells (Huang and Moore, 2015a). CAT catalyzes the conversion of cysteine to 3-mercaptopyruvate (3-MP) in presence of  $\alpha$ -ketoglutarate. Then 3-MST produce  $\text{H}_2\text{S}$  and pyruvate from 3-MP degradation (Li et al., 2011).  $\text{H}_2\text{S}$  is mainly metabolized through oxidation in the mitochondria; however,  $\text{H}_2\text{S}$  metabolism occurs through methylation in the cytosol, too. In mitochondria,  $\text{H}_2\text{S}$  is first oxidized in presence of sulfide quinone oxidoreductase (SQOR) into sulfane sulfur ( $\text{S}^0$ ), which is accepted by mobile sulfite ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) forming thiosulfate ( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ).  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  is the substrate of GSH-dependent thiosulfate sulfurtransferase (TST) generating glutathione persulfide (GS-SH). Mitochondrial sulfur dioxygenase (SDO) catalyzes the formation of sulfite ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) from GS-SH. The last step of  $\text{H}_2\text{S}$  metabolism corresponds to the oxidation of  $\text{SO}_3^{2-}$  to sulfate ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) by sulfite oxidase (SO) or to degradation of  $\text{SO}_3^{2-}$  by SQOR to produce  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  (Bouillaud and Blachier, 2011; Kimura et al., 2010; Melideo et al., 2014) (Fig. 5).

### 3.2. $\text{H}_2\text{S}$ detection

Several analytic methods allow measuring  $\text{H}_2\text{S}$  concentration

such as colorimetric assay (methylene blue), ion selective electrodes, gas chromatography and metal induced sulfide precipitation from various sources such as blood, urine, feces, tissues and serum (Doeller et al., 2005; Kolluru et al., 2013; Ubuka, 2002). These methods are highly sensitive but they are limited with the post mortem processing and destruction of tissues and cells (Doeller et al., 2005). New reaction-based fluorescence methods have been developed; these new fluorescent probes are compatible with live cells and tissues (Sasakura et al., 2011) and are based on specific  $\text{H}_2\text{S}$  reactions (Choi et al., 2009; Lin and Chang, 2012) such as: 1)  $\text{H}_2\text{S}$ -mediated reduction of azide ( $\text{N}_3$ ) substrate or nitro group, 2)  $\text{H}_2\text{S}$  as nucleophile to react with electrophiles and 3)  $\text{H}_2\text{S}$  as nucleophile to react with precipitated metal salts. Although several probes were developed, few can really detect  $\text{H}_2\text{S}$  due to a lack of sensitivity and/or slow reaction rate with high auto-fluorescence background (Kimura et al., 2012; Lippert et al., 2011; Qian et al., 2011). More recently, new developments lead to bioluminescence probes for  $\text{H}_2\text{S}$  detection in mice and cancer cells (Ke et al., 2016). Altogether the metabolism of  $\text{H}_2\text{S}$  is fast and the challenge to detect sub-micromolar concentrations of  $\text{H}_2\text{S}$  is crucial for the field.

### 3.3. Physiological and pathophysiological functions

Hydrogen sulfide is involved in many physiological and pathophysiological processes.

One of the first physiological roles attributed to  $\text{H}_2\text{S}$  is vasodilation (Hosoki et al., 1997).  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channels are the main targets of  $\text{H}_2\text{S}$ . Several studies point at a direct interaction between  $\text{H}_2\text{S}$  and cysteines present on the channels as mechanism of modulation. In

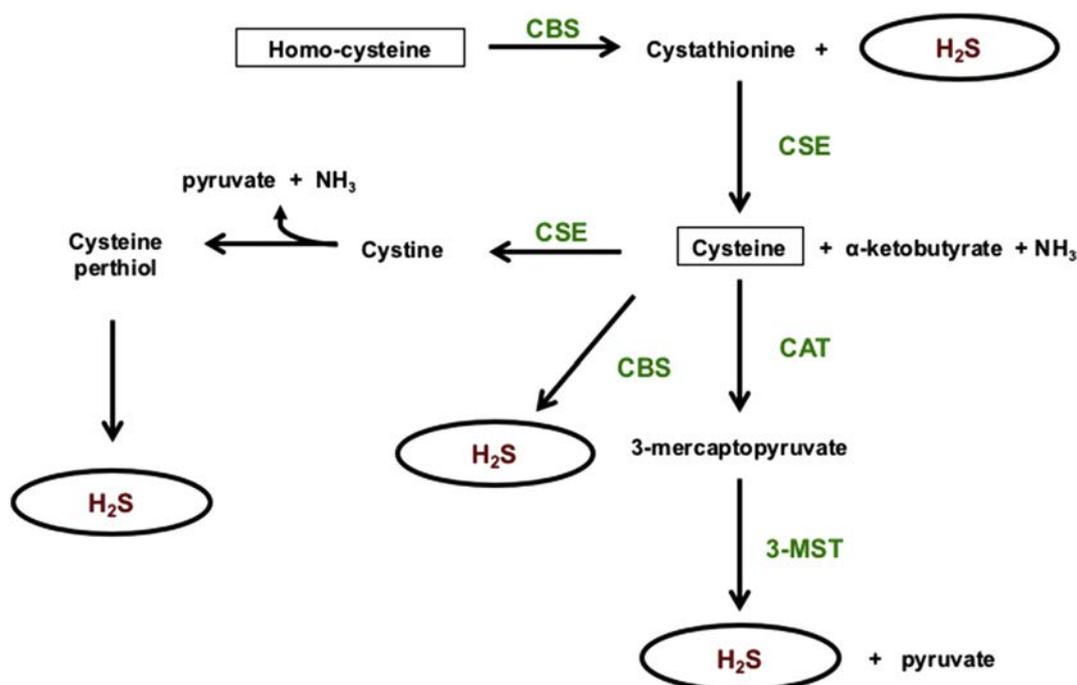
**Table 2**  
Evidence of anti-cancer activity of OSCs in animal models.

| OSC      | Tissue    | Cancer cell line(s) used             | Animal model           | Impact/Molecular target  | Reference                                 |
|----------|-----------|--------------------------------------|------------------------|--|---|
| SAMC (7) | Ovary     | HO8910 and SKOV3 xenograft           | Nude mice              | Reduction of tumor volume  | (Wu et al., 2016)                         |
|          | Colon     | SW620 xenograft                      | Nude mice              | Suppression of tumor growth and metastasis through induction of apoptosis  | (Liang et al., 2011)                      |
|          | Prostate  | PC-3 xenograft                       | SCID mice              | Suppression of tumor growth and formation of distant metastasis  | (Howard et al., 2007)                     |
| SAC (9)  | Tongue    | CAL-27 xenograft                     | Nude mice              | Inhibition of tumor growth and progression. Inhibition of PI3K/Akt and MAPK/ERK pathways. suppression of epithelial-mesenchymal transition       | (Pai et al., 2012)                        |
|          | Liver     | MHCC-97L xenograft                   | Nude mice              | Reduction of tumor volume and suppression of lung metastatic potential of MHCC-97L cells   | (Ng et al., 2012)                         |
| DAS (3)  | Colon     | Colo 205 xenograft                   | Nude Mice              | Suppression of tumor size and weight through promotion of multidrug resistance-associated protein (MRP3, MRP4 and MRP6) gene expression          | (Lai et al., 2012)                        |
| DADS (4) | Breast    | MDA-MB-231 xenograft                 | Nude Mice              | Increase of apoptosis. and decrease of Bcl-2, MMP-9, Snail and active $\beta$ -catenin   | (Huang et al., 2015)                      |
|          | Breast    | MDA-MB-231 xenograft                 | Nude Mice              | Decrease of tumor volume and weight. Co-treatment with miR-34a enhances the anti-tumor effect of DADS  | (Xiao et al., 2014)                       |
|          | Colon     | Colo 205 xenograft                   | Nude Mice              | Suppression of tumor size and weight through promotion of multidrug resistance-associated protein (MRP3, MRP4 and MRP6) gene expression          | (Lai et al., 2012)                        |
|          | Blood     | HL-60 xenograft                      | SCID Mice              | Suppression of tumor growth and increase of histone acetylation  | (Zhao et al., 2006)                       |
|          | Esophagus | ECA-109 xenograft                    | Nude Mice              | Activation of mitochondria-mediated apoptosis and upregulation of Bax/Bcl-2 ratio.   | (Yin et al., 2014a)                       |
| DATS (5) | Brain     | U87MG xenograft                      | SCID Mice              | Downregulation of the RAF/ERK/MEK pathway<br>Reduction of tumor size and tumor mass.   | (Wallace et al., 2013)                    |
|          | Lung      | A549 xenograft                       | Nude Mice              | Inhibition of mitosis and reduction of HDAC activity   | (Li et al., 2012)                         |
|          | Colon     | Colo 205 xenograft<br>CT26 allograft | Nude mice<br>Nude mice | Inhibition of tumor incidence and tumor growth<br>Suppression of tumor size and weight. through stimulation of MRP4 and MRP6 gene expression     | (Lai et al., 2012)<br>(Wu et al., 2011b)  |
|          | Prostate  | PC-3 xenograft                       | TRAMP mice             | Reduction of tumor volume and weight<br>Suppression of tumor growth via induction of apoptosis, downregulation of XIAP and induction of survivin | (Xiao et al., 2006)<br>(Kim et al., 2011) |

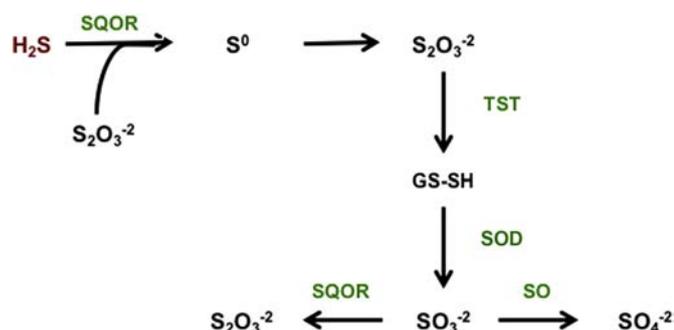
Bax: Bcl-2-associated X protein; Bcl-2: B-cell lymphoma 2; DADS: diallyl disulfide; DAS: diallyl sulfide; DATS: diallyl trisulfide; HDAC: histone deacetylase; PI3K/AKT: phosphatidylinositol-3-kinase/AKT; MAPK/ERK: mitogen activated protein kinase/extracellular signal regulated-kinase, MMP-9: matrix metalloproteinase-9; MRP: multidrug resistance associated protein, RAF/ERK/MEK: SAC: S-allylcysteine; SAMC: S-allylmercaptocysteine; SCID: severe combined immunodeficiency; Snail: zinc finger protein; XIAP: X-linked inhibitor of apoptosis.

rats, intravenous bolus injection of  $\text{H}_2\text{S}$  decreases the blood pressure, antagonized by gibenclamide, a  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channel blocker.  $\text{H}_2\text{S}$  acts directly on isolated vascular smooth muscle cells by increasing  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channel currents and inducing membrane hyperpolarization causing vasorelaxation, antagonized by gibenclamide (Zhao et al.,

2001). Eberhardt et al. showed a direct interaction of  $\text{H}_2\text{S}$  and NO generating nitroxyl (HNO) formation and subsequent activation of the stress sensor, receptor potential channel A1 (TRPA1) through disulfide bond formation. Then the pro-inflammatory calcitonin gene-related protein (CGRP) is released mediating systemic



**Fig. 4.** Scheme of enzymatic pathways involved in  $\text{H}_2\text{S}$  synthesis. 3-CAT: cysteine aminotransferase; 3-MST: 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase; CBS: cystathionine  $\beta$ -synthase; CSE: cystathionine  $\gamma$ -lyase;  $\text{H}_2\text{S}$ : Hydrogen sulfide,  $\text{NH}_3$ : ammonia.



**Fig. 5.** Scheme of enzymatic pathways involved in H<sub>2</sub>S degradation. GS-SH: glutathione persulfide; SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>: sulfite; SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>: sulfate; S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>: thiosulfate; S<sup>0</sup>: sulfane sulfur; SOD: superoxide dismutase; SQOR: sulfide quinone oxidoreductase; TST: thiosulfate glutathione sulfurtransferase.

vasodilation (Eberhardt et al., 2014). In addition, H<sub>2</sub>S induces persulfidation of Cys 43 on the inwardly rectifying potassium channel subunit Kir6.1 preventing its interaction with ATP and leading to its binding with phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2). Thereby the K<sub>ATP</sub> channels are open and the K<sup>+</sup> influx leads to the relaxation of smooth muscle cells (Mustafa et al., 2011). More recently, Hedegaard et al. showed that micromolar concentrations of free H<sub>2</sub>S from exogenous sodium hydrosulfide (NaHS) and sodium sulfide (Na<sub>2</sub>S) salts induced relaxation of rat mesenteric small arteries contracted by norepinephrine. The blockage of voltage-gated potassium channel subunit K<sub>v</sub>7 channels with linopirdine inhibited the NaHS mediated-relaxation of mesenteric arteries supporting the involvement of K<sup>+</sup> channels in H<sub>2</sub>S-mediated relaxation (Hedegaard et al., 2016).

Oxidative stress is the main causative agent of various disorders like neuronal damage and degeneration in brain, ischemia-reperfusion injury in the gastric mucosa and cardiac remodeling (Kim et al., 2015; Konradi et al., 2015; Li et al., 2007; Liu et al., 2010). H<sub>2</sub>S exhibits cytoprotective effects against oxidative stress in various organs. GYY4137, a slow-releasing H<sub>2</sub>S donor showed a protective effect of alveolar growth in broncho-pulmonary dysplasia through promotion of capillary network establishment and cell viability (Vadivel et al., 2014). GYY4137 acts as a ROS scavenger in hyperoxia-exposed endothelial cells of human pulmonary artery (Vadivel et al., 2014). H<sub>2</sub>S is physiologically produced in the cardiovascular system through L-cysteine metabolism and plays a crucial role in cardiac homeostasis. Treatment of smoking rats with NaHS leads to an anti-oxidant effect of H<sub>2</sub>S in rat myocardial tissue through PI3K/AKT-dependent activation of the Nrf2 pathway (Zhou et al., 2015). In gastric epithelial cells, NaHS exerts cytoprotective effect against ischemia-reperfusion injury and apoptotic cell death through anti-oxidant and anti-inflammatory effects by inhibiting the ROS-induced NF-κB pathway and by suppressing NO, interleukin-6 (IL-6) and TNF-α production (Guo et al., 2014). H<sub>2</sub>S plays a protective role in the central nervous system by protecting neurons against glutamate-mediated oxidative stress by increasing production of GSH in primary neurons culture (Kimura and Kimura, 2004). Moreover, H<sub>2</sub>S protects neural cells from traumatic brain injury-mediated apoptosis and autophagy activation by reversing caspase-3 cleavage, Bcl-2 decrease and conversion of microtubule light chain-I to -II (LC3I-II) (Zhang et al., 2014a).

H<sub>2</sub>S possesses a pro-angiogenic effect by increasing cell growth and migration via PI3K/AKT (Cai et al., 2007) and p38/MAPK (Papapetropoulos et al., 2009; Zhen et al., 2015b) pathways in endothelial cells. H<sub>2</sub>S enhances angiogenesis by activating vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)-2 by reducing the

cysteine disulfide bond between Cys1045 and Cys1024 in vascular endothelial cells (Tao et al., 2013). H<sub>2</sub>S stimulates the formation of new blood vessels; *in vivo* the chicken chorioallantoic membrane model showed that H<sub>2</sub>S increases the vascular network length and branching in a concentration-dependent manner (Papapetropoulos et al., 2009).

Evidence suggests that H<sub>2</sub>S can modulate inflammatory response. H<sub>2</sub>S plays both anti-inflammatory and pro-inflammatory roles. The hormetic dose-response of H<sub>2</sub>S could explain these opposite effects: at physiological concentration, H<sub>2</sub>S acts as anti-inflammatory mediator whereas at higher concentrations, H<sub>2</sub>S generates a pro-inflammatory effect (Li et al., 2006). Accordingly, some anti-inflammatory drugs were combined to H<sub>2</sub>S donors to overcome gastric damage and leucocyte adherence induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and cyclooxygenase (COX)-2 inhibitors: these derivatives have been significantly improved compared to their parent drugs (Wallace, 2007) (Table 3). Several studies reported the potential of H<sub>2</sub>S to reduce pro-inflammatory cytokines such as IL-1β (Ha et al., 2015) and IL-6 (Xin et al., 2016) through different mechanisms of action like inhibition of the NF-κB (Xu et al., 2015a) and MAPK pathways (Wu et al., 2015).

One mode of H<sub>2</sub>S signaling is by protein modification of cysteine residues on target proteins through sulphydration or persulfidation, which are ascribed to play comparable functional roles to nitrosylation (Paul and Snyder, 2015). Endogenous H<sub>2</sub>S converts cysteine thiol groups (SH) to perthiol (SSH) groups while NO targets cysteines to generate S-nitrosothiol (SNO) groups. Cysteines represent crucial residues whose status regulates the activity of many enzymes and proteins in a direct or indirect way. Frequently present in catalytic pockets of enzymes or in protein domains orchestrating events of protein-protein interaction as well as conformational changes, the modification of their thiol group (e.g., by oxidation and/or derivatization) belongs to an ancestral modality of regulating crucial homeostatic cellular processes. Mustafa et al., assessed for the first time by a modified switch biotin assay that endogenous H<sub>2</sub>S determines S-sulphydration of cysteine residues of many proteins important for cell metabolism and cellular shape/motility including glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), β-tubulin and actin (Mustafa et al., 2009). These modifications respectively increase GAPDH activity and actin polymerization. The phenomenon has been investigated in liver where the redox status is crucial also for channel-mediated detoxifying activity of this organ.

Sulphydration and nitrosylation offer a versatile and diversified modulation of same cellular mediators, whenever playing multi-tasking activity. The case of GAPDH modification is a paradigmatic example. Beside its glycolytic function, GAPDH may localize into the nucleus and orchestrate transcriptional events. S-nitrosylation of cysteines on GAPDH inhibits its glycolytic activity while promoting first its interaction with factors bearing a nuclear localization signal and next its translocation to the nucleus where GAPDH mediates cell death through p300/CREB-binding protein (CBP) activation (Sen et al., 2008). On the opposite, H<sub>2</sub>S-mediated sulphydration increases GAPDH glycolytic activity by about 700% (Mustafa et al., 2009). Indeed, GAPDH plays a critical role in cancer cells depending on its modulation: ADP ribosylation of GAPDH enhances cell survival but in contrast S-nitrosylation of GAPDH promotes apoptosis (Zhang et al., 2015a).

A body of evidence indicates that H<sub>2</sub>S-mediate S-sulphydration as an event triggered during cellular stress response to offer a pro-survival advantage.

H<sub>2</sub>S mediate cytoprotection and delays cellular aging via protein modification. H<sub>2</sub>S-mediated S-sulphydration of MEK1 at cysteine 341 induces ERK1/2 phosphorylation which in turn

**Table 3**  
Major categories of H<sub>2</sub>S donors.

| Category                | H <sub>2</sub> S releasing agents   | References  |
|-------------------------|---|---|
| Inorganic sulfide salts | Sodium sulfide (Na <sub>2</sub> S)<br>Sodium hydrosulfide (NaHS)<br>Calcium sulfide (CaS)   | (Kashfi and Olson, 2013)  |
| Garlic-derived OSCs     | Allicin<br>Ajoene<br>DAS<br>DADS<br>DATS  | (Benavides et al., 2007; Chuah et al., 2007; Jacob et al., 2008; Tsai et al., 2015)   |
| HS-NSAIDs <sup>a</sup>  | ACS-6 (Sildenafil)<br>ACS-15 (Diclofenac)<br>ATB-343 (Indomethacin)<br>ATB-346 (Naproxen)<br>ATB-337 (Diclofenac)<br>ATB-429 (Mesalamine) | (Caliendo et al., 2010)   |
| Lawesson's reagent      | GY4137  | (Li et al., 2008)   |
| Cysteine analogs        | Phosphorodithioate<br>S-allylcysteine<br>S-propyl cysteine<br>S-propargyl cysteine  | (Park et al., 2013)<br>(Gong et al., 2011; Wang and Dubois, 2010; Wang et al., 2010a; Wang et al., 2010b; Wang et al., 2010c; Wang et al., 2010d; Wang et al., 2010e) |
| Thiol-activated         | N-mercapto-based donors<br>Perthiol-based donors<br>Dithioperoxyanhydrides<br>Aryl-thioamide-based donors<br>gem-dithiol-based donors     | (Zhao et al., 2014b; Zhao et al., 2015)   |

<sup>a</sup> Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NS-AIDs) coupled to DTTs to form hybrids.

promotes poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) activation, thereby increasing the efficiency of DNA damage repair and counteracting cellular senescence (Zhao et al., 2014a). In line with these results, CSE knockdown mice exhibit accelerated cellular senescence (Yang et al., 2013), thus reinforcing the anti-aging modulatory activity of endogenous H<sub>2</sub>S.

Endogenous H<sub>2</sub>S promotes sulfhydration of Cys 38 of p65 subunit resulting in the increase of NF-κB anti-apoptotic target gene activity (Sen et al., 2012). Importantly both inducers of the NF-κB signaling pathway, TNF-α and lipopolysaccharide (LPS) trigger a robust increase in H<sub>2</sub>S as an early response which gradually declines in favor of p65 nitrosylation. Mutations in CSE catalyzing H<sub>2</sub>S synthesis attenuate the transcriptional and anti-apoptotic functions of NF-κB, thus indicating an important role for H<sub>2</sub>S-mediated sulfhydration in the anti-apoptotic role of NF-κB.

H<sub>2</sub>S modulates endoplasmic reticulum (ER) stress response which involves activation of protein kinase RNA-like ER kinase (PERK) by Tyr phosphorylation and inhibition of PERK by protein Tyr phosphatase B1 (PTPB1). Eukaryotic translational initiation factor 2α (eIF2α) phosphorylation by PERK inhibits subsequently protein translation. H<sub>2</sub>S sulfhydrates the phosphatase PTPB1 at Cys 215 thereby inactivating its catalytic function, which in turn leads to an increase of the phosphorylated PERK pool with suppression of protein translation (Krishnan et al., 2011). Also in this instance, CSE knockdown relieves PTPB1 sulfhydration and inhibition, documenting the modulatory role of endogenous H<sub>2</sub>S production in ER stress. Interestingly, several OSCs have been also reported as modulators of ER stress and unfolded protein response (UPR). S-thiolation of ajoene interferes with protein folding thus leading to the accumulation of misfolded proteins paralleled by ER stress and UPR activation (Kaschula et al., 2016).

H<sub>2</sub>S induces antioxidant response via sulfhydration at Cys 151 of Keap1, the endogenous negative regulator of Nrf2, leading to Nrf2-Keap1 dissociation and activation of the antioxidant transcription factor Nrf2 (Yang et al., 2013).

Altogether, endogenous production of H<sub>2</sub>S is activated when cells cope with several types of stress. H<sub>2</sub>S exerts a wide range of biological activities including cytoprotective, pro-angiogenic, antioxidant, anti-inflammatory effects and modulates the efficiency of

metabolic (e.g., glycolysis) as well as ion channel activities. Protein sulfhydration plays a pivotal role in many of these physiological processes, mostly offering a survival advantage. Such aspects warn about the potential risk associated with an exploitation of these same protective pathways in cancer cells as part of a defense response to stress-induced agents intended to play an anti-cancer activity.

#### 4. Garlic-derived organic sulfur compounds act as natural hydrogen sulfide donors

As summarized above, *in vitro* and *in vivo* studies previously described the various biological activities of garlic-derived OSCs, which are connected to the number of reactive sulfur atoms. In the literature, OSCs are accepted as organic H<sub>2</sub>S donors in several reviews (Kashfi and Olson, 2013; Lee and Deng, 2015; Zhao et al., 2014b, 2015). Unfortunately, experimental studies related to H<sub>2</sub>S release from OSCs are limited. Nevertheless, the presence of reactive sulfur atoms in OSCs prompts researchers to study H<sub>2</sub>S release by garlic-derived compounds. Jacob and colleagues provided a chemical overview of sulfur-containing agents able to elicit H<sub>2</sub>S production (Jacob et al., 2008). For example, DAS (3) could generate H<sub>2</sub>S by forming sulfoxides and sulfones catalyzed by cysteine-S-conjugate-β lyase. DADS (4) could release H<sub>2</sub>S through thiol/disulfide exchange by nucleophilic substitution of α-and/or olefinic carbons. Moreover, DATS (5) could produce H<sub>2</sub>S through exchange reactions of hydrogen disulfide (RSSH) and hydrogen trisulfide (RSSSH) by cleaving cysteine-sulfur bonds. Finally, DATS (8) could release H<sub>2</sub>S through exchange reactions of RSSH, sulfide ion (S<sup>2-</sup>), RSSSH and hydrogen tetrasulfide (RSSSSH) by cleaving cysteine-sulfur bonds (Jacob et al., 2008). From this perspective, few studies confirmed the potential of garlic-derived compounds to release H<sub>2</sub>S.

The attribution of biological functions of garlic-derived OSCs to H<sub>2</sub>S release started in 2007 with Benavides et al. (Benavides et al., 2007) who reported for the first time that H<sub>2</sub>S mediated the vasoactivity of garlic in rats. Interestingly, these authors explored the chemical efficacy of garlic-derived OSCs in GSH-mediated H<sub>2</sub>S release, which was the highest with DATS (5) followed by DADS (4),

**DAS (3)** and **allyl methyl sulfide (AMS) (10)**. The vasorelaxation of aorta rings was concentration-dependent and was maximal with **DATS (5)** followed by **DADS (4)**, **DAS (3)** and **AMS (10)**. In addition, the cardioprotective effect of garlic was associated to the **H<sub>2</sub>S** production by **S-allylcysteine (7)** in rat acute myocardial infarction (Chuah et al., 2007). Liang et al. reported that **DATS (5)** is a GSH-mediated fast donor of **H<sub>2</sub>S** whereas **DADS (4)** is a slow donor in both chemical and biological systems (Liang et al., 2015). Then, **DATS (5)** protects rat cardiac cells from high glucose-induced apoptosis *in vitro* and *in vivo*, by increasing CSE expression and reducing ROS generation. Reduction of apoptosis was linked to the anti-oxidant response of **DATS (5)** and to the promotion of insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R)/AKT survival pathway in H9c2 cells (Tsai et al., 2015).

Altogether, even though OSCs are accepted as **H<sub>2</sub>S** donors and that few studies described a correlation between cardioprotection of polysulfanes and **H<sub>2</sub>S** release, no research is yet related to the specific relationship between **H<sub>2</sub>S** and anti-cancer properties of polysulfanes.

Here we hypothesize that OSCs may mediate anti-cancer effect through **H<sub>2</sub>S**-related pathways as many biological actions of **H<sub>2</sub>S** and OSCs occur, at least in part, through sulphydration of cysteine-containing proteins.

We will discuss below that **H<sub>2</sub>S** exerts paradoxical pro-cancer effects while the inhibition of its biosynthesis leads to anti-cancer effects. This dual role of **H<sub>2</sub>S** on cancer might be a limiting factor for the anti-cancer potential of OSCs.

### 5. Anti-cancer potential of garlic-derived organic sulfur compounds is limited by the dual role of hydrogen sulfide

Numerous sources of exogenous **H<sub>2</sub>S** were identified; we summarized these major classes of **H<sub>2</sub>S** donors in Table 3. Among them, OSCs is an important class of **H<sub>2</sub>S** donors and they have been widely studied in cancer research as described above. Accordingly, OSCs by acting as **H<sub>2</sub>S** donors, became new candidates in cancer therapy by inhibiting cancer progression, blocking mitosis and inducing cell death. In contrast, the anti-cancer potential of **H<sub>2</sub>S** remains controversial as it can also exhibit pro-tumor effects. Interestingly several cancer cell lines including colon (Szabo et al., 2013), ovarian (Bhattacharyya et al., 2013), prostate (Guo et al., 2012) and breast cancer (Sen et al., 2015) exhibit high expression levels of CBS compared to non-cancerous cells. Increased CBS activity is associated with cell proliferation, migration and invasion in HCT-116 colon cancer cells. Therefore, the suppression of CBS expression by short hairpin (sh)RNA leads to the inhibition of cell proliferation and to the decrease of **H<sub>2</sub>S** production in colon cancer cells (Szabo et al., 2013). Cellular bioenergetics is crucial in the regulation of cancer progression; pharmacological inhibition by aminoxyacetic acid (AOAA) as well as shRNA-mediated inhibition of CBS reduce the basal mitochondrial respiration, ATP synthesis and the respiratory reserve capacity in human HCT116 colon cancer cells (Hellmich et al., 2015; Szabo et al., 2013). Downregulation of CBS with specific siRNAs leads to impairment of cell proliferation, oxidative stress and sensitizes to cisplatin thereby triggering apoptosis in several ovarian cancer cell lines including A2780 and its cisplatin-resistant variant A2780/CP-70, OV202 and SKOV3 cells (Bhattacharyya et al., 2013; Hellmich et al., 2015). Studies on xenografts of colon or ovarian cancer reported the pro-tumor effect of **H<sub>2</sub>S**. The pharmacological inhibition of CBS inhibits tumor growth of HCT-116 cell tumor xenografts in athymic nude mice (Hellmich et al., 2015). Furthermore, knockdown of CBS in an orthotopic mouse model leads to the inhibition of tumor growth by enhancing cisplatin toxicity on ovarian cancer A2780/CP-20 xenografts (Bhattacharyya et al., 2013).

Upregulation of CSE and CBS have been reported in several tumors and were associated to a pro-carcinogenic effect. Increased CSE, CBS and mercaptopyruvate sulfurtransferase (MPST) expression was associated to the most advanced cancer stages and grades in urothelial bladder carcinoma cells (Gai et al., 2016). CSE upregulation was observed in SW480 colon cancer cells and the transcription of the CSE gene was associated to the activation of Wnt/ $\beta$ -catenin pathway leading to proliferation and migration of cancer cells *in vitro*. shRNA-mediated silencing of CSE as well as its pharmacological inhibition, reduced tumor xenograft growth of colon tumor in nude mice (Fan et al., 2014). The **H<sub>2</sub>S**/CSE pathway was implicated in hepatoma cell proliferation (Pan et al., 2014). Inhibition of this pathway leads to oxidative stress, accompanied by mitochondrial disruption and increased apoptosis (Pan et al., 2014).

Angiogenesis plays a crucial role in tumor progression and **H<sub>2</sub>S** is an endogenous stimulator of angiogenesis by accelerating cell growth, migration and capillary morphogenesis of endothelial cells as reported above (3.3). The silencing of CSE leads to inhibition of **H<sub>2</sub>S** synthesis and to the reduction of VEGF signaling thereby limiting the migration of endothelial cells (Papapetropoulos et al., 2009). Suppression of CBS by shRNA or pharmacological agents inhibits tumor angiogenesis in HCT116 tumor xenografts (Szabo et al., 2013). More recently, Zhen et al. reported that **H<sub>2</sub>S** promotes proliferation, angiogenesis, and migration of PLC/PRF/5 hepatoma cells by activating the NF- $\kappa$ B pathway (Zhen et al., 2015a).

Various mechanisms are involved in the pro-tumor effect of **H<sub>2</sub>S** including enhanced proliferation, migration and angiogenesis besides inhibition of mitochondrial bioenergetics and apoptosis. The findings above reported that CSE as well as CBS inhibition counteract the pro-tumor effect of elevated endogenous **H<sub>2</sub>S** concentrations. Owing to the role of **H<sub>2</sub>S** in cancer, several enzyme inhibitors of **H<sub>2</sub>S** production were synthesized. The most potent one is the AOAA that is inhibiting both CBS and CSE enzymes whereas D,L-propargyl glycine (PAG) and  $\beta$ -cyano-L-alanine (BCA) are specific inhibitors of CSE (Szabo, 2007). In contrast, we showed above that exogenously administered **H<sub>2</sub>S** donors such as OSCs exhibit anti-cancer activity. This dual role of **H<sub>2</sub>S** might be related to the bioavailability and biodegradation of **H<sub>2</sub>S**. The continuous biosynthesis of **H<sub>2</sub>S** due to hyper-activation of CBS/CSE enzymes could promote carcinogenesis in cells whereas micromolar concentrations of exogenously administered **H<sub>2</sub>S** might rather have beneficial effects. The bioavailability of **H<sub>2</sub>S** should be shorter because of a rapid disappearance whereas exposure to higher doses may exacerbate or prolong stress response turning them into a no longer protective but rather detrimental outcome in cancer cells. There is a subtle difference between the ranges of concentrations determining physiologic (homeostatic) vs. pathologic or lethal outcomes. Here, the identification of anti-cancer effects of OSCs related to **H<sub>2</sub>S** release by evaluating the "real" **H<sub>2</sub>S** pool after exogenous **H<sub>2</sub>S** treatment and the translation of these *in vitro* effects to those *in vivo* is critically missing.

### 6. Conclusions

**H<sub>2</sub>S** participates in numerous physiological and pathophysiological activities. Recent research indicates that this gas-transmitter exerts a complex biphasic pharmacological activity. Various studies showed both pro- and anti-cancer effects of **H<sub>2</sub>S** leading to controversies in the field, thereby requiring a deeper understanding of the mechanism of action of **H<sub>2</sub>S** and also its pharmacokinetic characteristics, its intracellular transport and metabolism to help designing new anti-cancer agents based on **H<sub>2</sub>S**-releasing agents. The specific anti-cancer action of OSCs is also not well established yet; the correlation between anti-cancer effect

of garlic derived-OSCs and  $\text{H}_2\text{S}$  remains an active field of investigation considering that garlic-derived OSCs are  $\text{H}_2\text{S}$  donors. Accumulating evidence support the therapeutic potential of  $\text{H}_2\text{S}$  releasing drugs like garlic-derived OSCs as anti-cancer drugs.  $\text{H}_2\text{S}$  is a highly diffusible gas with the advantage to easily penetrate into the tumor. No studies were dedicated to the role of  $\text{H}_2\text{S}$  in OSC-mediated anti-cancer activity. Therefore, we have to carefully elucidate the mechanism of action of  $\text{H}_2\text{S}$  released from OSCs. We should identify how fast OSCs release  $\text{H}_2\text{S}$ ; what are the chemical products of this release; what can be the inter-reactivity with other biomolecules; and what is the toxicity of OSC-released  $\text{H}_2\text{S}$ . Another point to consider is that, so far only few studies investigated toxicity of  $\text{H}_2\text{S}$ -donors. We must to clearly identify the toxicology of exogenous  $\text{H}_2\text{S}$  in animal models. Indeed, zebrafish are emerging tools for drug-discovery and a better understanding of OSC distribution, metabolism and excretion (MacRae and Peterson, 2015). Zebrafish are prominent models to evaluate the effect of  $\text{H}_2\text{S}$  in neighboring organs particularly nervous and cardiovascular systems, which would be the most affected by the toxicity of  $\text{H}_2\text{S}$  gasotransmitter.

### Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts.

### Acknowledgments

EY is supported by Télévie Luxembourg. CC is supported by a “Waxweiler grant for cancer prevention research” from the Action Lions “Vaincre le Cancer”. Research at LBMCC is supported by Télévie Luxembourg, the «Recherche Cancer et Sang» foundation and «Recherches Scientifiques Luxembourg» association. The authors thank «Een Häerz fir Kriibskrank Kanner» association and the Action Lions “Vaincre le Cancer” for generous support. Further support was received from the European Union (ITN “RedCat” 215009 and Interreg IVa project “Corena”). MD is supported by a grant from Research Institute of Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy, Seoul National University, by the NRF by the MEST of Korea for Tumor Microenvironment GCRC 2012-0001184 grant and by Brain Korea (BK21) PLUS program.

### Transparency document

Transparency document related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2016.07.016>.

### References

- Abe, K., Kimura, H., 1996. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J. Neurosci.* 16, 1066–1071.
- Altonsy, M.O., Habib, T.N., Andrews, S.C., 2012. Diallyl disulfide-induced apoptosis in a breast-cancer cell line (MCF-7) may be caused by inhibition of histone deacetylation. *Nutr. Cancer* 64, 1251–1260.
- Anwar, A., Burkholz, T., Scherer, C., Abbas, M., Lehr, C.-M., Diederich, M., Jacob, C., 2011. Naturally occurring reactive sulfur species, their activity against Caco-2 cells, and possible modes of biochemical action. *J. Sulfur Chem.* 29, 251–268.
- Bat-Chen, W., Golan, T., Peri, I., Ludmer, Z., Schwartz, B., 2010. Allicin purified from fresh garlic cloves induces apoptosis in colon cancer cells via Nrf2. *Nutr. Cancer* 62, 947–957.
- Benavides, G.A., Squadrito, G.L., Mills, R.W., Patel, H.D., Isbell, T.S., Patel, R.P., Darley-Usmar, V.M., Doeller, J.E., Kraus, D.W., 2007. Hydrogen sulfide mediates the vasoactivity of garlic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 17977–17982.
- Bhattacharyya, S., Saha, S., Giri, K., Lanza, I.R., Nair, K.S., Jennings, N.B., Rodriguez-Aguayo, C., Lopez-Berestein, G., Basal, E., Weaver, A.L., Visscher, D.W., Cliby, W., Sood, A.K., Bhattacharya, R., Mukherjee, P., 2013. Cystathionine beta-synthase (CBS) contributes to advanced ovarian cancer progression and drug resistance. *PLoS One* 8, e79167.
- Bouillaud, F., Blachier, F., 2011. Mitochondria and sulfide: a very old story of poisoning, feeding, and signaling? *Antioxid. Redox Signal* 15, 379–391.
- Busch, C., Jacob, C., Anwar, A., Burkholz, T., Aicha Ba, L., Cerella, C., Diederich, M., Brandt, W., Wessjohann, L., Montenarh, M., 2010. Diallylpolysulfides induce growth arrest and apoptosis. *Int. J. Oncol.* 36, 743–749.
- Cai, W.J., Wang, M.J., Moore, P.K., Jin, H.M., Yao, T., Zhu, Y.C., 2007. The novel proangiogenic effect of hydrogen sulfide is dependent on Akt phosphorylation. *Cardiovasc. Res.* 76, 29–40.
- Caliendo, G., Cirino, G., Santagada, V., Wallace, J.L., 2010. Synthesis and biological effects of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S): development of H<sub>2</sub>S-releasing drugs as pharmaceuticals. *J. Med. Chem.* 53, 6275–6286.
- Cerella, C., Dicato, M., Jacob, C., Diederich, M., 2011. Chemical properties and mechanisms determining the anti-cancer action of garlic-derived organic sulfur compounds. *Anticancer Agents Med. Chem.* 11, 267–271.
- Cerella, C., Scherer, C., Cristofanon, S., Henry, E., Anwar, A., Busch, C., Montenarh, M., Dicato, M., Jacob, C., Diederich, M., 2009. Cell cycle arrest in early mitosis and induction of caspase-dependent apoptosis in U937 cells by diallyltetrasulfide (A12S<sub>4</sub>). *Apoptosis* 14, 641–654.
- Cha, J.H., Choi, Y.J., Cha, S.H., Choi, C.H., Cho, W.H., 2012. Allicin inhibits cell growth and induces apoptosis in U87MG human glioblastoma cells through an ERK-dependent pathway. *Oncol. Rep.* 28, 41–48.
- Challier, B., Perarnau, J.M., Viel, J.F., 1998. Garlic, onion and cereal fibre as protective factors for breast cancer: a French case-control study. *Eur. J. Epidemiol.* 14, 737–747.
- Chandra-Kuntal, K., Lee, J., Singh, S.V., 2013. Critical role for reactive oxygen species in apoptosis induction and cell migration inhibition by diallyl trisulfide, a cancer chemopreventive component of garlic. *Breast Cancer Res. Treat.* 138, 69–79.
- Chiavarini, M., Minelli, L., Fabiani, R., 2016. Garlic consumption and colorectal cancer risk in man: a systematic review and meta-analysis. *Public Health Nutr.* 19, 308–317.
- Choi, M.G., Cha, S., Lee, H., Jeon, H.L., Chang, S.K., 2009. Sulfide-selective chemosignaling by a Cu<sub>2</sub><sup>+</sup> complex of dipicolylamine appended fluorescein. *Chem. Commun. (Camb.)* 7390–7392.
- Chuah, S.C., Moore, P.K., Zhu, Y.Z., 2007. S-allylcysteine mediates cardioprotection in an acute myocardial infarction rat model via a hydrogen sulfide-mediated pathway. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 293, H2693–H2701.
- Clancy, J.L., Patel, H.R., Hussein, S.M., Tonge, P.D., Cloonan, N., Corso, A.J., Li, M., Lee, D.S., Shin, J.Y., Wong, J.J., Bailey, C.G., Benevento, M., Munoz, J., Chuah, A., Wood, D., Rasko, J.E., Heck, A.J., Grimmond, S.M., Rogers, I.M., Seo, J.S., Wells, C.A., Puri, M.C., Nagy, A., Preiss, T., 2014. Small RNA changes en route to distinct cellular states of induced pluripotency. *Nat. Commun.* 5, 5522.
- Czepukojc, B., Baltés, A.K., Cerella, C., Kelkel, M., Viswanathan, U.M., Salm, F., Burkholz, T., Schneider, C., Dicato, M., Montenarh, M., Jacob, C., Diederich, M., 2014. Synthetic polysulfane derivatives induce cell cycle arrest and apoptotic cell death in human hematopoietic cancer cells. *Food Chem. Toxicol.* 64, 249–257.
- D'Alessio, M., De Nicola, M., Coppola, S., Gualandi, G., Pugliese, L., Cerella, C., Cristofanon, S., Civitareale, P., Ciriolo, M.R., Bergamaschi, A., Magrini, A., Ghibelli, L., 2005. Oxidative Bax dimerization promotes its translocation to mitochondria independently of apoptosis. *FASEB J.* 19, 1504–1506.
- Das, A., Banik, N.L., Ray, S.K., 2007. Garlic compounds generate reactive oxygen species leading to activation of stress kinases and cysteine proteases for apoptosis in human glioblastoma T98G and U87MG cells. *Cancer* 110, 1083–1095.
- Di, C., Sun, C., Li, H., Si, J., Zhang, H., Han, L., Zhao, Q., Liu, Y., Liu, B., Miao, G., Gan, L., Liu, Y., 2015. Diallyl disulfide enhances carbon ion beams-induced apoptotic cell death in cervical cancer cells through regulating Tap73/DeltaNp73. *Cell cycle* 14, 3725–3733.
- Doeller, J.E., Isbell, T.S., Benavides, G., Koenitzer, J., Patel, H., Patel, R.P., Lancaster Jr., J.R., Darley-Usmar, V.M., Kraus, D.W., 2005. Polarographic measurement of hydrogen sulfide production and consumption by mammalian tissues. *Anal. Biochem.* 341, 40–51.
- Dorant, E., vandenBrandt, P., Goldbohm, R.A., 1996. A prospective cohort study on the relationship between onion and leek consumption, garlic supplement use and the risk of colorectal carcinoma in The Netherlands. *Carcinogenesis* 17, 477–484.
- Durackova, Z., 2010. Some current insights into oxidative stress. *Physiol. Res.* 59, 459–469.
- Eberhardt, M., Dux, M., Namer, B., Miljkovic, J., Cordasic, N., Will, C., Kichko, T.I., de la Roche, J., Fischer, M., Suarez, S.A., Bikiel, D., Dorsch, K., Leffler, A., Babes, A., Lampert, A., Lennerz, J.K., Jacobi, J., Marti, M.A., Doctorovich, F., Hogestatt, E.D., Zygumt, P.M., Ivanovic-Burmazovic, I., Messlinger, K., Reeh, P., Filipovic, M.R., 2014. H<sub>2</sub>S and NO cooperatively regulate vascular tone by activating a neuroendocrine HNO-TRPA1-CGRP signalling pathway. *Nat. Commun.* 5, 4381.
- Fan, K., Li, N., Qi, J., Yin, P., Zhao, C., Wang, L., Li, Z., Zha, X., 2014. Wnt/beta-catenin signaling induces the transcription of cystathionine-gamma-lyase, a stimulator of tumor in colon cancer. *Cell. Signal* 26, 2801–2808.
- Filomeni, G., Aquilano, K., Rotilio, G., Ciriolo, M.R., 2003. Reactive oxygen species-dependent c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase/c-Jun signaling cascade mediates neuroblastoma cell death induced by diallyl disulfide. *Cancer Res.* 63, 5940–5949.
- Gai, J.W., Qin, W., Liu, M., Wang, H.F., Zhang, M., Li, M., Zhou, W.H., Ma, Q.T., Liu, G.M., Song, W.H., Jin, J., Ma, H.S., 2016. Expression profile of hydrogen sulfide and its synthases correlates with tumor stage and grade in urothelial cell carcinoma of bladder. *Urol. Oncol.* 34 (166), e115–120.
- Galeone, C., Pelucchi, C., Levi, F., Negri, E., Franceschi, S., Talamini, R., Giacosa, A., La Vecchia, C., 2006. Onion and garlic use and human cancer. *Am. J. Clin. Nutr.* 84, 1027–1032.

- Gong, Q.H., Wang, Q., Pan, L.L., Liu, X.H., Xin, H., Zhu, Y.Z., 2011. S-propargylcysteine, a novel hydrogen sulfide-modulated agent, attenuates lipopolysaccharide-induced spatial learning and memory impairment: involvement of TNF signaling and NF-kappaB pathway in rats. *Brain Behav. Immun.* 25, 110–119.
- Gonzalez, C.A., Pera, G., Agudo, A., Bueno-de-Mesquita, H.B., Ceroti, M., Boeing, H., Schulz, M., Del Giudice, G., Plebani, M., Carneiro, F., Berrino, F., Sacerdote, C., Tumino, R., Panico, S., Berglund, G., Siman, H., Hallmans, G., Stenling, R., Martinez, C., Dorronsoro, M., Barricarte, A., Navarro, C., Quiros, J.R., Allen, N., Key, T.J., Bingham, S., Day, N.E., Linseisen, J., Nagel, G., Overvad, K., Jensen, M.K., Olsen, A., Tjønneland, A., Buchner, F.L., Peeters, P.H., Numans, M.E., Clavel-Chapelon, F., Boutron-Ruault, M.C., Roukos, D., Trichopoulos, A., Psaltopoulou, T., Lund, E., Casagrande, C., Slimani, N., Jenab, M., Riboli, E., 2006. Fruit and vegetable intake and the risk of stomach and oesophagus adenocarcinoma in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-EURGAST). *Int. J. Cancer* 118, 2559–2566.
- Guo, C., Liang, F., Shah Masood, W., Yan, X., 2014. Hydrogen sulfide protected gastric epithelial cell from ischemia/reperfusion injury by Keap1 s-sulfhydration, MAPK dependent anti-apoptosis and NF-kappaB dependent anti-inflammation pathway. *Eur. J. Pharmacol.* 725, 70–78.
- Guo, H., Gai, J.W., Wang, Y., Jin, H.F., Du, J.B., Jin, J., 2012. Characterization of hydrogen sulfide and its synthases, cystathionine beta-synthase and cystathionine gamma-lyase, in human prostatic tissue and cells. *Urology* 79 (483), e481–485.
- Ha, C., Tian, S., Sun, K., Wang, D., Lv, J., Wang, Y., 2015. Hydrogen sulfide attenuates IL-1beta-induced inflammatory signaling and dysfunction of osteoarthritic chondrocytes. *Int. J. Mol. Med.* 35, 1657–1666.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674.
- Hedegaard, E.R., Gouliava, A., Winther, A.K., Arcanjo, D.D., Aalling, M., Renaltan, N.S., Wood, M.E., Whiteman, M., Skovgaard, N., Simonsen, U., 2016. Involvement of potassium channels and calcium-independent mechanisms in hydrogen sulfide-induced relaxation of rat mesenteric small arteries. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 356, 53–63.
- Heine-Broring, R.C., Winkels, R.M., Renkema, J.M., Kragt, L., van Orten-Luiten, A.C., Tigchelaar, E.F., Chan, D.S., Norat, T., Kampman, E., 2015. Dietary supplement use and colorectal cancer risk: a systematic review and meta-analyses of prospective cohort studies. *Int. J. Cancer* 136, 2388–2401.
- Hellmich, M.R., Coletta, C., Chao, C., Szabo, C., 2015. The therapeutic potential of cystathionine beta-synthetase/hydrogen sulfide inhibition in cancer. *Antioxid. Redox Signal* 22, 424–448.
- Hosoki, R., Matsuki, N., Kimura, H., 1997. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237, 527–531.
- Hosono, T., Fukao, T., Ogiwara, J., Ito, Y., Shiba, H., Seki, T., Ariga, T., 2005. Diallyl trisulfide suppresses the proliferation and induces apoptosis of human colon cancer cells through oxidative modification of beta-tubulin. *J. Biol. Chem.* 280, 41487–41493.
- Howard, E.W., Ling, M.T., Chua, C.W., Cheung, H.W., Wang, X., Wong, Y.C., 2007. Garlic-derived S-allylmercaptocysteine is a novel in vivo antimetastatic agent for androgen-independent prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* 13, 1847–1856.
- Hsing, A.W., Chokkalingam, A.P., Gao, Y.T., Madigan, M.P., Deng, J., Gridley, G., Fraumeni Jr., J.F., 2002. Allium vegetables and risk of prostate cancer: a population-based study. *J. Natl. Cancer Inst.* 94, 1648–1651.
- Huang, C.W., Moore, P.K., 2015a. H2S synthesizing enzymes: Biochemistry and molecular aspects. *Handb. Exp. Pharmacol.* 230, 3–25.
- Huang, C.W., Moore, P.K., 2015b. H2S Synthesizing Enzymes: Biochemistry and Molecular Aspects, Chemistry, Biochemistry and Pharmacology of Hydrogen Sulfide. Springer Science + Business Media, pp. 3–25.
- Huang, J., Yang, B., Xiang, T., Peng, W., Qiu, Z., Wan, J., Zhang, L., Li, H., Li, H., Ren, G., 2015. Diallyl disulfide inhibits growth and metastatic potential of human triple-negative breast cancer cells through inactivation of the beta-catenin signaling pathway. *Mol. Nutr. Food Res.* 59, 1063–1075.
- Hughes, M.N., Centelles, M.N., Moore, K.P., 2009. Making and working with hydrogen sulfide: the chemistry and generation of hydrogen sulfide in vitro and its measurement in vivo: a review. *Free Radic. Biol. Med.* 47, 1346–1353.
- Iciek, M., Kwiecien, I., Wlodek, L., 2009. Biological properties of garlic and garlic-derived organosulfur compounds. *Environ. Mol. Mutagen.* 50, 247–265.
- Jacob, C., Anwar, A., Burkholz, T., 2008. Perspective on recent developments on sulfur-containing agents and hydrogen sulfide signaling. *Planta Med.* 74, 1580–1592.
- Ji, C., Ren, F., Ma, H., Xu, M., 2010. The roles of p38MAPK and caspase-3 in DADS-induced apoptosis in human HepG2 cells. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 29, 50.
- Kaschula, C.H., Hunter, R., Cotton, J., Tuveri, R., Ngarande, E., Dzobo, K., Schafer, G., Siyo, V., Lang, D., Kusza, D.A., Davies, B., Katz, A.A., Parker, M.L., 2016. The garlic compound ajoene targets protein folding in the endoplasmic reticulum of cancer cells. *Mol. Carcinog.* 55, 1213–1228.
- Kashfi, K., Olson, K.R., 2013. Biology and therapeutic potential of hydrogen sulfide and hydrogen sulfide-releasing chimeras. *Biochem. Pharmacol.* 85, 689–703.
- Ke, B., Wu, W., Liu, W., Liang, H., Gong, D., Hu, X., Li, M., 2016. Bioluminescence probe for detecting hydrogen sulfide in vivo. *Anal. Chem.* 88, 592–595.
- Kelkel, M., Cerella, C., Mack, F., Schneider, T., Jacob, C., Schumacher, M., Dicato, M., Diederich, M., 2012. ROS-independent JNK activation and multisite phosphorylation of Bcl-2 link diallyl tetrasulfide-induced mitotic arrest to apoptosis. *Carcinogenesis* 33, 2162–2171.
- Kim, G.H., Kim, J.E., Rhie, S.J., Yoon, S., 2015. The role of oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Exp. Neurobiol.* 24, 325–340.
- Kim, S., Lee, H.G., Park, S.A., Kundu, J.K., Keum, Y.S., Cha, Y.N., Na, H.K., Surh, Y.J., 2014. Keap1 cysteine 288 as a potential target for diallyl trisulfide-induced Nrf2 activation. *PLoS One* 9, e85984.
- Kim, S.H., Bommareddy, A., Singh, S.V., 2011. Garlic constituent diallyl trisulfide suppresses x-linked inhibitor of apoptosis protein in prostate cancer cells in culture and in vivo. *Cancer Prev. Res. (Phila.)* 4, 897–906.
- Kim, S.H., Kaschula, C.H., Priedigkeit, N., Lee, A.V., Singh, S.V., 2016. Forkhead Box Q1 is a novel target of breast Cancer stem cell inhibition by diallyl trisulfide. *J. Biol. Chem.* 291, 13495–13508.
- Kim, Y.A., Xiao, D., Xiao, H., Powolny, A.A., Lew, K.L., Reilly, M.L., Zeng, Y., Wang, Z., Singh, S.V., 2007. Mitochondria-mediated apoptosis by diallyl trisulfide in human prostate cancer cells is associated with generation of reactive oxygen species and regulated by Bax/Bak. *Mol. Cancer Ther.* 6, 1599–1609.
- Kimura, H., Shibuya, N., Kimura, Y., 2012. Hydrogen sulfide is a signaling molecule and a cytoprotectant. *Antioxid. Redox Signal* 17, 45–57.
- Kimura, Y., Goto, Y., Kimura, H., 2010. Hydrogen sulfide increases glutathione production and suppresses oxidative stress in mitochondria. *Antioxid. Redox Signal* 12, 1–13.
- Kimura, Y., Kimura, H., 2004. Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress. *FASEB J.* 18, 1165–1167.
- Kodali, R.T., Eslick, G.D., 2015. Meta-analysis: does garlic intake reduce risk of gastric cancer? *Nutr. Cancer* 67, 1–11.
- Kolluru, G.K., Shen, X., Bir, S.C., Kevil, C.G., 2013. Hydrogen sulfide chemical biology: pathophysiological roles and detection. *Nitric Oxide* 35, 5–20.
- Konradi, J., Mollenhauer, M., Baldus, S., Klinke, A., 2015. Redox-sensitive mechanisms underlying vascular dysfunction in heart failure. *Free Radic. Res.* 49, 721–742.
- Kotzev, I., 2012. Risk and Protective Factors for Development of Colorectal Polyps and Cancer. Cancer Prevention - From Mechanisms to Translational Benefits. InTech.
- Krishnan, N., Fu, C., Pappin, D.J., Tonks, N.K., 2011. H2S-Induced sulfhydration of the phosphatase PTP1B and its role in the endoplasmic reticulum stress response. *Sci. Signal* 4, ra86.
- Lai, K.C., Cao, C.L., Ho, H.C., Yang, J.S., Ma, C.Y., Lu, H.F., Huang, H.Y., Chueh, F.S., Yu, C.C., Chung, J.G., 2012. Diallyl sulfide, diallyl disulfide and diallyl trisulfide affect drug resistant gene expression in colo 205 human colon cancer cells in vitro and in vivo. *Phytomedicine* 19, 625–630.
- Lee, Z.-W., Deng, L.-W., 2015. Role of H2S Donors in Cancer Biology, Chemistry, Biochemistry and Pharmacology of Hydrogen Sulfide. Springer Science + Business Media, pp. 243–265.
- Li, L., Bhatia, M., Moore, P.K., 2006. Hydrogen sulphide—a novel mediator of inflammation? *Curr. Opin. Pharmacol.* 6, 125–129.
- Li, L., Rose, P., Moore, P.K., 2011. Hydrogen sulfide and cell signaling. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 51, 169–187.
- Li, L., Rossoni, G., Sparatore, A., Lee, L.C., Del Soldato, P., Moore, P.K., 2007. Anti-inflammatory and gastrointestinal effects of a novel diclofenac derivative. *Free Radic. Biol. Med.* 42, 706–719.
- Li, L., Whiteman, M., Guan, Y.Y., Neo, K.L., Cheng, Y., Lee, S.W., Zhao, Y., Baskar, R., Tan, C.H., Moore, P.K., 2008. Characterization of a novel, water-soluble hydrogen sulfide-releasing molecule (GYY4137): new insights into the biology of hydrogen sulfide. *Circulation* 117, 2351–2360.
- Li, W., Tian, H., Li, L., Li, S., Yue, W., Chen, Z., Qi, L., Hu, W., Zhu, Y., Hao, B., Gao, C., Si, L., Gao, F., 2012. Diallyl trisulfide induces apoptosis and inhibits proliferation of A549 cells in vitro and in vivo. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* 44, 577–583.
- Liang, D., Qin, Y., Zhao, W., Zhai, X., Guo, Z., Wang, R., Tong, L., Lin, L., Chen, H., Wong, Y.C., Zhong, Z., 2011. S-allylmercaptocysteine effectively inhibits the proliferation of colorectal cancer cells under in vitro and in vivo conditions. *Cancer Lett.* 310, 69–76.
- Liang, D., Wu, H., Wong, M.W., Huang, D., 2015. Diallyl trisulfide is a fast H2S donor, but diallyl disulfide is a slow one: the reaction pathways and intermediates of glutathione with polysulfides. *Org. Lett.* 17, 4196–4199.
- Lin, V.S., Chang, C.J., 2012. Fluorescent probes for sensing and imaging biological hydrogen sulfide. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 16, 595–601.
- Lippert, A.R., New, E.J., Chang, C.J., 2011. Reaction-based fluorescent probes for selective imaging of hydrogen sulfide in living cells. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 10078–10080.
- Liu, K.L., Chen, H.W., Wang, R.Y., Lei, Y.P., Sheen, L.Y., Lii, C.K., 2006. DATS reduces LPS-induced iNOS expression, NO production, oxidative stress, and NF-kappaB activation in RAW 264.7 macrophages. *J. Agric. Food Chem.* 54, 3472–3478.
- Liu, M.J., Fei, S.J., Qiao, W.L., Du, D.S., Zhang, Y.M., Li, Y., Zhang, J.F., 2010. The protective effect of 17beta-estradiol postconditioning against hypoxia/reoxygenation injury in human gastric epithelial cells. *Eur. J. Pharmacol.* 645, 151–157.
- Liu, X., Guo, W., Wu, S., Wang, L., Wang, J., Dai, B., Kim, E.S., Heymach, J.V., Wang, M., Girard, L., Minna, J., Roth, J.A., Swisher, S.G., Fang, B., 2012. Antitumor activity of a novel STAT3 inhibitor and redox modulator in non-small cell lung cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* 83, 1456–1464.
- Liu, Y., Zhu, P., Wang, Y., Wei, Z., Tao, L., Zhu, Z., Sheng, X., Wang, S., Ruan, J., Liu, Z., Cao, Y., Shan, Y., Sun, L., Wang, A., Chen, W., Lu, Y., 2015. Antimetastatic therapies of the polysulfide diallyl trisulfide against triple-negative breast Cancer (TNBC) via suppressing MMP2/9 by blocking NF-kappaB and ERK/MAPK signaling pathways. *PLoS One* 10, e0123781.
- Ma, H.B., Huang, S., Yin, X.R., Zhang, Y., Di, Z.L., 2014. Apoptotic pathway induced by

- diallyl trisulfide in pancreatic cancer cells. *World J. Gastroenterol.* 20, 193–203.
- MacRae, C.A., Peterson, R.T., 2015. Zebrafish as tools for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 14, 721–731.
- McCullough, M.L., Jacobs, E.J., Shah, R., Campbell, P.T., Gapstur, S.M., 2012. Garlic consumption and colorectal cancer risk in the CPS-II Nutrition Cohort. *Cancer Causes Control* 23, 1643–1651.
- Melideo, S.L., Jackson, M.R., Jorns, M.S., 2014. Biosynthesis of a central intermediate in hydrogen sulfide metabolism by a novel human sulfurtransferase and its yeast ortholog. *Biochemistry* 53, 4739–4753.
- Meng, S., Zhang, X., Giovannucci, E.L., Ma, J., Fuchs, C.S., Cho, E., 2013. No association between garlic intake and risk of colorectal cancer. *Cancer Epidemiol.* 37, 152–155.
- Miles, E.W., Kraus, J.P., 2004. Cystathionine beta-synthase: structure, function, regulation, and location of homocystinuria-causing mutations. *J. Biol. Chem.* 279, 29871–29874.
- Millen, A.E., Subar, A.F., Graubard, B.I., Peters, U., Hayes, R.B., Weissfeld, J.L., Yokochi, L.A., Ziegler, R.G., Team, P.C.S.T.P., 2007. Fruit and vegetable intake and prevalence of colorectal adenoma in a cancer screening trial. *Am. J. Clin. Nutr.* 86, 1754–1764.
- Mustafa, A.K., Gadalla, M.M., Sen, N., Kim, S., Mu, W., Gazi, S.K., Barrow, R.K., Yang, G., Wang, R., Snyder, S.H., 2009. H2S signals through protein S-sulfhydration. *Sci. Signal* 2, ra72.
- Mustafa, A.K., Sikka, G., Gazi, S.K., Steppan, J., Jung, S.M., Bhunia, A.K., Barodka, V.M., Gazi, F.K., Barrow, R.K., Wang, R., Amzel, L.M., Berkowitz, D.E., Snyder, S.H., 2011. Hydrogen sulfide as endothelium-derived hyperpolarizing factor sulfhydrates potassium channels. *Circ. Res.* 109, 1259–1268.
- Myneni, A.A., Chang, S.C., Niu, R., Liu, L., Swanson, M.K., Li, J., Su, J., Giovino, G.A., Yu, S., Zhang, Z.F., Mu, L., 2016. Raw garlic consumption and lung Cancer in a chinese population. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 25, 624–633.
- Na, H.K., Kim, E.H., Choi, M.A., Park, J.M., Kim, D.H., Surh, Y.J., 2012. Diallyl trisulfide induces apoptosis in human breast cancer cells through ROS-mediated activation of JNK and AP-1. *Biochem. Pharmacol.* 84, 1241–1250.
- Nagata, K., Puls, A., Futter, C., Aspenstrom, P., Schaefer, E., Nakata, T., Hirokawa, N., Hall, A., 1998. The MAP kinase kinase MLK2 co-localizes with activated JNK along microtubules and associates with kinesin superfamily motor KIF3. *EMBO J.* 17, 149–158.
- Ng, K.T., Guo, D.Y., Cheng, Q., Geng, W., Ling, C.C., Li, C.X., Liu, X.B., Ma, Y.Y., Lo, C.M., Poon, R.T., Fan, S.T., Man, K., 2012. A garlic derivative, S-allylcysteine (SAC), suppresses proliferation and metastasis of hepatocellular carcinoma. *PLoS One* 7, e31655.
- Nicastro, H.L., Ross, S.A., Milner, J.A., 2015. Garlic and onions: their cancer prevention properties. *Cancer Prev. Res. (Phila.)* 8, 181–189.
- Nogales, E., 2000. Structural insights into microtubule function. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 277–302.
- Pai, M.H., Kuo, Y.H., Chiang, E.P., Tang, F.Y., 2012. S-Allylcysteine inhibits tumour progression and the epithelial-mesenchymal transition in a mouse xenograft model of oral cancer. *Br. J. Nutr.* 108, 28–38.
- Pan, Y., Lin, S., Xing, R., Zhu, M., Lin, B., Cui, J., Li, W., Gao, J., Shen, L., Zhao, Y., Guo, M., Wang, J.M., Huang, J., Lu, Y., 2016. Epigenetic upregulation of metallothionein 2A by diallyl trisulfide enhances chemosensitivity of human gastric Cancer cells to docetaxel through attenuating NF-kappaB activation. *Antioxid. Redox Signal* 24, 839–854.
- Pan, Y., Ye, S., Yuan, D., Zhang, J., Bai, Y., Shao, C., 2014. Hydrogen sulfide (H2S)/cystathionine gamma-lyase (CSE) pathway contributes to the proliferation of hepatoma cells. *Mutat. Res.* 763–764, 10–18.
- Papapetropoulos, A., Pyriochou, A., Altaany, Z., Yang, G., Marazioti, A., Zhou, Z., Jeschke, M.G., Branski, L.K., Herndon, D.N., Wang, R., Szabo, C., 2009. Hydrogen sulfide is an endogenous stimulator of angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 21972–21977.
- Park, C.M., Zhao, Y., Zhu, Z., Pacheco, A., Peng, B., Devarie-Baez, N.O., Bagdon, P., Zhang, H., Xian, M., 2013. Synthesis and evaluation of phosphorodithioate-based hydrogen sulfide donors. *Mol. Biosyst.* 9, 2430–2434.
- Parker, A.L., Kavallaris, M., McCarroll, J.A., 2014. Microtubules and their role in cellular stress in cancer. *Front. Oncol.* 4, 153.
- Paul, B.D., Snyder, S.H., 2015. H2S: a novel gas transmitter that signals by sulfhydration. *Trends biochem. Sci.* 40, 687–700.
- Pereira, A.M., Tudor, C., Kanger, J.S., Subramaniam, V., Martin-Blanco, E., 2011. Integrin-dependent activation of the JNK signaling pathway by mechanical stress. *PLoS One* 6, e26182.
- Pratheeshkumar, P., Thejass, P., Kutun, G., 2010. Diallyl disulfide induces caspase-dependent apoptosis via mitochondria-mediated intrinsic pathway in B16F-10 melanoma cells by up-regulating p53, caspase-3 and down-regulating pro-inflammatory cytokines and nuclear factor-kappaB-mediated Bcl-2 activation. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 29, 113–125.
- Qian, Y., Karpus, J., Kabil, O., Zhang, S.Y., Zhu, H.L., Banerjee, R., Zhao, J., He, C., 2011. Selective fluorescent probes for live-cell monitoring of sulphide. *Nat. Commun.* 2, 495.
- Reuter, S., Gupta, S.C., Chaturvedi, M.M., Aggarwal, B.B., 2010. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic. Biol. Med.* 49, 1603–1616.
- Sasakura, K., Hanaoka, K., Shibuya, N., Mikami, Y., Kimura, Y., Komatsu, T., Ueno, T., Terai, T., Kimura, H., Nagano, T., 2011. Development of a highly selective fluorescence probe for hydrogen sulfide. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 18003–18005.
- Satia, J.A., Littman, A., Slatore, C.G., Galanko, J.A., White, E., 2009. Associations of herbal and specialty supplements with lung and colorectal cancer risk in the Vitamins and Lifestyle study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 18, 1419–1428.
- Sen, N., Hara, M.R., Kornberg, M.D., Cascio, M.B., Bae, B.I., Shahani, N., Thomas, B., Dawson, T.M., Dawson, V.L., Snyder, S.H., Sawa, A., 2008. Nitric oxide-induced nuclear GAPDH activates p300/CBP and mediates apoptosis. *Nat. Cell Biol.* 10, 866–873.
- Sen, N., Paul, B.D., Gadalla, M.M., Mustafa, A.K., Sen, T., Xu, R., Kim, S., Snyder, S.H., 2012. Hydrogen sulfide-linked sulfhydration of NF-kappaB mediates its anti-apoptotic actions. *Mol. Cell* 45, 13–24.
- Sen, S., Kawahara, B., Gupta, D., Tsai, R., Khachatryan, M., Roy-Chowdhuri, S., Bose, S., Yoon, A., Faull, K., Farias-Eisner, R., Chaudhuri, G., 2015. Role of cystathionine beta-synthase in human breast Cancer. *Free Radic. Biol. Med.* 86, 228–238.
- Shigemitsu, Z., Furukawa, Y., Hosokawa, K., Minami, S., Matsuhira, J., Nakata, S., Watanabe, T., Kagawa, H., Nakagawa, K., Takeda, H., Fujimuro, M., 2016. Diallyl trisulfide induces apoptosis by suppressing NF-kappaB signaling through destabilization of TRAF6 in primary effusion lymphoma. *Int. J. Oncol.* 48, 293–304.
- Shin, D.Y., Kim, G.Y., Hwang, H.J., Kim, W.J., Choi, Y.H., 2014. Diallyl trisulfide-induced apoptosis of bladder cancer cells is caspase-dependent and regulated by PI3K/Akt and JNK pathways. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 37, 74–83.
- Shin, D.Y., Kim, G.Y., Lee, J.H., Choi, B.T., Yoo, Y.H., Choi, Y.H., 2012. Apoptosis induction of human prostate carcinoma DU145 cells by diallyl disulfide via modulation of JNK and PI3K/AKT signaling pathways. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 14158–14171.
- Sriram, N., Kalayarasan, S., Ashokkumar, P., Sureshkumar, A., Sudhandiran, G., 2008. Diallyl sulfide induces apoptosis in Colo 320 DM human colon cancer cells: involvement of caspase-3, NF-kappaB, and ERK-2. *Mol. Cell. Biochem.* 311, 157–165.
- Stedel, R., 2002. The chemistry of organic polysulfanes R-S(n)-R (n>2). *Chem. Rev.* 102, 3905–3945.
- Su, B., Su, J., Zeng, Y., Liu, F., Xia, H., Ma, Y.H., Zhou, Z.G., Zhang, S., Yang, B.M., Wu, Y.H., Zeng, X., Ai, X.H., Ling, H., Jiang, H., Su, Q., 2016. Diallyl disulfide suppresses epithelial-mesenchymal transition, invasion and proliferation by downregulation of LIMK1 in gastric cancer. *Oncotarget* 7, 10498–10512.
- Szabo, C., 2007. Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. *Nat. Rev. Drug Discov.* 6, 917–935.
- Szabo, C., Coletta, C., Chao, C., Modis, K., Szczesny, B., Papapetropoulos, A., Hellmich, M.R., 2013. Tumor-derived hydrogen sulfide, produced by cystathionine-beta-synthase, stimulates bioenergetics, cell proliferation, and angiogenesis in colon cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 12474–12479.
- Tao, B.B., Liu, S.Y., Zhang, C.C., Fu, W., Cai, W.J., Wang, Y., Shen, Q., Wang, M.J., Chen, Y., Zhang, L.J., Zhu, Y.Z., Zhu, Y.C., 2013. VEGFR2 functions as an H2S-targeting receptor protein kinase with its novel Cys1045-Cys1024 disulfide bond serving as a specific molecular switch for hydrogen sulfide actions in vascular endothelial cells. *Antioxid. Redox Signal* 19, 448–464.
- Tong, D., Qu, H., Meng, X., Jiang, Y., Liu, D., Ye, S., Chen, H., Jin, Y., Fu, S., Geng, J., 2014. S-allylmercaptocysteine promotes MAPK inhibitor-induced apoptosis by activating the TGF-beta signaling pathway in cancer cells. *Oncol. Rep.* 32, 1124–1132.
- Trio, P.Z., You, S., He, X., He, J., Sakao, K., Hou, D.X., 2014. Chemopreventive functions and molecular mechanisms of garlic organosulfur compounds. *Food Funct.* 5, 833–844.
- Tsai, C.Y., Wen, S.Y., Shibu, M.A., Yang, Y.C., Peng, H., Wang, B., Wei, Y.M., Chang, H.Y., Lee, C.Y., Huang, C.Y., Kuo, W.W., 2015. Diallyl trisulfide protects against high glucose-induced cardiac apoptosis by stimulating the production of cystathionine gamma-lyase-derived hydrogen sulfide. *Int. J. Cardiol.* 195, 300–310.
- Turati, F., Guercio, V., Pelucchi, C., La Vecchia, C., Galeone, C., 2014. Colorectal cancer and adenomatous polyps in relation to allium vegetables intake: a meta-analysis of observational studies. *Mol. Nutr. Food Res.* 58, 1907–1914.
- Turati, F., Pelucchi, C., Guercio, V., La Vecchia, C., Galeone, C., 2015. Allium vegetable intake and gastric cancer: a case-control study and meta-analysis. *Mol. Nutr. Food Res.* 59, 171–179.
- Ubuka, T., 2002. Assay methods and biological roles of labile sulfur in animal tissues. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 781, 227–249.
- Vadivel, A., Alphonse, R.S., Ionescu, L., Machado, D.S., O'Reilly, M., Eaton, F., Haromy, A., Michelakis, E.D., Thebaud, B., 2014. Exogenous hydrogen sulfide (H2S) protects alveolar growth in experimental O2-induced neonatal lung injury. *PLoS One* 9, e90965.
- Wallace, G.C.t., Haar, C.P., Vandergrift 3rd, W.A., Giglio, P., Dixon-Mah, Y.N., Varma, A.K., Ray, S.K., Patel, S.J., Banik, N.L., Das, A., 2013. Multi-targeted DATS prevents tumor progression and promotes apoptosis in ectopic glioblastoma xenografts in SCID mice via HDAC inhibition. *J. Neurooncol.* 114, 43–50.
- Wallace, J.L., 2007. Hydrogen sulfide-releasing anti-inflammatory drugs. *Trends Pharmacol. Sci.* 28, 501–505.
- Wang, D., Dubois, R.N., 2010. Eicosanoids and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 10, 181–193.
- Wang, G., Liu, G., Ye, Y., Fu, Y., Zhang, X., 2016a. Upregulation of miR-34a by diallyl disulfide suppresses invasion and induces apoptosis in SGC-7901 cells through inhibition of the PI3K/Akt signaling pathway. *Oncol. Lett.* 11, 2661–2667.
- Wang, H., Sun, N., Li, X., Li, K., Tian, J., Li, J., 2016b. Diallyl trisulfide induces osteosarcoma cell apoptosis through reactive oxygen species-mediated down-regulation of the PI3K/Akt pathway. *Oncol. Rep.* 35, 3648–3658.
- Wang, H.C., Yang, J.H., Hsieh, S.C., Sheen, L.Y., 2010a. Allyl sulfides inhibit cell growth of skin cancer cells through induction of DNA damage mediated G2/M arrest and apoptosis. *J. Agric. Food Chem.* 58, 7096–7103.

- Wang, J., Zhao, B., Zhang, W., Wu, X., Wang, R., Huang, Y., Chen, D., Park, K., Weimer, B.C., Shen, Y., 2010b. Mycoepoxydiene, a fungal polyketide, induces cell cycle arrest at the G2/M phase and apoptosis in HeLa cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20, 7054–7058.
- Wang, Q., Wang, X.L., Liu, H.R., Rose, P., Zhu, Y.Z., 2010c. Protective effects of cysteine analogues on acute myocardial ischemia: novel modulators of endogenous H(2)S production. *Antioxid. Redox Signal* 12, 1155–1165.
- Wang, R., 2003. The gasotransmitter role of hydrogen sulfide. *Antioxid. Redox Signal* 5, 493–501.
- Wang, Y., Sun, Z., Chen, S., Jiao, Y., Bai, C., 2016c. ROS-mediated activation of JNK/p38 contributes partially to the pro-apoptotic effect of ajoene on cells of lung adenocarcinoma. *Tumour Biol.* 37, 3727–3738.
- Wang, Y., Yang, Z., Zhao, X., 2010d. Honokiol induces paraptosis and apoptosis and exhibits schedule-dependent synergy in combination with imatinib in human leukemia cells. *Toxicol. Mech. Methods* 20, 234–241.
- Wang, Y.B., Qin, J., Zheng, X.Y., Bai, Y., Yang, K., Xie, L.P., 2010e. Diallyl trisulfide induces Bcl-2 and caspase-3-dependent apoptosis via downregulation of Akt phosphorylation in human T24 bladder cancer cells. *Phytomedicine* 17, 363–368.
- Wu, J., Zhao, S., Zhang, J., Qu, X., Jiang, S., Zhong, Z., Zhang, F., Wong, Y., Chen, H., 2016. Over-expression of survivin is a factor responsible for differential responses of ovarian cancer cells to S-allylmercaptocysteine (SAMC). *Exp. Mol. Pathol.* 100, 294–302.
- Wu, P.P., Chung, H.W., Liu, K.C., Wu, R.S., Yang, J.S., Tang, N.Y., Lo, C., Hsia, T.C., Yu, C.C., Chueh, F.S., Lin, S.S., Chung, J.G., 2011a. Diallyl sulfide induces cell cycle arrest and apoptosis in HeLa human cervical cancer cells through the p53, caspase- and mitochondria-dependent pathways. *Int. J. Oncol.* 38, 1605–1613.
- Wu, P.P., Liu, K.C., Huang, W.W., Chueh, F.S., Ko, Y.C., Chiu, T.H., Lin, J.P., Kuo, J.H., Yang, J.S., Chung, J.G., 2011b. Diallyl trisulfide (DATS) inhibits mouse colon tumor in mouse CT-26 cells allograft model in vivo. *Phytomedicine* 18, 672–676.
- Wu, Z., Peng, H., Du, Q., Lin, W., Liu, Y., 2015. GYY4137, a hydrogen sulfide-releasing molecule, inhibits the inflammatory response by suppressing the activation of nuclear factor-kappa B and mitogen-activated protein kinases in Coxsackie virus B3-infected rat cardiomyocytes. *Mol. Med. Rep.* 11, 1837–1844.
- Xiao, D., Herman-Antosiewicz, A., Antosiewicz, J., Xiao, H., Brisson, M., Lazo, J.S., Singh, S.V., 2005. Diallyl trisulfide-induced G(2)-M phase cell cycle arrest in human prostate cancer cells is caused by reactive oxygen species-dependent destruction and hyperphosphorylation of Cdc 25 C. *Oncogene* 24, 6256–6268.
- Xiao, D., Lew, K.L., Kim, Y.A., Zeng, Y., Hahm, E.R., Dhir, R., Singh, S.V., 2006. Diallyl trisulfide suppresses growth of PC-3 human prostate cancer xenograft in vivo in association with Bax and Bak induction. *Clin. Cancer. Res.* 12, 6836–6843.
- Xiao, D., Zeng, Y., Singh, S.V., 2009. Diallyl trisulfide-induced apoptosis in human cancer cells is linked to checkpoint kinase 1-mediated mitotic arrest. *Mol. Carcinog.* 48, 1018–1029.
- Xiao, X., Chen, B., Liu, X., Liu, P., Zheng, G., Ye, F., Tang, H., Xie, X., 2014. Diallyl disulfide suppresses SRC/Ras/ERK signaling-mediated proliferation and metastasis in human breast cancer by up-regulating miR-34a. *PLoS One* 9, e112720.
- Xin, H., Wang, M., Tang, W., Shen, Z., Miao, L., Wu, W., Li, C., Wang, X., Xin, X., Zhu, Y.Z., 2016. Hydrogen sulfide attenuates inflammatory hepcidin by reducing IL-6 secretion and promoting SIRT1-mediated STAT3 deacetylation. *Antioxid. Redox Signal* 24, 70–83.
- Xu, L., Yu, J., Zhai, D., Zhang, D., Shen, W., Bai, L., Cai, Z., Yu, C., 2014. Role of JNK activation and mitochondrial Bax translocation in allicin-induced apoptosis in human ovarian Cancer SKOV3 cells. *Evid. Based Complement Altern. Med.* 2014, 378684.
- Xu, W., Chen, J., Lin, J., Liu, D., Mo, L., Pan, W., Feng, J., Wu, W., Zheng, D., 2015a. Exogenous H2S protects H9c2 cardiac cells against high glucose-induced injury and inflammation by inhibiting the activation of the NF-kappaB and IL-1beta pathways. *Int. J. Mol. Med.* 35, 177–186.
- Xu, X.H., Li, G.L., Wang, B.A., Qin, Y., Bai, S.R., Rong, J., Deng, T., Li, Q., 2015b. Diallyl trisulfide protects against oxygen glucose deprivation -induced apoptosis by scavenging free radicals via the PI3K/Akt -mediated Nrf2/HO-1 signaling pathway in B35 neural cells. *Brain Res.* 1614, 38–50.
- Yan, J., 2014. Interplay between HDAC6 and its interacting partners: essential roles in the aggresome-autophagy pathway and neurodegenerative diseases. *DNA Cell Biol.* 33, 567–580.
- Yang, G., Zhao, K., Ju, Y., Mani, S., Cao, Q., Puukila, S., Khaper, N., Wu, L., Wang, R., 2013. Hydrogen sulfide protects against cellular senescence via S-sulfhydration of Keap1 and activation of Nrf2. *Antioxid. Redox Signal* 18, 1906–1919.
- Yin, X., Zhang, J., Li, X., Liu, D., Feng, C., Liang, R., Zhuang, K., Cai, C., Xue, X., Jing, F., Wang, X., Wang, J., Liu, X., Ma, H., 2014a. DADS suppresses human esophageal xenograft tumors through RAF/MEK/ERK and mitochondria-dependent pathways. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 12422–12441.
- Yin, X., Zhang, R., Feng, C., Zhang, J., Liu, D., Xu, K., Wang, X., Zhang, S., Li, Z., Liu, X., Ma, H., 2014b. Diallyl disulfide induces G2/M arrest and promotes apoptosis through the p53/p21 and MEK-ERK pathways in human esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol. Rep.* 32, 1748–1756.
- Yu, C.S., Huang, A.C., Lai, K.C., Huang, Y.P., Lin, M.W., Yang, J.S., Chung, J.G., 2012. Diallyl trisulfide induces apoptosis in human primary colorectal cancer cells. *Oncol. Rep.* 28, 949–954.
- Zhang, J.Y., Zhang, F., Hong, C.Q., Giuliano, A.E., Cui, X.J., Zhou, G.J., Zhang, G.J., Cui, Y.K., 2015a. Critical protein GAPDH and its regulatory mechanisms in cancer cells. *Cancer Biol. Med.* 12, 10–22.
- Zhang, M., Shan, H., Chang, P., Wang, T., Dong, W., Chen, X., Tao, L., 2014a. Hydrogen sulfide offers neuroprotection on traumatic brain injury in parallel with reduced apoptosis and autophagy in mice. *PLoS One* 9, e87241.
- Zhang, X., Zhu, Y., Duan, W., Feng, C., He, X., 2015b. Allicin induces apoptosis of the MGC-803 human gastric carcinoma cell line through the p38 mitogen-activated protein kinase/caspase-3 signaling pathway. *Mol. Med. Rep.* 11, 2755–2760.
- Zhang, Y., Li, H.Y., Zhang, Z.H., Bian, H.L., Lin, G., 2014b. Garlic-derived compound S-allylmercaptocysteine inhibits cell growth and induces apoptosis via the JNK and p38 pathways in human colorectal carcinoma cells. *Oncol. Lett.* 8, 2591–2596.
- Zhao, J., Huang, W.G., He, J., Tan, H., Liao, Q.J., Su, Q., 2006. Diallyl disulfide suppresses growth of HL-60 cell through increasing histone acetylation and p21WAF1 expression in vivo and in vitro. *Acta Pharmacol. Sin.* 27, 1459–1466.
- Zhao, K., Ju, Y., Li, S., Altaany, Z., Wang, R., Yang, G., 2014a. S-sulfhydration of MEK1 leads to PARP-1 activation and DNA damage repair. *EMBO Rep.* 15, 792–800.
- Zhao, W., Zhang, J., Lu, Y., Wang, R., 2001. The vasorelaxant effect of H(2)S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. *EMBO J.* 20, 6008–6016.
- Zhao, Y., Biggs, T.D., Xian, M., 2014b. Hydrogen sulfide (H2S) releasing agents: chemistry and biological applications. *Chem. Commun. (Camb.)* 50, 11788–11805.
- Zhao, Y., Pacheco, A., Xian, M., 2015. Medicinal Chemistry: Insights into the Development of Novel H2S Donors. *Chemistry, Biochemistry and Pharmacology of Hydrogen Sulfide*. Springer Science + Business Media, pp. 365–388.
- Zhen, Y., Pan, W., Hu, F., Wu, H., Feng, J., Zhang, Y., Chen, J., 2015a. Exogenous hydrogen sulfide exerts proliferation/anti-apoptosis/angiogenesis/migration effects via amplifying the activation of NF-kappaB pathway in PLC/PRF/5 hepatoma cells. *Int. J. Oncol.* 46, 2194–2204.
- Zhen, Y., Zhang, W., Liu, C., He, J., Lu, Y., Guo, R., Feng, J., Zhang, Y., Chen, J., 2015b. Exogenous hydrogen sulfide promotes C6 glioma cell growth through activation of the p38 MAPK/ERK1/2-COX-2 pathways. *Oncol. Rep.* 34, 2413–2422.
- Zhou, X., Zhao, L., Mao, J., Huang, J., Chen, J., 2015. Antioxidant effects of hydrogen sulfide on left ventricular remodeling in smoking rats are mediated via PI3K/Akt-dependent activation of Nrf2. *Toxicol. Sci.* 144, 197–203.
- Zhou, Y., Zhuang, W., Hu, W., Liu, G.J., Wu, T.X., Wu, X.T., 2011. Consumption of large amounts of Allium vegetables reduces risk for gastric cancer in a meta-analysis. *Gastroenterology* 141, 80–89.
- Zhuang, J., Li, Y., Chi, Y., 2016. Role of p38 MAPK activation and mitochondrial cytochrome-c release in allicin-induced apoptosis in SK-N-SH cells. *Anticancer Drugs* 27, 312–317.
- Zou, X., Liang, J., Sun, J., Hu, X., Lei, L., Wu, D., Liu, L., 2016. Allicin sensitizes hepatocellular cancer cells to anti-tumor activity of 5-fluorouracil through ROS-mediated mitochondrial pathway. *J. Pharmacol. Sci.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpsh.2016.04.017>.



## Original Article

# Tubulin-binding anticancer polysulfides induce cell death via mitotic arrest and autophagic interference in colorectal cancer



Esmay Yagdi Efe<sup>a</sup>, Aloran Mazumder<sup>b</sup>, Jin-Young Lee<sup>b</sup>, Anthoula Gaigneaux<sup>a</sup>, Flavia Radogna<sup>a</sup>, Muhammad Jawad Nasim<sup>c</sup>, Christo Christov<sup>d</sup>, Claus Jacob<sup>c</sup>, Kyu-Won Kim<sup>b</sup>, Mario Dicato<sup>a</sup>, Patrick Chaimbault<sup>e</sup>, Claudia Cerella<sup>a</sup>, Marc Diederich<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer, Hôpital Kirchberg, 9, rue Edward Steichen, L-2540 Luxembourg, Luxembourg

<sup>b</sup> College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul, 08826, South Korea

<sup>c</sup> Division of Bioorganic Chemistry, School of Pharmacy, Saarland University, Campus B 2.1, D-66123 Saarbrücken, Germany

<sup>d</sup> University of Lorraine, Service Commun de Microscopie, Nancy, France

<sup>e</sup> SRSMC, UMR7565, University of Lorraine, Metz, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 16 August 2017

Received in revised form

14 September 2017

Accepted 15 September 2017

## Keywords:

Diallyl sulfide

Mitotic arrest

Cell death

Autophagic flux

Zebrafish xenografts

## ABSTRACT

Polysulfanes show chemopreventive effects against gastrointestinal tumors. We identified diallyl tetrasulfide and its derivative, dibenzyl tetrasulfide (DBTTS), to be mitotic inhibitors and apoptosis inducers. Here, we translate their application in colorectal cancer (CRC). MALDI-TOF-MS analysis identified both compounds as reversible tubulin binders, validated by *in cellulo*  $\alpha$ -tubulin degradation. BRAF(V600E)-mutated HT-29 cells were resistant to DBTTS, as evidenced by mitotic arrest for 48 h prior to apoptosis induction compared to KRAS(G12V)-mutated SW480/620 cells, which committed to death earlier. The prolonged mitotic block correlated with autophagy impairment and p62 protein accumulation in HT-29 but not in SW480/620 cells, whereas siRNA-mediated p62 inhibition sensitized HT-29 cells to death. *In silico* analysis with 484 colorectal cancer patients associated higher p62 expression and reduced autophagic flux with greater overall survival. Accordingly, we hypothesized that DBTTS targets CRC survival/death through autophagy interference in cell types with differential autophagic capacities. We confirmed the therapeutic potential of DBTTS by the inhibition of spheroid and colony formation capacities in CRC cells, as well as in HT-29 zebrafish xenografts *in vivo*.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Abbreviations:** Baf, bafilomycin A1; BRAF, v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B; CFAs, colony formation assays; CHCA,  $\alpha$ -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid; CHX, cycloheximide; CIMP, CpG island methylator phenotype; CIN, chromosomal instability; CRC, colorectal cancer; DATTS, diallyl tetrasulfide; DBTTS, dibenzyl tetrasulfide; DHB, 2,5-dihydroxybenzoic acid; EGFR, epithelial growth factor receptor; FDR, false discovery rate; GO, gene ontology; HO, heme-oxygenase; KEAP1, kelch-like ECH-associated protein 1; KRAS, v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog; LC3, microtubule-associated protein light chain 3; MALDI-TOF-MS, matrix assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry; MSI, microsatellite instability; MTA, microtubule-altering agent; mTOR, mammalian target of rapamycin; NRF2, nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2; NF- $\kappa$ B, nuclear factor-kappa B; OSC, organic sulfur compound; PGP, p-glycoprotein; PI, propidium iodide; PIK3CA, phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase; PTEN, phosphatase and tensin homolog; Q-RT-PCR, quantitative real-time polymerase chain reaction; ROS, reactive oxygen species; SD, standard deviation; siRNA, small inhibitor RNA; TEM, transmission electron microscopy; TFA, trifluoroacetic acid; TP53, tumor protein 53; TREAT, t-tests relative to a threshold.

\* Corresponding author. Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Seoul National University, Building 29 Room 233, 1 Gwanak-ro, Gwanak-gu, Seoul, 08826, South Korea.

E-mail address: [marcdiederich@snu.ac.kr](mailto:marcdiederich@snu.ac.kr) (M. Diederich).

## Introduction

Despite progress in molecular testing and identification of predictive biomarkers, colorectal cancer (CRC) remains the second leading cause of cancer-related deaths worldwide. Chemotherapy is associated with limited efficacy in tumors at stages  $\geq$  II. KRAS (V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog), PIK3CA (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase), and BRAF (v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B) are among the most frequently mutated oncogenes [1,2]. Testing for KRAS/BRAF status is a criterion for prognostic stratification, used primarily as an unfavorable marker to preclude specific therapies (e.g., anti-epithelial growth factor receptor [EGFR] therapy). Additionally, a high percentage of patients with one or both of these mutations do not respond to all major drug combination regimens, including those involving monoclonal antibodies. The reasons behind this lack of response are still unclear in most cases.

Many epidemiological studies have confirmed the chemopreventive effect of a diet that includes onions and garlic. Subsequent experimental studies have identified organic sulfur compounds (OSCs), specifically polysulfanes, as potential targets for anticancer drug development [3]. Tumors of the gastrointestinal tract could potentially benefit from the chemopreventive effect of OSOs. We previously showed that garlic-derived OSOs targeted the microtubular network and inhibited tubulin polymerization, leading to mitotic arrest [4]. Benzyl tetrasulfide (DBTTS), a derivative of the natural compound diallyl tetrasulfide (DATTS), has demonstrated improved pharmacological and anti-cancer properties compared to its naturally occurring counterpart [5]. Moreover, DBTTS diffuses and crosses membrane barriers without requiring specific transport systems for internalization or extrusion [6].

Blocking mitotic progression by targeting microtubules of proliferating tumor cells is a consolidated strategy, which relies on prototypical natural agents such as *Vinca* alkaloids (*Vinca rosea*) or taxanes (*Taxus brevifolia*) [7] and more recently, epothilones (i.e., *Sporangium cellulosum*) [8]. Mitotic inhibitors are widely used in combination treatments for various types of lung, bladder, and ovarian tumors. However, they are currently not in clinical use to treat colon cancer, a disease that exhibits a high level of chemoresistance towards spindle poisons, as taxanes have failed to provide significant clinical benefits in phase II trials [9]. P-glycoproteins (PGPs) are highly expressed in the gastrointestinal tract and contribute to resistance to paclitaxel [10].

Increased rates of autophagy are a hallmark of colorectal cancer. The most frequently administered 5-fluorouracil promotes autophagy, and strategies that involve impairing the autophagic flux can sensitize colon cancer cells to death [11]. As the modulation of the microtubular network impacts progression of the autophagic flux, novel compounds interfering with the autophagic flux in CRC could lead to therapeutic improvement.

In this study, the tubulin binder DBTTS triggered mitotic arrest followed by apoptosis in both KRAS(G12V)-mutated SW480/SW620 and BRAF(V600E)-mutated HT-29 cells. In HT-29 cells, stalled autophagy was concomitant with the accumulation of the p62 protein in mitotically arrested cells. Conversely, siRNA-mediated targeting of p62 sensitized cells to apoptosis. Autophagosomes also accumulated in DBTTS-treated SW480/SW620 cells concomitant with apoptosis induction. We validated the anti-cancer potential of DBTTS in 3D spheroid and colony formation assays, which was further confirmed by *in vivo* inhibition of HT-29 xenograft growth in zebrafish. Altogether, our results provide evidence of the *in vitro* and *in vivo* capacity of DBTTS to efficiently target CRC, pointing to the existence of a cell-type dependent autophagy impairment involving p62.

## Materials and methods

### Cell culture and reagents

The colorectal cancer cell lines HT-29 (Deutsch Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ, Leibniz, Germany), SW480, and SW620 (American Type Culture Collection, ATCC, Manassas, VA, USA) were cultured in RPMI 1640 medium (BioWhittaker, Lonza, Verviers, Belgium) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (Sigma-Aldrich, Bornem, Belgium) and 1% (v/v) antibiotic-antimycotic (BioWhittaker). Cells were seeded at a density of  $3 \times 10^5$  cells/ml in 6-well plates to achieve a confluence of 60% at the moment of treatment, after a 24 h incubation in a humidified atmosphere at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>.

DATTS and DBTTS were synthesized, as previously described [5], with DBTTS showing improved solubility in aqueous media, reduced volatility and odor, powder consistency, and suitable lipophilicity to cross membranes by Lipinski's Rule of Five [5]. DATTS and DBTTS were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO; stock solution: 50 mM). Vinblastine, vincristine (stock solutions: 1.2 mM), and paclitaxel (stock solution: 7 mM), were obtained from Teva® Pharmaceutical Industries (Petach Tikva, Israel) as ready-to-use injectable solutions; intermediate stocks were freshly prepared and dissolved in sterile water. The vacuolar pump inhibitor bafilomycin A1 (Baf; 10 nM, stock solution: 100 μM) and the mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor PP242 (10 μM, stock solution: 10 mM) were obtained from Sigma-Aldrich. The protein synthesis inhibitor cycloheximide (CHX; 10 μM,

stock solution: 10 mM) and the proteasome inhibitor MG132 (5 μM, stock solution: 50 mM) were purchased from Calbiochem (Leuven, Belgium). All compounds were dissolved in DMSO.

### Cell viability measurement and apoptosis assessment

Cell viability was measured using 1 mg/ml of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT) reagent (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions. Apoptosis was assessed through morphological analysis of the nucleus following Hoechst 33342 staining (1 μg/ml, 15 min; Sigma-Aldrich) using fluorescence microscopy (Olympus, Aartselaar, Belgium) [12].

### Cell cycle assessment

Cell cycle was analyzed according to standard procedures. Briefly, adherent cells were trypsinized, and both floating and trypsinized cells were harvested. After centrifugation (5 min, 1200 rpm), pellets were fixed with 70% (v/v) ethanol for at least 40 min on ice. Cells were incubated for 20 min in phosphate buffer solution (PBS) containing one μg/ml of propidium iodide (PI; Becton Dickinson Biosciences, Erembodegem, Belgium) and 100 μg/ml RNase A (Roche, Luxembourg). Flow cytometry (FACScalibur, BD Biosciences, San José, CA, USA), with the CellQuest software (BD Biosciences, Erembodegem, Belgium), was used to record 10,000 events/sample. Data were analyzed with the FlowJo887 software (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA).

### Caspase-3/7 assay

The caspases-3/-7 activity assay was assessed using Caspase-3/-7<sup>®</sup> Glo assay purchased from Promega (Leiden, The Netherlands). Cells ( $2.0 \times 10^3$ ) treated with/without 50 μM of DBTTS were incubated for 1 h at room temperature with 50 μl of reagent. Caspase activity was monitored using a Centro LB 960 plate-reading luminometer (Berthold, Bad Wildbad, Germany).

### Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) analysis

**Chemicals and reagents.** All solvents were high-performance liquid chromatography (HPLC) grade. Acetonitrile was obtained from Thermo Fisher Scientific (Geel, Belgium), and 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) and  $\alpha$ -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid (CHCA) were obtained from Sigma-Aldrich (St Quentin-Fallavier, France). Trifluoroacetic acid (TFA) was purchased from Merck Schuchardt (Hohenbrunn, Germany). HTS tubulin (purity of 97%, Cat #HTS02-B/092) and the tubulin buffer (Cat #BST01-001/069) were purchased from Cytoskeleton (Boechout, Belgium).

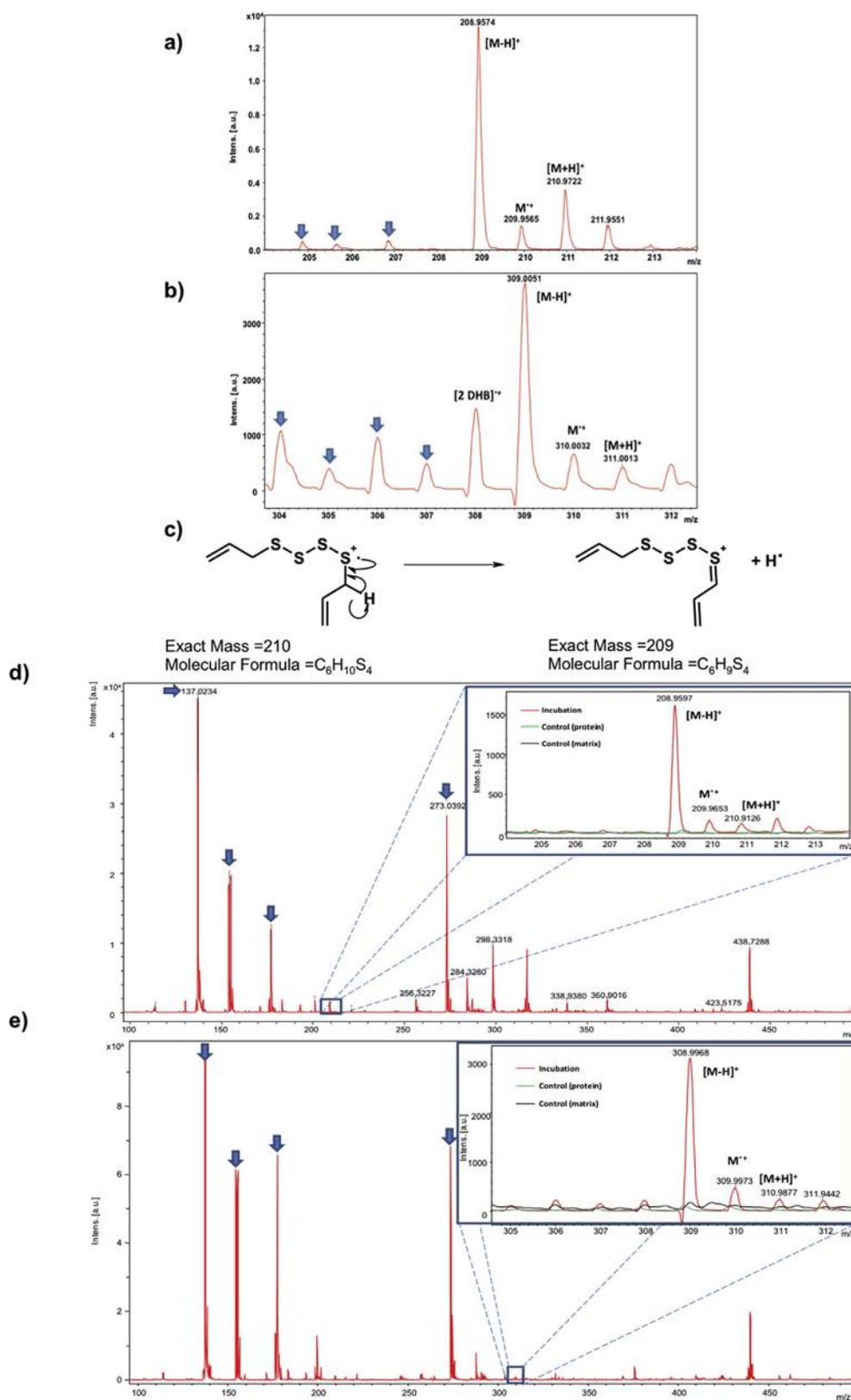
**Matrices.** Different matrices and solvent conditions were evaluated to analyze DATTS and DBTTS using MALDI-TOF-MS. These conditions are listed in Table 1. All depositions were made using the dried-droplet method with an analyte/matrix ratio of 1 to 1.

**MALDI-TOF-MS.** MALDI-TOF-MS measurements were carried out on a Bruker ultraflex II TOF/TOF mass spectrometer (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany), equipped with the SCOUT 384 probe ion source, using a nitrogen pulsed laser (337 nm, model VSD-337ND; Laser Science Inc., Boston, MA, USA) with an output energy of 400 μJ/pulse. The ions were accelerated without delayed extraction conditions in positive ion mass reflectron mode with ion source 1 (IS1) set to 25.13 kV, ion source 2 set to 21.18 kV (84.4% IS1), the lens set to 9.05 kV (36% IS1), the reflector set to 26.43 kV (13.87 kV [52.5% reflection]), using the "RP\_0-1kDa.par" method. All spectra data presented resulted from four series of 200 laser shots from four different locations ([M+H]<sup>+</sup> for the different species). The positive ions were accelerated with a 200-ns extraction delay. The source pressure was 10<sup>-6</sup> mbar, and the analyzer pressure was 10<sup>-7</sup> mbar. Mass spectra were manually acquired, using FlexControl (Bruker Daltonik GmbH) software, by accumulating four series of 1000 laser shots, and the respective analysis was performed using the FlexAnalysis software. Internal calibration was conducted using DHB or CHCA matrix peaks, depending on the matrix used. The DHB peaks used were: the DHB monoisotopic peak, *m/z* 154.02606 (M<sup>+</sup>), *m/z* 155.03389 ([M+H]<sup>+</sup>), *m/z* 273.03936 ([2M-2H2O]<sup>+</sup>), *m/z* 137.0233 ([M-OH]<sup>+</sup>), *m/z* 308.0532 ([2M]<sup>+</sup>), and values of DHB adducts with ions such as Na<sup>+</sup> (*m/z* 177.0158) and K<sup>+</sup> (*m/z* 192.9898). The CHCA

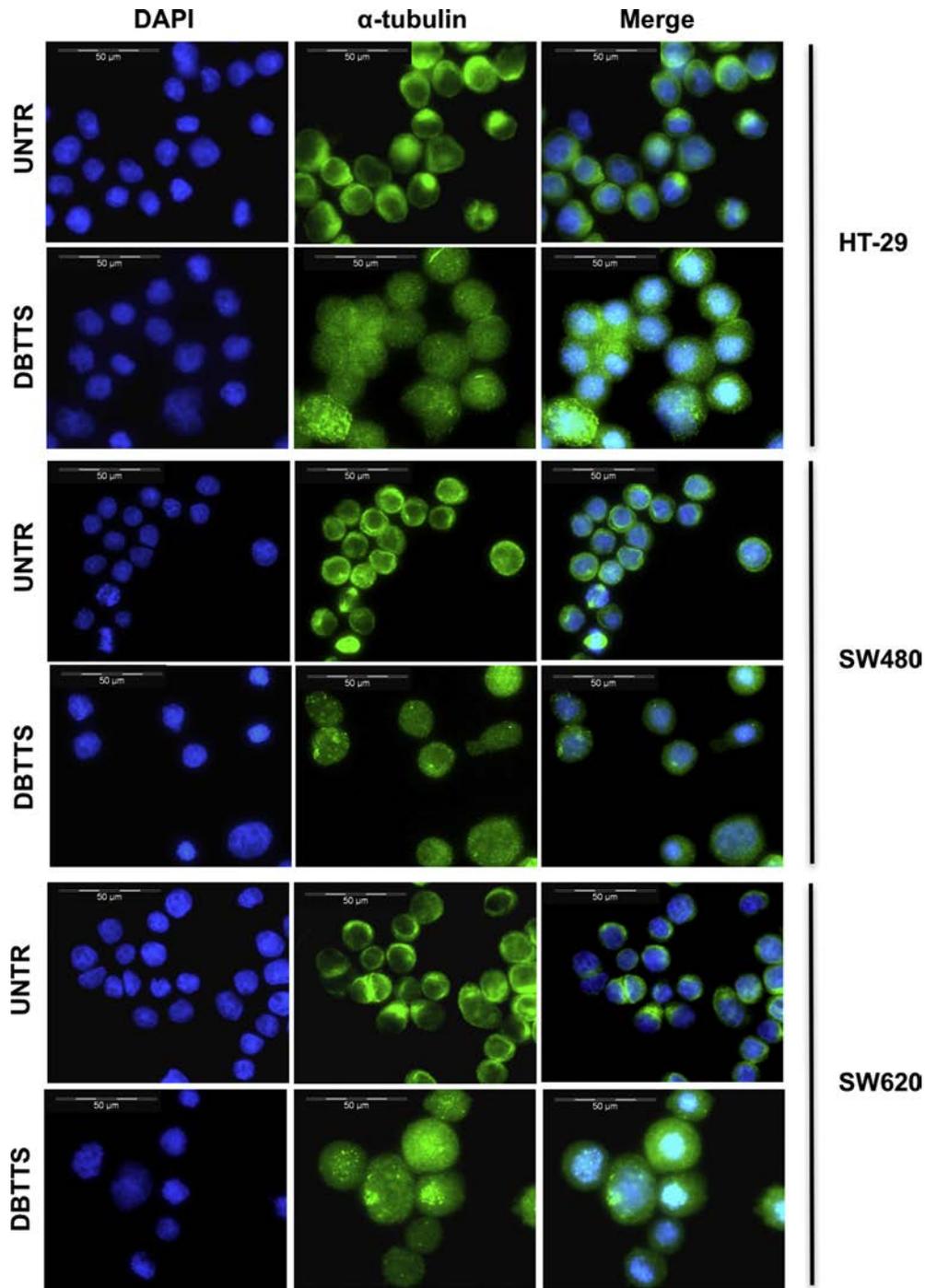
**Table 1**

Development and optimization of the MALDI-TOF-MS conditions. Observed ions in MALDI-TOF-MS for DATTS and DBTTS are reported with related statistics for the incubated samples.

| Compounds | Observed ions      | Observed <i>m/z</i> | Theoretical <i>m/z</i> | Δ <i>m</i> (ppm) |
|-----------|--------------------|---------------------|------------------------|------------------|
| DATTS     | [M-H] <sup>+</sup> | 208.9597            | 208.9587               | 4.8              |
|           | M <sup>+</sup>     | 209.9653            | 209.9665               | 5.7              |
|           | [M+H] <sup>+</sup> | 210.9126            | 210.9685               | -28              |
| DBTTS     | [M-H] <sup>+</sup> | 308.0051            | 308.9968               | 22               |
|           | M <sup>+</sup>     | 310.0032            | 309.9973               | -1.6             |
|           | [M+H] <sup>+</sup> | 311.0013            | 310.9877               | -57              |



**Fig. 1. DATTs and DBTTs are reversible tubulin binders.** MALDI-TOF-MS of **a)** DATTs and **b)** DBTTs.  $[2 \text{ DHB}]^{2+}$  corresponds to a dimer ion from the matrix (2,5-dihydroxybenzoic acid) and blue arrows corresponds to other interferences. **c)** Possible formation of the  $[M-H]^+$  fragment ion at  $m/z$  209 from the molecular ion  $M^+$  for DATTs. **d)** MALDI-TOF-MS of tubulin incubated with DATTs. The window represents a zoom in the  $m/z$  204 to 214 region, corresponding to the DATTs ions. Blue arrows correspond to matrix peaks. **e)** MALDI-TOF-MS of tubulin incubated with DBTTs. The window represents a zoom in the  $m/z$  304 to 313 region, corresponding to the DBTTs ions. In both windows, the matrix signal (matrix alone) appears in black, the protein signal appears in green (matrix + tubulin), and the incubation (matrix + DATTs or DBTTs incubated with tubulin) appears in red. Blue arrows correspond to matrix peaks. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).



**Fig. 2. DBTTS modulates the microtubule network.** Immunofluorescence *in situ* analysis of changes induced in the tubulin pattern by DBTTS ( $IC_{50}$ ) treatment (24 h) in HT-29, SW480, and SW620 cells (images are representative of three independent experiments).

**Table 2**

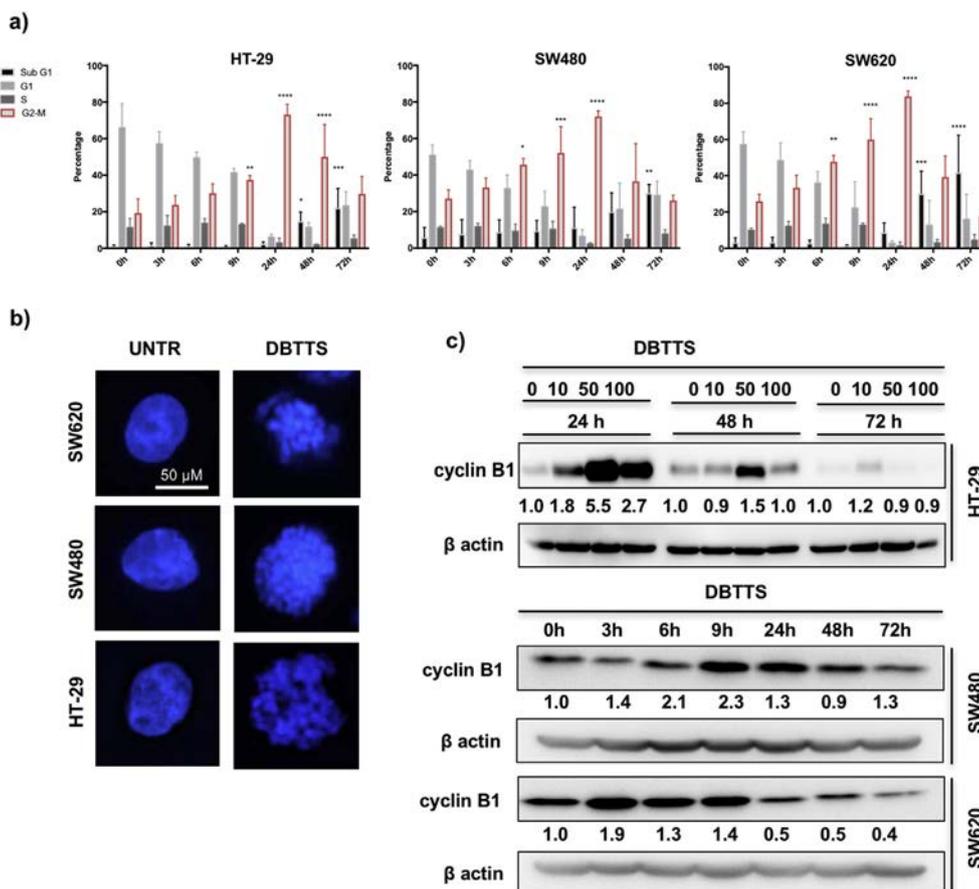
DBTTS  $IC_{50}$  in CRC cell lines. DATTS and DBTTS  $IC_{50}$  values ( $\mu M$ ) were calculated using the MTT test. Data are the mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).

|       | $IC_{50}$ ( $\mu M$ ) |                 |                 |                   |                |                 |
|-------|-----------------------|-----------------|-----------------|-------------------|----------------|-----------------|
|       | DATTS ( $\mu M$ )     |                 |                 | DBTTS ( $\mu M$ ) |                |                 |
|       | 24 h                  | 48 h            | 72 h            | 24 h              | 48 h           | 72 h            |
| HT-29 | >100                  | >100            | >100            | >100              | $41.5 \pm 4.9$ | $23.4 \pm 10.5$ |
| SW480 | >100                  | >100            | >100            | $26.6 \pm 8.9$    | $9.4 \pm 5.6$  | $7.7 \pm 3.2$   |
| SW620 | >100                  | $37.1 \pm 13.0$ | $24.9 \pm 12.5$ | $7.7 \pm 5.5$     | $1.5 \pm 0.2$  | $1.1 \pm 0.7$   |

peaks used were: the CHCA monoisotopic peak,  $m/z$  189.0420 ( $M^{*+}$ ),  $m/z$  190.0454 ( $[M+H]^+$ ),  $m/z$  379.0925 ( $[2M]^+$ ), and  $m/z$  values of CHCA adducts with  $K^+$   $m/z$  228.00575.

#### Western blot analysis

Protein extracts (40  $\mu g$ ) and western blot were carried out as previously described [13]. Membranes were blocked using phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.1% Tween and 5% milk or bovine serum albumin (BSA) before incubation with the primary antibody (dilution 1:1000), which included:  $\alpha$ -tubulin (CP06; Calbiochem); cyclin B1 (05-373; Merck Millipore, Overijs, Belgium); p62 and caspase-3 (sc-28359, sc-7272; Santa Cruz Biotechnology, Boechout, Belgium);



**Fig. 3.** DBTTS leads to mitotic arrest and apoptosis in HT-29, SW480, and SW620 cells. **a)** Cell cycle assessment after PI staining and flow cytometric analysis in HT-29, SW480, and SW620 cells (three independent experiments  $\pm$  SD). \*, \*\*, \*\*\* indicate  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.0005$ , respectively. **b)** Analysis of nuclear morphology using Hoechst staining after treatment with 50  $\mu$ M (HT-29) or 10  $\mu$ M (SW480 and SW620) of DBTTS. **c)** Kinetic analysis of cyclin B1 expression using western blot at indicated times/concentrations of DBTTS in HT-29, SW480, and SW620 cells. All results are representative of three independent experiments. \*, \*\*, \*\*\* indicate  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.0005$ , respectively. Two-way ANOVA test (cell cycle); posthoc: Dunnett's test.

LC3B (L7543; Sigma Aldrich). This was followed by incubation with the corresponding secondary antibody (dilution 1:4000; for LC3B, dilution 1:20,000), horseradish peroxidase (HRP)-conjugated, for 1 h at room temperature (Santa Cruz Biotechnology).  $\beta$ -actin (A5316, dilution 1:10,000 for the primary and secondary antibody; Sigma Aldrich) and Coomassie blue (LKB, Villeneuve-la-Garenne, France) were used as loading controls. After visualization of the protein bands by chemiluminescence using the ECL + Western Blotting Detection System kit (GE 36 Healthcare, Roosendaal, The Netherlands), blot quantifications were performed using the ImageJ software (version 1.43u; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA; <http://rsbweb.nih.gov/ij/>), and results were normalized to the control.

#### Immunofluorescence

Cells ( $3 \times 10^5$ ) were seeded in 6-well plates and treated with DBTTS (50  $\mu$ M) for 24 h. At the end of the treatment, cells were fixed for 20 min at 4  $^{\circ}$ C, then permeabilized using Cytotfix/Cytoperm™ (BD Biosciences). Cells were washed twice with the Cytowash/Cytoperm™ solution, then incubated with the primary antibodies,  $\alpha$ -tubulin (CP06; Calbiochem) or p62 (sc-28359; Santa Cruz Biotechnology), for 1 h at room temperature, followed by the corresponding Alexa-Fluor dye conjugated secondary antibody (488 nm goat anti-mouse, 568 nm goat anti-rabbit; Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Tournai, Belgium) for 30 min at room temperature. Samples were washed twice and then analyzed by fluorescence microscopy using the cell™ software (Olympus).

#### Proteasome activity assay

Proteasome-Glo™ cell-based assays (Chymotrypsin-like/Caspase-like/Trypsin-like; Promega) were used according to the manufacturer's instructions. Cells were treated with the indicated concentrations of DBTTS or MG132; the luminescence signal was quantified using a luminometer. Cell viability was measured in parallel using the Cell Titer-Glo® Luminescent Cell Viability Assay kit (Promega). Data were normalized to the control.

#### Electron microscopy

At least  $3 \times 10^6$  cells were prepared as previously described [14]. Ultrathin sections were analyzed using a high-resolution transmission electron microscope (TEM; JEM 3010; JEOL Ltd., Tokyo, Japan).

#### Colony formation assays

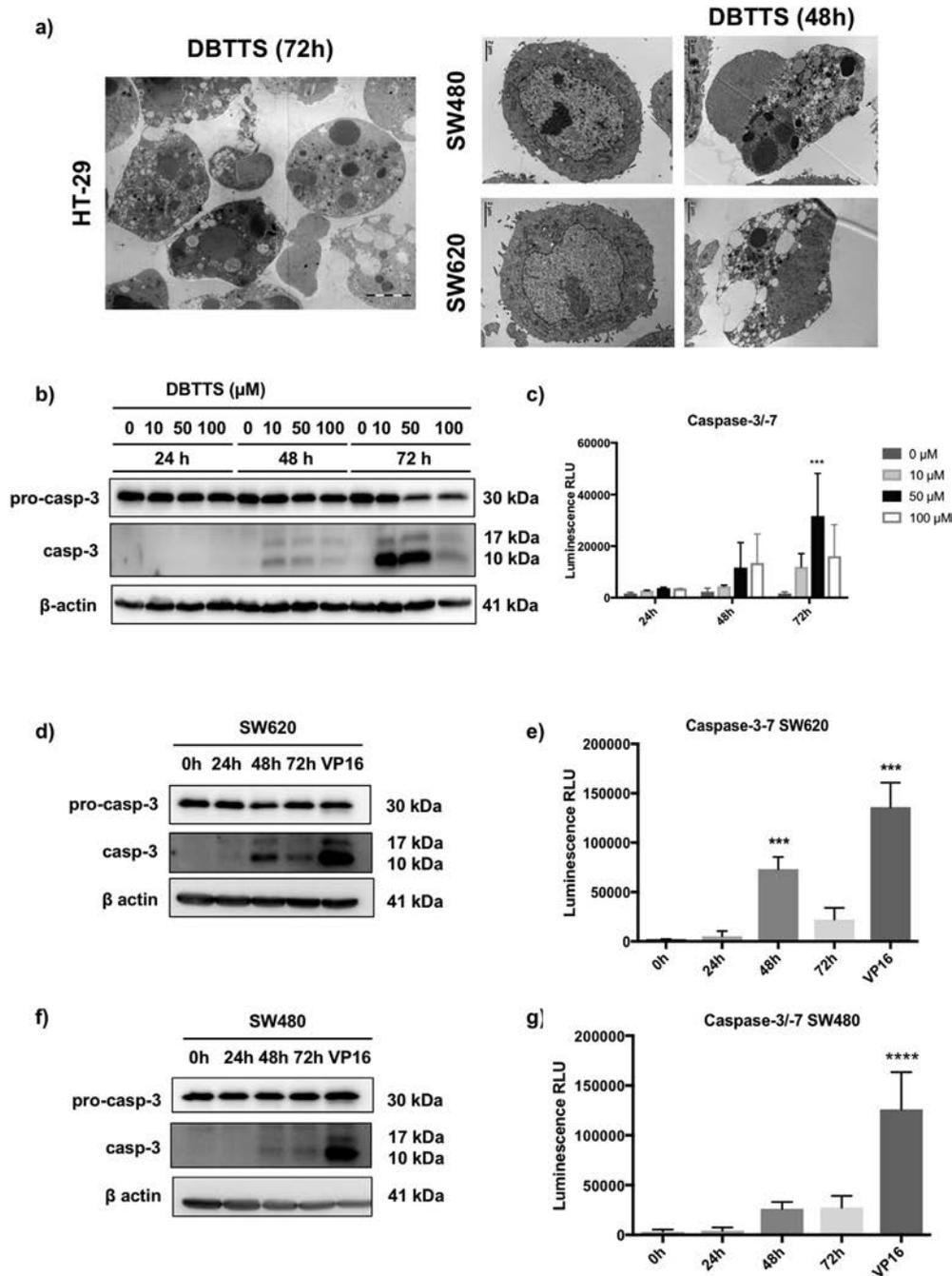
HT-29, SW480, and SW620 cells ( $10^3$  cells/ml) were grown in semi-solid methylcellulose-based medium (Methocult H4230; StemCell Technologies Inc., Vancouver, Canada) supplemented with DBTTS at indicated concentrations. After 10 days, colonies were detected after incubation for 10 min with 1 mg/ml of MTT reagent (Sigma-Aldrich). Clones were scored using the ImageJ software (U.S. National Institute of Health).

#### Generation of HT-29 spheroids

Spheroids were generated using the hanging drop method [15] with modifications. Briefly, 30  $\mu$ l drops of complete medium containing DBTTS, vincristine, or paclitaxel at indicated concentrations and  $1 \times 10^3$  HT-29 cells each were seeded on the cover of a Petri dish containing 10 ml of PBS. After 4 days of incubation, spheroid growth was evaluated by light microscopy (Olympus) to estimate the spheroid area using the ImageJ software. Cell viability of spheroids was assessed using the luminescent Celltiter-Glo® 3D cell viability assay according to the manufacturer's instructions.

#### In vivo assay

Wild type zebrafish (*Danio rerio*) were maintained according to Seoul National University (SNU) guidelines [12]. For cancer xenograft assays,  $2 \times 10^2$  HT-29 cells, untreated or treated with DBTTS at indicated concentrations for 48 h and stained at the last 2 h of incubation with 4  $\mu$ M of the Cell tracker CM-Dil dye (Invitrogen™, Seoul, Korea), were injected into the yolk sac of at least 10 zebrafish (PV820 microinjector; World Precision Instruments, FL, USA). Injected zebrafish were



**Fig. 4.** DBTTS induces apoptotic cell death in HT-29, SW480, and SW620. **a)** Transmission electron microscopy showing apoptotic features in the three cell models. Analysis of caspase-3 cleavage by western blot in HT-29 (**b**), SW620 (**d**), SW480, (**f**) and the corresponding caspase-3/-7 activity assay in the three cell models (**c**, **e**, **g**) after incubation with 0, 10, 50, 100 μM of DBTTS in HT-29 cells and 10 μM DBTTS in SW620 and SW480 cells. Etoposide (VP16, 20 μM) was used as a positive control. All results are representative of three independent experiments. \*, \*\*, \*\*\*\* indicate  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.0005$ , respectively, compared to control cells. Two-way (cell cycle) or one-way ANOVA test (caspase activity assay); posthoc: Dunnett's test.

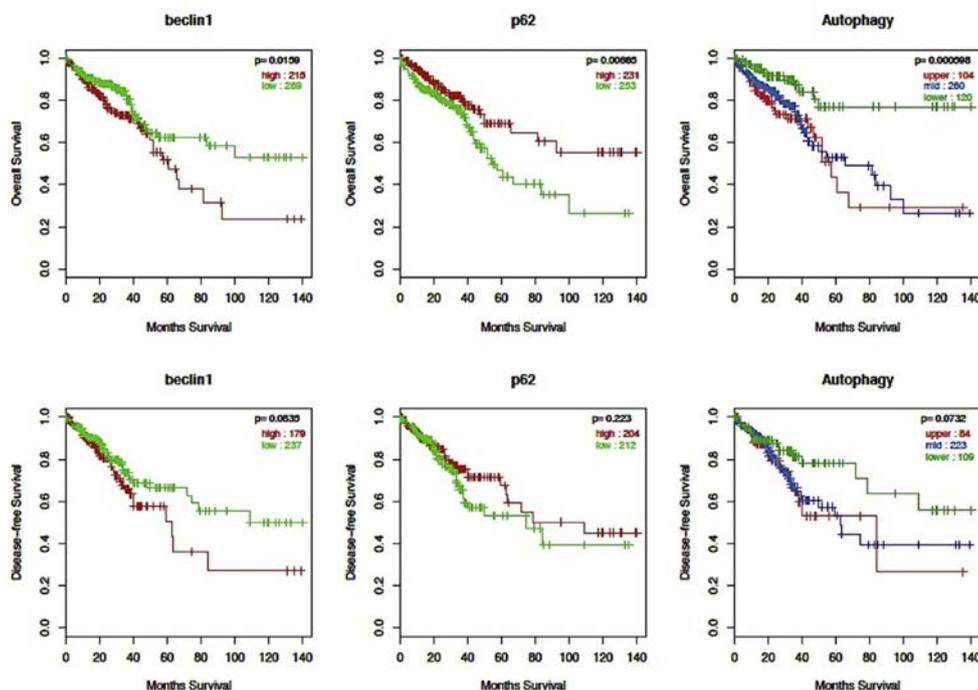
incubated in 96-well plates containing Danieau's solution with 0.003% phenylthiourea (PTU) at 28.5 °C for 72 h, then transferred onto a glass slide and immobilized in a drop of 3% methylcellulose in Danieau's solution to take pictures with a fluorescence microscope (Leica DE/DM 5000B, Seoul, Republic of Korea). The tumor fluorescence area was quantified using the ImageJ software.

#### Transfections

**DNA plasmid.** Cells ( $3 \times 10^5$ ) were grown on 6-well plates or glass coverslips and then transfected with Lipofectamine<sup>®</sup> LTX and Plus<sup>™</sup> reagent (Invitrogen<sup>™</sup>), according to the manufacturer's instructions, with the pSELECT-GFP-hLC3 (psetz-gfp3; InvivoGen, Toulouse, France) fusion gene. Cells transfected with the GFP-LC3 plasmid for 24 h were treated with DBTTS for 24 h followed by Baf treatment. The

percentage of GFP-LC3-positive cells with punctae formation per positive cell were assessed using fluorescence microscopy (Olympus).

**Small inhibitor RNAs.** A double silencing procedure was performed as follows: HT-29 cells were seeded at  $1.125 \times 10^5$  cells/ml in 25 cm<sup>2</sup> flask; after 24 h, they were transfected with small inhibitor RNAs against human SQSTM1 (SI03089023, SI03116750; QIAGEN, Venlo, The Netherlands) using INTERFERin<sup>®</sup> reagent (Polyplus, Illkirch, France), according to the manufacturer's instructions. In parallel,  $1.125 \times 10^5$  cells/ml in 25 cm<sup>2</sup> flasks were incubated in the presence of AllStars negative control siRNA (QIAGEN) or transfection reagent only (Polyplus). After 48 h, cells were harvested by trypsinization and seeded again at  $3 \times 10^5$  cells/ml. After 24 h, transfection was repeated. After 72 h, p62-knockdown cells were seeded at a concentration of  $3 \times 10^5$  cells/well and after 24 h treated with 50 μM DBTTS.



**Fig. 5. Survival depending on autophagy in colorectal cancer.** Overall (upper panel) and disease-free (lower panel) survival curves in all provisional TCGA colorectal samples with protein expression data. Number of samples per group and p-value (log-rank test) are shown. Samples were split into expression groups according to expression z-scores ( $z \leq 0$  or  $z > 0$ ). Autophagy groups were defined from combined beclin 1 and p62 expression levels.

#### Gene expression analyses using quantitative real-time polymerase chain reaction (Q-RT-PCR)

RNA extraction, reverse transcription, and real-time PCR were carried out as previously described [13]. The following primers (Eurogentec, Liège, Belgium) were used:  $\beta$ - (forward 5'-CTCTTCCAGCCCTTCCT-3', reverse 5'-AGCACTGTGTGGCG-TACAG-3'), *SQSTM1* (forward 5'-GAGGATCCGAGTGTGAATTCCT-3', reverse 5'-CTCTTTTCCCTCCGTCTCC-3'), *heme oxygenase-1* (forward 5'-TGAACCTCCCTGGA-GATGACTC-3', reverse 5'-AGCTCTGCAACTCTCTCAA-3').

#### Reactive oxygen species generation

Cells ( $1 \times 10^4$ ) were seeded in 96-well plates and then treated with DBTTS (50 or 10  $\mu$ M) at indicated times. At the end of the treatment, cells were labeled with 10  $\mu$ M of 2',7' dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCF-DA; Life Technologies, Gent, Belgium). Fluorescence was measured using the SpectraMax Gemini EM fluorometer and SoftmaxPro5 software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

#### Differential transcriptomic analysis in cell lines

Analyses were performed using the R platform (ver. 3.3.1) and Bioconductor [16]. Data were retrieved using GEOquery [17]. We used data from the dataset GSE20298 [18], containing 44 samples of 12 cell lines. Differential analysis was performed using limma library [19], taking into consideration all arrays of the dataset. Differential expression was computed for the following contrasts: SW620 vs. SW480, SW620 vs. HT-29, and SW480 vs. HT-29, in triplicate. P-values were adjusted for multiple comparisons using the false discovery rate (FDR) method [20]. We considered genes with a fold change larger than 2 and an FDR p-value smaller than 0.05 as significant, using the t-tests relative to a threshold (TREAT) method [21].

#### Association between protein expression and patient survival

Protein expression data were retrieved from the TCGA provisional colon cancer dataset [1] using the cgdpr package [22]. Groups were defined on the basis of normalized protein expression levels (z-score); patients were defined as having a low (z-score  $< 0$ ) or high (z-score  $> 0$ ) expression profile. For autophagy, groups were defined from the combination of beclin 1 and p62 expression; samples with high levels of beclin 1 and low levels of p62 were considered "high autophagy" ( $N = 104$ ), while samples with low beclin 1 and high p62 were considered "low autophagy" ( $N = 120$ ). Samples with mixed levels for these proteins were put in the intermediate group ( $N = 260$ ). Survival curves were analyzed via the log-rank (Mantel-Haenszel) test, using the survival package [23,24]. All analyses were performed in the R environment (ver. 3.2.3) [16].

#### Statistical analyses

Data are the mean of three independent experiments  $\pm$  standard deviation (SD). Statistical analyses were carried out using the GraphPad Prism 6.0 software (La Jolla, CA, USA), specifically, one-way or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by indicated post hoc analyses. P-values below 0.05 were considered statistically significant.

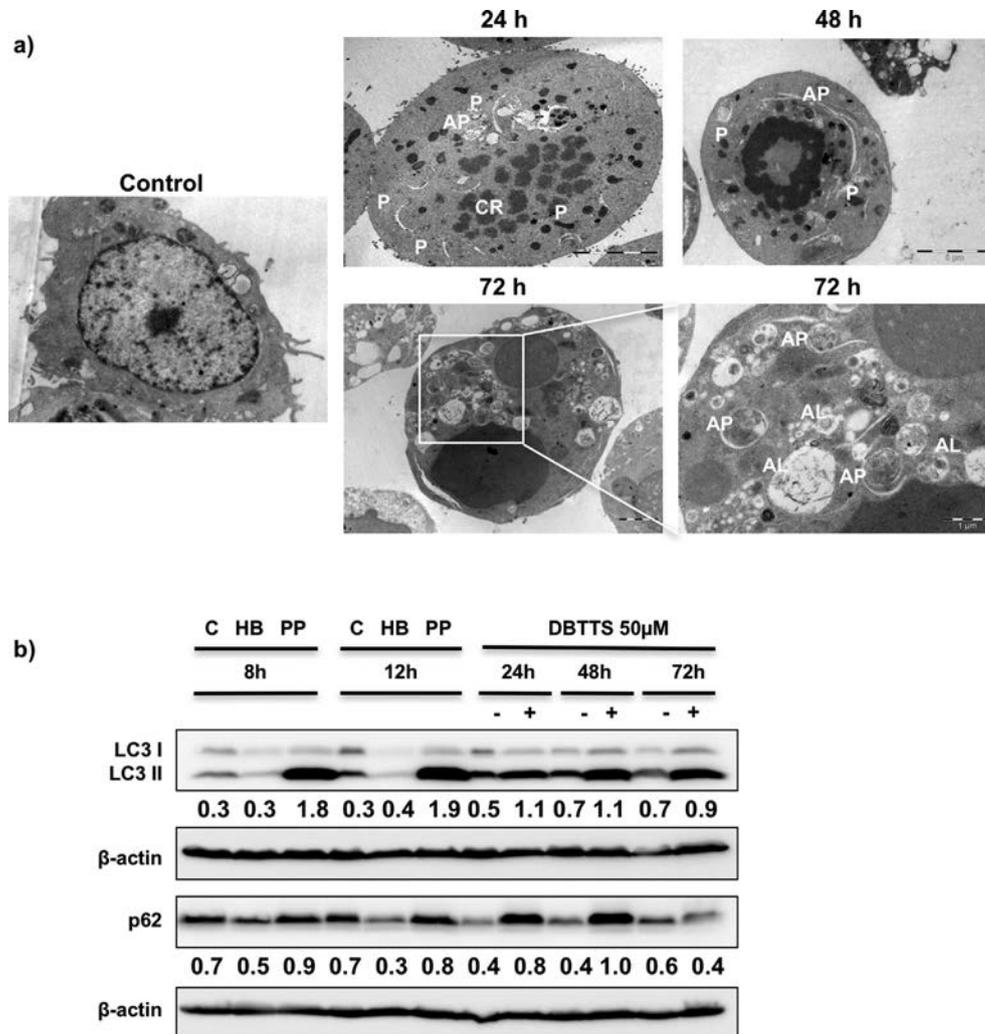
## Results

### DATTS and DBTTS are reversible tubulin binders

To assess the primary pharmacological target of diallyl sulfides, we assessed the binding of DATTS and DBTTS to tubulin using MALDI-TOF-MS [25,26], based on our previously published data. Overall, incubation of tubulin peptides with DATTS/DBTTS validated both compounds as direct and reversible tubulin binders. Observed ions are summarized in Table 1. Mass spectra for DATTS and DBTTS are presented in Fig. 1a-b. The expected ions,  $M^+$  and  $[M+H]^+$ , were observed for both compounds with the main peak corresponding to a fragment with a loss of a proton, indicative of the possible formation of the  $[M+H]^+$  fragment ion at  $m/z$  209 from the molecular ion  $M^+$  for DATTS (Fig. 1c). The same mechanism may be involved in the formation of  $m/z$  309 for DBTTS. Signals of DATTS appeared in the mass spectrum, leading to the conclusion that DATTS behaves as a reversible inhibitor of tubulin (Fig. 1d). Similar conclusions may be drawn for DBTTS, although the interference of the matrix was more abundant around  $m/z$  300 than around  $m/z$  200. Moreover, the signal to noise ratios were weaker than those obtained with DATTS (Fig. 1e).

### Differential colon cancer cell line sensitivity to DBTTS

We then investigated tubulin-targeting properties and verified any differential tubulin expression patterns through an *in silico*



**Fig. 6. DBTTS induces autophagy flux impairment in HT-29 cells.** a) TEM pictures of HT-29 cells treated with IC<sub>50</sub> values of DBTTS. a-c) Corresponding magnifications show autophagosome (AP), autophagolysosome (AL), chromatin (CR), euchromatin (E), mitochondria (M), or phagophore (P). b) Western blot analysis of LC3-I/LC3-II conversion and p62 protein expression levels in HT-29 cells treated with DBTTS IC<sub>50</sub> at indicated times. Starvation with HBSS (HB) or treatment with PP242 (PP; 10 µM) served as positive controls. c) TEM and western blot analysis of d) LC3 conversion and e) p62 in HT-29 cells treated with 50 µM DBTTS in the presence/absence of bafilomycin A1 (Baf). f) Immunofluorescence microscopy analysis of HT-29 cells transfected with GFP-LC3 plasmid and treated for 24 h with 50 µM DBTTS or 10 nM bafilomycin A1. Histogram (right panel) represents the percentage of GFP-LC3-positive cells with punctae relative to total GFP-LC3-positive cells. g) Cell cycle analysis and h) representative bright field images and 3D plots of spheroids derived from HT-29 cells treated with 50 µM DBTTS, 3 nM vinblastine (VINB), 5 nM vincristine (VINC), and 7.5 nM PACLI (IC<sub>50</sub> values) or IC<sub>10</sub> (10 µM, 0.6 nM, 1 nM, and 1.5 nM) respectively. Graphs correspond to area and volume measurements. i) TEM analysis of HT-29 treated with VINB and VINC (50 µM, 3 nM, and 5 nM) at indicated times. j) Western blot analysis of p62 protein in HT-29 cells treated with VINB and VINC (IC<sub>50</sub> at indicated times). All results are representative of three independent experiments. One-way ANOVA; post hoc: Sidak's test (GFP-LC3 punctae formation quantification); Two-way ANOVA; post hoc: Tukey's test (spheroids area and volume measurements). \*, \*\*, \*\*\* indicate p < 0.05, p < 0.01, p < 0.0005 versus control cells, respectively; #, ##, ###, indicate p < 0.05, p < 0.01, p < 0.0005, respectively, for IC<sub>10</sub> versus IC<sub>50</sub>.

approach using a publicly available dataset (GSE20298) [18]. For our investigations, we selected non-metastatic (HT-29 and SW480) vs. metastatic (SW620) cells, which are expected to display heterogeneity related to cell cycle, proliferation, and migration, in addition to drug resistance [27]. Additionally, these cells possess different genetic profiles for KRAS and BRAF (HT-29: KRAS wild type, BRAF(V600E)-mutated; SW480/620: KRAS(G12V)-mutated, BRAF wild type), two genes that contribute to dysregulated cancer cell proliferation when mutated [28,29]. Interestingly, SW480 and SW620 were resected from the same patient (SW480 from a primary tumor and SW620 from a metastatic abdominal lymph node). We identified 204 genes (Suppl. Fig. 1a) that were differentially expressed. Interestingly, numerous tubulin-related genes (Suppl. Fig. 1b) were among these identified genes; TUBB6 (tubulin, beta 6 class V), TUBB2B (tubulin, beta 2B class IIb), and TUBB4A

(tubulin beta 4A class IVa) were expressed at significantly higher levels in SW480 and SW620 than in HT-29 cells. Next, we selected DBTTS (IC<sub>50</sub> concentrations at 48 h) for mechanistic studies to confirm microtubules as a DBTTS target and monitored the  $\alpha$ -tubulin network structure using immunofluorescence microscopy. Tubulin disarrangements were visible after 24 h in all instances (Fig. 2), corroborating the MALDI-TOF-MS results and validating our previous findings in leukemia [4].

As a consequence of the binding of diallyl sulfides *in vitro*, confirmed by *in silico* data and *in cellulo* tubulin disarrangements, we investigated the effect of DATTS and DBTTS on the proliferation of these three CRC cell lines by quantifying metabolically active cells (Table 2). Overall, susceptibility was in the order of SW620 > SW480 > HT-29, and DBTTS appeared to act as the most efficient compound [5]. Sensitivity to DATTS/DBTTS correlated with

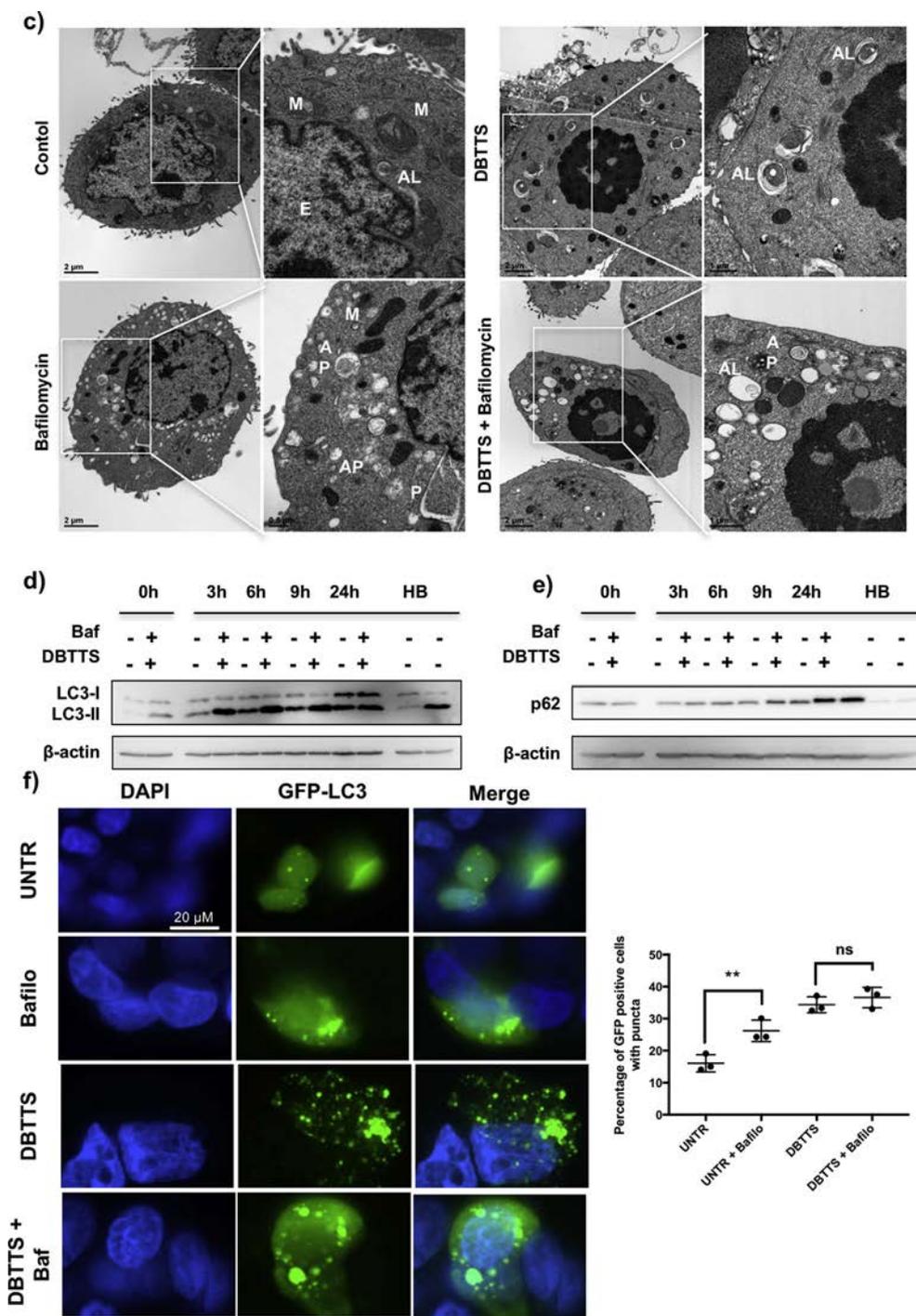


Fig. 6. (continued).

cell doubling time, where HT-29 (40–60 h) was more resistant compared to SW480 and SW620 (25–30 h and 20.4 h, respectively). SW cell types exhibited higher levels of c-Myc amplification [30].

*DBTTS induces mitotic arrest followed by apoptosis in CRC cells*

Considering the more efficient interaction and inhibition potential of DBTTS, we further investigated the anticancer potential of this compound in CRC. As the tubular network targeted by diallyl sulfides plays a crucial role in cell division and cell cycle

progression, we analyzed the cell cycle response of CRC cells to DBTTS. We observed a significant accumulation of cells in G2-M after 6–9 h, peaking at 24 h (Fig. 3a). Nuclear morphology assessment using Hoechst staining confirmed a dotted pattern in the chromatin after 24 h, suggesting a mitotic arrest in the prometaphase [4,31] (Fig. 3b). The accumulation of the G2-M transition marker, cyclin B1, further confirmed this arrest in the early phases of mitosis (Fig. 3c).

Mitotic arrest was followed by induction of apoptosis in all cell models. An increase of cells in the sub-G1 phase followed the

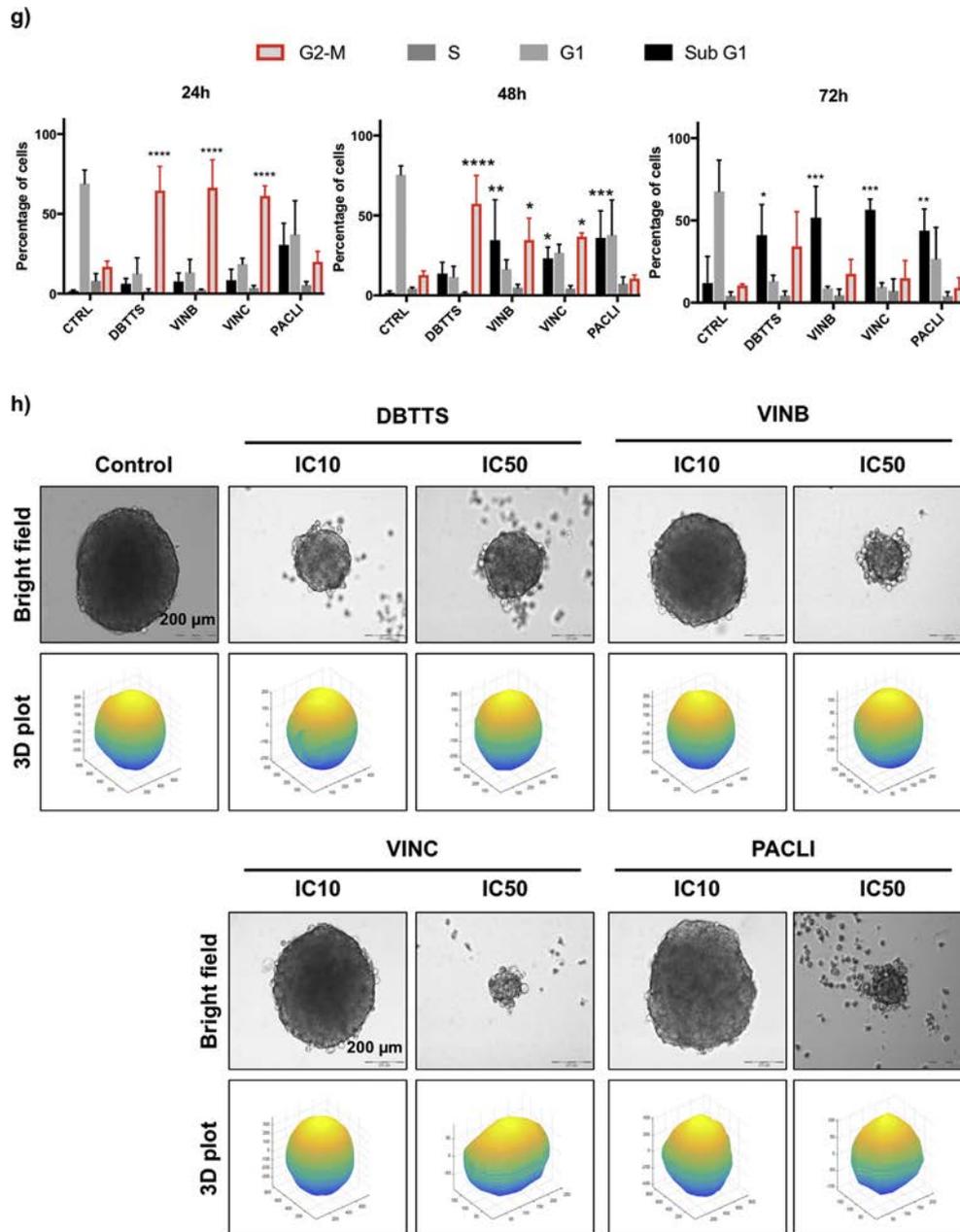


Fig. 6. (continued).

accumulation in G2-M phase from 48 to 72 h of treatment (Fig. 3a). TEM analysis confirmed the accumulation of dying cells with apoptotic morphological alterations (Fig. 4a). In HT-29 cells, DBTTS induced a robust cleavage/activation of the effector caspases following 72 h (Fig. 4b-c). In SW620 cells, caspase cleavage/activation was detected after 48 h of treatment with 10  $\mu$ M DBTTS (Fig. 4d-e). In SW480 cells, caspase-3 cleavage was modestly detectable at all time points with 10  $\mu$ M DBTTS treatment, as confirmed by the caspase-3/-7 activity assay (Fig. 4f-g).

*In silico* TCGA colorectal cancer patient survival is improved when the autophagic flux is impaired

In addition to mitotic arrest, alterations in microtubular dynamics can also affect the autophagic flux [32]. We hypothesized

that autophagy could be a key determinant of CRC cell survival. Interestingly, a survival analysis of 484 CRC patients showed that lower beclin 1 levels combined with higher p62 expression, both contributing to a reduced autophagic flux, which could be associated with a significantly increased overall survival (Fig. 5). We thus hypothesized that CRC cell autophagic flux could contribute to survival, whereas inhibition of the autophagic machinery would deprive CRC cells of an essential pro-survival mechanism. Accordingly, any compound causing extensive autophagic impairment would eventually lead to cellular demise. As DBTTS initially triggered an inhibition of early mitosis via perturbation of the microtubular network prior to cell death induction, we suspected that a perturbation of the autophagic machinery by DBTTS would contribute to sensitizing CRC cells to apoptosis.

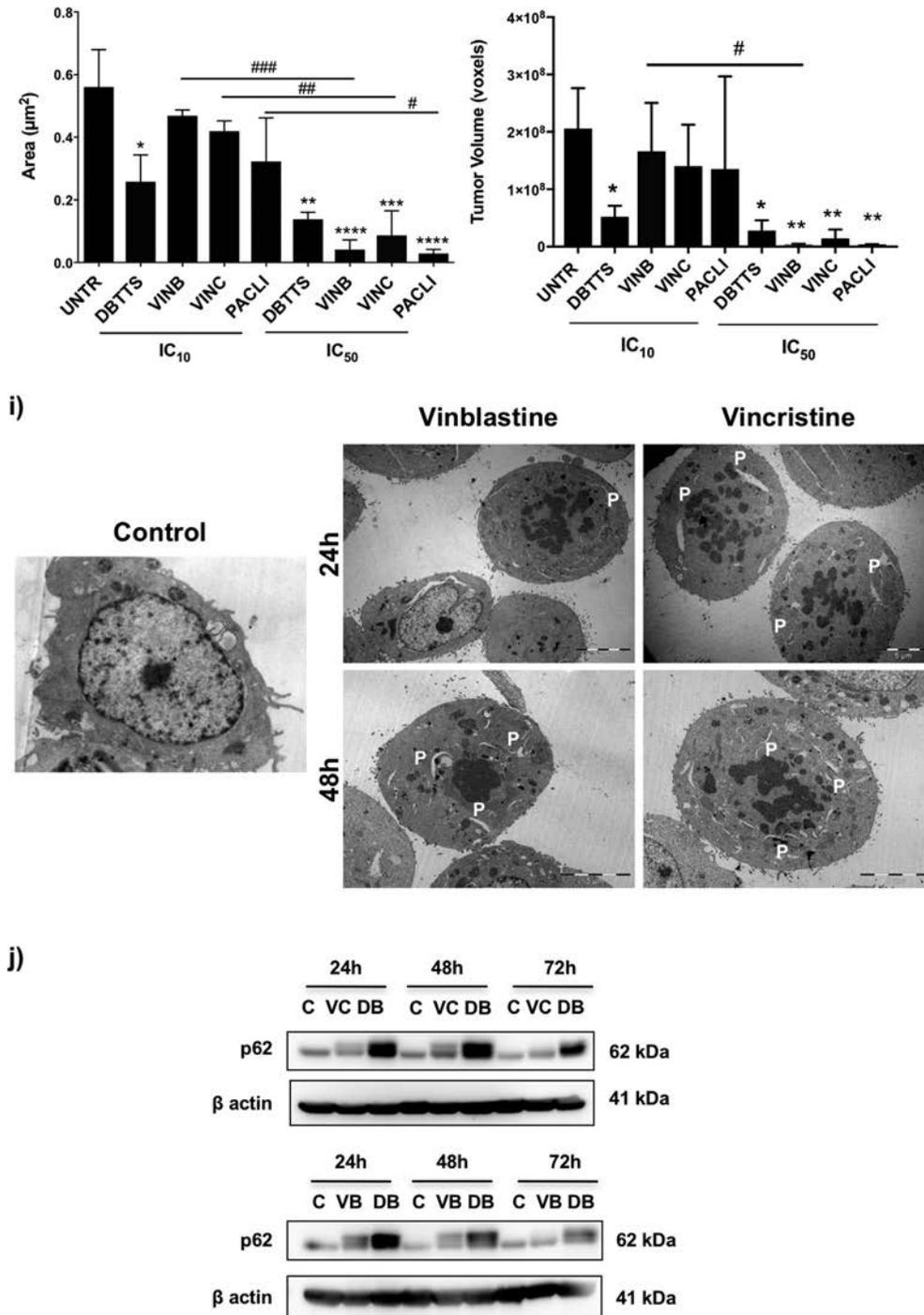
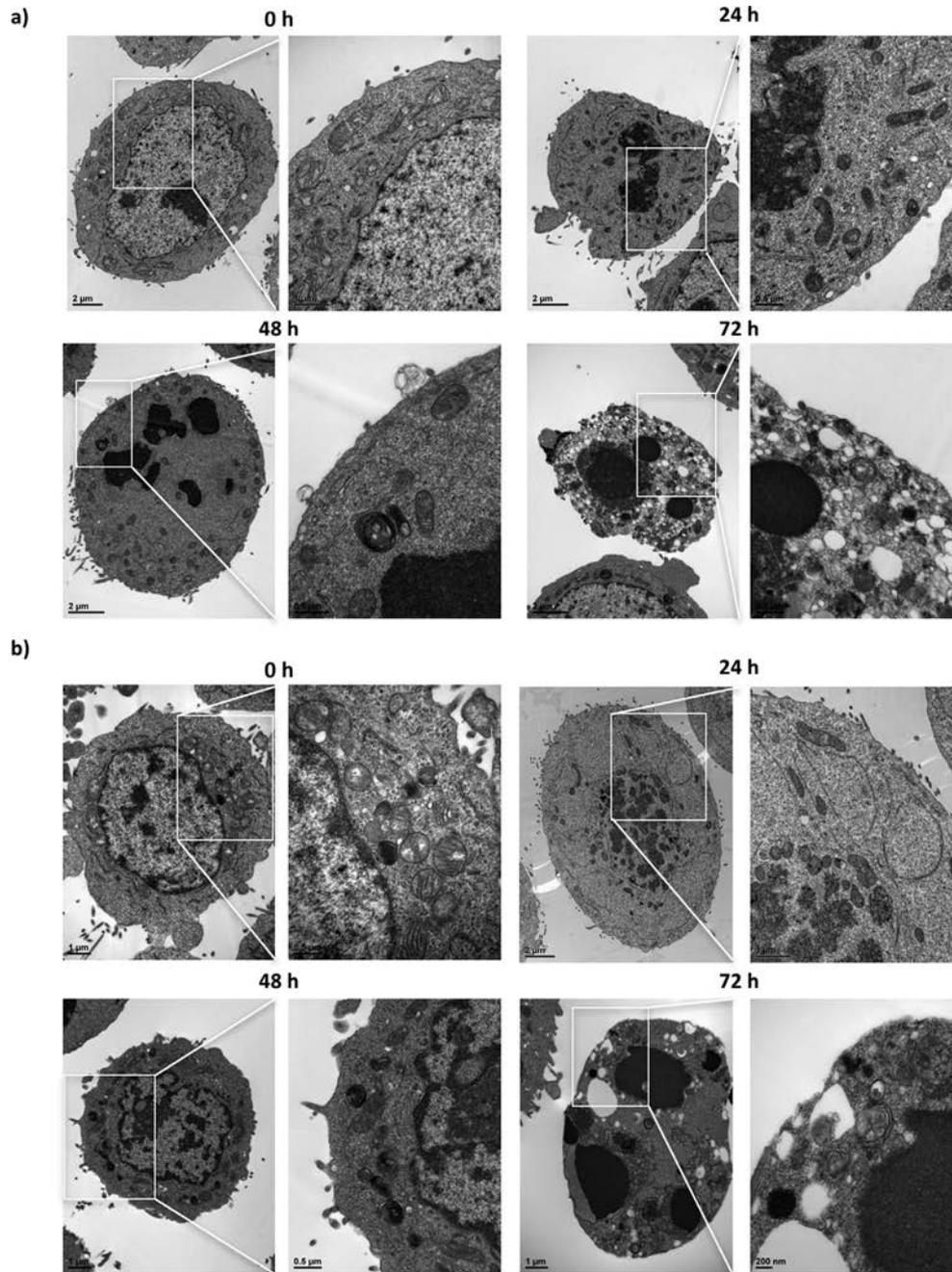


Fig. 6. (continued).

*Response to DBTTS impairs autophagic flux in CRC cells*

Next, we verified any modulatory potential of DBTTS on autophagy using a multiparametric approach. First, we monitored DBTTS-treated vs. untreated HT-29 cells using TEM. All cells with prometaphase-like condensed chromatids exhibited abundant autophagic vacuoles with phagophores and autophagosomes predominating over autophagolysosomes (Fig. 6a). This phenomenon was detectable at 24 h, as well as 48 h of treatment when mitotic arrest became the predominant feature. The observation of autophagolysosomes was limited to advanced apoptotic cells at 72 h

(Fig. 6a). Concomitant with mitotic arrest, we saw a persistent accumulation of LC3-II and SQSTM1/p62 cargo proteins, overall indicating autophagy modulation by DBTTS (Fig. 6b). Incubation with the autophagic flux inhibitor Baf, which prevents late-phase degradation of autophagic vacuoles and related markers, confirmed physiological autophagy in untreated HT-29 cells but not in DBTTS-treated cells, where no further accumulation of pre-fusion complexes were observed (Fig. 6c). To confirm our results, we assessed the expression of autophagy markers in the presence of Baf. First, we performed a more stringent kinetic analysis at earlier time points using western blot. Baf increased LC3-II levels



**Fig. 7.** Impact of DBTTS on autophagy in SW480 and SW620 cells. **a-b)** TEM analysis of SW480 and SW620 cells treated with DBTTS (10  $\mu$ M) for the indicated times. **c-d)** Western blot analysis of LC3-I/LC3-II and p62 protein expression levels in SW480 and 620 after treatment with 10  $\mu$ M DBTTS at the indicated times, in the presence or absence of bafilomycin A1 (10 nM) with respective controls. All results are representative of three independent experiments.

between 3 h and 9 h, as expected for an active autophagic flux; however, Baf failed to do so at 24 h, where the LC3-II signal reached a plateau, supporting the hypothesis of an inhibition of the autophagic flux at the pre-fusion complex stage (Fig. 6d). SQSTM1/p62 accumulated starting from 9 h and its expression level did not change in the presence of Baf, correlating with autophagy inhibition (Fig. 6e). Second, we monitored autophagosome formation in GFP-LC3-transfected HT-29 cells by examining the percentage of GFP-LC3-positive cells with punctae formation (Fig. 6f). In DBTTS-treated HT-29 cells, Baf again did not generate any differences compared to untreated cells.

Aside from the autophagy-lysosomal pathway, ubiquitin-proteasomal degradation also contributes to regulating protein homeostasis. To assess potential compensation for autophagy impairment, we quantified the three main proteasomal activities to demonstrate that DBTTS treatment increased chymotrypsin-like proteasomal activity (Suppl. Fig. 2) concomitant with SQSTM1/p62 accumulation. Overall, these results provide strong evidence of a defective protein homeostasis induced by DBTTS, concomitant with mitotic arrest in HT-29.

Considering the crucial role of microtubule-altering agents (MTAs) in cancer therapy, the effect of DBTTS showed similar

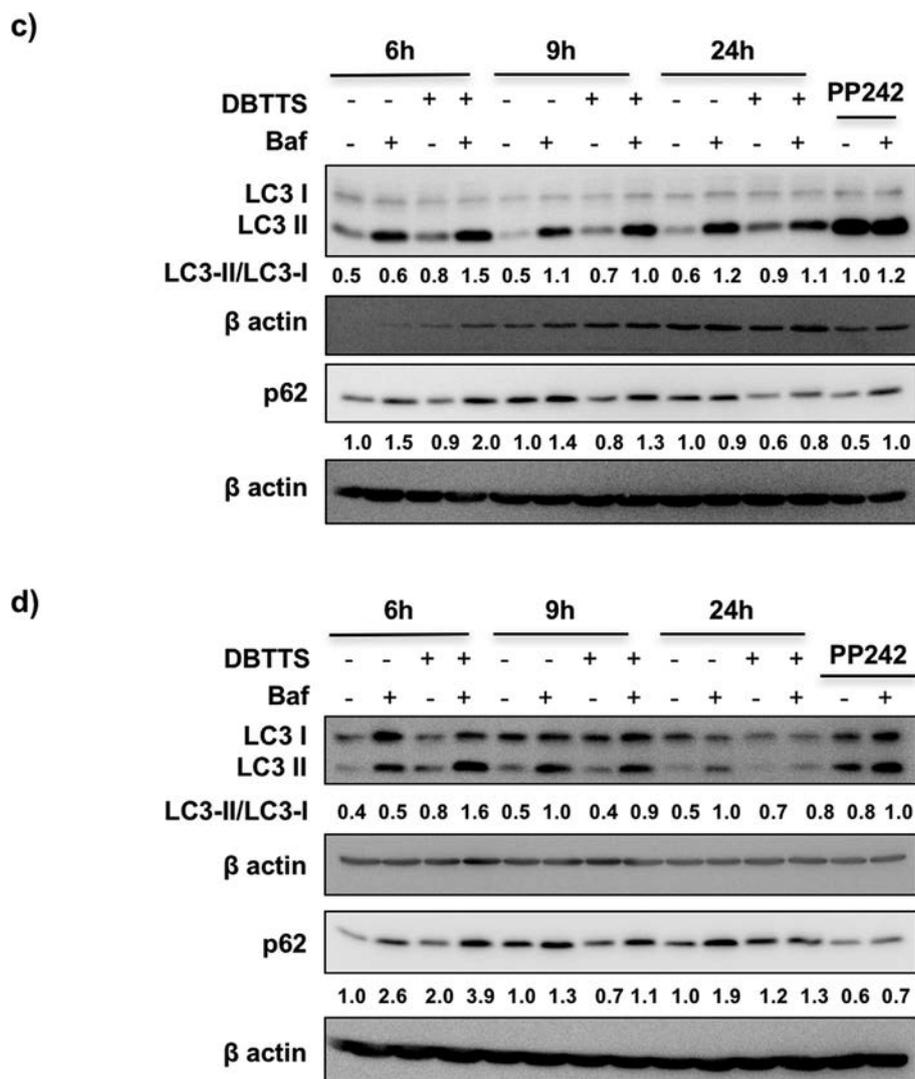


Fig. 7. (continued).

kinetics in mitotic arrest/cell death commitment in various CRC cell lines, as well as the ability to impair spheroid formation (comparison with  $IC_{50}$  and  $IC_{10}$  concentrations, Suppl. Table I; Fig. 6g-h). Interestingly, DBTTS induced a much greater p62 protein accumulation concomitant with the accumulation of autophagic vesicles (Fig. 6i-j).

To generalize our findings, we used SW480 and SW620 cells and investigated the effect of DBTTS on autophagic flux. These cell types showed a less prolonged mitotic blockage and reduced extensive autophagic vacuole accumulation (Fig. 7a-b), confirmed by a less significant LC3-I/II conversion. Baf *per se* induced strong LC3-II accumulation, verifying a very high basal autophagic flux in these fast-cycling cell types. In both cell lines, p62 was not modulated (Fig. 7c-d), though autophagosome accumulation was detectable after 72 h of DBTTS treatment. Altogether, these results indicate that perturbation of autophagy may be an early response depending on the cellular context.

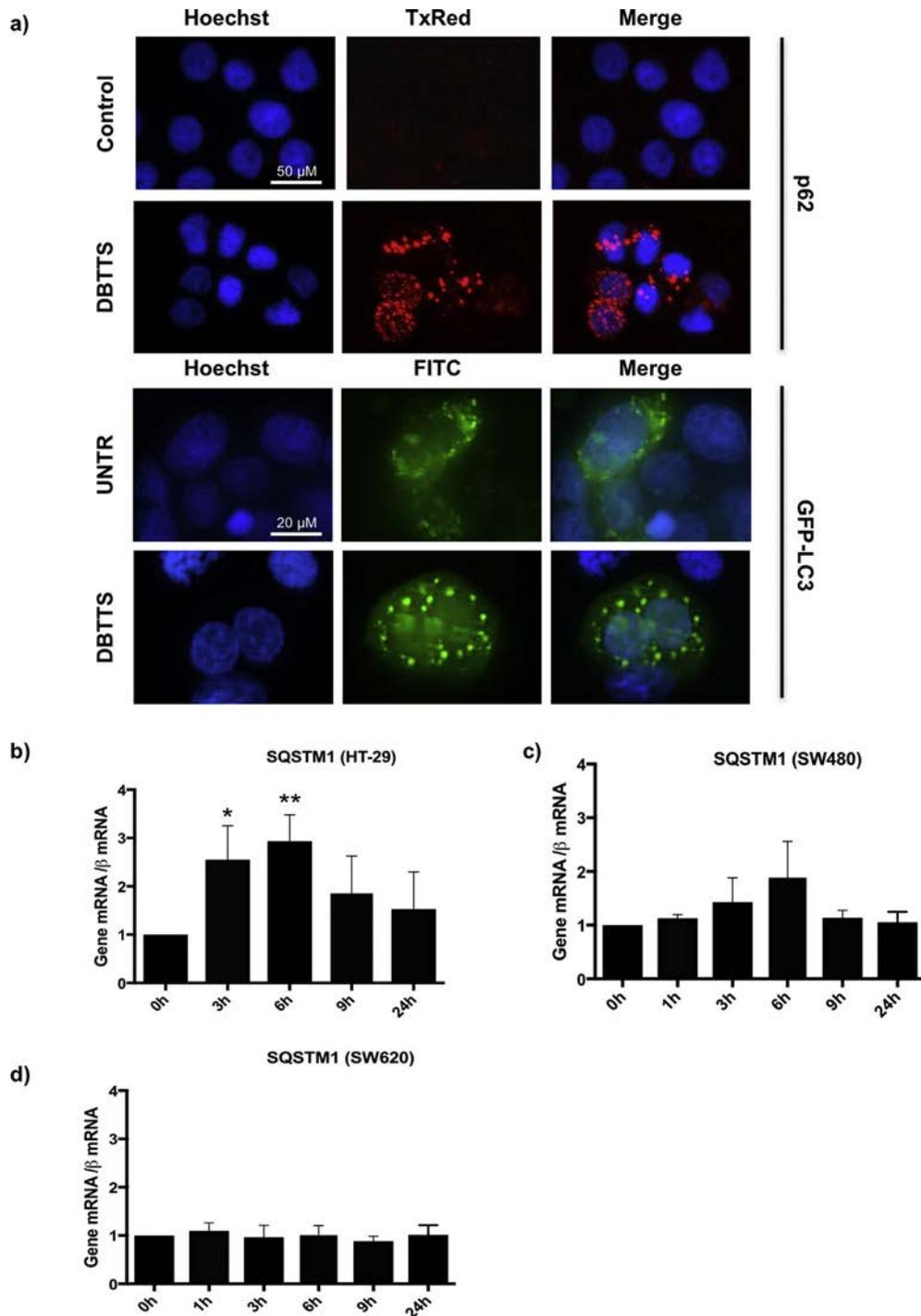
#### Mechanistic role of p62 protein accumulation in DBTTS-treated HT-29 cells

The *in situ* analysis of p62 cellular localization in DBTTS-treated HT-29 cells showed a dotted cytoplasmic pattern, resembling an

LC3-II punctae network (Fig. 8a), suggestive of protein accumulation as a result of pre-fusion complex accumulation (Fig. 8a). p62 is known to be upregulated in the case of defective autophagy/catabolism or by *de novo* synthesis [33,34]. Thus, we assessed any change in p62 mRNA levels using real-time PCR. DBTTS increased p62 mRNA levels between 3 h and 6 h in HT-29 cells (Fig. 8b). No modulation of p62 mRNA expression occurred in SW480 and SW620 cells (Fig. 8c-d), in line with the p62 protein expression levels (Fig. 7c-d).

To assess the importance of protein neosynthesis in p62 accumulation, we inhibited protein synthesis with CHX. Our results show that simultaneous administration or 8 h-pretreatment of HT-29 cells with 10  $\mu$ M CHX efficiently prevented p62 protein modulation by DBTTS (Suppl. Fig. 3a). However, CHX also prevented the accumulation of cells in the G2/M phase (Suppl. Fig. 3b), most likely due to inhibition of the synthesis of essential cell cycle regulators, a fact that might preclude the conclusion regarding a direct or up-stream effect of this modulation on p62.

We then hypothesized that the modulation of p62 expression was part of a pro-survival response of HT-29 cells in a last attempt to resist DBTTS. p62 proteins deliver ubiquitinated proteins to the proteasome acting as a mediator between the autophagic machinery and the ubiquitin-proteasome system [35]. Autophagy



**Fig. 8. Expression and role of p62 protein accumulation in DBTTS- challenged HT-29 cells.** **a)** Immunofluorescence analysis of p62 protein expression (TxRed) and GFP-LC3 punctae (FITC) formation in cells treated with DBTTS (50  $\mu$ M) for 24 h. Nuclei were counterstained with Hoechst. p62 mRNA expression level was assessed using qRT-PCR after treatment with 50 or 10  $\mu$ M of DBTTS at the indicated times in **b)** HT-29 cells, **c)** SW480 cells, and **d)** SW620 cells (three independent experiments  $\pm$  SD). Effect of p62 silencing (siRNA 5 and 6) on **e)** DBTTS-mediated cell cycle distribution and **f)** p62 protein expression as well as caspase-3 cleavage after DBTTS treatment at indicated times (three independent experiments  $\pm$  SD). **g)** The graph represents caspase-3/-7 activity assay performed after p62 silencing and DBTTS (50  $\mu$ M) treatment. \*, \*\*, \*\*\* indicate  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.0005$  versus control cells, respectively. Two-way (cell cycle analysis) and one-way (caspase-3/-7 assay) ANOVA test; post hoc: Dunnett's and Turkey's test, respectively.

impairment was accompanied by increased proteasomal activity, which may also contribute to a pro-survival function during autophagic flux dysfunction (Suppl. Fig. 2). We used the proteasome inhibitor MG132 to assess whether inactivation of the proteasome could sensitize HT-29 cells to death. Simultaneous administration or 4 h pre-treatment with 5  $\mu$ M MG132, however, completely

blocked DBTTS-induced G2-M arrest (Suppl. Fig. 3c). In line with these results, p62 protein accumulation did not occur (Suppl. Fig. 3d).

Next, we directly modulated p62 expression through genetic inhibition with two siRNAs targeting p62 (siRNA 5 and 6). p62 silencing did not affect cell cycle distribution after 24 h and 48 h of

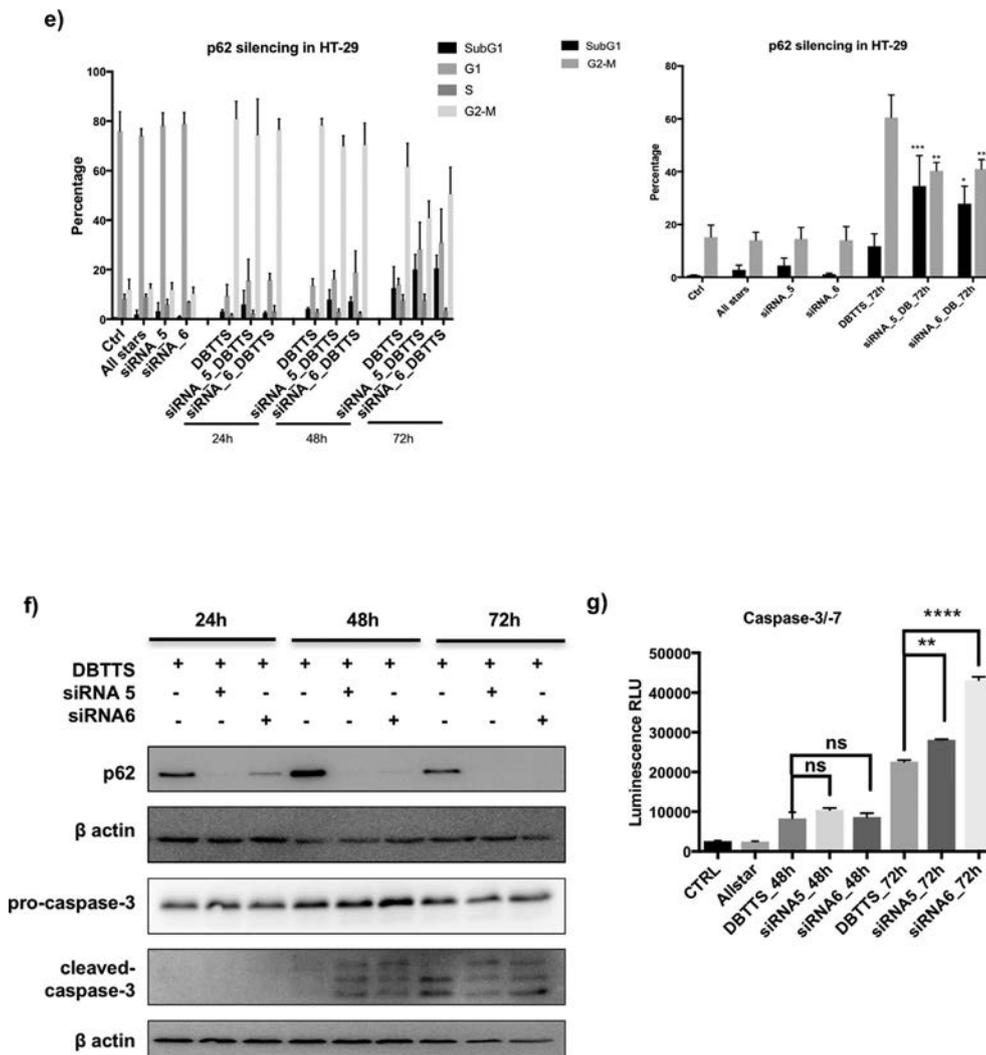


Fig. 8. (continued).

DBTTS treatment, but it promoted cell death after 72 h, as indicated by quantification of the number of cells in the sub-G1 phase (Fig. 8e). This was further confirmed by caspase-3/7 cleavage and activation (Fig. 8f-g).

Translational potential of DBTTS in CRC

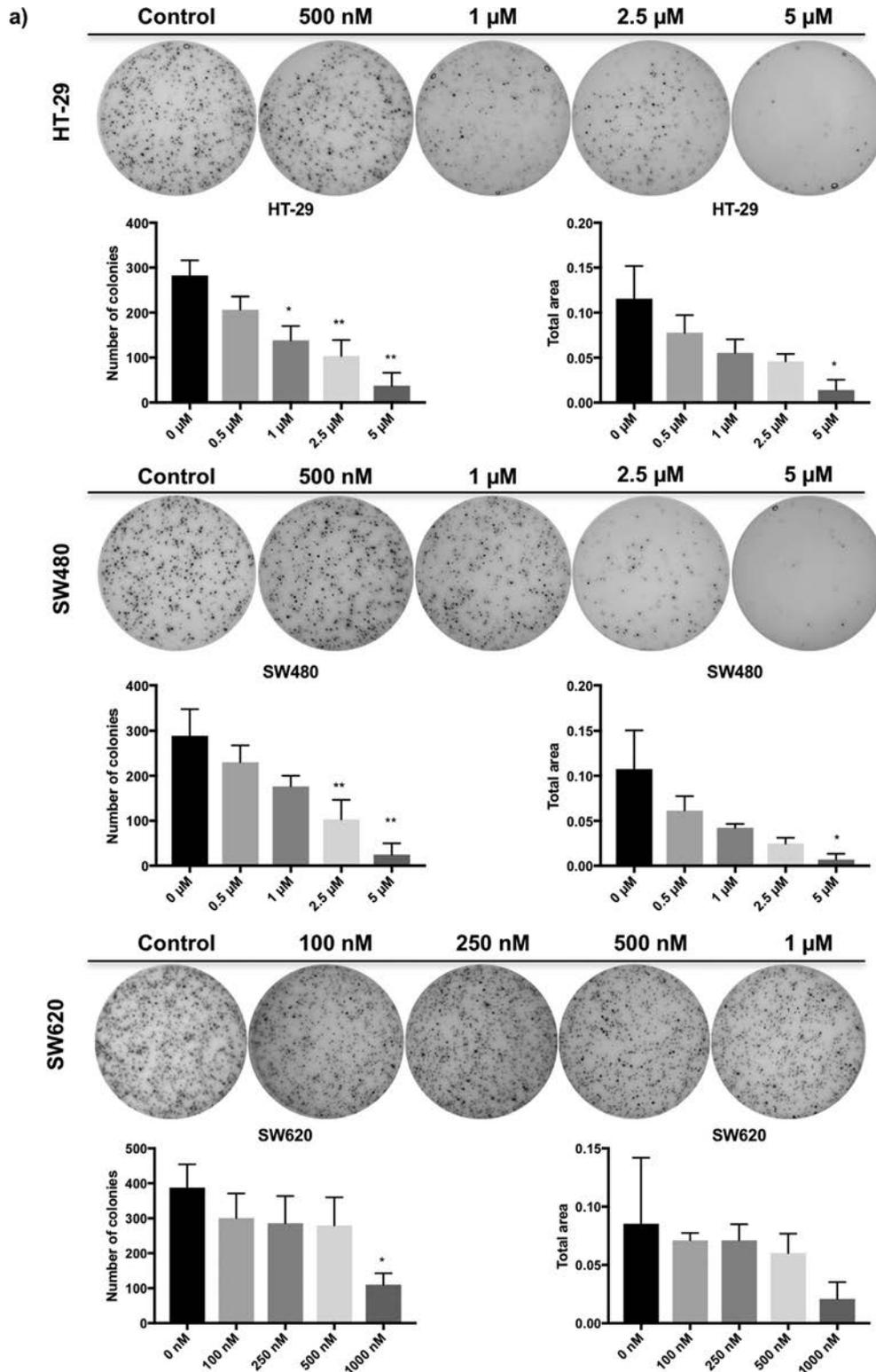
Considering the interesting therapeutic potential of DBTTS, we confirmed the anticancer potential of this compound in *in vitro* and *in vivo* using 3D CRC cell models. Colony formation assays of HT-29, SW480, and SW620 cells showed DBTTS impacting all cell lines in a dose-dependent manner (Fig. 9a). Moreover, DBTTS prevented spheroid formation in HT-29 cells; specifically, this area was impacted by a decrease in cell viability in a dose-dependent manner (Fig. 9b).

To extend the *in vitro* colony formation assays (CFAs) to *in vivo* conditions, we further validated the anticancer potential of DBTTS in a zebrafish xenograft model. HT-29 cells were treated with 10 or 50 μM DBTTS for 30 h to commit cells while maintaining their viability. Fluorescently stained cells were then injected into the yolk sac of zebrafish at 48 h post-fertilization. Results showed that DBTTS induced a dose-dependent inhibition of HT-29 tumor mass formation after 72 h (Fig. 9c-d).

Discussion

This study provides evidence to support the anticancer potential of DBTTS, a derivative of the natural compound DATTS, for the treatment of specific forms of CRC. Here, we validate for the first time that *i*) these compounds act as reversible binders of tubulin, *ii*) the efficacy of DBTTS is superior to DATTS due to improved chemical-physical characteristics, and *iii*) the cell cycle arrest and cell death induction of CRC cell models depend on a peculiar modulation of the autophagic flux during mitotic arrest (Fig. 10). This response seems to be cell-intrinsic as canonical MTAs generate, in HT-29 cells, a pattern of alterations very similar to DBTTS (comparison between IC<sub>10</sub> and IC<sub>50</sub> values).

Autophagy plays a dual role in cancer. On one hand, it protects healthy cells from tumorigenesis via degradation of damaged organelles and aggregated proteins; on the other hand, autophagy acts as a pro-tumor resource by providing essential nutrients for tumor growth. Additionally, cancer cells exacerbate autophagy as a stress response against anti-cancer treatment [11]. Of note, DBTTS induces a remarkable increase in the autophagic marker and cargo protein, p62. The accumulation of autophagic vacuoles, as well as p62 modulation, take place during mitotic arrest but do not overlap with the apoptosis that occurs at later periods in time. We



**Fig. 9. Anticancer activity of DBTTS in 3D in vitro/in vivo CRC cell models.** a) Colony formation assay was performed in HT-29, SW480, and SW620 cells in the presence of DBTTS for 10 days at the indicated concentrations. Graphs represent the number of colonies and total area (three independent experiments  $\pm$  SD). b) Representative bright field images and 3D plots of spheroids derived from HT-29 cells. Histogram corresponds to the mean spheroid area and viability (three independent experiments  $\pm$  SD). c) Dose-dependent effect of DBTTS treatment on tumor formation in a zebrafish xenograft. CM-dil (2 h, 4  $\mu$ M) stained and DBTTS (10 and 50  $\mu$ M, 30 h) pre-treated HT-29 cells were injected into the 2-day-old zebrafish yolk sac. Representative images from a total of 10 fish per condition are represented. PBS injection was used as a control for injection toxicity. d) Fluorescence was quantified and reported in the graph. \*, \*\*, \*\*\* indicate  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.0005$  versus control cells, respectively. One-way ANOVA test; posthoc: Dunnett's test.

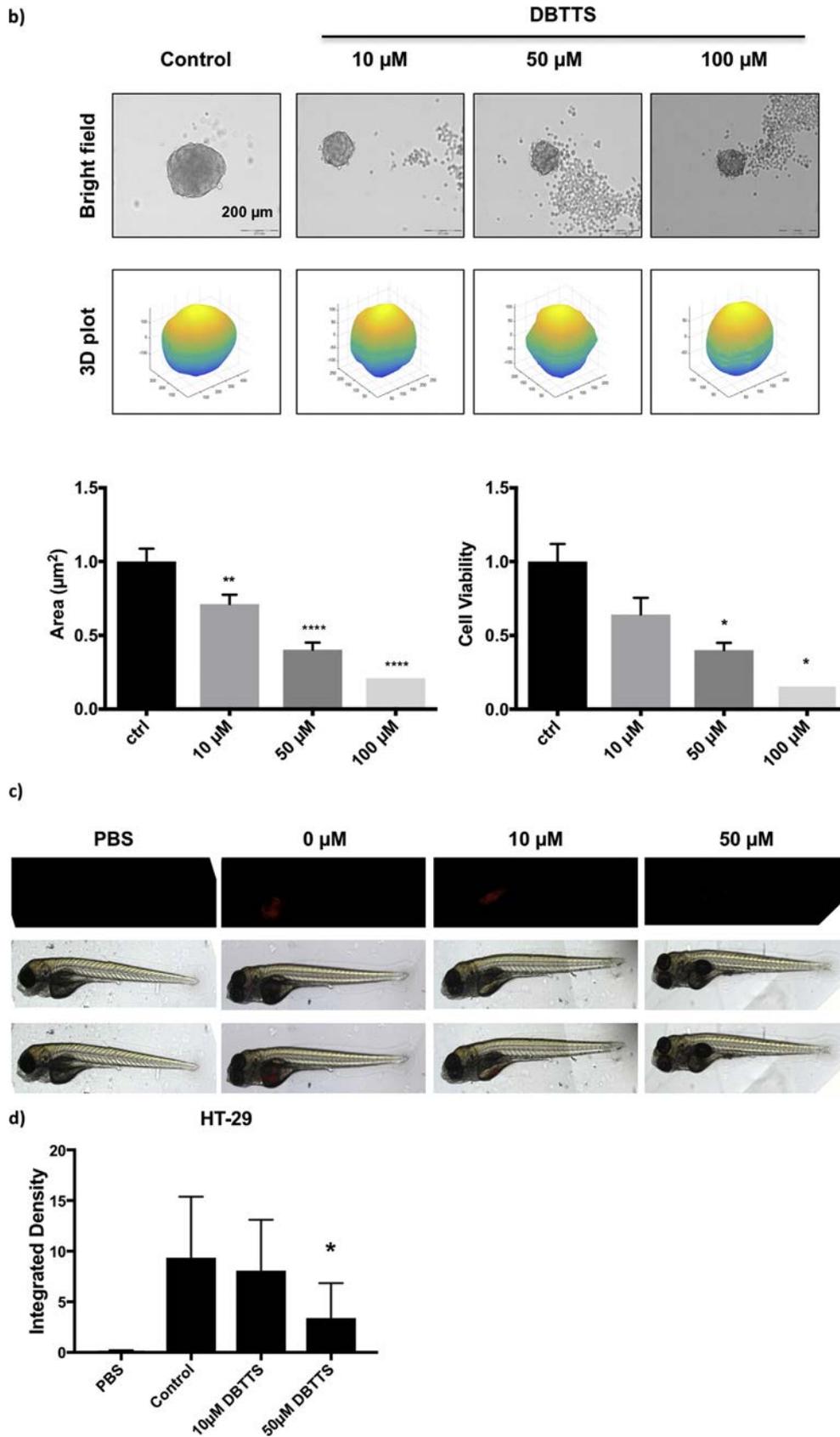
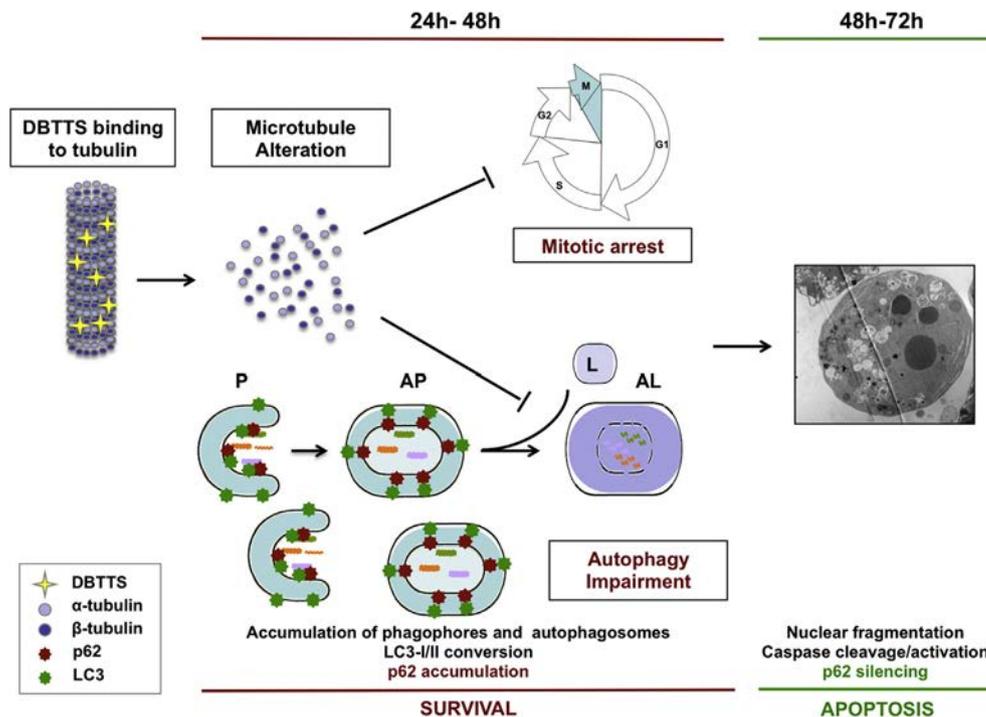


Fig. 9. (continued).



**Fig. 10. Time-course-dependent summary scheme.** DBTTS binds to tubulin and induces microtubule network disarrangement, which in turn leads to mitotic arrest and autophagic flux inhibition with accumulation of pre-fusion complexes. Autophagy impairment correlates with p62 cargo protein accumulation in mitotic arrested cells (up to 48 h). With longer durations, apoptosis occurs. p62 silencing sensitizes the cells to death, suggesting its active role in a pro-survival response. Autophagosome (AP), autophagolysosome (AL), phagophore (P), and lysosome (L).

hypothesized that impairment in the autophagic flux is detectable as part of the early stress response/damage induced by DBTTS in mitosis-arrested HT-29 cells, which, as not resolved, culminates in cell demise via apoptosis.

p62 is a multitasking cellular signaling hub, as evidence by its ability to recruit numerous interacting partners [36], and plays a crucial role in autophagy and more broadly, carcinogenesis [37]. Mathew et al. [38] provided the first evidence that p62 protein promotes tumorigenesis through perturbation of nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) signaling. Wei et al. showed that p62 knock-down synergize with autophagy suppression to inhibit tumor growth, suggesting that the development of more effective anti-cancer therapies should take into consideration the inhibition of both these markers/events [39]. Furthermore, caspases are among the binding partners of p62 [39–41]. These results indicate a modulatory effect of p62 on cell death mediators; but, they also highlight a potential dual and active role played by this protein in the survival/death balance. The sensitization of HT-29 cells to cell death after p62 silencing supports the idea that p62 accumulation acts as a pro-survival response. Here, we showed clearly that p62 accumulation via autophagy impairment was cell-type dependent, as DBTTS was unable to inhibit the autophagy flux in SW480 and SW620 cells, exhibiting a stable basal autophagy level instead. Similarly, p62 mRNA was increased in HT-29 but not in the more sensitive SW480 and SW620 cells, where autophagy is not modulated. In HT-29 cells, p62 protein accumulations appeared in dotted areas similar to LC3-I/-II accumulation. Altogether, we believe that the observed p62 protein upregulation was the result of *de novo* synthesis combined with aggregation in specific subcellular areas.

p62 modulates the nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (NRF2)/kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAP1) pathway through its ability to chelate KEAP1 during oxidative stress [42]. p62 accumulation might belong to an anti-oxidant response in

DBTTS-treated HT-29 cells. Accordingly, we observed a significant increase in antioxidant heme-oxygenase (HO)-1 mRNA expression (Suppl. Fig. 3b), concomitant with increased mRNA expression of p62 in HT-29 cells, but not in SW480 and SW620 cell lines (Suppl. Fig. 3b). However, we did not detect reactive oxygen species (ROS) generation in the three cell lines investigated (Suppl. Fig. 3a). Alternatively, a potential modification of the thiol pool may trigger increased HO-1 or p62 mRNA levels [4]. Further investigations are required to elucidate this point, taking into account that the reactive sulfur atoms of the DBTTS molecule may directly interact with the cysteine residues of KEAP1 [43]. In the clinical setting, patients with RAS-mutated CRC respond poorly to chemotherapy due to increased drug resistance and absence of sensitivity to targeted therapies [44]. We found that KRAS(G12V)-mutated cells were more sensitive to DBTTS compared to KRAS wild type HT-29 cells. This alteration correlates with a higher amplification of c-Myc levels [30] and deregulated higher proliferation rate and poor response of mutated forms of cancer to current multi-drug combination therapies. In contrast to various studies supporting  $\beta$ III-tubulin overexpression as the cause of microtubule altering agent-resistance in many cancers [45], our analysis of the public microarray dataset indicated that DBTTS is more efficient in SW480 and SW620 cells, independent of  $\beta$ III-tubulin expression levels (Suppl. Fig. 1). However, our MS analysis did not identify the specific binding site of DBTTS on  $\beta$ -tubulin. Thus, the involvement of these specific tubulin isoforms in the differential response to DBTTS-mediated treatment remains to be elucidated. Interestingly, pathway and gene ontology (GO) enrichment analyses of differentially modulated genes revealed that in SW480/620 cells, pathways related to lipid metabolism were exacerbated compared to those in HT-29 cells, in line with their faster cycling (Suppl. Fig. 1a).

In our case, RAS-mutated SW480 and SW620 cells were more sensitive to DBTTS, thus encouraging us to test this compound as a

novel approach in patient-derived organoids to mimic, as much as possible, the cancer microenvironment. Altogether, this study suggests the benefit of DBTTS for CRC treatment, as well as a potential ability to stratify CRC models by response. In this instance, a combination of DBTTS with BRAF inhibitors such as vemurafenib or EGFR inhibitors for RAS-mutated cells may be considered.

## Acknowledgments

EY, CC, AG, and FR are recipients of a Télévie Luxembourg fellowship. This work was supported by the “Recherche Cancer et Sang” Foundation, the “Recherches Scientifiques Luxembourg” Association, the “Een Häerz fir kriebeskrank Kanner” Association, the Action LIONS “Vaincre le Cancer” Association, and by Télévie Luxembourg. AM, JYL, and MD are supported by the NRF, the MEST of Korea for Tumor Microenvironment GCRC 2012-0001184 grant, and by Brain Korea (BK21) PLUS program.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.09.011>.

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

## References

- [1] Cancer Genome Atlas Network, Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer, *Nature* 487 (7407) (2012) 330–337.
- [2] M.S. Pino, D.C. Chung, The chromosomal instability pathway in colon cancer, *Gastroenterology* 138 (6) (2010) 2059–2072.
- [3] E. Yagdi, C. Cerella, M. Dicato, M. Diederich, Garlic-derived natural polysulfanes as hydrogen sulfide donors: friend or foe? *Food Chem. Toxicol.* 95 (2016) 219–233.
- [4] M. Kelkel, C. Cerella, F. Mack, T. Schneider, C. Jacob, M. Schumacher, et al., ROS-independent JNK activation and multisite phosphorylation of Bcl-2 link diallyl tetrasulfide-induced mitotic arrest to apoptosis, *Carcinogenesis* 33 (11) (2012) 2162–2171.
- [5] B. Czepukojc, A.K. Balthes, C. Cerella, M. Kelkel, U.M. Viswanathan, F. Salm, et al., Synthetic polysulfane derivatives induce cell cycle arrest and apoptotic cell death in human hematopoietic cancer cells, *Food Chem. Toxicol.* 64 (2014) 249–257.
- [6] A. Arora, K. Seth, Y. Shukla, Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by diallyl sulfide in K562 leukemic cells and in mouse liver, *Carcinogenesis* 25 (6) (2004) 941–949.
- [7] E. Mukhtar, V.M. Adhami, H. Mukhtar, Targeting microtubules by natural agents for cancer therapy, *Mol. Cancer Ther.* 13 (2) (2014) 275–284.
- [8] C. Cerella, M.H. Teiten, F. Radogna, M. Dicato, M. Diederich, From nature to bedside: pro-survival and cell death mechanisms as therapeutic targets in cancer treatment, *Biotechnol. Adv.* 32 (6) (2014) 1111–1122.
- [9] R. Pazdur, Y. Lassere, L.T. Soh, J.A. Ajani, B. Bready, E. Soo, et al., Phase II trial of docetaxel (Taxotere) in metastatic colorectal carcinoma, *Ann. Oncol.* 5 (5) (1994) 468–470.
- [10] A. Sparreboom, J. van Asperen, U. Mayer, A.H. Schinkel, J.W. Smit, D.K. Meijer, et al., Limited oral bioavailability and active epithelial excretion of paclitaxel (Taxol) caused by P-glycoprotein in the intestine, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (5) (1997) 2031–2035.
- [11] J. Li, N. Hou, A. Faried, S. Tsutsumi, H. Kuwano, Inhibition of autophagy augments 5-fluorouracil chemotherapy in human colon cancer in vitro and in vivo model, *Eur. J. Cancer* 46 (10) (2010) 1900–1909.
- [12] C. Cerella, A. Gaigneaux, A. Mazumder, J.Y. Lee, E. Saland, F. Radogna, et al., Bcl-2 protein family expression pattern determines synergistic pro-apoptotic effects of BH3 mimetics with hemisynthetic cardiac glycoside UNBS1450 in acute myeloid leukemia, *Leukemia* 31 (3) (2017) 755–759.
- [13] C. Cerella, F. Muller, A. Gaigneaux, F. Radogna, E. Viry, S. Chateauvieux, et al., Early downregulation of Mcl-1 regulates apoptosis triggered by cardiac glycoside UNBS1450, *Cell Death Dis.* 6 (2015), e1782.
- [14] M. Schnekenburger, C. Grandjennette, J. Ghelfi, T. Karius, B. Foliguet, M. Dicato, et al., Sustained exposure to the DNA demethylating agent, 2'-deoxy-5-azacytidine, leads to apoptotic cell death in chronic myeloid leukemia by promoting differentiation, senescence, and autophagy, *Biochem. Pharmacol.* 81 (3) (2011) 364–378.
- [15] R. Foty, A simple hanging drop cell culture protocol for generation of 3D spheroids, *J. Vis. Exp.* 51 (2011).
- [16] R.C. Team, A Language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2016.
- [17] S. Davis, P.S. Meltzer, GEOquery: a bridge between the gene expression omnibus (GEO) and bioconductor, *Bioinformatics* 23 (14) (2007) 1846–1847.
- [18] M. Spitzner, G. Emons, F. Kramer, J. Gaedcke, M. Rave-Frank, J.G. Scharf, et al., A gene expression signature for chemoradiosensitivity of colorectal cancer cells, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 78 (4) (2010) 1184–1192.
- [19] M.E. Ritchie, B. Phipson, D. Wu, Y. Hu, C.W. Law, W. Shi, et al., Limma powers differential expression analyses for RNA-seq and microarray studies, *Nucleic Acids Res.* 43 (7) (2015) e47.
- [20] Y. Benjamini, Y. Hochberg, Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing, *J. Roy. Stat. Soc. B* 57 (1995) 289–300.
- [21] D.J. McCarthy, G.K. Smyth, Testing significance relative to a fold-change threshold in a TREAT, *Bioinformatics* 25 (6) (2009) 765–771.
- [22] A. Jacobsen, cgdcr: R-based API for Accessing the MSKCC Cancer Genomics Data Server (CGDS), 2017.
- [23] T.M. Therneau, A Package for Survival Analysis in S, 2015.
- [24] T.M. Therneau, P.M. Grambsch, Modeling Survival Data: Extending the (C)ox Model, Springer, 2000.
- [25] P. Hannewald, B. Maunit, J.F. Muller, Tubulin-binding drug screening by MALDI-TOFMS, *Anal. Chem.* 78 (13) (2006) 4390–4397.
- [26] P. Hannewald, B. Maunit, J.F. Muller, Screening of DHFR-binding drugs by MALDI-TOFMS, *Anal. Bioanal. Chem.* 392 (7–8) (2008) 1335–1344.
- [27] F. Luo, J. Li, S. Wu, X. Wu, M. Chen, X. Zhong, et al., Comparative profiling between primary colorectal carcinomas and metastases identifies heterogeneity on drug resistance, *Oncotarget* 7 (39) (2016) 63937–63949.
- [28] A. Preto, J. Figueiredo, S. Velho, A.S. Ribeiro, P. Soares, C. Oliveira, et al., BRAF provides proliferation and survival signals in MSI colorectal carcinoma cells displaying BRAF(V600E) but not KRAS mutations, *J. Pathol.* 214 (3) (2008) 320–327.
- [29] X. Liu, M. Jakubowski, J.L. Hunt, KRAS gene mutation in colorectal cancer is correlated with increased proliferation and spontaneous apoptosis, *Am. J. Clin. Pathol.* 135 (2) (2011) 245–252.
- [30] M. Donzelli, R. Bernardi, C. Negri, E. Prosperi, L. Padovan, C. Lavielle, et al., Apoptosis-prone phenotype of human colon carcinoma cells with a high level amplification of the c-myc gene, *Oncogene* 18 (2) (1999) 439–448.
- [31] C. Cerella, C. Scherer, S. Cristofanon, E. Henry, A. Anwar, C. Busch, et al., Cell cycle arrest in early mitosis and induction of caspase-dependent apoptosis in U937 cells by diallyltetrasulfide (Al2S4), *Apoptosis* 14 (5) (2009) 641–654.
- [32] R. Mackeh, D. Perdiz, S. Lorin, P. Codogno, C. Pous, Autophagy and microtubules - new story, old players, *J. Cell Sci.* 126 (Pt 5) (2013) 1071–1080.
- [33] M. Komatsu, S. Waguri, M. Koike, Y.S. Sou, T. Ueno, T. Hara, et al., Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice, *Cell* 131 (6) (2007) 1149–1163.
- [34] G. Bjorkoy, T. Lamark, S. Pankiv, A. Overvatn, A. Brech, T. Johansen, Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1, *Methods Enzymol.* 452 (2009) 181–197.
- [35] W.J. Liu, L. Ye, W.F. Huang, L.J. Guo, Z.G. Xu, H.L. Wu, et al., p62 links the autophagy pathway and the ubiquitin-proteasome system upon ubiquitinated protein degradation, *Cell. Mol. Biol. Lett.* 21 (2016) 29.
- [36] J. Moscat, M.T. Diaz-Meco, p62: a versatile multitasker takes on cancer, *Trends Biochem. Sci.* 37 (6) (2012) 230–236.
- [37] A. Puissant, N. Fenouille, P. Auberger, When autophagy meets cancer through p62/SQSTM1, *Am. J. Cancer Res.* 2 (4) (2012) 397–413.
- [38] R. Mathew, C.M. Karp, B. Beaudoin, N. Vuong, G. Chen, H.Y. Chen, et al., Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62, *Cell* 137 (6) (2009) 1062–1075.
- [39] H. Wei, C. Wang, C.M. Croce, J.L. Guan, p62/SQSTM1 synergizes with autophagy for tumor growth in vivo, *Genes Dev.* 28 (11) (2014) 1204–1216.
- [40] J.M. Norman, G.M. Cohen, E.T. Bampton, The in vitro cleavage of the hAtg proteins by cell death proteases, *Autophagy* 6 (8) (2010) 1042–1056.
- [41] R.X. Zeng, Y.B. Zhang, Y. Fan, G.L. Wu, p62/SQSTM1 is involved in caspase-8 associated cell death induced by proteasome inhibitor MG132 in U87MG cells, *Cell Biol. Int.* 38 (10) (2014) 1221–1226.
- [42] M. Komatsu, H. Kurokawa, S. Waguri, K. Taguchi, A. Kobayashi, Y. Ichimura, et al., The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1, *Nat. Cell Biol.* 12 (3) (2010) 213–223.
- [43] A.L. Egger, G. Liu, J.M. Pezzuto, R.B. van Breemen, A.D. Mesecar, Modifying specific cysteines of the electrophile-sensing human Keap1 protein is insufficient to disrupt binding to the Nrf2 domain Neh2, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (29) (2005) 10070–10075.
- [44] A.I. Phipps, D.D. Buchanan, K.W. Makar, A.K. Win, J.A. Baron, N.M. Lindor, et al., KRAS-mutation status in relation to colorectal cancer survival: the joint impact of correlated tumour markers, *Br. J. Cancer* 108 (8) (2013) 1757–1764.
- [45] S. Lobert, J.J. Correia, Energetics of vinca alkaloid interactions with tubulin, *Methods Enzymol.* 323 (2000) 77–103.

## RESUME

Le cancer colorectal est une cause majeure de morbidité et de mortalité dans le monde entier. Des études épidémiologiques révèlent une corrélation inverse entre le risque de développer un cancer du côlon et un régime alimentaire riche en ail. De nombreux travaux scientifiques rapportent l'activité anti-cancéreuse des polysulfures de diallyle (PSDA) dérivés de l'ail dans divers types de cancer *in vitro* et *in vivo*. Le mécanisme d'action le mieux connu repose sur l'induction de l'arrêt mitotique suivi de l'apoptose. La tubuline est identifiée comme nouvelle cible thérapeutique des PSDA. La tubuline est fondamentale dans la progression de l'autophagie, source nutritionnelle essentielle pour le développement du cancer au stade avancé, et l'activation de l'autophagie joue un rôle de chimiorésistance dans le traitement du cancer du côlon.

L'hypothèse de ce projet est que les PSDA dérivés de l'ail interagissent avec la tubuline pour altérer l'organisation du réseau microtubulaire responsable de l'inhibition de la prolifération cellulaire et de la modulation de l'autophagie dans le cancer du côlon.

Dans un premier temps, nous avons analysé l'impact du TTSDA/TTSDB sur le réseau microtubulaire. Nous avons montré que le TTSDA/TTSDB interagissait avec la tubuline par spectrométrie en masse. Nous avons montré que l'organisation microtubulaire est altérée dans les trois lignées cellulaires : HT-29 (mutées BRAF), SW480 (mutées KRAS) et SW620 (mutées KRAS, métastatiques), plus sensibles au TTSDB que le TTSDA. Dans un deuxième temps, nous avons étudié le rôle anticancéreux du TTSDB dans le cancer du côlon. Nous avons montré que le TTSDB induisait un arrêt mitotique suivi de la mort cellulaire dans toutes lignées confondues. Son activité antiproliférative est validée dans un système de culture 3D et *in vivo*. Nous avons aussi montré que l'effet du TTSDB est comparable aux agents altérant les microtubules. Dans un troisième temps, nous avons évalué l'impact du TTSDB dans l'autophagie. L'inhibition de l'autophagie est accompagnée par l'accumulation de la protéine p62, qui joue un rôle de survie dans les cellules HT-29 uniquement.

Ensemble, nous avons identifié l'autophagie comme mécanisme de survie lors de l'arrêt mitotique prolongé en fonction du type cellulaire. Cette étude permettra d'envisager un ciblage thérapeutique selon le profil génétique du cancer du côlon.

**Mots clés :** cancer, côlon, tubuline, autophagie, polysulfure de diallyle

## ABSTRACT

Colorectal cancer is a major cause of morbidity and mortality worldwide. Epidemiological studies reveal an inverse correlation between the risk of developing colon cancer and a garlic-rich diet. Many scientific studies reported the anti-cancer activity of diallyl polysulfides (DAPS) derived from garlic in various types of cancer *in vitro* and *in vivo*. The best-known mechanism of action is the induction of mitotic arrest followed by apoptosis. Here tubulin is identified as a new therapeutic target for DAPS. Tubulin is fundamental in the progression of autophagy, an essential energy source for the development of advanced cancer, and autophagy activation plays a role of chemoresistance against the treatment of colon cancer.

The hypothesis of this project is that garlic-derived DAPS interact with tubulin to alter the microtubule network organization responsible for the inhibition of cell proliferation and modulation of autophagy in colon cancer.

First, we analyzed the impact of DATTS/DBTTS on the microtubular network. We have shown that DATTS/DBTTS interacts with tubulin by mass spectrometry. We have shown that the microtubule organization is altered in the three cell lines: HT-29 (BRAF mutated), SW480 (KRAS mutated) and SW620 (metastatic, KRAS mutated), which were more sensitive to DBTTS than DATTS. In a second step, we studied the anticancer activity of DBTTS in colon cancer. We showed that DBTTS induced mitotic arrest followed by cell death in all cell lines. Its anti-proliferative activity is validated in a 3D culture system and *in vivo*. We have also shown that the effect of DBTTS is comparable to microtubule altering agents. In a third step, we evaluated the impact of DBTTS in autophagy. Inhibition of autophagy is accompanied by accumulation of the p62 protein, which plays a survival role in HT-29 cells only.

Altogether, we identified here autophagy as a survival mechanism during prolonged mitotic arrest depending the cell type. This study will allow us to consider targeted therapy according to the genetic profile of colon cancer.

**Key words:** cancer, colon, tubulin, autophagy, diallyl polysulfide