



HAL
open science

Effet anti-tumoral de l'acide docosahexaénoïque : implication des microARNs et du TNFalpha

Aurélie Fluckiger

► **To cite this version:**

Aurélie Fluckiger. Effet anti-tumoral de l'acide docosahexaénoïque : implication des microARNs et du TNFalpha. Médecine humaine et pathologie. Université de Bourgogne, 2015. Français. NNT : 2015DIJOS042 . tel-01418773

HAL Id: tel-01418773

<https://theses.hal.science/tel-01418773>

Submitted on 17 Dec 2016

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

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

UNIVERSITE DE BOURGOGNE

UFR Sciences de la Vie, Terre et Environnement / INSERM U866

THESE

Pour obtenir le grade de Docteur à l'Université de Bourgogne

Discipline: Sciences vie

Spécialité : Biologie Cellulaire et Moléculaire

Par

Aurélié FLUCKIGER

Soutenue publiquement le 15 décembre 2015

**Effet anti-tumoral de l'acide docosahexaénoïque : Implication des
microARNs et du TNF α**

Directeur de thèse
Aziz HICHAMI

Co-encadrant
Mickaël RIALLAND

Professeur Stéphane CHEVALIER (Université François Rabelais INSERM U 1069, Tours)	Rapporteur
Docteur Laurent CORCOS (Université de Brest INSERM U1078, Brest)	Rapporteur
Docteur Marie-Thérèse DIMANCHE-BOITREL (Université Rennes 1 INSERM U1085, Rennes)	Examinatrice
Professeur François GHIRINGHELLI (Université de Bourgogne INSERM U866, Dijon)	Président du jury
Docteur Aziz HICHAMI (Université de Bourgogne INSERM U866, Dijon)	Directeur de thèse
Docteur Mickaël RIALLAND (Université de Bourgogne INSERM U866, Dijon)	Co-encadrant de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'évaluer mon travail et de bénéficier de leurs compétences et de leurs connaissances. Je remercie le Professeur Stéphan Chevalier et le Docteur Laurent Corcos d'avoir accepté d'être mes rapporteurs ainsi que le Docteur Marie-Thérèse Dimanche-Boitrel d'être mon examinatrice. Merci pour le temps consacré à la lecture de ce manuscrit et pour vos remarques constructives.

Je remercie également mon directeur d'équipe, le Professeur François Ghiringhelli, de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, pour son appui et ses précieux conseils concernant mon avenir professionnel. Un grand merci à mon directeur de thèse et mon co-encadrant, le Docteur Aziz Hichami et le Docteur Mickaël Rialland, de m'avoir donné l'opportunité de réaliser une thèse au sein du laboratoire. Merci à Mickaël pour ta disponibilité et ton encadrement qui m'a permis d'acquérir une véritable rigueur scientifique. Merci à Aziz pour tes conseils avisés et ta bonne humeur. Tu as le don de toujours mettre en avant les points positifs dans chaque résultat pour remonter le moral.

Merci à toutes les personnes qui m'ont entouré, de la faculté des Sciences Gabriel à la faculté de Médecine. Je pense tout particulièrement à mes compagnons de bureau.

Célia, nous avons commencé ce périple ensemble et nous soutiendrons notre thèse presque ensemble à 1 jour près. Merci pour ton soutien psychologique durant ces trois années. Je pense également à ceux qui sont arrivés par la suite: Adélie, Tania, Charlotte et Danish. Merci pour votre soutien et votre bonne humeur quotidienne. Nos fous rires et nos sorties vont me manquer mais j'espère que notre amitié ne s'arrêtera pas à ma soutenance de thèse. Je compte bien prendre de vos nouvelles et revenir vous voir dès que possible, et comme dirait Francis « ça continue encore et encore, c'est que le début ... ».

Je remercie tout naturellement ma famille et ma belle-famille qui m'ont soutenu.

Enfin merci à mon compagnon depuis presque 10 ans maintenant. Il est parfois difficile de tout comprendre lorsque nous parlons de notre travail car nous avons choisi des domaines complètement différents, mais tu as toujours cru en moi, m'encourageant à aller plus loin et ne jamais abandonner même pendant les périodes de doutes. L'envie que tu sois fier de moi a été une source de motivation pour me surpasser. C'est à toi que je dédie ce travail.

Résumé

L'acide docosahexaénoïque (DHA) est un acide gras polyinsaturé oméga-3 avec des propriétés anti-inflammatoires et anti-tumorales. L'effet du DHA dans le cadre du cancer colorectal pourrait être la conséquence d'une action anti-proliférative directe sur les cellules cancéreuses et de sa capacité à réduire l'inflammation propice au développement de la tumeur. Le Tumor Necrosis Factor- α (TNF α) est une cytokine pro-inflammatoire et présente des effets paradoxaux. En fonction du contexte cellulaire, le TNF α activera une voie de signalisation dépendante de la kinase RIP1 engageant la cellule cancéreuse vers la prolifération ou la mort cellulaire. Notre objectif fut d'évaluer le rôle du TNF α dans l'effet anti-prolifératif du DHA sur des cellules cancéreuses coliques et de préciser les mécanismes moléculaires régulant l'expression de cette cytokine.

Le DHA induit l'expression de TNF α et sa sécrétion par les cellules cancéreuses. Nous avons montré que des anticorps neutralisant l'action autocrine du TNF α sur les cellules cancéreuses prévenait l'effet pro-apoptotique du DHA et abolissait l'effet anti-cancéreux observé dans des souris nude avec tumeurs HCT-116 sous régime DHA. L'induction de l'expression de TNF α par le DHA prend son origine à un niveau post-transcriptionnel par la répression du microARN miR-21 perdant sa capacité à dégrader l'ARNm TNF α . Le DHA par l'activation des kinases AMPK α et RIP1 déclenche la translocation nucléaire du facteur de transcription FOXO3a se fixant sur le promoteur miR-21 et diminuant l'expression de ce microARN.

Nos travaux mettent en évidence un nouveau mécanisme moléculaire soutenant l'action anti-tumorale du DHA.

Mots clés: Acide docosahexaénoïque, cancer colorectal, TNF α , apoptose, miR-21, AMPK α , Foxo3a, RIP1.

Abstract

Docosahexaenoic acid (DHA) is an omega-3 polyunsaturated fatty acid with anti-inflammatory and anti-tumoral properties. The anti-tumor effect of DHA in colorectal cancer might be attributed to direct anti-proliferative action on cancer cells and to its ability to reduce inflammatory status involved in tumor growth. Tumor Necrosis Factor- α (TNF α) is an inflammatory cytokine with paradoxical effect in cancer biology. According to the cellular context, TNF α activates RIP1 kinase dependent signaling pathway leading to proliferation or cell death. Our aim was to evaluate the role of TNF α in anti-proliferative effect of DHA in colon cancer cells and to precise the molecular mechanisms regulating TNF α expression.

DHA treatment increased TNF α expression and secretion by cancer cells. We have shown that neutralization of autocrine TNF α action prevented the pro-apoptotic effect of DHA colon cancer cells and abolished anti-cancer effect in tumor HCT-116 bearing nude mice fed a DHA-enriched diet. Induction of TNF α expression by DHA occurred at post-transcriptional level through microRNA miR-21 repression reducing its ability to induce TNF α mRNA degradation. DHA activates AMPK α and RIP1 kinases triggering nuclear translocation of the transcription factor Foxo3a which bound to miR-21 promoter and repressed the microRNA expression.

Our works highlight a new molecular mechanism supporting the anti-cancer action of DHA.

Keywords: Docosahexaenoic acid, colorectal cancer, TNF α , apoptosis, miR-21, AMPK α , Foxo3a, RIP1.

Tables des matières

Liste des tableaux.....	1
Liste des figures.....	1
Abréviation	2

INTRODUCTION	5
--------------	---

I. Cancer colorectal :..... 6

A. Définition du cancer :	6
B. Epidémiologie du cancer colorectal:	6
1. Les cancers dans le monde.....	6
2. Les cancers en France.....	7
C. Etiologie du cancer colorectal :	8
1. Les cancers colorectaux sporadiques et héréditaires :	8
2. Les instabilités génomiques :	16
3. Les voies de signalisations altérées :	17
D. Oncogenèse : Rôle de TNF α	28
1. Inflammation:.....	31
2. Mort cellulaire:.....	34
3. Angiogenèse :	43

II. Acides gras polyinsaturés n-3 et cancer :45

A. Définition et structure des acides gras:.....	45
B. Sources alimentaires des acides gras et Apports Nutritionnels Conseillés (ANC):	48
C. Métabolisme des acides gras :	50
1. Synthèse des acides gras :	50
2. Catabolisme des acides gras:	56
3. Les dérivés des AGPI n-6 et n-3 : eicosanoïdes et docosanoïdes	58
D. Effet anti-tumoral des acides gras polyinsaturés n-3 :	61
1. Effet des AGPI n-3 sur les cellules cancéreuses	62
2. Effet des AGPI n-3 sur le microenvironnement tumoral.....	72

III. MicroARN et cancer	82
A. Définition et découverte des microARNs :.....	83
B. Synthèse et mode d'action des microARNs :	83
1. Transcription et maturation dans le noyau :.....	83
2. Exportation dans le cytoplasme et incorporation dans le complexe RISC :.....	85
3. Mode d'action :	85
C. Implication des microARNs dans l'oncogenèse :.....	88
1. MicroARNs oncogéniques :	88
2. MicroARNs suppresseurs de tumeurs :.....	91
3. Les microARNs comme outils de dépistage et de pronostic:.....	92

OBJECTIF	93
-----------------	-----------

RESULTATS	94
------------------	-----------

I. Rappel introductif	95
------------------------------------	-----------

II. Article	99
--------------------------	-----------

DISCUSSION	100
-------------------	------------

I. Mécanismes moléculaires à l'origine de l'effet anti-prolifératif du DHA <i>in vitro</i>	101
---	------------

A. Action cytotoxique du DHA	101
------------------------------------	-----

B. La régulation des cytokines inflammatoires par DHA : rôle de NF- κ B et PPAR γ	102
---	-----

C. La régulation de miR-21 par DHA.....	102
---	-----

D. La régulation du facteur de transcription anti-tumoral Foxo3a par DHA : rôle d'AMPK....	104
--	-----

E. Boucle de régulation positive de la production de TNF α par DHA : rôle de RIP1.....	105
---	-----

II. Effet anti-tumoral du DHA.....	106
---	------------

CONCLUSION PERSPECTIVES	109
--------------------------------	------------

I. Culture cellulaire et traitements.....	113
A. Lignées cellulaires et entretien	113
B. Traitement acides gras	113
C. Traitements avec les inhibiteurs pharmacologiques	114
D. Transfection des siARN et pre-miARN.....	114
E. Transfection de plasmide	114
II. Mesure de la prolifération et de la mort cellulaire	115
A. Analyse de la prolifération cellulaire.....	115
B. Analyse de la mort cellulaire par apoptose.....	115
1. Marquage Annexin V et 7AAD.....	115
2. Mesure de l'activité caspase-8.....	115
III. Extraction d'ARN et RT-qPCR.....	116
A. Extraction des ARNs totaux et microARNs.....	116
B. Transcription inverse.....	116
C. La PCR quantitative en temps réel	117
IV. Western Blotting.....	118
A. Extraction des protéines	118
B. Migration et transfert.....	119
C. Immunoblotting et révélation.....	119
V. Immunofluorescence	120
VI. Immunoprécipitation de chromatine.....	120
VII. Test ELISA.....	121
VIII. Expérimentation animale.....	121
IX. Analyse statistique	122

Publications et communications	123
--------------------------------	-----

Annexe	124
--------	-----

BIBLIOGRAPHIE	126
---------------	-----

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les apports nutritionnels conseillés en acides gras	48
Tableau 2 : Listes de microARNs dont l'expression est altérée dans le CCR.	91
Tableau 3: Liste des amorces de qPCR et ChIP	117
Tableau 4: Programme de qPCR	117
Tableau 5: Liste des anticorps pour l'immunoblotting	119
Tableau 6: Composition du régime contrôle et enrichi en DHA	122

Liste des figures

Figure 1: Estimation de l'incidence et de la mortalité des cancers dans le monde	7
Figure 2: La voie de signalisation Wnt/APC/ β -caténine.....	19
Figure 3: La voie de signalisation RAS/MAPK.....	20
Figure 4: La voie de signalisation PI3K/Akt.....	22
Figure 5: La voie de signalisation p53.....	23
Figure 6: Le voie de signalisation du TGF-b.....	25
Figure 7: Les 10 caractéristiques des cellules cancéreuses	29
Figure 8: Voie de signalisation du TNF α	31
Figure 10: Changements morphologiques au cours des différents types de mort cellulaire.....	34
Figure 9: Voie de signalisation apoptotique.....	37
Figure 11: Voie de signalisation nécroptotique.....	42
Figure 12: Structure et nomenclature des acides gras linoléique et α -linoléique.....	46
Figure 13: Structure d'un triglycéride, d'un phospholipide et d'un ester de cholestérol.....	47
Figure 14: Biosynthèse des acides gras saturés.....	52
Figure 15: Synthèse des acides gras saturés, monoinsaturés et polyinsaturés de la famille n-7 et n-9.....	53
Figure 16: Structure et métabolisme des acides gras n-6 et n-3.....	55
Figure 17: Dégradation des acides gras par β -oxydation mitochondriale.....	57
Figure 18: Les dérivés eicosanoïdes et docosanoïdes des AGPI n-6 et n-3	59
Figure 19: Biogenèse des microARNs chez les cellules eucaryotes.....	84
Figure 20: Les différents modes de régulation post-transcriptionnelle des ARNm par les microARNs.....	87
Figure 22 : Schéma récapitulatif.....	106

Abréviation

AA : Acide Arachidonique (20:4n-6)	CIMP: CpG Island Methylation
ACC : Acétyl-CoA Carboxylase	Phenotype
ADN : Acide DésoxyriboNucléique	CIN : Chromosome INstability
ADNc : ADN complémentaire	MYC : Myelocytomatosis oncogene
AG : Acides Gras	COX : Cyclo-oxygénase
AGMI : Acides Gras MonoInsaturés	CSF : Colony Stimulating Factor
AGPI : Acides Gras PolyInsaturés	CYLD : Cylindromatosis
AGS : Acides Gras Saturés	DGLA : Acide Dihomo- γ -Linoléinique
AINS : Anti-Inflammatoire Non	DHA : Acide DocosaHexaénoïque (22:6
Stéroïdien	n-3)
ALA : Acide α -linoléinique (18:3 n-3)	DISC : Death Inducing Signaling
AMPK : AMP-activated protein Kinase	Complex
ANC: Apports Nutritionnels Conseillés	DMEM : Dulbecco's Modified Eagle
AOM: Azoxyméthane	Medium
Apaf-1 : Apoptosis Protease-Activating	DMSO : Diméthylsulfoxyde
Factor-1	DNMT : ADN méthyltransférases
APC : Adenomatous Polyposis Coli	DPA : Acide DocosaPentaénoïque
ARN : Acide RiboNucléique	(22:5n-3)
ATF : Activating Transcription Factor	DR4/5 : Death Receptor 4/5
ATP : Adénosine TriPhosphate	DSS: Dextran Sodium Sulfate
BAD: Bcl-2-associated death	DTT : Dithiothréitol
BAX : Bcl-2-associated X protein	EC : Ester de Cholestérol
BCA : Acide bicinchoninique	ECL : Enhanced ChemiLuminescent,
bFGF : basic Fibroblast Growth Factor	EDTA : Acide Ethylène Diamine
BH3 : Bcl-2 homology domain 3	Tétraacétique
BID: BH3 interacting-domain death	EGF : Epidermal Growth Factor
agonist	EGTA : Acide Ethylène Glycol
BIM : Bcl2-interacting mediator of cell	Tétraacétique
death	eIF2 : Eukaryotic translation Initiation
BSA : Sérum albumine bovine	Factor 2
CCR: Cancer Colorectal	EMT : Epithelial-mesenchymal transition
CDK : Cyclin Dependent Kinase	

EPA : Acide EicosaPentaénoïque (20:5 n-3)

ERK : Extracellular Regulated Kinase

FAP: Familial adenomatous polyposis

FAS : Fatty Acid Synthase

FLIP : FLice (caspase-8) Inhibitory Protein

GDP : Guanosine DiPhosphate

GLUT4 : Glucose Transporter type 4

GSK3 β : Glycogen Synthase kinase 3 β

GTP : Guanosine TriPhosphate

HAT: Histone AcetylTransferase

HEPES : Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

HNPCC : Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer

IAP: Inhibitor of Apoptosis Protein

ICAM: InterCellular Adhesion Molecule

IGF : Insulin like Growth Factor

IKK : I κ B Kinase

IL : Interleukine

INCa: Institut National du Cancer

JAK: Janus Kinase

JNK : Jun N-terminal kinase

KO : Knock Out

LA : Acide Linoléique (18:2 n-6)

LOX : Lipoxgénase

LT : Leucotriène

LXR : Liver X Receptor

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

MDSC: Myeloid-Derived Suppressor Cells

MEK: Mitogen-activated extracellular kinase

MLH : MutL homolog

MLKL: Mixed Lineage Kinase domain-Like

MMP: Matrix Metalloproteinase

MMR : DNA mismatch repair

MSH : MutS homolog

MSI : MicroSatellite Instability

mTOR : mammalian Target Of Rapamycin

NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

NEMO: NF- κ B Essential Modulator

NF- κ B : Nuclear Factor Kappa-light-chainenhancer of activated B cells

NIK : NF- κ B Inducing Kinase

NO : Oxyde nitrique

PARP : Poly (ADP-ribose) polymerase

PCR : réaction en chaîne par polymérisation

PDCD4: programmed cell death 4

PDK2 : 3-phosphoinositide dependent kinase 2

PG : Prostaglandine

PGDH: Prostaglandin dehydrogenase

PI3K : Phosphatidyl-Inositol 3'-Kinase

PKR : interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase

PL : Phospholipides

PMSF : Fluorure de phenylméthanesulfonyle

PPAR : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor

PPRE : Elément de réponse aux PPAR
PTEN : Phosphatase and TENsin
homolog
PUMA : p53 Upregulated Modulator of
Apoptosis
PVDF : Fluorure de Polyvinylidène
Rb : gène de la protéine du
RétinoBlastome
RE : Réticulum endoplasmique
RIP: Receptor Interacting Protein
RNase : Endoribonucléase
ROS : Espèces réactives de l'oxygène
RT : transcription inverse
RXR : Récepteurs X aux Rétinoïdes
SCD : Stéaroyl-CoA Désaturase
SDS : Sodium-Dodécyl-Sulfate
siRNA : ARN interférent
SOD : Super Oxyde Dismutase
SPRY: Sprouty
SREBP : Sterol Regulatory Element-
Binding Protein
STAT : Signal Transducer and Activator
of Transcription
SVF: serum de voeu foetal
TAF: Tumor Angiogenesis Factor
TAM: Tumor-Associated Macrophage
TG : Triglycérides
TGF : Transforming Growth Factor
TGFR : Récepteur au TGF
TLR : Récepteurs Toll Like
TNF : Tumor Necrosis Factor
TRADD: TNF Receptor Associated
Death domain

TRAF2 : Tumor necrosis factor Receptor-
Associated Factor 2
TRAIL : Tumor necrosis factor-Related
Apoptosis-Inducing Ligand
VCAM: Vascular Cell Adhesion
Molecule
VEGF : Vascular Endothelial Growth
Factor

INTRODUCTION

I. Cancer colorectal :

A. Définition du cancer :

Hippocrate (460-377 av. J-C) a été le premier à utiliser le terme grec « carcinos » et compare le cancer à un crabe dû à la ressemblance des tumeurs du sein avec cet animal. C'est ensuite le médecin romain Celsus (28 av. J.C – 50 ap. J.C) qui traduit le mot grec « carcinos » en « cancer ». Puis Galien (131-201 après J.C) utilisa le terme grec « oncos » pour désigner une grosseur ou une tumeur maligne.

D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le cancer est un terme général appliqué à un grand groupe de maladies qui peuvent toucher n'importe quelle partie de l'organisme. L'une de ses caractéristiques est la prolifération rapide de cellules anormales qui peuvent essaimer dans d'autres organes, formant des métastases.

B. Epidémiologie du cancer colorectal:

1. Les cancers dans le monde

Le cancer est une cause majeure de mortalité dans le monde avec 8.2 millions de décès et on estime à 14.1 millions de nouveaux cas en 2012 [1].

Le cancer colorectal est le 3^{ème} cancer le plus fréquent et la 4^{ème} cause de mortalité par cancer dans le monde tous sexes confondus.

En effet, les cancers les plus fréquemment diagnostiqués sont les cancers du poumon, du sein et le cancer colorectal avec respectivement 1.8 ; 1.7 et 1.4 million cas en 2012. Tandis que la mortalité par cancer est la plus élevée pour les cancers du poumon, du foie, de l'estomac et le cancer colorectal avec respectivement 1600, 745, 723 et 694 mille décès en 2012 (figure 1).

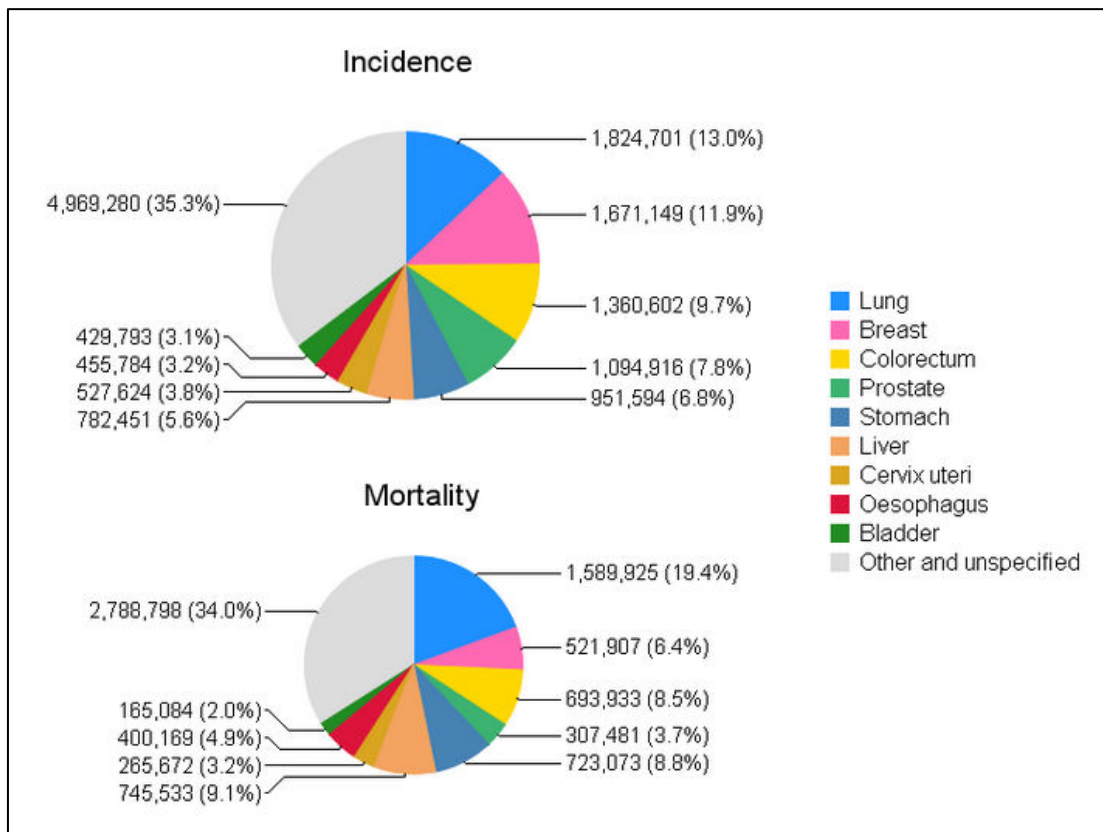


Figure 1: Estimation de l'incidence et de la mortalité des cancers dans le monde [1]

Chez l'homme, l'incidence du cancer colorectal se situe en 3^{ème} position avec 746 000 cas en 2012, après le cancer du poumon et de la prostate (1,2 et 1,1 million cas), et en 4^{ème} position quant à la mortalité (374 mille décès) après celui du poumon, du foie et de l'estomac (1100, 521 et 469 mille décès).

Chez la femme, l'incidence du cancer colorectal se situe en 2^{ème} position avec 614 000 cas en 2012, après le cancer du sein (1.6 million cas), et en 3^{ème} position quant à la mortalité par cancer (320 mille décès) après celui du sein et du poumon (522 et 491 mille décès).

2. Les cancers en France

D'après un rapport édité en janvier 2014 par l'INCa (Institut National du Cancer), on estime le nombre de nouveaux cas de cancers en France en 2012 à 355 mille (200 mille chez l'homme et 155 mille chez la femme). Les trois cancers les plus fréquents chez l'homme sont ceux de la prostate (57 mille cas diagnostiqués par an), du poumon (28 mille cas diagnostiqués par an) et du côlon-rectum (23 mille cas diagnostiqués par an). Les plus fréquents chez la femme sont les cancers du sein (49 mille cas diagnostiqués par an), du côlon-rectum (19 mille cas diagnostiqués par an) et du poumon (11 mille cas diagnostiqués par an). La mortalité par cancer en 2012 est estimée à 148 mille décès (85 mille chez

l'homme et 63 mille chez la femme) avec le cancer du poumon comme première cause de décès par cancer chez l'homme (21 mille décès) devant le cancer colorectal (9 mille décès) et le cancer de la prostate (8 mille décès). Chez la femme, la première cause de mortalité par cancer est celui du sein (12 mille décès) devant le cancer du poumon (8 623 décès) et le cancer colorectal (8 447 décès).

C. Etiologie du cancer colorectal :

1. Les cancers colorectaux sporadiques et héréditaires :

L'origine des cancers colorectaux (CCR) :

- *Les cancers sporadiques* représentent approximativement 95% des cas et résultent de multiples modifications génomiques spontanées (non héritées) dans les cellules somatiques telles que des délétions, des mutations ponctuelles ou des insertions et des translocations génomiques [2].
- *Les cancers héréditaires* représentent environ 5% des cas de CCR et résultent de mutations germinales. Il existe deux types de prédispositions héréditaires majeures aux CCR : la première est la Polypose Adénomateuse Familiale (FAP, 10%) et le Syndrôme de Lynch ou HNPCC (Hereditary non polyposis colon cancer) (10-15%) [2].

a) Les facteurs de risque des CCR sporadiques

Quatre-vingt pourcent des CCR surviennent chez les hommes et femmes de plus de 50 ans, sans facteur de prédisposition génétique identifié. De plus, un individu quittant un pays où l'incidence de CCR est faible pour émigrer vers un pays où l'incidence est élevée, a le même risque de développer un CCR que les sujets du pays d'adoption [3]. Ceci suggère que des facteurs environnementaux, dont les facteurs liés au style de vie (habitudes alimentaires, sédentarité, alcool), à l'obésité ou encore l'inflammation, jouent un rôle important dans le risque de cancer colorectal.

L'alimentation :

Diverses études nutritionnelles dont l'étude EPIC (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition) issue du suivi de quelques 478 040 hommes et femmes de 10 pays européens, montrent qu'une alimentation riche en viandes rouges, charcuteries ou grillades et au contraire faible en poissons, en fruits et légumes augmente le risque de CCR.

La dégradation des substrats protéiques dans le côlon ou le métabolisme des peptides et des acides aminés peut former des métabolites potentiellement toxiques pour l'hôte (phénols, ammoniac, amines, indoles). Le risque est augmenté de 29 % par portion de viande consommée de 100 g/j et de 21 % par portion de 50 g de charcuterie/j [4]. La charcuterie conservée par fumaison, séchage et salage est riche en nitrites à potentiel cancérigène. Un excès en fer héminique, contenu dans les viandes, augmente la production de radicaux libres (pro-oxydants) pouvant causer des dommages à l'ADN [5]. Les effets cytotoxiques dus à l'excès de fer seraient compensés par une hyperprolifération des cellules épithéliales qui pourrait donc favoriser le CCR [6]. La température de cuisson de la viande est également importante. En effet, à une température élevée (frit, grillé ou rôti au barbecue), la viande forme des substances chimiques appelées amines hétérocycliques (AH) qui accroissent le risque de cancer colorectal en entraînant des mutations sur certains gènes comme : H-ras, K-ras, p53 [7], Apc [8] ou encore β -caténine [9].

Les fruits et légumes quant à eux préviennent l'apparition de CCR [10] car ils contiennent des vitamines, des minéraux, des oligoéléments ainsi que des fibres. Les vitamines, les minéraux et les oligoéléments sont impliqués dans diverses fonctions de l'organisme. Par exemple, les vitamines C et E ont des propriétés antioxydantes tout comme le sélénium en tant que co-enzyme de la glutathion peroxydase. La vitamine B9 joue un rôle dans l'intégrité de l'ADN et le zinc participe à l'intégrité des histones liées à l'ADN. Les vitamines A, B6, B12 et D participent à l'augmentation des défenses immunitaires. Les fibres préviennent l'apparition de CCR, d'une part, en limitant le contact entre d'éventuels agents cancérigènes de l'alimentation et la paroi intestinale [11], d'autre part, en augmentant la concentration de butyrate issu de la fermentation des fibres par des bactéries de l'intestin. Le butyrate agit comme un facteur de survie des cellules coliques saines et possède des propriétés anti-néoplasiques et anti-inflammatoires [12]. Les effets du butyrate passent en partie par l'inhibition de la voie NF- κ B impliquée dans l'inflammation et la prolifération cellulaire [13]. Le butyrate induit également l'augmentation de l'expression et de l'activité de PPAR γ impliqué dans la mort cellulaire [14].

L'excès d'apport en acides gras saturés (AGS) augmente le risque de cancer notamment le cancer du sein, du côlon et de la prostate. L'augmentation calorique n'explique pas à elle seule l'augmentation des CCR associées à un régime riche en AGS. En effet, ce risque est conservé en veillant à comparer entre des régimes isocaloriques. Les graisses animales riches en AGS sont d'avantage associées à une augmentation de la carcinogenèse que les graisses provenant d'huiles végétales. Par exemple, les AGS augmenteraient la

concentration d'acides biliaires secondaires dans le côlon qui stimuleraient la prolifération de l'épithélium colique augmentant ainsi le risque de CCR [15]. L'huile d'olive riche en acide gras oméga-9 (acide oléique) a peu d'effet sur le développement de cancer. Cependant, des études montrent un faible taux de cancers du sein, du côlon et de la prostate au sein des populations dont l'alimentation est de type méditerranéen avec une consommation élevée d'huile d'olive et dont les effets bénéfiques seraient principalement dus à la présence d'antioxydants [16]. Cependant, certaines huiles végétales (blé, carthame, tournesol) riche en précurseur des acides gras oméga-6 (acide linoléique) augmentent le développement de cancers. Tandis que le précurseur des acides gras oméga-3 (acide α -linoléique), contenu dans des huiles végétales (lin, noix, canola), et les acides gras oméga-3 EPA et DHA, contenus dans les poissons et les huiles de poisson, inhibent la croissance tumorale [17]. Nous aborderons l'implication des AGPI n-3 dans la carcinogenèse plus en détails dans le chapitre II.

Des études suggèrent qu'une restriction de la consommation de glucides réduit l'apparition et la progression de tumeur [18]. Ainsi, une étude chez des patients avec un cancer gastro-intestinale montrent que l'augmentation de la glycémie, par un régime enrichi en glucose, favorise la prolifération des cellules cancéreuses [19]. Ce constat a également été fait pour les cancers du sein, du pancréas, de l'endomètre et les mélanomes et suggèrent que les glucides peuvent avoir des effets sur la prolifération des cellules tumorales [20, 21]. En effet, contrairement aux cellules saines, les cellules malignes sont dépendantes de la disponibilité en glucose dans le sang pour générer de l'énergie cellulaire (ATP) dû à une réduction de leur capacité à métaboliser des acides gras en raison d'un dysfonctionnement de la mitochondrie [18]. C'est en 1923 que Otto Warburg découvre que les cellules cancéreuses ne fournissent en ATP en dégradant du glucose de façon anaérobie, au lieu de tirer cette dernière de la respiration cellulaire mitochondriale. Ainsi, les cellules tumorales vont avoir une consommation accrue de glucose, que ce soit en présence ou en absence d'oxygène, afin de satisfaire leurs besoins énergétiques et organiques nécessaire à leur prolifération [22].

Pour finir, la consommation excessive que se soit de protéines, de lipides ou de glucides favorise le déséquilibre entre apports et dépenses énergétiques et favorise le développement d'une obésité représentant un facteur de risque du CCR.

L'obésité :

L'obésité fait partie des facteurs augmentant le risque du CCR. Chez une personne obèse (IMC > 30 kg/m²), l'augmentation du risque est de 33 % et le risque est d'autant plus élevé que l'indice de masse corporelle (IMC) augmente [23]. Chez les personnes obèses, on observe très souvent une résistance à l'insuline entraînant une hyper-glycémie et par conséquent une hyper-insulinémie. L'insuline possède des effets pro-tumoraux car sa fixation au récepteur de l'insuline active la voie PI3K/Akt impliquée dans l'expression de gènes mitogéniques et anti-apoptotiques [24]. D'autre part, l'excès d'apport en lipides au niveau des adipocytes induit une dérégulation du métabolisme (lipidique et glucidique), une résistance à l'insuline et une altération de la sécrétion d'adipokines par les adipocytes (facteurs de croissance, cytokines, chimiokines) pouvant mener à une inflammation, au recrutement de macrophages ou encore favoriser l'angiogenèse influençant profondément le comportement de la tumeur. En effet, la co-culture d'adipocytes matures (isolés à partir de tissu adipeux murin) avec des cellules tumorales (prostatiques, mammaires ou de côlon), augmente significativement la prolifération des cellules tumorales due aux facteurs sécrétés par les adipocytes [25-27]. Ainsi, la leptine est une adipokine principalement connue pour son rôle de facteur de satiété mais elle est également impliquée dans l'activation de voies de signalisation pro-tumorales telles que la voie PI3K/Akt, la voie MAPK et JAK2/STAT3 suite à la fixation sur son récepteur LEP-R [28]. Les adipocytes peuvent sécréter des cytokines pro-inflammatoires et des chimiokines comme IL-6, TNF α ou CSF-1 participant à l'inflammation associée aux cancers et à la progression tumorale [29]. Les adipocytes constituent une réserve de lipides, par conséquent ils vont libérer des acides gras libres qui pourront être captés par les cellules cancéreuses et être utilisés comme source d'énergie via la β -oxydation des lipides et favoriser la progression tumorale. Ces transferts de lipides ont été mis en évidence dans le cancer du sein, de l'ovaire et de la prostate [30-32].

L'inflammation

L'inflammation est une réponse physiologique à une agression : infection, blessure, brûlure ou encore allergie. Elle accompagne la réponse immunitaire, facilite l'élimination de l'agent pathogène et favorise le renouvellement des tissus lésés. On distingue trois phases : la phase d'initiation (activation de l'immunité innée et vasodilatation), la phase d'amplification (mobilisation de l'immunité adaptative) et la phase de résolution (renouvellement des tissus lésés). Ces différentes étapes sont orchestrées par la production

de cytokines/chimiokines qui permettent le dialogue entre les différents types cellulaires : cellules immunitaires, endothéliales ou encore les fibroblastes.

Un dérèglement dans la quantité ou dans la cinétique de production de ces cytokines/chimiokines entraîne une réponse immunitaire non maîtrisée et bloque la phase de résolution. Par conséquent, l'inflammation perdure et peut devenir chronique.

En condition inflammatoire, des cellules immunitaires, principalement les macrophages, produisent des espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui peuvent créer des dommages à l'ADN donnant lieu, par exemple, à des mutations activatrices d'oncogènes (KRAS) ou inhibitrices de suppresseurs de tumeurs (p53) favorisant la carcinogenèse [33]. De plus, comme nous allons le voir dans le prochain paragraphe, les cytokines inflammatoires activent des voies de signalisation pro-tumorales favorisant la prolifération cellulaire, l'angiogenèse et l'invasion. Ainsi, les maladies intestinales inflammatoires chroniques, telles que la colite ulcéreuse ou la maladie de Crohn, ont été associées aux processus de promotion et de progression du CCR [34, 35].

Le contexte inflammatoire est associé à l'apparition et à la progression du CCR puisqu'on constate que les patients atteints de ce type de cancer ont une augmentation des taux circulants de médiateurs pro-inflammatoires tels que l'IL-6, IL-1 β , TNF α ou encore PGE2 [36, 37]. Ces médiateurs sont produits principalement par des cellules immunitaires (monocytes, macrophages et lymphocytes) et accessoirement par les cellules tumorales. Grâce à cette production de cytokines, les cellules cancéreuses activent les cellules inflammatoires impliquées dans l'immunosuppression et la néoangiogenèse favorisant la progression tumorale [38, 39].

L'IL-1 β et TNF α sont des cytokines pro-inflammatoires qui, en se liant à leurs récepteurs respectifs (IL-1R1 et TNF-R) à la surface des cellules immunitaires et tumorales, actives les voies de MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) et NF- κ B. Ces deux voies de signalisation sont impliquées dans la production de molécules inflammatoires (IL-6, IL-8, TNF α , PGE2), anti-apoptotiques (Bcl-2, FLIP), pro-prolifératives (Cycline D1, EGFR) et pro-angiogénique (VEGF). Ainsi, IL-1 β et TNF α réduisent l'apoptose des cellules tumorales, activent leur prolifération et favorisent l'angiogenèse. De plus, l'action de l'IL-1 β sur les cellules du système immunitaire varie en fonction de son profil d'expression. Lors d'une inflammation aigue, l'IL-1 β est produite en grande quantité pendant une durée limitée et favorise une immunité anti-tumorale en augmentant la production d'IFN γ par les lymphocytes T CD8+ [40]. A l'inverse, lors d'une inflammation chronique, l'IL-1 β est

produite de manière modérée mais continue et induit l'expansion de cellules immunitaires immunosuppressives (MDSC) et de Th17, favorisant une réponse immunitaire non optimum propice à la croissance tumorale [41].

De même pour l'IL-6 qui, en se liant à son récepteur IL-6R à la surface des cellules immunitaires ou tumorales, active la voie JAK (JANus Kinase)-STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription) régulant également l'expression de gènes pro-inflammatoires (IL-1 β , TNF α , PGE2), anti-apoptotiques (p53, Bcl-2, IAP) et pro-angiogénique (VEGF) [42]. L'IL-6 peut ainsi exercer un effet direct sur la croissance et la survie des cellules tumorales mais également un effet immunomodulateur. L'IL-6 favorise l'activité immunosuppressive des MDSC et des T-reg, et bloque l'activité des cellules dendritiques et des lymphocytes natural killer (NK) favorisant l'échappement des tumeurs au système immunitaire anti-tumoral [43].

PGE2 est un médiateur lipidique pro-inflammatoire métabolisé par une enzyme : la cyclo-oxygénase-2 (COX-2) dont l'expression est fortement augmentée dans des cellules cancéreuses coliques en culture et dans des tumeurs coliques. Les cytokines pro-inflammatoires IL-6 et IL-1 β seraient en partie responsable de l'induction d'expression de COX-2 suite à l'activation des facteurs de transcription NF- κ B et STAT3 [44]. L'activité de PGE2 peut être augmentée suite à la perte d'expression de la 15-prostaglandine dehydrogénase (15-PGDH) qui est une enzyme catalysant sa dégradation. Or, l'augmentation du taux de COX-2 est observée dans un tiers des CCR et la perte de la 15-PGDH dans 80% des CCR [45]. La fixation de PGE2 à ses récepteurs (EP-1 à EP-4), présents sur de multiples types cellulaires, active les voies Wnt/ β -caténine, PI3K/Akt et RAS/MAPK impliquées dans l'expression de gènes anti-apoptotiques (Bcl-2), pro-angiogénique (VEGF) et l'inhibition de gènes anti-prolifératifs (p21) [46]. PGE2 augmente la croissance tumorale en agissant directement sur les cellules cancéreuses mais également sur le système immunitaire. En effet, PGE2 régule la production de cytokines, la différenciation ainsi que l'activité des cellules immunitaires [47]: elle supprime les fonctions cytolytiques des cellules NK et la production d'IFN γ responsable de la réponse anti-tumorale des Th1 et des T CD8+ cytotoxiques. A l'inverse, elle favorise la différenciation des T CD4+ naïfs en Th17 et Th2 à activité pro-tumorale [48]. Enfin, PGE2 induit l'expression de l'arginase-1 et iNOS indispensable à l'activité immunosuppressive des MDSC [49].

L'une des stratégies pour diminuer le apparition et la progression du CCR est d'utiliser des agents anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS), comme l'aspirine, qui inhibent l'activité des COX. En effet, l'administration d'une faible dose d'aspirine pendant plus d'un an diminue le risque de CCR [50]. De plus, des AINS tels que sulindac, etodolac ou celecoxib ont été montrés comme diminuant le taux de PGE2 dans les tissus sains et tumoraux via l'inhibition de l'expression de COX-2. La réduction du taux de PGE2 par ces AINS est associée à une modification de l'expression de gènes du cycle cellulaire et de la mort par apoptose se traduisant par une diminution du nombre de polypes dans le côlon [51-53]. Cependant, ces agents anti-inflammatoires peuvent avoir des effets secondaires néfastes notamment au niveau cardiaque et gastro-intestinal. Par exemple, la diminution de l'apparition d'adénomes colorectaux sous l'effet du celecoxib est accompagnée d'effets secondaires cardiovasculaires graves [52].

b) Les CCR héréditaires

Il existe deux types de prédispositions héréditaires majeurs aux CCR : la Polypose Adénomateuse Familiale (FAP) et le Syndrôme de Lynch ou HNPCC (Hereditary non polyposis colon cancer). Il existe d'autres formes héréditaires mais le risque de développer un CCR est moins élevé.

La Polypose Adénomateuse Familiale (FAP)

La FAP représentent moins de 1% des CCR [54, 55]. C'est une maladie autosomale dominante liée à la délétion chromosomique en 5q21 du gène APC (Adenomatous Polyposis Coli) défini comme un gène suppresseur de tumeur. Il inhibe l'action transcriptionnelle de la β -caténine qui est un facteur de transcription impliqué dans l'expression de proto-oncogènes (c-myc, Cdk4 et cycline D1). La mutation du gène APC aboutit à la formation d'une protéine tronquée qui n'est plus capable d'inhiber l'activité de la β -caténine. Or, la β -caténine entraîne une dérégulation de la croissance des cellules épithéliales intestinales car elle active l'expression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire. Ceci conduit à la formation de nombreux adénomes dans le côlon qui pourra évoluer vers un adénocarcinome en absence de traitement [54, 55].

Des modèles murins ont été établis pour étudier ce cancer héréditaire. La premier modèle murin appelée « Min » porte une mutation constitutionnelle du gène APC obtenue par mutagenèse chimique non dirigée (N-ethyl-N-nitrosourea) avec des adénomes essentiellement localisés dans l'intestin grêle. Deux autres modèles ont été obtenus par

recombinaison génétique ciblée : le modèle « APC delta716 » (mutation sur le codon 716) qui développe également des adénomes essentiellement dans l'intestin grêle [56] et le modèle Cdx2-Apc qui développe des adénomes essentiellement au niveau du côlon [57]. Ces modèles permettent d'étudier l'effet de certains traitements anti-tumoraux. Ainsi, l'utilisation de la lignée Min a permis de démontrer qu'un traitement oral en sulindac (AINS) entraîne une régression des lésions intestinales et de la tumorigenèse chez la lignée Min [58].

Le Syndrome de Lynch ou HNPCC

Le syndrome de Lynch se caractérise par la mutation délétère de gènes MMR (Mis-Match Repair) codant des protéines impliquées dans la réparation des mésappariements de l'ADN : hMSH2, hMLH1, hMSH6, hPMS2. Les protéines hMSH2 et 6 reconnaissent les mésappariements de l'ADN et recrutent hMLH1 et hPMS2 effectuant la réparation (excision, synthèse, ligation). Une mutation qui inactive des gènes MMR entraîne une accumulation de mutations cellulaires et augmente la probabilité de cancer. Les sujets atteints de ce syndrome développent principalement des cancers colorectaux et de l'endomètre, avec un risque supérieur à 80% à l'âge de 70 ans. Ils sont diagnostiqués en moyenne à 44 ans et représentent 2 à 3% des CCR [59].

Une mutation dans MSH2 et MLH1 entraîne également le syndrome de Muir-Torre, qui est considéré comme une variante du HNPCC. Le syndrome de Muir-Torre représente moins de 1 % de tous les cas de cancers colorectaux héréditaires et possède les caractéristiques du syndrome HNPCC associées à des tumeurs des glandes sébacées [54].

Un nouveau modèle murin a été mis au point pour mimer le syndrome de Lynch. Ce sont des souris MSH2 Knockout (KO) conditionnelles car elles sont dépourvues de gène codant pour MSH2 spécifiquement dans l'intestin grêle et le côlon aboutissant à l'apparition d'adénomes et adénocarcinomes intestinaux [60].

Autres formes héréditaires de CCR :

Il existe d'autres formes héréditaires du CCR comme la MUTYH associated polyposis (MAP) qui est une maladie autosomale récessive se manifestant par une polypose cliniquement semblable à la FAP. MUTYH est une ADN glycosylase qui aide à la réparation des mésappariements de l'ADN. Ainsi, MUTYH protège des mutations des

gènes d'APC et KRAS ayant un rôle clé dans l'apparition de CCR. Pour les sujets atteints de MAP, le risque de développer un CCR est de 70% [61].

On peut également citer la polypose juvénile familiale (PJF), une maladie autosomale dominante due à des mutations des gènes suppresseurs de tumeur PTEN et SMAD4 avec un risque de développer un CCR de 40% [62].

2. Les instabilités génomiques :

Nous avons vu précédemment que les cancers colorectaux peuvent être classés en deux catégories : héréditaire et sporadique. Cependant, les CCR peuvent également être catégorisés en fonction de leur phénotype. En effet, des altérations moléculaires sont impliquées dans la cancérogenèse colorectale et se traduisent sur le plan du phénotype par l'existence d'une instabilité chromosomique (phénotype CIN) et génétique (phénotype MSI pour instabilité des microsatellites). Plus récemment, un troisième phénotype a été suggéré, il s'agit d'une hyperméthylation des îlots CpG des régions régulatrices des gènes (phénotype CIMP). Ce troisième phénotype n'est pas complètement indépendant des deux autres. En effet, l'hyperméthylation de certains gènes, comme le gène hMLH1, est fréquemment présente dans les tumeurs de phénotype MSI leur donnant un double phénotype.

a) Instabilité chromosomique (phénotype CIN)

L'instabilité chromosomique est le type d'instabilité génomique le plus fréquent parmi les CCR, en effet il est présent dans 80% des cancers sporadiques.

Elle se caractérise par des pertes alléliques concernant des régions entières ou ciblées de chromosomes [2]. L'instabilité chromosomique peut donc induire des pertes alléliques aboutissant à l'inactivation de gènes suppresseur de tumeur comme TP53, et SMAD2-4 [62] ou encore à la formation d'une protéine tronquée comme pour la protéine APC dans les cas de CCR [63]. Il s'agit respectivement d'une perte du bras long du chromosome 5, du bras long du chromosome 18 et du bras court du chromosome 17.

b) Instabilité des microsatellites (Phénotype MSI)

L'instabilité des microsatellites caractérise le syndrome HNPCC et représente 15% des cancers sporadiques.

Elle est liée à une réparation déficiente des mésappariements de l'ADN (DNA mismatch repair ou MMR). Ce défaut de réparation est dû à une mutation inactivatrice de gènes

codant pour des protéines impliquées dans la réparation des erreurs de réplication de l'ADN. Dans les cancers sporadiques, seul le gène MLH1 est inactivé. Pour le syndrome HNPCC, l'inactivation touche également d'autres gènes : MSH2, MSH6, PMS1 et PSM2 [2]. Ce défaut de système de réparation entraîne l'accumulation de mutations secondaires au niveau des séquences répétées de l'ADN (microsatellites) pouvant se situer dans des régions codantes et ainsi activer ou inactiver certains gènes. On retrouve ce genre de mutations notamment au niveau des gènes codant pour le récepteur au TGF- β impliqué dans la régulation de la croissance cellulaire, ou codant pour l'E2F4 qui est une protéine impliquée dans la régulation du cycle cellulaire et enfin des gènes codant pour des protéines pro-apoptotiques comme Bax [45, 64].

Boland *et al.* proposent de classer les CCR en trois sous-type : MSI-H (MSI-High, avec au moins 2 microsatellites instables), MSI-L (MSI-Low, avec 1 microsatellite instable) et MSS (aucun microsatellite instable). L'analyse de l'instabilité est basée sur l'amplification par PCR de 5 marqueurs de microsatellites dont le nombre de répétition est très homogène entre les individus. Les profils d'amplification sont comparés entre l'ADN du tissu sain et tumoral [65].

c) Hyperméthylation (Phénotype CIMP, CpG Island methylation phenotype)

Dans certaines régions du promoteur d'un gène, les îlots CpG sont maintenus non méthylés favorisant la transcription de ce gène. Au contraire, la méthylation des îlots CpG, par l'ADN méthyltransférase (DNMT), conduit à une inactivation transcriptionnelle due à un changement de conformation de l'ADN et donc une diminution de son accessibilité [2].

Dans le cancer colorectal, des taux élevés d'activité DNMT ont été mis en évidence [66] aboutissant à l'hyperméthylation et donc l'inactivation de la transcription de gènes suppresseurs de tumeurs comme p16^{INK4A} impliqué dans le cycle cellulaire (26% des cas) [67] ou encore de gènes de réparation de l'ADN comme MLH1 (12% des cas) [68]

3. Les voies de signalisations altérées :

Le cancer se développe suite à l'accumulation de plusieurs altérations de l'ADN qui provoquent l'apparition et la progression de la tumeur. Ces altérations génétiques modifient l'expression de certains gènes impliqués dans des voies de signalisation qui, quand elles sont dérégulées, permettent à la cellule d'acquérir des propriétés oncogéniques. La carcinogenèse colique est un processus multi-étapes caractérisé par des altérations

génétiqes touchant principalement les voies : WNT (Wingless Int), RAS MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase), PI3K (PhosphoInositide 3 kinase), TGF- β (Transforming Growth Factor β) et P53.

a) Voie Wnt/APC/ β -caténine

En absence de fixation du ligand Wnt sur son récepteur, il y a formation d'un complexe protéique constitué de la protéine APC, l'axine/conductine, la Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3) et la Caséine Kinase I (CKI). Ces deux dernières kinases, en phosphorylant certains résidus sérine (Ser 33 et 37) et thréonine (Thr 41) de la β -caténine, entraînent sa dégradation par le protéasome prévenant la prolifération des cellules (figure 2) [69].

La fixation du proto-oncogène Wnt sur son récepteur entraîne l'inhibition de la formation du complexe axine-APC-GSK3-CKI par Dishevelled (Dsh). La β -caténine ainsi stabilisée est transloquée dans le noyau et se fixe à des facteurs de transcription pour activer l'expression de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire tels que c-myc et cycline D1 [70] (figure 2). Par exemple, l'inhibition d'APC chez des cellules cancéreuses coliques SW480 conduit à l'inhibition de la transition G1-S du cycle cellulaire [70]. De plus, l'extinction de la β caténine dans les cellules cancéreuses du côlon HCT116 et SW480, par l'utilisation d'ARN interférents ciblant la β -caténine, réduit la formation de clones cellulaires en milieu semi-solide et la croissance tumorale dans des souris immunodéficientes [71].

La β -caténine se lie également avec les E-cadhérines qui sont des glycoprotéines transmembranaires permettant l'adhésion entre les cellules. Ainsi APC, en induisant la dégradation de la β -caténine par le protéasome, empêche celle-ci de jouer son rôle d'adhésion et favorise la migration des cellules vers le sommet des villosités et leur desquamation dans la lumière intestinale [72].

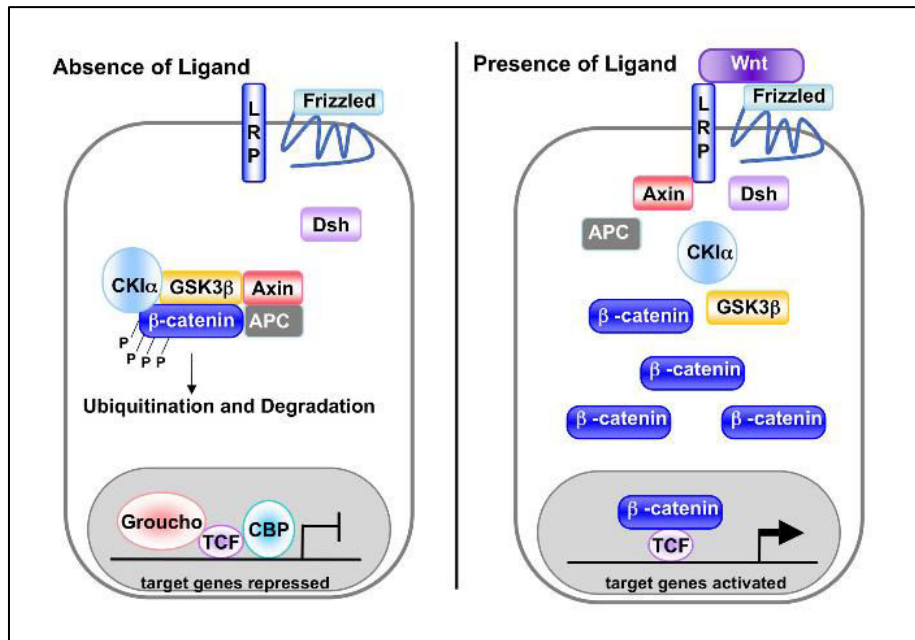


Figure 2: La voie de signalisation Wnt/APC/ β -caténine [73]

Le gène suppresseur de tumeur APC, situé dans la région chromosomique 5q21-q22, est responsable de la Polypose Adénomateuse Familiale (FAP) et est muté dans 60 à 80% des CCR de phénotype CIN. Les altérations du gène APC peuvent être dues à la perte du bras long du chromosome 5, des délétions ou des insertions de bases entraînant la synthèse d'une protéine tronquée [63]. On trouve également des mutations de la β -caténine augmentant sa stabilité : ce phénomène est observé dans 50% des cancers du côlon ne présentant pas de mutation du gène APC [74] et principalement dans les CCR de phénotype MSI [2].

b) Voie EGF

Le récepteur à l'EGF est surexprimé dans 30 à 85% des CCR et la cascade de signalisation induite par ce récepteur est activée dans 70% des CCR [2].

La fixation de EGF à son récepteur (EGFR) déclenche la phosphorylation de son domaine effecteur tyrosine-kinase intracellulaire. Ces résidus tyrosines phosphorylés sont reconnus par des protéines intracellulaires possédant un domaine SH2 (Src homology-2) permettant la transmission des signaux intracellulaires associés. Parmi les protéines à domaine SH2 on trouve :

- le complexe Grb2/Shc qui active la protéine RAS dans la voie RAS/RAF/MAPK (mitogen activated protein kinase) [75]
- la protéine PI3K (phosphatidyl inositol 3-kinase) qui recrute la protéine AKT dans la voie PI3K/AKT [76]

Donc l'activation du récepteur à EGF entraîne l'activation de deux voies de signalisation intracellulaires : RAS/RAF/MAPK et PI3K/AKT, impliquées dans la prolifération, la migration, l'adhésion, la résistance à l'apoptose et l'angiogenèse.

c) Voie RAS/RAF/MAPK

Lors de la fixation du ligand EGF à son récepteur EGFR, il y a recrutement du complexe Grb2/hSos (via son domaine SH2) qui active la protéine RAS. La protéine RAS, qui est ancrée dans la couche phospholipidique membranaire, est activée par remplacement de son GDP en GTP grâce à la protéine GAP (GTPase activated proteins) induisant son interaction avec d'autres molécules effectrices. La protéine RAS activée recrute la protéine kinase RAF qui entraîne l'activation par phosphorylation de MAPK-Kinase ou MEK (MAPK-ERK-kinase) qui à son tour active par double phosphorylation MAPK ou ERK. ERK est alors transloquée dans le noyau pour réguler l'expression de facteurs de transcription (c-fos, c-myc, c-jun) impliqués dans la régulation de l'expression de gènes codant pour la cycline D1 et CDK6 indispensables à l'initiation du cycle cellulaire (figure 3) [75].

La voie de signalisation RAS/RAF/MAPK est activée dans 50% des CCR dues à des mutations activatrices de RAS. Ces mutations conduisent une accumulation de la forme active liée au GTP, et de RAF, responsable d'une augmentation de son activité kinase [2].

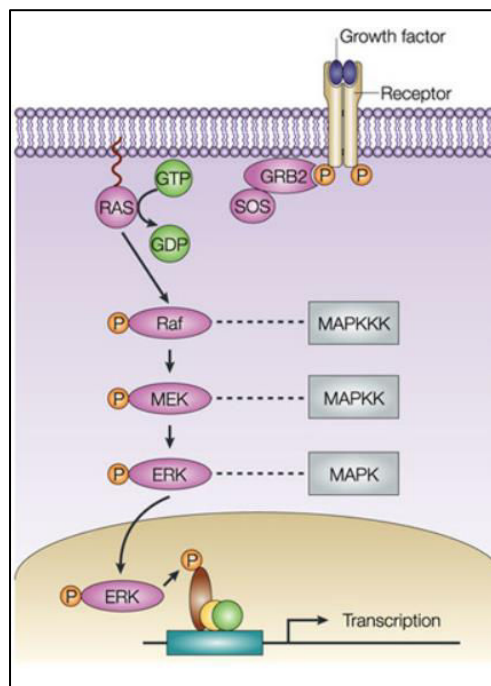


Figure 3: La voie de signalisation RAS/MAPK [77]

d) Voie PI3K/Akt

La fixation de EGF à son récepteur EGFR provoque le recrutement de PI3K (via son domaine SH2) au niveau membranaire. PI3K est une enzyme entraînant la phosphorylation de lipides membranaires, les phosphoinositides (PI) permettant la génération de phosphatidylinositol 3, 4, 5-triphosphate (PIP₃) à partir du phosphatidylinositol diphosphate (PIP₂). La protéine PI3K peut également être activée par RAS. Deux protéines kinases sont ensuite associées à PIP₃ : PDK1 et 2 (3-phosphoinositol dependent kinase). Ces deux protéines assurent une double phosphorylation sur AKT déclenchant son détachement de la membrane d'une part et son activation d'autre part (figure 4) [76].

AKT régule la synthèse de protéines en activant la kinase mTOR (mammalian target of rapamycin). En effet, mTOR phosphoryle 4E-BP1 (eIF4E binding protein-1) provoquant sa dissociation du facteur de traduction eIF-4E permettant le recrutement de la petite sous-unité du ribosome sur l'ARNm et donc augmente la synthèse de protéine [78].

AKT régule le cycle cellulaire par inactivation de GSK3 β . Par exemple, GSK3 β phosphoryle la cycline D1 à l'origine de son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome. Ainsi AKT, en phosphorylant GSK3 β , induit son inactivation et empêche la destruction de la cycline D1 impliquée dans la progression en phase G1 du cycle cellulaire [79].

AKT régule la survie cellulaire par phosphorylation activatrice de MDM2, localisé dans le noyau pour inhiber p53, et des phosphorylations inactivatrices de protéines pro-apoptotiques comme BAD, caspase-9 ou le facteur de transcription Foxo3a [80].

Il existe un régulateur négatif de cette voie de signalisation PI3K/AKT : la phosphatase PTEN (phosphatase with tensin homology). En effet, PTEN entraîne le passage de la forme PIP₃ à PIP₂ s'opposant ainsi à l'activation de la PI3K. La translocation du facteur de transcription Foxo3a est inhibée suite à sa phosphorylation par Akt. Donc PTEN, en inhibant la voie PI3K/Akt, pourrait également augmenter la translocation de Foxo3a dans le noyau. Or, Foxo3a est impliqué dans l'activation de l'expression d'inhibiteur du cycle cellulaire (p21), de protéines pro-apoptotiques (BIM, FasL, p21) et augmenterait la production de ROS [81-83].

Des mutations activatrices du gène de PI3K aboutissant à une augmentation de son activité sont observées dans 12 à 15% des CCR. De plus, des mutations inactivatrices du gène PTEN aboutissant à une perte de son expression sont observées dans 15 à 30% des CCR [2].

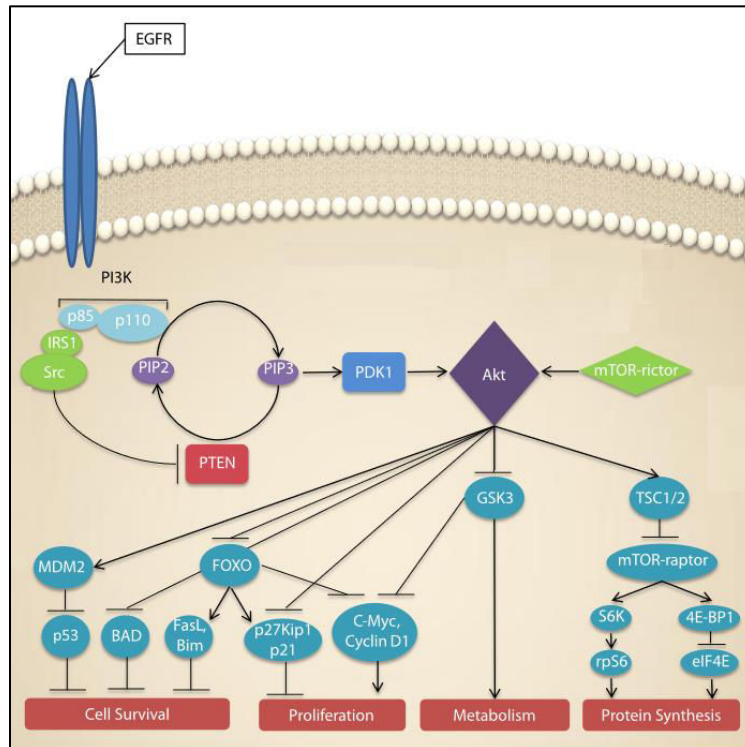


Figure 4: La voie de signalisation PI3K/Akt [84]

e) Voie p53

Dans les conditions physiologiques, p53 est finement régulé par une boucle d'autorégulation inhibitrice impliquant MDM2 : une ligase de la famille des E3 ubiquitine. MDM2 est l'une des cibles transcriptionnelles de p53 qui va induire sa dégradation par le protéasome en conjuguant des résidus ubiquitine sur le domaine C-terminal de p53.

Lors d'un stress cellulaire qui provoque des dommages à l'ADN, p53 va subir des modifications post-traductionnelles différentes selon la nature du stress, aboutissant à la dissociation du complexe Mdm2/p53 et donc à la stabilisation de p53 qui va pouvoir jouer son rôle de facteur de transcription (figure 5). Lors de dommages à l'ADN, il régule l'expression de gènes conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire de manière réversible afin de permettre la réparation de l'ADN. Si les dommages sont irréparables, p53 peut induire, de façon irréversible, les voies conduisant à la mort cellulaire par apoptose. C'est pourquoi p53 est décrit comme un gardien du génome [85].

P53 et cycle cellulaire

Lorsqu'il y a des dommages à l'ADN, p53 régule l'expression de p21^{WAF1}, 14-3-3 σ et GADD45. p21 inhibe la cyclineA-cdk2 et cyclineE-cdk2 permettant un arrêt du cycle cellulaire en phase G1/S pour réparer les dommages à l'ADN avant la réplication tandis que 14-3-3 σ et GADD45 entraîne un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M pour des réparations avant la division cellulaire (figure 5) [86]

P53 et apoptose

Si les lésions de l'ADN sont trop importantes pour être réparées, p53 induit l'apoptose par stimulation de l'expression de gènes impliqués dans la voie intrinsèque mitochondriale (Bax, Bid, AFAP-1), par activation de récepteurs membranaires de mort (CD95/Fas, DR4, DR5) (figure 5) ou encore par activation du gène suppresseur de tumeur PTEN. P53 induit également la répression de facteurs anti-apoptotiques tels que Bcl-2 ou IAP [86].

La protéine p53 protège ainsi l'organisme contre la prolifération de cellules potentiellement tumorales. Cependant, le gène suppresseur de tumeur p53, localisé sur le bras court du chromosome 17, est inactivé par des pertes alléliques et des mutations ponctuelles dans 60 à 80% des CCR de phénotype CIN. Pour les CCR de phénotype MSI, 30 à 50% ont des mutations sur une séquence répétée microsatellite situées dans la séquence codante du gène BAX [2, 87].

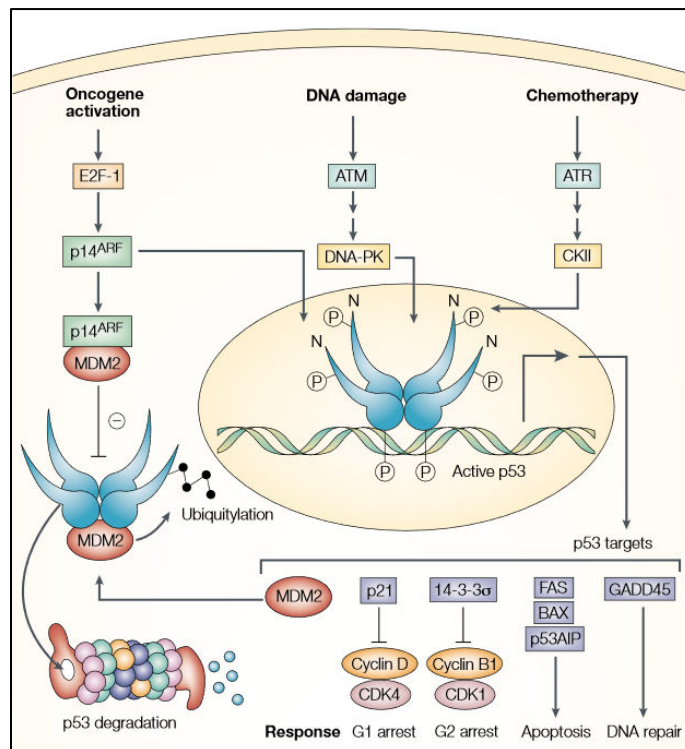


Figure 5: La voie de signalisation p53 [88]

f) Voie TGF- β /Smad

Les membres de la famille du TGF- β sont des facteurs de croissance et de différenciation cellulaire. Le TGF- β 1 est un inhibiteur de prolifération cellulaire épithéliale. Lorsque le TGF- β se fixe sur son récepteur TGF- β RII, celui-ci forme un hétérotétramère avec TGF- β RI entraînant sa phosphorylation au niveau de son domaine GS (riche en résidus glycine et sérine). Cet hétérotétramère phosphoryle les protéines intracellulaires smad2 et smad3 qui vont former un hétérodimère avec smad4. Ce complexe rejoint ensuite le noyau pour réguler l'expression de gènes (figure 6) [89]. TGF- β inhibe le cycle cellulaire en activant l'expression d'inhibiteurs de cyclines comme p21 et induit la mort par apoptose en augmentant l'expression de gènes pro-apoptotiques comme Bim et capsase-9 [89, 90] ou encore en inhibant l'expression de gènes anti-apoptotiques Bcl-x et Bcl-2 [91]. TGF- β prévient également l'immortalisation cellulaire en inhibant l'expression de la télomérase : une enzyme qui catalyse l'addition d'une séquence répétée spécifique à l'extrémité des chromosomes (les télomères) ce qui empêche leur raccourcissement et évite l'entrée des cellules en sénescence [92].

Des mutations inactivatrices des gènes smad2 et 4 sont trouvées dans 20 à 30% des CCR de phénotype CIN [93]. La synthèse du récepteur TGF- β RII tronqué non fonctionnel, due à des mutations inactivatrices de son gène, sont retrouvées dans 60 à 80% des CCR de phénotype MSI. En effet, ce gène possède dans sa séquence codante une séquence répétée microsatellite, qui est donc sujette à des erreurs de réplication non réparées par le système MMR [2].

La voie de signalisation TGF- β exerce un effet suppresseur de tumeur chez les cellules saines et au stade précoce des carcinomes. Cependant, l'effet anti-tumoral de la voie de signalisation TGF- β est perdu au cours de la progression tumorale et switch pour promouvoir le processus métastatique. En effet, le TGF- β peut activer la transition EMT (transition épithélio-mésenchymateuse) qui consiste au passage des cellules de la forme épithéliale à la forme mésenchymateuse caractérisée par la perte de capacité d'adhésion. Le TGF- β favorise cette transition en inhibant l'expression de protéines d'adhésion comme E-cadhérine ou ZO-1 [94].

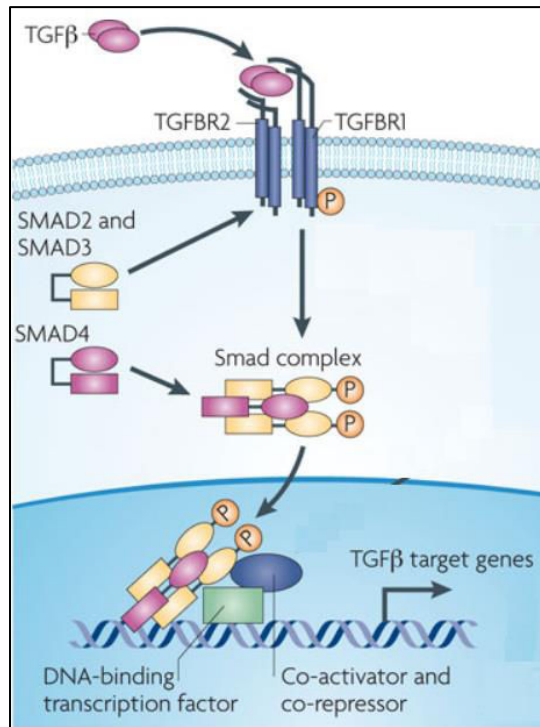


Figure 6: Le voie de signalisation du TGF-b [89]

g) Voie AMPK/Foxo3a

L'AMPK est une sérine/thréonine kinase existant sous la forme d'un complexe hétérotrimérique composé d'une sous-unité catalytique (α) et de deux sous-unités régulatrices (β et γ), chacune représentée par différentes isoformes (α_1 , α_2 , β_1 , β_2 , γ_1 , γ_2 et γ_3) codées par des gènes distincts. La régulation de l'activité AMPK se fait de deux manières : par liaison d'AMP sur les sous-unités régulatrices (β et γ) et par phosphorylation de la Thréonine 172 sur sa sous-unité catalytique (α). La phosphorylation de sa sous-unité catalytique peut-être assurée par trois kinases : le suppresseur de tumeur LKB1 responsable de la phosphorylation de l'AMPK dans la majorité des cellules de mammifères [95], la CaMKK β (Ca²⁺/Calmodulin-dependant protein kinase kinase) active l'AMPK en réponse à des concentrations intracellulaires élevée de Ca²⁺, et enfin la TAK1 (Transforming growth factor- β -Activated Kinase 1). Des phosphatases sont également capables d'inactiver l'AMPK en déphosphorylant la Thréonine 172 comme les phosphatases 2A et 2C dont l'activité est inhibée par l'AMP et activée par les acides gras libres [96].

L'AMPK est donc activée par une augmentation du ratio AMP/ATP, lors d'une pénurie en nutriments par exemple, se traduisant par un stress métabolique. L'AMPK a pour rôle de rétablir l'équilibre énergétique de la cellule en reprogrammant son métabolisme afin de maintenir une concentration constante en ATP. Pour cela, l'AMPK va réguler l'expression

et l'activité d'enzymes du métabolisme glucidique et lipidique afin de stimuler les voies cataboliques générant de l'ATP (oxydation des acides gras et glycolyse aérobie suivie de la respiration mitochondriale) et d'inhiber les voies anaboliques consommant de l'ATP (synthèse de protéique, d'acide gras et de cholestérol). L'AMPK peut également induire le processus d'autophagie en inhibant la signalisation mTOR. L'autophagie consiste à la dégradation d'une partie du contenu cytoplasmique en vue d'un recyclage des acides aminés, des bases nucléiques et des acides gras [97].

Si le stress persiste, la mort cellulaire est déclenchée. Pour cela, l'AMPK active le suppresseur de tumeur p53, par phosphorylation sur la Serine 15, qui est impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire et la mort cellulaire par apoptose [98]. L'AMPK régule également l'activité d'un facteur de transcription Foxo3a (ou FKHRL1 pour Forkhead Drosophila homolog 1 rhabdomyosarcoma Like 1), impliqué dans la régulation de gènes anti-prolifératifs et pro-apoptotiques, en compétition avec une autre protéine kinase Akt.

Lorsque la protéine Akt est activée, elle phosphoryle directement Foxo3a sur trois sites régulateurs (Thr32, Ser253 et Ser315), entraînant sa séquestration dans le cytoplasme [99]. En pénurie de nutriments, AMPK entraîne la translocation nucléaire de Foxo3a en inhibant les phosphorylations activatrices d'Akt [100]. De plus, l'AMPK augmente l'activité transcriptionnelle de Foxo3a par phosphorylation sur plusieurs résidus (Thr179, Ser399, Ser413, Ser555, Ser588 et Ser626) situés dans son domaine d'activité transcriptionnelle [101]. Foxo3a se fixe à ces éléments de réponses FHRE au niveau des promoteurs de ces gènes cibles. Ainsi, Foxo3a inhibe la prolifération en activant l'expression de p21, un inhibiteur du cycle cellulaire [83], et en inhibant l'expression des cyclines D qui sont des activateurs du cycle cellulaire [102]. Foxo3a peut également induire la mort cellulaire en activant l'expression de protéines pro-apoptotiques appartenant à la famille Bcl-2 tels que BIM [81], PUMA [103] ou encore NOXA [104]. Parmi les gènes cibles de Foxo3a, on trouve également les gènes des ligands des récepteurs de mort: FasL et TRAIL [82, 105], mais également PTEN qui inhibe la voie PI3K/Akt formant une boucle de rétrocontrôle négatif [83].

Une diminution de l'expression et de la phosphorylation de l'AMPK est observée dans les cellules cancéreuses où la voie PI3K/Akt est activée et où PTEN et LKB1 est inactivé [106]. De plus, des travaux montrent une localisation principalement cytoplasmique de Foxo3a dans des cellules cancéreuses de biopsies de cancer du sein et ceci est associée à un

pronostic défavorable [107]. Par conséquent, la voie AMPK-Foxo3a est une voie de signalisation anti-tumorale pouvant être une cible intéressante pour le traitement du cancer [108].

Des activateurs et des inhibiteurs pharmacologiques de l'AMPK sont utilisés afin d'identifier l'implication de l'AMPK dans le cancer et les cibles en aval. Par exemple, la metformine, un activateur d'AMPK utilisé pour le traitement des diabètes de type 2, réduit le risque de cancers chez ces patients et plus particulièrement des cancers du pancréas, du côlon et du foie [109]. Le 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside (AICAR) est une molécule rapidement phosphorylée en analogue de l'AMP, le ZMP. L'accumulation de ZMP aboutit à l'activation de l'AMPK en mimant les effets de l'AMP. Le compound C quant à lui est un inhibiteur de l'AMPK, réversible et compétitif de l'ATP. C'est ainsi qu'une étude a montré que l'activation d'AMPK par AICAR augmente la sensibilité de cellules cancéreuses coliques (HCT-116) à l'effet cytotoxique de TRAIL et TNF α , en augmentant l'activité du suppresseur de tumeur p53 [110].

L'apoptose de cellules cancéreuses coliques (HCT-116, SW480) induite par un traitement en selenium passe par l'inhibition de la voie PI3K/Akt permettant la translocation nucléaire de Foxo3a [81]. Une autre étude montre que l'expression de FasL est induite *in vitro* lors d'une surexpression de Foxo3 muté (non phosphorylable par Akt) et associée à une augmentation de l'apoptose [82]. La surexpression et l'accumulation nucléaire de Foxo3a inhibent la prolifération cellulaire *in vitro* et la croissance tumorale *in vivo* de cellules cancéreuses mammaires [107, 111]. L'activation de Foxo3a par un traitement salinomycine lève la résistance de cellules cancéreuses hépatiques à la doxorubicine *in vitro* et *in vivo*. Ce phénomène est dû à une inhibition de la voie Wnt/ β -caténine et plus particulièrement de la formation du complexe β -caténine/TCF réprimant ainsi l'expression de leur gènes cibles notamment impliqués dans la transition EMT à l'origine de la résistance des cellules cancéreuses hépatiques à la doxorubicine [112].

Cependant, on observe une interdépendance et une compétition entre les différentes voies de signalisation cellulaire. L'utilisation d'inhibiteur d'Akt (AKT inhibitor API-2) entraîne une augmentation de la translocation nucléaire de Foxo3a pour inhiber la prolifération de cellules cancéreuses prostatiques, pancréatiques, mammaires, ovariennes et de mélanomes [113]. Cependant, l'utilisation d'inhibiteurs d'Akt chez des cellules cancéreuses coliques *in vitro* et chez des xénogreffes *in vivo* ayant une forte expression de β -caténine augmente la

résistance à l'apoptose et la formation de métastases. Tandis que le co-traitement avec des inhibiteurs de la voie Wnt (XAV-939) lève la résistance aux inhibiteurs d'Akt. Ainsi, la colocalisation nucléaire de la β -caténine et de Foxo3a est un facteur de mauvais pronostic concernant la réponse au traitement avec des inhibiteurs d'Akt chez des patients atteints d'un CCR [114, 115]. La colocalisation de Foxo3a et β -caténine aboutit à l'expression de gènes oncogéniques comme Sprouty2, un régulateur intracellulaire des récepteurs à tyrosine kinase. Son expression est activée par la voie Wnt/ β -caténine qui est anormalement activée dans 90% des carcinomes du côlon. Une étude a montré que l'induction de l'expression de Sprouty2 par la β -caténine se fait en coopération avec Foxo3a. En effet, l'expression de la protéine Sprouty2 est corrélée à une colocalisation de Foxo3a et β -caténine dans le noyau de carcinomes coliques et le taux de protéine sprouty2 est corrélée à une diminution de la survie des patients atteints de CCR [116].

D. Oncogenèse : Rôle de TNF α

Le cancer colorectal comme les autres cancers se développe suite à l'instabilité du génome qui provoque l'apparition et la progression de la tumeur maligne. Au fur et à mesure de l'accumulation des mutations génomiques, l'expression de certains gènes s'en trouve modifiée et les cellules cancéreuses acquièrent de nouvelles fonctions conduisant à leur transformation [117]. Weinberg et Hanahan ont ainsi définis 10 grandes caractéristiques des cellules cancéreuses et de leur environnement (figure 7).

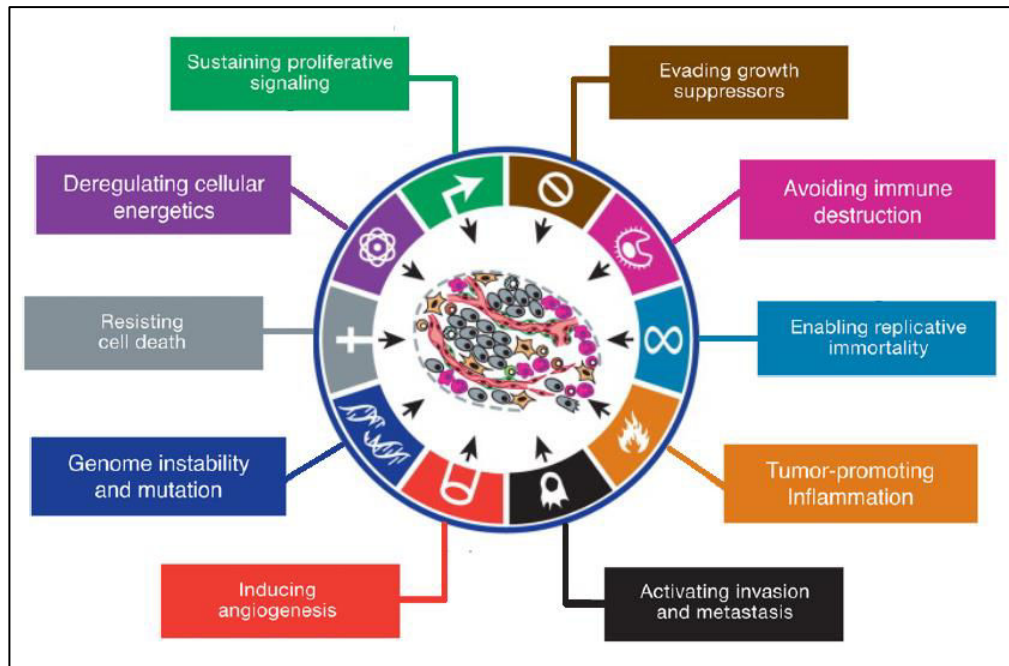


Figure 7: Les 10 caractéristiques des cellules cancéreuses [117]

L'une des caractéristiques des cellules cancéreuses est leur autosuffisance en facteur de croissance. En effet, les cellules tumorales deviennent indépendantes des signaux provenant du microenvironnement car elles génèrent leurs propres facteurs de croissance. L'insensibilité des cellules cancéreuses aux signaux inhibiteurs de la prolifération comme $TGF\beta$, et leur potentiel répliatif illimité sont deux autres caractéristiques complémentaires renforçant leurs capacités à proliférer de manière anarchique. En effet, les cellules cancéreuses expriment de façon dérégulée la télomérase, une enzyme qui protège les extrémités des chromosomes (les télomères) évitant l'entrée des cellules en sénescence. De plus, l'excès de prolifération n'est pas rééquilibré par une augmentation de la mort cellulaire à laquelle les cellules cancéreuses sont devenues résistantes. Le métabolisme des cellules cancéreuses est également modifié afin de s'adapter à leur prolifération exacerbée et au faible taux d'oxygène [117].

Les cellules qui composent le microenvironnement de la tumeur contribuent à la modification des caractéristiques phénotypiques des cellules cancéreuses pour favoriser leur survie et la croissance tumorale. En effet, toutes ces caractéristiques acquises par les cellules cancéreuses entraînent rapidement une augmentation de la masse tumorale nécessitant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (angiogénèse), qui implique le recrutement de cellules endothéliales par la tumeur, pour l'apport d'oxygène et de nutriments. L'angiogénèse va faciliter la migration des cellules cancéreuses qui vont alors

pouvoir envahir d'autres organes pour former une tumeur secondaire (métastase). De plus, les cellules cancéreuses échappent au système immunitaire anti-tumoral et favorise un état inflammatoire en faveur de la progression tumorale, l'invasion, l'instabilité génomique et l'immunosuppression.

Le TNF α est une cytokine jouant un rôle important dans la régulation de la progression tumorale. En effet, il est impliqué dans différents processus dont l'inflammation, la prolifération, la mort cellulaire et l'angiogenèse. Le TNF α est synthétisée à partir d'une pro-forme membranaire (26 kDa) puis clivé par une métallo-protéase TACE (TNF-converting enzyme) en TNF α soluble (17 kDa). Ces deux formes sont capables d'activer les récepteurs au TNF α mais avec des affinités différentes. Il existe deux types de récepteur au TNF α : le récepteur de type 1 (TNF-R1) et le récepteur de type 2 (TNF-R2). Le TNF-R1 est principalement activé par la forme soluble tandis que le TNF-R2 est activé par sa forme membranaire à travers un contact cellule-cellule. TNF-R1 est exprimé par toutes les cellules tandis que TNF-R2 est exprimé uniquement par les cellules immunitaires. La différence majeure entre ces 2 récepteurs est l'absence de Death Domain (DD) au niveau du TNF-R2. L'activation de TNF-R1 est impliquée à la fois dans la régulation de médiateurs inflammatoires et la mort cellulaire tandis que TNF-R2 est uniquement impliqué dans la régulation de médiateurs inflammatoires (figure 8) [118]. Le devenir des cellules cancéreuses sous l'action du TNF α est contrôlé par la formation de différents complexes, au niveau des récepteurs au TNF α , dépendant du contexte et du type cellulaire. Trois différents complexes (I, IIa et IIb) peuvent être formés suite à la fixation de TNF α sur son récepteur et chaque complexe va conduire à une signalisation différente [119]. Le complexe I est impliqué dans la régulation de médiateurs pro-inflammatoires et la survie tandis que les complexes IIa et IIb sont impliqués dans la mort cellulaire par apoptose et par nécroptose respectivement. Le but de ce chapitre est de décrire l'impact de TNF α sur la progression tumorale à travers son rôle dans l'inflammation, la mort cellulaire et l'angiogenèse.

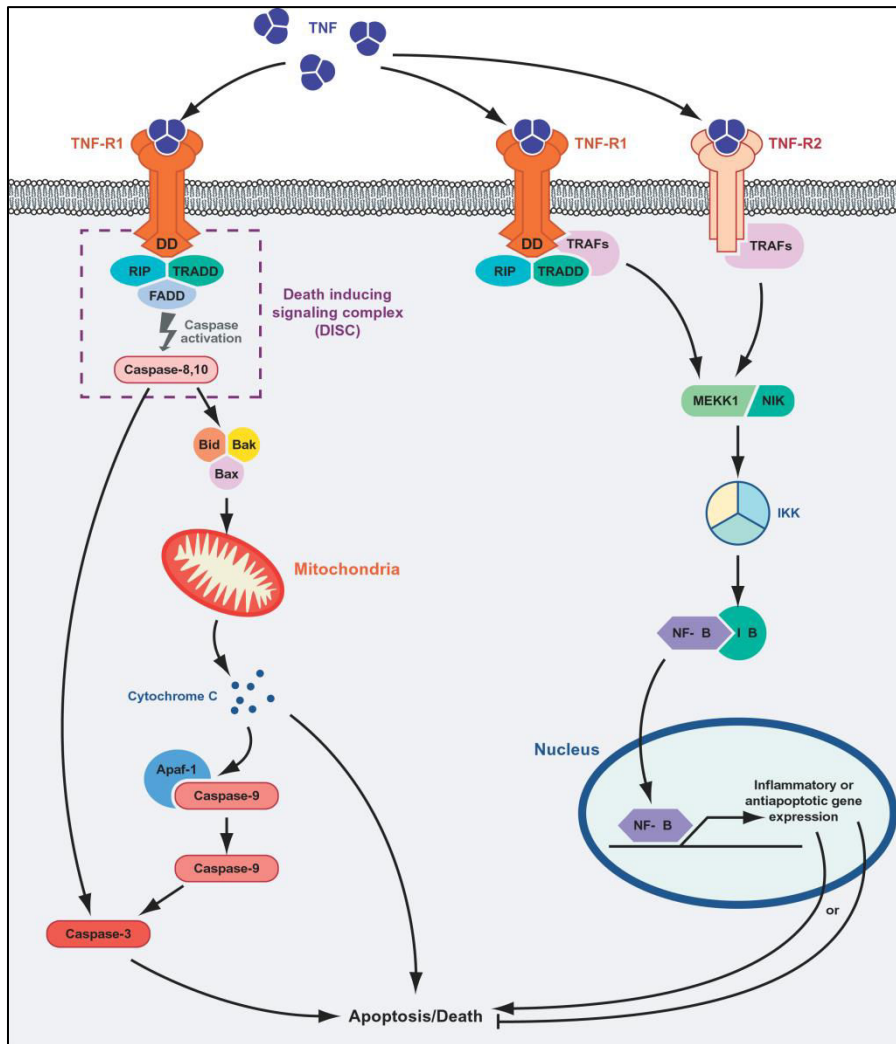


Figure 8: Voie de signalisation du TNF α [120]

1. Inflammation:

Le TNF α joue un rôle important dans le processus inflammatoire. Or, l'inflammation intestinale chronique fait partie des facteurs de risque de CCR et la tumeur favorise l'apparition d'un état inflammatoire.

Le TNF α est une cytokine principalement produite par des cellules immunitaires: les macrophages, les cellules dendritiques, les neutrophiles et les cellules NK (natural killer) mais également par les cellules stromales comme les cellules endothéliales et les fibroblastes. Les cellules tumorales sont également capables de produire des cytokines dont le TNF α pour instaurer un état inflammatoire favorable à la progression tumorale [121]. Ainsi, le TNF α produit par les différentes cellules du microenvironnement tumoral peut induire l'apparition et la croissance tumorale par différents mécanismes :

- Lors d'une exposition prolongée au TNF α , notamment dans le cas d'une inflammation intestinale chronique, on observe une forte production de dérivés radicalaires (ROS, NO) qui va favoriser l'apparition de lésions oxydatives de l'ADN des cellules intestinales pouvant conduire à une transformation néoplasique [122].
- Le TNF α joue ensuite un rôle dans la différenciation des lymphocytes dont les lymphocytes Th17 [123] qui se révèle être des promoteurs de la progression du cancer colorectal par leur production d'IL-17 [124].
- Afin de permettre le recrutement des cellules immunitaires au site de l'inflammation, le TNF α augmente la perméabilité vasculaire, l'expression de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales (sélectines, ICAM, VCAM) et de métalloprotéinases matricielles (MMP) ce qui facilite la diapédèse des cellules immunitaires et leur migration dans les tissus [125]. De plus, le TNF α augmente l'expression d'IL-8 impliqué dans la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) caractérisée par la perte d'adhésion cellulaire. Dans un contexte tumoral, ces effets du TNF α favorisent le caractère invasif des cellules cancéreuses et dans le cas du cancer colorectal la formation de métastases hépatiques [126].
- Une fois la réponse immunitaire maîtrisée, le TNF α participe à la réparation tissulaire en favorisant l'angiogenèse par l'activation de l'expression du facteur angiogénique (VEGF). Dans un contexte tumoral, l'effet pro-angiogénique de TNF α va augmenter la progression tumorale [127].

Les effets de TNF α observés lors d'une réaction inflammatoire passe par l'activation de différentes voies de signalisation cellulaire dont les voies NF- κ B et MAPKinases par l'action des récepteurs TNF-R1 et TNF-R2, ces voies de signalisation sont impliquées dans la progression tumorale. En effet, outre l'induction de la transcription de cytokines pro-inflammatoires permettant une amplification de la réponse inflammatoire, ces voies de signalisation déclenchent l'expression de protéines favorisant la survie cellulaire.

- La voie NF- κ B est activée suite à la fixation de TNF α sur ses récepteurs TNF-R1 et R2 aboutissant à la formation du complexe I composé des protéines TRADD (TNF Receptor Associated Death Domain), TRAF2 et la kinase RIP1 (Receptor-Interacting serine/threonine-Protein 1). La protéine TRADD recrute la protéine TRAF2 qui à son tour va recruter les protéines cIAP-1 et 2 (Inhibitor of Apoptosis) : des ubiquitines ligases qui vont être impliquées dans l'ubiquitination de RIP1 [128]. RIP1 ubiquitinylé

recrute et active NIK (NF- κ B Inducing Kinase) qui à son tour active par phosphorylation le complexe IKK (IkB Kinase) constitué de 2 sous-unités catalytiques à activité kinase IKK α et IKK β et d'une sous-unité régulatrice IKK γ ou autrement appelé NEMO (NF- κ B Essential Modulator). Le complexe IKK phosphoryle et ubiquitine IkB entraînant sa dégradation par le protéasome. La protéine IkB séquestre le facteur de transcription NF- κ B et sa dégradation permet la translocation de NF- κ B dans le noyau. NF- κ B va alors réguler l'expression de gènes pro-inflammatoires (IL-6, IL-8, IL-1 β , COX-2), anti-apoptotiques (c-FLIP, IAPs, Bad, Bax) ou encore pro-angiogénique (VEGF) [129]. Une activation constitutive de NF- κ B est détectée dans de nombreuses tumeurs humaines [130] dont les tumeurs coliques [131]. Chez la souris, l'inhibition de NF- κ B diminue l'incidence des cancers dans des modèles inflammatoires du cancer du foie et du colon, ce qui prouve le rôle majeur de NF- κ B dans l'induction des cancers liés à l'inflammation [132, 133].

- La voie MAPKinases est également activée suite à la fixation de TNF α sur ces récepteurs (R1 et R2) mais cette fois-ci elle implique le recrutement des protéines TRAF 2 et 6 qui vont permettre l'activation en cascade de MEK puis de JNK (pour TRAF2) et p38 (pour TRAF6). JNK et p38 activent ensuite des facteurs de transcription tels que AP-1 et NF- κ B qui vont permettre l'expression de protéines de l'inflammation (IL-6, COX-2), de l'apoptose, de la prolifération (cycline D1, EGFR) ou encore de la motilité cellulaire [134, 135].

Le TNF α est donc indispensable au déroulement de la réaction inflammatoire permettant la défense de l'organisme et la réparation des tissus suite à une agression (infectieuse ou physique). Cependant, le TNF α induit également un signal de survie et de prolifération. Donc une présence prolongée de TNF α lors d'une inflammation chronique devient délétère pour l'organisme et favorise l'initiation et la progression tumorale. En effet, lorsqu'on induit un cancer associé à une colite chez la souris par l'injection d'un agent carcinogène (l'azoxyméthane AOM), et l'ajout d'un agent pro-inflammatoire dans l'eau de boisson (le dextran sodium sulfate DSS), on observe que le développement tumoral est associé à une augmentation du taux de TNF α et du nombre de leucocytes (macrophages et neutrophiles) exprimant le récepteur au TNF α (TNF-R) dans la muqueuse du côlon. De plus, lorsqu'on induit une colite chez des souris où l'activité de TNF α est bloquée, par l'utilisation de souris TNF-R -/- ou par l'utilisation d'un récepteur soluble (etanercept), les dommages à la muqueuse colique sont moindres avec une réduction du nombre de leucocytes infiltrant les

tumeurs accompagnée d'une diminution du taux de cytokines pro-inflammatoires et une inhibition de la prolifération tumorale [136]. En plus des leucocytes, des cellules cancéreuses coliques sont également capables de produire du TNF α soutenant leur propre prolifération par action autocrine et favorisant l'angiogenèse par induction paracrine de la production de VEGF par les macrophages [38]. Ainsi, la neutralisation de TNF α avec soit l'administration de son récepteur soluble (etanercept) soit un anticorps bloquant TNF α (infliximab) réduit la formation de tumeur dans les modèles de CCR associés aux colites [136, 137].

2. Mort cellulaire:

L'une des 10 caractéristiques des cellules cancéreuses est la résistance à la mort cellulaire ce qui entraîne un déséquilibre en faveur de la prolifération. Il existe plusieurs mécanismes de mort cellulaire dont les plus étudiés sont : l'apoptose, la nécrose et l'autophagie (figure 10) [138]. Dans cette partie nous aborderons uniquement l'apoptose et la nécrose qui sont deux voies de mort cellulaire régulées par TNF α .

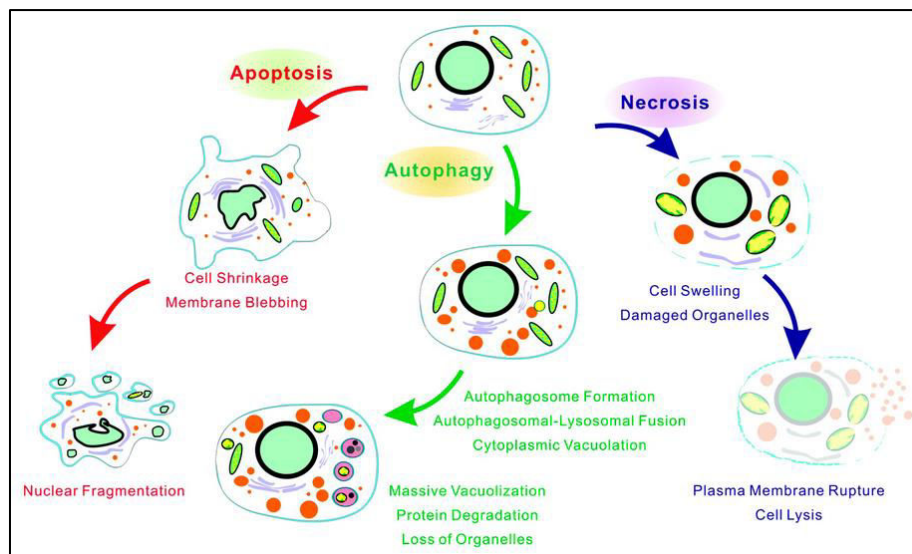


Figure 9: Changements morphologiques au cours des différents types de mort cellulaire [139]

Il est clairement établi que le TNF α peut induire la mort cellulaire par apoptose et par nécrose. En effet, le TNF α (Tumor Necrosis Factor) a été isolé en 1975 par Carswell *et al.* sous forme d'un facteur soluble, dans le sérum de souris traitées par des endotoxines bactériennes, et qui provoque la nécrose d'une tumeur transplantée (le « sarcome Meth A ») d'où le nom de facteur de nécrose tumorale [140]. Par la suite, le TNF α est apparu comme induisant l'apoptose dans certains contextes : en effet, le rôle de TNF α dans l'inflammation

passé également par l'action apoptotique directe sur les cellules infectées. Dans cette partie nous allons voir par quelle voie de signalisation le TNF α peut induire la mort cellulaire et les conséquences sur la progression tumorale.

a) Apoptose

L'apoptose est indispensable au développement des organismes pluricellulaires. Elle est impliquée dans le développement embryonnaire, le renouvellement tissulaire, la réponse immunitaire ou encore le maintien de l'intégrité du génome [141]. Elle conduit à une séquence d'altérations morphologiques comprenant le bourgeonnement de la membrane plasmique, la condensation et la fragmentation du noyau, et le découpage de la cellule en corps apoptotiques qui seront digérés par des macrophages ou par les cellules voisines (figure 10).

L'apoptose consiste en une cascade de réactions assurées par des facteurs présents à l'état latent dans les cellules. Parmi ces acteurs, les caspases (protéases) jouent un rôle important en assurant une cascade ordonnée d'événements protéolytiques. Il existe différents sous-types de caspases : les caspases initiateuses et les caspases exécutoires (ou effectrices). Les caspases initiateuses interviennent en amont dans la cascade et, quand elles sont activées, elles activent à leur tour les caspases exécutoires. Les caspases sont synthétisées sous forme de précurseurs appelés pro-caspases. L'activation des pro-caspases nécessite le clivage de leur pro-domaine entraînant un réarrangement du site actif de la caspase en conformation active. Les caspases initiateuses (caspases-8, 9, 10) ont comme principaux substrats les caspases exécutoires (caspases-3, 6, 7) alors que les caspases exécutoires ont des centaines de substrats qui vont contribuer à la destruction de la cellule [142]. Parmi les protéines cibles des caspases exécutoires, il y a la lamine entraînant un phénomène de condensation nucléaire qui caractérise l'apoptose, des protéines du cytosquelette entraînant une perte de la morphologie des cellules, PARP impliqué dans la réparation de l'ADN et des inhibiteurs de nucléases comme DFF45 permettant l'action de nucléase comme DFF40 aboutissant à la fragmentation de l'ADN [141]. La membrane plasmique des cellules apoptotiques subit alors des réarrangements qui mènent à l'exposition extracellulaire de certains phospholipides comme la phosphatidylsérine (PS) qui sont habituellement situés sur le feuillet interne de la membrane plasmique. L'exposition de la PS à la surface des cellules peut être détectée par l'annexine V : une protéine possédant une forte affinité pour

la PS. Couplé à un marqueur fluorescent l'annexine V permet de détecter les cellules en phase précoces d'apoptose [143].

On distingue deux voies caractéristiques de l'apoptose : la voie extrinsèque (voie dépendante des récepteurs de morts) et intrinsèque (voie dépendante de la mitochondrie).

La voie extrinsèque de l'apoptose, ou voie des récepteurs de mort, est activée lors de la fixation de ligands spécifiques sur des récepteurs de surface appelés récepteurs de mort appartenant à la superfamille des récepteurs du Tumor Necrosis Factor (TNFR) [144]. Ces récepteurs incluent les récepteurs au TNF α (TNFR-1, TNFR-2) mais également les récepteurs de FasL (CD95) et les récepteurs de TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) (DR-4 et DR-5). Ces récepteurs possèdent, au niveau de leurs régions cytoplasmiques, une séquence appelée Death Domain (DD). Lorsque le récepteur est activé, il recrute au niveau du DD les protéines RIP1, Fas Associated Death Domain (FADD) ou TNF Receptor Associated Death Domain (TRADD) qui possèdent un domaine d'interaction protéique appelé Death Effector Domain (DED) leur permettant d'interagir avec des caspases initiateuses, les pro-caspases-8 et -10. La protéine RIP1 joue un rôle central dans la signalisation des récepteurs de morts. Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, lorsque la kinase RIP1 est ubiquitinée par cIAP, elle recrute et active la protéine kinase I κ B de la voie de signalisation NF- κ B pro-inflammatoire. Lorsque la kinase RIP1 est déubiquitinée par CYLD (cylindromatosis) [145], elle permet le recrutement de FADD et TRADD pour former le complexe IIa aussi appelé Death Inducing Signaling Complex (DISC) et permet le rapprochement des pro-caspases-8 et -10 qui sont alors en mesure de s'activer par auto-clivage. La caspase-8 activée va ensuite cliver RIP1 pour éviter le déclenchement de la nécroptose [119, 146]. Il existe une isoforme de la caspase-8 qui ne possède pas de site catalytique appelée Flice-inhibitory protein (FLIP) et dont l'expression est augmentée par NF- κ B. La protéine FLIP entre ainsi en compétition avec la caspase-8 empêchant son recrutement au niveau du complexe DISC prévenant l'activation des caspases effectrices [147].

L'activation de la caspase-8 conduit soit à l'exécution de l'apoptose par activation directe des caspases effectrices -3, -6 et -7, soit elle nécessite une amplification du signal apoptotique via l'activation de la voie intrinsèque ou voie mitochondriale de l'apoptose pour déclencher la cascade d'activation des caspases (figure 9) [148].

Cette deuxième voie est possible grâce à une petite protéine de la famille des protéines Bcl-2 (B-cell lymphoma-2) appelée Bid (BH3 interacting domain death agonist). En effet, la caspase-8 activée clive Bid pour obtenir sa forme tronquée appelée t-Bid qui est alors rapidement transloquée du cytosol vers la membrane mitochondriale où elle se lie à des protéines pro-apoptotiques : Bak et Bax (BCL2-associated X protein) et induit l'activation de la voie mitochondriale (intrinsèque) de l'apoptose [149].

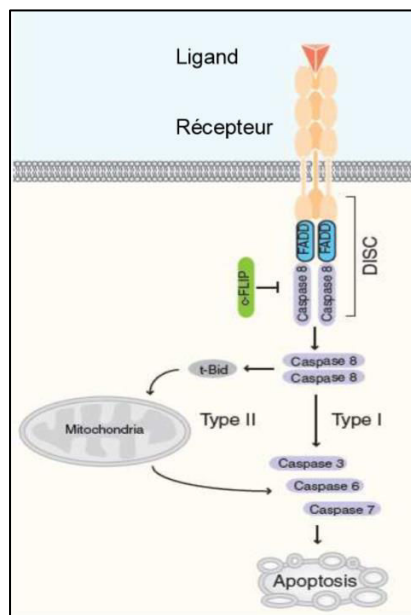


Figure 10: Voie de signalisation apoptotique [150]

La voie intrinsèque de l'apoptose ou voie mitochondriale est induite par des signaux de stress cellulaire tels que l'exposition à des radiations UV, un stress oxydant, des altérations de l'ADN, une réduction en facteurs de survie ou en oxygène. Tous ces éléments entraînent des perturbations mitochondriales incluant l'altération de la membrane externe qui est associée à une modification de la perméabilité de la membrane interne conduisant à des variations du potentiel mitochondrial transmembranaire [151].

Ces perturbations augmentent le relargage dans le cytosol de protéines de l'espace intermembranaire dont fait partie le cytochrome c (cyt c). Le relargage du cyt c permet la formation d'un complexe appelé apoptosome constitué du cyt c, apaf-1, d'ATP et pro-caspase-9. Le cyt c relargué interagit avec une protéine adaptatrice, apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1), pour former le squelette heptamérique de l'apoptosome. Ce complexe recrute et active la caspase-9 par dimérisation. La caspase-9 activée clive les caspases effectrices -3 et -7 [152]. Le relargage du cytochrome c est régulé en partie par les membres de la famille Bcl2. Les membres anti-apoptotiques (tels que Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1,

Bfl-1) inhibent le relargage du cyto c tandis que les membres pro-apoptotiques appartenant au groupe Bak et Bax (tels que Bad, Bim, NOXA, PUMA, Bik) l'augmente [153].

Les perturbations mitochondriales conduisent également au relargage d'inhibiteurs des IAPs (Inhibitor of Apoptosis) comme Smac/DIABLO (Second Mitochondria-derived Activator of Caspase/Direct IAP Binding protein with Low pI) et Omi/HtrA2 (high-temperature requirement protein A2) [154]. D'autres facteurs apoptogènes sont relargués mais activent une voie caspases-indépendante constituée de AIF (Apoptosis-Inducing Factor) et EndoG (Endonucléase G). Après activation de la voie intrinsèque, AIF est exporté de la mitochondrie vers le noyau où il induit une condensation de la chromatine et un clivage de l'ADN. EndoG est une nucléase mitochondriale qui va rejoindre le noyau pour digérer l'ADN [155, 156].

L'apoptose est indispensable au maintien de la balance entre la mort et la survie cellulaire mais également au maintien de l'intégrité du génome. Son rôle est important lors d'une réaction inflammatoire au cours de laquelle les ligands des récepteurs de mort, principalement sécrétés par les cellules immunitaires, déclenchent l'apoptose pour permettre l'élimination des cellules infectées. Par ailleurs, lorsque l'ADN d'une cellule est endommagé, la protéine p53 entraîne l'apoptose afin d'éviter la prolifération d'une cellule défectueuse. Par conséquent, un dysfonctionnement dans le processus apoptotique peut conduire à de nombreuses pathologies dont le cancer [157].

Des agents chimiothérapeutiques, utilisés pour traiter les cancers, induisent l'apoptose des cellules cancéreuses en provoquant des dommages à l'ADN. Il existe des anti-métabolites comme le 5-fluorouracile qui empêche la synthèse des acides nucléiques [158]. Des agents anti-néoplasiques comme le métabolite de l'irinotécan (SN38) inhibent la topoisomérase I induisant des cassures de l'ADN [159]. Des agents alkylants comme l'oxaliplatine [160] ou encore des agents intercalants comme la doxorubicine inhibent l'ADN topoisomérase II qui est une enzyme impliquée dans le maintien de la structure tridimensionnelle de l'ADN lors des phénomènes de transcription et de réplication [161]. Ces agents chimiothérapeutiques induisent des dommages à l'ADN activant la voie intrinsèque mitochondriale de l'apoptose.

L'effet pro-apoptotique du TNF α est aussi bien observé *in vitro* en traitant des cellules cancéreuses coliques avec du TNF α humain recombinant [162-166] qu'*in vivo* suite à

l'injection de TNF α dans des modèles de xénogreffes de cellules de cancer colique, du sein, du foie ou encore de la vessie [162, 167-169].

Un dysfonctionnement dans le processus d'apoptose peut être causé par des altérations de l'expression ou des fonctions de molécules exécutrices et régulatrices de l'apoptose. En effet, au sein des cellules cancéreuses, on observe un déséquilibre de l'expression des protéines de la famille Bcl-2 en faveur des protéines anti-apoptotiques [170] une surexpression des inhibiteurs de l'apoptose tels que c-FLIP [171] et IAPs [172] mais également une inhibition de l'expression ou de l'activité des caspases [173], de p53 [87] ou encore des récepteurs de morts [174]. Ces altérations entraînent la résistance des cellules cancéreuses à l'apoptose et aux agents anti-cancéreux. Ainsi, en modifiant l'expression génique en faveur des protéines pro-apoptotiques, on sensibilise les cellules cancéreuses à l'apoptose par les agents anti-cancéreux. En effet, l'augmentation de l'expression de TNF-R1 par les cellules cancéreuses favorise l'apoptose induite par TNF α [175]. L'inhibition de c-FLIP et XIAP induit l'apoptose de cellules cancéreuses coliques HCT-116 et Colo205 [176, 177]. De plus, restaurer l'expression de la caspase-3 dans les cellules du cancer du sein (MCF-7) augmente l'apoptose induite par la doxorubicine [173]. L'induction de l'expression de p53 sensibilise les cellules cancéreuses à l'apoptose médiée par TRAIL [178]. Par ailleurs, la voie NF- κ B est considérée comme le mécanisme majeur permettant l'échappement des cellules cancéreuses à l'effet pro-apoptotique de TNF α . En effet, NF- κ B est impliquée dans l'expression de protéines anti-apoptotiques (c-FLIP, IAPs, Bcl-2) et entre en compétition avec la voie apoptotique. Ainsi, l'inactivation de NF- κ B augmente la mort des cellules tumorales lors d'un traitement en TNF α [179]. Des études ont également montré que des agents anti-inflammatoires non stéroïdiens (NSAIDs) sensibilisent des cellules cancéreuses coliques à l'apoptose induite par TNF α en inhibant NF- κ B [180, 181].

L'apoptose et la nécrose ont longtemps été opposées. La nécrose est considérée comme une mort accidentelle non contrôlée alors que l'apoptose est décrite comme une mort programmée. Or, des voies d'induction de la nécrose ont été décrites et remettent en question cette dualité : on parle alors de nécroptose ou nécrose programmée.

b) Nécrose et nécrose programmée

La nécrose est considérée comme une mort passive ou accidentelle, qui se caractérise par une augmentation du volume cellulaire, un gonflement des organelles et une lyse cellulaire

avec la dispersion du contenu de la cellule dans le milieu extracellulaire [182] contrairement à l'apoptose où les organelles restent intacts et la cellule est fragmentée en corps apoptotiques sans dispersion du contenu de la cellule (figure 10).

Un processus de mort appelé nécroptose (ou nécrose programmée) a été mis en évidence par l'équipe du Professeur Yuan [183]. Elle se caractérise par une mort cellulaire par nécrose mais faisant intervenir des facteurs que l'on retrouve dans le processus d'apoptose. Comme pour l'apoptose, les cellules en nécrose voient leur potentiel membranaire chuter et leurs membranes mitochondriales se perméabiliser. L'une des différences avec l'apoptose est la déplétion en ATP conduisant à l'absence d'activation de la cascade des caspases qui nécessite la présence d'ATP. Par ailleurs, contrairement à l'apoptose, la nécroptose déclenche une réponse immunitaire inflammatoire. En effet, la lyse de la cellule en nécrose entraîne le relargage de molécules intracellulaires : les DAMPs (Damage/Danger-Associated Molecular Patterns) tels que HMGB1, l'ATP, l'acide urique ou encore IL-1 α et IL-33. Ces DAMPs sont reconnus par des récepteurs TLR (Toll like receptor) et NLR (Node type receptor) à la surface des cellules phagocytaires (macrophages, cellules dendritiques). Ces cellules vont alors sécréter des cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-1 β , IL-6 et IL-8) responsable de l'activation de l'immunité adaptative [184].

L'inhibition d'événements essentiels au déroulement des processus apoptotiques et/ou autophagiques, résulte en l'induction d'une mort cellulaire nécrotique. Il suffirait par exemple d'inhiber l'activité des caspases (utilisation du z-VAD, inhibiteur global des caspases) pour induire la nécroptose, à condition que la machinerie nécroptotique soit fonctionnelle [185].

Des études mettent en évidence une voie de signalisation pour le déclenchement et le déroulement du processus nécrotique [186]. La signalisation actuellement connue pour l'exécution de la nécroptose a de nombreuses caractéristiques communes avec la voie extrinsèque de l'apoptose. En effet, la nécroptose est induite par la fixation des ligands TNF α , TRAIL et FasL sur les récepteurs de morts (TNF-R, DR4/5, CD95) aboutissant à la formation d'un complexe multi-protéique impliquant FADD, RIP1 (Receptor-interacting protein 1) et la caspase-8. La caspase-8 clive la protéine kinase RIP1 pour empêcher la nécroptose et induire l'apoptose. Si la caspase-8 est inactive, la kinase RIP1 recrute la kinase RIP3 pour former un complexe appelé nécroptosome (complexe IIb) [119]. RIP1 et RIP3 vont alors se phosphoryler mutuellement afin de réguler plusieurs protéines pour

induire la mort des cellules. L'équipe du Pr. Junying Yuan a mis en évidence le rôle central de la kinase RIP1 par le criblage de molécules pouvant inhiber la nécroptose comme la nécrostatine-1 (Nec-1) [187]. Par ailleurs, RIP3 va favoriser l'activité d'enzymes du métabolisme du glycogène et du glutamate tels que la glycogène phosphorylase (PYGL), la glutamate-ammonie ligase (GUL1) ou encore la glutamate déshydrogénase (GLUD1). Ces enzymes vont fournir des substrats pour la chaîne respiratoire mitochondriale aboutissant à une surproduction de ROS (espèces actives de l'oxygène) mitochondriaux nécessaires à la nécroptose (figure 11) [188]. De plus, la NADPH oxydase (NOX1), impliquée dans la production de ROS, est activée par le complexe nécroptotique. Ces observations montrent que la production de ROS est essentielle au processus de nécroptose. En effet, la production de ROS est rapidement augmentée au stade précoce de la nécroptose et l'inhibition de la production de ROS empêche le processus de nécroptose. Les ROS induisent la peroxydation des lipides et des dommages aux membranes mitochondriales et plasmiques aboutissant à la mort cellulaire [189].

La kinase RIP3 activée lors de ce processus peut également activer la kinase Mixed Lineage Kinase domain-Like (MLKL) par phosphorylation sur ces résidus Thréonine 357 et Sérine 358 [186]. La MLKL est impliquée dans la perméabilisation de la membrane mitochondriale. En effet, MLKL peut activer la protéine phosphoglycerate mutase 5L (PGAM 5L) qui va alors interagir avec PGAM 5S située dans la membrane mitochondriale. Le complexe PGAM 5L/S va inhiber une protéine : la dynamin-related protein 1 (DRP1) induisant la fragmentation de la membrane mitochondriale [190]. De plus, une étude montre que MLKL induit un influx important d'ions calcium par activation du transporteur TRPM7 [191], tandis qu'une autre étude met en évidence une augmentation de l'influx de sodium [192]. Dans tous les cas, l'altération des influx ioniques induit par MLKL compromet la capacité de la membrane plasmique à préserver l'homéostasie ionique intracellulaire et met en péril son intégrité dû à un changement de pression osmotique [193]. On observe donc un rôle central de MLKL dans le processus de nécroptose. En effet, des cellules (fibroblastes et macrophages) provenant de souris KO pour MLKL sont résistantes à la nécroptose induit par un traitement TNF α et ZVAD [194].

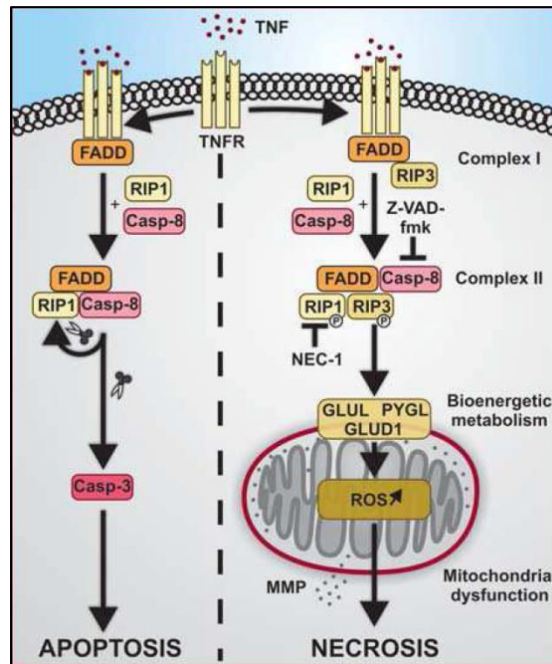


Figure 11: Voie de signalisation nécroptotique [188]

Pour que la nécroptose soit déclenchée, les récepteurs de mort doivent être activés par les ligands de la famille TNF (TNF α , TRAIL, FasL), la caspase-8 doit être inactive pour éviter le clivage de RIP1, et les IAPs doivent être inhibées pour éviter l'ubiquitination de RIP1 impliquée dans l'activation de la voie NF- κ B. Par conséquent, un co-traitement de ligands TNF avec un inhibiteur des caspases (ZVAD) ou un inhibiteur des IAPs (Smac) peut favoriser le déclenchement de la nécroptose de cellules cancéreuses y compris les cellules résistantes à l'apoptose. En effet, Smac permet l'induction de la nécroptose par TNF α de cellules de leucémie résistante à l'apoptose et de cellules de fibrosarcome (L929) [195]. La nécroptose est également déclenchée après activation des récepteurs à TRAIL chez des cellules cancéreuses coliques [196]. Des cellules cancéreuses ovariennes résistantes à l'apoptose deviennent sensibles au TNF α et meurent par nécroptose lorsqu'elles sont co-traitées avec ZVAD et Smac [197]. La staurosporine, un inducteur de l'apoptose, est capable de déclencher la nécroptose dans des cellules de leucémie lorsque l'activation des caspases est inhibée [198].

Les cellules cancéreuses résistantes à l'apoptose pourraient donc être éliminées en activant une autre voie de mort cellulaire, la nécroptose. Cependant, des acteurs de la voie de nécroptose peuvent également être altérés chez les cellules tumorales. Par exemple, dans des tumeurs coliques humaines, l'expression de RIP1 et RIP3 est fortement diminuée comparé aux tissus sains [199].

3. Angiogenèse :

Lors d'une réaction inflammatoire, le $\text{TNF}\alpha$ participe à la réparation tissulaire en induisant l'angiogenèse, ce qui peut avoir des conséquences néfastes dans un contexte tumoral. Cependant, l'impact du $\text{TNF}\alpha$ sur l'angiogenèse diffère suivant la dose à laquelle il est administré [200]. L'objectif de cette partie est de décrire le rôle de l'angiogenèse dans la progression tumorale et sa régulation, notamment par $\text{TNF}\alpha$.

Les tumeurs cancéreuses ont besoin d'oxygène et de nutriments pour leur croissance. Cependant, lorsqu'une tumeur solide atteint une taille critique, une ischémie apparaît dans les zones non vascularisées. Pour remédier à cela, la tumeur induit la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants dans le tissu sain avoisinant, ce processus est appelé angiogenèse. Cette vascularisation est régulée par la balance entre les facteurs activateurs et inhibiteurs de l'angiogenèse. L'angiogenèse est activée lorsqu'il y a un déséquilibre en faveur des facteurs pro-angiogéniques (TAFs) dont font partie le FGF (Fibroblastes Growth Factor), VEGF (Vascular endothelial growth factor), $\text{TGF-}\beta$ (Transforming Growth Factor) ou EGF (Epidermal Growth Factor). VEGF est l'un des facteurs les plus importants dans l'angiogenèse et est produit par de nombreux types de cellules cancéreuses, ainsi que par les cellules saines [201]. En se fixant à ces récepteurs à la surface des cellules endothéliales, VEGF va induire la migration (VEGFR-R1) et la prolifération (VEGFR-R2) de ces cellules. VEGF régule l'expression de gènes impliqués dans l'angiogenèse mais également des gènes de l'inflammation [202]. De plus, l'interleukine-8 (IL-8, CXCL8) pouvant être induite par $\text{TNF}\alpha$, stimule la migration des cellules endothéliales (cellules HUVEC) et augmente l'angiogenèse *in vivo* chez le rat [203].

L'expression des TAFs peut être induite lors d'une ischémie, déclenchant des carences en acides aminés et en glucose ainsi qu'une hypoxie, qui conduit à l'induction de l'expression du facteur pro-angiogénique VEGF par la voie de signalisation cellulaire dépendante du facteur de transcription HIF-1. En présence d'oxygène, le facteur de transcription HIF-1 α est hydroxylé par PHD2 (prolyl hydroxylase domain) entraînant sa fixation à la protéine VHL (von Hippel-Lindau). VHL est une E3 ubiquitine ligase qui induit la dégradation de HIF-1 α par le protéasome. Au cours d'une baisse de la teneur en oxygène, l'hydroxylation de HIF-1 α est inhibée. Par conséquent, HIF-1 α s'accumule dans le cytoplasme puis rejoint le noyau pour se dimériser avec HIF-1 β afin de réguler l'expression de gènes impliqués

dans l'angiogenèse tel que VEGF. La maladie de Von Hippel-Lindau est due à une mutation sur le gène VHL et entraîne le développement de nombreux cancers dont le cancer du rein associé à une hypervascularisation [204].

L'expression de ces TAFs peut également être régulée par des protéines dont l'expression ou l'activité sont altérées dans l'oncogenèse. L'oncogène Bcl-2 (protéine anti-apoptotique) induit une augmentation de l'expression du VEGF [205]. D'autres oncogènes comme RAS augmente l'expression du VEGF [206]. Le gène suppresseur de tumeur p53 inhibe indirectement l'angiogénèse en augmentant l'expression du facteur anti-angiogénique TSP-1, en modulant les effets du facteur HIF-1 α et en inhibant la transcription du VEGF [207]. En plus des stress métaboliques et des modifications génétiques, l'angiogenèse peut être induite suite à une réponse immune et inflammatoire se manifestant par l'infiltration de cellules immunitaires dans la tumeur. En effet, il a été montré que des macrophages associés aux tumeurs (TAMs) produisent du VEGF en présence de TNF α et favorise l'angiogenèse [38].

Les nouveaux vaisseaux formés au sein de la tumeur sont anormaux d'un point de vue architectural et fonctionnel. En effet, c'est un réseau plutôt de type veineux, irrégulièrement anastomosés avec de nombreux culs-de-sac et forme des shunts artério-veineux. La bordure endothéliale est incomplète, la membrane basale est souvent absente et on observe très peu de cellules satellites (péricytes et cellules musculaires lisses). L'efficacité de perfusion est médiocre notamment dû aux courts-circuits artério-veineux. Ceci confère à la tumeur une résistance aux traitements anti-cancéreux et favorise les métastases [208].

L'inhibition de l'angiogenèse ralentit fortement la croissance tumorale, ce qui démontre toute l'importance de la formation de vaisseaux pour la tumeur. C'est pourquoi des traitements anti-cancéreux visant à l'inhibition de l'angiogenèse tumorale ont été développés. Des inhibiteurs du VEGF, comme bevacizumab (anticorps monoclonal), ou de la voie induit par VEGF, comme sorafénib (inhibiteur de RAF), sont utilisés dans le traitement de certains cancers comme le cancer colorectal, du sein ou encore du rein [209]. Le TNF α est également utilisé en co-traitement avec un agent chimiothérapeutique (melphalan) pour traiter des sarcomes et des mélanomes des membres. L'administration de TNF α par voie systémique induit des effets secondaires toxiques analogues à un syndrome inflammatoire majeur. C'est pourquoi le co-traitement TNF α /melphalan est administré par

perfusion de membre isolé à l'aide d'un garrot, afin d'abolir la toxicité systémique du TNF α [210, 211].

TNF α cible la vascularisation des tumeurs en induisant une hyperperméabilisation et la destruction de la paroi vasculaire permettant à court terme une augmentation de la pénétration des agents anti-cancéreux dans les tumeurs et à long terme une destruction du réseau vasculaire tumoral [212, 213]. En effet, des études *in vivo* montrent que le TNF α améliore l'activité anti-tumorale de la doxorubicine en induisant la mort des cellules endothéliales vasculaires permettant une augmentation de la perméabilité de la paroi endothéliale [214].

Les traitements anti-angiogéniques, abordés dans le paragraphe précédent, ont pour but de bloquer l'angiogenèse et détruire les vaisseaux tumoraux afin de priver la tumeur en oxygène. Or, l'impact des radiations ionisantes et l'effet de certaines drogues de chimiothérapie sont amoindris en l'absence d'oxygène. En effet, certaines drogues nécessitent de l'oxygène pour former des radicaux libres (cyclophosphamide). Une augmentation de la perfusion tumorale permettrait d'augmenter l'oxygénation de la tumeur et la biodisponibilité des drogues afin d'augmenter l'efficacité de la radiothérapie et chimiothérapie. Une nouvelle approche thérapeutique viserait à induire une vasodilatation tumorale par l'utilisation de substances vasomotrices (NO, inhibiteur de endothéline-1) et par une « normalisation » du réseau vasculaire qui peut être obtenu par des traitements anti-angiogéniques [215, 216]. En effet, les traitements anti-angiogéniques détruiraient les vaisseaux tumoraux immatures laissant en place uniquement les vaisseaux les plus matures (avec cellules musculaires lisses) se rapprochant d'un réseau vasculaire normal capable de réagir aux substances régulant le tonus vasculaire [208].

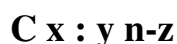
II. Acides gras polyinsaturés n-3 et cancer :

A. Définition et structure des acides gras:

Les acides gras sont des chaînes carbonées possédant à l'une des extrémités un groupement carboxylique, et à l'autre extrémité un groupement méthylique. Les acides gras dits à chaîne moyenne ou courte (AGCM) ont un nombre de carbones compris entre 4 et 10, et les acides gras dits à longue chaîne (AGLC) supérieurs à 12.

Cette chaîne carbonée peut être dépourvue de toute double liaison entre des atomes de carbone et, dans ce cas, les acides gras sont dits saturés (AGS). Elle peut aussi présenter une ou plusieurs double(s) liaison(s), les acides gras sont alors désignés comme des acides gras monoinsaturés (AGMI) ou polyinsaturés (AGPI).

La nomenclature des acides gras repose sur le nombre d'atomes de carbone et le nombre de doubles liaisons. Par convention, la notation des acides gras est la suivante :



x représente le nombre d'atomes de carbone

y représente le nombre de doubles liaisons

z la position de la double liaison la plus proche de l'extrémité méthyl.

Ainsi, les acides gras des familles n-9 (oméga-9 ou ω -9), n-6 (oméga-6 ou ω -6) et n-3 (oméga-3 ou ω -3) ont leur première double liaison située respectivement à 9 carbones, 6 carbones et 3 carbones de l'extrémité méthylique (figure 12).

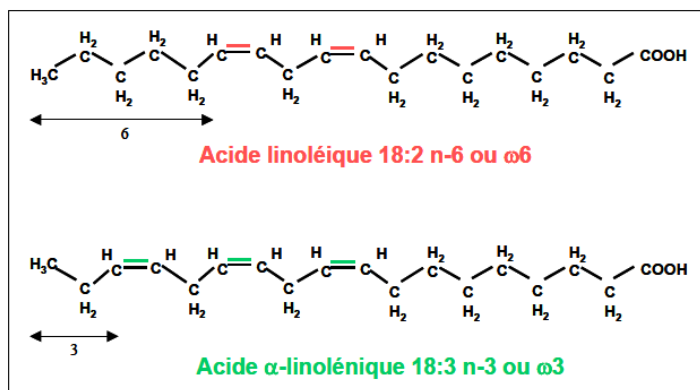


Figure 12: Structure et nomenclature des acides gras linoléique et α -linoléique.

Les acides gras ont deux origines : l'alimentation et la synthèse *de novo* par l'organisme. Les acides gras saturés, monoinsaturés et une partie des acides gras polyinsaturés sont synthétisés dans l'organisme, alors que les acides gras polyinsaturés n-6 et n-3, ou tout du moins les précurseurs : acides linoléique n-6 et α -linoléique n-3, doivent être apportés par l'alimentation, c'est pourquoi ils sont qualifiés d'acides gras indispensables.

Les acides gras sont les constituants élémentaires de différentes classes de lipides : les triglycérides, les phospholipides et les esters de cholestérol (figure 13).

- Les triglycérides (TG) sont constitués d'une molécule de glycérol estérifiée par trois acides gras en position sn-1 (R1), sn-2 (R2) et sn-3 (R3) qui ne sont pas nécessairement les mêmes. Les acides gras insaturés se fixent préférentiellement en position R2 (centrale) tandis que les positions R1 et R3 (périphériques) fixent des acides gras saturés (figure 16). Ils sont situés principalement dans les tissus adipeux, constituent ainsi la forme de stockage principale de l'énergie.
- Les phospholipides (PL) sont constitués d'une molécule de glycérol estérifiée par deux acides gras et un acide phosphorique, lui-même lié à un alcool aminé (figure 13) (choline, sérine, éthanolamine), un résidu glycérol ou une molécule d'inositol. On obtient alors des phosphatidylcholines (PC), phosphatidylsérines (PS), phosphatidyléthanolamines (PE), phosphatidylglycérols (PG) et enfin des phosphatidylinositols (PI). On les appelle des lipides de structure car ce sont des constituants des membranes cellulaires influençant entre autre sa fluidité.
- Les esters de cholestérol (EC) sont constitués d'une molécule de cholestérol lié à un acide gras à longue chaîne au niveau de son groupement hydroxyl. Ils représentent la forme de stockage intracellulaire (principalement dans le foie) et la forme de transport intravasculaire du cholestérol.

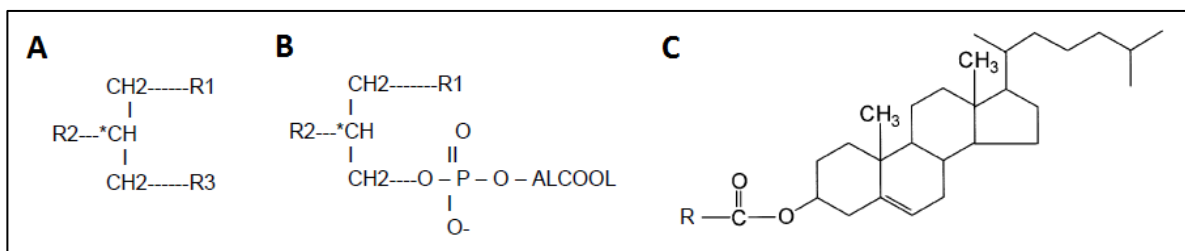


Figure 13: Structure d'un triglycéride (A), d'un phospholipide (B) et d'un ester de cholestérol (C).

B. Sources alimentaires des acides gras et Apports Nutritionnels Conseillés (ANC)

Les acides gras sont ingérés sous la forme de triglycérides représentant 95 à 98 % des lipides alimentaires.

Les acides gras représentent 30-35% de l'apport énergétique total dans les pays industrialisés et les sources alimentaires les plus importantes sont les huiles végétales, les produits laitiers, les viandes, les graines, les poissons ou les huiles de poissons.

Des apports nutritionnels conseillés (ANC) pour les acides gras ont été fixés chez l'adulte sain à partir de données expérimentales, épidémiologiques et cliniques. Les ANC pour les acides gras ont été définis en 2001 par l'agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA), mais les données scientifiques acquises depuis 2001 ont amené l'AFSSA à les actualiser en 2010 (tableau 1).

ANC 2010 en lipides pour un adulte* consommant 2000 Kcal (en % d'apport énergétique)	
	Lipides totaux 35-40
AG indispensables	Acide linoléique C18 :2 n-6 4
	Acide α-linoléique C18 :3 n-3 1
	Acide docosahexaénoïque DHA, C22 :6 n-3 250 mg
AG non indispensables	Acide eicosapentaénoïque EPA, C20 :5 n-3 250 mg
	Acide laurique (C12:0) + Acide myristique (C14:0) + Acide palmitique (C16:0) ≤ 8
	Acides gras saturés totaux ≤ 12
	Acide oléique C18 :1 n-9 15-20
	Autres AG non indispensables -

**Les valeurs sont les mêmes pour les adolescents, les femmes enceintes ou qui allaitent ainsi que les sujets âgés.*

Tableau 1 : Les apports nutritionnels conseillés en acides gras (D'après Legrand P. et al. 2010)

En ce qui concerne les AGPI, il est recommandé que le rapport oméga-6 / oméga-3 tende vers 5, pour éviter que les acides gras oméga-6 n'induisent une compétition excessive

vis-à-vis des acides gras oméga-3. Cependant, on observe une forte consommation d'oméga-6 au détriment des oméga-3 favorisant certaines pathologies dont le cancer.

En effet, d'après l'enquête INCA (une étude de la consommation alimentaire individuelle effectuée au cours des années 1998 et 1999 en France), les apports moyens en acide α -linoléique sont très faibles, compris entre 0,10 et 0,20 g/jour, tandis que les apports moyens en acide linoléique sont nettement plus élevés, compris entre 1 et 2 g/jour.

Les études SUVIMAX (1998) et d'Aquitaine (2001) montrent également un déficit net de la consommation d'acide α -linoléique (en moyenne 0,8 g alors que l'ANC est de 2 g). Le rapport linoléique/ α -linoléique devrait tendre vers la valeur de 5, ce qui est loin d'être le cas dans la population française puisqu'il est de l'ordre de 12 à 15.

Des études épidémiologiques portant sur l'impact des AGPI sur le risque de cancer donnent parfois des résultats contradictoires, cependant elles tendent à montrer qu'un ratio n-6/n-3 élevé augmente le risque de cancer de la prostate [217], du sein [218] et colorectal [219, 220]. De plus, une forte consommation d'huile d'olive (riche en acide gras monoinsaturé n-9 oléique) est associée à une diminution du risque de cancer notamment du côlon, du sein et de la peau. Ces effets sont principalement dus à la présence d'antioxydants et d'acide oléique [16, 221].

L'augmentation des apports alimentaires en acide α -linoléique peut s'effectuer par la consommation d'huiles riches en cet acide gras comme l'huile de colza et de soja. Ces huiles apportent également des teneurs significatives en vitamines E à propriété anti-oxydante. Pour augmenter la teneur en cet acide gras dans les tissus animaux d'élevages, l'alimentation peut être modifiée par un apport en graines de lin pour obtenir des produits de consommation courante enrichis en acides gras polyinsaturés oméga-3. L'augmentation des apports alimentaires en AGPI-LC oméga-3 (EPA, DHA) peut également s'effectuer par la consommation d'aliments naturellement riches en cet acide gras comme le poisson ou ses dérivés [222].

Des travaux ont permis de mettre en évidence la répercussion d'une supplémentation en AGPI n-3 sur leurs taux plasmatiques. Pour cela, Mori *et al.* ont réalisé une étude avec des personnes sans pathologies connues (entre 20-65 ans) divisées en 3 groupes : un groupe contrôle supplémenté en huile d'olive, un groupe EPA et un groupe DHA supplémenté avec 4g/jour d'EPA et DHA (éthyl-ester). La supplémentation est sous forme de capsule sur une durée de 6 semaines. Ils ont constaté que la supplémentation en EPA augmente le taux

d'EPA plasmatique de 494% sans changement significatif en DHA. La supplémentation en DHA augmente le taux plasmatique d'EPA et DHA de 52% et 167% respectivement. Il observe également une diminution du taux plasmatique d'AA de 25% et de 22% lors d'une supplémentation en EPA et DHA respectivement [223]. Une autre étude a démontré un effet dose réponse d'une supplémentation en huile de poisson chez des hommes sains d'une trentaine d'années divisés en 4 groupes. La supplémentation en huile de poisson est réalisée sur 12 semaines sous forme de capsule apportant soit 0 ; 1.5 ; 3 et 6 g /jr d'EPA/DHA (une capsule contenant 300 mg EPA et 200 mg DHA). On peut observer que l'augmentation de la dose d'huile de poisson consommée est corrélée à une augmentation du taux plasmatique d'EPA et DHA et à une diminution du taux plasmatique d'AA [224].

Une supplémentation en AGPI n-3 (EPA/DHA à 4.8g/jr) pendant 6 mois a également été réalisée chez des patients atteints d'un CCR sporadique et est associée à une augmentation du niveau d'AGPI n-3 plasmatique dans les fractions : triglycérides, cholestérols et phospholipides. Dans les triglycérides, le pourcentage d'EPA et DHA avant la supplémentation est de 0.32 et 1.44 et passe à 2.328 et 2.189 après 6 mois de supplémentation. Au niveau de la fraction cholestérol, le pourcentage d'EPA et DHA avant la supplémentation est de 1.27 et 0.22 et passe à 7.452 et 1.086 après 6 mois de supplémentation. Dans les phospholipides, le pourcentage d'EPA et DHA avant la supplémentation est de 1.59 et 5.27 et passe à 6.54 et 6.627 après 6 mois de supplémentation [225]. De plus, des patients atteints de polypose adénomateuse familiale (FAP) supplémenté en EPA sous forme libre (2 g/jour) pendant 6 mois, voient leur taux d'EPA dans la muqueuse coliques augmenté de 2.6 fois comparé au groupe contrôle avec une réduction du nombre et de la taille des polypes [226].

C. Métabolisme des acides gras :

1. Synthèse des acides gras :

a) *Synthèse des acides gras saturés et monoinsaturés :*

La synthèse *de novo* des acides gras saturés se déroule dans le cytoplasme des cellules des tissus lipogéniques comme le foie, le tissu adipeux et les glandes mammaires. Dans le cas du cancer, les cellules tumorales possèdent la caractéristique de voir leur lipogénèse augmentée pour soutenir leur prolifération [117].

La lipogenèse dépend de plusieurs enzymes dont les premières dans la séquence de réaction sont : l'acétyl-coenzyme A carboxylase (ACC) [4] et la fatty acid synthase (FAS). Il existe deux isoformes d'ACC : ACC1 et ACC2, qui possèdent une activité enzymatique similaire mais ont une spécificité d'expression tissulaire. ACC1 est exprimée dans tous les tissus mais son expression est plus importante dans le tissu adipeux, le foie et les glandes mammaires. Tandis que ACC2 est principalement exprimée dans le muscle squelettique et cardiaque et dans une moindre mesure dans le foie [227]. ACC est responsable de la production de malonyl-coenzyme A à partir d'acétyl-coenzyme A. Le malonyl-CoA généré par ACC1 est pris en charge par la FAS pour la synthèse d'AG dans le cytosol. Le malonyl-CoA généré par ACC2 agit comme un inhibiteur de la carnitine-palmitoyltransferase-1 (CPT-1) impliquée dans l'entrée des AG dans la mitochondrie pour la β -oxydation [228].

Le malonyl-CoA généré par ACC1 est pris en charge par la FAS pour allonger la chaîne de l'acétyl-CoA localisée dans le site de fixation des acyls (ACP) de la FAS. La FAS est un complexe multienzymatique composé de 7 sous unités qui possèdent des activités catalytiques différentes : acétyl/malonyl-CoA transférase, β -cétocoacyl synthase, β -cétocoacyl réductase, β -hydroxylacyl déshydratase, énoyl réductase, thioestérase. L'élongation se fait par cet enchaînement de réactions conduit par la FAS qui permet de transformer de l'acétyl-coenzyme A à 2 carbones, en acide palmitique (C16:0) à 16 carbones en 7 cycles réactionnels. A chaque tour se rajoute 2 carbones par ajout de malonyl-CoA à la chaîne carbonée fixée à l'ACP. ACC a un rôle clef dans la néo-synthèse des acides gras car il y a consommation d'un malonyl-coenzyme A à chaque fois que la chaîne carbonée est allongée de 2 carbones. La dernière étape a lieu lorsque la chaîne carbonée liée à l'ACP a atteint une longueur de 16 carbones : la *fatty acyl-ACP thioesterase* va briser la liaison reliant cette chaîne à l'ACP, libérant majoritairement de l'acide palmitique (C16:0) et d'autres intermédiaires (figure 14). L'activité des enzymes ACC et FAS nécessite de l'ATP (Adénosine TriPhosphate) et le pouvoir réducteur du NADPH,H⁺ (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate).

partir du groupement carboxyle terminal conduisant respectivement à l'acide palmitoléique (C16 : 1 n-7) et à l'acide oléique (C18 : 1 n-9), pour ce qui concerne les deux principaux. Quantitativement, l'acide oléique représente l'élément majeur des acides gras mono-insaturés et est activement synthétisé par les cellules. A partir de ces acides gras monoinsaturés, les chaînes carbonées peuvent être allongées par des élongases et le nombre d'insaturations peut être augmenté par l'action de désaturases pour former les acides gras de la famille n-7 et n-9 (figure 15).

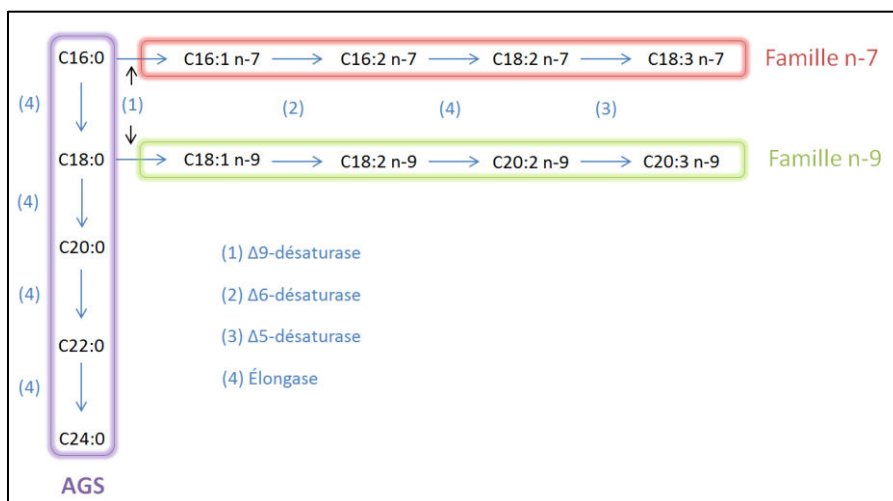


Figure 15: Synthèse des acides gras saturés (AGS), monoinsaturés et polyinsaturés de la famille n-7 et n-9.

Les cellules cancéreuses reprogramment leur métabolisme lipidique pour répondre à un taux anormalement élevé de prolifération et pour faire face à un environnement défavorable à leur multiplication. Les modifications de leur métabolisme lipidique sont dues principalement à une altération de l'expression des enzymes de la lipogenèse tout en conservant la capacité de capter des lipides dans le microenvironnement en fonction du contexte cellulaire [229-232].

Dans des conditions physiologiques, l'alimentation constitue l'apport majeur en AG alors que la synthèse *de novo* est faible dans la plupart des organes exceptée dans le foie et le tissu adipeux qui régulent l'homéostasie lipidique. Cependant dans les tumeurs, 95% des AG proviennent de la synthèse *de novo* avec un taux de synthèse élevé d'AGS et AGMI [233]. Ainsi dans les tumeurs coliques, on observe une accumulation des acides palmitique et oléique [234]. A l'inverse, on observe un appauvrissement en AGPI, notamment en AGPI n-3, dans des tumeurs coliques comparées à la muqueuse saine à l'exception d'un AGPI n-6, l'acide arachidonique [235]. Dans de nombreux cancers, on observe une

augmentation de l'expression et de l'activité d'enzymes impliqués dans la lipogénèse tels que ACC, FAS et SCD [236]. Ceci concorde avec les modifications de la composition lipidique des tumeurs et l'augmentation de la synthèse *de novo* des AGS et AGMI. La lipogénèse est donc un élément clé dans la prolifération cellulaire cancéreuse. Ainsi, l'extinction de l'expression d'ACC, FAS et SCD1 à l'aide d'ARN interférents (siARN) ou d'inhibiteurs pharmacologiques ralentit la prolifération et induit la mort par apoptose des cellules cancéreuses sans effet cytotoxique sur les cellules saines [237-239].

b) Synthèse des acides gras polyinsaturés n-3 et n-6 :

Les précurseurs des AGPI de la famille n-6 et n-3 : acide linoléique (C18 : 2 n-6) et acide α -linoléique (C18 : 3 n-3), sont dits indispensables car ils sont nécessaires à la croissance normale et aux fonctions physiologiques de tous les tissus, mais non synthétisables par l'Homme. L'acide linoléique et l'acide α -linoléique ont leur première double liaison située respectivement à 6 carbones (n-6) et 3 carbones (n-3) de l'extrémité méthyle. Or, les mammifères ne possèdent pas les désaturases nécessaires à l'insertion de ces doubles liaisons. Seuls les végétaux expriment les Δ 12 et Δ 15-désaturases capables d'insérer une double liaison à 6 carbones (n-6) et 3 carbones (n-3) de l'extrémité méthyle à partir de l'acide oléique. Cependant, l'Homme peut ajouter à ces deux précurseurs des doubles liaisons vers l'extrémité carboxyle grâce aux désaturases FADS1 et 2, et allonger la chaîne carbonée grâce à une élongase pour obtenir les autres acides gras polyinsaturés essentiels n-6 et n-3. Le tissu principal de la biosynthèse des AGPI est le foie mais elle peut également s'effectuer au niveau d'autres organes comme le cerveau, les reins ou encore les intestins [240-242].

Le métabolisme des deux familles d'acides gras polyinsaturés n-3 et 6 suit deux voies parallèles dont au moins 3 enzymes sont impliquées : la Δ 6-désaturase (ou fatty acid desaturase 2, FADS2), les élongases-5 et 2 (ELOVL5 et ELOVL2) ainsi que la Δ 5-désaturase (ou fatty acid desaturase 1, FADS1) [243].

Concernant la famille des AGPI n-6, l'acide linoléique (LA, C18 :2 n-6) est converti en acide γ -linoléique (GLA, C18 :3 n-6) par l'ajout d'une double liaison sous l'action de la Δ 6-désaturase puis l'ajout de 2 carbones par l'élongase-5 permet d'obtenir l'acide dihomo- γ -linoléique (DGLA, C20:3n-6). Le DGLA est ensuite converti en acide arachidonique (AA, C20:4 n-6) par la Δ 5-désaturase (figure 16).

Dans la famille des AGPI n-3, l'acide α -linoléique (ALA, C18:3 n-3) peut être converti par la Δ 6-désaturase en acide stéaridonique (SDA, C18:4 n-3) grâce à l'ajout d'une double liaison. L'élongation de SDA par l'élongase-5 permet d'obtenir l'acide eicosatétraénoïque (C20:4 n-3) auquel est ajoutée une double liaison par la Δ 5-désaturase conduisant à la synthèse de l'acide eicosapentaénoïque (EPA, C20:5 n-3). L'EPA peut subir l'action de l'élongase-5 suivie de l'élongase-2 puis de la Δ 6-désaturase pour former successivement l'acide docosapentaénoïque (DPA, C22:5 n-3), l'acide tetracosapentaénoïque (C24:5 n-3) et l'acide tetracosahexaénoïque (C24:6 n-3). Ce dernier peut entrer dans la voie de β -oxydation peroxisomale pour raccourcir la chaîne de 2 carbones et ainsi obtenir l'acide docosahexaénoïque (DHA, 22 :6 n-3) (figure 16).

Les désaturases étant communes aux deux familles, les acides gras oméga-3 et 6 entrent en compétition pour les enzymes du métabolisme des AGPI. En effet, un afflux de substrat oméga-6 compromet la génération d'EPA et de DHA à partir de leur précurseur ALA et inversement. De plus, il n'y a pas de transformation métabolique de l'une à l'autre des deux familles n-6 et n-3.

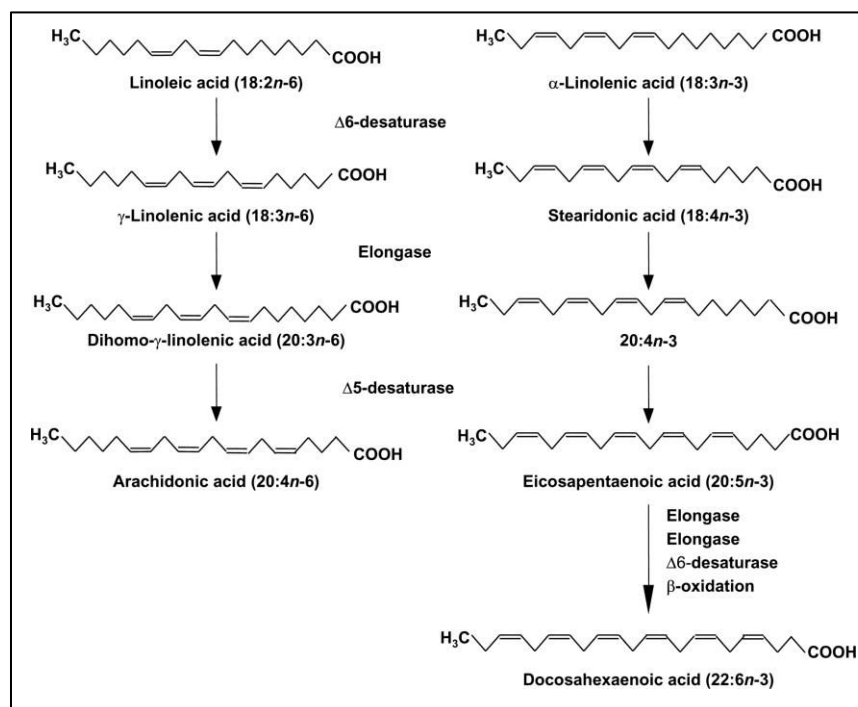


Figure 16: Structure et métabolisme des acides gras n-6 et n-3 [244]

La majorité de l'acide α -linoléique (ALA) est utilisée comme substrat pour la β -oxydation afin de fournir de l'énergie à la cellule et, dans une plus faible proportion (5%), utilisée pour la synthèse de l'EPA et du DHA. Le DHA peut également être rétroconverti en EPA

par une réaction de β -oxydation peroxysomale. Contrairement au DHA, AA est synthétisé efficacement chez l'Homme par conversion de son précurseur, l'acide linoléique, dès lors que l'alimentation apporte une quantité suffisante de ce dernier [222].

2. Catabolisme des acides gras:

Les acides gras sont une importante source énergétique aussi bien chez les animaux que chez les végétaux. Les cellules peuvent en accumuler de très grandes quantités sous forme de triglycérides. Ces triglycérides sont essentiellement stockés dans le cytoplasme des cellules adipeuses et sont véhiculés par le sang vers les sites d'utilisation.

Pour que les lipides puissent être utilisés comme source d'énergie, les triglycérides doivent être soumis à une hydrolyse enzymatique par les lipases pour libérer les acides gras qui vont être dégradés par β -oxydation en aérobiose pour donner des acétyl-CoA qui seront des substrats pour différentes voies métaboliques.

a) Hydrolyse des triglycérides :

L'utilisation des triglycérides comme source d'énergie débute par une hydrolyse sous l'action des lipases qui vont libérer le glycérol et les acides gras. Dans un premier temps, la triglycéride lipase, libère un 2-monoacylglycérol et 2 acides gras. Elle est régulée par des hormones comme l'adrénaline, la noradrénaline et le glucagon. Dans un deuxième temps, l'hydrolyse par la monoacylglycérol lipase (MAGL) se fait de manière intracellulaire et indépendamment des hormones pour libérer le dernier acide gras et le glycérol.

Ces triglycérides peuvent être une source d'AG pour les cellules cancéreuses. Or, l'expression et l'activité de la MAGL sont augmentées dans plusieurs lignées de cellules cancéreuses et tumeurs ce qui leur permet d'obtenir une grande quantité d'acides gras libres nécessaire à leur prolifération accrue [245]. L'inhibition de l'expression et de l'activité de MAGL par des siARN ou un inhibiteur pharmacologique (JZL184) diminue le taux d'acides gras libres et réduit la prolifération de cellules du cancer colorectal [246].

b) β -oxydation des acides gras :

Pour être oxydés, les acides gras doivent être transférés sur le coenzyme-A par l'acyl-CoA synthétase puis transportés dans la mitochondrie pour subir la β -oxydation. Les acides gras à courte chaîne peuvent être transportés directement dans la matrice mitochondriale alors que les acides gras à longue chaîne (nombre de carbones supérieur à 12) doivent être transportés par la navette acyl-carnitine à travers la membrane mitochondriale interne.

Une fois entrée dans la mitochondrie, les acides gras vont subir la β -oxydation faisant intervenir une succession d'enzymes : une acyl-CoA déshydrogénase, une énoyl-CoA hydratase, la 3-hydroxyacyl-CoA et enfin la β -cétotliase qui entraîne la libération d'acétyl-CoA issu de l'AG oxydé. A la fin de chaque tour, il y a libération de 1 acétyl-CoA, de 1 FADH₂ et de 1 NADH,H⁺ à l'intérieur de la matrice (figure 17).

Pour les acides gras insaturés et polyinsaturés, la présence d'une ou plusieurs doubles liaisons mal positionnées peuvent empêcher l'action de l'acyl-CoA déshydrogénase et l'action d'isomérases pour convertir les doubles liaisons sont donc nécessaires pour l'oxydation complète de ces acides gras [247].

Pour les acides gras à très longue chaîne (à 22 atomes de carbone et plus), l'oxydation débute dans les peroxysomes avant d'être entièrement dégradés par β -oxydation dans les mitochondries. Les différences entre l'oxydation peroxysomale et mitochondriale sont que la première étape est réalisée par une acyl-CoA oxydase au lieu de l'acyl-CoA déshydrogénase et l'importation à travers la membrane du peroxysome s'opère à l'aide d'une protéine ABCD1 de la famille des transporteurs ABC au lieu de la navette carnitine [248].

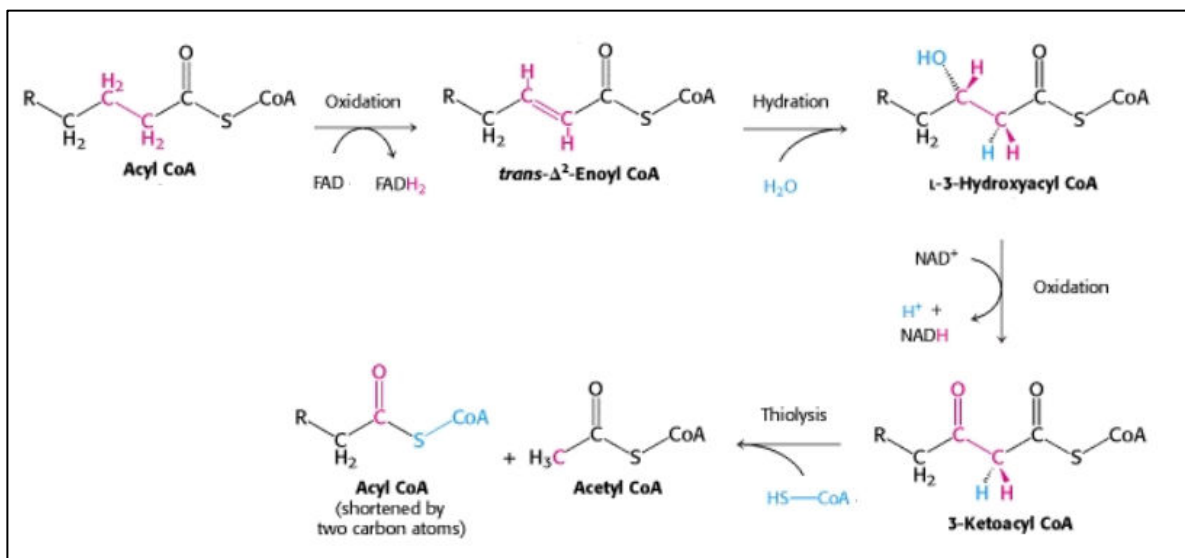


Figure 17: Dégradation des acides gras par β -oxydation mitochondriale.

c) Devenir des produits formés par la β -oxydation des lipides :

Le glycérol issu de l'hydrolyse des triglycérides peut être réutilisé comme précurseur de la synthèse des lipides ou du glucose (néoglucogénèse) ou suivre la voie de la glycolyse.

Les acétyl-CoA issus de la β -oxydation des acides gras sont utilisés comme substrat dans le cycle de Krebs et dans la synthèse des acides gras, cholestérol et des corps cétoniques via la cétogenèse. Ils peuvent aussi être oxydés en glyoxylate pour devenir des précurseurs de la synthèse du glucose.

Les coenzyme FADH₂ et NADH,H⁺ libérés lors de la β -oxydation alimentent la chaîne respiratoire mitochondriale pour la production de l'énergie cellulaire : l'ATP.

Il existe un certain nombre d'études qui montrent un lien entre la β -oxydation et le cancer. En effet, l'oxydation des acides gras est une voie prédominante pour la production d'énergie des cellules cancéreuses de la prostate [249] et une augmentation de la β -oxydation mitochondriale des acides gras (par un régime riche en graisse) est liée à la promotion de la tumeur dans le cancer du pancréas [250]. A l'inverse, l'inhibition de la β -oxydation par des inhibiteurs pharmacologique (etomoxir et ranolazine) induit l'apoptose des cellules leucémiques [251]. Les cellules cancéreuses qui expriment constitutivement CPT-1 ont une augmentation de l'oxydation des AG, de la production d'ATP et sont résistantes à un manque de glucose ou d'oxygène. L'inhibition de CPT-1 par siARN réduit la croissance tumorale de xénogreffes de cellules cancéreuses mammaires, prostatiques et coliques [252]. Par conséquent, ces travaux suggèrent que la β -oxydation est une voie de régulation importante de la carcinogenèse et est une cible potentielle pour le traitement des cancers.

3. Les dérivés des AGPI n-6 et n-3 : eicosanoïdes et docosanoïdes

L'acide arachidonique (AA) pour la famille n-6 et l'acide eicosapentaénoïque (EPA) pour la famille n-3 sont les précurseurs de médiateurs lipidiques oxygénés appelés les eicosanoïdes. Il existe trois voies principales de biosynthèse des eicosanoïdes : la voie des cyclooxygénases (COX) générant les prostanoïdes (prostaglandines PG et thromboxanes TX) et la voie des lipoxygénases (LOX) conduisant à la synthèse des leucotriènes (TL). Les prostanoïdes de série 2 et 3 dérivent respectivement de l'AA et de l'EPA et sont synthétisés de manière ubiquitaire. Les leucotriènes de la série 4 et 5 dérivent respectivement de l'AA et de l'EPA et sont synthétisés dans les cellules participant à la mise en place des processus inflammatoires (figure 18).

L'EPA et le DHA sont également les précurseurs de molécules appelées résolvines produites par la COX et de la LOX. Les résolvines de la série E et D dérivent respectivement de l'EPA et du DHA. Le DHA peut également être le précurseur d'une

autre famille de molécules appelées protectines et marésine. Les dérivés oxygénés formés à partir du DHA sont regroupés sous le terme de docosanoïdes (figure 18).

L'entrée de l'AA, EPA et DHA dans les voies enzymatiques nécessite au préalable leur libération de la position sn-2 des phospholipides membranaires par l'action de la phospholipase A2 (PLA2) hautement spécifique de la position sn-2.

Les eicosanoïdes et docosanoïdes modulent de nombreuses fonctions cellulaires avec des effets opposés ou complémentaires selon la famille (n-3 ou n-6). Ils régulent l'activité du système immunitaire, l'agrégation plaquettaire et l'inflammation [253-255].

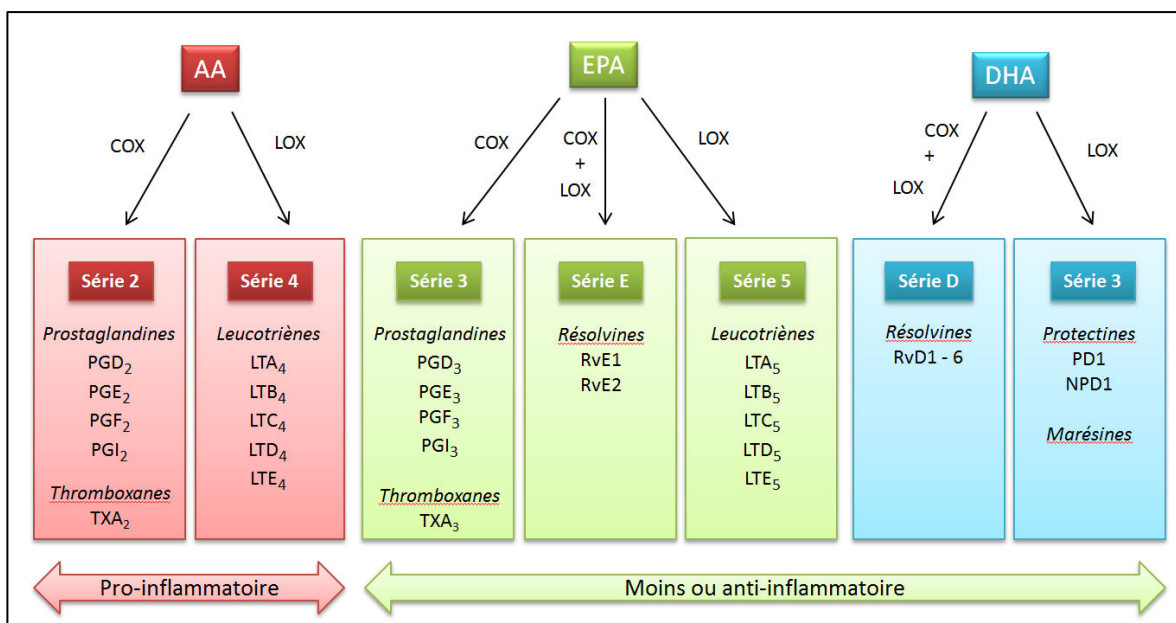


Figure 18: Les dérivés eicosanoïdes et docosanoïdes des AGPI n-6 (AA) et n-3 (EPA et DHA).

a) Dérivés des AGPI n-6

Il existe deux isoformes de cyclo-oxygénases : COX-1 et 2. Ces enzymes catalysent la transformation de l'acide arachidonique en prostaglandine G₂, et une activité de peroxydation conduisant à la formation de la prostaglandine H₂. Cette dernière peut être convertie en différents eicosanoïdes de série 2, telles que la prostaglandine E₂ (PGE₂) et thromboxane A₂ (TXA₂), sous l'action de la prostaglandine synthase et la thromboxane synthase.

Il existe quatre isoformes de lipoxygénases : 5, 8, 12 et 15-LOX qui se différencient par la position d'insertion de l'oxygène sur l'acide arachidonique. Par exemple, la 5-LOX

catalyse la transformation de l'acide arachidonique en 5-HPETE (acide 5-hydroxyperoxyeicosatétraénoïque) qui est le précurseur des leucotriènes de série 4.

Les eicosanoïdes formés à partir de l'AA sont principalement pro-inflammatoires et dans un contexte d'inflammation chronique, ils vont favoriser la progression tumorale [256].

PGE2 régule la production de cytokines (TNF α , IL-6), la différenciation et l'activité des cellules immunitaires. Elle supprime les fonctions cytolytiques des cellules NK et la production d'IFN γ responsable de la réponse anti-tumorale des Th1 et des T CD8+ cytotoxiques. A l'inverse, elle favorise la différenciation des T CD4+ en Th17 et Th2 à activité pro-tumorale [48]. PGE2 augmente également la production de VEGF favorisant la vascularisation intra-tumorale. PGE2 agit également au niveau des cellules cancéreuses en activant les voies Wnt/ β -caténine, PI3K/Akt et RAS/MAPK impliquées dans l'expression de gènes anti-apoptotiques (Bcl-2) et pro-prolifératifs (c-myc, cycline D1) [46].

TXA2 est synthétisé principalement par les plaquettes mais aussi dans d'autres cellules comme les macrophages. TXA2 augmente la production de VEGF pro-angiogénique et induit le recrutement de macrophages par stimulation de la sécrétion de la chimiokine MCP-1 dans le cas du cancer des poumons [257]. Le taux de TXA2 est élevé dans les tumeurs coliques par rapport au tissu sain, et l'inhibition de la thromboxane synthase réduit la prolifération des cellules cancéreuses coliques [258].

Le leucotriène LTB4 est produit dans les leucocytes en réponse à des médiateurs inflammatoires et son taux est augmenté dans le cancer du côlon. Il induit le chimiotactisme des neutrophiles, macrophages, cellules dendritiques et lymphocytes T au site de l'inflammation et stimule également la production de cytokines pro-inflammatoires augmentant et favorisant une inflammation chronique [256].

b) Dérivés des AGPI n-3

L'EPA peut être métabolisé par la COX en eicosanoïdes de série 3. En effet, il est métabolisé en PGG3 puis en PGH3 avant d'être converti en différents composés tels que PGE3 et TXA3. Les lipoxygénases vont être responsables de la synthèse des leucotriènes de série 5 (LTB5) et enfin l'association de COX-2 et 5-LOX va permettre la synthèse de résolvines de série E (RvE1 et RvE2) à partir de l'EPA et de série D (RvD1-6) à partir du DHA.

Le DHA sous l'action séquentielle de la 15-LOX et la 5-LOX donne lieu à la synthèse de protectines telle que la protectine D1. Lorsque la synthèse a lieu dans les tissus nerveux, on

parle de neuroprotectines, telle que la neuroprotectine D1. Une nouvelle voie de biosynthèse de médiateurs issus du DHA a été mise en évidence dans les macrophages et dont le produit principale est la marésine 1 (MaR1) pour « macrophage mediator in resolving inflammation » [259].

Les métabolites formés à partir de l'EPA et du DHA sont pour la plupart moins inflammatoires voire anti-inflammatoires comparés aux métabolites issus de l'AA [256]. Des études ont démontré que PGE3 pouvait inhiber la production d'IL-1 β et de TNF α par les monocytes [260]. LTB5 possède les mêmes fonctions que LTB4 mais est considérablement moins active (30 fois moins) [261]. Les protectines et les résolvines ont des effets anti-inflammatoires : par exemple, RvE1 inhibe la voie NF- κ B impliquée dans l'expression de cytokines pro-inflammatoires, RvD1 et PD1 réduisent l'infiltration de leucocytes [262]. MaR1 possède également une activité anti-inflammatoire et des propriétés protectrices similaires à celles de la RvE1 et de la PD1. Par exemple, il stimule la phagocytose par les macrophages [259].

L'effet anti-inflammatoire des AGPI n-3 passe non seulement par leur transformation en dérivés eicosanoïdes et docosanoïdes anti-inflammatoires mais également par leur capacité à réduire l'expression et l'activité de la COX et ainsi réduire la production des dérivés pro-inflammatoires issus de l'AA. En effet, L'acide arachidonique étant l'acide gras majoritaire des phospholipides membranaires, l'enrichissement des membranes en AGPI n-3 permet également de diminuer cette composition en acide arachidonique réduisant ainsi la quantité de substrats disponibles pour la COX [263]. De plus, les AGPI n-3 inhibent les phospholipases membranaires et entrent en compétition avec les AGPI n-6 pour les désaturases et les élongases ce qui diminue la synthèse et la biodisponibilité de l'AA [264].

D. Effet anti-tumoral des acides gras polyinsaturés n-3 :

Les causes du cancer colorectal sont d'ordre génétique et environnemental avec un rôle prépondérant des habitudes alimentaires. Ainsi des études épidémiologiques ont montré qu'une alimentation riche en acides gras oméga-3 (DHA et EPA) diminue le risque de CCR [220, 265, 266] et plus particulièrement des CCR de type MSI-H [267], indiquant que le rôle potentiel des oméga-3 dans la protection contre le CCR peut passer par le système de réparation de l'ADN. De plus, l'EPA et le DHA inhibent la prolifération des cellules épithéliales pré-néoplastiques pouvant évoluer en adénocarcinome chez des patients avec

des adénomes colorectaux sporadiques [268]. Une autre étude montre qu'une supplémentation en EPA sous sa forme libre (2g/jour pendant 6 mois) réduit la taille et le nombre d'adénomes colorectaux chez des patients atteints de FAP [226]. Une étude clinique de phase II révèle que le DHA en traitement adjuvant améliore l'efficacité d'une chimiothérapie à base d'anthracycline chez des patientes atteintes du cancer du sein métastasé [269]. Une autre étude a démontré une amélioration de la tolérance à la radiothérapie pour le cancer de l'œsophage chez les patients prenant des suppléments d'AGPI n-3 [270]. Une étude clinique de phase II a été effectuée avec des patients supplémentés ou non avec de l'EPA (2g/jour) avant de subir une résection hépatique suite à la formation de métastases lors d'un cancer colorectal. On observe une incorporation de l'EPA dans le tissu métastasé avec une réduction de sa vascularisation et une augmentation de la durée de vie des patients [271]. D'autres études sont en cours afin d'étudier l'effet d'une supplémentation en DHA en co-traitement avec une chimiothérapie à base de paclitaxel chez des patients atteints de cancer de la prostate, du pancréas et colorectal [17]. L'action préventive et curative des oméga-3 est donc établie à partir d'études d'intervention mais également à partir de modèles expérimentaux pré-cliniques [17]. De nombreuses études *in vivo* démontrent un effet anti-tumoral des AGPI n-3 (EPA et DHA) dans des modèles murins de carcinogenèse chimioinduite (AOM + DSS), des modèles transgéniques (modèle APC « min ») ou de transplantation de cellules cancéreuses. Par exemple, les souris immunodéficientes (Nude) avec transplantations de cellules cancéreuses coliques humaines HT-29 ou HCT-116 soumises à un régime enrichi en EPA et DHA, voient leur croissance tumorale diminuée en association avec un enrichissement des tumeurs en EPA et DHA au détriment de l'AA [272, 273].

Dans cette partie, nous allons aborder les mécanismes d'action anti-tumorale des AGPI n-3 touchant aussi bien sur les cellules cancéreuses et le microenvironnement tumoral.

1. Effet des AGPI n-3 sur les cellules cancéreuses

a) Détection des AGPI n-3

Les lipides peuvent exercer leurs effets en se liant à des récepteurs spécifiques : GPR (G-Protein coupled Receptor), ou encore à des protéines de transports comme FAT/CD36 (Fatty Acid Translocase) et FABP (Fatty Acid Binding Protein).

Il existe différents types de GPR ayant des spécificités d'expression tissulaire et de substrats.

GPR120 est spécifiquement activé par des acides gras à longue chaîne (AGLC), en particulier par les AGPI n-3 : ALA, EPA et DHA. GPR120 est exprimé par les adipocytes, les macrophages ou encore les cellules endocrines intestinales. Les AGPI n-3 peuvent exercer leur effet anti-inflammatoire, notamment au niveau des macrophages, en inhibant la protéine TAK1 impliqué dans l'activation des voies de signalisation NF- κ B et JNK. Rappelons que ces voies sont activées par TNF α et sont impliquées dans la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires. L'activation de GPR120 induit le recrutement de la β -arrestine 2 qui recrute à son tour la protéine TAB1 indispensable à l'activité de TAK1. L'association de la β -arrestine 2 avec TAB1 bloque sa capacité à se lier à TAK1 et par conséquent inhibe l'activité de TAK1 [274]. L'effet anti-inflammatoire des AGPI n-3 à travers l'activation de GPR120 devrait être accompagné d'un effet anti-tumoral. De plus, une étude a montré que GPR120 est surexprimé dans les tumeurs coliques et des lignées de cellules cancéreuses coliques (HCT-116, SW480). De façon surprenante, l'activation de GPR120 par un agoniste synthétique (GW9508) augmente la croissance tumorale et l'angiogenèse en induisant l'expression de VEGF, IL-8 et PGE2 [275]. Très récemment, une autre étude montre que les AGPI n-3 inhibent dans les mêmes proportions la croissance tumorale de cellules cancéreuses mammaires (Py230) transplantées chez des souris sauvages mais également chez des souris KO pour GPR120. Donc les AGPI n-3 exercent un effet anti-tumoral sur des cellules cancéreuses mammaires indépendamment de GPR120 [276]

CD36 est une protéine membranaire se liant avec une forte affinité aux AGLC. Elle possède une fonction de transporteur ou de récepteur en fonction du type cellulaire. L'expression de CD36 semble modulée dans le cancer et cette protéine pourrait jouer un rôle dans la progression tumorale. En effet, une faible expression de CD36 est corrélée à une forte capacité de migration des cellules cancéreuses dans le cancer du côlon, de l'ovaire et du sein [277]. Bien qu'il fonctionne comme un transporteur d'AG, CD36 est également impliqué dans l'adhérence au collagène, donc un faible taux de CD36 réduit l'adhésion cellulaire et favorise la formation de métastases [278]. De plus, CD36 activé par la thrombosporine-2 induit l'apoptose des cellules endothéliales *in vitro* et inhibe l'angiogenèse de tumeurs mammaires *in vivo* [279].

FABP est un transporteur intracellulaire des AG et permet notamment leur migration dans le noyau et leur liaison à des récepteurs nucléaires PPARs, RXR et LXR [280]. Une

altération de l'expression de FABP est retrouvée dans plusieurs types de cancers suggérant que FABP joue un rôle dans la tumorigenèse. Il existe 12 isoformes de FABP ayant une spécificité d'expression tissulaire et de substrats. FABP5 est l'isoforme la mieux caractérisée dans la biologie du cancer, son expression est augmentée dans les cancers de la prostate [281], du foie [282], du pancréas [283] et du sein [284] et associé à une augmentation de la progression tumorale. Or, Zhang *et al.* ont montré qu'un régime enrichi en AGPI n-3 réduit l'expression de FABP5 dans des cellules cancéreuses mammaires *in vivo* comparé à un régime riche en AGPI n-6. Cependant, ils n'observent pas de différence significative de la croissance tumorale entre les deux régimes [285]. A l'inverse, FABP1 pourrait être un suppresseur de tumeur dans le CCR puisque son expression est inhibée au stade précoce de la tumorigenèse colorectale [286]. Une autre FABP, L-FABP (liver fatty acid-binding protein), est quant à elle associée à une progression du CCR. En effet, la délétion de L-FABP chez des souris transgéniques APC^{min} conduit à une diminution de l'expression des enzymes de la lipogenèse et une réduction du nombre d'adénomes comparé aux souris APC^{min} exprimants L-FABP [287].

b) Régulation du métabolisme des acides gras

Comme nous l'avons vu précédemment, la lipogenèse est un élément clé dans la prolifération de la cellule cancéreuse. En effet, les cellules en prolifération ont besoin d'une synthèse accrue d'acides gras pour satisfaire ses besoins et lui conférer un avantage prolifératif [229]. C'est pourquoi, dans de nombreux cancers, dont le CCR, on observe une augmentation de l'expression et de l'activité d'enzymes de la lipogenèse tels que ACC, FAS et SCD [236], permettant une augmentation de la synthèse *de novo* des AGS et AGMI.

AGPI n-3 inhibent un activateur de la lipogenèse : SREBP

Le facteur de transcription SREBP-1 (sterol regulatory element binding protein-1) est le principal régulateur transcriptionnel des enzymes de la lipogenèse : ACC, FAS et SCD1, via son élément de réponse SRE sur leur promoteur. Il existe trois isoformes de SREBP: SREBP-1a, SREBP-1c et SREBP-2. SREBP-1a et c sont impliquées dans la régulation des gènes de la biosynthèse des AG tandis que SREBP-2 serait plus particulièrement impliqué dans la synthèse de cholestérol. SREBP-1 est d'abord synthétisé sous la forme d'un précurseur inactif et associé à la membrane du réticulum endoplasmique. Après avoir rejoint la membrane de l'appareil de Golgi, sa maturation et son activation nécessitent un

clivage protéolytique qui le libère de la membrane pour être transloqué dans le noyau [288]. Il a été montré que les tumeurs humaines de la prostate et du côlon présentent un taux élevé de SREBP-1 associée à l'agressivité de la tumeur [289]. De plus, le traitement de cellules cancéreuses coliques HCT116 avec un inhibiteur pharmacologique de FAS (Cerulenin) déclenche une augmentation de l'expression et de la maturation de SREBP-1 ainsi qu'une induction de l'expression de la FAS [290]. Ces résultats démontrent que les cellules tumorales détectent et répondent à un déficit en synthèse *de novo* d'AG par une augmentation de l'expression de SREBP et FAS pour continuer à proliférer. Ainsi, l'inhibition de SREBP dans des glioblastomes bloque la synthèse des AG et diminue la prolifération cellulaire [232]. Or, les AGPI n-3 induisent la dégradation de l'ARNm de SREBP-1c et inhibent sa maturation entraînant une diminution de l'expression des enzymes de la lipogénèse [291]. De plus, une étude a montré que le DHA active l'AMPK qui inhibe SREBP-1c par phosphorylation de la Sérine 365 [292]. Par conséquent, les AGPI n-3 pourraient altérer le métabolisme lipidique des cellules tumorales et réduire leur prolifération en inhibant SREBP. En effet, l'expression de FAS et ACC est diminuée dans des cellules cancéreuses hépatiques transplantées chez des rats soumis à un régime enrichi en ALA. Cette inhibition est associée à une réduction de l'expression de SREBP et aboutit à une réduction de la croissance tumorale [293]. Le même phénomène est observé chez des cellules cancéreuses coliques traitées avec du DHA [294]. L'expression d'une autre enzyme de la lipogénèse, SCD-1, est également diminuée chez des cellules cancéreuses hépatiques traitées avec EPA [295].

AGPI n-3 activent un senseur énergétique : AMPK

L'AMPK est un senseur énergétique, sensible au taux d'ATP intracellulaire, et dont le rôle est de rétablir l'équilibre énergétique de la cellule en reprogrammant son métabolisme afin de maintenir une concentration constante en ATP. Pour augmenter le taux d'ATP, lors d'une pénurie en nutriment, l'AMPK stimule les voies cataboliques générant de l'ATP telles que l'oxydation des acides gras et inhibe les voies anaboliques consommant de l'ATP telles que la synthèse d'acide gras [296]. Ainsi, parmi les protéines inhibées par l'AMPK se trouvent ACC et FAS. En effet, l'AMPK inhibe l'expression de SREBP-1 par phosphorylation sur la sérine 365 [292]. SREBP-1 étant un activateur transcriptionnel des enzymes de la lipogénèse, l'AMPK inhibe ainsi l'expression de ACC et FAS [297]. L'AMPK est également capable d'inhiber ACC par phosphorylation, indépendamment de

la régulation par SREBP [298]. ACC est une enzyme qui catalyse la transformation de l'acétyl-CoA en malonyl-CoA (première réaction de la biosynthèse des acides gras). Le malonyl-CoA étant un inhibiteur allostérique du transporteur des acides gras vers la mitochondrie : la carnitine-palmitoyl transférase-1 (CPT-1), l'inhibition de l'ACC par l'AMPK réduit le taux de malonyl-CoA augmentant ainsi le transport des acides gras dans la mitochondrie et donc leur oxydation [299]. Cependant, une étude montre que l'augmentation du taux de malonyl-CoA a un effet cytotoxique chez des cellules cancéreuses mammaires. Dans cette étude, l'augmentation du taux de malonyl-CoA est obtenue par inhibition (siARN ou inhibiteur MPA) de la malonyl-CoA décarboxylase (MCD) impliquée dans la conversion du malonyl-CoA en acétyl-CoA [300].

Dans la plupart des cellules cancéreuses, on observe une inhibition de l'AMPK, aboutissant à une forte synthèse d'AG *de novo* nécessaire à leur prolifération [301]. Le traitement de cellules cancéreuses de la prostate avec un activateur de l'AMPK (AICAR), réduit l'expression d'ACC et FAS avec une augmentation de la β -oxydation des AG et une inhibition de la prolifération cellulaire [302]. Des cellules cancéreuses mammaires (MCF-7) traitées en DHA ont une augmentation de l'activité du suppresseur de tumeur LKB1 qui active la protéine kinase AMPK (AMP-activated protein kinase) par phosphorylation sur la Thréonine 172 aboutissant à une diminution de la capacité de migration de ces cellules [303]. Par conséquent, l'activation de l'AMPK pourrait en partie expliquer les effets métaboliques du DHA sur les cellules cancéreuses.

En conclusion, le DHA entraîne une reprogrammation du métabolisme de la cellule cancéreuse en inhibant la synthèse d'acide gras privant la cellule d'une ressource énergétique et structurale.

c) Régulation de la prolifération cellulaire

Lorsqu'on analyse le profil d'expression de gènes pour les lignées Caco-2 et LT97 grâce à une puce à ADN, on voit que le DHA régule de nombreux gènes impliqués dans la tumorigenèse. Par exemple, le DHA augmente l'expression d'inhibiteurs du cycle cellulaire (p21, p27) ou au contraire inhibe des activateurs du cycle cellulaire (cyclines). On observe également une augmentation de l'expression de protéines pro-apoptotiques (caspases, Bax, Bid) et au contraire l'inhibition de protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, XIAP, cIAP) [304, 305]. Par conséquent, le DHA peut réguler de nombreuses voies de

signalisation et facteurs de transcription afin de moduler l'expression de gènes impliqués dans le cycle et la mort cellulaire.

Régulation de voies de signalisation

Comme nous l'avons vu dans le premier chapitre, plusieurs voies de signalisation sont altérées dans les cellules cancéreuses coliques.

Parmi ces voies, la voie de signalisation RAS/RAF/MAPK induite par EGF après fixation sur son récepteur est anormalement activée dans les cas de CCR et est impliquée dans l'expression de gènes pro-prolifératifs. La voie de signalisation RAS/RAF/MAPK est inhibée par un traitement en DHA conduisant à une diminution de la prolifération de cellules cancéreuses coliques [306]. En effet, le DHA incorporé dans les radeaux lipidiques de la membrane plasmique régule négativement l'activité du récepteur à EGF aboutissant à une diminution de l'association de RAS avec Sos1 et l'inhibition de la signalisation ERK [307]. Le DHA inhibe également l'expression du gène codant pour l'EGF en régulant négativement l'activité du facteur de transcription AP-1 et prive la cellule d'une source autocrine de facteur de croissance [308]. Enfin, le DHA est capable d'inhiber l'expression de RAS dans un modèle de carcinogenèse colique chimioinduite [309].

Il a été décrit que le DHA induit également la mort par apoptose de cellules cancéreuses coliques en inhibant la voie PI3K/Akt pro-tumorale et en activant le suppresseur de tumeur p53. En effet, la mort par apoptose des cellules Caco-2 suite à un traitement en DHA est associée à une réduction de la phosphorylation d'Akt et une augmentation de la phosphorylation activatrice de p53 [310]. De plus, un inhibiteur de cette voie (PTEN) voit sa phosphorylation diminuée en présence de DHA traduisant son activation [311]. Par ailleurs, une diminution de l'expression et de la phosphorylation de l'AMPK est observée dans les cellules cancéreuses où la voie PI3K/Akt est activée et PTEN inactivé [97]. Or, l'AMPK active le suppresseur de tumeur p53 par phosphorylation sur la Serine 15. Une étude a montré que l'activation d'AMPK par AICAR augmente la sensibilité des cellules cancéreuses coliques HCT-116 à l'effet cytotoxique de TRAIL et TNF α . Ce phénomène n'est pas observé dans les cellules HCT-116 p53 -/- indiquant que p53 est nécessaire à cette sensibilisation par l'AMPK [110]. Une autre étude montre que la metformine potentialise l'effet d'un agent chimiothérapeutique : le paclitaxel qui induit un stress génotoxique et

l'activité p53 [312]. Par conséquent, le DHA pourrait augmenter la phosphorylation de p53 en activant l'AMPK.

Régulation de facteurs de transcription

Les AGPI et leurs dérivés, régulent l'expression d'un grand nombre de gènes par l'intermédiaire de multiples facteurs de transcription dont les récepteurs aux proliférateurs des peroxysomes appelés « peroxisome proliferator-activated receptors » ou PPAR [313]. D'autres facteurs de transcription régulés par les acides gras et leurs dérivés ont également été identifiés, parmi lesquels RXR (retinoid X receptor), SREBP-1 (sterol regulatory element-binding protein 1), et LXR (liver X receptor) [314] ou encore NF- κ B et la β -caténine. Les AGPI peuvent réguler ces facteurs de transcription par interaction directe (PPAR, RXR, HNF4, LXR) ou de façon indirecte (SREBP-1, NF- κ B, β -caténine).

Facteurs de transcription dont l'activité est dépendante d'AGPI n-3 : PPARs

Les récepteurs nucléaires activés par les proliférateurs des peroxysomes (PPAR) sont des facteurs de transcription activés par interaction avec un ligand dont les AGPI et plus particulièrement l'acide gras docosahexaénoïque (DHA). Il existe trois isoformes de PPAR : PPAR α , PPAR β/δ et PPAR γ [315], ayant des spécificités d'action et d'expression tissulaire. PPAR α est exprimé principalement dans le foie, les reins, le cœur, les muscles et le tissu adipeux brun où il est responsable de l'induction des gènes de la lipolyse. PPAR β/δ est ubiquitairement exprimé et régule l'expression des gènes impliqués dans la β -oxydation. Tandis que PPAR γ est principalement exprimé par les cellules du tissu adipeux blanc où il est impliqué dans la différenciation adipocytaire et régule les gènes impliqués dans le stockage des lipides. Après fixation d'un ligand, les PPARs peuvent former des hétérodimères avec RXR et LXR. La dimérisation avec RXR induit la liaison de PPAR à son élément de réponse (PPRE) sur le promoteur du gène cible impliqué notamment dans le métabolisme, l'adipogenèse et l'inflammation [316]. Tandis que la liaison avec LXR bloque l'hétérodimérisation de PPAR avec RXR et empêche la liaison au PPRE [317]. Le DHA peut également interagir directement avec RXR pour réguler l'expression de gènes de la différenciation adipocytaire [318].

Les PPARs sont également impliqués dans la prolifération des cellules cancéreuses avec des effets différents selon l'isoforme [319]. PPAR α et PPAR γ possèdent des propriétés anti-tumorales. En effet, leur activation par des ligands (troglitazone et bezafibrate) inhibe

l'inflammation et la carcinogénèse colorectale chimioinduite chez des rats [320]. De plus, la pioglitazone (agoniste PPAR γ) et le bezafibrate diminue le nombre de polypes intestinaux chez des souris APC^{min} [321]. Par ailleurs, le ciglitazone (agoniste PPAR γ) entraîne une inhibition de l'expression de COX-2 associée à une augmentation de l'apoptose de cellules cancéreuses coliques HT-29 [322]. Ces résultats démontrent que l'activation de PPAR α et γ dans le CCR permet de stopper la prolifération et/ou de faire entrer les cellules cancéreuses en apoptose. A l'inverse de PPAR α et γ , l'expression de PPAR β/δ est plus élevée dans les tumeurs coliques comparées aux tissus sains et est associé à un mauvais pronostic chez les patients atteints de CCR [323] suggérant un rôle pro-tumorale de PPAR β/δ . Ainsi, la délétion de PPAR β/δ chez des souris APC^{min} diminue le nombre et la taille des polypes colorectaux comparés aux souris APC^{min} exprimant PPAR δ [324, 325].

Les AGPI n-3 étant des ligands des PPARs, ils peuvent moduler leurs activités transcriptionnelles permettant d'inhiber la prolifération cellulaire et d'entraîner l'apoptose des cellules cancéreuses [326-328]. Par exemple, l'EPA augmente l'activité transcriptionnelle de PPAR γ et l'antagoniste de PPAR γ (GW9662) prévient l'effet anti-prolifératif de l'EPA sur des cellules cancéreuses coliques HT-29 [329]. De plus, le DHA active PPAR γ et inhibe PPAR β/δ conduisant à une réduction de la prolifération de cellules de cancer du sein [330, 331].

Facteurs de transcription dont l'activation est régulée par AGPI n-3 : NF- κ B et β -caténine.

Le facteur de transcription NF- κ B est impliqué dans la réponse immunitaire et inflammatoire. Il joue également un rôle clé dans le développement du CCR lié à l'inflammation, notamment en induisant l'expression de gènes pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α) et anti-apoptotiques (Bcl-2, c-FLIP, cIAPs) [129, 132, 133]. Ainsi, la délétion d'une protéine activant la translocation nucléaire de NF- κ B, IKK β , réduit la formation de tumeur colique chez des souris avec un CCR chimioinduit [132]. De plus, l'effet anti-inflammatoire du DHA se traduit par une inhibition de NF- κ B et induit l'apoptose de cellules cancéreuses coliques [332]. Le DHA a été montré comme inhibant NF- κ B de manière dépendante et indépendante de PPAR γ . En effet, une inhibition de PPAR γ avec un antagoniste (GW9662) abolit l'inactivation de NF- κ B par le DHA [333]. PPAR γ est capable d'interagir avec NF- κ B pour prévenir sa translocation nucléaire ou induire sa dégradation par le protéasome. Par exemple, le traitement de cellules cancéreuses

coliques HT-29 avec un ligand de PPAR γ (ciglitazone), augmente son interaction avec NF- κ B, inhibe l'activité transcriptionnelle de NF- κ B et augmente l'apoptose des cellules cancéreuses [334]. Par ailleurs, l'interaction de PPAR γ avec NF- κ B peut aboutir à son ubiquitination et à sa dégradation par le protéasome grâce à son activité E3 ubiquitine ligase. En effet, des ligands de PPAR γ (troglitazone et pioglitazone) induisent l'ubiquitination et la dégradation de NF- κ B conduisant à une diminution d'expression de COX-2 et IL-1 β associée à une réduction de la croissance tumorale de xénogreffes HT-29 chez des souris Nude [335]. Le DHA peut également réguler NF- κ B en augmentant la phosphorylation et la dégradation d'I κ B entraînant une réduction de la translocation nucléaire de NF- κ B [336].

Le facteur de transcription β -caténine est également impliqué dans la cancérogenèse. En effet, comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, la voie de signalisation Wnt impliquant la stabilisation de la β -caténine est anormalement active dans le cancer colorectal. Or, un régime enrichi en huile de poisson (EPA et DHA) réduit la carcinogénèse colique chimioinduite (AOM) en inhibant la voie Wnt/ β -caténine. D'une part, on observe une inhibition de l'expression de Wnt chez des rats nourris avec un régime enrichi en huile de poisson [337]. D'autre part, le DHA induit la dégradation par le protéasome de la β -caténine chez les cellules cancéreuses SW480 et HCT-116 surexprimant cette protéine. En effet, l'inhibiteur du protéasome MG132 prévient la dégradation de la β -caténine par le DHA confirmant l'implication du protéasome. L'effet du DHA sur la β -caténine s'accompagne d'une diminution de sa translocation nucléaire et de l'expression d'une protéine anti-apoptotique appelée survivine. D'autres protéines régulées par la β -caténine telles qu'une métalloprotéinase MMP-7 (impliqué dans l'invasion) et VEGF (impliqué dans l'angiogénèse) ont une expression inhibée par le DHA [338].

Sensibilisation des cellules cancéreuses à l'apoptose :

Les AGPI n-3 sont capables de réguler de manière transcriptionnelle et post-traductionnelle les acteurs de l'apoptose tels que les récepteurs de morts et les protéines mitochondriales, augmentant ainsi la sensibilité des cellules cancéreuses à l'apoptose [332]. En effet, les AGPI n-3 régulent l'expression des acteurs de l'apoptose en modulant des facteurs de transcription comme NF- κ B. Les AGPI n-3 sont également capables de réguler leur activité suite à leur incorporation au niveau de la membrane plasmique et mitochondriale. En effet,

EPA et DHA étant des AG avec un grand nombre d'insaturations, leur incorporation à la membrane entraîne une augmentation de sa fluidité facilitant ainsi les changements de conformation nécessaire à l'activité de protéines membranaires. Ils peuvent également agir indirectement en induisant la ségrégation de domaines membranaires plus ordonnés, appelé « raft », enrichis en acides gras saturés, en phosphatidylcholine, en glycosphingolipides et en cholestérol auxquels sont associés des complexes protéiques actifs [339]. Au niveau de la membrane plasmique, le DHA peut alors favoriser l'activation des récepteurs de mort, mais peut également inhiber d'autres récepteurs comme le récepteur à EGF à effet mitogénique [307]. Au niveau mitochondrial, le DHA peut activer des protéines mitochondriales pro-apoptotiques (Bax, Bid, cytochrome c) et au contraire inhiber des protéines anti-apoptotiques (Bcl-2) [340].

Par ailleurs, une étude a montré que le DHA peut également induire l'expression d'un récepteur de mort (DR5) chez des cellules cancéreuses coliques en augmentant le stress du réticulum endoplasmique (RE) [341]. En effet, le DHA induit une production de ROS responsable de l'induction du stress du RE. Des voies de signalisation activées pendant le stress du RE vont induire l'activation d'un facteur de transcription CHOP régulant l'expression de gènes impliqués dans la mort cellulaire dont le récepteur à TRAIL (DR5). Dans cette étude, l'induction d'un stress du RE sensibilise les cellules cancéreuses coliques à TRAIL[341].

Une autre étude a démontré que le DHA augmente l'efficacité du sulindac sulfide, un agent anti-inflammatoire non-stéroïdien (NSAID) déclenchant la voie apoptotique extrinsèque par augmentation de l'expression du récepteur à TRAIL (DR5). On observe une diminution de la viabilité des cellules cancéreuses coliques HCT-116 et LoVo co-traitées en DHA et sulindac sulfide associée à une augmentation de PARPc et de l'activité caspase-8 indiquant une mort par apoptose. L'utilisation d'un inhibiteur de la caspase-8 et de siRNA DR5 abolit l'effet pro-apoptotique du co-traitement DHA et Sulindac sulfide [342]. Ces résultats sont appuyés par une étude *in vivo* montrant qu'un régime enrichi en oméga-3 augmente l'efficacité d'un autre AINS, celecoxib, chez des rats avec CCR induit chimiquement par injection du carcinogène AOM [343].

EPA et DHA augmentent également l'effet pro-cytotoxique de plusieurs agents chimiothérapeutiques dont le 5-FU, oxaliplatine et irinotecan sur les cellules cancéreuses coliques HT-29 (Bax+/+) mais pas pour les LS-174 (Bax -/-). Donc la potentialisation des

effets cytotoxiques des agents anti-cancéreux par AGPI n-3 pourrait être dépendante de la protéine mitochondriale Bax. L'effet pro-cytotoxique sur les HT-29 (Bax +/+) est confirmé par une forte dépolarisation de la membrane mitochondriale [344]. Une autre étude montre que le DHA potentialise l'effet pro-apoptotique du 5-FU dans des cellules cancéreuses coliques (HT-29, LS-174, Colo 205 et Colo 320) en diminuant l'expression des protéines pro-apoptotiques de la famille des Bcl-2 et BCL-xL [345]. Les AGPI n-3 EPA et DHA peuvent donc augmenter l'efficacité d'agents chimiothérapeutiques en activant la voie apoptotique intrinsèque mitochondriale. L'EPA et DHA augmentent également l'efficacité des radiothérapies sur les deux mêmes lignées HT-29 et LS174T qui est associée à une inhibition de NF- κ B, COX-2 et Bcl-2 [346] mais également pour d'autres lignées humaines d'adénocarcinomes colorectaux CO112 et Caco-2 [347].

Par conséquent, l'augmentation de la sensibilité des cellules cancéreuses à l'apoptose par le DHA, passe par la modulation des récepteurs de morts et des protéines mitochondriales, et permet d'accroître l'efficacité d'agents anti-cancéreux impliquant l'activation de l'apoptose.

2. Effet des AGPI n-3 sur le microenvironnement tumoral

Durant toutes les étapes de la transformation en cellule cancéreuse, le microenvironnement prend une part importante dans cette évolution.

a) Régulation de l'état inflammatoire

Comme nous l'avons vu dans le chapitre I, l'inflammation intestinale chronique fait partie des facteurs augmentant le risque de CCR.

Une étude analysant les taux sériques de cytokines pro-inflammatoires : IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, TNF α et IFN γ , a été menée suite à une supplémentation en AGPI n-3 (EPA/DHA à 4.8g/jr) chez des patients atteints d'un CCR sporadique. L'absorption des AG a été confirmée par une augmentation du niveau d'AGPI n-3 dans les triglycérides, cholestérols et phospholipides. Les taux sériques des cytokines diminuent à partir de 2 mois de supplémentation et atteignent un taux minimum à 6 mois avec une diminution de 61% pour IL-1 β , 63% pour IL-2, 69% pour IL-4, 83% pour IL-6, 73% pour TNF α et 67% pour IFN γ . Trois mois après l'arrêt de la supplémentation, les niveaux de cytokines sont revenus aux valeurs initiales [225]. Cette étude met en évidence l'effet anti-inflammatoire des AGPI n-3 dans un contexte de CCR avec une capacité à contrôler la progression tumorale. Nous

aborderons les mécanismes possibles de régulations des AGPI n-3 dans ce contexte inflammatoire.

Rappelons que les AGPI n-6 peuvent être métabolisés en eicosanoïdes pro-inflammatoires alors que les AGPI n-3 sont métabolisés en eicosanoïdes anti-inflammatoires sous l'action de cyclo-oxygénases (COX) et lipoxygénases (LOX). Ainsi, l'enzyme COX-2 métabolise l'AA en PGE2 pro-inflammatoire mais métabolise également l'EPA en PGE3 anti-inflammatoire. Le DHA est également métabolisé en docosanoïdes tels que des protectines ou résolvines à effet anti-inflammatoire.

Il a été observé que le métabolisme des eicosanoïdes est modifié dans le CCR. En effet, COX-2 et 5-LOX sont surexprimées dans la plupart des tumeurs coliques et l'AA est l'acide gras majoritaire des phospholipides membranaires de ces tumeurs entraînant ainsi une forte production de dérivés pro-inflammatoires ayant des effets pro-tumoraux tels que PGE2 [348, 349]. Une supplémentation en AGPI n-3 permet un enrichissement des membranes en AGPI n-3 (EPA et DHA) au détriment de l'AA réduisant la synthèse des dérivés pro-inflammatoires issus de l'AA et augmentant celle des dérivés anti-inflammatoires issus de l'EPA et du DHA. De plus, les AGPI n-3 inhibent l'expression et l'activité de COX-2 et sont capables d'augmenter l'expression de la 15-PGDH impliquée dans la dégradation de PGE2 favorisant par son action une diminution de la progression tumorale [350].

Par conséquent, les AGPI n-3 inhibent l'état inflammatoire via leur modification en dérivés anti-inflammatoires au détriment des dérivés pro-inflammatoires.

Le DHA est également impliqué dans l'inhibition de NF- κ B : un facteur de transcription ayant un rôle clé dans l'inflammation et la progression tumorale notamment en régulant l'expression de cytokines pro-inflammatoires, de protéines anti-apoptotiques et pro-angiogéniques. En effet, le DHA est capable d'inhiber NF- κ B de manière dépendante et indépendante de PPAR γ [333, 335, 336]. Il a été observé, *in vitro* et *ex vivo* dans des leucocytes et macrophages stimulés aux LPS et dans des cellules endothéliales, que l'EPA et le DHA inhibent la phosphorylation et la dégradation d'I κ B associées à une réduction de la translocation de NF- κ B dans le noyau [351, 352].

De nombreuses études ont analysé les effets anti-tumoraux des AGPI n-3 à travers leurs propriétés anti-inflammatoires. Pour cela, certains laboratoires utilisent des souris transgéniques pour le gène *Fat1* codant une n-3 désaturase capable de convertir les AGPI

n-6 en n-3. Ainsi, chez des souris Fat1 sous régime enrichi en AGPI n-6, on observe une diminution du ratio n-6/n-3 accompagnée d'une réduction de l'expression de COX-2 et de la production de PGE2 [353]. Des souris Fat1, comparées à des souris WT, auxquelles on induit une colite (par administration d'azoxyméthane et de DSS) développent moins d'adénocarcinomes associés à une réduction du nombre de cellules inflammatoires dans l'intestin (quantification des cellules T CD3+ et CD4+ dans la lamina propria du côlon) et une réduction de marqueurs inflammatoires (IL-6, IL-8, IL-1 β , TNF α et PGE2) [354]. Nowak *et al.* ont également montré une diminution de l'expression et l'activité du facteur de transcription NF κ B associé à une diminution de l'état inflammatoire et du nombre de polypes chez des souris Fat1 avec induction de colite par rapport aux souris WT [355].

b) Activation de la réponse immunitaire anti-tumorale

Le système immunitaire est capable de reconnaître et d'éliminer les cellules cancéreuses dès leur apparition. Cependant, les tumeurs peuvent dans certains cas progresser et échapper au système immunitaire. Pour cela, les tumeurs mettent en place divers mécanismes comme la diminution de l'expression à leur surface du complexe majeur d'histocompatibilité I (CMHI) [356] permettant normalement aux cellules du système immunitaire de reconnaître les cellules cancéreuses. On observe également l'augmentation de la différenciation et de l'activité de cellules immunosuppressives ou encore la sécrétion de certaines cytokines pro-inflammatoires par les cellules cancéreuses favorisant la progression tumorale [357]. Les AGPI n-3 et leurs métabolites (eicosanoïdes, docosanoïdes) sont des modulateurs de la réponse immunitaire. Leur capacité à modifier des voies de transduction du signal intracellulaire (par la régulation de voie de signalisation, de facteur de transcription et de l'expression de gènes) va leur permettre d'influencer la différenciation et l'activité des cellules immunitaires afin d'induire une réponse immunitaire anti-tumorale [358]. Dans cette partie nous allons voir le rôle des AGPI n-3 dans la réponse immunitaire anti-tumorale.

Lymphocytes T intra-tumoraux

Les lymphocytes T sont répartis en deux sous-populations: les LT CD4+ et CD8+.

Les LT CD8+ reconnaissent les peptides couplés aux molécules CMH de classe I et induisent la mort des cellules à laquelle elles sont liées. C'est pourquoi ils sont appelés LT cytotoxiques. Deux mécanismes sont à l'origine des fonctions cytotoxiques des LT CD8+ :

le premier mécanisme est la présentation de FasL et TRAIL par le LT CD8+ qui vont être reconnus par le récepteur de mort situé à la surface de la cellule cible et provoquer la mort par apoptose. Le deuxième mécanisme est la sécrétion de perforine et granzyme induisant des pores dans les membranes de la cellule cible.

Les LT CD4+ reconnaissent des peptides couplés aux molécules CMH de classe II et produisent des cytokines permettant la coordination de la réponse immunitaire. Les lymphocytes T CD4+ naïfs, selon l'environnement cytokinique, peuvent se différencier en différents sous-types de lymphocytes dont les principaux sont : Th1, Th2, Treg et Th17. Ces cellules ont des fonctions différentes sur la croissance tumorale: Les T-reg sont des cellules à fonction immunosuppressive qui favorisent l'échappement des tumeurs à l'immuno-surveillance. Les Th1 sont anti-tumoraux tandis que les Th2 et Th17 sont considérés comme pro-tumoraux [359].

Les cellules Th17 (T helper type 17) sont impliquées dans le maintien de la barrière homéostatique épithéliale contre les attaques extérieures (bactériennes et fongiques) et sont impliqués dans les syndromes inflammatoires chroniques (maladie de Crohn), les maladies auto-immunes (psoriasis) et dans le cancer [124]. La différenciation Th17 est initiée en présence de TGF- β , d'IL-6, d'IL-23 et d'IL-1 β chez la souris et par le TGF- β , l'IL-1 β et l'IL-21 chez l'homme. Ces cytokines, en se liant à leurs récepteurs, vont activer la voie STAT3 permettant l'induction du facteur de transcription Ror γ t caractéristique de la lignée Th17. Une fois initiée les Th17 secrètent leurs propres cytokines (l'IL-17, l'IL-21, l'IL-22). L'IL-21 par une boucle de rétrocontrôle positif impliquant STAT3 va permettre l'amplification des Th17 et induire l'expression du récepteur à l'IL-23. L'IL-23 secrétée essentiellement par les cellules dendritiques et macrophages assure la stabilisation et le maintien du phénotype Th17 [360]. IL-17 va être responsable de l'effet pro-inflammatoire et donc pro-tumoral si l'état inflammatoire persiste. Des études sur le rôle de l'IL-17 montre qu'il peut activer la voie ERK/p38MAPK/NF- κ B impliquée dans l'expression de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-1, TNF α) et favorise le développement de CCR chez des souris déficientes pour APC. L'injection d'anti-IL-17 réduit l'apparition d'adénocarcinome chez les souris déficientes pour APC et potentialise l'effet d'un agent de chimiothérapie : 5-FU [361]. IL-17 favorise l'angiogenèse en augmentant la production de VEGF par les cellules tumorales et peut également favoriser directement leur prolifération et leur résistance à l'apoptose [124].

Des travaux ont démontré que les AGPI n-3 sont capables de réguler l'activation des LT ou de favoriser leur différenciation en LT ayant des propriétés anti-tumorales [362]. En effet, il a été montré que le DHA joue un rôle anti-angiogénique et anti-tumoral en inhibant la différenciation des Th17 et leur sécrétion d'IL-17 [363]. Berger *et al.* ont mis en évidence que le DHA limite la croissance de mélanome (B16) et de cellule cancéreuse mammaire (4T1) chez des souris Balb-C. En effet, le DHA active PPAR γ dans les cellules T pour inhiber la phosphorylation de STAT-3 qui est impliquée dans l'expression de ROR γ C et IL-17: facteurs clé de la différenciation et de l'activité des Th17 [364]. Une autre étude montre que les AGPI n-3 inhibent l'expression du récepteur à l'IL-6 à la surface des LT CD4+: une cytokine impliquée dans la différenciation des Th17 [365].

Les AGPI n-3 favorisent également la différenciation des cellules T vers le phénotype Th1 anti-tumoral. Cet effet est en partie dû à l'inhibition de la production de PGE2 qui est impliquée dans la régulation du système immunitaire [48]. En effet, PGE2 inhibe la réponse anti-tumorale des Th1 et des LT CD8+ cytotoxiques en supprimant la production d'IFN γ . PGE2 induit la production d'IL-10 immunosuppresseur, réduit celle d'IL-2 nécessaire à l'activation des LT et favorise la différenciation des LT en Th2 et Th17 [366]. Par conséquent, l'inhibition de la production de PGE2 par le DHA pourrait expliquer ses effets sur le système immunitaire en faveur d'une réponse anti-tumorale. D'autre part, les AGPI n-3 inhibent la migration et l'activité des cellules immunosuppressives T-reg impliquées dans l'échappement des tumeurs à l'immunosurveillance. En effet, Les AGPI n-3 inhibent leur migration en réprimant l'expression des récepteurs aux chimiokines à leur surface : CCR-4 et CXCR-4, et augmentent l'expression de p27^{KIP1} impliqué dans l'inhibition de leur activité immunosuppressive [367].

Les cellules NK

Ce sont des lymphocytes granuleux capables de reconnaître et de tuer des cellules cancéreuses ou infectées par un virus en induisant l'apoptose sans stimulation antigénique. Les cellules NK expriment à leur surface des récepteurs activateurs (NKG2D) qui reconnaissent des ligands (NKG2DL : MIC et ULBP) à la surface des cellules cancéreuses et peuvent également être activées par des cytokines du microenvironnement tumoral (IL-2, IFN γ , TNF α). Les cellules NK possèdent également à leur surface des récepteurs inhibiteurs (KIR) qui reconnaissent les molécules CMH de classe I du soi exprimées à la surface de toutes les cellules saines. Ce mécanisme préserve les cellules saines de la

cytotoxicité des cellules NK. L'absence d'expression du CMH I par les cellules cancéreuses conduit à l'activation des cellules NK. L'activation des cellules NK entraîne la sécrétion de granzymes, perforines, cytokines cytotoxiques (TNF α , TRAIL, FasL) induisant l'apoptose des cellules tumorales [368]. Néanmoins, les cellules NK présentent une altération de leurs fonctionnalités et de leurs capacités à infiltrer les tumeurs chez les patients atteints de cancer. En effet, les cellules cancéreuses peuvent échapper à l'immunosurveillance des cellules NK notamment en inhibant l'expression des récepteurs activateurs (NKG2D) et de leurs ligands (NKG2DL) à la surface des cellules NK et tumorales respectivement [369]. L'une des stratégies vise à stimuler des cellules NK *ex vivo* et de réaliser un transfert de cellules adoptives *in vivo*. Ainsi, de multiples tentatives visent actuellement à manipuler les cellules NK pour une utilisation en immunothérapie du cancer [370].

Des études ont montré que les AGPI n-3, en combinaison avec des anti-oxydants, augmente l'apoptose de cellules cancéreuses pancréatiques induite par les cellules NK [371]. Le mécanisme précis n'a pas été élucidé, cependant une étude montre que l'inhibition de PGE2 réduit l'activité immunosuppressive des MDSC permettant une augmentation de l'activité cytotoxique des cellules NK [372]. Donc l'augmentation de l'activité cytotoxique des cellules NK par les AGPI n-3 pourrait être la conséquence de l'inhibition des MDSC immunosuppressives et non pas un effet direct sur les cellules NK.

Les cellules myéloïdes suppressives

Les cellules myéloïdes suppressives MDSC (myeloid-derived suppressor cells), sont des cellules immatures de type myéloïdes capables d'inhiber les fonctions des lymphocytes T par différents mécanismes. Les MDSC inhibent notamment l'activation des lymphocytes T CD8+, la production d'interféron γ (IFN γ) et des facteurs cytolytiques assurant ainsi le maintien de la croissance tumorale. Les MDSC répriment l'activation des lymphocytes T CD8+ grâce à l'expression d'enzyme (iNOS et arginase) privant les LT CD8+ en arginine et cystéine : deux acides aminés indispensables à l'activation des LT CD8+. De plus, les MDSC sécrètent du TGF- β et de l'IL-10 qui induisent les lymphocytes T-reg exerçant eux-mêmes une activité immunosuppressive sur les LT. Les MDSC favorisent également l'angiogenèse par la sécrétion du facteur pro-angiogénique VEGF [373]. Dans un contexte tumoral, il est observé une corrélation directe entre le volume tumoral et la présence des

MDSC. Cet environnement tumoral (i.e. côlon ou sein) permet l'expansion et l'activation de MDSC chez les patients atteints de cancers [374, 375].

Différents médiateurs pro-inflammatoires (PGE2, IL-6, IL-1 β , IFN γ , GM-CSF, protéines S100A8 et A9, TGF- β) sous le contrôle des voies Stat1/3 et NF- κ B conditionnent la génération et l'activation des MDSC et les voies de signalisation moléculaire s'opposant à leurs effets sont autant de possibilités de réduire l'action des MDSC [376]. Il a été montré que PGE2 induit l'expression de l'arginase-1 et iNOS et donc favorise l'activité immunosuppressive des MDSC [49]. Un régime enrichi en huile de poisson réduit la production de PGE2 et associé à une diminution du nombre de MDSC chez des souris porteuses de tumeurs métastatiques des poumons, ceci s'accompagne d'une diminution du nombre de métastases [377].

Les macrophages associés aux tumeurs (TAMs)

Les macrophages sont des cellules phagocytaires infiltrant les tissus pour absorber les cellules apoptotiques, les débris cellulaires et les pathogènes. Ils initient le déclenchement d'une réponse immunitaire par présentation d'antigènes aux lymphocytes T. Ils sécrètent également des facteurs de croissance, des protéases ainsi que des cytokines pro- et anti-inflammatoires. Les macrophages sont activés en réponse à des facteurs extérieurs : cytokines (IFN γ , IL-4, TNF α , GM-CSF, M-CSF), stimulation bactérienne, chimique ou mécanique. Les macrophages peuvent également acquérir une activité pro ou anti-tumorale. Les cytokines de type Th1 (IFN γ , IL-1 β) active STAT1 induisant des macrophages de type M1 à activité anti-tumorale: sécrétion de molécules cytotoxiques (TNF α , FasL), stimulation de la réponse adaptative (production d'IL-12, IL-23) et inhibition de l'angiogénèse (production de MMP-12). Tandis que les cytokines de type Th2 (IL-4, IL-13) active STAT6 induisant des macrophages M2 à activité pro-tumorale (MMP-2, MMP-9, PGE2, VEGF) [378].

Les macrophages sont l'une des principales populations de leucocytes infiltrant les tumeurs solides et sont principalement des macrophages polarisés en type M2 possédant des fonctions immunosuppressives, pro-angiogéniques et pro-invasives [379]. La présence de macrophages M2 est associée à une forte progression tumorale et à un mauvais pronostic [380].

PGE2 inhibe la production d'IFN γ impliqué dans l'induction des macrophages de type M1. Or, un traitement en IFN γ et Celecoxib (inhibiteur de COX-2) augmente le pourcentage de macrophage de type M1 au détriment du type M2 dans un modèle de cancer du poumon et de l'ovaire. De plus, le traitement IFN γ et celecoxib est associé à une diminution de l'expression de MMP-2, 9 et VEGF ainsi qu'à une réduction de la vascularisation des tumeurs [381]. L'inhibition de l'activité de COX-2 et de la production de PGE2 par EPA et DHA pourrait donc être impliquée dans le changement de polarisation M2 vers M1.

EPA et DHA inhibent la production de NO par les macrophages [382]. Or, le NO a la capacité de promouvoir la croissance tumorale et de favoriser l'angiogenèse en augmentant la production de VEGF [383].

Une autre étude montre qu'un traitement en EPA et DHA réduit la capacité de migration et d'invasion de cellules cancéreuses prostatiques (PC-3) induit par les macrophages de type M2. Les cellules PC-3 sont pré-traitées avec EPA ou DHA avant d'être exposées à un milieu conditionné par des macrophages THP-1 polarisés en type M2. Les macrophages de type M2 augmentent l'expression de molécules impliquées dans la migration et l'invasion des cellules cancéreuses prostatiques (MMP-9, COX-2, VEGF). Le traitement en EPA et DHA diminue l'expression de ces molécules en activant PPAR γ qui inhibe le facteur de transcription NF- κ B, conduisant à une diminution de la migration et l'invasion des cellules PC-3. L'effet du traitement EPA/DHA sur les cellules PC-3 est aboli par l'utilisation d'un antagoniste de PPAR γ (GW9662) [384].

c) Inhibition de l'angiogenèse

Comme nous l'avons vu dans le chapitre I, la prostaglandine E2 (formée à partir de l'AA sous l'action de l'enzyme Cox-2) est principalement pro-inflammatoire et considérée comme promoteur de tumeur dans le côlon. Ces effets pro-tumoraux sont également dus à son implication dans les processus d'angiogenèse. Lorsque les cellules cancéreuses sont en hypoxie, l'expression de COX-2 est induite augmentant ainsi la production de PGE2 qui déclenche l'expression de VEGF : un facteur de croissance de l'endothélium vasculaire indispensable à l'angiogenèse [385].

Or, il été montré que des traitements en EPA et DHA *in vitro* ou un régime enrichi en EPA et DHA *in vivo* chez des souris porteuses de tumeurs coliques, inhibent l'expression et l'activité de COX-2 réduisant la production de PGE2 et l'expression de VEGF permettant un ralentissement de l'angiogenèse [273]. Le PGDF (Platelet-derived growth factor) est un

autre facteur de croissance de l'endothélium vasculaire impliqué dans l'angiogenèse et dont l'expression est également inhibée par l'EPA et le DHA *in vitro* et *in vivo* [386, 387].

Dans les zones hypoxiques, il a été montré que l'induction de HIF-1 α et VEGF est également impliquée dans l'inhibition du système immunitaire et donc favorise l'échappement des tumeurs au système immunitaire [385]. En effet, on observe le recrutement de T-reg et de MDSC (cellules immunosuppressives) dans les zones hypoxiques de la tumeur. Il semblerait que VEGF favorise l'accumulation des MDSC dans les tumeurs et régule leurs fonctions ainsi que leur différenciation. HIF-1 α et VEGF sont impliqués dans l'activation du facteur de transcription STAT3 responsable de l'expression de gènes pro-inflammatoires et anti-apoptotiques ce qui favorise la résistance des cellules cancéreuses à la lyse induite par les lymphocytes T cytotoxiques. Dans les zones hypoxiques, les macrophages associés aux tumeurs (TAMs) sécrètent la protéine MMP7 impliquée dans le clivage de FasL ce qui rend également les cellules cancéreuses moins sensibles à la lyse engendrée par les cellules NK et les LT [385].

Par conséquent, l'inhibition du VEGF par le DHA pourrait réduire l'angiogenèse, augmenter la réponse anti-tumorale des lymphocytes T cytotoxiques mais également limiter le recrutement des MDSCs et des T-reg au site de la tumeur pour permettre l'augmentation de l'efficacité des immunothérapies.

Des études suggèrent que le DHA n'inhibe pas la formation de vaisseaux sanguins dans la tumeur mais serait plutôt impliqué dans la réorganisation du réseau vasculaire tumoral pour se rapprocher d'un réseau vasculaire « normal ». Comme nous l'avons vu dans le chapitre I, l'efficacité de perfusion est médiocre dans le système vasculaire tumoral, ce qui confère à la tumeur une résistance aux agents de chimiothérapie et radiothérapie.

Des travaux de Sophie Kornfeld *et al.* menés à Tours illustrent bien ce phénomène [388]. Dans cette étude, des rats porteurs de tumeurs mammaires chimioinduites sont soumis ou non à un régime enrichi en AGPI n-3, puis sont traités avec un agent chimiothérapeutique : le docetaxel, un analogue du paclitaxel, qui est un anti-mitotique par action sur les microtubules. Différents paramètres sont mesurés au sein de la tumeur: la densité vasculaire, la pression du liquide interstitiel (IFP, Interstitial Fluid Pressure) et l'extravasation. Une forte IFP est associée à une diminution de l'extravasation puisqu'elle empêche le passage des molécules anti-cancéreuses des vaisseaux vers l'espace interstitiel tumoral. Par exemple, une étude sur des patients atteints de mélanome montre que les

patients répondant efficacement au traitement anti-cancéreux ont une faible IFP [389]. Ainsi, dans leurs travaux, Sophie Kornfeld *et al.* mettent en évidence que le régime AGPI n-3 entraîne un enrichissement du tissu tumoral en EPA et DHA et une diminution de l'AA. De plus, le docetaxel stabilise la croissance tumorale avec le régime contrôle, cependant il induit 50% de régression tumorale avec le régime enrichi en AGPI n-3. Suite à l'analyse des paramètres vasculaires, ils découvrent que les AGPI n-3 réduisent la densité vasculaire et l'IFP associée à une augmentation de l'extravasation. La production de NO par la NO synthase endothéliale (eNOS) est impliquée dans l'angiogenèse et possède des propriétés vasodilatatrices avec une augmentation de l'IFP. Or, les AGPI n-3 diminuent l'activation de eNOS indiquant que les AGPI n-3 pourraient empêcher la signalisation du NO pour diminuer l'IFP, augmenter le passage des molécules anti-cancéreuses des vaisseaux vers l'espace interstitiel tumoral et ainsi augmenter leur efficacité. [388].

Par conséquent, les AGPI n-3 peuvent entraîner une normalisation de la vascularisation tumorale qui améliore la pénétration des molécules de chimiothérapie. Une supplémentation en AGPI n-3 pourrait donc être une stratégie pour diminuer la résistance aux agents anti-cancéreux.

d) Inhibition du processus métastatique

L'invasion tissulaire et la formation de métastases nécessitent que les cellules tumorales acquièrent la capacité à migrer vers d'autres tissus et à les envahir. Quatre familles de molécules d'adhésion vont être sollicitées : les cadhérines, des molécules apparentées aux immunoglobulines (intercellular cell adhesion molecule ICAM, vascular cell adhesion molecule VCAM), les intégrines et les sélectines.

Les cellules cancéreuses d'origine épithéliale peuvent passer du phénotype épithélial à la forme mésenchymateuse, c'est la transition EMT (épithélio-mésenchymateuse) qui représente la première phase du processus métastatique. La forme mésenchymateuse a perdu son adhérence cellule-cellule suite à la perte d'expression de gène codant pour les E-cadhérines [100] et la modification de l'expression de certains gènes codant pour des métalloprotéinases responsable de la dégradation de la matrice extracellulaire (MMP) [390]. Ceci conduit à un détachement des cellules cancéreuses, à l'invasion de la lame basale et à la pénétration dans les vaisseaux sanguins ou lymphatiques (intravasation).

L'invasion métastatique du site secondaire par les cellules cancéreuses débute par l'adhésion à la paroi de l'endothélium vasculaire grâce aux ICAM, VCAM, intégrines et

sélectines. Puis, elles vont synthétiser de l'angiopoéтин-like 4 qui va fragiliser l'endothélium vasculaire et faciliter l'extravasation. Le lieu de résidence secondaire dépend du type de cancer: pour le cancer colorectal, des métastases vont se former préférentiellement au niveau du foie [391].

Le niveau sérique des molécules d'adhésion cellulaire : E-sélectines, ICAM et VCAM est augmenté chez des patients atteints d'un CCR sporadique comparé à des personnes témoins. Le niveau sérique de ces molécules est corrélé à la présence de métastases chez ces patients [392].

Des travaux montrent que les AGPI n-3 sont capables de diminuer la formation de métastases hépatiques de cellules cancéreuses coliques en régulant l'expression de molécules d'adhésion indispensables à l'extravasation. En effet, une étude *in vitro*, réalisant une coculture de cellules cancéreuses coliques humaines (CX-1) et de cellules endothéliales (HUVECs), montre qu'un traitement en DHA diminue l'expression du récepteur aux E-sélectine à la surface des CX-1 associée à diminution de leur liaison aux cellules endothéliales [393]. Par ailleurs, une étude *in vivo* montre que l'EPA diminue le nombre et la taille des métastases hépatiques suite à l'injection de cellules cancéreuses coliques (ACL-15) dans la veine mésentérique supérieure chez des rats F344. L'effet anti-métastatique de l'EPA est associé à une diminution de l'expression de VCAM-1 à la surface des cellules cancéreuses coliques ACL-15 [394].

III. MicroARN et cancer

Parmi les molécules impliquées dans l'oncogenèse, les microARNs apparaissent comme de nouveaux régulateurs des fonctions cellulaires tels que le cycle et la mort cellulaires. Ils se lient à des ARN messagers cibles pour inhiber leur traduction ou induire leur dégradation. Par conséquent, ils sont capables de réguler l'expression d'un grand nombre de gènes impliqués dans de multiples fonctions cellulaires. Les AGPI n-3 ont la capacité de changer le profil d'expression de microARNs modifiant le devenir des cellules cancéreuses par la régulation de la balance d'expression entre des microARNs oncogéniques et suppresseurs de tumeurs.

Nous allons à présent voir plus en détails ce que sont les microARNs, leurs synthèse, leurs modes d'action et enfin leurs implications dans l'oncogenèse.

A. Définition et découverte des microARNs :

Les microARNs sont de petits ARN non codants de 21 à 25 nucléotides qui répriment l'expression de gènes en contrôlant l'initiation de la traduction et la stabilité des ARNm de plus de 30% des gènes codant des protéines [395]. Il existe des microARNs chez les plantes et les animaux mais leur synthèse et la manière dont ils régulent leurs cibles sont très différentes. Nous ne développerons que la régulation et le rôle des microARNs chez les animaux.

Les premiers microARNs, lin-4 et let-7, ont été découverts par les équipes de Victor Ambros et Gary Ruvkun qui menaient des recherches sur le ver *C. Elegans* [396, 397]. Il existe quatre stades larvaires chez *C. Elegans* (L1 à 4). L'inhibition du gène codant la protéine lin-14 permet le passage du stade L1 au stade L2 [398]. En 1993, l'équipe de Ambros s'est aperçue que lin-4 codait deux transcrits de petite taille dont une partie de la séquence est complémentaire à la séquence contenue dans la région 3'UTR de l'ARNm de la protéine lin-14 [396]. Selon eux, cette interaction est responsable de l'inhibition de la traduction de l'ARNm lin-14 initiant ainsi le passage du stade larvaire L1 à L2 [399]. Par la suite, il a été évoqué que lin-4 pouvait également inhiber de la même manière l'expression de la protéine lin-28 responsable du passage du stade larvaire L2 vers L3 [400]. En 2000, l'équipe de Gary Ruvkun découvre un nouveau microARN, let-7, responsable de l'inhibition de l'expression de la protéine lin-41 impliquée dans le passage du stade larvaire L4 au stade adulte [397]. En 2001, ils identifient de nombreux gènes, conservés du ver à l'humain, codant pour des petits ARNs comme lin-4 et let-7 qui sont alors appelés microARNs (miARNs) [401].

On compte aujourd'hui plus de 1000 miARNs humains identifiés, séquencés et annotés dans le génome.

B. Synthèse et mode d'action des microARNs :

1. Transcription et maturation dans le noyau :

Les séquences codant les miARNs se trouvent principalement dans les introns de gènes codant ou non des protéines mais très rarement dans les exons [402]. Par ailleurs, environ un tiers des miARNs chez les mammifères sont regroupés en « clusters ». La majorité des miARNs introniques seraient co-transcrits avec leur gène hôte, cependant environ 30% pourraient être transcrits à partir d'un promoteur indépendant du gène hôte [403]. Ils sont

transcrits, comme les ARNm, sous l'action de l'ARN polymérase II en miARN primaire ou « pri-miARN » [404]. Ce dernier est ensuite clivé dans le noyau par un complexe, appelé microprocesseur, composé de l'endonucléase Droscha et d'une protéine de liaison au pri-miARN DGCR8, pour aboutir à la formation d'un « pré-miARN » qui est une structure en épingle à cheveux, ou structure tige-boucle, d'environ 70 nucléotides (figure 19) [405]. Le pri-miRNA est caractérisé par une tige d'ARN double brin d'environ 30 nucléotides présentant des mésappariements, une boucle, et des fragments d'ARN simple brin de part et d'autre de cette structure tige-boucle. DGCR8 reconnaît la jonction entre les fragments d'ARN simple brin en 5' et 3' et l'ARN double brin de la tige. La protéine DGCR8 possède deux domaines de liaison à l'ARN double brin et un domaine de liaison à la protéine Droscha. La fixation de DGCR8 au niveau de la jonction simple brin-double brin permettrait à la protéine Droscha d'interagir transitoirement avec la tige et de positionner le centre catalytique de l'enzyme de manière à ce qu'elle clive le duplex d'ARN 11 paires de bases après la jonction [406].

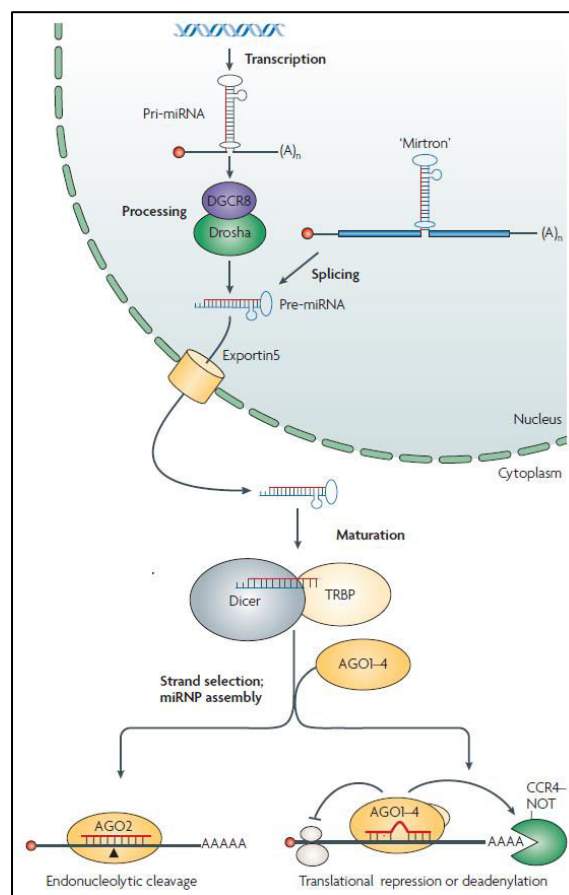


Figure 19: Biogenèse des microARNs chez les cellules eucaryotes [395].

2. Exportation dans le cytoplasme et incorporation dans le complexe RISC :

Le pré-miARN, formé suite à la maturation du pri-miARN, est exporté dans le cytoplasme par l'exportine-5 via un mécanisme Ran-GTP-dépendant [407] où il va être clivé par une autre nucléase appelée Dicer, assistée de la protéine TRBP (pour TAR RNA binding protein), pour éliminer la structure en épingle à cheveux afin d'obtenir un petit ARN double-brin « miARN » d'environ 20 paires de bases avec deux extrémités 3' sortantes de 2 nucléotides de chaque côté (figure 19) [408].

Cet ARN double-brin est ensuite incorporé au sein d'un complexe ribonucléoprotéique « RISC » (RNA-Induced Silencing Complex) où il subit un troisième clivage par une protéine argonaute (Ago2) afin d'éliminer l'un des deux brins [409]. Il existe quatre protéines argonautes chez les mammifères (Ago1-4) mais seule Ago2 possède une activité catalytique. Les protéines argonautes possèdent trois domaines : le domaine PAZ (Piwi-Argonaute-Zwille) qui reconnaît et se fixe à l'extrémité 3' du pré-miARN, le domaine MID qui se fixe au 5'-phosphate du pré-miR et le domaine PIWI (RNaseH-like Pelement induced wimpy testis) qui constitue le domaine catalytique de Ago2 [410].

Le miARN simple-brin mature associé au complexe RISC va ensuite se lier par complémentarité avec sa séquence cible sur l'ARNm pour inhiber sa traduction ou diminuer sa stabilité.

3. Mode d'action :

Actuellement, on estime que 60% des gènes humains seraient régulés par des miARNs. Des algorithmes ont donc été développés pour prédire les ARNm cibles possibles des miARNs (miRanda, PicTar, TargetScan). Les dizaines ou centaines de cibles prédites pour un miARN nécessitent cependant des validations expérimentales. Ainsi, un seul miARN peut réguler de nombreuses cibles et on estime qu'un miARN de mammifères a une moyenne de 300 cibles prédites [411]. Inversement, un ARNm cible peut être régulé par plusieurs miARNs [412]. Les interactions miRNAs-ARNm cibles sont donc complexes et dépendent du contexte cellulaire, c'est-à-dire de la quantité respective de miARNs et de ARNm cibles [413].

a) Appariement à l'ARNm cible

Le miARN du complexe RISC va interagir avec la région 3' non traduite de l'ARNm cible aussi appelé « région 3' UTR » pour UnTranslated Region.

Si l'appariement est parfait, il conduit à la dégradation de l'ARNm cible par clivage endonucléolytique réalisé par Ago2 au sein de l'hybride miARN-ARNm. Si l'appariement est imparfait, il conduit à l'inhibition de la traduction de l'ARNm cible [414].

Il existe également des cas très rares où des miARNs peuvent activer la traduction de leurs ARNm cibles au lieu de la réprimer. Par exemple, miR-122 (spécifique du foie) stimule l'expression de l'ARN du virus de l'hépatite C en se fixant à l'extrémité 5'UTR [415]. C'est également le cas de RIP140 (receptor-interacting protein 140) dont l'expression protéique est augmentée par la fixation de miR-346 sur sa région 5' UTR [416].

b) Régulation post-transcriptionnelle de la cible

Les miARN peuvent contrôler l'expression génique en régulant l'initiation de la traduction, l'élongation de la traduction, la protéolyse du peptide naissant et la stabilité du messenger par déadénylation [395].

Régulation de l'initiation de la traduction

La traduction débute par la reconnaissance de la coiffe en 5' de l'ARNm par eIF4E, une sous-unité du complexe d'initiation eIF4F qui facilite le recrutement de la petite sous-unité ribosomique 40S et son association avec la grande sous-unité 60S permettant de former le complexe ribosomique 80S et de commencer l'élongation.

Une hypothèse serait que le complexe RISC inhibe la reconnaissance de la coiffe. Le complexe RISC en se fixant à la coiffe de l'ARNm empêcherait l'association du complexe d'initiation de traduction. Une étude menée par Kiriakidou *et al.* montre que la protéine Ago2 contient dans son domaine central des similitudes avec le domaine de liaison à la coiffe du facteur eIF4E [417]. En se fixant à leur ARNm cible, les miARNs inhiberaient l'initiation de la traduction en amenant Ago2 à proximité de la coiffe entrant en compétition avec eIF4E (figure 20).

Régulation de l'élongation de la traduction

L'inhibition de traduction par les miARNs pourrait également se faire après l'initiation de traduction. Le complexe RISC engendrerait le détachement des ribosomes pendant l'élongation et entraînerait la dégradation des polypeptides naissant en recrutant des protéases spécifiques (figure 20) [418]. RISC est capable de recruter le facteur eIF6 qui inhibe la fixation des sous-unités ribosomiques 60S et 40S sur l'ARNm [419]. Une étude réalisée sur des cellules HeLa, montre que des miARNs (miR-21 et Let-7) sont retrouvés dans des polysomes en cours de traduction. Ils retrouvent notamment let-7 associé à

l'ARNm de KRAS qui est l'une de ces cibles. On a donc une accélération du relargage du ribosome, avant même que la synthèse de la protéine ne soit achevée. Ce phénomène est appelé le « ribosome dropoff » [420].

Régulation de la stabilité de l'ARNm cible par déadénylation

La grande majorité des ARN messagers possèdent une queue polyA qui permet leur stabilisation et stimule la traduction par interaction avec la PABP (polyA binding protein). La déstabilisation des ARNm par les miARNs peut s'effectuer par déadénylation de cette queue polyA [421]. Elle fait intervenir les protéines argonautes et de nombreuses autres enzymes de dégradation (CAF1, NOT1, DCP1 et DCP2) contenues dans des structures subcellulaires appelées P-bodies (figure 20). Dans ces P-bodies, on trouve des ARNm non traduits [422] mais également le complexe ARNm-miARN-Ago pour l'étape de déadénylation [423]. Les P-bodies peuvent également être appelés GW-bodies, car on y trouve la protéine GW182 recrutée par les protéines argonautes au sein du complexe RISC jouant un rôle dans le processus de dégradation des ARNm [424-426].

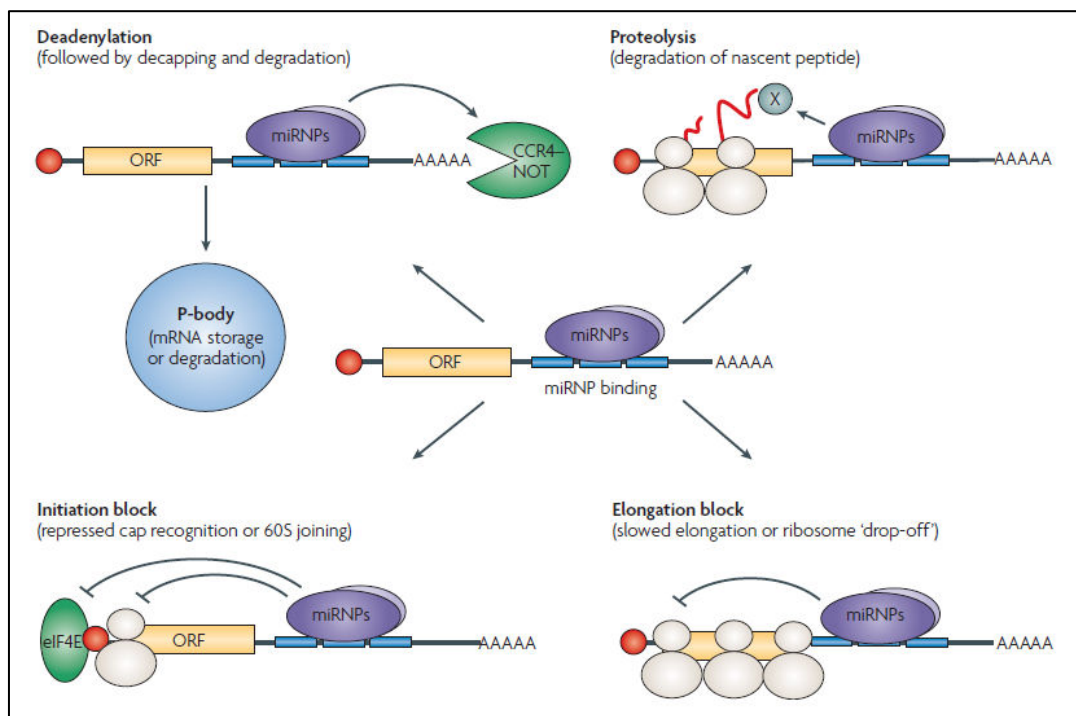


Figure 20: Les différents modes de régulation post-transcriptionnelle des ARNm par les microARNs [395].

C. Implication des microARNs dans l'oncogenèse :

Les microARNs apparaissent comme de nouveaux régulateurs de différents processus cellulaires tels que la prolifération, l'apoptose et la différenciation [427]. Or, on observe que 50% des gènes humains codant pour des microARNs sont localisés dans des régions chromosomiques fréquemment altérées (déletées ou amplifiées) dans les cancers [428]. Cette observation permet de soutenir l'hypothèse que l'expression de microARNs pourrait être altérée au cours de la cancérogenèse et contribuerait au processus tumoral. En effet, l'expression des microARNs et d'acteurs de la voie de synthèse des microARNs sont effectivement dérégulées dans les cancers, et certains microARNs se comportent individuellement comme des oncogènes ou des suppresseurs de tumeurs [429].

1. MicroARNs oncogéniques :

L'un des premiers microARNs oncogéniques identifiés est miR-21 qui est surexprimé dans de nombreux cancers dont le CRC [430]. Une augmentation de l'expression de miR-21 favorise la prolifération et l'invasion des cellules cancéreuses coliques. Au contraire, une perte d'expression de miR-21 est associée à une diminution de la prolifération, une augmentation de l'apoptose des cellules cancéreuses ainsi qu'à une diminution de la formation de métastases [431].

L'explication moléculaire serait probablement une expression diminuée des gènes cibles de miR-21 impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire et la mort cellulaire. En effet, l'inhibition de miR-21, par la transfection d'anti-miR-21 chez des cellules cancéreuses coliques HCT-116, entraîne un arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. Ceci est associé à une augmentation de l'expression de PTEN et une inhibition de la voie PI3K/Akt. De plus, l'utilisation d'un gène rapporteur, contenant la séquence 3'UTR de PTEN couplé au gène de la luciférase, montre une augmentation de l'activité luciférase en présence d'anti-miR-21, indiquant que PTEN est une cible post-transcriptionnelle de miR-21 [432].

De plus, dans des cellules transformées par Ras, l'expression de miR-21 est induite par le facteur de transcription AP-1 et induit une diminution de l'expression d'une protéine de mort cellulaire programmée PDCD4. Ras étant un activateur d'AP-1, les mutations activatrices de Ras induit l'expression de miR-21 ciblant l'ARNm de PDCD4 [433]. Une surexpression de miR-21 est corrélée à une diminution du taux de protéine PDCD4 dans du tissu tumoral de patients atteints d'un CCR [431].

Reck est un inhibiteur des métalloprotéases responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire et donc impliqué dans la migration et l'invasion des cellules cancéreuses. Dans des cellules cancéreuses gastriques, l'expression de Reck est diminuée par l'action de miR-21 induisant une augmentation de leur capacité d'invasion [434].

Le microARN miR-21 cible également le gène Sprouty 2. L'inhibition de l'expression de Sprouty 2 augmente l'activation des récepteurs tyrosine kinase (RTKs). Ainsi, l'inhibition de miR-21 entraîne une augmentation de Sprouty2 dans les cellules cancéreuses coliques (HCT-116), associé à une inhibition de leur prolifération et une augmentation de leur sensibilité au 5-FU et à la metformine. Ce phénomène est associé à une activation de PTEN et un blocage de la voie RAS/RAF/ERK [435].

MiR-21 cible également l'ARNm de hMSH2 (human mutS homologue 2) qui fait partie du complexe de réparation des mésappariements de l'ADN. Un dysfonctionnement de ce système de réparation contribue à la résistance des cellules cancéreuses coliques à un agent anti-cancéreux : le 5-fluorouracile (5FU) [436].

La résistance des glioblastomes à l'apoptose induite par le Temozolomide (TMZ), un agent alkylant, est également dépendante de l'expression de miR-21. Une surexpression de miR-21 dans des cellules de glioblastome (U87MG) induit une diminution de l'expression de Bax et une augmentation de Bcl-2 conduisant à une diminution de l'apoptose de ces cellules [437].

L'oncogène PLR-3 est connu pour promouvoir le processus métastatique notamment dans le cas de CCR. Une étude montre que PLR-3 est capable d'induire l'expression de miR-21 en activant le facteur de transcription STAT3 [438]. De plus, un autre facteur de transcription NF- κ B active l'expression de miR-21 associée à une augmentation de la prolifération cellulaire [439, 440]. STAT3 et NF- κ B étant des facteurs principalement responsables de l'expression de cytokines pro-inflammatoires, ceci explique la corrélation entre l'augmentation accrue de l'expression de miR-21 et des cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-8) dans les tumeurs coliques. De plus, l'expression de miR-21 est augmentée suite à l'injection de LPS et lors de la différenciation des LT. Les gènes de l'inflammation et miR-21 constituent ainsi des biomarqueurs du CCR [441]. Une autre étude montre que l'IL-6 active STAT3 et induit l'expression de miR-21 dont l'une des cibles est l'ARNm de CYLD (cylindromatosis) permettant une activation de la voie NF- κ B [442]. Par conséquent, ces études montrent que miR-21 participe à l'induction de la carcinogenèse colorectale dans un contexte pro-inflammatoire. En effet, miR-21 a été montré comme étant surexprimé dans le tissu du côlon et le sérum de patients atteints de colite ulcéreuse, de

CCR et de CCR associé aux colites (CAC) [443, 444]. Après l'induction d'un CAC par l'injection d'un agent carcinogène (AOM) et pro-inflammatoire (DSS), on observe une réduction de l'expression de cytokines pro-inflammatoires et pro-tumorales (IL-6, IL-17, IL-21) et une diminution du nombre et de la taille des tumeurs chez des souris KO pour miR-21 comparé à des souris sauvages [444].

Cependant, l'expression de miR-21 peut-être réprimée au niveau transcriptionnel par le facteur de transcription Foxo3a. En effet, une étude montre que miR-21 cible l'ARNm de FasL pour inhiber sa traduction et que Foxo3a induit l'expression de FasL en réprimant celle de miR-21 par fixation sur son promoteur [82]. Foxo3a étant inactivé dans le CCR, ceci pourrait en partie expliquer la surexpression de miR-21 dans ce type de cancer.

Une étude chez des souris porteuses de tumeurs, après injection en sous-cutanée de cellules cancéreuses pancréatiques, montre qu'une injection intra-tumorale d'un vecteur lentiviral contenant la séquence de miR-21 antisense inhibe la croissance tumorale et améliore l'efficacité de la gemcitabine, injecté en intra-péritonéale [445]. C'est également le cas chez des souris immunodéficiente porteuses de tumeurs après injection sous-cutanée de cellules cancéreuses mammaires (MCF-7) ou mélanomes (A375) transfectées avec des oligonucléotides anti-miR-21 [446, 447].

Il existe d'autres microARNs oncogéniques dont les cibles sont citées dans le tableau 2.

microRNA	Tumor Suppressor or Oncogene	Examples of experimentally validated microRNA Targets
<i>let-7</i>	Tumor Suppressor	<i>KRAS</i>
<i>miR-17-92</i> cluster	Oncogene	<i>E2F1</i>
<i>miR-21</i>	Oncogene	<i>PDCD4, PTEN, RECK, NFIB, TPM1, SPRY2, RHOB, TIMP3, maspin, CDC25a, TLAM1, MSH2</i>
<i>miR-29</i>	Tumor Suppressor	<i>MMP2, DNMT3A/B</i>
<i>miR-30a</i>	Tumor Suppressor	<i>DTL</i>
<i>miR-34a</i>	Tumor Suppressor	<i>FRA1, SIRT1, MYC, BCL2</i>
<i>miR-95</i>	Oncogene	<i>SNX1</i>
<i>miR-101</i>	Tumor Suppressor	<i>COX2</i>
<i>miR-135a/b</i>	Oncogene	<i>APC</i>
<i>miR-137</i>	Tumor Suppressor	<i>CDC42</i>
<i>miR-143</i>	Tumor Suppressor	<i>KRAS, DNMT3A, ERK5</i>
<i>miR-145</i>	Tumor Suppressor	<i>IRS-1, c-Myc, YES1, STAT1, OCT4, SOX2, KLF4, FLI1</i>
<i>miR-155</i>	Oncogene	<i>MLH1, MSH2, MSH6</i>
<i>miR-200c</i>		<i>ZEB1, ZEB2</i>
<i>miR-342</i>	Tumor Suppressor	<i>DNMT1</i>
<i>miR-365</i>	Tumor Suppressor	<i>CCND1, BCL-2</i>
<i>miR-451</i>	Tumor Suppressor	<i>MIF</i>
<i>miR-499</i>	Oncogene	<i>FOXO4, PDCD4</i>
<i>miR-675</i>	Tumor Suppressor	<i>RB</i>

Tableau 2 : Listes de microARNs dont l'expression est altérée dans le CCR [448].

2. MicroARNs suppresseurs de tumeurs :

Dans le CCR, il y a des microARNs à fonction anti-tumorale, comme par exemple *let-7*, *miR-143*, *miR-145*, *miR-365* ou encore *miR-29b*, qui ont une expression réduite.

Let-7 est décrit comme un miARN suppresseur de tumeur car il réprime l'expression de plusieurs cibles oncogènes dont la protéine Ras fréquemment muté dans les CCR, *c-Myc* [449] ou encore des activateurs du cycle cellulaire comme la cycline D2 [450]. Dans le contexte de la différenciation, la protéine *lin-28* inhibe l'expression de *let-7*. Or, une surexpression de *lin-28* est observée dans les tumeurs diminuant fortement l'expression de *let-7*, ce qui a pour conséquence la surexpression des protéines oncogéniques cibles de *let-7* [451].

Les miARN-143 et 145 voient leur expression réduite dans les de CCR [452]. Or, ils régulent la croissance et la prolifération cellulaire en ciblant différents gène codant pour des protéines oncogéniques. miR-143 cible préférentiellement KRAS [453] et ERK5 (extracellular signal-regulated kinase-5) [454] tandis que miR-145 inhibe l'expression de protéine comme c-Myc [455] ou encore STAT1 (signal transducer and activator of transcription 1) [456].

Enfin, les miARN-365 et 29b dont l'expression est également inhibée dans les tumeurs coliques et ciblant des ARNm de gènes impliqués dans le cycle (Cycline D1) [457] et la mort cellulaires (Bcl-2) [458] pour miR-365, mais également dans d'autres processus cellulaires comme la formation de métastases (MMP-2) pour miR-29b [459].

Ainsi, dans le CCR, on observe une altération de l'expression de nombreux microARNs dont le rôle et les cibles sont présentés dans le tableau 2.

3. Les microARNs comme outils de dépistage et de pronostic:

Grâce à l'utilisation des puces à microARNs, on a pu mettre en évidence des microARNs sur- et sous-exprimés dans certains types tumoraux, comme le CCR, par rapport au tissus sains. De plus, les microARNs exprimés sont différents en fonction du tissu d'origine et du stade de différenciation. Par conséquent, des signatures d'expression de microARNs peuvent être exploitées pour déterminer l'origine tissulaire de tumeurs peu différenciées d'origine inconnue. Elles peuvent également définir le stade de différenciation de la tumeur permettant d'utiliser un traitement adapté et pourraient servir de marqueurs pronostiques. Plusieurs microARNs sont ainsi associés à un mauvais diagnostic dans le cas du CRC tels que miR-21, miR-200c, miR-155 et miR-141 [460-463].

Par exemple, des taux plasmatiques élevés de miR-92a ont été mesurés chez des patients atteints de CRC comparés à des sujets sains. Le taux de miR-92a permet également de différencier les patients atteint d'un CRC des patients atteint d'un autre cancer digestif ou d'inflammation chronique de l'intestin [464, 465].

Objectif

Les études cliniques sur les effets des acides gras de la famille n-3 dans un contexte tumoral restent peu nombreuses mais soutiennent toujours l'hypothèse d'une action bénéfique du DHA notamment dans le cancer du côlon. Les acteurs cellulaires et les mécanismes moléculaires à l'origine de l'effet anti-cancéreux du DHA commencent à être bien décrits dans des modèles pré-cliniques *in vitro* et *in vivo*. Cependant, le rôle des microARNs dans la régulation de la prolifération des cellules cancéreuses par le DHA n'a pas encore été abordé et encore moins en relation avec le statut inflammatoire de la cellule cancéreuse.

Ainsi, l'objectif de ma thèse a consisté à étudier la régulation de l'expression de microARN (miARN) par l'acide docosahexaénoïque (DHA), et analyser la régulation de médiateurs inflammatoires possiblement à l'origine de l'action pro-apoptotique du DHA sur les cellules cancéreuses coliques.

Ce travail de thèse s'est appuyé sur une étude préliminaire montrant, par une analyse utilisant une puce à miRNA, que des cellules cancéreuses HCT-116 traitées par différentes concentrations en DHA voyaient une modification d'expression de miRNA. Notre étude s'est portée sur miR-21 avec pour objectif de caractériser les acteurs de sa régulation et d'identifier les cibles impliquées dans l'effet anti-tumoral du DHA.

Nous avons choisi comme modèle d'étude le cancer du côlon. Après avoir criblé plusieurs lignées cancéreuses (HCT-116, SW480, CT-26, HT-29, HCT-8), nous avons retenu les cellules humaines HCT-116 et HCT-8 pour leur sensibilité au traitement DHA. De plus, nous avons utilisé un modèle *in vivo* de xéno greffe de cellules HCT-116 dans des souris immunodéficientes Nude.

Contrairement aux autres lignées testées, les cellules HCT-116 et HCT-8 présentent un phénotype MSI (microsatellite instability). Or, des études épidémiologiques ont montré qu'une alimentation riche en acides gras oméga-3 (DHA et EPA) diminue le risque de CCR et plus particulièrement des CCR de type MSI. Par conséquent, il est possible que la sensibilité au DHA des cellules HCT-116 et HCT-8 soit liée à leur phénotype MSI qui les différencie des autres lignées.

RESULTATS

Le DHA induit la mort de cellules cancéreuses coliques par une action autocrine du TNF α

I. Rappel introductif

Ce chapitre me permet de replacer le contexte de ce travail et faire brièvement un état des connaissances sur les acteurs moléculaires décrits dans cette publication.

L'inflammation est une composante importante dans le développement d'un cancer colorectal (CCR). En effet, les maladies intestinales inflammatoires chroniques, comme la maladie de Crohn ou les colites ulcéreuses, augmentent le risque de CCR [34, 35]. De plus, les patients atteints d'un CCR ont une augmentation du taux circulant de médiateurs inflammatoires tels que l'IL-6, IL-1 β , TNF α ou encore PGE2, indiquant que l'établissement d'un environnement inflammatoire accompagne la progression tumorale [36, 37]. Ces médiateurs sont produits principalement par des cellules immunitaires (monocytes, macrophages et lymphocytes) mais aussi par les cellules tumorales permettant de créer un environnement favorable à leur prolifération [33, 38, 39]. L'une des stratégies pour diminuer le risque et la progression du CCR est d'utiliser des agents anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS). Cependant, ces agents anti-inflammatoires peuvent avoir des effets secondaires néfastes. Par exemple, la diminution de l'apparition d'adénomes colorectaux sous l'effet d'un inhibiteur AINS de COX-2 est accompagnée d'effets secondaires cardiovasculaires graves (insuffisance cardiaque, accident vasculaire cérébral, infarctus) [52].

Les AGPI n-3 possèdent des propriétés anti-inflammatoires et anti-cancéreuses maintenant bien connues [17]. Purasiri *et al.* ont montré qu'un régime enrichi en AGPI n-3 diminue les taux sériques de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, TNF α et IFN γ) chez des patients atteints d'un CCR [225]. De plus, Jia *et al.* ont comparé les effets de l'induction d'une colite chez des souris sauvages et des souris Fat1 (transgéniques pour le gène Fat1 codant pour une n-3 désaturase capable de convertir les AGPI n-6 en n-3) et ont montré que les souris Fat1, avec un taux élevé en AGPI n-3, développent moins d'adénocarcinomes coliques comparées à des souris sauvages. De plus, ils observent une réduction de l'infiltration de cellules immunitaires au niveau de la lamina propria du côlon,

et une réduction du taux de médiateurs inflammatoires (IL-6, IL-8, IL-1 β , TNF α et PGE2) chez les souris Fat1 [354].

Les effets anti-prolifératifs des AGPI n-3 ont été démontrés *in vitro* sur différentes lignées de cellules cancéreuses coliques [272, 338, 466-468] et *in vivo* dans différents modèles transgéniques, de greffes de cellules cancéreuses et de cancers colorectaux chimioinduits [272, 273, 337, 353-355, 469]. L'effet des AGPI n-3 s'avère relier autant à un effet direct sur les cellules cancéreuses par arrêt du cycle cellulaire et apoptose qu'à un effet sur le microenvironnement tumoral en touchant la différenciation lymphocytaire (Th17 par exemple) et l'angiogenèse [273, 363, 364, 386-388]. Par ailleurs, les études cliniques sont encourageantes et montrent que EPA ou DHA limitent l'évolution d'adénomes vers des adénocarcinomes chez des patients avec CCR sporadiques ou héréditaires [226, 268]. D'autres études sont en cours afin d'étudier l'effet du DHA en co-traitement avec le paclitaxel chez des patients atteints de cancer colorectal [17].

Au vu des effets bénéfiques des AGPI n-3 sur l'inflammation, l'effet anti-tumoral des AGPI n-3 pourrait donc être attribué à leur capacité à réduire la production de cytokines pro-inflammatoires.

Parmi les médiateurs pro-inflammatoires, le TNF α est une cytokine qui possède des fonctions paradoxales dans la biologie du cancer [470]. Les effets du TNF α dépendent du contexte et du type cellulaire avec une action favorisant la prolifération des cellules cancéreuses ou, au contraire, une action induisant leur mort. Cette contradiction apparente proviendrait de l'activation de différentes voies de signalisation suite à la formation de complexes particuliers au niveau de ses récepteurs (TNF-R). Le TNF α peut soutenir la prolifération cellulaire principalement en activant la voie de signalisation NF- κ B impliquée dans l'expression de protéines pro-inflammatoires, anti-apoptotiques ou encore pro-angiogéniques [129-131, 133]. Le TNF α peut également induire la mort cellulaire par activation des voies d'apoptose ou de nécroptose [118]. La protéine RIP1 joue un rôle central dans la signalisation médiée par TNF α . En effet, lorsque la kinase RIP1 est ubiquitinée par cIAP, elle recrute et active la protéine kinase I κ B pour déclencher la voie de signalisation NF- κ B. Lorsque la kinase RIP1 est déubiquitinée par CYLD (cylindromatosis) [145], elle recrute les protéines FADD et TRADD pour former le complexe DISC et permet l'activation de la caspase-8 par autoclivage et l'induction de l'apoptose. La caspase-8 activée va ensuite cliver RIP1 pour éviter le déclenchement de la

nécroptose [119, 146]. Si la caspase-8 est inactive, RIP1 recrute la kinase RIP3 pour former le nécroptosome et déclencher la nécroptose [119].

Les effets contextuels du TNF α ont des implications dans le développement tumoral. Ainsi, dans des modèles de cancer colorectal associé à une inflammation chronique, le TNF α soutient la progression tumorale par une action autocrine sur les cellules cancéreuses et favorise l'angiogenèse par une action paracrine sur les macrophages en augmentant la production de VEGF [38, 136]. A l'inverse, des études ont montré qu'une production locale de TNF α avait la capacité de contenir la progression tumorale dans différents modèles de cancers coliques, mammaires, hépatiques et de la vessie [165, 167-169]. Par ailleurs, le TNF α administré localement par perfusion de membre isolé, afin d'abolir sa toxicité systémique, et en co-traitement avec un agent chimiothérapeutique (melphalan), présente des effets bénéfiques pour le traitement des sarcomes et des mélanomes [210, 211]. En effet, il agirait notamment sur la vascularisation tumorale favorisant l'accès des agents anti-cancéreux à la tumeur [212-214].

Les microARNs sont des régulateurs de différents processus cellulaires tels que la prolifération, l'apoptose ou encore la différenciation [427], et leur expression peut être dérégulée dans les cancers. C'est notamment le cas de miR-21 dont l'expression est augmentée dans le CCR [430]. Ainsi, miR-21 est surexprimé dans le tissu du côlon et le sérum de patients atteints d'inflammation intestinale chronique, de CCR et de CCR associé aux colites (CAC) [443, 444]. miR-21 favorise la prolifération et l'invasion des cellules cancéreuses coliques en prévenant l'expression de gènes anti-prolifératifs et pro-apoptotiques [432-434]. De plus, miR-21 participe à la résistance de cellules cancéreuses coliques à des agents anti-cancéreux comme le 5-FU [435, 436]. Ainsi, une inhibition de l'expression de miR-21 permet de diminuer la prolifération, d'augmenter l'apoptose des cellules cancéreuses et de prévenir la formation de métastases [431]. De plus, miR-21 est impliqué dans l'induction de la carcinogenèse colorectale lors d'une inflammation intestinale chronique. En effet, des acteurs de l'inflammation (IL-6, STAT3, NF- κ B) induisent l'expression de miR-21 qui va maintenir le statut inflammatoire et favoriser l'initiation de la carcinogenèse colorectale [438-440, 442]. La délétion de miR-21 dans un modèle de CAC chimioinduit permet de réduire l'expression de cytokines pro-inflammatoires et de diminuer le nombre et la taille des tumeurs coliques [444].

Au vu des données actuelles, le rôle du TNF α dans le développement tumoral semble prépondérant et l'analyse de l'effet du DHA sur sa régulation dans le cadre du cancer colorectal apparaît comme un élément clé dans l'effet anti-tumoral de cet acide gras. De façon inattendue, nous avons observé que le DHA induisait une augmentation de l'expression et de la sécrétion de TNF α par les cellules cancéreuses coliques. Cette production autocrine de TNF α conduit à la mort par apoptose des cellules cancéreuses et est à l'origine de l'effet anti-tumoral du DHA démontré dans un modèle de xénogreffes de cellules HCT-116 dans les souris Nude. Enfin, nous avons expliqué le mécanisme moléculaire de régulation du TNF α par le DHA dans ces cellules cancéreuses en démontrant l'implication de la voie de signalisation AMPK α -Foxo3a-miR-21.

II. Article

Inhibition of colon cancer growth by docosahexaenoic acid involves autocrine production of TNF α

A Fluckiger^{1,2}, A Dumont^{1,2}, V Derangère^{1,3}, C Rébé^{1,4}, C de Rosny^{1,2}, S Causse^{1,3}, C Thomas^{1,2}, L Apetoh^{1,3,4}, A Hichami^{1,2}, F Ghiringhelli^{1,3,4} and M Rialland^{1,2}.

1. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) UMR 866, Dijon, 21000, France.

2. UFR Sciences de la Vie, Terre et Environnement, Université de Bourgogne, Dijon, 21000, France.

3. UFR des sciences de santé, Université de Bourgogne, Dijon, 21000, France.

4. Centre Georges François Leclerc, Dijon, 21000, France.

Running title: DHA-induced cancer cell death via autocrine TNF α

Corresponding author: Mickaël Rialland, Université de Bourgogne, INSERM UMR 866, 6 bd Gabriel, 21000 Dijon, France. Tel: +33 (0)3 80 39 63 14. Fax: +33 (0)3 80 39 63 30. E-mail: mickael.rialland@u-bourgogne.fr

Grant Support: The present work was supported by Ligue contre le cancer comité Grand-Est and by a French Government grant managed by the French National Research Agency under the program “Investissements d’Avenir” with reference ANR-11-LABX-0021 (Lipstic Labex).

Abstract

The omega-3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid (DHA) has anti-inflammatory and anti-cancer properties. Among pro-inflammatory mediators, Tumor Necrosis Factor α (TNF α) plays a paradoxical role in cancer biology with induction of cancer cell death or survival depending on the cellular context. The objective of the study was to evaluate the role of TNF α in DHA-mediated tumor growth inhibition and colon cancer cell death. The treatment of human colorectal cancer cells HCT-116 and HCT-8 cells with DHA triggered apoptosis in autocrine TNF α -dependent manner. We demonstrated that DHA-induced increase content of TNF α mRNA occurred through a post-transcriptional regulation via the down-regulation of miR-21 expression. Treatment with DHA led to nuclear accumulation of Foxo3a which bound to the miR-21 promoter triggering its transcriptional repression. Moreover, inhibition of RIP1 kinase and AMPK α reduced Foxo3a nuclear-cytoplasmic shuttling and subsequent increase of TNF α expression through a decrease of miR-21 expression in DHA-treated colon cancer cells. Finally, we were able to show in HCT-116 xenograft tumor-bearing nude mice that a DHA-enriched diet induced a decrease of human miR-21 expression and an increase of human TNF α mRNA expression limiting tumor growth in a cancer cell-derived TNF α dependent manner. Altogether, the present work highlights a novel mechanism for anti-cancer action of DHA involving colon cancer cell death mediated through autocrine action of TNF α .

Key words: Docosahexaenoic acid, colon cancer, TNF α , miR-21, Foxo3a, RIP1

Introduction

Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer and the fourth leading cause of cancer death worldwide. The etiology of CRC is linked to hereditary component and to environmental factors (diet, lifestyle, chronic inflammation). The inherited CRC account for about 20% of CRC including hereditary nonpolyposis colorectal cancer and familial adenomatous polyposis¹. Therefore, the vast majority of CRC are sporadic without any identified genetic predispositions. The chronic inflammation observed in ulcerative-colitis and Crohn's disease increases the risk of CRC evidencing the connection between a pro-inflammatory context and colorectal carcinogenesis^{2, 3}. Actually a pro-inflammatory context promotes virtually all steps of colon carcinogenesis and patients with CRC present increase content of circulating pro-inflammatory mediators (i.e. IL-6, IL-1 β , IL-8, TNF α)^{4, 5}.

Epidemiological and clinical studies suggest beneficial effects of anti-inflammatory omega-3 polyunsaturated fatty acids (ω -3 PUFA) intake on the risk or treatment of CRC⁶⁻⁹. Additionally, *in vitro* and *in vivo* preclinical models evidence anti-proliferative and anti-neoplastic functions of both ω -3 PUFA predominantly found in fish oil, eicosapentaenoic acid (EPA, C22:5) and docosahexaenoic acid (DHA, C22:6)⁹. Therefore, fish oil- or individual ω -3 PUFA-enriched diets are able to reduce the risk of CRC and to limit tumor growth from colon cancer cells transplanted in mice^{10, 11}. The anticancer effect of DHA might be a consequence of its ability to regulate the production of pro-inflammatory mediators (i.e. TNF α , IL-17, PGE2) in cancer cells and/or host cells changing the systemic or tumor microenvironment inflammatory status¹¹⁻¹⁵.

Among pro-inflammatory mediators, TNF α is a paradoxical cytokine in cancer biology mainly detected in tumor infiltrating leukocytes in colitis-associated cancer

(CAC) and sporadic CRC^{16, 17}. In addition to leukocytes, colon cancer cells are also able to produce TNF α sustaining their own proliferation by autocrine action. Furthermore, neutralization of TNF α in a CAC model reduces tumor formation^{17, 18}. Although most studies underline a tumor promoting role for TNF α , its function remains elusive since administration of exogenous TNF α might induce cancer cell death and inhibit tumor growth¹⁹⁻²¹. Moreover, activation of TNF α signaling by malignant cell-derived TNF α production may be sufficient to trigger cancer cell death process^{22, 23}. Therefore, TNF α -mediated cell fate (cell death or survival) depends on cellular context and is controlled by the formation of different complexes following activation of death receptor TNF α -receptor I (TNFR-I). TNF α -mediated cell death relies on the formation of a cytosolic complex II composed of caspase 8, FADD, RIP1 kinase and the long form of cellular FLICE-like inhibitory protein²⁴.

In the present study, we aimed to evaluate the regulation of TNF α expression by DHA in colon cancer cells and its potential role in DHA-mediated apoptosis. We confirmed that DHA treatment induced inhibition of tumor growth and activation of apoptosis in colon cancer cells. However, surprisingly, we found, that these effects originated from autocrine production of TNF α . Furthermore, we documented the molecular regulation of TNF α synthesis involving the decrease of miR-21 expression under the control of Foxo3a nuclear accumulation dictated by RIP1 kinase and AMPK α .

RESULTS

DHA induces TNF α -mediated cell death in human colon cancer cells

We evaluated the effect of DHA on growth of human colon cancer cells (HCT-116 and HCT-8 cells) using Cyquant assay and compared with ω -6 linoleic (LA), arachidonic (AA) and oleic (OA) acids belonging to or ω -9 fatty acid family. We found that DHA treatment (50, 75 and 100 μ M) for 48 hours reduced cancer cell number in a dose-dependent manner while OA, AA and LA treatment did not in comparison with the control (ctrl) treatment (Figures 1a and b). In order to determine the cell death rate, we carried out analysis of Annexin V-7AAD staining. Addition of DHA for 48 hours at indicated concentrations induced a dose-dependent increase of cell death in both colon cancer cells reaching 40.7% of HCT-116 and 26.1% of HCT-8 cells positive for cell death staining at 100 μ M of DHA treatment (Figures 1c and d). Moreover, a zVAD-FMK treatment abolished DHA-mediated cell death indicating that DHA at 100 μ M for 48 hours induced caspase-depend apoptosis (Supplementary Figures S1A and B). We then evaluated the expression of pro-inflammatory cytokines in DHA-treated colon cancer cells. Expression of TNF α mRNA increased in HCT-116 and HCT-8 cells treated with DHA (50 and 100 μ M) for 6 hours whereas IL-6 and IL-8 expression decreased (Figures 1e and f). We quantified TNF α secretion in colon cancer cell culture medium treated by DHA using ELISA and we found that DHA administration for 14 hours induced increase of TNF α in HCT-116 and HCT-8 supernatants (Figure 1g). A Trypan blue exclusion assay revealed that DHA did not trigger cell death at 14 hours of treatment (data not shown) highlighting that the increase production of TNF α arrived before cell death. Because TNF α has ambivalent properties¹⁷⁻²¹, we analysed the effect of TNF α neutralization on

DHA-mediated cell death. We found that pre-treatment with blocking anti-TNF α (0.5 μ g/ml) reduced the DHA-induced cell death in HCT-116 and HCT-8 while the co-treatment with control IgG and DHA showed cell death level similar than administration of DHA alone (Figures 1h and i). The data here suggest that DHA inhibits cell growth by inducing autocrine TNF α -dependent cell death.

Figure 1: DHA induces TNF α -dependent cell death in colon cancer cells

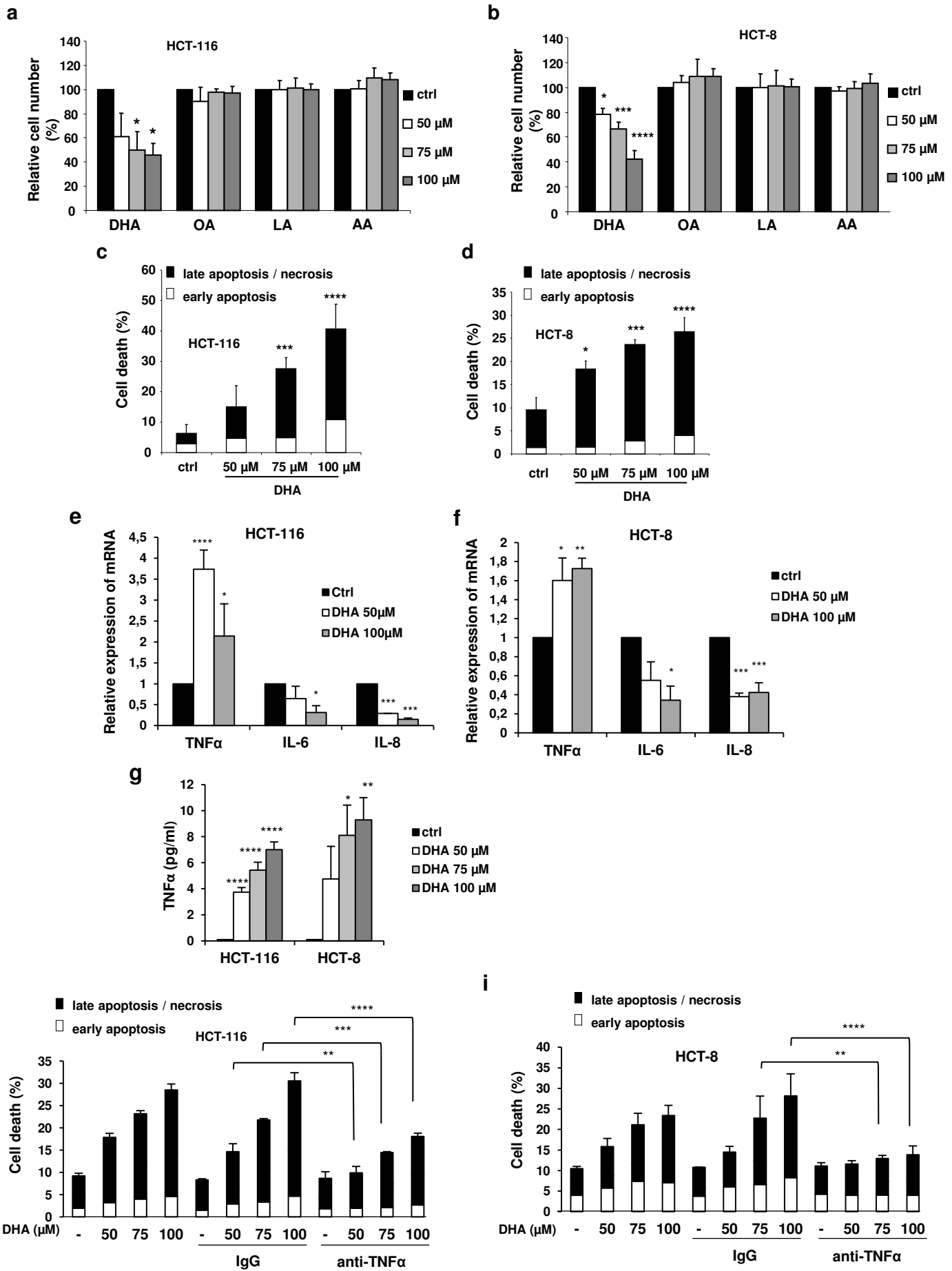


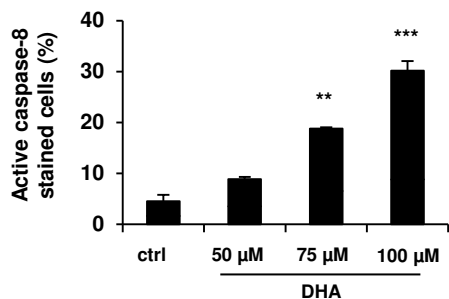
Figure 1. DHA induces TNF α -dependent cell death in colon cancer cells. (a) and (b), proliferation analysis with Cyquant assay for HCT-116 and HCT-8 treated for 48 hours with indicated concentrations of docosahexaenoic (DHA), oleic acid (OA) and linoleic acid (LA). (c) and (d), cell death analysis by Annexin V-7AAD staining in HCT-116 and HCT-8 cells treated with DHA for 48 hours. (e) and (f), relative expression of TNF α , IL-6 and IL-8 mRNA in HCT-116 and HCT-8 cells treated with DHA for 6 hours. (g), TNF α secretion measured by ELISA in HCT-116 and HCT-8 cells after 14 hours of treatment with DHA. (h) and (i), cell death analysis as (c) and (d) for HCT-116 and HCT-8 co-treated with DHA (100 μ M) and blocking anti-TNF α or control IgG (0.5 μ g/ml). Data are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments and compared to control (ctrl) unless otherwise indicated. * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001; **** p<0.0001.

RIP1 regulates TNF α mRNA expression in colon cancer cells

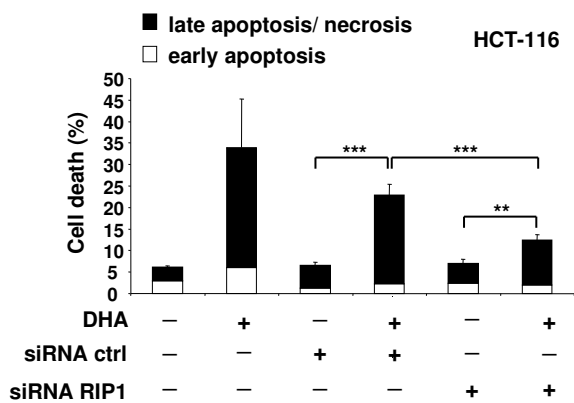
TNF α -mediated apoptosis involves the processing of pro-caspase-8 to active caspase-8 and depends on RIP1²⁴. In agreement with a previous study²⁵, we showed induction of active caspase 8 in DHA-treated cancer cells (Figure 2a). To determine the role of RIP1 in DHA effect, we investigated cell death level in colon cancer cells treated with DHA in RIP1-depleted cells using siRNA (Supplementary Figures S2A and B) or in presence of the RIP1 inhibitor necrostatin-1 (Nec-1). We found that silencing of RIP1 expression in HCT-116 and HCT-8 cells reduced DHA-mediated cell death analysed 48 hours post-transfection (Figures 2b and 2c). Similarly, inhibition of RIP1 kinase activity with Nec-1 treatment attenuated DHA-induced cell death in colon cancer cells (Figures 2d and e). Altogether these results evidenced the role of RIP1 in the pro-cytotoxic effect of DHA. In addition to its downstream action after activation of TNF α signaling, RIP1 is able to induce TNF α expression in a feedforward manner²⁶. Hence, we analysed the regulation of TNF α expression by RIP1 in HCT-116 cells. Silencing of RIP1 expression and activity abolished DHA-mediated TNF α upregulation in colon cancer cells (Figures 2f and 2g).

Figure 2: RIP1 regulates TNF α production in colon cancer cells

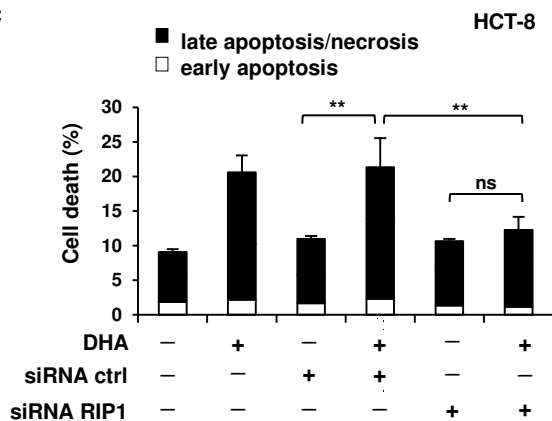
a



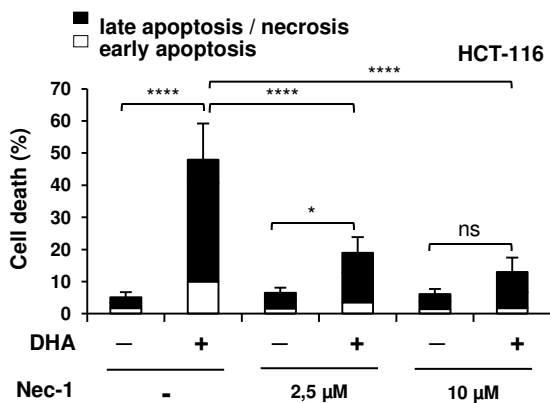
b



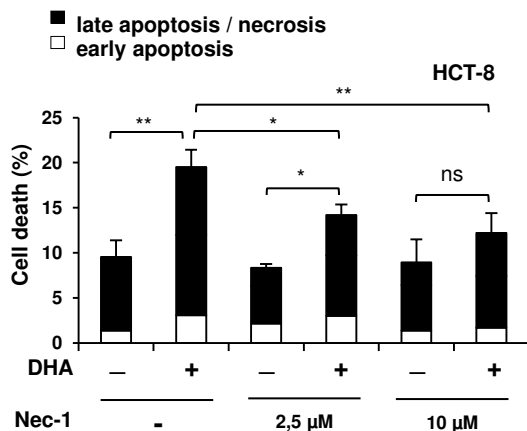
c



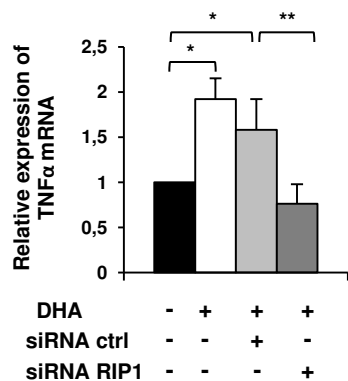
d



e



f



g

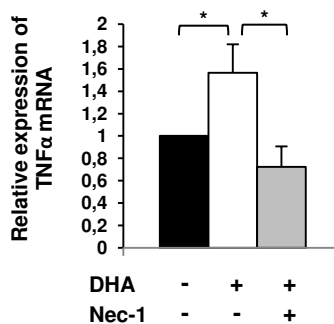


Figure 2. RIP1 regulates TNF α production in colon cancer cells. (a), caspase-8 activity in HCT-116 treated with DHA for 48 hours. (b) and (c), cell death analysis by Annexin V-7AAD staining of HCT-116 and HCT-8 transfected with siRNA control (ctrl) or RIP1 (siRNA RIP1) and treated with DHA (100 μ M) for 48 hours. (d) and (e), cell death analysis as (b) and (c) after co-treatment with Necrostatin-1 (Nec-1; 2.5 and 10 μ M) and DHA. (f) and (g), relative expression of TNF α mRNA in DHA-treated HCT-116 cells for 6 hours transfected with siRNA control and RIP1 (siRNA RIP1) (f) or treated with Nec-1 (g). Data are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments and compared to control (ctrl) unless otherwise indicated. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns= non-significant.

DHA increases TNF α expression through downregulation of miR-21

Recently, microRNAs appeared as novel regulators of cell functions (e.g. proliferation and differentiation) by controlling gene expression through post-transcriptional action²⁷. Moreover, DHA is able to modify the profile of microRNA expression targeting cell death program in cancer cells^{28, 29}. Thus, to investigate the molecular pathway involved in TNF α -induced cell death in DHA-treated colon cancer cells, we evaluated the role of microRNA-21 (miR-21) which is a possible regulator of TNF α mRNA content³⁰. We observed that DHA (50 and 100 μ M) repressed the expression of miR-21 in HCT-116 and HCT-8 cells (Figures 3a and b). We provided evidence that DHA might regulate the increase of TNF α mRNA through regulation of miR-21 expression. Indeed, transfection of pre-miR-21 (miR-21 mimic) in colon cancer cells decreased TNF α mRNA expression and abolished the DHA-induced upregulation of TNF α mRNA expression (Figures 3c and d). To validate the fact that DHA upregulated level of TNF α mRNA via miR-21 action, we used 3'-UTR of TNF α containing the miR-21 binding site cloned in a luciferase reporter vector. A significant increase of luciferase activity has been observed in colon cell lines treated with DHA (Figure 3e). Such data suggests that DHA-mediated inhibition of miR-21 expression alleviated post-transcriptional repression exerted on TNF α mRNA. Next, we wondered whether RIP1 participated in the regulation of miR-21 expression in DHA-treated colon cancer cells. We found that downregulation of miR-21 expression was lost in DHA-treated cancer cells lacking RIP1 expression or activity (Figures 3f and g). Furthermore, overexpression of miR-21 mimic counteracted DHA-induced cell death in both colon cancer cell lines (Figures 3h and i).

Figure 3: miR-21 contributes to DHA-mediated regulation of TNF α expression and cell death

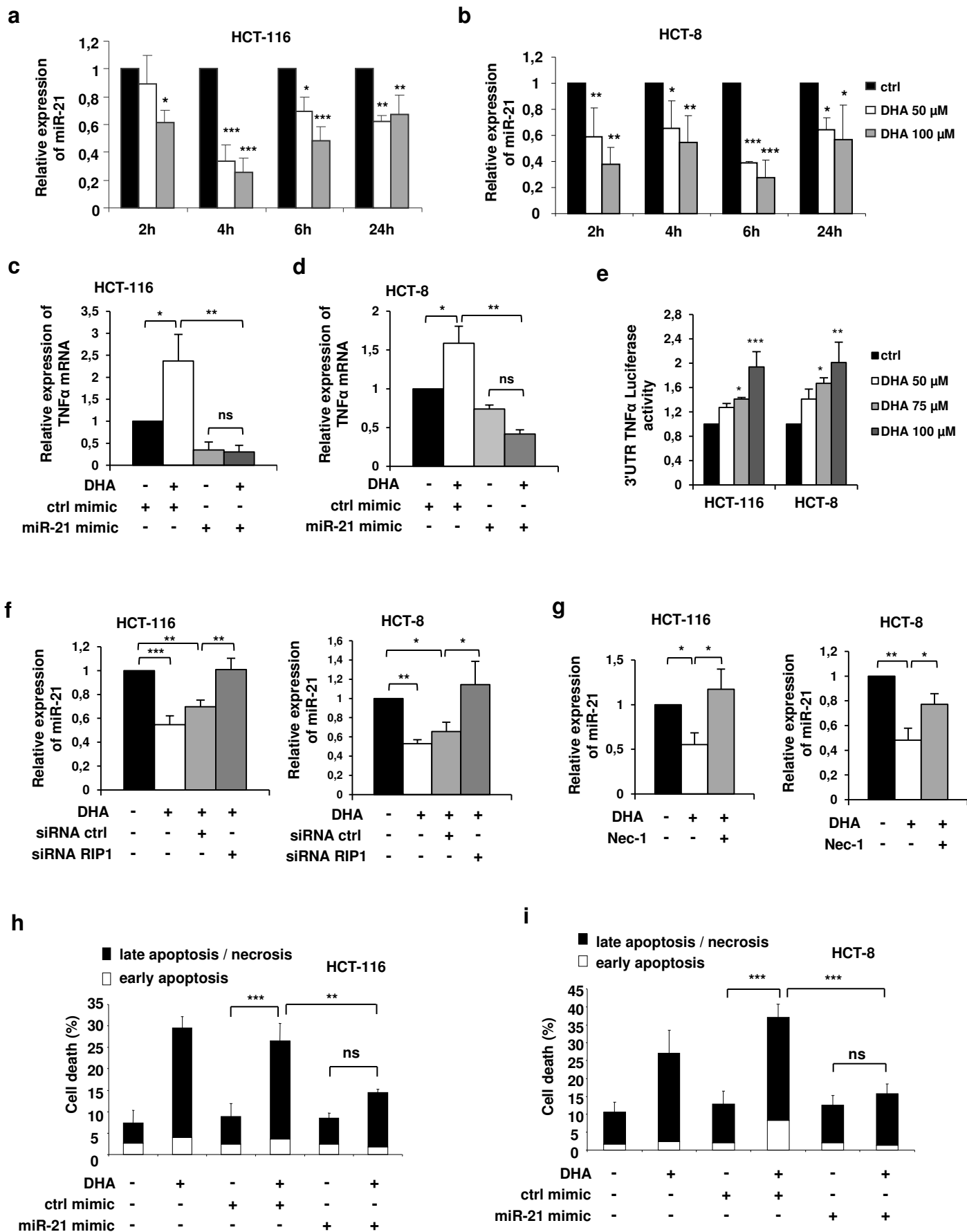


Figure 3. miR-21 contributes to DHA-mediated regulation of TNF α expression and cell death. (a) and (b), relative miR-21 expression in DHA-treated HCT-116 and HCT-8 at indicated times. (c) and (d), relative TNF α mRNA expression in HCT-116 and HCT-8 cells transfected with miR-21 or control (ctrl) mimic and treated with DHA (100 μ M) for 6 hours. (e), analysis of 3'-UTR TNF α luciferase activity in HCT-116 and HCT-8 cells normalized to *Renilla* luciferase activity. Relative 3'-UTR TNF α luciferase activity in DHA-treated cells is compared to control-treated cells. (f) and (g), analysis of relative miR-21 expression in DHA-treated cancer cells transfected with siRNA control (ctrl) or RIP1 (siRNA RIP1) (f) or treated with Nec-1 (g). (h) and (i), cell death analysis by Annexin V-7AAD staining of HCT-116 and HCT-8 transfected with miR-21 and control (ctrl) mimic and treated with DHA for 48 hours. Data are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments and compared to control (ctrl) unless otherwise indicated. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns= non-significant.

DHA-mediated nuclear translocation of Foxo3a regulates miR-21 and TNF α expression

The transcription factor Foxo3a has been described as a repressor of miR-21 expression through direct binding on miR-21 promoter which has two Foxo3a response elements (BS1 and BS2)³¹. Expression of Foxo3a protein in HCT-8 and HCT-116 cells treated for 4 hours with DHA was analysed and we observed an increase of Foxo3a expression in HCT-8 while remaining unchanged in HCT-116 (Supplementary Figures S3A and B). Then, we investigated the nuclear-cytoplasmic shuttling in both DHA-treated colon cancer cells. Immunofluorescence analysis evidenced an increase of nuclear translocation of endogenous Foxo3a in DHA-treated HCT-116 and HCT-8 cells using a rabbit polyclonal anti-Foxo3a (Figures 4a and b). Similar results were obtained with a goat polyclonal anti-Foxo3a and with overexpressed Flag-Foxo3a in HCT-116 cells (Supplementary Figures S3C and D). To gain further insight into the control of miR-21 expression by DHA, we analysed the DNA-binding of Foxo3a on miR-21 promoter using CHIP assay. DHA led to a statistically significant increase of Foxo3a binding on BS1 (2.7 fold) and a trend increase on BS2 (1.3 fold) whereas no amplification after immunoprecipitation with control IgG of BS1 and BS2 was detected (data not shown) (Figure 4c). We then studied the involvement of Foxo3a in the control of miR-21 expression in HCT-116 and HCT-8 cancer cells treated by DHA. For such experiment, we silenced Foxo3a expression using small-interfering RNA against Foxo3a (siRNA Foxo3a; Supplementary Figures S3E and F) and analysed miR-21 expression in control and DHA-treated cells. Colon cancer cells transfected with siRNA ctrl and exposed to DHA had a decreased expression of miR-21 compared to untreated cells and to siRNA Foxo3a-transfected cells which were unable to induce the DHA-mediated

downregulation of miR-21 expression (Figure 4d). This result indicates that Foxo3a is essential for repression of miR-21 expression in DHA-treated cancer cells. In the same way, the inhibition of Foxo3a expression with siRNA Foxo3a alleviated the DHA-induced TNF α mRNA expression in HCT-116 and HCT-8 cells (Figure 4e). We next evaluated the role of Foxo3a in cell death induced by DHA with analysis of Annexin V and 7AAD staining in siRNA Foxo3a- and siRNA ctrl-transfected colon cancer cells. The treatment with DHA induced cell death in HCT-116 and HCT-8 transfected with siRNA ctrl whereas the knockdown of Foxo3a (siRNA Foxo3a) significantly reduced the DHA-mediated cell death (Figures 4f and g).

Figure 4: Foxo3a regulates miR-21 and TNF α expression in DHA-treated cells

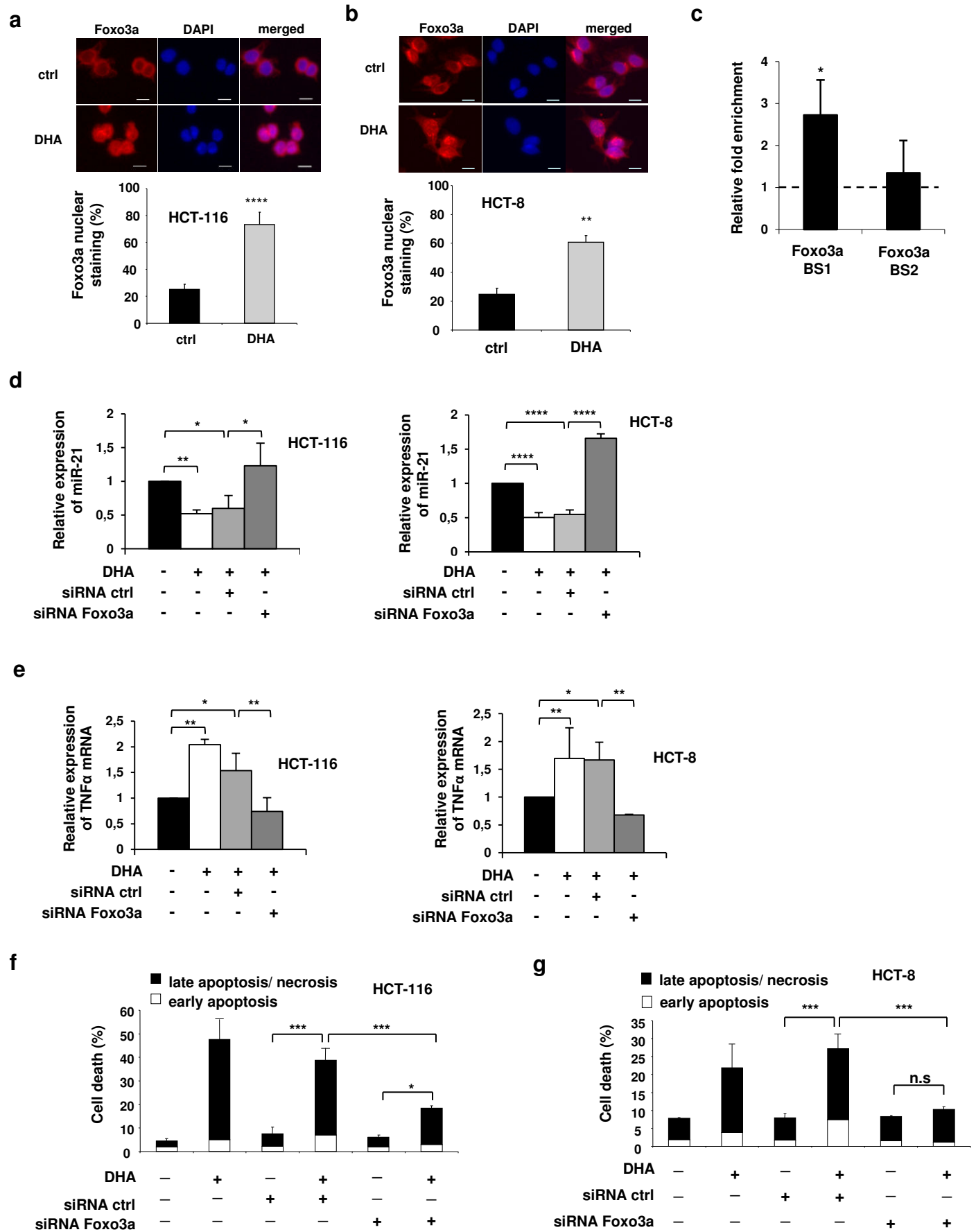


Figure 4. Foxo3a regulates miR-21 and TNF α expression in DHA-treated cells.

(a) and (b), immunofluorescence with rabbit anti-Foxo3a in HCT-116 and HCT-8 cells treated with DHA for 4 hours (Scale bar = 10 μ m). Foxo3a nuclear distribution (%) was determined with Image J software as described in materials and methods. (c), CHIP analysis with anti-Foxo3a to determine binding of Foxo3a on BS1 and BS2 of miR-21 promoter in control- and DHA-treated HCT-116 for 4 hours. Foxo3a occupancy in DHA-treated cells is compared to Foxo3a occupancy on BS1 or BS2 in control cells. (d) and (e), relative expression of miR-21 (d) and TNF α mRNA (e) in HCT-116 and HCT-8 transfected with siRNA control or Foxo3a (siRNA Foxo3a) and treated with DHA (100 μ M) for 6 hours. (f) and (g), cell death analysis by Annexin V-7AAD staining of HCT-116 and HCT-8 transfected with siRNA control or Foxo3a and treated with DHA for 48 hours. Data are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments and compared to control (ctrl) unless otherwise indicated. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

AMPK α controls nuclear localization of Foxo3a and TNF α expression in DHA-treated cancer cells

From above results, we evidenced that the effect of DHA on miR-21 and TNF α mRNA expression involved RIP1 kinase and Foxo3a. Thereby, we evaluated the ability of DHA to regulate Foxo3a nuclear-cytoplasmic shuttling in a RIP1 kinase activity dependent manner. Subcellular distribution of Foxo3a was analysed in both colon cancer cell lines co-treated with DHA and Nec-1. Although treatment with Nec-1 impaired Foxo3a nuclear localization in DHA-treated HCT-116 cells for 4 hours, Foxo3a distribution was not affected in HCT-8 cells demonstrating that RIP1-mediated regulation of Foxo3a nuclear translocation was not a common mechanism in colon cancer cells (Supplementary Figures S4A and B). Since AMP-activated protein kinase α (AMPK α)-Foxo3a axis does exist in stressed cells through phosphorylation of Foxo3a at Ser413 (p-Foxo3a S413) by AMPK, we determined the p-Foxo3a S413 level in DHA-treated colon cancer cells³². Administration of DHA increased p-Foxo3a S413 content in HCT-116 and HCT-8 cells in association with increase of AMPK α phosphorylation (p-AMPK T172) analyzed at 4 and 6 hours respectively (Figures 5a and b). In addition, immunofluorescence analysis of Foxo3a subcellular distribution showed that treatment of cells with AMPK activator (AICAR) induced nuclear Foxo3a accumulation (Supplementary Figure S4C). To precise the potential function of AMPK α activation in regulation of Foxo3a localization in DHA-treated cells, we inhibited AMPK α expression with siRNA AMPK α (Supplementary Figure S4D) and AMPK activity with compound C (0.5 μ M). The loss of AMPK activity as well as inhibition of AMPK α expression reduced Foxo3a nuclear distribution in HCT-116 and HCT-8 exposed to DHA treatment (Figures 5c and d). Next, we evaluated the role of

DHA-mediated AMPK α activation in regulation of miR-21 and TNF α expression. The DHA treatment in HCT-116 cells transfected with siRNA ctrl showed as expected a decrease of miR-21 expression and increase of TNF α mRNA content while abolition of AMPK α expression counteracted the DHA effect on miR-21 and TNF α mRNA (Figures 5e and f). We confirmed using compound C that prevention of DHA-induced AMPK α activation did not trigger the change of miR-21 and TNF α expression (Supplementary Figures S4E and F). Finally, we showed that AMPK α activation pathway is involved in DHA-induced colon cancer cell death. Indeed, we observed that extinction of AMPK α expression and inactivation of AMPK α pathway by compound C reduced cell death in HCT-116 and HCT-8 treated with DHA (Figure 5g, Supplementary Figures S4G and H).

Figure 5: DHA-triggered AMPK α activation regulates Foxo3a nuclear translocation

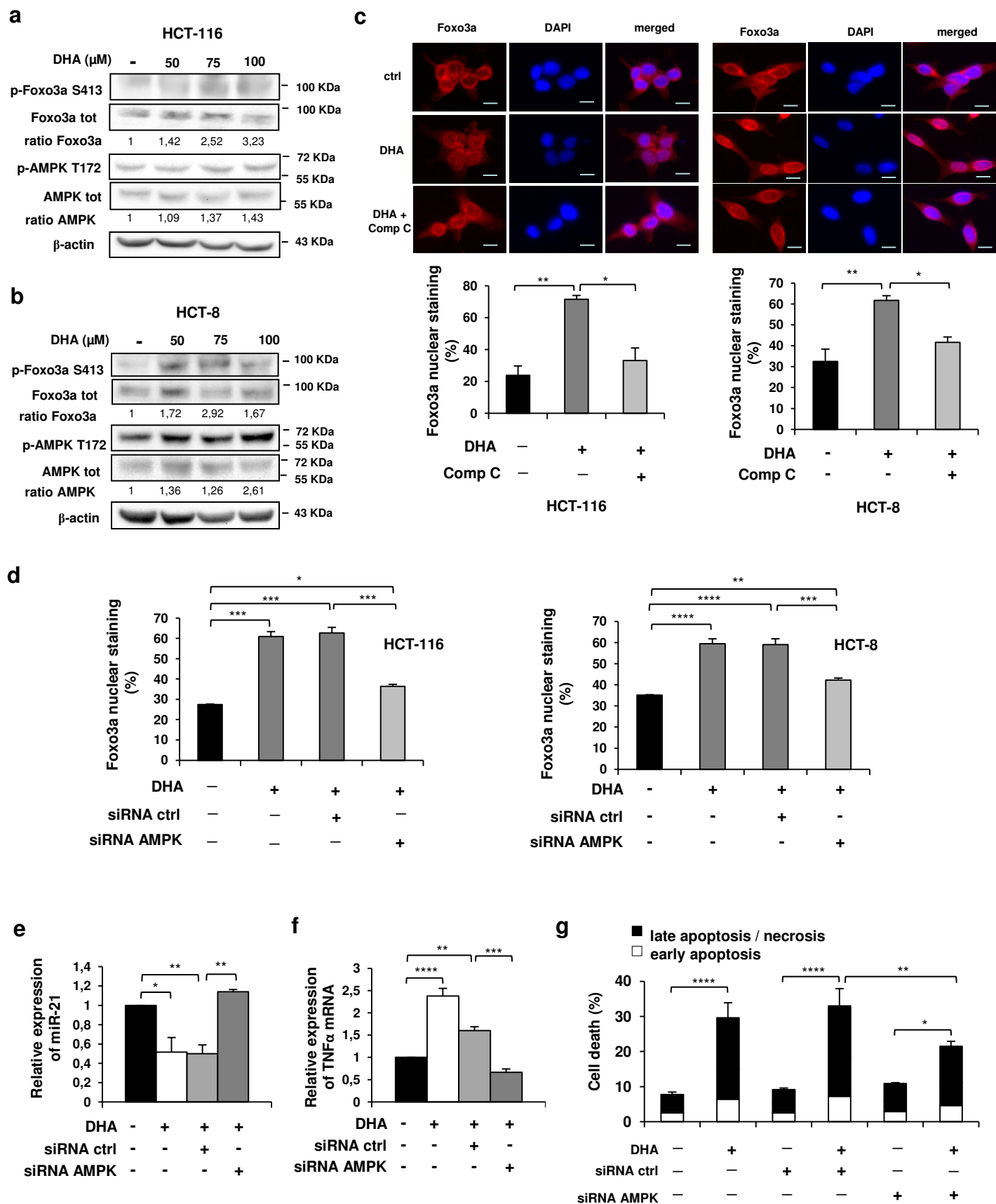


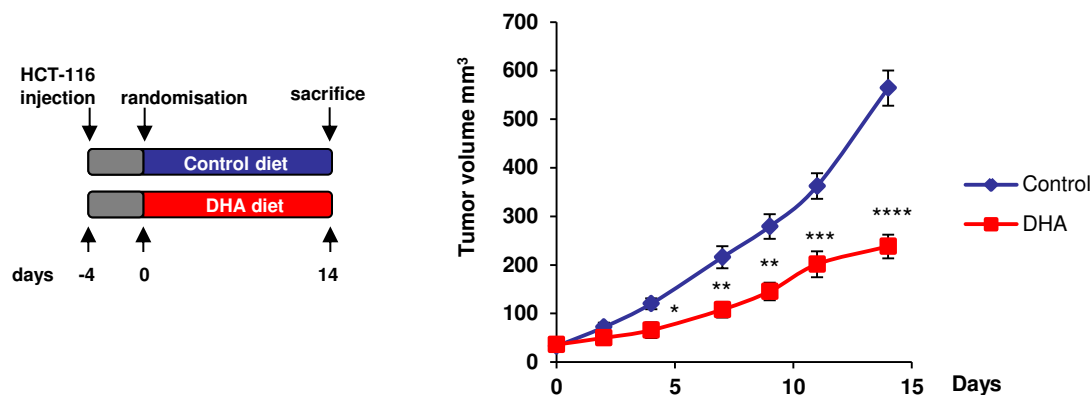
Figure 5. DHA-triggered AMPK α activation regulates Foxo3a nuclear translocation. (a) and (b), analysis of p-AMPK α (T172), total AMPK α , p-Foxo3a (S413) and total Foxo3a expression by western-blotting in HCT-116 (a) and HCT-8 (b) cells treated with DHA (50, 75 and 100 μ M) for 4 or 6 hours respectively. (c), subcellular distribution of Foxo3a in HCT-116 and HCT-8 treated with AMPK inhibitor (Comp C, 0.25 μ M) and treated with DHA (100 μ M) for 4 hours (Scale bar = 10 μ m). Foxo3a nuclear distribution (%) was determined with Image J software as described in materials and methods. (d), subcellular distribution of Foxo3a in HCT-116 and HCT-8 transfected with siRNA control (siRNA ctrl) or against AMPK α (siRNA AMPK) and treated with DHA (100 μ M) for 4 hours. Foxo3a nuclear distribution (%) was determined with Image J software as described in materials and methods. (e) and (f), relative miR-21 (e) and TNF α mRNA (f) expression assessed by RT-qPCR in HCT-116 cells transfected with siRNA control (siRNA ctrl) or against AMPK α (siRNA AMPK) followed by DHA treatment for 4 hours. (g), analysis of cell death by Annexin V-7AAD staining in HCT-116 cells transfected with siRNA control or AMPK treated by DHA for 48 hours. Data are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments and compared to control (ctrl) unless otherwise indicated. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

DHA inhibits HCT-116 xenograft tumor growth through TNF α production

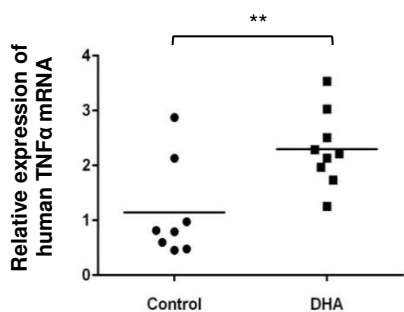
Activity of DHA has been evaluated in nude mice fed either a control (ctrl) or a DHA-enriched diet (DHA) after HCT-116 tumor xenografts were established. The monitoring of colon tumor growth showed that DHA diet limited the growth of implanted HCT-116 cells into nude mice compared to control diet (Figure 6a). The *in vitro* studies underlined the contribution of TNF α and miR-21 in the cytotoxic effects of DHA. Therefore, we analysed the expression of TNF α and miR-21 in tumors of mice treated with control or DHA-enriched diet. In order to discriminate between TNF α production from human malignant cells or mouse tumor microenvironment cells, we designed specific primers for analysis of human or mouse TNF α mRNA expression by RT-qPCR. In tumors from nude mice fed DHA diet, we observed an increase of human TNF α mRNA expression and a decrease of human miR-21 expression compared to tumors from mice fed control diet confirming *in vitro* data (Figures 6b and c). Moreover, mouse TNF α mRNA content evaluated from tumor microenvironment cells did not significantly change with the DHA-enriched diet in comparison with the control diet although a decrease trend has been observed (Figure 6d). To test the role of human TNF α in DHA-mediated tumor growth inhibition, we administered neutralizing anti-human TNF α (anti-TNF α) or control IgG (IgG) in tumor-bearing mice fed a DHA diet. The control IgG injection in mice fed DHA-enriched diet reduced tumor growth as well as mice fed DHA-enriched diet whereas blocking anti-human TNF α administration abolished the anti-tumor action of DHA-enriched diet (Figure 6e). It is noteworthy that anti-TNF α alleviated the anti-tumoral effect of DHA diet as long as anti-TNF α has been daily injected. Altogether these observations clearly demonstrated that DHA exerted anti-cancer activity through colon cancer cell-derived TNF α production.

Figure 6: DHA inhibits HCT-116 xenograft tumor growth through colon cancer cell-derived TNF α production

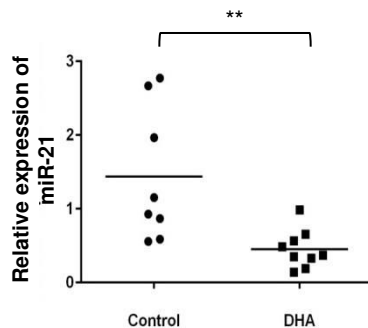
a



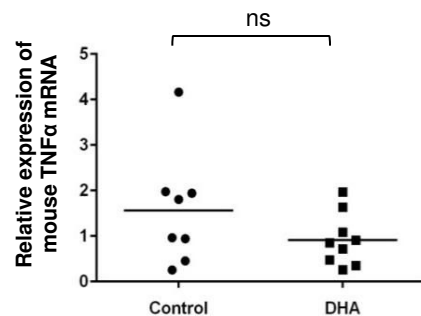
b



c



d



e

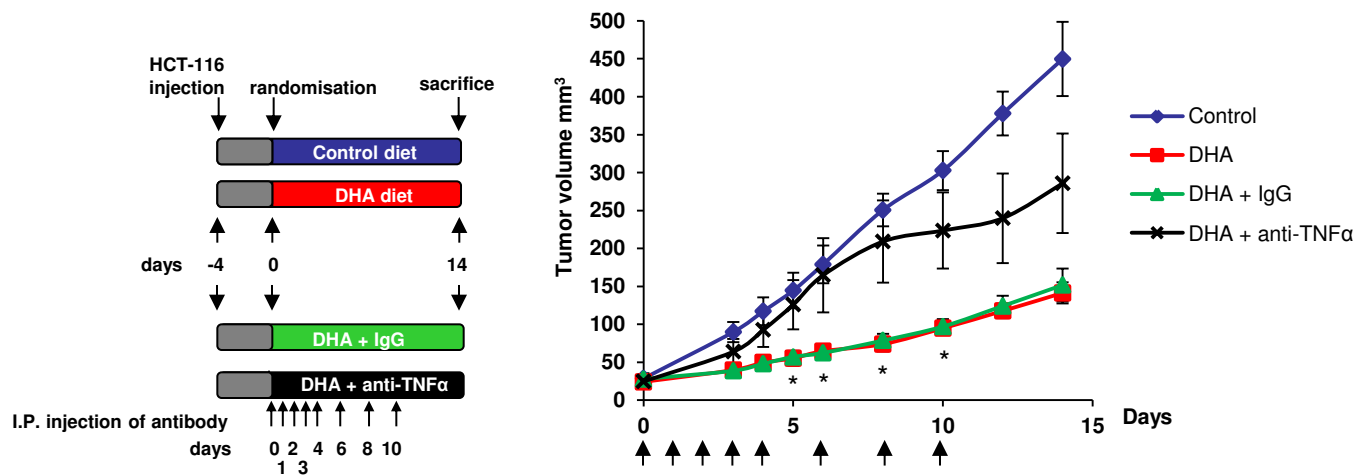


Figure 6. DHA inhibits HCT-116 xenograft tumor growth through colon cancer cell-derived TNF α production. (a), monitoring of established HCT-116 xenograft tumor in athymic nude mice fed a control diet (n=8, blue) or DHA-enriched diet (n=9, red). (b), (c) and (d), relative expression of human TNF α mRNA (b), human miR-21 (c) and mouse TNF α mRNA (d) analyzed by RT-qPCR in HCT-116 xenograft tumor tissues from mice fed a control diet or DHA-enriched diet. (e), analysis of HCT-116 xenograft tumor growth in athymic nude mice (n=6 per group) fed control diet (blue) or DHA-enriched diet (red) with intra-peritoneal injections (indicated with arrow) of 100 μ g control IgG (green) or anti-human TNF α antibody (anti-TNF α) (black). Data are expressed as the mean \pm S.E.M and compared to control (ctrl) unless otherwise indicated. * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001; **** p<0.0001; ns= non-significant.

Discussion

A large body of evidence sustains the fact that inflammation is associated with carcinogenesis and cancer progression, especially in colorectal cancer^{2-5, 33}. However, the contribution of TNF α to the physiopathology of the disease remains unclear and conflicting. Indeed, TNF α is a multifunctional cytokine acting on immune cells, vasculature and cancer cells and is a major mediator of inflammation with pro- and anti-tumor properties. Literature reports an increase of circulating TNF α in colitis-associated cancer and the global neutralization of TNF α reduces colon tumor formation in chronic inflammatory mouse model¹⁷. However, TNF α production by tumor-associated myeloid cells activated with polyI:C or local TNF α administration suppresses tumor growth^{34, 35}. We showed here that DHA induced TNF α production and secretion by malignant cells that might generate both an unfavourable tumor microenvironment affecting infiltrated cell properties and triggering the autocrine TNF α production-mediated colon cancer cell death (Figures 1h-i and Figure 6e). Functional TNF α signaling in HCT-116 and HCT-8 colon cancer cells allowed a cytotoxic action through cancer cell-derived TNF α production which might be amplified by increased expression of TNF-RI previously described in DHA-treated colon cancer cells^{21, 25, 36, 37}. Therefore, a role of RIP1 in DHA-mediated cell death through autocrine TNF α action was not surprising. However, we found that the increase of TNF α mRNA content in DHA-treated colon cancer cells occurred via RIP1 activation suggesting a feedforward loop. A transcriptional regulation of TNF α in a RIP1 dependent manner but independent of canonical NF- κ B pathway has been demonstrated in cancer cells treated with a compound isolated from fungus (neoalbaconol) or with a pan-caspase inhibitor both activating necroptosis^{38, 39}. In our study, we evidenced that DHA treatment induced caspase-dependent apoptosis

instead of necroptosis since zVAD-FMK addition prevented DHA-mediated cell death (Supplementary Figures S1A and B). DHA treatment triggered caspase 8 activation which induced apoptosis commitment and likely blocked necroptosis through cleavage of key substrates involved in necroptosis program^{24, 40, 41}. Moreover, we were interested in the role of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in DHA-mediated apoptosis. PPARs exist under three isoforms (PPAR γ , PPAR α and PPAR β/δ) which are DHA-activated nuclear receptors⁴² and whose expression could be controlled by DHA^{43, 44}. In A549 lung and MCF-7 breast cancer cells, the inactivation of PPAR γ counteracted the pro-apoptotic program induced by DHA^{45, 46}. Nevertheless, we confirmed a previous study evidencing that PPAR γ is not involved in DHA-mediated colon cancer cell death²⁵. Similarly, PPAR α and PPAR β/δ did not seem to be involved in pro-apoptotic effect of DHA in colon cancer cells (Supplementary Figures S5). Therefore, DHA-induced apoptosis in colon cancer cells would be independent of PPARs.

The anti-proliferative effect of DHA is not a common feature of unsaturated fatty acids. Indeed, oleic acid (OA) belonging to ω -9 family or linoleic (LA) and arachidonic (AA) acids belonging to ω -6 family did not exert any anti-proliferative action in colon cancer cells in the present cell culture conditions. It is noteworthy that previous studies already reported the effects of ω -3 and ω -6 PUFA on proliferation of cancer cells. They observed anti-proliferative action on colon, breast, lung and prostate cancer cells of fatty acids of both family which would depend on cell types and concentration of fatty acids⁴⁷⁻⁵¹. However, studies on regulation of CRC by dietary fats showed that ω -3 and ω -6 PUFA-enriched diets exerted different action on tumor growth as we observed in vitro on colon cancer cell growth. Indeed, ω -6 PUFA-

enriched diet promoted colon cancer development whereas OA or DHA reduced colon cancer growth⁵².

The opposite effect of ω -3 and ω -6 PUFA on CRC would involve a different regulation of inflammatory status. PUFA of ω -3 family especially DHA have anti-inflammatory properties associated with anti-cancer action^{11, 12, 53}. Thus, administration of DHA on colon cancer cells led to a decreased expression of pro-inflammatory cytokines (IL-6 and IL-8). However, the induction of TNF α expression highlights a discrepancy in the regulation of the inflammatory status in DHA-treated colon cancer cells. Indeed, we found that regulation of TNF α bypassed the DHA-activated anti-inflammatory program through a post-transcriptional regulation dependent on miR-21 expression (Figures 1e-f and Figures 2f-g).

Such microRNA binds to the 3'-untranslated region of the target mRNA and triggers a repression of translation or degradation of the mRNA²⁷. Zhang X. et al. showed that the oncomiR miR-21 targets TNF α mRNA limiting the production of TNF α protein and promoting transformation of genotoxic-damaged cells underlying a pro-tumoral action of miR-21 and a subsequent loss of anti-tumoral action of TNF α ³⁰. Thereby, aberrant increase in expression of miR-21 has been found in CRC tissues from two different cohorts and a positive association between expression of miR-21 and pro-inflammatory cytokines (IL-6, IL-8) has been observed⁵⁴. Unlike IL-6 and IL-8, TNF α expression has been shown to be decreased in CRC tissues from the same cohorts while miR-21 expression increased without significant negative association with TNF α expression⁵⁴. Although consistent data reported increase expression of miR-21, it is noteworthy that there are inconsistent results for TNF α expression in CRC tissues since increase of TNF α expression has also been reported^{17, 55}. Therefore, miR-21 appears as a good candidate target for anticancer action and the essential

role of miR-21 in colon cancer cell proliferation has been already described with miR-21 inhibitor reducing xenograft tumor growth what we were able to mimic in athymic nude mice bearing tumors fed a DHA-enriched diet⁵⁶.

Although NF- κ B plays a central role in the transcriptional activation of pro-inflammatory program and miR-21 expression, we focused our study on Foxo3a-dependent regulation of miR-21 expression⁵⁷. We observed that DHA treatment led to Foxo3a nuclear translocation allowing transcriptional repression of miR-21 expression (Figures 4a-d). The suppression of Foxo3a expression with siRNA abolished the DHA-mediated down-regulation of miR-21 expression confirming a previous study that described the negative regulation of miR-21 promoter activity with increased binding of Foxo3a on its response elements in doxorubicin-treated lung cancer cells³¹. However, we were not able to show that an enforced Foxo3a-TM (a mutated nuclear-targeted Foxo3a) expression regulated miR-21 expression in HCT-116 (Supplementary Figure S6A) suggesting that DHA would coordinate different pathways in order to repress miR-21 expression. The transcriptional function of Foxo3a depends on its nuclear translocation and activation controlled by kinases inducing phosphorylation on different residues⁵⁸. Since we showed that RIP1 is involved in miR-21 regulation by DHA and that Foxo3a participated to such regulation, we postulated that RIP1 could control the Foxo3a nuclear translocation. Although RIP1 partially contributed to the regulation of Foxo3a nuclear translocation in HCT-116, a RIP1-dependent mechanism was not observed in HCT-8 (Supplementary Figures S4A and B). Instead, we found that AMPK α is activated by DHA treatment and induced AMPK α -dependent Foxo3a nuclear translocation which contributes to inhibition of miR-21 transcription and increase of TNF α mRNA expression. The role of AMPK α in Foxo3a regulation has been first

described as a transcriptional regulation activity through phosphorylation on Ser413 of Foxo3a under nutrient deprivation without affecting subcellular distribution³². However, recent data confirmed our observation that AMPK α controls Foxo3a subcellular localization. Indeed, Chou *et al.* showed that AMPK α activation by OSU53 induced Foxo3a nuclear distribution and suggested that this event depended on AKT regulation⁵⁹. The literature reported that DHA inhibits AKT signaling by regulation of its phosphorylation status and by change of its subcellular localization^{60, 61}. Therefore, Foxo3a nuclear translocation dependent on DHA-activated AMPK α might be through regulation of AKT and the regulation of the transcriptional activity through a direct action of AMPK α on Foxo3a. Activation of AMPK α pathway in DHA-treated cells might originate from reactive oxygen species (ROS) overproduction as already described^{62, 63}. We analysed generation of ROS with CM-H2CDF and DHE at early time points and did not find ROS overproduction in DHA-treated cells (Supplementary Figures S7A-D) excluding a role of ROS in activation of AMPK α triggering production of TNF α through Foxo3a and miR-21 regulation. Although ROS overproduction were not detected in cells exposed to DHA for 30 minutes to 5 hours, we observed lipid peroxidation accumulation at 3 hours of treatment (Supplementary Figure S7E). DHA has a great number of double bonds that would increase its susceptibility to endogenous peroxidation⁶⁴ via ROS generated by basal metabolism of cancer cells. Lipid peroxidation has been observed in cancer cells treated by DHA⁵⁰ and could result from anti-oxidant response alteration such as inhibition of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (GPX4)⁶⁵ which has been shown to trigger lipid peroxidation before ROS detection⁶⁶. We showed that abolition of lipid peroxidation with α -tocopherol in DHA-treated cells did not prevent either AMPK α activation or increase of TNF α expression (Supplementary Figures S7F-G) indicating

that activation of AMPK α pathway leading to TNF α induction was independent of lipid peroxide generation. Further investigations are needed to determine the mechanism that initiates activation of AMPK α pathway in DHA-treated colon cancer cells.

In summary, our work describes for the first time a regulation of Foxo3a-miR-21 signaling pathway by RIP1 and AMPK α controlling the production of TNF α in DHA-treated colon cancer cells leading to apoptosis and inhibition of tumor growth.

Materials and methods

Cell culture conditions

Human colorectal carcinoma HCT-116 and HCT-8 cells were obtained from the American Type Culture Collection and maintained in DMEM or RPMI supplemented with 6% and 10% heat inactivated fetal bovine serum respectively. Cell lines were authenticated by examination of morphology and growth characteristics and confirmed to be mycoplasma free. Cells were treated with fatty acids bound to fatty acid free-bovine serum albumin (ratio 4:1) (BSA, Sigma-Aldrich). Docosahexaenoic acid (DHA, C22:6 n-3), oleic acid (OA, C18:1 n-9), linoleic acid (LA, C18:2 n-6) were purchased from Sigma-Aldrich (USA). Necrostatin-1 (Nec-1) and compound C (Comp C) applied at 10 μ M and 0.5 μ M respectively were from Sigma-Aldrich (USA).

Cell proliferation assay

Cell proliferation analysis was carried out using CyQuant® NF cell proliferation assay (Invitrogen) as previously described⁶⁷.

Cell death analysis

Cell death was determined by APC-Annexin V and 7-amino-actinomycin D (7AAD) staining with BioLegend's APC-Annexin V Apoptosis Detection Kit and analysed by flow cytometry (FACSCalibur, Becton Dickinson). Cells with APC-AnnexinV⁺-7AAD⁻ staining were considered as cells in early-stage apoptosis whereas cells with Annexin V⁺-7AAD⁺ or Annexin V⁻-7AAD⁺ staining were identified as cells in late-stage apoptosis or necrosis.

Caspase 8 activity

Colon cancer cells treated for 48 hours with indicated concentrations of DHA were collected and analysed with FAM-FLICA™ Caspase 8 Assay Kit (Immunochemistry Technologies).

siRNA and pre-miR transfection

Cells were transfected with siRNA against human Foxo3a (siRNA Foxo3a), human RIP1 (siRNA RIP1), human AMPK α (siRNA AMPK) and negative control siRNA (siRNA ctrl) purchased from Ambion (Life Technologies) and Santa-Cruz Biotechnology using Oligofectamine (Invitrogen). Human pre-miR-21 (miR-21 mimic) and pre-miR control (ctrl mimic) obtained from Ambion were transfected using Oligofectamine (Invitrogen). Treatment with fatty acid was performed 24 hours post-transfection.

RNA purification and RT-qPCR

Total RNA was extracted with Trizol (Invitrogen) and reverse transcribed with M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen) for analysis of mRNA expression or with TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Invitrogen) for analysis of microRNA expression. Real-time RT-qPCR was performed with iQSYBR Green supermix (Bio-Rad) for mRNA expression analysis and TaqMan® Universal PCR Master Mix II for microRNA expression analysis using a StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems). The sequence of primers is indicated in Supplementary Table S1. Expression was normalized to β -actin for mRNA or RNU48 for microRNA. Relative expression of RNA targets was determined using the comparative $\Delta\Delta C_t$ method.

Immunoblotting analysis

Immunoblotting was carried out as previously described⁶⁷. In brief, total protein extracts were resolved by SDS-PAGE and analysed by western-blotting with the following antibodies: anti-Foxo3a (H-144) from Santa-Cruz Biotechnologies, anti-RIP1 from BD Biosciences, anti- β -actin from Sigma-Aldrich, anti-phospho-AMPK α (Thr172), anti-AMPK α , anti-phospho-Foxo3a (Ser413), HRP-conjugated anti-mouse and anti-rabbit from Cell Signaling Technology.

Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) analysis

Cells were fixed with 1% formaldehyde at room temperature for 10 minutes and quenched with 0.125 M glycine. Chromatin was isolated and sonicated into chromatin fragments with an average length of 100–500 bp. DNA was immunoprecipitated with anti-Foxo3a (Santa Cruz Biotechnology). After chromatin elution, crosslinking was reversed and PCR was performed to amplify Foxo3a binding sites (BS1 and BS2) of the human miR-21 promoter. PCR amplification with inputs was used for normalization. Data were expressed in fold change occupancy for DHA treatment relative to control (ctr) treatment. Primers are listed in Supplementary Table S1.

Dual-Luciferase reporter assay

Cells were transfected with the 3'-UTR sequence of TNF α into psiCheck luciferase vector (generously provided by Dr Wang) and with *Renilla* luciferase vector using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) and treated 24 hours post-transfection with DHA for 6 hours. Cells were harvested and luciferase activities were analysed with the Dual

Glo Luciferase Reporter Assay kit (Promega) using a Perkin Elmer Victor 3 Model 1420 Multi-label Microplate Reader.

Immunofluorescence staining

The cells were fixed with 4% paraformaldehyde solution for 10 min at 4°C. Samples were incubated overnight at 4°C with rabbit polyclonal anti-Foxo3a (H-144) followed with incubation with Alexa568-coupled anti-rabbit antibody. Cell nuclei were stained with DAPI (Duo82040, Sigma-Aldrich). Microscopy images were taken on an Axio Imager 2 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany) equipped with an Apotome.2 module (Carl Zeiss GmbH). Images were acquired using an AxioCam MRm monochrome CCD camera (Carl Zeiss GmbH) with filter sets 43 HE (Rhodamine/Alexa568) and 49 (DAPI). Quantitative Foxo3a nuclear staining was analysed with Image J software. Image masks were created for Foxo3a and DAPI positive staining to determine regions of interest (ROI). Nuclear ROI was defined by DAPI staining mask. With the Image Calculator, we quantified Foxo3a immunofluorescence intensity in nuclear ROI and obtained a percentage of nuclear Foxo3a staining over total cellular Foxo3a staining in a cell. Unless otherwise specified, three independent experiments were used to calculate the mean % of nuclear Foxo3a staining with at least 100 cells per experiment.

TNF α secretion analysis

Cell culture supernatants of colon cancer cells treated for 14 hours with indicated concentrations of DHA were collected and analysed with Human TNF- α ELISA MAX™ Standard kit (Biolegend) according to the manufacturer's protocol.

Xenograft tumor growth experiments

Mice were bred and maintained according to both the Federation of Laboratory Animal Science Associations and the Animal Experimental Ethics Committee Guidelines (University of Burgundy, Dijon, France). In order to induce tumor formation, 10^6 HCT-116 colon cancer cells were subcutaneously injected into male athymic nude mice (Charles River Laboratories, France). Once tumors were measurable, tumor-bearing mice were randomly assigned to either a group of mice fed a control diet containing sunflower oil or a group of mice fed a DHA-enriched diet containing Omegavie DHA90 TG (Polaris Nutritional Lipids)¹². The tumor volume was calculated as follows: larger diameter \times (smaller diameter)²/2. Human TNF α neutralization was achieved by daily intraperitoneal (IP) injection of 100 μ g of control IgG or anti-human TNF α (#1825; R&D systems) on day 0 to 5 after assignment of mice to control or DHA-enriched diet group and then every two days.

Statistical analysis

Statistical analysis was conducted using GraphPad Prism software. Results were presented as mean \pm SD. As applicable, Student's *t* test or the Mann-Whitney *U* test were used for pairwise comparisons whereas one-way ANOVA was used to compare multiple groups.

Conflict of interest

The authors disclose no potential conflicts of interest.

Aknowledgements

The authors would like to thank the lipidomic platform and the flow cytometry platform facilities of Université de Bourgogne. The present work was supported by Ligue contre le cancer comité Grand-Est and by a French Government grant managed by the French National Research Agency under the program “Investissements d’Avenir” with reference ANR-11-LABX-0021 (Lipstic Labex).

References

1. Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology* 2010; 138: 2044-2058.
2. Beaugerie L, Itzkowitz SH. Cancers complicating inflammatory bowel disease. *The New England journal of medicine* 2015; 372: 1441-1452.
3. Brenner H, Kloor M, Pox CP. Colorectal cancer. *Lancet* 2014; 383: 1490-1502.
4. Krzystek-Korpacka M, Diakowska D, Kapturkiewicz B, Bebenek M, Gamian A. Profiles of circulating inflammatory cytokines in colorectal cancer (CRC), high cancer risk conditions, and health are distinct. Possible implications for CRC screening and surveillance. *Cancer letters* 2013; 337: 107-114.
5. Maihofner C, Charalambous MP, Bhambra U, Lightfoot T, Geisslinger G, Gooderham NJ. Expression of cyclooxygenase-2 parallels expression of interleukin-1beta, interleukin-6 and NF-kappaB in human colorectal cancer. *Carcinogenesis* 2003; 24: 665-671.
6. Anti M, Marra G, Armelao F, Bartoli GM, Ficarelli R, Percesepe A *et al.* Effect of omega-3 fatty acids on rectal mucosal cell proliferation in subjects at risk for colon cancer. *Gastroenterology* 1992; 103: 883-891.
7. Bartoli GM, Palozza P, Marra G, Armelao F, Franceschelli P, Luberto C *et al.* n-3 PUFA and alpha-tocopherol control of tumor cell proliferation. *Molecular aspects of medicine* 1993; 14: 247-252.
8. Anti M, Armelao F, Marra G, Percesepe A, Bartoli GM, Palozza P *et al.* Effects of different doses of fish oil on rectal cell proliferation in patients with sporadic colonic adenomas. *Gastroenterology* 1994; 107: 1709-1718.
9. Cockbain AJ, Toogood GJ, Hull MA. Omega-3 polyunsaturated fatty acids for the treatment and prevention of colorectal cancer. *Gut* 2012; 61: 135-149.
10. Bathen TF, Holmgren K, Lundemo AG, Hjelstuen MH, Krokan HE, Gribbestad IS *et al.* Omega-3 fatty acids suppress growth of SW620 human colon cancer xenografts in nude mice. *Anticancer research* 2008; 28: 3717-3723.
11. Calviello G, Di Nicuolo F, Gragnoli S, Piccioni E, Serini S, Maggiano N *et al.* n-3 PUFAs reduce VEGF expression in human colon cancer cells modulating the COX-2/PGE2 induced ERK-1 and -2 and HIF-1alpha induction pathway. *Carcinogenesis* 2004; 25: 2303-2310.
12. Berger H, Vegran F, Chikh M, Gilardi F, Ladoire S, Bugaut H *et al.* SOCS3 transactivation by PPARgamma prevents IL-17-driven cancer growth. *Cancer research* 2013; 73: 3578-3590.
13. Gravaghi C, La Perle KM, Ogrodowski P, Kang JX, Quimby F, Lipkin M *et al.* Cox-2 expression, PGE(2) and cytokines production are inhibited by endogenously

- synthesized n-3 PUFAs in inflamed colon of fat-1 mice. *The Journal of nutritional biochemistry* 2011; 22: 360-365.
14. Liang B, Wang S, Ye YJ, Yang XD, Wang YL, Qu J *et al.* Impact of postoperative omega-3 fatty acid-supplemented parenteral nutrition on clinical outcomes and immunomodulations in colorectal cancer patients. *World journal of gastroenterology : WJG* 2008; 14: 2434-2439.
 15. Yao L, Han C, Song K, Zhang J, Lim K, Wu T. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Upregulate 15-PGDH Expression in Cholangiocarcinoma Cells by Inhibiting miR-26a/b Expression. *Cancer research* 2015; 75: 1388-1398.
 16. Naylor MS, Stamp GW, Balkwill FR. Investigation of cytokine gene expression in human colorectal cancer. *Cancer research* 1990; 50: 4436-4440.
 17. Popivanova BK, Kitamura K, Wu Y, Kondo T, Kagaya T, Kaneko S *et al.* Blocking TNF-alpha in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis. *The Journal of clinical investigation* 2008; 118: 560-570.
 18. Zins K, Abraham D, Sioud M, Aharinejad S. Colon cancer cell-derived tumor necrosis factor-alpha mediates the tumor growth-promoting response in macrophages by up-regulating the colony-stimulating factor-1 pathway. *Cancer research* 2007; 67: 1038-1045.
 19. Balkwill FR, Lee A, Aldam G, Moodie E, Thomas JA, Tavernier J *et al.* Human tumor xenografts treated with recombinant human tumor necrosis factor alone or in combination with interferons. *Cancer research* 1986; 46: 3990-3993.
 20. Kreeger PK, Mandhana R, Alford SK, Haigis KM, Lauffenburger DA. RAS mutations affect tumor necrosis factor-induced apoptosis in colon carcinoma cells via ERK-modulatory negative and positive feedback circuits along with non-ERK pathway effects. *Cancer research* 2009; 69: 8191-8199.
 21. Wang P, Qiu W, Dudgeon C, Liu H, Huang C, Zambetti GP *et al.* PUMA is directly activated by NF-kappaB and contributes to TNF-alpha-induced apoptosis. *Cell death and differentiation* 2009; 16: 1192-1202.
 22. Cianchi F, Papucci L, Schiavone N, Lulli M, Magnelli L, Vinci MC *et al.* Cannabinoid receptor activation induces apoptosis through tumor necrosis factor alpha-mediated ceramide de novo synthesis in colon cancer cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2008; 14: 7691-7700.
 23. Petersen SL, Wang L, Yalcin-Chin A, Li L, Peyton M, Minna J *et al.* Autocrine TNFalpha signaling renders human cancer cells susceptible to Smac-mimetic-induced apoptosis. *Cancer cell* 2007; 12: 445-456.
 24. Ofengeim D, Yuan J. Regulation of RIP1 kinase signalling at the crossroads of inflammation and cell death. *Nature reviews Molecular cell biology* 2013; 14: 727-736.

25. Giros A, Grzybowski M, Sohn VR, Pons E, Fernandez-Morales J, Xicola RM *et al.* Regulation of colorectal cancer cell apoptosis by the n-3 polyunsaturated fatty acids Docosahexaenoic and Eicosapentaenoic. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa)* 2009; 2: 732-742.
26. Biton S, Ashkenazi A. NEMO and RIP1 control cell fate in response to extensive DNA damage via TNF-alpha feedforward signaling. *Cell* 2011; 145: 92-103.
27. van Kouwenhove M, Kedde M, Agami R. MicroRNA regulation by RNA-binding proteins and its implications for cancer. *Nature reviews Cancer* 2011; 11: 644-656.
28. Farago N, Feher LZ, Kitajka K, Das UN, Puskas LG. MicroRNA profile of polyunsaturated fatty acid treated glioma cells reveal apoptosis-specific expression changes. *Lipids in health and disease* 2011; 10: 173.
29. Gil-Zamorano J, Martin R, Daimiel L, Richardson K, Giordano E, Nicod N *et al.* Docosahexaenoic acid modulates the enterocyte Caco-2 cell expression of microRNAs involved in lipid metabolism. *The Journal of nutrition* 2014; 144: 575-585.
30. Zhang X, Ng WL, Wang P, Tian L, Werner E, Wang H *et al.* MicroRNA-21 modulates the levels of reactive oxygen species by targeting SOD3 and TNFalpha. *Cancer research* 2012; 72: 4707-4713.
31. Wang K, Li PF. Foxo3a regulates apoptosis by negatively targeting miR-21. *The Journal of biological chemistry* 2010; 285: 16958-16966.
32. Greer EL, Oskoui PR, Banko MR, Maniar JM, Gygi MP, Gygi SP *et al.* The energy sensor AMP-activated protein kinase directly regulates the mammalian FOXO3 transcription factor. *The Journal of biological chemistry* 2007; 282: 30107-30119.
33. Chung H, Lee YS, Mayoral R, Oh DY, Siu JT, Webster NJ *et al.* Omega-3 fatty acids reduce obesity-induced tumor progression independent of GPR120 in a mouse model of postmenopausal breast cancer. *Oncogene* 2014.
34. Al-Zoubi M, Salem AF, Martinez-Outschoorn UE, Whitaker-Menezes D, Lamb R, Hult J *et al.* Creating a tumor-resistant microenvironment: cell-mediated delivery of TNFalpha completely prevents breast cancer tumor formation in vivo. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 2013; 12: 480-490.
35. Shime H, Matsumoto M, Oshiumi H, Tanaka S, Nakane A, Iwakura Y *et al.* Toll-like receptor 3 signaling converts tumor-supporting myeloid cells to tumoricidal effectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012; 109: 2066-2071.
36. Bansal T, Alaniz RC, Wood TK, Jayaraman A. The bacterial signal indole increases epithelial-cell tight-junction resistance and attenuates indicators of inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010; 107: 228-233.

37. Verbeke H, De Hertogh G, Li S, Vandercappellen J, Noppen S, Schutyser E *et al.* Expression of angiostatic platelet factor-4var/CXCL4L1 counterbalances angiogenic impulses of vascular endothelial growth factor, interleukin-8/CXCL8, and stromal cell-derived factor 1/CXCL12 in esophageal and colorectal cancer. *Human pathology* 2010; 41: 990-1001.
38. Christofferson DE, Li Y, Hitomi J, Zhou W, Upperman C, Zhu H *et al.* A novel role for RIP1 kinase in mediating TNFalpha production. *Cell death & disease* 2012; 3: e320.
39. Yu X, Deng Q, Li W, Xiao L, Luo X, Liu X *et al.* Neoalbacinol induces cell death through necroptosis by regulating RIPK-dependent autocrine TNFalpha and ROS production. *Oncotarget* 2015; 6: 1995-2008.
40. O'Donnell MA, Perez-Jimenez E, Oberst A, Ng A, Massoumi R, Xavier R *et al.* Caspase 8 inhibits programmed necrosis by processing CYLD. *Nature cell biology* 2011; 13: 1437-1442.
41. Shalini S, Dorstyn L, Dawar S, Kumar S. Old, new and emerging functions of caspases. *Cell death and differentiation* 2015; 22: 526-539.
42. Varga T, Czimmerer Z, Nagy L. PPARs are a unique set of fatty acid regulated transcription factors controlling both lipid metabolism and inflammation. *Biochimica et biophysica acta* 2011; 1812: 1007-1022.
43. Calviello G, Resci F, Serini S, Piccioni E, Toesca A, Boninsegna A *et al.* Docosahexaenoic acid induces proteasome-dependent degradation of beta-catenin, down-regulation of survivin and apoptosis in human colorectal cancer cells not expressing COX-2. *Carcinogenesis* 2007; 28: 1202-1209.
44. Yu H, Liu Y, Pan W, Shen S, Das UN. Polyunsaturated fatty acids augment tumoricidal action of 5-fluorouracil on gastric cancer cells by their action on vascular endothelial growth factor, tumor necrosis factor-alpha and lipid metabolism related factors. *Archives of medical science : AMS* 2015; 11: 282-291.
45. Martinasso G, Oraldi M, Trombetta A, Maggiora M, Bertetto O, Canuto RA *et al.* Involvement of PPARs in Cell Proliferation and Apoptosis in Human Colon Cancer Specimens and in Normal and Cancer Cell Lines. *PPAR research* 2007; 2007: 93416.
46. Sun H, Berquin IM, Owens RT, O'Flaherty JT, Edwards IJ. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-mediated up-regulation of syndecan-1 by n-3 fatty acids promotes apoptosis of human breast cancer cells. *Cancer research* 2008; 68: 2912-2919.
47. Begin ME, Das UN, Ells G, Horrobin DF. Selective killing of human cancer cells by polyunsaturated fatty acids. *Prostaglandins, leukotrienes, and medicine* 1985; 19: 177-186.

48. Begin ME, Ells G, Das UN, Horrobin DF. Differential killing of human carcinoma cells supplemented with n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *Journal of the National Cancer Institute* 1986; 77: 1053-1062.
49. Béguin ME, Das UN, Ells G. Cytotoxic effects of essential fatty acids (EFA) in mixed cultures of normal and malignant human cells. *Progress in Lipid Research* 1986; 25: 573-576.
50. Das UN. Tumoricidal action of cis-unsaturated fatty acids and their relationship to free radicals and lipid peroxidation. *Cancer letters* 1991; 56: 235-243.
51. Monjazebe AM, High KP, Conroy A, Hart LS, Koumenis C, Chilton FH. Arachidonic acid-induced gene expression in colon cancer cells. *Carcinogenesis* 2006; 27: 1950-1960.
52. Bartoli R, Fernandez-Banares F, Navarro E, Castella E, Mane J, Alvarez M *et al.* Effect of olive oil on early and late events of colon carcinogenesis in rats: modulation of arachidonic acid metabolism and local prostaglandin E(2) synthesis. *Gut* 2000; 46: 191-199.
53. Zou Z, Bellenger S, Massey KA, Nicolaou A, Geissler A, Bidu C *et al.* Inhibition of the HER2 pathway by n-3 polyunsaturated fatty acids prevents breast cancer in fat-1 transgenic mice. *Journal of lipid research* 2013; 54: 3453-3463.
54. Schetter AJ, Nguyen GH, Bowman ED, Mathe EA, Yuen ST, Hawkes JE *et al.* Association of inflammation-related and microRNA gene expression with cancer-specific mortality of colon adenocarcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2009; 15: 5878-5887.
55. Gattolliat CH, Uguen A, Pesson M, Trillet K, Simon B, Doucet L *et al.* MicroRNA and targeted mRNA expression profiling analysis in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 2015; 51: 409-420.
56. Iliopoulos D, Jaeger SA, Hirsch HA, Bulyk ML, Struhl K. STAT3 activation of miR-21 and miR-181b-1 via PTEN and CYLD are part of the epigenetic switch linking inflammation to cancer. *Molecular cell* 2010; 39: 493-506.
57. Zhou R, Hu G, Gong AY, Chen XM. Binding of NF-kappaB p65 subunit to the promoter elements is involved in LPS-induced transactivation of miRNA genes in human biliary epithelial cells. *Nucleic acids research* 2010; 38: 3222-3232.
58. Chiacchiera F, Simone C. The AMPK-FoxO3A axis as a target for cancer treatment. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 2010; 9: 1091-1096.
59. Chou CC, Lee KH, Lai IL, Wang D, Mo X, Kulp SK *et al.* AMPK reverses the mesenchymal phenotype of cancer cells by targeting the Akt-MDM2-Foxo3a signaling axis. *Cancer research* 2014; 74: 4783-4795.

60. Gu Z, Wu J, Wang S, Suburu J, Chen H, Thomas MJ *et al.* Polyunsaturated fatty acids affect the localization and signaling of PIP3/AKT in prostate cancer cells. *Carcinogenesis* 2013; 34: 1968-1975.
61. Chen Z, Zhang Y, Jia C, Wang Y, Lai P, Zhou X *et al.* mTORC1/2 targeted by n-3 polyunsaturated fatty acids in the prevention of mammary tumorigenesis and tumor progression. *Oncogene* 2014; 33: 4548-4557.
62. Cardaci S, Filomeni G, Ciriolo MR. Redox implications of AMPK-mediated signal transduction beyond energetic clues. *Journal of cell science* 2012; 125: 2115-2125.
63. Jung SN, Yang WK, Kim J, Kim HS, Kim EJ, Yun H *et al.* Reactive oxygen species stabilize hypoxia-inducible factor-1 alpha protein and stimulate transcriptional activity via AMP-activated protein kinase in DU145 human prostate cancer cells. *Carcinogenesis* 2008; 29: 713-721.
64. Else PL, Kraffe E. Docosahexaenoic and arachidonic acid peroxidation: It's a within molecule cascade. *Biochimica et biophysica acta* 2015; 1848: 417-421.
65. Ding WQ, Lind SE. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase plays a role in protecting cancer cells from docosahexaenoic acid-induced cytotoxicity. *Molecular cancer therapeutics* 2007; 6: 1467-1474.
66. Seiler A, Schneider M, Forster H, Roth S, Wirth EK, Culmsee C *et al.* Glutathione peroxidase 4 senses and translates oxidative stress into 12/15-lipoxygenase dependent- and AIF-mediated cell death. *Cell metabolism* 2008; 8: 237-248.
67. Pierre AS, Minville-Walz M, Fevre C, Hichami A, Gresti J, Pichon L *et al.* Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid induced cell death in human colon cancer cells through reactive oxygen species-mediated ER stress. *Biochimica et biophysica acta* 2013; 1831: 759-768.

Supplementary Data

Materials and methods

Cell treatments

Cancer cells were treated with AICAR (Sigma-Aldrich, USA) at 1 mM for 4 hours and fenofibrate (50 μ M; a PPAR α agonist, Sigma-Aldrich, USA) for 48 hours. Cancer cells were pre-treated with α -tocopherol (100 μ M), GW9662 (a PPAR γ antagonist, Sigma-Aldrich, USA) at 10 μ M, GW6471 (a PPAR α antagonist, Sigma-Aldrich, USA) at 5 and 20 μ M, ST247 (a PPAR β inverse agonist, Sigma-Aldrich, USA) at 10 μ M, GW0742 (a PPAR β agonist, Sigma-Aldrich, USA) at 1 μ M or zVAD-FMK (Bachem, Germany) at 75 μ M and then treated with DHA (100 μ M) for indicated time.

Expression vector transfection

HCT-116 cells were transfected with Flag-Foxo3a-WT (wild-type) and Flag-Foxo3a-TM expression vectors from Addgene¹ using Lipofectamine 2000 (Invitrogen).

Immunofluorescence staining

Immunofluorescence staining and analysis were performed as described in materials and methods. Samples were incubated with goat polyclonal anti-Foxo3a (ab17026, Abcam) or mouse anti-DYKDDDK Tag (Flag). The secondary antibody Alexa568-coupled anti-goat or anti-mouse were used at a 1/2000 dilution.

Measurement of ROS and TBARS

Colon cancer cells were stained for 30 minutes with 10 μ M of dichlorodihydrofluorescein diacetate (CM-H₂DCFDA; ThermoFisher Scientific) or the dihydroethidium (DHE; ThermoFisher Scientific) at 37°C in the dark and washed twice with PBS for analysis by flow cytometry. The level of intracellular ROS in DHA-treated cells was expressed as the fold change of mean fluorescence intensity (MFI) of DCF and DHE compared to control cells.

Thiobarbituric acid reagents (TBARS) assay was carried out using TBARS assay kit (Interchim). Briefly, 500.10³ colon cancer cells were collected and homogenized on ice. Lysate was incubated with 1% trichloroacetic acid (TCA) and 0.4% thiobarbituric acid (TBA) in acid conditions at 95°C for 1 hour and placed in ice to block the reaction. TBARS formed were measured colorimetrically at 530-540 nm.

Table 1. Sequence of primers used in this study.

Figure S1. A and B, cell death analysis by Annexin V-7AAD staining in HCT-116 and HCT-8 cells treated with DHA (100 μ M) for 48 hours in presence of zVAD-FMK (a broad-spectrum caspase inhibitor).

Figure S2. A and B, analysis of RIP1 expression by western-blotting in HCT-116 (A) and HCT-8 (B) cells transfected with siRNA ctrl or siRNA RIP1. Total protein lysates were collected 24 hours post-transfection with siRNA and treated with control or DHA and analyzed for RIP1 expression.

Figure S3. A and B, analysis of Foxo3a expression by western-blotting in DHA-treated HCT-8 (A) and HCT-116 (B) cells at indicated concentrations for 6 hours or 4 hours respectively. C, subcellular distribution of Foxo3a in DHA-treated HCT-116 cells for 4 hours analyzed by immunofluorescence with goat polyclonal anti-Foxo3a (Scale bar = 10 μ m). Foxo3a nuclear distribution (%) was determined with Image J software as described in materials and methods. D, subcellular distribution of Foxo3a analyzed by immunofluorescence with mouse anti-Flag in HCT-116 cells transfected with Flag-Foxo3a expression vector and treated with DHA for 4 hours (Scale bar = 10 μ m). E and F, Foxo3a expression analysis by western-blotting in HCT-116 and HCT-8 cells transfected siRNA control (ctrl) and Foxo3a (siRNA Foxo3a) for 24 hours and then treated with DHA for 6 hours. Data are expressed as the mean \pm SD of two independent experiments compared to control (ctrl). *** $p < 0.001$.

Figure S4. A and B, Foxo3a subcellular distribution analyzed by immunofluorescence in HCT-116 (A) and HCT-8 (B) cells co-treated with Nec-1 and DHA for 4 hours. Foxo3a nuclear distribution (%) was determined with Image J software as described in materials and methods. C, subcellular distribution of Foxo3a analyzed by immunofluorescence in HCT-116 cells treated with DHA (100 μ M) or AMPK activator (AICAR, 1 mM) for 4 hours (Scale bar= 10 μ m). D, analysis of AMPK α expression evaluated by western-blotting in HCT-116 cells transfected with siRNA ctrl or siRNA AMPK α . Total protein lysates were collected 24 hours post-transfection with siRNA and treated with control or DHA and analyzed for AMPK α expression. E and F, analysis of relative miR-21 (E) and TNF α mRNA (F) expression evaluated by RT-qPCR in HCT-116 cells co-treated with AMPK inhibitor (Comp C, 0.25 μ M) and DHA (100 μ M) for 4 hours. G and H, analysis of cell death by annexin

V-7AAD staining in HCT-116 and HCT-8 cells co-treated with AMPK inhibitor (Comp C, 0.25 μ M) and DHA (100 μ M) for 48 hours. Data are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments and compared to control (ctrl) unless otherwise indicated. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; ns=non-significant.

Figure S5. A, cell death analysis by annexin V-7AAD staining in HCT-116 treated for 48 hours with DHA (100 μ M) and GW9662 (10 μ M). B, cell death analysis by annexin V-7AAD staining in HCT-116 treated for 48 hours with fenofibrate (50 μ M) or with DHA (100 μ M) and GW6471 (5 and 20 μ M). C, cell death analysis by annexin V-7AAD staining in HCT-116 treated for 48 hours with DHA (100 μ M) and ST247 (10 μ M) or GW0742 (1 μ M).

Figure S6. Relative miR-21 expression assessed by RT-qPCR in HCT-116 cells transfected with Foxo3a-WT and Foxo3a-TM (triple mutated Foxo3a) expression vector for 24 hours. Data are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments.

Figure S7. AMPK α activation is independent of ROS and lipid peroxidation. (A) and (B), analysis of ROS production with CM-H₂DCF in HCT-116 (A) and HCT-8 (B) treated with DHA (100 μ M) for indicated times. Cells were treated with antimycin A used as positive control. (C) and (D), analysis of superoxide production with DHE in HCT-116 (C) and HCT-8 (D) treated with DHA (100 μ M) for indicated times. Cells were treated with antimycin A used as positive control. (E), analysis of lipid peroxidation. HCT-116 cells were treated for indicated times with DHA (100 μ M) in absence or presence of α -tocopherol. Quantification of TBARS were performed with 500.10³ HCT-116 cells. (F), analysis of p-AMPK α (T172) and total AMPK α expression by western-blotting in HCT-116 cells treated with DHA (100 μ M) for 3 hours in absence or presence of α -tocopherol (100 μ M). (G), analysis of TNF α mRNA expression assessed by RT-qPCR in HCT-116 cells treated for 4 hours with DHA (100 μ M) in absence or presence of α -tocopherol (100 μ M). Data are expressed as the mean \pm SD of four independent experiments and compared to control (ctrl). * $p < 0.05$.

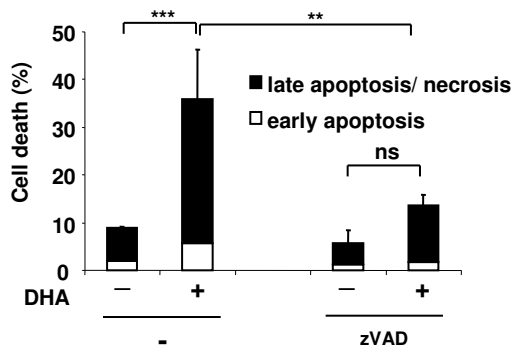
1. Ramaswamy S, Nakamura N, Sansal I, Bergeron L, Sellers WR. A novel mechanism of gene regulation and tumor suppression by the transcription factor FKHR. *Cancer cell* 2002; **2**: 81-91.

Supplementary table 1

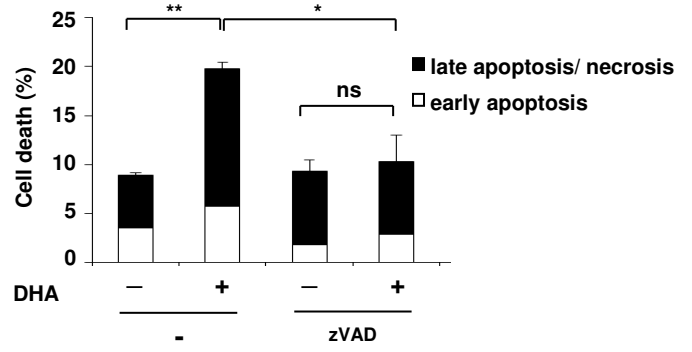
	Forward	Reverse
human TNFα	5'-CCC AGG GAC CTC TCT CTA ATC A-3'	5'-AGC TGC CCC TCA GCT TGA G-3'
human IL-6	5'-AGG AGA CTT GCC TGG TGA AA -3'	5'-GTC AGG GGT GGT TAT TGC AT -3'
human IL-8	5'-AGG TGC AGT TTT GCC AAG GA-3'	5'-TTT CTG TGT TGG CGC AGT GT-'3
human β-actin	5'-AGCCTGCCTTTGCCGA-3'	5'-CTGGTGCCTGGGGCG-3'
mouse TNFα	5'-GGCAGGTCTACTTTGGAGTCATTGC-3'	5'-ACATTGAGGCTCCAGTGAATTCCGG-3'
mouse β-actin	5'-ATGGAGGGGAATACAGCCC-3'	5'-TTCTTTGCAGCTCCTTCGTT-3'
BS1 Foxo3a	5'-AAACCAAGGCTCTTACCATAGC-3'	5'-CATTGCACTCCAACCTGGGCAA-3'
BS2 Foxo3a	5'-CTCTGGTTTCAACAGACACAAA-3'	5'-TCTGGCCTGTTAAGATCGAACC-3'

Supplementary Figure S1

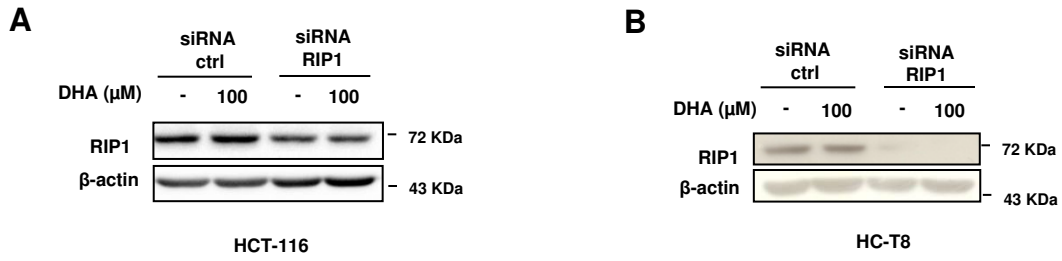
A



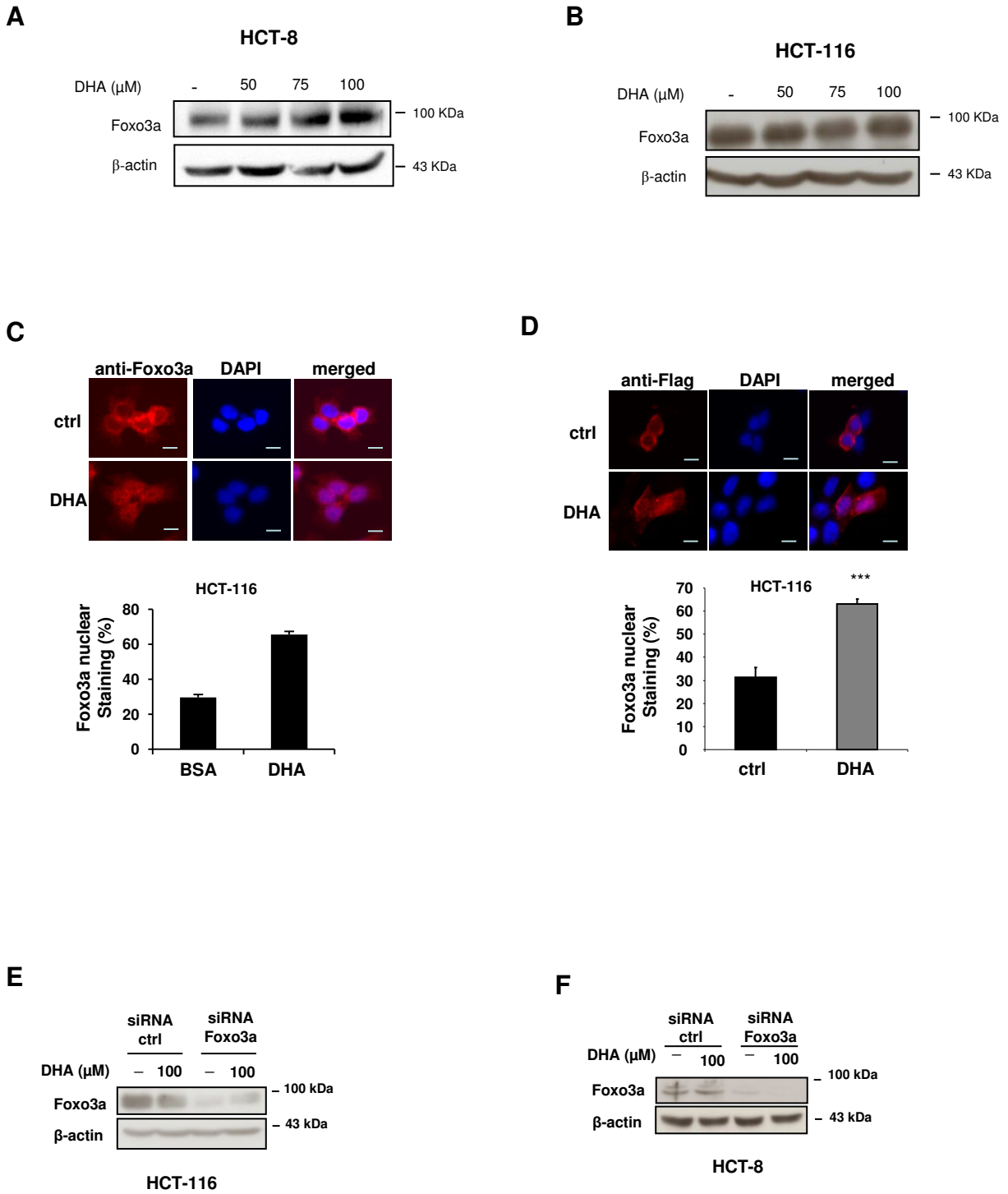
B



Supplementary Figure S2

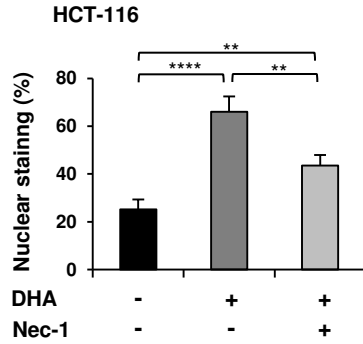


Supplementary Figure S3

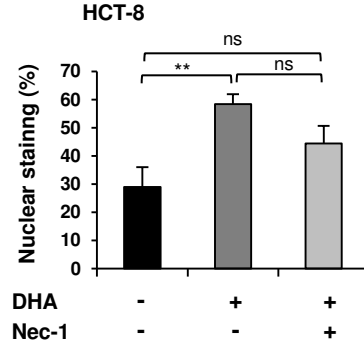


Supplementary Figure S4

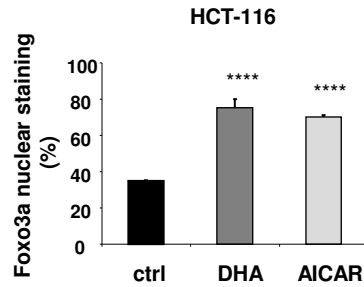
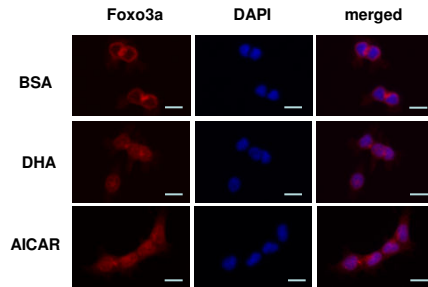
A



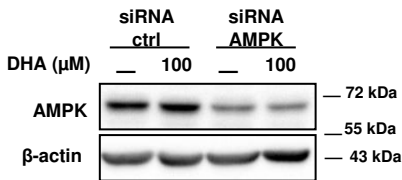
B



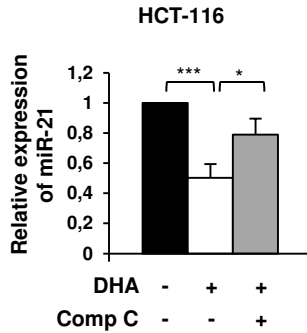
C



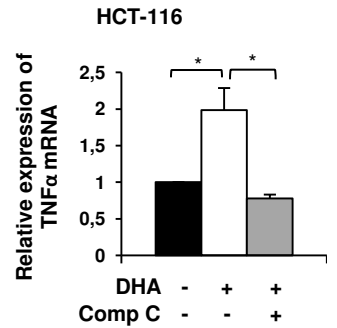
D



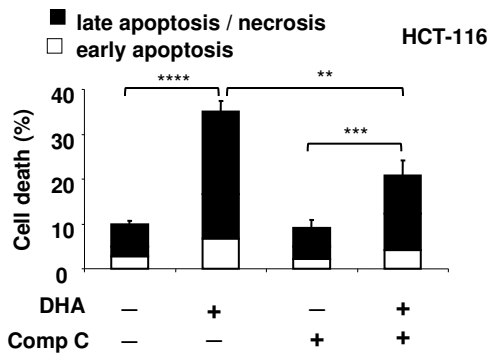
E



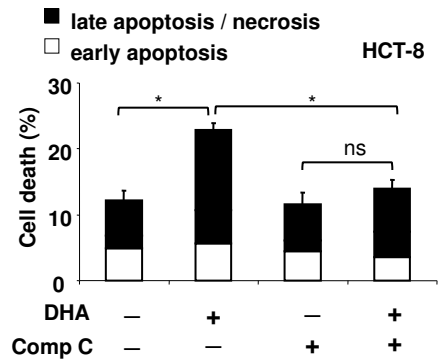
F



G

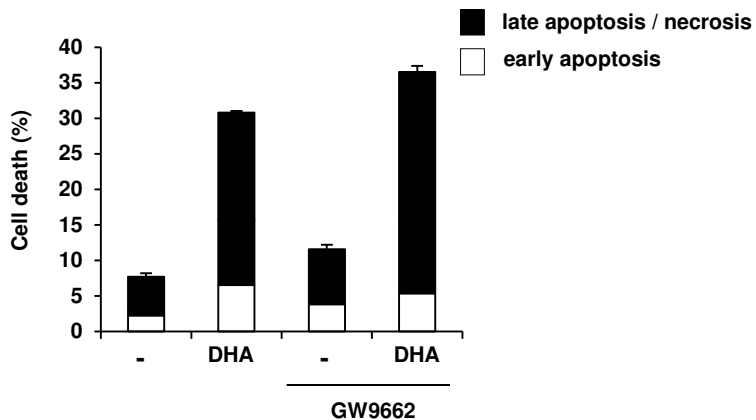


H

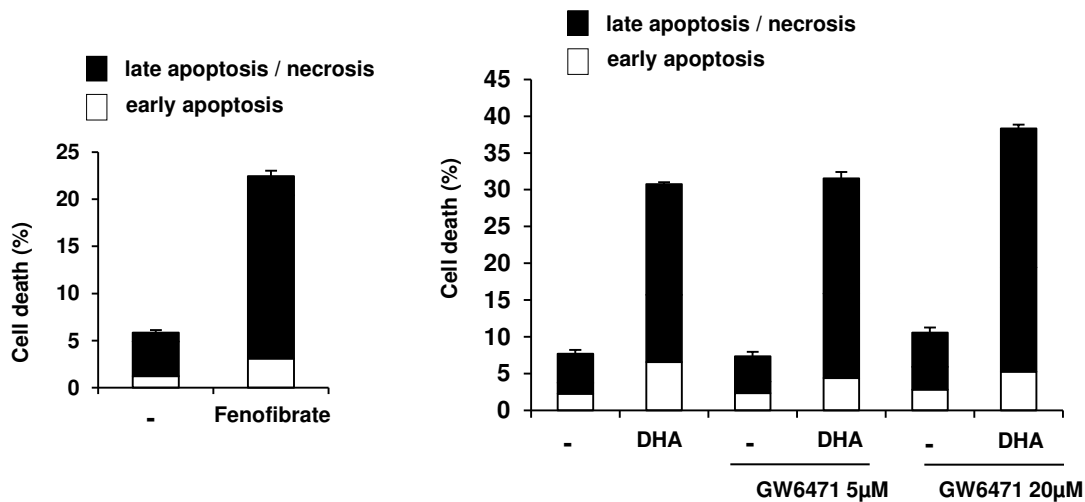


Supplementary Figure S5

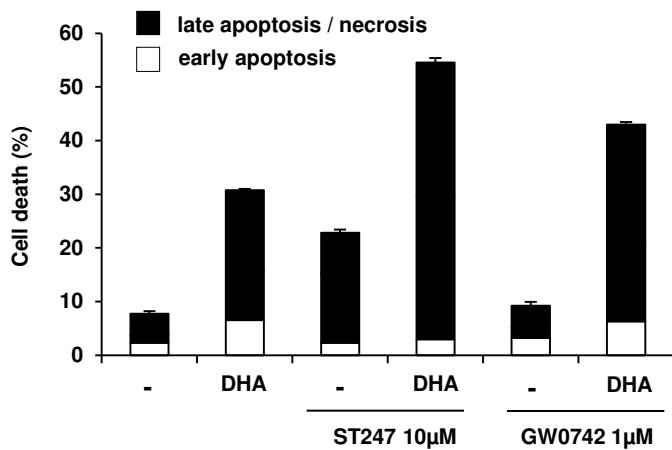
A



B

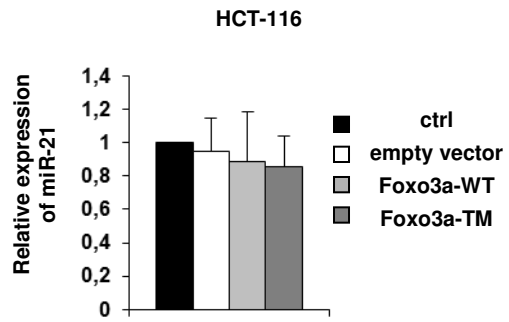


C



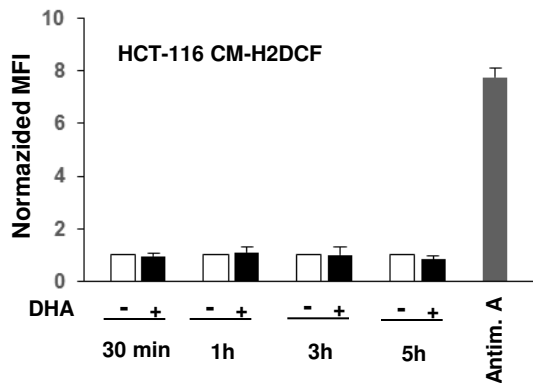
Supplementary Figure S6

A

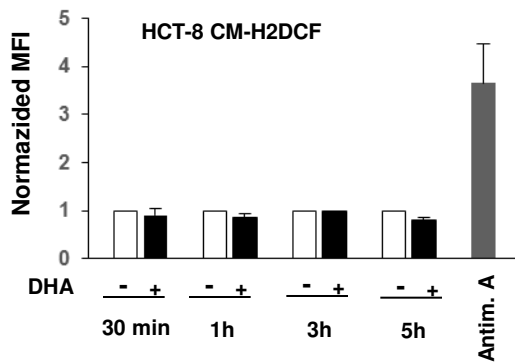


Supplementary Figure S7

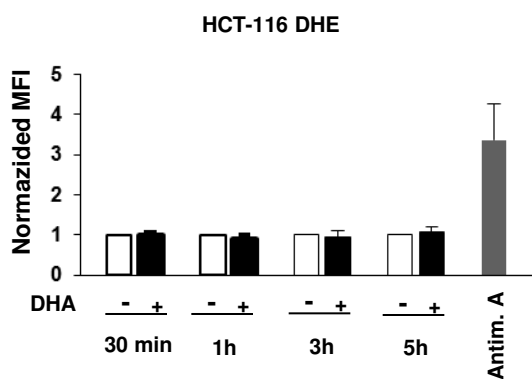
A



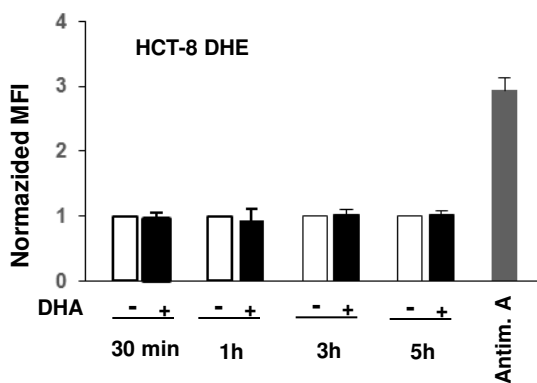
B



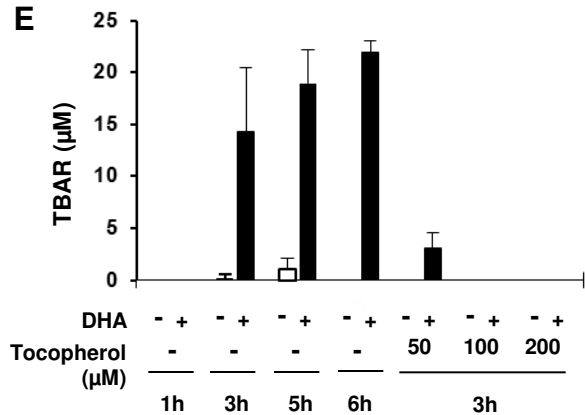
C



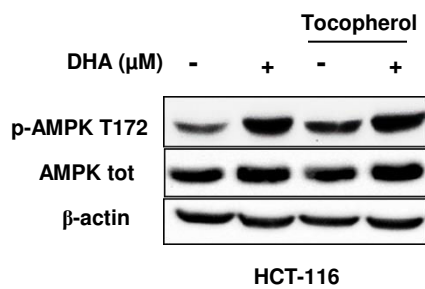
D



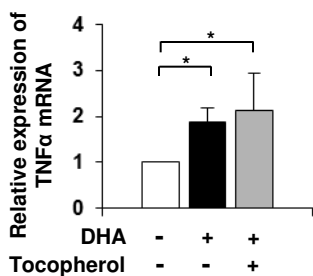
E



F



G



DISCUSSION

I. Mécanismes moléculaires à l'origine de l'effet anti-prolifératif du DHA *in vitro*

A. Action cytotoxique du DHA

Nous avons montré l'effet anti-prolifératif du DHA *in vitro* sur des cellules cancéreuses coliques humaines et cet effet est propre au DHA par comparaison avec des acides gras de la famille n-9, l'acide oléique, et n-6, l'acide linoléique. Cet effet anti-prolifératif a au moins pour origine l'induction d'apoptose dans ces cellules, confirmant des observations ultérieures sur les cellules cancéreuses coliques et d'autres tissus (sein, prostate, poumon) [310, 332, 340, 342, 344].

Dans notre étude, l'induction de l'apoptose des cellules cancéreuses par DHA est associée à une activation de l'AMPK. Or, l'AMPK joue un rôle de senseur énergétique et peut induire l'autophagie lors d'un déficit en ATP intracellulaire. L'autophagie permet un recyclage du contenu cytoplasmique afin de pallier à ce déficit, cependant une activation prolongée de l'autophagie aboutit à une mort cellulaire par apoptose [471]. Ainsi, des études ont montré que le DHA est capable d'induire l'apoptose en réprimant un inhibiteur de l'autophagie, mTOR, par activation d'AMPK et inhibition d'Akt [472]. De plus, une induction de la production de ROS mitochondriaux par le DHA peut également être à l'origine de l'inhibition de la voie Akt/mTOR activant l'autophagie [473]. Par conséquent, l'effet pro-cytotoxique du DHA sur les cellules cancéreuses peut être accompagné ou prendre sa source dans l'induction de l'autophagie via l'activation de l'AMPK.

Le DHA peut également induire le stress du RE qui est un autre mécanisme mis en place par la cellule pour rétablir l'homéostasie de cet organite suite à un dysfonctionnement cellulaire et dont l'activation prolongée aboutit à la mort cellulaire par apoptose [474]. En effet, le RE étant impliqué dans la synthèse des lipides, l'altération du métabolisme lipidique par DHA peut déclencher un stress du RE [294]. De plus, le DHA inhibe l'expression de GRP78 qui est une protéine chaperonne d'ATF6 et PERK impliquées dans les voies de signalisation du stress du RE aboutissant à l'activation d'un facteur de transcription CHOP à l'origine du déclenchement de la mort par apoptose [475]. Ainsi, l'effet pro-cytotoxique du DHA sur les cellules cancéreuses pourrait également dépendre de l'induction d'un stress du RE suivie de l'activation de CHOP [341, 475].

B. La régulation des cytokines inflammatoires par DHA : rôle de NF- κ B et PPAR γ

Les cellules cancéreuses produisent, pour certaines, des cytokines pro-inflammatoires afin de soutenir leur propre prolifération [38]. Les AGPI n-3 réduisent la production systémique de cytokines pro-inflammatoires et, par ce contrôle, diminueraient la croissance tumorale sans pour autant faire état d'une action sur la régulation des facteurs inflammatoires par la cellule cancéreuse [225, 256]. De manière surprenante, nous avons découvert que le DHA augmente l'expression et la sécrétion de TNF α par les cellules cancéreuses coliques *in vitro*. Cette observation entre en contradiction avec l'effet anti-inflammatoire du DHA qui passe notamment par l'inhibition du facteur de transcription NF- κ B impliqué dans l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF α , IL-6 et IL-8 [332, 476]. Cependant, l'utilisation d'un vecteur rapporteur contenant la séquence 3'UTR de TNF α a permis de montrer que la régulation de TNF α par le DHA se fait de manière post-transcriptionnelle, via la diminution du taux de miR-21, tout en gardant un rôle inhibiteur sur l'expression des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et IL-8, indiquant que l'effet du DHA sur l'expression du TNF α ne concerne pas une régulation globale du programme inflammatoire.

Le DHA est connu pour sa capacité à inhiber la signalisation NF- κ B dans différents modèles cellulaires [332, 351, 476] mis en évidence par l'inhibition de IL-6 et IL-8 dans notre étude. La résistance de certaines cellules cancéreuses à l'effet cytotoxique du TNF α proviendrait d'une activation constitutive de NF- κ B qui serait levée par le traitement DHA et rétablirait ainsi la sensibilité au TNF α et à la mort cellulaire [179].

Le DHA est capable de réguler NF- κ B en augmentant la phosphorylation et la dégradation d'I κ B entraînant une réduction de la translocation nucléaire de NF- κ B [336]. Une autre voie de régulation de NF- κ B par DHA implique PPAR γ . En effet, PPAR γ est un récepteur nucléaire, activé par interaction avec le DHA, qui possède des fonctions anti-inflammatoires et anti-cancéreuses [320-322] notamment en inhibant NF- κ B [334, 335]. Ainsi, l'inhibition de PPAR γ avec un antagoniste (GW9662) abolit l'inactivation de NF- κ B par le DHA [333].

C. La régulation de miR-21 par DHA

miR-21 est un microARN oncogénique dont l'expression favorise la prolifération de cellules cancéreuses et dont l'inhibition entraîne une diminution de la prolifération, une

augmentation de l'apoptose et une diminution de la formation de métastases [431]. Dans notre étude, nous avons montré que l'induction de la mort cellulaire par le DHA implique l'inhibition de l'expression de miR-21. En effet, les cellules cancéreuses coliques traitées en DHA voient leur expression de miR-21 diminuée et l'augmentation du taux de miR-21, par transfection d'oligonucléotides pré-miR-21, abolit la mort cellulaire médiée par le DHA.

Des éléments de réponse au facteur de transcription Foxo3a sont présents dans le promoteur de miR-21 et nous avons montré que le DHA inhibe miR-21 en augmentant la liaison de Foxo3a sur son promoteur suite à une augmentation de sa translocation nucléaire. De plus, l'extinction de l'expression de Foxo3a empêche l'inhibition de miR-21, l'augmentation de TNF α et la mort cellulaire médiée par le DHA.

D'autres facteurs de transcription régulent l'expression de miR-21 et sont modulés par DHA. En effet, des facteurs de transcription impliqués dans l'inflammation, STAT3 et NF- κ B, induisent l'expression de miR-21 qui va maintenir le statut pro-inflammatoire et favoriser l'initiation de la carcinogenèse colorectale [438-440, 442]. C'est pourquoi miR-21 est considéré comme un élément clé de l'induction de la carcinogenèse colorectale dans un contexte pro-inflammatoire [443, 444]. Or, le DHA inhibe STAT3 et NF- κ B conduisant à une diminution de l'inflammation et de la prolifération des cellules cancéreuses [332, 351, 476, 477]. De plus, dans des cellules transformées par Ras, l'expression de miR-21 est induite par le facteur de transcription AP-1 [433] qui peut être séquestré dans le cytoplasme par le facteur de transcription PPAR α possédant des propriétés anti-tumorales et pouvant être activé par interaction avec DHA [478]. Ainsi, l'activation de PPAR α inhibe le CAC [320] et l'un des mécanismes à l'origine de cet effet est la réduction de l'expression de COX-2 et VEGF via l'inhibition d'AP-1 [478]. Donc, l'inhibition de miR-21 par le DHA pourrait également dépendre de l'activation de PPAR α et l'inactivation de STAT3, NF- κ B et AP-1 à l'origine de l'effet bénéfique du DHA dans le cas du CCR associé aux colites (CAC).

miR-21 favorise également la résistance des cellules cancéreuses à des agents anti-tumoraux en prévenant l'expression de gènes anti-prolifératifs et pro-apoptotiques [432-437]. Par exemple, miR-21 cible l'ARNm du gène suppresseur de tumeur PTEN [432] et d'une protéine pro-apoptotique Bax [437]. Par conséquent, l'inhibition de miR-21 par

DHA pourrait expliquer l'augmentation d'expression de PTEN et Bax dans des cellules cancéreuses associée à la mort cellulaire [344, 479] et à leur sensibilisation au 5-FU [344].

D. La régulation du facteur de transcription anti-tumoral Foxo3a par DHA : rôle d'AMPK.

L'action de Foxo3a est régulée par des protéines kinases : Akt et AMPK α , dont l'activité peut être régulée par le DHA [303, 310]. Akt inhibe l'activité de Foxo3a par phosphorylation sur 3 résidus (Thr32, Ser253 et Ser315) entraînant sa séquestration dans le cytoplasme [99]. Tandis que l'AMPK α augmente l'activité de Foxo3a par phosphorylation sur plusieurs résidus (Thr179, Ser399, Ser413, Ser555, Ser588 et Ser626). Une augmentation de la phosphorylation d'AMPK α (Thr172) et de Foxo3a (Ser413) est observée dans les cellules cancéreuses coliques traitées en DHA, indiquant que le DHA induit l'activation d'AMPK α qui activerait à son tour Foxo3a. L'immunofluorescence de Foxo3a chez des cellules cancéreuses coliques traitées en DHA nous a permis de corrélérer l'augmentation de la phosphorylation de Foxo3a avec une augmentation de sa translocation nucléaire. Cette translocation nucléaire est abolie lorsqu'on inhibe l'expression et l'activité d'AMPK α , démontrant que la translocation nucléaire de Foxo3a induite par le DHA est dépendante de l'AMPK α . Cet effet de l'AMPK α a été démontré sur des cellules de cancer du sein et de la prostate traitées par un activateur allostérique de l'AMPK α , OSU-53 [100]. De plus, l'inhibition de l'AMPK α est associée à une augmentation de l'expression de miR-21, une diminution de l'expression de TNF α et une réduction de la mort cellulaire médiée par DHA. Par conséquent, l'activation et la translocation nucléaire de Foxo3a par le DHA permet l'inhibition de miR-21 et est dépendante de l'AMPK α . Par ailleurs, l'activation de la fonction Foxo3a par le DHA pourrait également expliquer, en plus de la régulation de miR-21, les effets du DHA sur l'expression de PTEN qui possède des éléments de réponse à Foxo3a sur son promoteur [83]. En effet, le DHA entraîne une augmentation de l'expression de PTEN régulée au niveau transcription par Foxo3a et post-transcriptionnel par miR-21. De plus, l'activation de Foxo3a par DHA peut expliquer ces effets sur l'expression de nombreux gènes impliqués dans la prolifération et la mort cellulaire. En effet, Foxo3a active l'expression de p21 [83], de protéines pro-apoptotiques telles que BIM [81], PUMA [103] ou encore NOXA [104] mais également des ligands des récepteurs de mort: FasL et TRAIL [82, 105].

E. Boucle de régulation positive de la production de TNF α induite par DHA : rôle de RIP1.

Dans notre étude, l'induction de l'expression du TNF α par le DHA est réduite suite à l'abolition de l'activité RIP1 suggérant que la protéine RIP1 est indispensable à la production de cette cytokine, ce qui appuie les travaux d'une autre étude montrant que RIP1 est capable d'activer l'expression de TNF α via la voie JNK/AP-1 [480]. De plus, la protéine RIP1 est indispensable à l'effet pro-apoptotique du DHA. En effet, le DHA peut favoriser la voie de signalisation apoptotique en inhibant NF- κ B qui active l'expression des protéines cIAPs et c-FLIP [340, 481] impliquées respectivement dans l'ubiquitination de RIP1, conduisant à l'activation de la voie NF- κ B [128], et dans l'inhibition du recrutement de la caspase-8 au niveau de RIP1 [147]. Ainsi, une boucle de régulation positive pourrait s'établir suite à la production de TNF α qui se fixerait à ses récepteurs de mort et recruterait RIP1 afin d'induire l'expression de TNF α et la mort des cellules cancéreuses coliques par apoptose.

De plus, l'extinction de RIP1 abolit l'effet du DHA sur l'inhibition de miR-21 suggérant que le DHA augmente l'expression de TNF α en inhibant l'expression de miR-21 de manière dépendante de RIP1. L'analyse de la localisation subcellulaire de Foxo3a par immunofluorescence montre une réduction de la translocation nucléaire de Foxo3a induite par DHA suite à l'inhibition de RIP1. Ce qui suggère que le DHA active la protéine kinase RIP1 qui induit la translocation nucléaire de Foxo3a pour inhiber l'expression de miR-21.

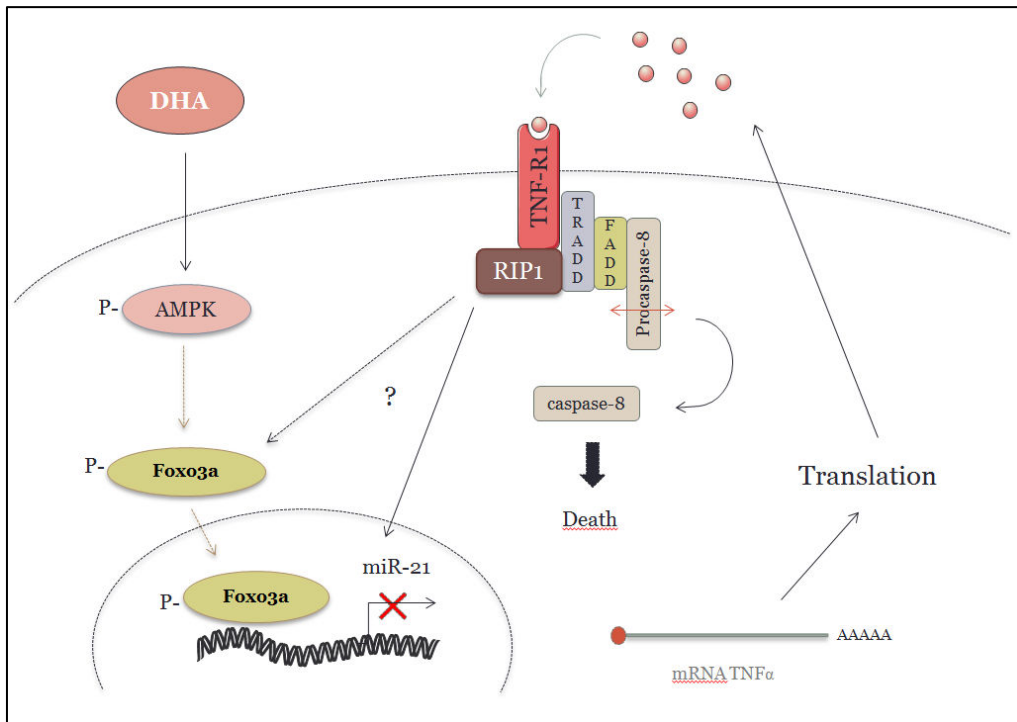


Figure 21 : Schéma récapitulatif

En résumé, ces résultats démontrent une nouvelle voie d'induction de la mort des cellules cancéreuses coliques par le DHA. Il induit une augmentation de la production de TNF α par les cellules cancéreuses coliques qui agit de manière autocrine. La régulation de TNF α par le DHA est dépendante de la voie de signalisation AMPK/Foxo3a aboutissant à l'inhibition de miR-21 dont l'une des cibles est l'ARNm de TNF α (figure 22).

II. Effet anti-tumoral du DHA

Nous avons montré que l'action anti-proliférative du DHA, impliquant la production autocrine de TNF α , permettait de limiter la croissance tumorale chez des souris avec un régime enrichi en DHA. En effet, notre modèle de xénogreffe permettait de discriminer la production de TNF α d'origine humaine et murine. Nous avons donc montré que l'activation du TNF α humain provenant des cellules cancéreuses était nécessaire à l'effet cytotoxique du DHA *in vivo*. Cependant, nous n'observons pas d'augmentation, voire une tendance à la diminution, de l'expression de TNF α murin dans les cellules du microenvironnement tumoral soutenant les observations que DHA réduit l'inflammation systémique. Donc le DHA entraîne une augmentation de TNF α uniquement dans les cellules cancéreuses coliques et conserve son pouvoir anti-inflammatoire systémique. Ainsi, le DHA pourrait favoriser une augmentation locale de TNF α intra-tumorale tout en diminuant le taux circulant de TNF α .

Ceci suggère que l'effet anti-cancéreux du DHA est, au moins en partie, sous le contrôle d'une action cytotoxique directe sur les cellules cancéreuses coliques. Cependant, le DHA peut également exercer un effet anti-cancéreux en modulant le microenvironnement tumoral, notamment l'angiogenèse et le système immunitaire. En effet, des travaux ont démontré que les AGPI n-3 régulent l'activation des LT et favorisent leur différenciation en engageant les LT vers un phénotype anti-tumoral [362]. Ainsi, le DHA favorise la différenciation des LT en Th1 anti-tumoraux [48], inhibe la différenciation des Th17 pro-tumoraux [363, 364] et bloque l'activité des cellules immunosuppressives T-reg impliquées dans l'échappement des tumeurs à l'immunosurveillance [367]. De plus, le DHA inhibe l'angiogenèse par différents mécanismes. Il réduit la production d'IL-17 par les Th17, la production de NO par les macrophages et inhibe NF- κ B qui favorise la production du facteur angiogénique VEGF [124, 383]. Ainsi, un régime enrichi en DHA chez des souris porteuses de tumeurs coliques, inhibent l'expression de VEGF permettant un ralentissement de l'angiogenèse [273]. De plus, la production de NO par les cellules endothéliales est réduite par le DHA et permet de diminuer la pression du liquide interstitiel et d'augmenter le passage des molécules anti-cancéreuses des vaisseaux vers l'espace interstitiel tumoral améliorant leur efficacité [388]. Donc on ne peut pas exclure la possibilité que le DHA puisse agir sur le microenvironnement tumoral, cependant l'utilisation de souris immunodéficientes permet de s'affranchir de l'action du DHA sur les lymphocytes T.

Le TNF α produit par les cellules cancéreuses coliques sous l'action du DHA peut également agir sur le microenvironnement tumoral proche par une action paracrine. En effet, le TNF α est capable d'augmenter la réponse immunitaire anti-tumorale. Par exemple, le TNF α augmente l'activité des cellules NK aboutissant à la mort de cellules cancéreuses de moelle osseuse en co-culture [482]. Une autre étude montre que le TNF α active NF- κ B induisant l'expression de la protéine MET indispensable à l'activité cytotoxique des neutrophiles et donc à leur fonction anti-tumorale. En effet, MET est impliqué dans l'activation de la NO synthase permettant la production de NO responsable de la mort des cellules cancéreuses. Ainsi, la délétion du gène *met* dans les neutrophiles *in vivo* favorise la croissance de cellules cancéreuses pulmonaires (LLC) et l'utilisation d'un anticorps bloquant TNF α , prévient l'induction de MET dans les neutrophiles et l'inhibition de la croissance tumorale chez des souris porteuses de tumeurs LLC [483]. On sait que l'une des manières pour les cellules cancéreuses d'échapper au système immunitaire est de ne pas exprimer à sa surface une molécule présentatrice d'antigène CMH1 et ainsi éviter d'être

reconnues par les cellules du système immunitaire anti-tumorales. Des travaux ont mis en évidence que la protéine HFE, une protéine inhibitrice de l'absorption du fer, masque le CMH1 et est surexprimée notamment dans les cellules cancéreuses pulmonaires, rénales et les mélanomes. Lorsque les cellules cancéreuses sont traitées avec du TNF α , il y a une diminution de l'expression de HFE. Par conséquent, TNF α est capable d'inhiber l'expression de HFE, augmentant l'accessibilité du CMH1 par les LT [484].

Le TNF α est également capable d'inhiber l'angiogénèse intra-tumorale en induisant la mort des cellules endothéliales vasculaires. A court terme, le TNF α augmente la perméabilité des vaisseaux sanguins intra-tumoraux et permet d'augmenter l'efficacité de perfusion et donc l'efficacité des chimiothérapies. A long terme, le TNF α détruit le réseau vasculaire intra-tumoral [212, 213]. Une étude *in vivo* montre que le TNF α améliore l'activité anti-tumorale de la doxorubicine en induisant la mort des cellules endothéliales vasculaires permettant une augmentation de la perméabilité de la paroi endothéliale [214].

Par ailleurs, miR-21 dont l'expression est inhibée par le DHA, joue un rôle important dans la régulation des cellules du microenvironnement tumoral par les cellules cancéreuses [485]. En effet, miR-21 exprimé par les cellules cancéreuses peut être sécrété dans le microenvironnement tumoral et agir au sein des cellules du stroma. Une étude montre que le transfert de miR-21 entre des neuroblastomes et des monocytes se fait par la formation d'exosomes et que l'utilisation d'un inhibiteur de la formation d'exosomes (GW4869) augmente la sensibilité des neuroblastomes au cisplatine [486]. De plus, il semblerait que miR-21 sécrété par les cellules cancéreuses puisse agir comme un ligand des récepteurs TLR à la surface des cellules immunitaires et ainsi induire la voie NF- κ B conduisant à l'expression et la sécrétion de cytokines inflammatoires favorisant la progression tumorale [487, 488]. Par conséquent, l'inhibition de miR-21 par DHA pourrait permettre de bloquer le dialogue entre les cellules cancéreuses coliques et les cellules du microenvironnement tumoral afin de réduire la progression tumorale.

Par conséquent, en plus d'induire la mort des cellules cancéreuses coliques, l'augmentation de la production de TNF α et l'inhibition de miR-21 par le DHA pourrait également activer la réponse immunitaire anti-tumorale, inhiber l'angiogénèse et ainsi augmenter l'efficacité des chimiothérapies.

Conclusion générale et Perspectives

Nous montrons pour la première fois que le DHA augmente la production d'une cytokine pro-inflammatoire TNF α pour induire la mort de cellules cancéreuses. La cellule cancéreuse contourne le programme anti-inflammatoire enclenché par le DHA en régulant TNF α de manière post-transcriptionnelle par l'inhibition de miR-21.

Perspectives :

- Des études montrent que le DHA est capable d'augmenter l'expression des récepteurs de mort en régulant des voies de signalisation et des facteurs de transcription et de réguler leur activité suite à leur incorporation dans les rafts lipidiques [307, 342]. Une analyse de l'expression et de l'activité des récepteurs au TNF α chez les cellules cancéreuses coliques traitées en DHA nous permettrait de déterminer si le DHA, en plus d'augmenter la production de TNF α , peut également augmenter l'expression et l'activité de ses récepteurs et ainsi augmenter la sensibilité des cellules cancéreuses coliques au TNF α . Des lignées de cellules cancéreuses coliques sont peu sensibles au DHA, il serait donc intéressant de déterminer si ces cellules n'expriment pas le récepteur au TNF α et si le DHA ne déclenche pas l'activation de la voie TNF α dans ces cellules.
- Nous avons également montré que RIP1 participe à l'activation de l'expression de TNF α dans les cellules cancéreuses coliques traitées en DHA. Si le TNF α active RIP1 après fixation à son récepteur et que RIP1 est capable d'induire l'expression de TNF α , alors nous mettons en évidence une boucle de régulation qui permettrait une amplification de l'effet cytotoxique du TNF α et qui reste à démontrer.
- La régulation de TNF α par DHA est dépendante de l'activation d'AMPK. Nous pouvons donc envisager d'analyser l'effet d'un autre activateur d'AMPK comme la metformine, déjà utilisé en traitement du diabète de type 2, et qui a également été découvert comme possédant des propriétés anti-cancéreuses [489]. Ainsi, nous pourrions mettre en évidence un nouveau mécanisme impliqué dans l'effet anti-tumoral de la metformine.
- Nos résultats ont été obtenus uniquement chez des cellules cancéreuses coliques, et l'impact du TNF α a été analysé uniquement sur ces mêmes cellules. Pour donner encore plus poids à notre étude, nous devons déterminer si le DHA peut induire la mort de d'autres lignées de cellules cancéreuses de manière dépendante de TNF α , et d'étendre l'analyse de l'impact du TNF α aux cellules du microenvironnement tumoral. Notre

modèle de xénogreffes de cellules cancéreuses coliques humaines chez des souris immunodéficientes peut comporter certains biais. Le TNF α peut agir au niveau des cellules endothéliales et immunitaires pour influencer la progression tumorale. Cependant, le TNF α sécrété par les cellules cancéreuses coliques est d'origine humaine, donc il est possible qu'il n'agisse pas aussi efficacement sur les cellules du microenvironnement tumoral de souris et ainsi on perdrait son effet anti-tumoral sur les cellules endothéliales et immunitaires.

- Des essais cliniques ont montré le rôle anti-tumoral d'une supplémentation en EPA, on peut alors se demander si l'EPA, comme le DHA, est capable d'induire la mort des cellules cancéreuses de manière dépendante de TNF α .

Le DHA est une molécule très intéressante pour le traitement des cancers. Il agit à la fois sur les cellules cancéreuses mais également sur les cellules du microenvironnement tumoral dont on sait qu'elles sont indispensables à la progression tumorale. Nos travaux montrent que le DHA induit la mort des cellules cancéreuses coliques en augmentant la production de TNF α par ces mêmes cellules. Au vu de ces résultats et de ce qui a déjà été montré dans la littérature, on peut supposer que le DHA, en augmentant la production de TNF α , puisse également réguler l'angiogenèse, la réponse immunitaire anti-tumorale et la sensibilité des cellules cancéreuses aux chimiothérapies. Le DHA apparaît donc comme une molécule prometteuse en traitement ou en co-traitement avec d'autres chimiothérapies. D'ailleurs, des études cliniques sont en cours afin d'étudier l'effet d'une supplémentation en DHA en co-traitement avec une chimiothérapie à base de paclitaxel chez des patients atteints de cancer de la prostate, du pancréas et colorectal [17].

Matériels et Méthodes

I. Culture cellulaire et traitements

A. Lignées cellulaires et entretien

Les lignées cellulaires utilisées sont deux lignées de cellules cancéreuses coliques humaines : HCT-116 et HCT-8, provenant de l'American Type Culture Collection (ATCC).

Les milieux de cultures utilisés pour l'entretien :

- **Pour HCT-116** : DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium) à 4.5 g/L de Glucose, 2mM de L-Glutamine (Dutsher) et supplémenté en antibiotique (pénicilline 100U/ml ; Streptomycine 100µg/ml (Dutsher) et supplémenté à 6% de SVF (sérum de Veau fœtal)
- **Pour HCT-8** : RMPI 1640 avec 2mM de L-Glutamine (Dutsher) supplémenté en antibiotique (pénicilline 100U/ml ; Streptomycine 100µg/ml (Dutsher) et supplémenté à 10% de SVF (sérum de Veau fœtal)

Avant d'être ajouté au milieu de culture, le SVF est décomplémenté par un chauffage à 56°C pendant 30 minutes.

Les lignées sont cultivées dans un incubateur sous atmosphère contrôlée à 37°C et à 5% CO₂. Le passage des cellules est réalisé lorsqu'elles sont à 80% de confluence, ce qui représente environ 2 à 3 passages par semaine. Pour cela, les cellules sont lavées avec du tampon PBS sans calcium et sans magnésium stérile (Dutsher) puis recouvertes de trypsine/EDTA (Dutsher) avant d'être placées à 37°C pendant 5 minutes. L'arrêt de la trypsination est effectué par l'ajout d'un grand volume de milieu complet. Les cellules sont ensuite réensemencées à une dilution de 1 :10 pour les HCT-116 et 1 :20 pour les HCT-8.

B. Traitement acides gras

Les acides gras (AG) utilisés proviennent de chez Sigma Aldrich : acide oléique (OL), linoléique (LA), eicosapentaénoïque (EPA) et docosahexaénoïque (DHA). Les solutions d'AG 10X sont préparées à partir de solutions mères conservées à -20°C dans de l'éthanol (EPA, DHA) ou du chloroforme (OL, LA).

Le volume d'AG nécessaire est prélevé et l'AG est mis à sec sous azote dans un tube soviel avant d'être repris avec un faible volume d'éthanol (1% du volume final de la solution 10X). Puis, on ajoute du milieu de culture préchauffé à 37°C et supplémenté avec du sérum albumine bovine (BSA, Sigma) afin d'obtenir un ratio BSA:AG égal à 1:4 (1

molécule de BSA pour 4 molécules d'AG). Les tubes sont fermés sous azote et agités énergiquement pour assurer la liaison des AG aux molécules de BSA. Les solutions d'AG (10X) sont ensuite filtrées (0.22 μ m) avant d'être utilisées pour traiter les cellules à une concentration finale de 50, 75 et 100 μ M.

C. Traitements avec les inhibiteurs pharmacologiques

L'inhibiteur de RIP1 et AMPK α , la nécrostatine-1 (Nec-1) et le Compound C (CC) respectivement, proviennent de chez Sigma-Aldrich. L'inhibiteur des capases (FMK-ZVAD) provient de chez Bachem. Les inhibiteurs sont conservés à -20°C dilués dans du DMSO et utilisés à des concentrations finales de 10 μ M (Nec-1), 0.5 μ M (CC) et 75 μ M (ZVAD). Le traitement en DHA est réalisé 1h après l'ajout de l'inhibiteur.

D. Transfection des siARN et pre-miARN

Les petits ARN interférents (siARN) dirigés contre AMPK α proviennent de chez Santa Cruz Biotechnology. Tandis que les siARN dirigés contre Foxo3a, RIP1 et les contrôles négatifs proviennent de chez ambion (lifetechnologies) tout comme le pre-miR-21 (miR-21 mimic) et le pre-miR contrôle (Ctrl mimic). Les cellules sontensemencées à raison de 120 000 cellules par puits en plaques 6 puits dans du milieu de culture sans antibiotiques. Le lendemain, les cellules sont transfectées en utilisant le kit Oligofectamine (invitrogen) selon les recommandations du fabricant à une concentration finale de 50 nM pour les siARN AMPK α , 5 nM pour les siARN Foxo3a, 10 nM pour les siARN RIP1 et les pre-miR-21. Le traitement en DHA est réalisé 24h après la transfection.

E. Transfection de plasmide

Le plasmide contenant la séquence 3'-UTR de TNF α couplé au gène rapporteur de la luciférase nous a été gracieusement donné par Docteur Ya Wang.

Les cellules sontensemencées à raison de 9 000 cellules par puits en plaques 96 puits dans du milieu de culture sans antibiotiques. Le lendemain, les cellules sont transfectées avec le vecteur 3'UTR-TNF α -Luc (200 ng) et le vecteur renilla-Luc (20 ng) en utilisant le kit Lipofectamine 2000 (Invitrogen) selon les recommandations du fabricant. Le vecteur Renilla-luc permet de rapporter l'activité luciférase au taux de transfection par cellule. Le traitement en DHA est réalisé 24h après la transfection.

La mesure de l'activité luciférase est réalisée avec le kit Dual Glo Luciferase Reporter Assay (Promega) et le lecteur de plaque Perkin Elmer Victor 3 Model 1420 Multi-label.

II. Mesure de la prolifération et de la mort cellulaire

A. Analyse de la prolifération cellulaire

L'analyse de la prolifération cellulaire a été réalisée avec le kit CyQuant®NF cell proliferation assay (Invitrogen). Les cellules sontensemencées à raison de 5000 cellules par puit dans une plaque 96 puits, puis traitées le lendemain avec les AG à 50, 75 et 100µM. Après 48h de traitement, le milieu de culture est éliminé et le nombre de cellules adhérentes est évalué par mesure de la fluorescence émise par le CyQuant GR dye qui se lie de manière stochiométrique au acide nucléique. La fluorescence est mesuré par un fluorimètre (VICTOR³V™, PerkinElmer Life Sciences Inc, Wellesley, MA, USA) avec une excitation à 485 nm et une détection à 535 nm.

B. Analyse de la mort cellulaire par apoptose

1. Marquage Annexin V et 7AAD

L'évaluation de l'apoptose a été réalisée par marquage des cellules avec un intercalant de l'ADN, 7AAD (7-amino-actinomycin D), et avec l'Annexin V à l'aide du kit APC Annexin V Apoptosis Detection kit (Biolegend) selon les recommandations du fabricant. Les maquages sont ensuite analysés par cytométrie en flux (FACS Calibur, Becton Dickinson). Les cellules flottantes et adhérentes sont collectées et culotées par centrifugation à 520g pendant 10 minutes. Après un lavage au PBS 1X, 500 000 cellules sont repris dans 200µl de tampon (binding buffer) auquel sont ajoutés 5µl d'annexin V et 3µl de 7AAD. Après 15 minutes d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, les échantillons sont passés au cytomètre.

Les cellules uniquement marquées à l'Annexin V (AnV+/7AAD-) sont considérées comme étant en stade précoce de l'apoptose. Les cellules doublement marquées à l'Annexin V et 7AAD (AnV+/7AAD+) sont au stade tardif de l'apoptose et enfin les cellules uniquement marquées au 7AAD (AnV-/7AAD+) sont les cellules en nécrose.

2. Mesure de l'activité caspase-8

L'analyse de l'activité caspase-8 est évaluée avec le kit FAM-FLICA™ caspase 8 assay (Immunochemistry Technologies) selon les recommandations du fabricant. Le kit utilise le substrat de la caspase-8 LETD-FMK conjugué au FITC qui se lie à la caspase-8 active dans les cellules apoptotiques.

Les cellules flottantes et adhérentes sont collectées et culotées par centrifugation à 400g pendant 5 min. Le culot est repris avec 500µL de milieu de culture auquel est ajouté 2µL de FLICA. Après une incubation d'1 heure à 37°C (agitation toutes les 20 minutes), les cellules sont lavées 2 fois et passées au cytomètre.

III. Extraction d'ARN et RT-qPCR

A. Extraction des ARNs totaux et microARNs

Les cellules sont lavées au PBS 1X et les ARNs sont extraits par lyse des cellules avec 1 ml de TRIzol (Invitrogen). Puis, 200 µl de chloroforme sont ajoutés et les tubes sont vortexés. Après incubation pendant 10 minutes, les tubes sont centrifugés à 12 000 g pendant 15 minutes à 4 °C. La phase aqueuse supérieure est récupérée et les ARNs sont précipités avec 500 µl d'isopropanol pendant 30 minutes pour les ARNs totaux, et pendant une nuit à -20°C pour les microARNs. Après centrifugation à 12 000 g pendant 10 minutes à 4°C, le culot est rincé 1 fois avec de l'éthanol 75% pour les ARNs totaux et 3 fois pour les microARNs. Les culots sont séchés à l'air à température ambiante puis repris avec 30 µl d'eau ultra pure

La concentration en acides nucléiques est déterminée par mesure de l'absorbance à 260 nm (1 unité de DO à 260 nm correspond à 40 µg/ml d'ARN) sur un spectrophotomètre UV (Jenway, Stone, UK). Le rapport des DO à 260 nm et 280 nm doit être compris entre 1.8 et 2 pour s'assurer de la qualité des ARN.

B. Transcription inverse

La synthèse du brin d'ADN complémentaire (ADNc) à partir des ARNs totaux est réalisée à partir de 500 ng d'ARN totaux à l'aide du kit M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen) selon les recommandations du fabricant. L'hybridation des ARNs avec les randoms primers est réalisée par une incubation à 65°C pendant 5 minutes. La RT est réalisée à 42°C pendant 1 heure après ajout des dNTP, dTT, inhibiteur de RNase et de la reverse transcriptase. L'inactivation de l'enzyme est réalisée par une augmentation de la température à 70°C pendant 15 minutes. Les ADNc sont conservés à -20°C.

La synthèse du brin d'ADN complémentaire (ADNc) à partir des microARNs est réalisée à partir de 150 ng de microARNs à l'aide du kit TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Invitrogen) selon les recommandations du fabricant. Comme pour la RT des ARNs

totaux, la RT d'un microARN nécessite des dNTP, inhibiteur de RNase et la reverse transcriptase. Cependant, les primers sont spécifiques à chaque microARN et le cycle de température est différent. L'hybridation se fait à 16°C pendant 30 minutes, la RT à 42°C pendant 30 minutes et l'inactivation de l'enzyme à 85°C pendant 5 minutes. Les ADNc sont conservés à -20°C.

C. La PCR quantitative en temps réel

Pour les ARNs totaux, la réaction d'amplification par PCR en temps réel est réalisée dans un volume final de 20µl à partir des ADNc issus de la RT auquel on ajoute des amorces sens et anti-sens (300 nM) ainsi que le SYBR Green Supermix (Biorad) contenant : KCl 100 mM ; Tris-HCl 40 mM pH 8.4 ; 0,4 mM de chaque dNTP ; iTaq DNA polymérase 50 U/ml ; MgCl₂ 6 mM ; SYBR Green I ; fluorescéine 20 nM ; stabilisateurs.

Pour les microARNs, la réaction d'amplification par PCR en temps réel est réalisée dans un volume final de 10µl à partir des ADNc issus de la RT auquel on ajoute les amorces spécifique à chaque microARN ainsi que la TaqMan® Universal PCR Master Mix II. Les séquences des amorces sont indiquées dans le tableau 3.

Tableau 3: Liste des amorces de qPCR et ChIP

	Forward	Reverse
human TNFα	5'-AGC TGC CCC TCA GCT TGA G-3'	5'-AGC TGC CCC TCA GCT TGA G-3'
human IL-6	5'-AGG AGA CTT GCC TGG TGA AA -3'	5'-GTC AGG GGT GGT TAT TGC AT -3'
human IL-8	5'-AGG TGC AGT TTT GCC AAG GA-3'	5'-TTT CTG TGT TGG CGC AGT GT-3'
human β-actin	5'-AGCCTCGCCTTTGCCGA-3'	5'-CTGGTGCCTGGGGCG-3'
mouse TNFα	5'-GGCAGGTCTACTTTGGAGTCATTGC-3'	5'-ACATTTCGAGGCTCCAGTGAATTCGG-3'
mouse β-actin	5'-ATGGAGGGGAATACAGCCC-3'	5'-TTCTTTGCAGCTCCTTCGTT-3'
BS1 Foxo3a	5'-AAACCAAGGCTCTTACCATAGC-3'	5'-CATTGCACTCCAACCTGGGCAA-3'
BS2 Foxo3a	5'-CTCTGGTTTCAACAGACACAAA-3'	5'-TCTGGCCTGTTAAGATCGAACC-3'

Les réactions d'amplifications sont effectuées dans l'appareil StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) selon le programme détaillé dans le tableau 4 pour le SYBR Green.

Tableau 4: Programme de qPCR (SYBR Green)

Durée	Température	Etape	Nombre de cycle
10 min	95 °C	Dénaturation	1
15 s	95 °C	Dénaturation	40
1 min	58 °C	Hybridation et élongation	
15 s	95 °C	Dénaturation	1

Les réactions d'amplifications sont effectuées selon le programme détaillé dans le tableau 5 pour la TaqMan.

Tableau 5: Programme de qPCR (TaqMan)

Durée	Température	Etape	Nombre de cycle
2 min	50 °C	Dénaturation	1
10 min	95 °C		1
15 s	95 °C		
60 s	60 °C	Hybridation et élongation	40

Les résultats sont normalisés par rapport aux gènes rapporteurs β -actine pour les ARN totaux et RNU48 pour les microARNs. La quantité relative d'expression des différents gènes est déterminée par la méthode des $\Delta\Delta C_t$:

$$\Delta C_t = C_{t_{\text{rapporteur}}} - C_{t_{\text{gène}}}$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t_{\text{échantillon}}} - \Delta C_{t_{\text{contrôle}}}$$

$2^{-\Delta\Delta C_t}$ représente l'expression dans l'échantillon par rapport au contrôle.

IV. Western Blotting

A. Extraction des protéines

Les cellules adhérentes sont lavées 2 fois avec du PBS 1X à 4°C, puis raclées dans du tampon de lyse : le tampon TRITON (Tris-HCL 20 mM pH 7,4 , NaCl 150 mM, EDTA 0,5 mM, EGTA 0,5 mM, Triton X-100 1%) supplémenté en DTT (1 mM), PMSF (1 mM), anti-phosphatases (P5726, Sigma) et anti-protéases (065K4070, Sigma). Les cellules sont passées à l'aiguille (25G) et incubées dans la glace pendant 15 minutes. Les débris cellulaires sont culotés par une centrifugation à 12 000 g pendant 10 minutes 4°C, et le surnageant contenant les protéines est récupéré et stocké à -80°C.

Les protéines du surnageant sont dosées par la méthode BCA (acide bicinchonique). Les protéines réduisent le Cu^{2+} en Cu^{1+} en milieu alcalin, or le BCA est un réactif spécifique du Cu^{1+} formant un complexe pourpre ayant une absorption maximale à 570 nm : L'absorbance étant proportionnelle à la concentration de protéines. Les échantillons en triplicat sont ajoutés au réactif BCA/ Cu^{2+} (Sigma) avec un rapport 50 :1 et le tout est incubé à 37°C pendant 30 minutes. La plaque de 96 puits est lue au spectrophotomètre à 570 nm avec le logiciel MRX Revelation.

Une fois la concentration en protéines des échantillons déterminée à partir de la gamme étalon réalisée avec de l'albumine (Bovine Serum Albumine, BSA), ceux-ci sont dilués afin d'obtenir une concentration finale de 1 µg/µl dans un volume final de 200 µl dont 40µl de tampon de charge (Composition du Tampon de charge 4X : 10% (w/v) SDS (sodium dodécylsulfate), 40% (v/v) Glycérol, 25% (v/v) Tris 1M pH=6,8, 20% (v/v) β-mercaptoéthanol, 0,005% (w/v) Bleu de Bromophénol).

B. Migration et transfert

Environ 30 à 60 µg de protéines additionnées de tampon de charge coloré (Tris-HCl 0,03 M pH 6.8 ; DTT 0,05 M ; glycérol 8% ; bleu de bromophénol 0,05% ; SDS 2% ; β-mercaptoéthanol 2,5%) sont dénaturés 3 minutes à 95°C puis déposés sur un gel d'acrylamide/ bisacrylamide à 8% contenant du SDS 0,1%. La migration est effectuée dans un tampon Tris-glycine (Tris 72 mM ; glycine 200 mM ; SDS 0,1%), puis le gel est transféré sur une membrane PVDF (Polyfluorure de vinylidène, Perkin Elmer) dans un tampon Tris-glycine (Tris 25 mM ; glycine 200 mM ; méthanol 20%).

C. Immunoblotting et révélation

Les membranes sont ensuite saturées pendant 1h à température ambiante dans un tampon salin TBS-T (TBS 1X ; Tween-20 0,1%) contenant 5% de BSA. Les anticorps (liste en tableau 5) sont mis à incuber sur les membranes au 1000^{ème} dans du TBS-T 5% BSA. Les anticorps secondaires, couplés à la peroxydase de raifort, sont tous appliqués à une dilution finale de 1/2000 dans du TBS-T contenant 5% de BSA. Tous les rinçages sont effectués au TBS-T.

La révélation est effectuée par ajout du réactif ECL (Clarity™, Western ECL Substrat, Biorad) à l'obscurité et exposés grâce à une station d'acquisition d'image (Chemi-Doc MP Imager Station, Biorad).

Tableau 5: Liste des anticorps pour l'immunoblotting

Anticorps	Origine	Référence	Fournisseur
Foxo3a	Rabbit	H144 sc-11351	Santa Cruz
p-Foxo3 Ser413	Rabbit	#8174	Cell signaling
AMPKα	Rabbit	#2532	
p-AMPKα Th172	Rabbit	#2535	
b-actine	Mouse	A1978	Sigma Aldrich

V. Immunofluorescence

Les cellules sont lavées au PBS 1X et fixées avec de la paraformaldéhyde à 4% pendant 10 minutes à 4°C. Après deux lavages au PBS 1X, les cellules sont perméabilisées avec une solution saponine (5% BSA et 0.2% saponine dans du PBS 1X) pendant 20 minutes à température ambiante. Les cellules sont ensuite incubées avec l'anticorps polyclonal rabbit anti-Foxo3a (voir tableau 5), dilué au 500^{ème} dans la solution saponine, sur la nuit à 4°C. Après trois lavages de 5 minutes au PBS 1X, les cellules sont incubées avec l'anticorps secondaire anti-rabbit couplé à Alexa568 (rouge), dilué au 2000^{ème} dans la solution de saponine, pendant 30 minutes à température ambiante. Les cellules sont lavées trois fois au PBS 1X puis montées entre lame et lammelle avec une solution de montage contenant un marqueur nucléaire : DAPI (Duo82040, Sigma-Aldrich). Les images sont prises avec un microscope Axio Imager 2 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany) équipé d'un Apotome 2 (Carl Zeiss GmbH). L'acquisition des images a été réalisée par une caméra AxioCam MRm monochrome CCD camera (Carl Zeiss GmbH) équipée d'un filtre 43HE (Rhodamine/Alexa568) et 49 (DAPI). La quantification du marquage nucléaire de Foxo3a est analysée avec le logiciel Image J.

VI. Immunoprécipitation de chromatine

Toutes les solutions dans ce protocole utilisées sont filtrées (0.22µm) avant utilisation.

L'immunoprécipitation de chromatine (ChIP) est réalisée à partir de 10 millions de cellules fixées avec de la formaldéhyde à 1% pendant 10 minutes à température ambiante (RT). La fixation est arrêtée avec 0.125 M de Glycine incubée 5 minutes à RT. Après un lavage au PBS 1X, les cellules sont raclées dans du tampon de lyse (PIPES 5mM pH8 ; KCl 85mM, NP-40 0.5%, inhibiteur de protéase). Après centrifugation à 2000 rpm pendant 5 minutes à 4°C, les noyaux contenus dans le culot sont lysés avec du tampon RIPA (sodium deoxycholate 0.5%, NP-40 1%, SDS 1%, inhibiteur de protéase) puis une sonication est effectuée afin d'obtenir des fragments de chromatine d'environ 100-500 bp. Après centrifugation à 14 000 rpm pendant 10 minutes à 4°C, les fragments de chromatine sont récupérées dans le surnageant.

Avant l'immunoprécipitation de chromatine, 50µl de billes magnétiques (couplées à des protéines G) sont incubées avec 5µg d'anticorps anti-Foxo3a (voir tableau 5) ou d'anticorps IgG contrôle sur une nuit à 4°C sous agitation. Le lendemain les billes sont lavées et

incubées avec 40µg d'ADN sur une nuit à 4°C sous agitation. Puis les billes sont à nouveau lavées une fois avec du dialysis Buffer (EDTA 2mM, Tris 50 mM pH 8.1, sarkosyl 0,2%, inhibiteur de protéase), 5 fois avec du wash buffer (Tris 100 mM pH 8.8, LiCl 0.5 M, NP-40 1%, NaDoc 1%, inhibiteur de protéase) et une fois avec du TE Buffer (...). Les billes sont reprises dans un petit volume de TE Buffer et incubées 30 minutes à 37°C avec 1 ml de RNase (10 mg/ml) puis incubées sur une nuit à 70°C avec 2µl de SDS à 10% afin de détaché l'ADN des billes. Pour finir, les protéines fixées à l'ADN sont dégradées par l'ajout de 2µl de protéinase K (20 mg/ml) pendant 1h30 à 45°C et l'ADN est purifié sur colonne (GFX PCR, DNA and gel purification kit, Amersham) selon les recommandations du fabricant. Une PCR quantitative est réalisée afin d'amplifier les sites de liaison à Foxo3a du promoteur de miR-21 (BS1 et BS2). La qPCR est effectuée avec les amorces sens et anti-sens (300nM), dont les séquences sont précisées dans le tableau 3, et du SYBR Green Supermix (Biorad).

VII. Test ELISA

Les cellules cancéreuses coliques sontensemencées à raison de 600 milles cellules par puits dans des plaques 6 puits. Les surnageants des cultures sont récupérés après 14h de traitements en DHA et le TNFα est dosé à l'aide du kit Human TNFα ELISA MAX™ Standard kit (Biolegend) selon les recommandations du fabricant.

VIII. Expérimentation animale

Les souris sont élevées et maintenues selon les consignes de la FELASA (Federation of Laboratory Animal Science Associations) et du comité d'éthique pour l'expérimentation animale de l'Université de Bourgogne. Préalablement aux expérimentations, les animaux ont été habitués aux conditions de l'animalerie pendant au minimum une semaine.

Pour induire la formation de tumeur, $1 \cdot 10^6$ de cellules HCT-116 ont été injectées en sous-cutanée chez des souris nudes mâles (Charles River Laboratories, France). Quand les tumeurs sont mesurables, les souris sont réparties en deux groupes soumis soit à un régime contrôle soit enrichi en DHA (Omegavie DHA90 TG, Polaris Nutritional Lipids). La composition des régimes est précisée dans le tableau 6. Le volume des tumeurs est calculé comme suit : $(\text{longueur} \times (\text{largeur})^2) / 2$

La neutralisation du TNF α a été réalisée par des injections intrapéritonéales de 100 μ g d'IgG contrôle ou d'anti-TNF α humain (clone #1825; R&D systems) tout les jours pendant 5 jours puis tout les deux jours jusqu'à 10 jours après la répartitions des souris dans les groupes contrôle ou DHA.

Tableau 6: Composition du régime contrôle et enrichi en DHA

Régime	Control	DHA
	g/100g	
Amidon	58,7	58,7
Caseine	20	20
Cellulose	5	5
Saccharose	5	5
Minéraux	4	4
Vitamines	2	2
DL-Methionine	0,3	0,3
Fish oil	0	3
dont DHA	0	2,778
Sunflower oil	5	2
dont LA	2,95	1,18

IX. Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm SD (déviation standard). La différence significative entre ces moyennes est déterminée par un test de Student (t-test) ou un test Mann-Whitney pour les comparaisons par paires, et un test ANOVA pour les comparaisons multiples.

Communications

Fluckiger A, Dumont A, Pais-de-Barros JP, Hichami A, Narce M, Ghiringhelli F, Rialland M. *L'extinction de la Stéaroyl-CoA désaturase (Scd1) induit l'apoptose des cellules cancéreuses coliques HCT116: rôle des microARN*. **Institut Multidisciplinaire de Biochimie des Lipides (IMBL) 2013 à Dijon**. (Poster)

Fluckiger A, Margier C, Hichami A, Ghiringhelli F and Rialland M. *Implication de mir-21 dans l'effet anti-tumoral de l'acide docosahexaénoïque (DHA)*. **Forum des Jeunes Chercheurs (FJC) 2013 à Dijon**. (Poster)

Fluckiger A, Dumont A, Hichami A, Derangere V, Rebe C, Thomas C, Apetoh L, Ghiringhelli F and Rialland M. *Docosahexaenoic acid (DHA) induces colon cancer cell death through AMPK α /Foxo3a/miR21 pathway*. **1^{er} Congrès de Physiologie et de Biologie Intégrative (CPBI) 4 - 6 mai 2015 à Strasbourg**. (Poster)

Fluckiger A, Dumont A, Hichami A, Derangere V, Rebe C, Thomas C, Apetoh L, Ghiringhelli F and Rialland M. *Docosahexaenoic acid (DHA) induces colon cancer cell death through AMPK α /Foxo3a/miR21 pathway*. **EACR-AACR-SIC Conference in "Anticancer Drug Action and Drug Resistance: from Cancer Biology to the Clinic". 20 - 23 juin 2015 à Florence, Italie**. (Poster)

Publications

Fluckiger A, Dumont A, Hichami A, Derangere V, Rebe C, De Rosny C, Causse S, Thomas C, Apetoh L, Ghiringhelli F and Rialland M. *Docosahexaenoic acid inhibits colon cancer progression through malignant cell-dependent TNF α production*. **Oncogene**.

Fluckiger A, Chikh M, Dosset M, Tili E, Mandard S, Desvergne B, Khan N, Rebe C, Apetoh L, Ghiringhelli F, Rialland M. and Hichami A. *DHA inhibits Th17 differentiation through down regulation of miR-146a expression*. **The Journal of immunology** (en cours de soumission)

Annexe

DHA inhibits Th17 differentiation through down -regulation of miR-146a expression.

Fluckiger A., Chikh M., Aboura I., Dosset M., Mandard S., Tili E., Desvergne B., Khan NA, Rebe C., Apetoh L., Rialland M., Ghiringhelli F. and Hichami A.

Abstract

Th17 lymphocytes are IL-17 producing helper T cells that play crucial roles in host defenses against extracellular bacteria and fungi, and in the regulation of inflammatory disorders and cancers. Docosahexaenoic (DHA) is a polyunsaturated fatty acids (PUFAs) belonging to n-3 family and known for its anti-inflammatory and anti-tumor properties using notably its capacity to inhibit Th17 differentiation. We demonstrated that miR-146a is preponderant for Th17 differentiation using anti-miR-146a or miR-146a knock-out (KO) mice and found that induction of Th17 differentiation from mice fed a DHA-enriched diet is inhibited and associated with a decrease of miR-146a expression. Furthermore, DHA-mediated inhibition of Th17 differentiation was associated *in vitro* to a decrease of miR-146a expression and that overexpression of miR-146a reversed the inhibitory effect of DHA on the Th17 polarization. The down-regulation of miR-146a expression by DHA is related to this capacity to inhibit NF- κ B signalling and to activate of PPAR γ . In addition, we showed that inhibition of miR-146a expression restored Numb expression, a direct target of miR-146a, which promoted the degradation of Notch1 repressing Th17 differentiation. Finally, we observed that DHA diet as well as miR-146a KO mice limited melanoma tumor growth in association with a decrease of Th17 frequency. In conclusion, our data support the fact that inhibition of miR-146a expression is a new mechanism by which DHA exerts its anti-inflammatory and its anti-cancer activity.

Introduction

Polyunsaturated fatty acids (PUFA) belonging to n-3 family have anti-inflammatory and immunosuppressive properties [1-4]. They are mainly found in fish oil and the major members of n-3 PUFA are docosahexaenoic (DHA) and eicosapentaenoic (EPA) acids. The anti-inflammatory effect of DHA in lymphocytes appeared more efficient than EPA essentially due to its ability to disrupt lipid raft organization [5] and therefore inhibits T cell signal transduction [6-10]. Hence, DHA has been used in the management of inflammatory and autoimmune diseases including inflammatory bowel disease, lupus, rheumatoid arthritis and multiple sclerosis. In addition, DHA has also been used as anticancer agent or to increase the effect of chemotherapy in cancers [11, 12]. The mechanisms of anti-cancer action involve different cell types. Thus, DHA is able to induce anti-proliferative effect on cancer cells through cell cycle arrest and apoptosis. Moreover, the tumor microenvironment may be modified by DHA changing the vascularization of the tumor [13, 14]. The anti-angiogenic effect of DHA would originate from inhibition of VEGF expression and IL-17 production [13-15].

Th17 cells are IL-17 producing cells belonging to a subtype of CD4⁺ T helper cells. Th17 are differentiated from naïve CD4⁺ T cells with a combination of IL-6, IL-21, IL-1 β , IL-23, and TGF β . Activation of STAT3 signaling is required for Th17 differentiation through induction of the transcription factor Ror γ t expression which is the main regulator of Th17 differentiation program. Th17 plays a preponderant role in control of inflammation and tumor immunity [16, 17]. However, the function in Th17 in tumor progression remains controversial with pro- and anti-cancer properties. Indeed, literature reported that Th17 has been able to eradicate melanoma tumors in mice while proinflammatory cytokines produced by Th17 (i.e. IL-17) promoted tumor growth. The pro-tumoral action of Th17 is associated to IL-17 secretion inducing angiogenesis, inflammation and myeloid-derived suppressor cell (MDSC) mobilization [18, 19]. We previously described that Th17 induced by the combination of TGF- β and IL-6 exhibited an immunosuppressive phenotype, as they co-expressed low ectonucleotidases (CD39 and CD73) [20]. Hence, Th17 by their pro-inflammatory activity may be the link between inflammation and cancer development [21] and anti-cancer response of DHA is partly mediated by the inhibition of Th17 differentiation [22, 23]. Thus, we previously showed that DHA enriched diet prevented IL-17 production by Th17 cells through enhancing SOCS3 expression induced by PPAR γ activation [15].

Beside the two main transcription factors, Stat3 and Ror γ t, miRNA represent an additional Th17 regulator. Indeed it has been reported that miR-21 [24], miR-326 [25], miR-155 [26] and Let-7f (mice) [27] increased Th17 differentiation by interfering with signaling pathways involved in Th17 program. MicroRNA also appears as marker of inflammation such as miR-146a which was initially described to play a pivotal role in innate immune response [28] and also seems to be involved in lymphocyte differentiation [29, 30]. MiR-146a could be involved in Th17 differentiation as its expression was positively correlated to the increase of IL-17 by lymphocytes in autoimmune inflammatory diseases [31, 32].

In the present study, we investigated the role of miR-146a in DHA-induced inhibition of Th17 differentiation. We observed that DHA-mediated dampening of Th17 polarization was correlated to the inhibition of miR-146a expression. We found that miR-146a targeted Numb mRNA and as a consequence impacted Notch signaling regulating Th17 differentiation. Finally, we showed that miR-146a and Th17 cells dictated the anti-melanoma effect of a DHA-enriched diet.

Materials and methods

Mice

Female C57BL/6 and BALB/c mice were purchased from Centre d'élevage Janvier. ROR γ -eGFP reporter mice were obtained from Dr. Eberl (Institute Pasteur, Paris, France) and have been previously described [33]. PPAR α - and PPAR γ -deficient mice were provided by Pr. Béatrice Desvergne (Centre for Integrative Genomics, University of Lausanne, Switzerland) and have been previously described [34]. The miR-146a-deficient mice (B6(FVB)-*Mir146*^{tm1.1Bal/J}) were obtained from Jackson laboratory. All animals were bred and maintained according to both the Federation of Laboratory Animal Science Associations (FELASA) and the Animal Experimental Ethics Committee Guidelines (University of Burgundy, Dijon, France).

Reagents

γ -Secretase Inhibitor XXI was obtained from Calbiochem. ACHAP was from TCRIS, Bristol (UK). Omegavie DHA90 TG was provided by Polaris, Quimper (France). Sunflower oil was purchased from Lesieur, Neuilly-sur-Seine (France). All products used for PCR or transfection were obtained from Invitrogen Life Technologies, Saint Aubin (France). Mouse IL-4, IL-6, IL-12 and TGF- β were all purchased from MiltenyiBiotec. Anti-IL-4 (clone 11B11) and anti-IFN- γ (clone XMG1.2) antibodies were obtained from Bio-XCell. Rosiglitazone, GW9662, bezafibrate, GW7647 were purchased from Cayman Chemical Michigan, (USA). Free docosahexaenoic acid was obtained from Sigma-Aldrich (France)

Diets

To investigate the effect of dietary DHA in mice, we routinely constituted two groups either fed a control diet containing sunflower oil or fed a DHA-enriched diet containing Omegavie DHA90 TG (Polaris Nutritional Lipids) for 8 weeks before starting experiments. Diets were prepared as described elsewhere [35]. The chemical composition of the control diet was as follows (g/kg dry diet): starch, 587; casein, 200; cellulose, 50; sucrose, 50; mineral mix, 40; vitamin mix, 20; DL-methionine, 3; sunflower, 50. DHA-enriched diet, contain the same composition as control diet except that sunflower was reduced to 20g/kg and 30g/kg of Omegavie DHA90 TG was added in the diet.

Fatty acid analysis

Total lipids were extracted from naïve CD4⁺ T cells according to the method of Bligh and Dyer [36]. Total lipid extracts were fractionated into phospholipid classes on silica gel thin

layer and the fatty acid phospholipid composition was determined by gas_chromatography after saponification and methylation at 80 °C for 20 min with BF₃/methanol (14%) according to Triboulot et al.

***In vitro* T-cell differentiation**

Naïve CD4⁺ T cells (CD4⁺CD62L^{hi}CD44^{lo}) cells were purified from spleen with mouse CD4⁺CD62L⁺ Cell isolation kit II (MiltenyiBiotec). Purified naïve T cells were stimulated with coated anti-CD3 (145-2C11, 2µg/mL; BioXCell) and anti-CD28 (PV-1, 2 µg/mL; BioXCell) and polarized into effector CD4⁺ T lymphocyte subsets by a combination of recombinant cytokines and blocking mAb as follows. Non polarized Th0 were obtained by addition of anti-IFN-γ (10 µg/mL) and anti-IL-4 (10 µg/mL), Th1 differentiation was generated by incubation with IL-12 (10 ng/mL) and anti-IL-4 (10 µg/mL), Th2 differentiation with IL-4 (20 ng/mL) and anti-IFN-γ (10 µg/mL), Treg differentiation with TGF-β (2 ng/mL) and Th17 polarization was induced with TGF-β (4 ng/mL), IL-6 (20 ng/mL), anti-IFN-γ (10µg/mL) and anti-IL-4 (10 µg/mL). In some experiments, cells were incubated with DHA 20 µM for 24h before their polarization. PPAR_γ agonist troglitazone (0.1 µM) and antagonist GW9662 (0.75 µM), PPAR_α antagonist GW6471 (1 µM) and agonist bezafibrate (30 µM) were added to cells 30 min before their polarization. Cells were classically harvested on day 3 otherwise time is specified.

Affymetrix Microarray Analyses.

RNAs extracted with TRIzol (Invitrogen) were subsequently subjected to DNase digestion (Turbo-DNase; Ambion). Affymetrix microarray analyses were done at the Ohio State University microarray facility.

Affymetrix Microarray and Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

Total RNA from T cells was extracted with TRIzol (Invitrogen) and subsequently subjected to DNase digestion (Turbo-DNase; Ambion). Affymetrix microarray analyses were done at the Ohio State University microarray facility. Total RNA purified with TriReagent (Ambion) (200 ng) was reverse-transcribed using M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) and analyzed by qRT-PCR with the SYBR Green method according to the manufacturer's instructions using the 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Expression was normalized to the expression of mouse *Actb*. Primers designed to assess gene expression are as follows: *Actb* *Actb* forward 5'-atggagggaatacagccc-3' and *Actb* reverse 5'-ttctttgcagctccttcgtt-3'; *Il-17* forward 5'-ttgatgcagcctgagtgtct-3' and *Il-17* reverse 5'-

aattccagaaccgctccagt-30; notch1 *forward* 5'-TGTGGACGGCGTGAATACCT-3' notch1 *reverse* 5'-GGGCATGAGCTGACATTCGT-3', Numb *forward* 5'-GAAGACCGATTTCCCAATAAAA-3' Numb *reverse* 5'-GCAGCACCAGAAGACTGACC-3'. RNA expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method.

For miR-146a qRT-PCR analysis, total RNA from T cells was extracted with TriReagent (Ambion) and 100 ng of RNA was reverse-transcribed with TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Invitrogen). Real-time RT-qPCR was performed with TaqMan® Universal PCR Master Mix II using TaqMan MicroRNA Assay primers for murine miR-146a (Life technologies). U6 snRNA (life technologies) was used as internal standard to normalize the expression of miR-146a.

Quantification of cytokines

After 72 hours polarization, cell culture supernatants were collected for mouse IL-17a quantification by ELISA (Biolegend) according to the manufacturer's protocol. For intracellular cytokine staining by flow cytometry, cells were cultured for 3 days and then stimulated for 4 hours at 37°C in culture medium containing phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; 50 ng/mL; Sigma-Aldrich), ionomycin (1 µg/mL; Sigma-Aldrich) and monensin (GolgiStop; 1 µL/mL; BD Biosciences). After staining for surface markers and 7-amino-actinomycin D (7-AAD) to exclude dead cells, cells were fixed and permeabilized according to the manufacturer's instructions (Cytotfix/Cytoperm Kit; BD Biosciences). The cells were stained with monoclonal antibodies (mAb) for flow cytometry analyses as follows: fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-CD4 (GK1.5; BD Biosciences), Alexa Fluor 647-conjugated anti-IL-17 (eBio 17B7; eBiosciences), and phycoerythrin (PE)-conjugated anti-IL-4 (554435; BD Biosciences) or PE-conjugated anti-IFN-γ (554412; BD Biosciences). All events were acquired by a BD LSR-II cytometer equipped with BD FACS Diva software (BD Biosciences) and data were analyzed using FlowJo software (Tree Star).

siRNA transfection

For transfection experiments, naïve CD4⁺ T cells were transfected *in vitro* with Silencer Select Predesigned siRNA specific for murine, siRNA Numb (ID: 435981; Ambion), or Silencer Negative Control N°1 (Ambion) with transfection reagent *TransIT*-TKO (Mirus Bio LLC) according to the manufacturer's instructions. Twenty-four hours after transfection, CD4⁺ T cells were restimulated with anti-CD3 and anti-CD28, differentiated in T_H0 or Th17 as described above and cultured for an additional 24 or 48 hours before analysis.

Immunoblot analysis

Purified naïve T cells were differentiated into Th0 or Th17, harvested and washed twice with PBS before resuspension in 50 µl of lysis buffer (HEPES, 20 mM, pH 7.3; EDTA, 1 mM; EGTA, 1 mM; NaCl, 0.15 mM; Triton X-100, 1%; glycerol, 10%; phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM; sodium orthovanadate, 2 mM; anti-protease cocktail). After centrifugation (12000g for 10 min at 4°C), total protein lysate was quantified with bicinchoninic acid (BCA) assay (Life Technologies) and either used immediately for Western blot detection or stored at -80°C. For nuclear NF-κB translocation, nuclear protein purification was performed using NE-PER nuclear and cytoplasmic extraction kit (PIERCE). Denatured proteins (60 µg) were separated by SDS-PAGE (10%) and transferred onto polyvinylidene difluoride membranes (Millipore). Saturation of the membrane was done with BSA in TBS-0.1% Tween 20 and immunodetection was performed by overnight incubation with primary antibodies: NF-κB p65 (D14E12, Cell Signaling), P-P65 (93H1, Cell Signaling), anti-IκBα (9905, Cell Signaling); anti-NF-κB2 p100/p52 (4882, Cell Signaling), anti-Numb (C29G11, Cell Signaling), anti-cleaved notch 1 (D3B8, Cell Signaling), anti-RORγt (AFKJS-9, ebioscience) and anti-β-actin or laminin (Sigma-Aldrich). Primary antibodies were detected with a horse radish peroxidase conjugated mouse anti-rabbit antibody and visualized using an ECL Kit (Merck Millipore) on Bio-Rad ChemiDoc XRS⁺ system. Densitometry analysis was performed on Bio-Rad Image Lab Software (version 4.1).

Chromatin immunoprecipitation assay

Cells were differentiated for 24 hours into Th17 cells. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) was conducted according to the manufacturer's instructions (ChiP-IT Express Enzymatic; Active Motif). Cells were fixed with 1% formaldehyde at room temperature (RT) for 10 minutes and quenched with 0.125 M glycine. Chromatin was isolated and sonicated into chromatin fragments with an average length of 100–500 bp. Twenty-five micrograms of DNA were immunoprecipitated with a NF-κB p65-specific antibody (cell signaling). After chromatin elution, crosslinking was reversed and PCR was performed to amplify NF-κB binding sites (NF-κB1 and NF-κB2) of miR-146a promoter, *NF-κB1* 297 5'-CAGGGGCACATGTATGAGGG -3' and 5'-AGGTGCATCAAGAGGACTGC -3'; and *NF-κB2* 679 5'-GGCAGGTATCACTGGGGAAC -3' and 5'-CAGGACCTTCCCCTTTTCA -3'. Data were expressed in fold change occupancy for Th0 DHA-enriched diet and Th17 (Control- and DHA- enriched diet) relative Th0 control diet.

Immunofluorescence

Immunofluorescence was performed as previously described [37]. Briefly, cytopsin prepared slides were fixed in 95% ethanol and rehydrated in 0.1 M PBS (pH 7.4). Slides were blocked in PBS containing 5% fetal calf serum and 0.2% triton X-100 for 30 minutes at room temperature before overnight incubation at 4°C with primary antibody (1/100 dilution). After washing, slides were incubated for 2 hours at room temperature with FITC or rhodamine-conjugated secondary antibodies. Staining specificity was assessed by treating slides in the absence of primary antibodies. After three washings with PBS, a drop of ProLong Antifade Reagents containing DAPI (Life technologies) was added on the slide for the analysis under fluorescent microscope (Zeiss Axioskop).

Tumor growth experiments

B16F10 melanoma were cultured at 37°C under 5% CO₂ in RPMI-1640 with GlutaMax-1 (Lonza) supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum (Lonza), 1% penicillin, streptomycin, amphotericin B (Gibco), 4 mmol/L HEPES (Gibco), and 1 mmol/L sodium pyruvate (Gibco). To induce tumor formation, 3×10^5 B16F10 were subcutaneously injected into C57/BL6J mice or miR-146a ^{-/-} mice. Tumor surface, based on caliper measurements, was calculated every 2 days following the formula: shortest diameter x largest diameter. In some experiments, mice were killed after 15 days following the tumor injection and the spleens were aseptically removed for splenocytes purification. They were incubated for 4 hours at 37°C in culture medium containing phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; 50 ng/mL; Sigma-Aldrich), ionomycin (1 mg/mL; Sigma-Aldrich), and monensin (GolgiStop; 1 mL/mL; BD Biosciences). After staining of surface markers and 7-amino-actinomycin D (7-AAD) to exclude dead cells, cells were fixed and permeabilized according to the manufacturer's instructions (Cytotfix/Cytoperm Kit; BD Biosciences). Cells were stained for FACS analysis with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-CD4, peridinin-chlorophyll proteins/Cyanine5.5 (PerCP/Cy5.5)-conjugated anti-CD8, phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CCR6 and eFluor 660-conjugated anti-IL-17 purchased from BD Biosciences. All events were acquired by a BD LSR-II cytometer equipped with BD FACSDiva software (BD Biosciences) and data were analyzed using FlowJo software (Tree Star).

Statistical analyses

Results are shown as means ± SEM. The significance of the differences between mean values was determined by two-way ANOVA (STATISTICA, Version 4.1, Statsoft), followed by the least significant difference (LSD) test. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results

DHA inhibited Th17 differentiation via the inhibition of miR-146a expression

We previously reported that DHA enriched diet dampened Th17 polarization [15]. In this study, we were interested in the involvement of miRNAs in DHA-mediated inhibition of Th17 polarization. First, we determined by miRNA microarray the profile of miRNA expression in *in vitro*-Th17 differentiated cells treated with DHA 20 μ M for 24 hours compared to control Th17 cells. We analyzed the expression of 402 miRNAs and observed that 18 miRNAs were differentially expressed in DHA-treated Th17 cells (SD fig 1a). We focused our work on miR-146a since it is highly expressed in CD4⁺ IL-17-producing cells and is drastically down-regulated in response to DHA treatment. To confirm such regulation, we tested miR-146a expression in *in vitro*-Th17-polarized cells from mice fed a control diet or DHA-enriched diet using qRT-PCR. We confirmed that DHA diet decreased miR-146a expression (fig 1a). As miR-146a belongs to miR-146 family, we analyzed miR-146b expression in Th17 polarized from mice fed control diet or DHA-enriched diet. We did not detect significant decrease in miR-146b expression in Th0 or Th17 generated from mice fed a DHA-enriched diet (SD fig 1b). We then tested expression of miR-146a in different T helper cell subsets from mice fed control diet or DHA-enriched diet. We observed that the expression of miR-146a is increased in Th1, Treg and Th17 cells compared to Th0 and generated from mice fed control diet while miR-146a expression is decreased in Th2 cells (fig 1b). Moreover, DHA diet reduced the expression of miR-146a in the different T helper cells (fig 1b). The decrease of miR-146a expression induced by DHA diet was correlated with a decrease of IL-4, IL-17, IFN γ secretion in Th2, Th17 and Th1 respectively (SD fig 1 c, d, e). For Treg, we observed that the decrease of miR-146a expression induced by DHA diet was associated to an increase of IL-10 expression (SD fig 1f).

To test the role of miR-146a in Th17 polarization, we transfected naïve CD4⁺ T cells with anti-miR-146a or mimic-miR-146a 24 hours before inducing their differentiation under Th17 cell-polarizing conditions. We noticed that the inhibition of miR-146a expression using anti-miR-146a decreased the secretion of IL-17a in Th17-polarized from mice fed control diet and DHA diet (fig 1c) whereas the over-expression of miR-146a using mimic-miR-146a reversed the inhibitory effect of DHA diet on IL-17a expression (fig 1c). In the same way, Th17 polarized from miR-146a ko mice produced less IL-17 when compared to Th17 polarized from WT mice under control diet (fig 1d). Taken together these observations

suggested that miR-146a induction seems to be required for Th17 polarization and that DHA curtailed Th17 differentiation by reducing miR-146a expression. We then evaluated the effect of DHA and miR-146a on ROR γ t, a master transcription factor of the Th17 cells lineage. We observed an induction of ROR γ t in Th17 polarized from mice fed control diet whereas DHA-enriched diet limited the induction of ROR γ t. Furthermore, induction of ROR γ t expression was not observed in Th17-polarized cells from miR-146a-deficient mice (fig 1e). ROR γ t expression was under the control of miR-146a as we observed that inhibition of miR-146a expression by anti-miR-146a dampened ROR γ t expression. In contrast, overexpression of miR-146a using miR-146a-mimic increased ROR γ t expression in Th17 from mice fed control diet. Interestingly, overexpression of miR-146a using miR-146a-mimic partially counteracted the inhibitory effect of DHA-enriched diet on ROR γ t expression (fig 1f). These observations were also confirmed using in vitro-polarized Th17 cells from Ror γ t-eGFP reporter mice. Flow cytometry analysis showed that DHA-enriched diet reduced the proportion of Ror γ t-expressing cells in Th17 differentiated cells. Furthermore, overexpression of miR-146a reversed the inhibitory effect of DHA-enriched diet on ROR γ t-eGFP expression and inhibition of miR-146a using anti miR-146a dampened the proportion of ROR γ t-expressing cells observed in Th17 polarized from mice fed control diet while DHA diet did not reduce ROR γ t-expressing cells in this condition (fig 1g). Together these data underscored that DHA diet impeded Th17 differentiation via modulation of miR-146a.

Involvement of NF- κ B and PPAR γ in DHA-inhibition of Th17 differentiation and miR-146a expression

DHA is known to activate PPAR γ pathway and to inhibit NF- κ B [38, 39]. Therefore, we were interested in analyzing their contribution in DHA effect on Th17 polarization and regulation of miR-146a expression. We observed that PPAR γ inhibitor (GW9662), but not PPAR α inhibitor (GW7642), reversed the inhibitory effect of DHA-enriched diet on miR-146a expression and IL-17 secretion in Th17 polarized cells. Conversely, PPAR γ agonist (rosiglitazone), but not PPAR α agonist; benzafibrate, inhibited both miR-146a expression and IL-17 secretion from Th17 cells polarized from mice fed control diet, mimicking the effect of DHA-enriched diet (fig 2a, fig 2b). These results suggested that PPAR γ , but not PPAR α , activation reduced miR-146a expression and Th17 differentiation, and that DHA-enriched diet inhibited miR-146a expression through PPAR γ activation (fig 2a, fig 2b). To confirm this

observation, we polarized Th17 cells from naive CD4⁺ cells of PPAR α KO and PPAR γ KO mice. We observed that Th17 cells generated from PPAR γ KO mice expressed higher level of miR-146a when compared to WT mice. Furthermore, DHA treatment reduced both miR-146a expression and IL-17a secretion in WT CD4⁺ T cells differentiated in Th17 (fig 2c and fig 2d), the lack of PPAR γ (PPAR γ KO), but not PPAR α (PPAR α KO) (fig 2e and fig 2f) prevented the inhibitory effect of DHA-enriched diet on Th17 polarization.

In the canonical pathway of NF- κ B activation, the phosphorylation of I κ B α by IKK α and IKK β leads to its ubiquitination and proteosomal degradation, and subsequently the release and the phosphorylation of NF- κ B (p65) allowing its translocation to the nucleus where it binds to NF- κ B response elements (NF κ B-RE) on the promoter of target genes. Western blotting analysis showed that the expression of I κ B α in Th17 polarized from DHA-fed mice was higher when compared to Th17 from control diet-fed mice (fig 3a). This suggested that DHA diet decreased I κ B α degradation and by consequent could decrease activation of NF κ B. As expected DHA diet prevented p65 phosphorylation and its nuclear translocation when compared to Th17 from control diet-fed mice (fig 3a). The inhibition of nuclear p65 translocation induced by DHA was confirmed by immunofluorescence staining using anti-p65 antibody (SD fig 2). To investigate the involvement of NF- κ B in the inhibitory effect of DHA-enriched diet on Th17 polarization and miR-146a expression, we used ACHP, a selective inhibitor of IKK β and IKK β α [40]. We observed that pretreatment of naive T cells with ACHP before their induction into Th17 polarization, reduced both miR-146a expression and IL-17a secretion mimicking the effect of DHA-enriched diet and underlined the role of NF- κ B in IL-17a and miR-146a regulation (fig 2a, fig 2b).

In order to establish a link between nuclear p65 translocation and miR-146a expression, we investigated DNA binding of p65 on two putative NF- κ B-RE located at positions -297 and -679 (Determined with Transfac software) in the promoter of miR-146a. We observed that there was a significant increase of p65 binding on NF- κ B-RE -297 (4 fold) and on NF- κ B-RE -679 (2.5 fold) in differentiated Th17 from mice fed control diet while DHA-enriched diet significantly reduced this binding (fig 3b). Together these data underlined that DHA regulated miR-146a expression through NF- κ B and PPAR γ signaling.

DHA regulated Numb and Notch expression through miR-146a

Among the target of miR-146a detected using TargetScan software, we focused our interest on Numb and Notch1. Indeed, Notch1 has been described to be involved in Th17 differentiation [41] and Numb is known as an inhibitor of notch signalling by promoting the ubiquitination and proteosomal degradation of both Notch1 receptor and Notch1 intracellular domain [42, 43]. We evaluated the involvement of miR-146a and DHA in the modulation of Notch 1 and numb mRNA expression. We observed that DHA-enriched diet, as well as the inhibition of miR-146a (using anti-miR-146a or miR-146a Ko mice), increased Numb mRNA expression in Th17 cells (fig 4a). Conversely, over-expression of miR-146a (mimic miR-146a) reduced the stimulatory effect of DHA diet on Numb expression (fig 4a). Taken together this data demonstrated that DHA increased Numb via down-regulation of miR-146a.

Concerning Notch, we observed that its mRNA expression was not significantly affected by DHA diet or in miR-146a KO. Thus, we excluded a direct effect of DHA or miR-146a on the expression of Notch1 at the transcriptional level (SD fig 3a). At the protein level, we found that DHA and miR-146a depletion enhanced Numb expression (Fig 4b and SD fig 3b) while inhibited Notch expression (Fig 4b and SD fig 3c). We observed that GSI, an inhibitor of the gamma secretase that blunted Notch signaling, inhibited IL-17a production in Th17 cells polarized from mice fed control diet and that DHA diet did not enhance the inhibitor effect of GSI suggesting that DHA acted via Notch pathway (fig 5a, fig 5b). In addition, Numb inhibition using siRNA counteracted the inhibitory effect of DHA-enriched on IL-17a secretion in WT mice (fig 5c).

Since, it has been reported that Numb may be involved in the ubiquitin-proteasome degradation of Notch1, we investigated Notch1 ubiquitination under DHA diet. Hence, Th17 polarization in the presence of MG-132, a proteasome inhibitor, showed that DHA increased the ubiquitination of proteins (SD fig 4a) including Notch1 in Th17 from DHA-fed mice. Similar results were obtained using Th17 from miR-146a KO mice when compared to Th17 from mice fed control diet (SD fig 4b).

Together these data highlighted that DHA-mediated down-regulation of miR-146a expression increased Numb expression inducing degradation of Notch1 and inhibition of Th17 polarization.

DHA diet inhibited B16-F10 tumor growth through inhibition of miR-146a expression

To investigate the physiological relevance of DHA-mediated miR-146a inhibition, we evaluated the effect of DHA-diet on B16F10 melanoma tumor growth subcutaneously injected either into C57BL/6 mice or miR-146-deficient mice. As previously reported [15], we observed that DHA-enriched diet inhibited subcutaneous B16F10 melanoma tumor growth. Similarly, B16F10 tumor grew more slowly in miR-146a Ko mice and DHA diet did not affect tumor growth suggesting that antitumor effect of DHA diet may result from the inhibition of miR-146a expression (fig 6a). Hence, we examined frequencies of IL-17-producing CD4⁺ in spleen of WT-mice and miR-146a ko-mice bearing tumor. We observed that B16F10 tumors induced a significant increase of splenic Th17 cells detected with CD4+CCR6+ cells (fig 6b) and CD4+IL-17+ CCR6+ staining by flow cytometry when compared to mice without tumor (fig 6c). Both DHA diet and miR-146a deficiency, whatever the diet, dampened the occurrence of splenic Th17 cells in B16F10 tumor bearing mice.

Discussion

Naive CD4⁺ T cells upon recognition of their cognate antigen presented by APC such as dendritic cells can differentiate into specialized and effector T cells: Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, and FoxP3⁺ regulatory T (Treg) cells [44]. Th17 by their pro-inflammatory function are key element in the link between chronic inflammation and cancer development [21]. Thus, pro-tumoral inflammatory Th17 could be a promising anti-cancer target in the fight against this pathology. In this report, we underlined the capacity of DHA to inhibit the Th17 differentiation via a regulation of miR-146a expression. Indeed, DHA down-regulated miR-146a expression which subsequently inhibited Notch signalling pathway through increase expression of Numb, a miR-146a target.

It is well admitted that DHA plays beneficial role in several autoimmune, inflammatory and cancer diseases. Indeed, DHA accumulation into naive T cells was previously shown to prevent TGF- β /IL-6-induced Th17 cell differentiation [15, 45] and to affect the differentiation of Th1, Th2 and Treg. Our results suggested that miR-146a increased is preponderant for the induction of Th17 differentiation. Indeed, the lack of miR-146a in naïve T cells from control-fed mice treated for Th17 polarization decreased both ROR γ t expression and IL-17 secretion. We also observed that DHA diet inhibited Th17 polarization by decreasing both ROR γ t expression and IL-17 secretion, mimicking what we observed in Th17 from miR-146a KO. Conversely, enforced expression of miR-146a in Th17 from DHA-fed mice reversed inhibitory effect of DHA. However, inhibition of miR-146a expression did not exert an additive effect on the inhibitory activity of DHA diet on Th17 polarization. This suggests that the inhibition of miR-146a expression would represent a main pathway by which DHA hampers Th17 cell differentiation. Relationship between miR-146a and Th17 differentiation and Il-17 production are still unclear and controversial. Indeed, Isobel *et al* [46] did not observe any change in baseline T-cell populations, including Th17, when miR-146a deficiency was restricted to T cells. However, they observed following *Heligmosomoides polygyrus* airway challenge that T cells from miR-146a^{-/-} mice had elevated airway eosinophils and neutrophils accompanied by elevated Th17 and Il-17a in lungs. In contrast, studies reported that there was an increase of miR-146a expression in the IL-17 producing T cells in RA patients [47] and a positive correlation between IL-17 and miR-146a in skin lesion and PBMC of psoriasis patients [48]. Moreover, it is noteworthy to mention that DHA did not affect miR-146b expression despite a similar sequence to miR-146a except for two bases

suggesting that miR-146b did not participate to the regulation of DHA-inhibited Th17 polarization.

Our investigations revealed that inactivation of PPAR γ , but not PPAR α , induced an increase of miR-146a expression and reinforced Th17 polarization. We determined that DHA diet inhibited miR-146a expression using the activation of PPAR γ . DHA is a natural agonist of PPAR γ and its activation negatively regulates Th17 differentiation evidencing by decrease of IL-17 production via its capacity to regulate SOCS3 [15]. The activation of PPAR γ leads also to transrepression of Stat3 preventing Stat3 signaling [49]. Yet, increase of miR-146a expression depended on Stat3 activation in HepG2 cells suggesting that DHA-mediated PPAR γ activation might repress miR-146a expression through transrepression of Stat3 [50]. Furthermore, it has been reported that DHA treatment or PPAR γ activation exerted their anti-inflammatory properties through inhibition of NF- κ B signaling [51, 52]. NF- κ B induced the expression of several pro-inflammatory cytokines [53] and seems to be required for Th17 induction [54]. Expression of miR-146a is dependent on NF- κ B activation [28, 55]. As expected, we observed that the inhibition of NF- κ B by ACHAP abolished Th17 differentiation in association with decrease of miR-146a expression. However, we did not observe any additional inhibitory effect of ACHAP treatment on the inhibition induced by DHA diet on IL-17 secretion suggesting that DHA and ACHAP have NF- κ B as common target. We confirmed in Th17 cells that DHA diet inhibited NF- κ B signalling evidencing by decrease of NF- κ B p65 phosphorylation and inhibition of its nuclear translocation showing that DHA-mediated NF- κ B nuclear translocation inhibition led to a reduction of NF- κ B binding to its response element in the promoter region of miR-146a and thereby attenuating the miRNA expression.

Notch 1 plays a pivotal role in Th17 differentiation. Indeed, Notch1 directly regulates the development of Th17 through its binding to both ROR γ t and IL-17 promoters [41]. In this study, we observed that the inhibition of Notch signalling through the inhibition of γ -secretase by Compound E decreased both IL-17 and ROR γ t expression only in Th17 polarized from control diet-fed mice. The data is in line with Keerthivasan *et al.* [41] who reported that either γ -secretase inhibitor or notch1 siRNA treatments decreased Th17 differentiation. To further understand the role of miR-146a in Th17 differentiation, we were interested in Numb and Notch1 regulation which are putative miR-146a targets [Target scan; Griffiths-Jones S]. Notch signalling is known to play a crucial role in cell differentiation in many cell types

including T-cell (Deftos). Moreover, Numb is an inhibitor of Notch1 signalling. Indeed, Numb interacts with the ubiquitin ligase E3 Itch and promotes the ubiquitination and degradation of Notch1 [42, 43]. As expected, we observed that DHA diet increased the expression of Numb mRNA and protein in Th17 cells since we observed a decrease of miR-146a expression in DHA condition. Furthermore, it seems that DHA diet decreased Th17 differentiation via the induction of Numb expression as Numb downregulation by siRNA counteracted the inhibitory effect of DHA diet on IL-17 expression. The hypothesis that induction of Numb expression by DHA diet is due to the inhibition of miR-146a expression is comforted by the observation that Th17 from miR-146a KO mice expressed high level of Numb. Conversely, overexpression of miR-146a curtailed Numb expression in Th17 from DHA-fed mice. In addition, Th17 polarized from mice fed control diet, which expressed high level of miR-146a and IL-17, exhibited a weak expression of Numb. In contrast, investigation of Notch expression at protein level by western blot and immunofluorescence showed that intracellular Notch fragment (NIC) protein is highly expressed in Th17 from control diet-fed mice and is weakly expressed in both Th17 from DHA-fed mice and miR-146a KO mice. This would suggest that Notch1 is not a target of miR-146a. Change in Notch1 expression has been only found at protein level leading to the hypothesis that regulation may occur at a post-translational level via ubiquitination and proteasomal degradation pathway involving Numb as suggested by McGill and McGlade [43]. Hence, the use of proteasome inhibitor (MG132) before induction of Th17 differentiation showed that DHA diet globally increased the level of ubiquitinated proteins. Furthermore, the absence of miR-146a in Th17 from mice fed DHA diet and miR-146a KO led to an increase of Notch1 protein ubiquitination.

As we have previously reported [15] DHA-enriched diet delayed subcutaneous B16F10 melanoma tumour growth throughout the inhibition of Th17 differentiation. In the present work, we showed that miR-146a in Th17 was involved in the regulation of tumor growth by DHA. We found that tumor grew at a lower rate in the absence of miR-146a and there was no additive inhibitory effect of DHA diet on tumor growth in miR-146a KO mice. Our observations are in agreement with a previous report of Huffaker *et al.* [56] who described an enhanced antitumor responses in miR-146a^{-/-} mice that could result from altered suppressive activities of Treg and an increase of IFN γ expression by effector T cells. To investigate the link between antitumor effect of DHA and miR-146a expression in Th17, we measured the frequency of Th17 cells from both miR-146a KO and WT mice bearing tumor under DHA diet. We noted in mice fed control diet, who have a high B16 tumour growth, exhibited a

high frequency of Th17 characterized by IL-17⁺/CCR6⁺ staining. Chemokine receptor 6 (CCR6) is highly expressed in Th17 facilitating their migration toward tumor tissues expressing CCL20 (the ligand of CCR6) [57]. However, we observed that miR-146a KO mice bearing tumour exhibited a low frequency of inflammatory spleen Th17 IL-17⁺ CCR6⁺ despite a high number of splenic CD4⁺ [58]. Similarly, DHA fed mice exhibited a low frequency of IL-17⁺CCR6⁺ CD4⁺ cells in spleen when compared to WT-fed control diet. Therefore, the anti-cancer effect of DHA diet may be attributed to the inhibition of Th17 differentiation through down-regulation of miR-146a in these cells.

In conclusion, our results unravel a new mechanism by which DHA prevented Th17 differentiation. Indeed, we showed that DHA-enriched diet inhibited miR-146a expression throughout the inhibition of NF-κB signalling that may result from activation of PPARγ and that the decrease expression of miR-146a led to increase expression of Numb which would alleviate Notch1 signalling repressing Th17 differentiation.

Figure Legends

Figure 1. DHA controls miR-146a expression in Th17 cells. (a) Relative expression of miR-146a analysed by qPCR in *in vitro* Th0 and Th17-polarized cells from mice with control or DHA-enriched diet. (b) Relative expression of mir-146a analysed by qPCR in *in vitro* Th0, Th2, Th1, Th17 and T-reg polarized cells from control and DHA-fed mice. (c) Secretion analysis of IL-17 by ELISA in *in vitro* Th17 polarized cells from naives CD4⁺ T-cells, isolated from control or DHA-fed mice, and transfected with anti-miR-146a or mimic-miR-146a before differentiation in Th17 cells. (d) Secretion analysis of IL-17 in *in vitro* Th0 and Th17 polarized cells from naives CD4⁺ T-cells isolated from WT or miR-146a KO mice. (e) Analysis of ROR γ T protein expression by western-blotting in *in vitro* Th0 and Th17 polarized cells from WT mice with control or DHA-enriched diet and from miR-146a KO mice. (f) Analysis of ROR γ T protein expression in *in vitro* Th17 polarized cells from naives CD4⁺ T-cells, isolated from control or DHA-fed mice, and transfected with anti-miR-146a or mimic-miR-146a before differentiation in Th17 cells. (g) Analysis of ROR γ T expression by flow cytometry in *in vitro* Th17 polarized cells from naives CD4⁺ T-cells, of ROR γ T-eGFP reporter mice with control or DHA-enriched diet, and transfected with anti-miR-146a or mimic-miR-146a before differentiation in Th17 cells. Data are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments and compared to control (ctrl) unless otherwise indicated. ** p<0.01; *** p<0.001; ns= non-significant.

Figure 2. MiR-146a expression is dependent of PPAR γ pathway. Analysis of miR-146a relative expression (a) and IL-17 secretion (b) in *in vitro* Th17 polarized cells from naives CD4⁺ T-cells, isolated from control or DHA-fed mice, and treated with PPAR γ agonist (Rosiglitazone) and antagonist (GW9662), PPAR α agonist (Benzafibrate) and antagonist (GW7647), or a selective inhibitor of IKK (ACHAP). Analysis of miR-146a relative expression (c) and IL-17 secretion (d) in *in vitro* Th17 polarized cells from WT mice and PPAR γ KO mice with control or DHA-enriched diet. Analysis of miR-146a relative expression (e) and IL-17 secretion (f) in *in vitro* Th17 polarized cells from WT-mice and PPAR α KO mice with control or DHA-enriched diet. Data are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments and compared to control (ctrl) unless otherwise indicated. *** p<0.001; ns= non-significant.

Figure 3. MiR-146a expression is dependent of NF- κ B pathway. (a) Analysis of p-NF- κ B P65, total NF- κ B P65, I κ B α and nuclear NF- κ B P65 by western-blotting in *in vitro* Th0 and

Th17 polarized cells from control or DHA-fed mice. (b) ChIP analysis with anti-NF- κ B to determine binding of NF- κ B on two putative NF- κ B-RE located at -297 and -679 of miR-146a promotor in *in vitro* Th0 and Th17-polarized cells from mice with control or DHA-enriched diet. Data are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments and compared to control (ctrl) unless otherwise indicated. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Figure 4. miR-146a targets mRNA of Numb and regulates protein Notch 1. (a) Relative expression of Numb in *in vitro* Th17 polarized cells from naives CD4⁺ T-cells, isolated from control or DHA-fed mice, and transfected with anti-miR-146a or mimic-miR-146a before differentiation in Th17 cells. (b) Analysis of Numb and Notch1 protein expression by western-blotting in *in vitro* Th0 and Th17 polarized cells from WT mice with control or DHA-enriched diet and miR-146a KO mice.

Data are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments and compared to control (ctrl) unless otherwise indicated. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

Figure 5. Numb inhibits Th17 cells differentiation. Analysis of IL-17 secretion by ELISA (a) and IL-17 expression by flow cytometry (b) in *in vitro* Th17 polarized cells from naives CD4⁺ T-cells, isolated from control or DHA-fed mice, and treated with γ -secretase inhibitor (GSI) or transfected with siRNA against numb (siNumb) (c) before differentiation in Th17 cells. Data are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments and compared to control (ctrl) unless otherwise indicated. *** $p < 0.001$; ns= non-significant.

Figure 6. MiR-146a deficient blunt the antitumoral effect of DHA. (a) Monitoring of established B16F10 xenograft tumor in C57BL/6 mice and miR-146a KO mice fed control or DHA enriched diet. Quantification of CD4⁺CCR6⁺ (b) and CD4⁺CCR6⁺IL-17⁺ (c) T-cells by flow cytometry in spleen of WT mice and WT mice or miR-146a KO mice bearing tumor. Data are expressed as the mean \pm S.E.M and compared to control (ctrl) unless otherwise indicated. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns= non-significant.

Figure 1. DHA control mir-146a expression in Th17 cells.

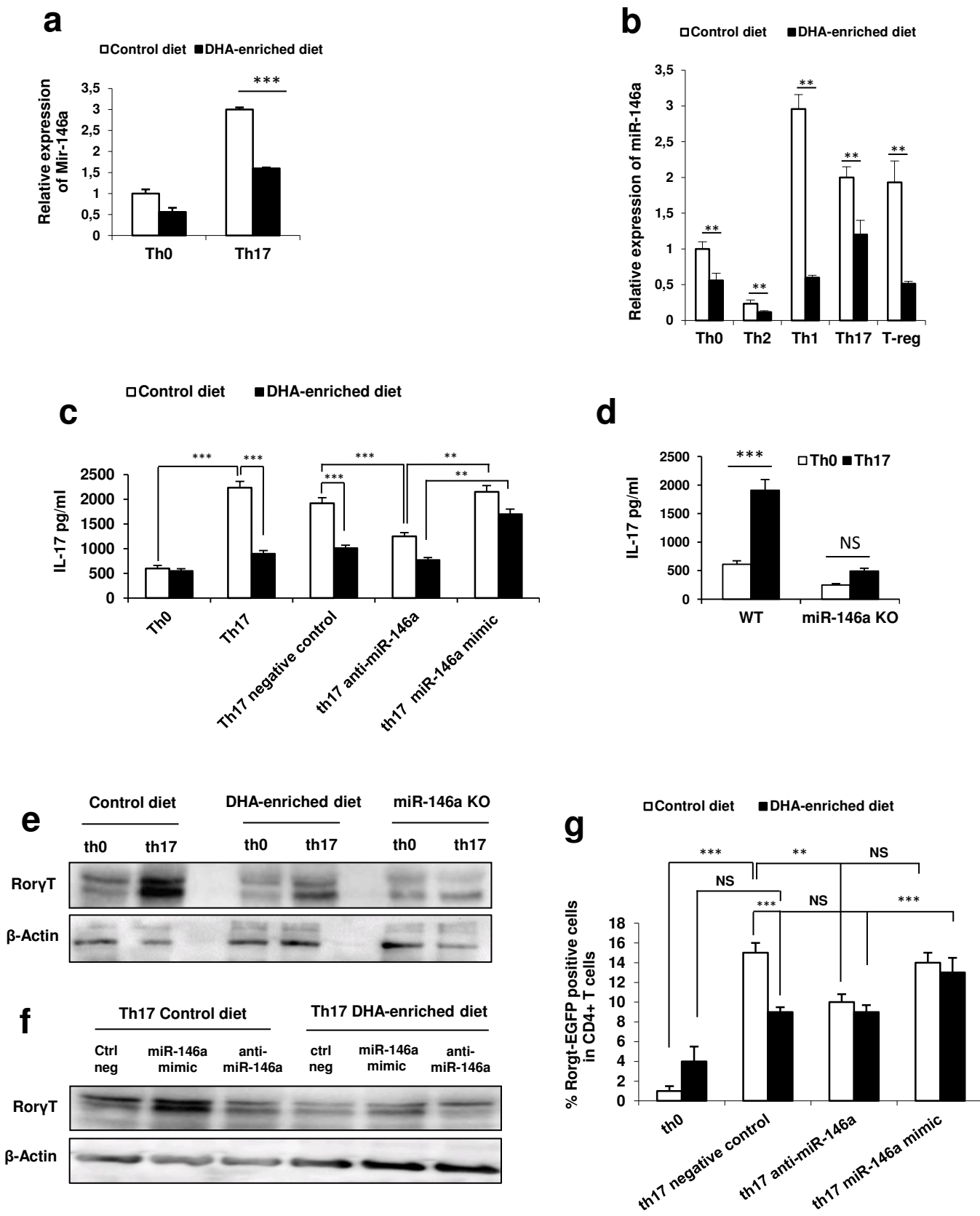


Figure 2. MiR-146a expression is dependent of PPAR γ pathway

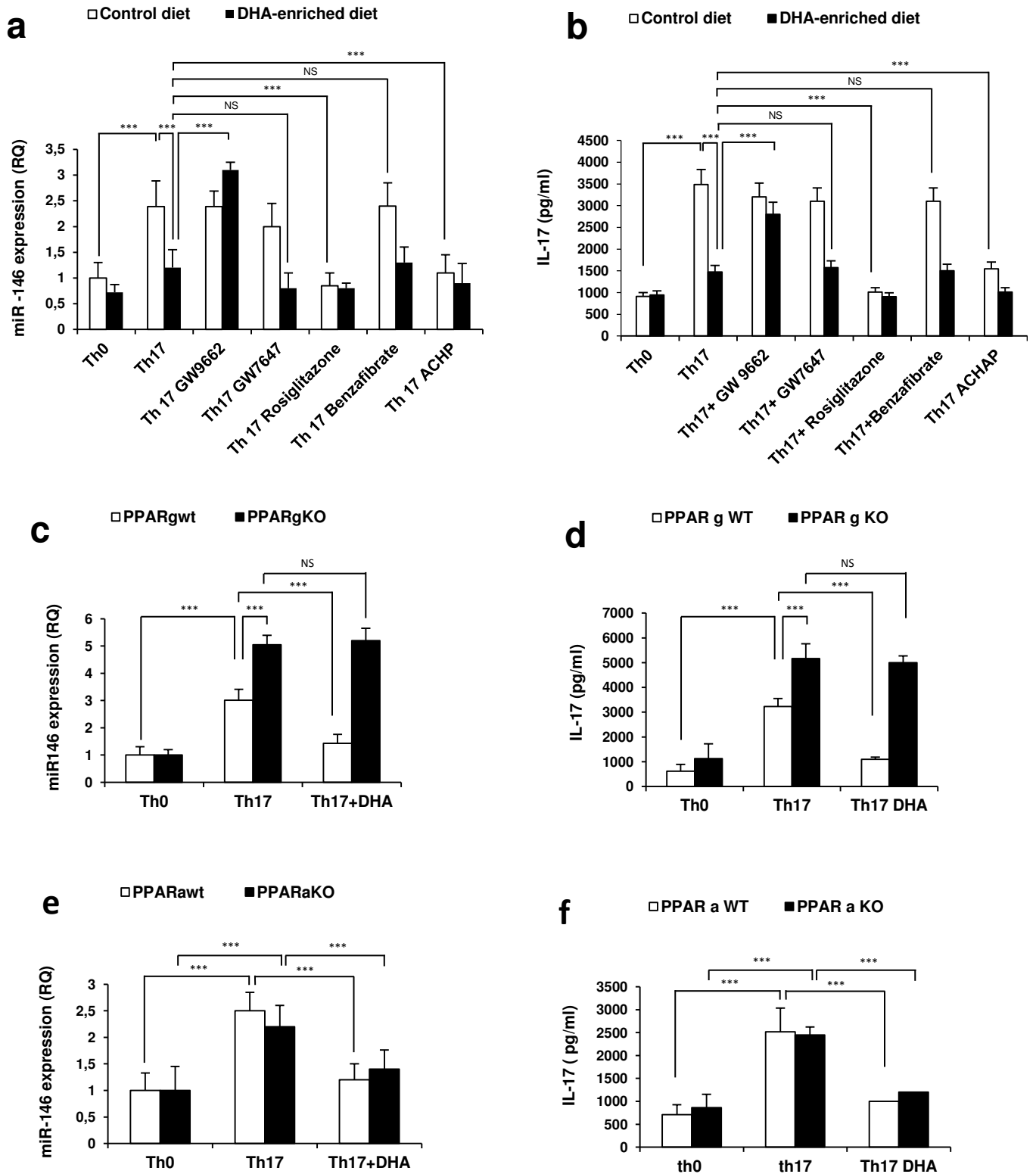


Figure 3. MiR-146a expression is dependent of NF- κ B pathway

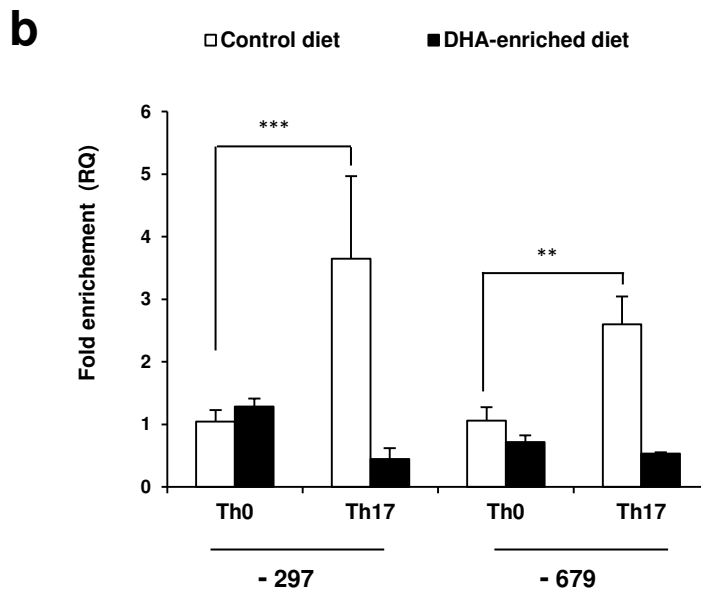
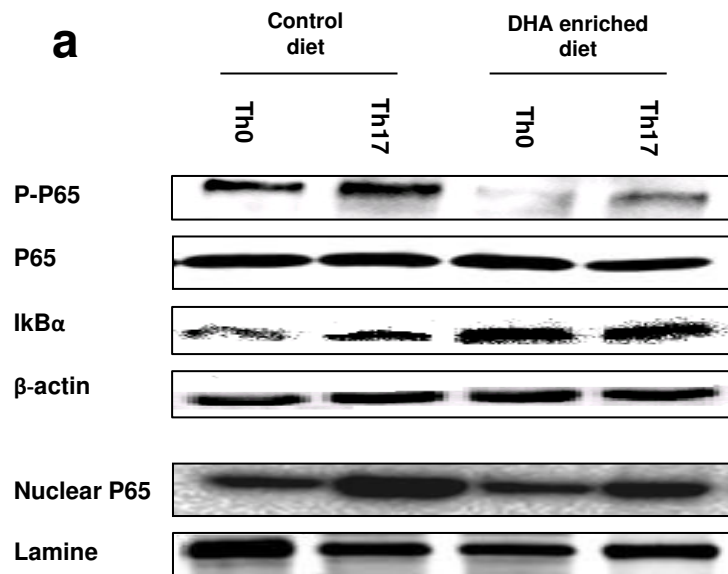
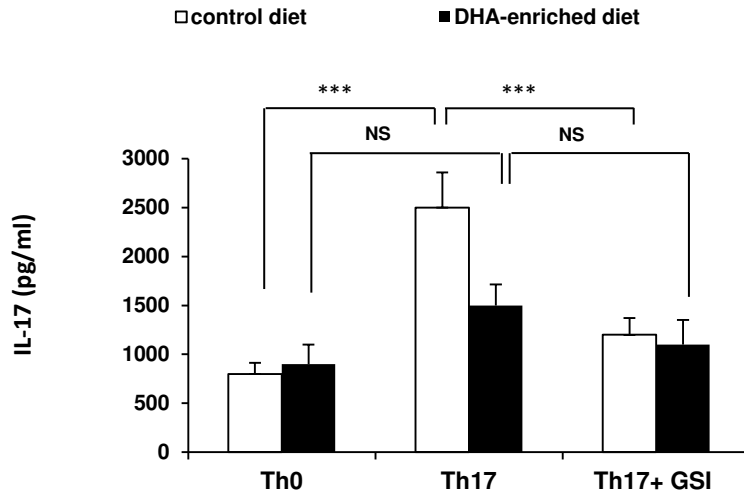
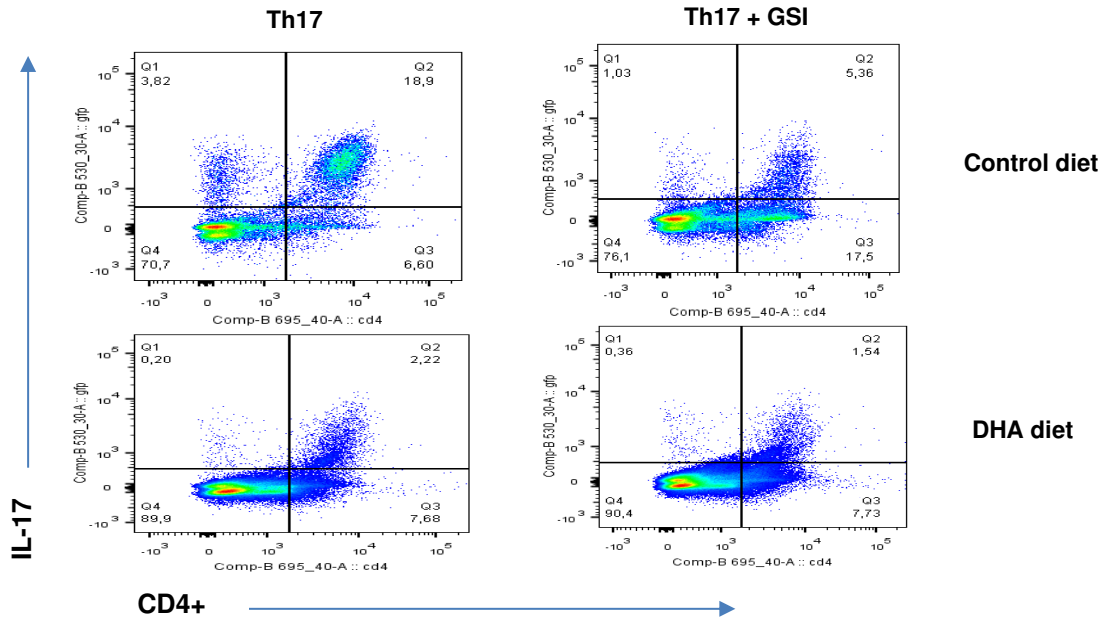


Figure 5. Numb inhibits Th17 cells differentiation

a



b



c

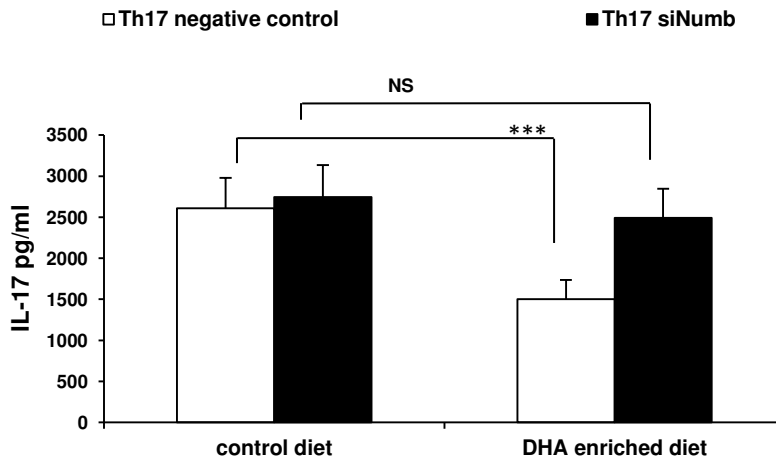
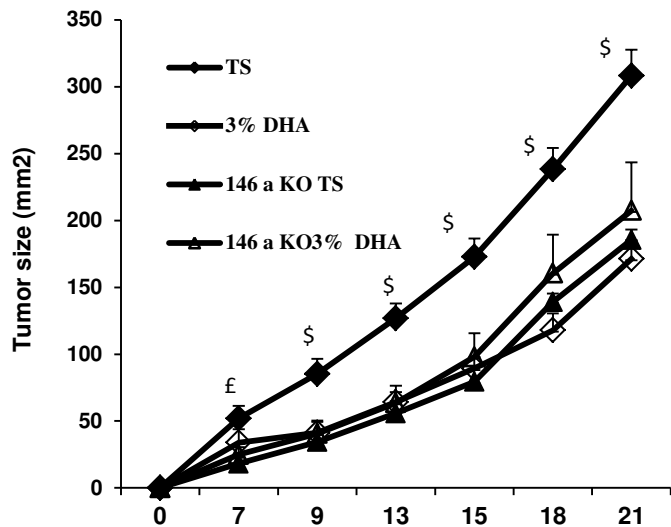
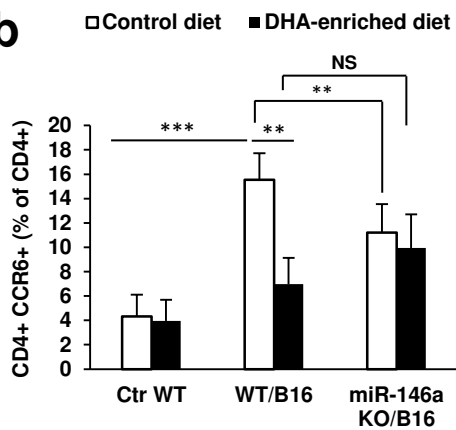


Figure 6. miR-146 deficient blunt the antitumoral effect of DHA.

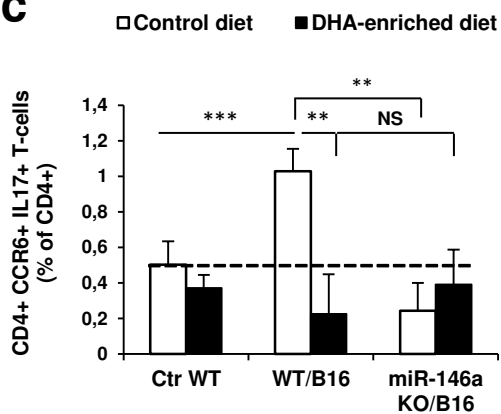
a



b



c



Supplementary data

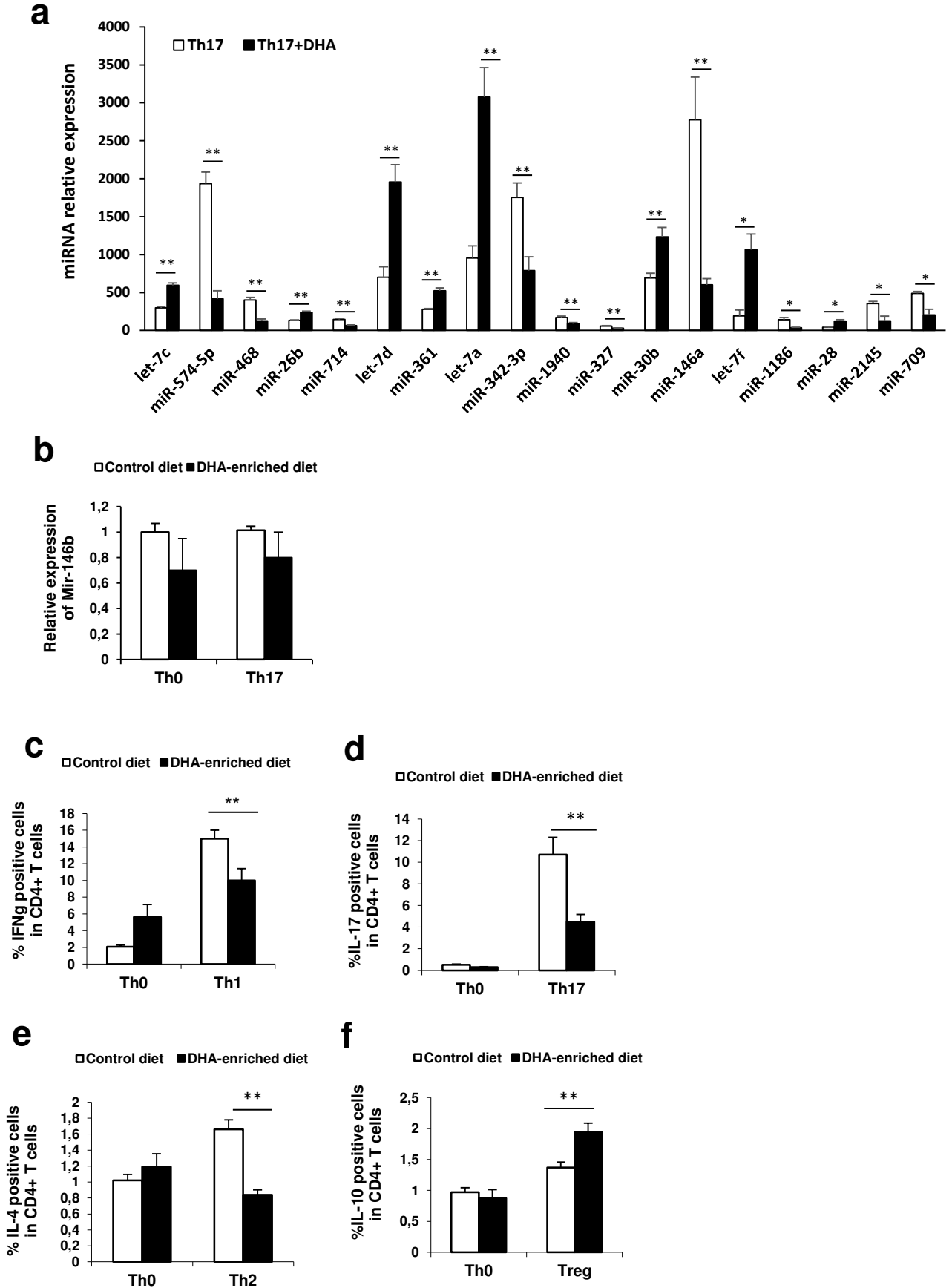
Figure 1. (a) Profile expression of miRNAs analysed by microarray in *in vitro*-Th17 polarized cells treated by DHA (20 μ M). (b) Relative expression of mir-146b analysed by qPCR in *in vitro* Th0 and Th17-polarized cells from mice with control or DHA-enriched diet. (c) Production analysis by flow cytometry of IFN γ (c), IL-17 (d), IL-4 (e), IL-10 (f) in *in vitro* Th1, Th17, Th2 and T-reg polarized cells respectively, from control and DHA-fed mice. Data are expressed as the mean \pm S.E.M and compared to control (ctrl) unless otherwise indicated. * p<0.05; ** p<0.01; ns= non-significant.

Figure 2. Analysis of NF- κ B subcellular localization by immunofluorescence in *in vitro* Th17 polarized cells from control or DHA-fed mice.

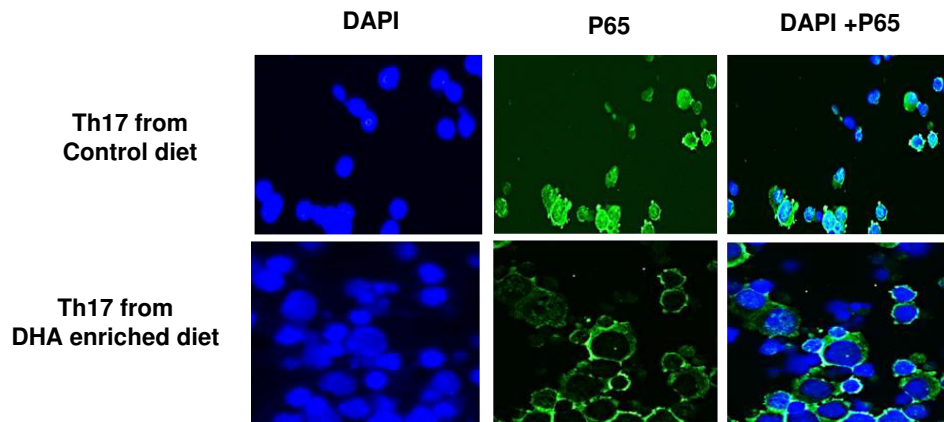
Figure 3. (a) Relative expression of Notch 1 in *in vitro* Th0 and Th17 polarized cells from control or DHA-fed mice. Analysis of subcellular localization of Numb (b) and Notch1 (c) by immunofluorescence in *in vitro* Th0 and Th17 polarized cells from WT mice with control or DHA-enriched diet and miR-146a KO mice. Data are expressed as the mean \pm S.E.M and compared to control (ctrl) unless otherwise indicated. * p<0.05; ns= non-significant.

Figure 4. (a) Quantification of ubiquitinated protein by immunoprecipitation of ubiquitin followed by western-blotting in *in vitro* Th0 and Th17 polarized cells from naives CD4+ T-cells, isolated from control or DHA-fed mice, and treated with proteasome inhibitor (MG132). (b) Analysis of Notch1 cleavage by western-blotting in *in vitro* Th17 polarized cells from WT mice with control or DHA-enriched diet and miR-146a KO mice.

SD. Figure 1

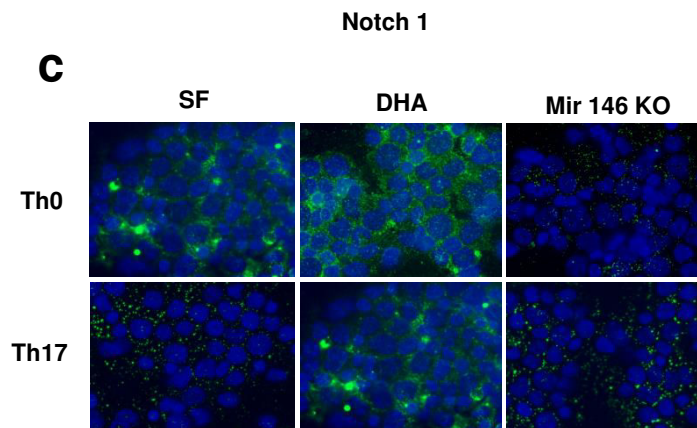
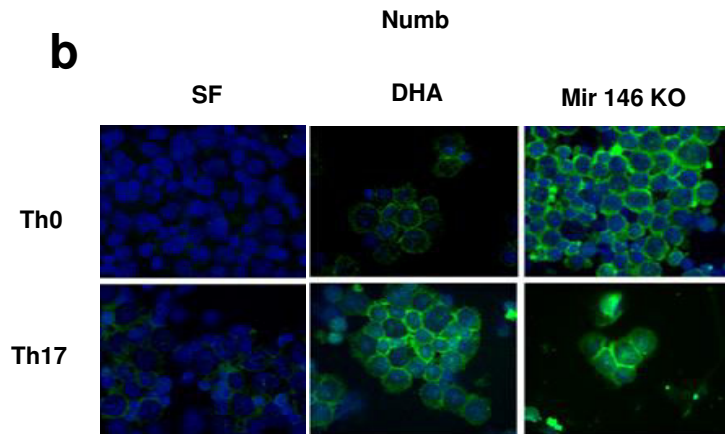
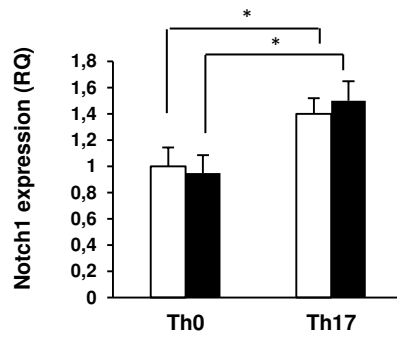


SD. Figure 2



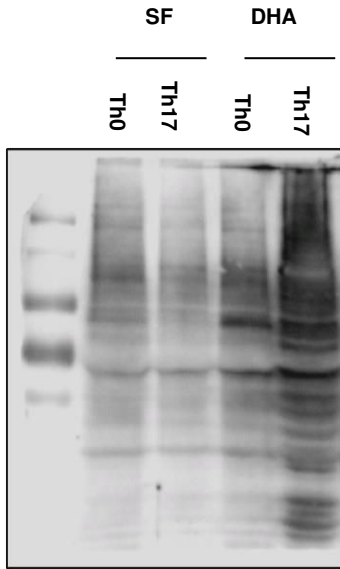
SD. Figure 3

a □ control diet ■ DHA-enriched diet

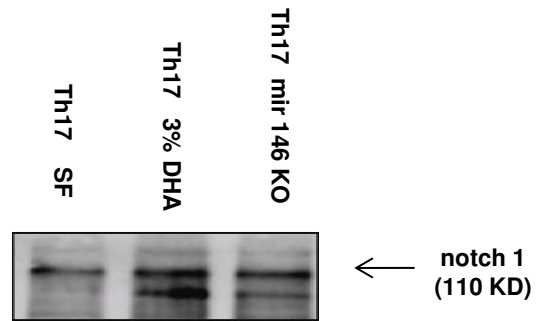


SD. Figure 4

a Traitent MG132 + IP ubiquitin + WB ubiquitin



b IP Ubiquitin + WB notch 1



Références

1. Calder, P.C. and P. Yaqoob, *Omega-3 polyunsaturated fatty acids and human health outcomes*. Biofactors, 2009. **35**(3): p. 266-272.
2. Chapkin, R.S., et al., *Dietary docosahexaenoic and eicosapentaenoic acid: Emerging mediators of inflammation*. Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 2009. **81**(2-3): p. 187-191.
3. Fetterman, J.W. and M.M. Zdanowicz, *Therapeutic potential of n-3 polyunsaturated fatty acids in disease*. American Journal of Health-System Pharmacy, 2009. **66**(13): p. 1169-1179.
4. Harris, W.S., et al., *Towards Establishing Dietary Reference Intakes for Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic Acids*. Journal of Nutrition, 2009. **139**(4): p. 804s-819s.
5. Williams, J.A., et al., *Docosahexaenoic and Eicosapentaenoic Acids Segregate Differently between Raft and Nonraft Domains*. Biophysical Journal, 2012. **103**(2): p. 228-237.
6. Zeyda, M., et al., *LAT displacement from lipid rafts as a molecular mechanism for the inhibition of T cell signaling by polyunsaturated fatty acids*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(32): p. 28418-28423.
7. Fan, Y.Y., et al., *Dietary docosahexaenoic acid suppresses T cell protein kinase C theta lipid raft recruitment and IL-2 production*. Journal of Immunology, 2004. **173**(10): p. 6151-6160.
8. Kim, W., et al., *n-3 Polyunsaturated Fatty Acids Suppress the Localization and Activation of Signaling Proteins at the Immunological Synapse in Murine CD4(+) T Cells by Affecting Lipid Raft Formation*. Journal of Immunology, 2008. **181**(9): p. 6236-6243.
9. Shaikh, S.R., et al., *Docosahexaenoic Acid Modifies the Clustering and Size of Lipid Rafts and the Lateral Organization and Surface Expression of MHC Class I of EL4 Cells*. Journal of Nutrition, 2009. **139**(9): p. 1632-1639.
10. Shaikh, S.R., *Diet-induced docosahexaenoic acid non-raft domains and lymphocyte function*. Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 2010. **82**(4-6): p. 159-164.
11. Anti, M., et al., *Effect of omega-3 fatty acids on rectal mucosal cell proliferation in subjects at risk for colon cancer*. Gastroenterology, 1992. **103**(3): p. 883-91.
12. Azrad, M., C. Turgeon, and W. Demark-Wahnefried, *Current evidence linking polyunsaturated Fatty acids with cancer risk and progression*. Front Oncol, 2013. **3**: p. 224.
13. Calviello, G., et al., *n-3 PUFAs reduce VEGF expression in human colon cancer cells modulating the COX-2/PGE2 induced ERK-1 and -2 and HIF-1alpha induction pathway*. Carcinogenesis, 2004. **25**(12): p. 2303-10.
14. Colas, S., et al., *Sensitization by dietary docosahexaenoic acid of rat mammary carcinoma to anthracycline: a role for tumor vascularization*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(19): p. 5879-86.
15. Berger, H., et al., *SOCS3 Transactivation by PPAR gamma Prevents IL-17-Driven Cancer Growth*. Cancer Research, 2013. **73**(12): p. 3578-3590.
16. Iwakura, Y. and H. Ishigame, *The IL-23/IL-17 axis in inflammation*. Journal of Clinical Investigation, 2006. **116**(5): p. 1218-1222.
17. Lin, W.W. and M. Karin, *A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer*. Journal of Clinical Investigation, 2007. **117**(5): p. 1175-1183.
18. Wang, L., et al., *IL-17 can promote tumor growth through an IL-6-Stat3 signaling pathway*. J Exp Med, 2009. **206**(7): p. 1457-64.
19. He, D., et al., *IL-17 promotes tumor development through the induction of tumor promoting microenvironments at tumor sites and myeloid-derived suppressor cells*. J Immunol, 2010. **184**(5): p. 2281-8.
20. Chalmin, F., et al., *Stat3 and Gfi-1 transcription factors control Th17 cell immunosuppressive activity via the regulation of ectonucleotidase expression*. Immunity, 2012. **36**(3): p. 362-73.
21. Bailey, S.R., et al., *Th17 cells in cancer: the ultimate identity crisis*. Frontiers in Immunology, 2014. **5**.

22. Paterniti, I., et al., *Docosahexaenoic acid attenuates the early inflammatory response following spinal cord injury in mice: in-vivo and in-vitro studies*. Journal of Neuroinflammation, 2014. **11**.
23. Kong, W.M., J.H. Yen, and D. Ganea, *Docosahexaenoic acid prevents dendritic cell maturation, inhibits antigen-specific Th1/Th17 differentiation and suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis*. Brain Behavior and Immunity, 2011. **25**(5): p. 872-882.
24. Murugaiyan, G., et al., *MicroRNA-21 promotes Th17 differentiation and mediates experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Clin Invest, 2015. **125**(3): p. 1069-80.
25. Du, C., et al., *MicroRNA miR-326 regulates TH-17 differentiation and is associated with the pathogenesis of multiple sclerosis*. Nat Immunol, 2009. **10**(12): p. 1252-9.
26. O'Connell, R.M., et al., *MicroRNA-155 Promotes Autoimmune Inflammation by Enhancing Inflammatory T Cell Development*. Immunity, 2010. **33**(4): p. 607-619.
27. Li, Z., et al., *IL-23 receptor regulation by Let-7f in human CD4+ memory T cells*. J Immunol, 2011. **186**(11): p. 6182-90.
28. Taganov, K.D., et al., *NF-kappa B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006. **103**(33): p. 12481-12486.
29. Monticelli, S., et al., *MicroRNA profiling of the murine hematopoietic system*. Genome Biology, 2005. **6**(8).
30. Lu, L.F., et al., *Function of miR-146a in Controlling Treg Cell-Mediated Regulation of Th1 Responses*. Cell, 2010. **142**(6): p. 914-929.
31. Pauley, K.M., et al., *Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients*. Arthritis Res Ther, 2008. **10**(4): p. R101.
32. Ceribelli, A., et al., *MicroRNAs in rheumatoid arthritis*. FEBS Lett, 2011. **585**(23): p. 3667-74.
33. Lochner, M., et al., *In vivo equilibrium of proinflammatory IL-17(+) and regulatory IL-10(+) Foxp3(+) ROR gamma t(+) T cells*. Journal of Experimental Medicine, 2008. **205**(6): p. 1381-1393.
34. Nadra, K., et al., *PPAR gamma in Placental Angiogenesis*. Endocrinology, 2010. **151**(10): p. 4969-4981.
35. Triboulot, C., et al., *Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids exert antihypertensive effects by modulating calcium signaling in T cells of rats*. Journal of Nutrition, 2001. **131**(9): p. 2364-2369.
36. Bligh EG, D.W., *A rapid method of total lipid extraction and purification*. Can J Biochem Physiol 1959.
37. El-Yassimi, A., et al., *Linoleic acid induces calcium signaling, Src kinase phosphorylation, and neurotransmitter release in mouse CD36-positive gustatory cells*. J Biol Chem, 2008. **283**(19): p. 12949-59.
38. Zand, H., et al., *Docosahexaenoic acid sensitizes Ramos cells to Gamma-irradiation-induced apoptosis through involvement of PPAR-gamma activation and NF-kappaB suppression*. Mol Cell Biochem, 2008. **317**(1-2): p. 113-20.
39. Hofmanova, J., et al., *Interaction of dietary fatty acids with tumour necrosis factor family cytokines during colon inflammation and cancer*. Mediators Inflamm, 2014. **2014**: p. 848632.
40. Murata, T., et al., *Synthesis and structure-activity relationships of novel IKK-beta inhibitors. Part 3: Orally active anti-inflammatory agents*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2004. **14**(15): p. 4019-4022.
41. Keerthivasan, S., et al., *Notch Signaling Regulates Mouse and Human Th17 Differentiation*. Journal of Immunology, 2011. **187**(2): p. 692-701.
42. McGill, M.A., et al., *Numb Regulates Post-endocytic Trafficking and Degradation of Notch1*. Journal of Biological Chemistry, 2009. **284**(39): p. 26427-26438.
43. McGill, M.A. and C.J. McGlade, *Mammalian numb proteins promote Notch1 receptor ubiquitination and degradation of the Notch1 intracellular domain*. J Biol Chem, 2003. **278**(25): p. 23196-203.

44. Shevach, E.M., *CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(6): p. 389-400.
45. Monk, J.M., et al., *n3 PUFAs Reduce Mouse CD4(+) T-Cell Ex Vivo Polarization into Th17 Cells*. Journal of Nutrition, 2013. **143**(9): p. 1501-1508.
46. Okoye, I.S., et al., *Transcriptomics identified a critical role for Th2 cell-intrinsic miR-155 in mediating allergy and antihelminth immunity*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014. **111**(30): p. E3081-E3090.
47. Niimoto, T., et al., *MicroRNA-146a expresses in interleukin-17 producing T cells in rheumatoid arthritis patients*. BMC Musculoskelet Disord, 2010. **11**: p. 209.
48. Xia, P., et al., *Dysregulation of miRNA146a versus IRAK1 induces IL-17 persistence in the psoriatic skin lesions*. Immunol Lett, 2012. **148**(2): p. 151-62.
49. Wang, L.H., et al., *Transcriptional inactivation of STAT3 by PPARgamma suppresses IL-6-responsive multiple myeloma cells*. Immunity, 2004. **20**(2): p. 205-18.
50. Sun, X., et al., *miR-146a is directly regulated by STAT3 in human hepatocellular carcinoma cells and involved in anti-tumor immune suppression*. Cell Cycle, 2015. **14**(2): p. 243-52.
51. Vaiopoulos, A.G., K.K. Papachroni, and A.G. Papavassiliou, *Colon carcinogenesis: Learning from NF-kappaB and AP-1*. Int J Biochem Cell Biol, 2010. **42**(7): p. 1061-5.
52. Denys, A., A. Hichami, and N.A. Khan, *n-3 PUFAs modulate T-cell activation via protein kinase C-alpha and -epsilon and the NF-kappaB signaling pathway*. J Lipid Res, 2005. **46**(4): p. 752-8.
53. Sun, S.C., *The noncanonical NF-kappa B pathway*. Immunological Reviews, 2012. **246**: p. 125-140.
54. Molinero, L.L., et al., *T cell receptor/CARMA1/NF-kappa B signaling controls T-helper (Th) 17 differentiation*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012. **109**(45): p. 18529-18534.
55. Wang, D., et al., *TRAIL-induced miR-146a expression suppresses CXCR4-mediated human breast cancer migration*. FEBS J, 2013. **280**(14): p. 3340-53.
56. Huffaker, T.B., et al., *Epistasis between microRNAs 155 and 146a during T cell-mediated antitumor immunity*. Cell Rep, 2012. **2**(6): p. 1697-709.
57. Hirota, K., et al., *Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model*. Journal of Experimental Medicine, 2007. **204**(12): p. 2803-2812.
58. Zhao, F., et al., *Human CCR4(+)CCR6(+)Th17 Cells Suppress Autologous CD8(+) T Cell Responses*. Journal of Immunology, 2012. **188**(12): p. 6055-6062.

Bibliographie

1. Ferlay, J., et al., *Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012*. Int J Cancer, 2015. **136**(5): p. E359-86.
2. Laurent-Puig, P., J. Agostini, and K. Maley, [*Colorectal oncogenesis*]. Bull Cancer. **97**(11): p. 1311-21.
3. Molakatala, P.K. and A.R. Kumar, *How does length of stay in the United States affect colorectal cancer incidence among immigrant Asian populations in California?* Am J Gastroenterol, 2014. **109**(10): p. 1687.
4. Norat, T., et al., *Meat, fish, and colorectal cancer risk: the European Prospective Investigation into cancer and nutrition*. J Natl Cancer Inst, 2005. **97**(12): p. 906-16.
5. Oostindjer, M., et al., *The role of red and processed meat in colorectal cancer development: a perspective*. Meat Sci, 2014. **97**(4): p. 583-96.
6. Sesink, A.L., et al., *Red meat and colon cancer: the cytotoxic and hyperproliferative effects of dietary heme*. Cancer Res, 1999. **59**(22): p. 5704-9.
7. Nagao, M., et al., *Genetic changes induced by heterocyclic amines*. Mutat Res, 1997. **376**(1-2): p. 161-7.
8. Kakiuchi, H., et al., *Specific 5'-GGGA-3'-->5'-GGA-3' mutation of the Apc gene in rat colon tumors induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(3): p. 910-4.
9. Dashwood, R.H., et al., *High frequency of beta-catenin (ctnnb1) mutations in the colon tumors induced by two heterocyclic amines in the F344 rat*. Cancer Res, 1998. **58**(6): p. 1127-9.
10. van Duijnhoven, F.J., et al., *Fruit, vegetables, and colorectal cancer risk: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition*. Am J Clin Nutr, 2009. **89**(5): p. 1441-52.
11. Bingham, S.A., et al., *Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study*. Lancet, 2003. **361**(9368): p. 1496-501.
12. Astorg, P., et al., [*Dietary fibers and colorectal cancer. Experimental studies, epidemiology, mechanisms*]. Gastroenterol Clin Biol, 2002. **26**(10): p. 893-912.
13. Yin, L., G. Laevsky, and C. Giardina, *Butyrate suppression of colonocyte NF-kappa B activation and cellular proteasome activity*. J Biol Chem, 2001. **276**(48): p. 44641-6.
14. Schwab, M., et al., *PPARgamma is a key target of butyrate-induced caspase-3 activation in the colorectal cancer cell line Caco-2*. Apoptosis, 2006. **11**(10): p. 1801-11.
15. Barrasa, J.I., et al., *Bile acids in the colon, from healthy to cytotoxic molecules*. Toxicol In Vitro. **27**(2): p. 964-77.
16. Filik, L. and O. Ozyilkan, *Olive-oil consumption and cancer risk*. Eur J Clin Nutr, 2003. **57**(1): p. 191.
17. Cockbain, A.J., G.J. Toogood, and M.A. Hull, *Omega-3 polyunsaturated fatty acids for the treatment and prevention of colorectal cancer*. Gut, 2012. **61**(1): p. 135-49.
18. Klement, R.J. and U. Kammerer, *Is there a role for carbohydrate restriction in the treatment and prevention of cancer?* Nutr Metab (Lond), 2011. **8**: p. 75.
19. Rossi-Fanelli, F., et al., *Effect of energy substrate manipulation on tumour cell proliferation in parenterally fed cancer patients*. Clin Nutr, 1991. **10**(4): p. 228-32.
20. Augustin, L.S., et al., *Dietary glycemic index and glycemic load, and breast cancer risk: a case-control study*. Ann Oncol, 2001. **12**(11): p. 1533-8.

21. Stattin, P., et al., *Prospective study of hyperglycemia and cancer risk*. Diabetes Care, 2007. **30**(3): p. 561-7.
22. Koppenol, W.H., P.L. Bounds, and C.V. Dang, *Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(5): p. 325-37.
23. Renehan, A.G., et al., *Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies*. Lancet, 2008. **371**(9612): p. 569-78.
24. Calle, E.E. and M.J. Thun, *Obesity and cancer*. Oncogene, 2004. **23**(38): p. 6365-78.
25. Tokuda, Y., et al., *Prostate cancer cell growth is modulated by adipocyte-cancer cell interaction*. BJU Int, 2003. **91**(7): p. 716-20.
26. Manabe, Y., et al., *Mature adipocytes, but not preadipocytes, promote the growth of breast carcinoma cells in collagen gel matrix culture through cancer-stromal cell interactions*. J Pathol, 2003. **201**(2): p. 221-8.
27. Amemori, S., et al., *Adipocytes and preadipocytes promote the proliferation of colon cancer cells in vitro*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007. **292**(3): p. G923-9.
28. Schaffler, A., J. Scholmerich, and C. Buechler, *Mechanisms of disease: adipokines and breast cancer - endocrine and paracrine mechanisms that connect adiposity and breast cancer*. Nat Clin Pract Endocrinol Metab, 2007. **3**(4): p. 345-54.
29. Clement, K. and S. Vignes, *[Inflammation, adipokines and obesity]*. Rev Med Interne, 2009. **30**(9): p. 824-32.
30. Gazi, E., et al., *Direct evidence of lipid translocation between adipocytes and prostate cancer cells with imaging FTIR microspectroscopy*. J Lipid Res, 2007. **48**(8): p. 1846-56.
31. Nieman, K.M., et al., *Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth*. Nat Med, 2011. **17**(11): p. 1498-503.
32. Laurent, V., et al., *[Adipose tissue and cancer: a high risk tandem]*. Med Sci (Paris), 2014. **30**(4): p. 398-404.
33. Grivennikov, S.I., F.R. Greten, and M. Karin, *Immunity, inflammation, and cancer*. Cell, 2010. **140**(6): p. 883-99.
34. Krishnamoorthy, S. and K.V. Honn, *Inflammation and disease progression*. Cancer Metastasis Rev, 2006. **25**(3): p. 481-91.
35. Brenner, D.R., et al., *A review of the application of inflammatory biomarkers in epidemiologic cancer research*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2014. **23**(9): p. 1729-51.
36. Szkaradkiewicz, A., et al., *Proinflammatory cytokines and IL-10 in inflammatory bowel disease and colorectal cancer patients*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2009. **57**(4): p. 291-4.
37. Krzystek-Korpacka, M., et al., *Profiles of circulating inflammatory cytokines in colorectal cancer (CRC), high cancer risk conditions, and health are distinct. Possible implications for CRC screening and surveillance*. Cancer Lett, 2013. **337**(1): p. 107-14.
38. Zins, K., et al., *Colon cancer cell-derived tumor necrosis factor-alpha mediates the tumor growth-promoting response in macrophages by up-regulating the colony-stimulating factor-1 pathway*. Cancer Res, 2007. **67**(3): p. 1038-45.
39. Fukuyama, T., et al., *Cytokine production of lung cancer cell lines: Correlation between their production and the inflammatory/immunological responses both in vivo and in vitro*. Cancer Sci, 2007. **98**(7): p. 1048-54.

40. Ghiringhelli, F., et al., *Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors*. Nat Med, 2009. **15**(10): p. 1170-8.
41. Bruchard, M., et al., *Chemotherapy-triggered cathepsin B release in myeloid-derived suppressor cells activates the Nlrp3 inflammasome and promotes tumor growth*. Nat Med, 2013. **19**(1): p. 57-64.
42. Yu, H., et al., *Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions*. Nat Rev Cancer, 2014. **14**(11): p. 736-46.
43. Chalmin, F., et al., *Membrane-associated Hsp72 from tumor-derived exosomes mediates STAT3-dependent immunosuppressive function of mouse and human myeloid-derived suppressor cells*. J Clin Invest, 2010. **120**(2): p. 457-71.
44. Maihofner, C., et al., *Expression of cyclooxygenase-2 parallels expression of interleukin-1beta, interleukin-6 and NF-kappaB in human colorectal cancer*. Carcinogenesis, 2003. **24**(4): p. 665-71.
45. Markowitz, S.D. and M.M. Bertagnolli, *Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer*. N Engl J Med, 2009. **361**(25): p. 2449-60.
46. Greenhough, A., et al., *The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment*. Carcinogenesis, 2009. **30**(3): p. 377-86.
47. Ricciotti, E. and G.A. FitzGerald, *Prostaglandins and inflammation*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. **31**(5): p. 986-1000.
48. Kalinski, P., *Regulation of immune responses by prostaglandin E2*. J Immunol, 2012. **188**(1): p. 21-8.
49. Obermajer, N. and P. Kalinski, *Generation of myeloid-derived suppressor cells using prostaglandin E2*. Transplant Res, 2012. **1**(1): p. 15.
50. Din, F.V., et al., *Effect of aspirin and NSAIDs on risk and survival from colorectal cancer*. Gut, 2010. **59**(12): p. 1670-9.
51. Arber, N., et al., *Celecoxib for the prevention of colorectal adenomatous polyps*. N Engl J Med, 2006. **355**(9): p. 885-95.
52. Bertagnolli, M.M., et al., *Celecoxib for the prevention of sporadic colorectal adenomas*. N Engl J Med, 2006. **355**(9): p. 873-84.
53. Takayama, T., et al., *Randomized double-blind trial of sulindac and etodolac to eradicate aberrant crypt foci and to prevent sporadic colorectal polyps*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(11): p. 3803-11.
54. Rustgi, A.K., *The genetics of hereditary colon cancer*. Genes Dev, 2007. **21**(20): p. 2525-38.
55. Plawski, A., et al., *Familial adenomatous polyposis of the colon*. Hered Cancer Clin Pract, 2013. **11**(1): p. 15.
56. Oshima, M., et al., *Loss of Apc heterozygosity and abnormal tissue building in nascent intestinal polyps in mice carrying a truncated Apc gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(10): p. 4482-6.
57. Hinoi, T., et al., *Mouse model of colonic adenoma-carcinoma progression based on somatic Apc inactivation*. Cancer Res, 2007. **67**(20): p. 9721-30.
58. Beazer-Barclay, Y., et al., *Sulindac suppresses tumorigenesis in the Min mouse*. Carcinogenesis, 1996. **17**(8): p. 1757-60.
59. Frebourg, T., et al., *[Hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Definition, genetics, diagnosis, and medical surveillance]*. Gastroenterol Clin Biol, 2003. **27**(8-9): p. 708-14.
60. Karim, B.O. and D.L. Huso, *Mouse models for colorectal cancer*. Am J Cancer Res, 2013. **3**(3): p. 240-50.

61. Worthley, D.L. and B.A. Leggett, *Colorectal cancer: molecular features and clinical opportunities*. Clin Biochem Rev, 2010. **31**(2): p. 31-8.
62. Migliore, L., et al., *Genetics, cytogenetics, and epigenetics of colorectal cancer*. J Biomed Biotechnol, 2011. **2011**: p. 792362.
63. Fodde, R., R. Smits, and H. Clevers, *APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer*. Nat Rev Cancer, 2001. **1**(1): p. 55-67.
64. Duval, A. and R. Hamelin, *Mutations at coding repeat sequences in mismatch repair-deficient human cancers: toward a new concept of target genes for instability*. Cancer Res, 2002. **62**(9): p. 2447-54.
65. Boland, C.R. and A. Goel, *Microsatellite instability in colorectal cancer*. Gastroenterology, 2010. **138**(6): p. 2073-2087 e3.
66. el-Deiry, W.S., et al., *High expression of the DNA methyltransferase gene characterizes human neoplastic cells and progression stages of colon cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(8): p. 3470-4.
67. Barault, L., et al., *Hypermethylator phenotype in sporadic colon cancer: study on a population-based series of 582 cases*. Cancer Res, 2008. **68**(20): p. 8541-6.
68. Toyota, M., et al., *CpG island methylator phenotype in colorectal cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(15): p. 8681-6.
69. MacDonald, B.T., K. Tamai, and X. He, *Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases*. Dev Cell, 2009. **17**(1): p. 9-26.
70. Heinen, C.D., et al., *The APC tumor suppressor controls entry into S-phase through its ability to regulate the cyclin D/RB pathway*. Gastroenterology, 2002. **123**(3): p. 751-63.
71. Verma, U.N., et al., *Small interfering RNAs directed against beta-catenin inhibit the in vitro and in vivo growth of colon cancer cells*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(4): p. 1291-300.
72. Tian, X., et al., *E-cadherin/beta-catenin complex and the epithelial barrier*. J Biomed Biotechnol. **2011**: p. 567305.
73. Eisenmann, D.M., *Wnt signaling*. WormBook, 2005: p. 1-17.
74. Sparks, A.B., et al., *Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer*. Cancer Res, 1998. **58**(6): p. 1130-4.
75. McCubrey, J.A., et al., *Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1773**(8): p. 1263-84.
76. Vivanco, I. and C.L. Sawyers, *The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(7): p. 489-501.
77. Kim, H.J. and D. Bar-Sagi, *Modulation of signalling by Sprouty: a developing story*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(6): p. 441-50.
78. Shaw, R.J. and L.C. Cantley, *Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth*. Nature, 2006. **441**(7092): p. 424-30.
79. Diehl, J.A., et al., *Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization*. Genes Dev, 1998. **12**(22): p. 3499-511.
80. Zhou, B.P., et al., *HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(11): p. 973-82.
81. Luo, H., et al., *PTEN-regulated AKT/FoxO3a/Bim signaling contributes to reactive oxygen species-mediated apoptosis in selenite-treated colorectal cancer cells*. Cell Death Dis, 2013. **4**: p. e481.
82. Wang, K. and P.F. Li, *Foxo3a regulates apoptosis by negatively targeting miR-21*. J Biol Chem, 2010. **285**(22): p. 16958-66.

83. Chiacchiera, F., et al., *p38alpha blockade inhibits colorectal cancer growth in vivo by inducing a switch from HIF1alpha- to FoxO-dependent transcription*. Cell Death Differ, 2009. **16**(9): p. 1203-14.
84. Zardavas, D., W.A. Phillips, and S. Loi, *PIK3CA mutations in breast cancer: reconciling findings from preclinical and clinical data*. Breast Cancer Res, 2014. **16**(1): p. 201.
85. Shangary, S. and S. Wang, *Targeting the MDM2-p53 interaction for cancer therapy*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(17): p. 5318-24.
86. Li, X.L., et al., *P53 mutations in colorectal cancer - molecular pathogenesis and pharmacological reactivation*. World J Gastroenterol, 2015. **21**(1): p. 84-93.
87. Pietrantonio, F., et al., *TP53 mutations in advanced colorectal cancer: the dark side of the moon*. Oncology, 2014. **86**(5-6): p. 289-94.
88. Bullock, A.N. and A.R. Fersht, *Rescuing the function of mutant p53*. Nat Rev Cancer, 2001. **1**(1): p. 68-76.
89. Ikushima, H. and K. Miyazono, *TGFbeta signalling: a complex web in cancer progression*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(6): p. 415-24.
90. Ohgushi, M., et al., *Transforming growth factor beta-dependent sequential activation of Smad, Bim, and caspase-9 mediates physiological apoptosis in gastric epithelial cells*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(22): p. 10017-28.
91. Saltzman, A., et al., *Transforming growth factor-beta-mediated apoptosis in the Ramos B-lymphoma cell line is accompanied by caspase activation and Bcl-XL downregulation*. Exp Cell Res, 1998. **242**(1): p. 244-54.
92. Lacerte, A., et al., *Transforming growth factor-beta inhibits telomerase through SMAD3 and E2F transcription factors*. Cell Signal, 2008. **20**(1): p. 50-9.
93. Fleming, N.I., et al., *SMAD2, SMAD3 and SMAD4 mutations in colorectal cancer*. Cancer Res, 2013. **73**(2): p. 725-35.
94. Loomans, H.A. and C.D. Andl, *Intertwining of Activin A and TGFbeta Signaling: Dual Roles in Cancer Progression and Cancer Cell Invasion*. Cancers (Basel), 2014. **7**(1): p. 70-91.
95. Shackelford, D.B. and R.J. Shaw, *The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(8): p. 563-75.
96. Carling, D., M.J. Sanders, and A. Woods, *The regulation of AMP-activated protein kinase by upstream kinases*. Int J Obes (Lond), 2008. **32 Suppl 4**: p. S55-9.
97. Luo, Z., M. Zang, and W. Guo, *AMPK as a metabolic tumor suppressor: control of metabolism and cell growth*. Future Oncol, 2010. **6**(3): p. 457-70.
98. Jones, R.G., et al., *AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint*. Mol Cell, 2005. **18**(3): p. 283-93.
99. Tzivion, G., M. Dobson, and G. Ramakrishnan, *FoxO transcription factors; Regulation by AKT and 14-3-3 proteins*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1813**(11): p. 1938-45.
100. Chou, C.C., et al., *AMPK reverses the mesenchymal phenotype of cancer cells by targeting the Akt-MDM2-Foxo3a signaling axis*. Cancer Res, 2014. **74**(17): p. 4783-95.
101. Greer, E.L., et al., *The energy sensor AMP-activated protein kinase directly regulates the mammalian FOXO3 transcription factor*. J Biol Chem, 2007. **282**(41): p. 30107-19.
102. Schmidt, M., et al., *Cell cycle inhibition by FoxO forkhead transcription factors involves downregulation of cyclin D*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(22): p. 7842-52.
103. You, H., et al., *FOXO3a-dependent regulation of Puma in response to cytokine/growth factor withdrawal*. J Exp Med, 2006. **203**(7): p. 1657-63.

104. Obexer, P., et al., *FKHRL1-mediated expression of Noxa and Bim induces apoptosis via the mitochondria in neuroblastoma cells*. *Cell Death Differ*, 2007. **14**(3): p. 534-47.
105. Modur, V., et al., *FOXO proteins regulate tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand expression. Implications for PTEN mutation in prostate cancer*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(49): p. 47928-37.
106. Carretero, J., et al., *Dysfunctional AMPK activity, signalling through mTOR and survival in response to energetic stress in LKB1-deficient lung cancer*. *Oncogene*, 2007. **26**(11): p. 1616-25.
107. Hu, M.C., et al., *IkappaB kinase promotes tumorigenesis through inhibition of forkhead FOXO3a*. *Cell*, 2004. **117**(2): p. 225-37.
108. Queiroz, E.A., et al., *Metformin induces apoptosis and cell cycle arrest mediated by oxidative stress, AMPK and FOXO3a in MCF-7 breast cancer cells*. *PLoS One*, 2014. **9**(5): p. e98207.
109. Kasznicki, J., A. Sliwinska, and J. Drzewoski, *Metformin in cancer prevention and therapy*. *Ann Transl Med*, 2014. **2**(6): p. 57.
110. Su, R.Y., et al., *5-Aminoimidazole-4-carboxamide riboside sensitizes TRAIL- and TNF{alpha}-induced cytotoxicity in colon cancer cells through AMP-activated protein kinase signaling*. *Mol Cancer Ther*, 2007. **6**(5): p. 1562-71.
111. Yang, J.Y., et al., *ERK promotes tumorigenesis by inhibiting FOXO3a via MDM2-mediated degradation*. *Nat Cell Biol*, 2008. **10**(2): p. 138-48.
112. Zhou, Y., et al., *Salinomycin decreases doxorubicin resistance in hepatocellular carcinoma cells by inhibiting the beta-catenin/TCF complex association via FOXO3a activation*. *Oncotarget*, 2015. **6**(12): p. 10350-65.
113. Yang, L., et al., *Akt/protein kinase B signaling inhibitor-2, a selective small molecule inhibitor of Akt signaling with antitumor activity in cancer cells overexpressing Akt*. *Cancer Res*, 2004. **64**(13): p. 4394-9.
114. Yan, Y. and M.R. Lackner, *FOXO3a and beta-catenin co-localization: double trouble in colon cancer?* *Nat Med*, 2012. **18**(6): p. 854-6.
115. Tenbaum, S.P., et al., *beta-catenin confers resistance to PI3K and AKT inhibitors and subverts FOXO3a to promote metastasis in colon cancer*. *Nat Med*, 2012. **18**(6): p. 892-901.
116. Ordonez-Moran, P., et al., *SPROUTY2 is a beta-catenin and FOXO3a target gene indicative of poor prognosis in colon cancer*. *Oncogene*, 2014. **33**(15): p. 1975-85.
117. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. *Cell*. **144**(5): p. 646-74.
118. Chu, W.M., *Tumor necrosis factor*. *Cancer Lett*, 2013. **328**(2): p. 222-5.
119. Ofengeim, D. and J. Yuan, *Regulation of RIP1 kinase signalling at the crossroads of inflammation and cell death*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013. **14**(11): p. 727-36.
120. Rahman, M.M. and G. McFadden, *Modulation of tumor necrosis factor by microbial pathogens*. *PLoS Pathog*, 2006. **2**(2): p. e4.
121. Balkwill, F., *Tumour necrosis factor and cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2009. **9**(5): p. 361-71.
122. Yan, B., et al., *Tumor necrosis factor-alpha is a potent endogenous mutagen that promotes cellular transformation*. *Cancer Res*, 2006. **66**(24): p. 11565-70.
123. Yingxia Zheng, L.S., Ting Jiang, Dongqing Zhang, Dongyi He, and Hong Nie, *TNF α Promotes Th17 Cell Differentiation through IL-6 and IL-1 β Produced by Monocytes in Rheumatoid Arthritis*. *Journal of Immunology Research*, 2014.
124. Wu, D., et al., *Interleukin-17: a promoter in colorectal cancer progression*. *Clin Dev Immunol*, 2013. **2013**: p. 436307.

125. Jaczewska, J., et al., *TNF-alpha and IFN-gamma promote lymphocyte adhesion to endothelial junctional regions facilitating transendothelial migration*. J Leukoc Biol, 2014. **95**(2): p. 265-74.
126. Bates, R.C., M.J. DeLeo, 3rd, and A.M. Mercurio, *The epithelial-mesenchymal transition of colon carcinoma involves expression of IL-8 and CXCR-1-mediated chemotaxis*. Exp Cell Res, 2004. **299**(2): p. 315-24.
127. Liu, Y., et al., *Effects of inflammatory factors on mesenchymal stem cells and their role in the promotion of tumor angiogenesis in colon cancer*. J Biol Chem, 2011. **286**(28): p. 25007-15.
128. Bertrand, M.J., et al., *cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination*. Mol Cell, 2008. **30**(6): p. 689-700.
129. Hayden, M.S. and S. Ghosh, *Shared principles in NF-kappaB signaling*. Cell, 2008. **132**(3): p. 344-62.
130. Sun, S.C. and G. Xiao, *Deregulation of NF-kappaB and its upstream kinases in cancer*. Cancer Metastasis Rev, 2003. **22**(4): p. 405-22.
131. Lind, D.S., et al., *Nuclear factor-kappa B is upregulated in colorectal cancer*. Surgery, 2001. **130**(2): p. 363-9.
132. Greten, F.R. and M. Karin, *The IKK/NF-kappaB activation pathway-a target for prevention and treatment of cancer*. Cancer Lett, 2004. **206**(2): p. 193-9.
133. Pikarsky, E., et al., *NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer*. Nature, 2004. **431**(7007): p. 461-6.
134. Pearson, G., et al., *Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions*. Endocr Rev, 2001. **22**(2): p. 153-83.
135. Wagner, E.F. and A.R. Nebreda, *Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(8): p. 537-49.
136. Popivanova, B.K., et al., *Blocking TNF-alpha in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis*. J Clin Invest, 2008. **118**(2): p. 560-70.
137. Kim, Y.J., et al., *Prevention of colitis-associated carcinogenesis with infliximab*. Cancer Prev Res (Phila), 2010. **3**(10): p. 1314-33.
138. Galluzzi, L., et al., *Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015*. Cell Death Differ, 2015. **22**(1): p. 58-73.
139. Tan, C.P., et al., *Metallomics insights into the programmed cell death induced by metal-based anticancer compounds*. Metallomics, 2014. **6**(5): p. 978-95.
140. Carswell, E.A., et al., *An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(9): p. 3666-70.
141. Goldar, S., et al., *Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment*. Asian Pac J Cancer Prev, 2015. **16**(6): p. 2129-44.
142. Parrish, A.B., C.D. Freel, and S. Kornbluth, *Cellular mechanisms controlling caspase activation and function*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(6).
143. van Engeland, M., et al., *Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure*. Cytometry, 1998. **31**(1): p. 1-9.
144. Locksley, R.M., N. Killeen, and M.J. Lenardo, *The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology*. Cell, 2001. **104**(4): p. 487-501.
145. Moquin, D.M., T. McQuade, and F.K. Chan, *CYLD deubiquitinates RIP1 in the TNFalpha-induced necrosome to facilitate kinase activation and programmed necrosis*. PLoS One, 2013. **8**(10): p. e76841.
146. O'Donnell, M.A., et al., *Ubiquitination of RIP1 regulates an NF-kappaB-independent cell-death switch in TNF signaling*. Curr Biol, 2007. **17**(5): p. 418-24.

147. Kataoka, T., et al., *FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin/granzyme B, chemotherapeutic drugs, and gamma irradiation*. J Immunol, 1998. **161**(8): p. 3936-42.
148. Wang, L., F. Du, and X. Wang, *TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways*. Cell, 2008. **133**(4): p. 693-703.
149. Esposito, M.D., *The roles of Bid*. Apoptosis, 2002. **7**(5): p. 433-40.
150. Wilson, N.S., V. Dixit, and A. Ashkenazi, *Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks*. Nat Immunol, 2009. **10**(4): p. 348-55.
151. Kroemer, G., L. Galluzzi, and C. Brenner, *Mitochondrial membrane permeabilization in cell death*. Physiol Rev, 2007. **87**(1): p. 99-163.
152. Yuan, S. and C.W. Akey, *Apoptosome structure, assembly, and procaspase activation*. Structure, 2013. **21**(4): p. 501-15.
153. Czabotar, P.E., et al., *Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(1): p. 49-63.
154. Schimmer, A.D., *Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice*. Cancer Res, 2004. **64**(20): p. 7183-90.
155. Li, L.Y., X. Luo, and X. Wang, *Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria*. Nature, 2001. **412**(6842): p. 95-9.
156. Sevrioukova, I.F., *Apoptosis-inducing factor: structure, function, and redox regulation*. Antioxid Redox Signal, 2011. **14**(12): p. 2545-79.
157. Sun, Y. and Z.L. Peng, *Programmed cell death and cancer*. Postgrad Med J, 2009. **85**(1001): p. 134-40.
158. Adamsen, B.L., K.L. Kravik, and P.M. De Angelis, *DNA damage signaling in response to 5-fluorouracil in three colorectal cancer cell lines with different mismatch repair and TP53 status*. Int J Oncol, 2011. **39**(3): p. 673-82.
159. Fuchs, C., E.P. Mitchell, and P.M. Hoff, *Irinotecan in the treatment of colorectal cancer*. Cancer Treat Rev, 2006. **32**(7): p. 491-503.
160. Alcindor, T. and N. Beauger, *Oxaliplatin: a review in the era of molecularly targeted therapy*. Curr Oncol, 2011. **18**(1): p. 18-25.
161. Swift, L.P., et al., *Doxorubicin-DNA adducts induce a non-topoisomerase II-mediated form of cell death*. Cancer Res, 2006. **66**(9): p. 4863-71.
162. Balkwill, F.R., et al., *Human tumor xenografts treated with recombinant human tumor necrosis factor alone or in combination with interferons*. Cancer Res, 1986. **46**(8): p. 3990-3.
163. Wang, P., et al., *PUMA is directly activated by NF-kappaB and contributes to TNF-alpha-induced apoptosis*. Cell Death Differ, 2009. **16**(9): p. 1192-202.
164. Kreeger, P.K., et al., *RAS mutations affect tumor necrosis factor-induced apoptosis in colon carcinoma cells via ERK-modulatory negative and positive feedback circuits along with non-ERK pathway effects*. Cancer Res, 2009. **69**(20): p. 8191-9.
165. Pastor, D.M., R.B. Irby, and L.S. Poritz, *Tumor necrosis factor alpha induces p53 up-regulated modulator of apoptosis expression in colorectal cancer cell lines*. Dis Colon Rectum, 2010. **53**(3): p. 257-63.
166. Han, J., et al., *Nuclear expression of beta-catenin promotes RB stability and resistance to TNF-induced apoptosis in colon cancer cells*. Mol Cancer Res, 2013. **11**(3): p. 207-18.
167. Leist, M., et al., *Murine hepatocyte apoptosis induced in vitro and in vivo by TNF-alpha requires transcriptional arrest*. J Immunol, 1994. **153**(4): p. 1778-88.

168. Al-Zoubi, M., et al., *Creating a tumor-resistant microenvironment: cell-mediated delivery of TNFalpha completely prevents breast cancer tumor formation in vivo*. Cell Cycle, 2013. **12**(3): p. 480-90.
169. Yang, T., et al., *Huachansu suppresses human bladder cancer cell growth through the Fas/FasL and TNF- alpha/TNFR1 pathway in vitro and in vivo*. J Exp Clin Cancer Res, 2015. **34**: p. 21.
170. Kang, M.H. and C.P. Reynolds, *Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(4): p. 1126-32.
171. Safa, A.R. and K.E. Pollok, *Targeting the Anti-Apoptotic Protein c-FLIP for Cancer Therapy*. Cancers (Basel), 2011. **3**(2): p. 1639-71.
172. Saleem, M., et al., *Inhibitors of apoptotic proteins: new targets for anticancer therapy*. Chem Biol Drug Des, 2013. **82**(3): p. 243-51.
173. Devarajan, E., et al., *Down-regulation of caspase 3 in breast cancer: a possible mechanism for chemoresistance*. Oncogene, 2002. **21**(57): p. 8843-51.
174. Arai, T., et al., *Genomic organization and mutation analyses of the DR5/TRAIL receptor 2 gene in colorectal carcinomas*. Cancer Lett, 1998. **133**(2): p. 197-204.
175. Mathiasen, I.S., et al., *Sensitization to TNF-induced apoptosis by 1,25-dihydroxy vitamin D(3) involves up-regulation of the TNF receptor 1 and cathepsin B*. Int J Cancer, 2001. **93**(2): p. 224-31.
176. Pajak, B. and A. Orzechowski, *Sodium butyrate-dependent sensitization of human colon adenocarcinoma COLO 205 cells to TNF-alpha-induced apoptosis*. J Physiol Pharmacol, 2007. **58 Suppl 3**: p. 163-76.
177. Wilson, T.R., et al., *Combined inhibition of FLIP and XIAP induces Bax-independent apoptosis in type II colorectal cancer cells*. Oncogene, 2009. **28**(1): p. 63-72.
178. Zhao, J., Y. Lu, and H.M. Shen, *Targeting p53 as a therapeutic strategy in sensitizing TRAIL-induced apoptosis in cancer cells*. Cancer Lett, 2012. **314**(1): p. 8-23.
179. Orłowski, R.Z. and A.S. Baldwin, Jr., *NF-kappaB as a therapeutic target in cancer*. Trends Mol Med, 2002. **8**(8): p. 385-9.
180. Giardina, C., H. Boulares, and M.S. Inan, *NSAIDs and butyrate sensitize a human colorectal cancer cell line to TNF-alpha and Fas ligation: the role of reactive oxygen species*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1448**(3): p. 425-38.
181. Yamamoto, Y., et al., *Sulindac inhibits activation of the NF-kappaB pathway*. J Biol Chem, 1999. **274**(38): p. 27307-14.
182. Kroemer, G., et al., *Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009*. Cell Death Differ, 2009. **16**(1): p. 3-11.
183. Degterev, A., et al., *Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury*. Nat Chem Biol, 2005. **1**(2): p. 112-9.
184. Pasparakis, M. and P. Vandenabeele, *Necroptosis and its role in inflammation*. Nature, 2015. **517**(7534): p. 311-20.
185. Sawai, H., *Differential effects of caspase inhibitors on TNF-induced necroptosis*. Biochem Biophys Res Commun, 2013. **432**(3): p. 451-5.
186. Giampietri, C., et al., *Necroptosis: molecular signalling and translational implications*. Int J Cell Biol, 2014. **2014**: p. 490275.
187. Degterev, A., et al., *Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins*. Nat Chem Biol, 2008. **4**(5): p. 313-21.
188. Galluzzi, L., O. Kepp, and G. Kroemer, *RIP kinases initiate programmed necrosis*. J Mol Cell Biol, 2009. **1**(1): p. 8-10.

189. Galluzzi, L., et al., *Molecular mechanisms of regulated necrosis*. Semin Cell Dev Biol, 2014. **35**: p. 24-32.
190. Dondelinger, Y., et al., *MLKL compromises plasma membrane integrity by binding to phosphatidylinositol phosphates*. Cell Rep, 2014. **7**(4): p. 971-81.
191. Cai, Z., et al., *Plasma membrane translocation of trimerized MLKL protein is required for TNF-induced necroptosis*. Nat Cell Biol, 2014. **16**(1): p. 55-65.
192. Chen, X., et al., *Translocation of mixed lineage kinase domain-like protein to plasma membrane leads to necrotic cell death*. Cell Res, 2014. **24**(1): p. 105-21.
193. Galluzzi, L., O. Kepp, and G. Kroemer, *MLKL regulates necrotic plasma membrane permeabilization*. Cell Res, 2014. **24**(2): p. 139-40.
194. Wu, J., et al., *Mkl1 knockout mice demonstrate the indispensable role of Mkl1 in necroptosis*. Cell Res, 2013. **23**(8): p. 994-1006.
195. Laukens, B., et al., *Smac mimetic bypasses apoptosis resistance in FADD- or caspase-8-deficient cells by priming for tumor necrosis factor alpha-induced necroptosis*. Neoplasia, 2011. **13**(10): p. 971-9.
196. Jouan-Lanhouet, S., et al., *TRAIL induces necroptosis involving RIPK1/RIPK3-dependent PARP-1 activation*. Cell Death Differ, 2012. **19**(12): p. 2003-14.
197. McCabe, K.E., et al., *Triggering necroptosis in cisplatin and IAP antagonist-resistant ovarian carcinoma*. Cell Death Dis, 2014. **5**: p. e1496.
198. Dunai, Z.A., et al., *Staurosporine induces necroptotic cell death under caspase-compromised conditions in U937 cells*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e41945.
199. Moriwaki, K., et al., *Differential roles of RIPK1 and RIPK3 in TNF-induced necroptosis and chemotherapeutic agent-induced cell death*. Cell Death Dis, 2015. **6**: p. e1636.
200. Fajardo, L.F., et al., *Dual role of tumor necrosis factor-alpha in angiogenesis*. Am J Pathol, 1992. **140**(3): p. 539-44.
201. Heinzman, J.M., S.L. Brower, and J.E. Bush, *Comparison of angiogenesis-related factor expression in primary tumor cultures under normal and hypoxic growth conditions*. Cancer Cell Int, 2008. **8**: p. 11.
202. Schweighofer, B., et al., *The VEGF-induced transcriptional response comprises gene clusters at the crossroad of angiogenesis and inflammation*. Thromb Haemost, 2009. **102**(3): p. 544-54.
203. Heidemann, J., et al., *Angiogenic effects of interleukin 8 (CXCL8) in human intestinal microvascular endothelial cells are mediated by CXCR2*. J Biol Chem, 2003. **278**(10): p. 8508-15.
204. Richard, S., et al., *Von Hippel-Lindau: how a rare disease illuminates cancer biology*. Semin Cancer Biol, 2013. **23**(1): p. 26-37.
205. Iervolino, A., et al., *Bcl-2 overexpression in human melanoma cells increases angiogenesis through VEGF mRNA stabilization and HIF-1-mediated transcriptional activity*. FASEB J, 2002. **16**(11): p. 1453-5.
206. Figueras, A., et al., *The impact of KRAS mutations on VEGF-A production and tumour vascular network*. BMC Cancer, 2013. **13**: p. 125.
207. Teodoro, J.G., S.K. Evans, and M.R. Green, *Inhibition of tumor angiogenesis by p53: a new role for the guardian of the genome*. J Mol Med (Berl), 2007. **85**(11): p. 1175-86.
208. Martinive, P. and P.A. Coucke, *[Vascular perfusion as the origin of neoplasm resistance to radio- and chemotherapy]*. Rev Med Liege, 2010. **65**(3): p. 133-9.
209. Tabernero, J., *The role of VEGF and EGFR inhibition: implications for combining anti-VEGF and anti-EGFR agents*. Mol Cancer Res, 2007. **5**(3): p. 203-20.

210. Lienard, D., et al., *High-dose recombinant tumor necrosis factor alpha in combination with interferon gamma and melphalan in isolation perfusion of the limbs for melanoma and sarcoma*. J Clin Oncol, 1992. **10**(1): p. 52-60.
211. Bonvalot, S., et al., *Hyperthermic isolated limb perfusion in locally advanced soft tissue sarcoma and progressive desmoid-type fibromatosis with TNF 1 mg and melphalan (T1-M HILP) is safe and efficient*. Ann Surg Oncol, 2009. **16**(12): p. 3350-7.
212. van Horssen, R., T.L. Ten Hagen, and A.M. Eggermont, *TNF-alpha in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility*. Oncologist, 2006. **11**(4): p. 397-408.
213. Mukaida, N., S. Sasakki, and B.K. Popivanova, *Tumor Necrosis Factor (TNF) and Chemokines in Colitis-Associated Cancer*. Cancers (Basel), 2011. **3**(3): p. 2811-26.
214. van der Veen, A.H., et al., *TNF-alpha augments intratumoural concentrations of doxorubicin in TNF-alpha-based isolated limb perfusion in rat sarcoma models and enhances anti-tumour effects*. Br J Cancer, 2000. **82**(4): p. 973-80.
215. Fukumura, D., et al., *Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(5): p. 2604-9.
216. Sonveaux, P., et al., *Endothelin-1 is a critical mediator of myogenic tone in tumor arterioles: implications for cancer treatment*. Cancer Res, 2004. **64**(9): p. 3209-14.
217. Williams, C.D., et al., *A high ratio of dietary n-6/n-3 polyunsaturated fatty acids is associated with increased risk of prostate cancer*. Nutr Res, 2011. **31**(1): p. 1-8.
218. Yang, B., et al., *Ratio of n-3/n-6 PUFAs and risk of breast cancer: a meta-analysis of 274135 adult females from 11 independent prospective studies*. BMC Cancer, 2014. **14**: p. 105.
219. Song, M., et al., *Dietary intake of fish, omega-3 and omega-6 fatty acids and risk of colorectal cancer: A prospective study in U.S. men and women*. Int J Cancer, 2014. **135**(10): p. 2413-23.
220. Kantor, E.D., et al., *Long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acid intake and risk of colorectal cancer*. Nutr Cancer, 2014. **66**(4): p. 716-27.
221. Carrillo, C., M. Cavia Mdel, and S.R. Alonso-Torre, *Antitumor effect of oleic acid; mechanisms of action: a review*. Nutr Hosp, 2012. **27**(6): p. 1860-5.
222. Arterburn, L.M., E.B. Hall, and H. Oken, *Distribution, interconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans*. Am J Clin Nutr, 2006. **83**(6 Suppl): p. 1467S-1476S.
223. Mori, T.A., et al., *Purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids have differential effects on serum lipids and lipoproteins, LDL particle size, glucose, and insulin in mildly hyperlipidemic men*. Am J Clin Nutr, 2000. **71**(5): p. 1085-94.
224. Blonk, M.C., et al., *Dose-response effects of fish-oil supplementation in healthy volunteers*. Am J Clin Nutr, 1990. **52**(1): p. 120-7.
225. Purasiri, P., et al., *Modulation of cytokine production in vivo by dietary essential fatty acids in patients with colorectal cancer*. Clin Sci (Lond), 1994. **87**(6): p. 711-7.
226. West, N.J., et al., *Eicosapentaenoic acid reduces rectal polyp number and size in familial adenomatous polyposis*. Gut, 2010. **59**(7): p. 918-25.
227. Abu-Elheiga, L., et al., *Human acetyl-CoA carboxylase: characterization, molecular cloning, and evidence for two isoforms*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(9): p. 4011-5.
228. Wakil, S.J. and L.A. Abu-Elheiga, *Fatty acid metabolism: target for metabolic syndrome*. J Lipid Res, 2009. **50** Suppl: p. S138-43.

229. Currie, E., et al., *Cellular fatty acid metabolism and cancer*. Cell Metab, 2013. **18**(2): p. 153-61.
230. Kamphorst, J.J., et al., *Hypoxic and Ras-transformed cells support growth by scavenging unsaturated fatty acids from lysophospholipids*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(22): p. 8882-7.
231. Ackerman, D. and M.C. Simon, *Hypoxia, lipids, and cancer: surviving the harsh tumor microenvironment*. Trends Cell Biol, 2014. **24**(8): p. 472-8.
232. Lewis, C.A., et al., *SREBP maintains lipid biosynthesis and viability of cancer cells under lipid- and oxygen-deprived conditions and defines a gene signature associated with poor survival in glioblastoma multiforme*. Oncogene, 2015.
233. Zhang, F. and G. Du, *Dysregulated lipid metabolism in cancer*. World J Biol Chem, 2012. **3**(8): p. 167-74.
234. Szachowicz-Petelska, B., S. Sulkowski, and Z.A. Figaszewski, *Altered membrane free unsaturated fatty acid composition in human colorectal cancer tissue*. Mol Cell Biochem, 2007. **294**(1-2): p. 237-42.
235. Oraldi, M., et al., *Decreased polyunsaturated Fatty Acid content contributes to increased survival in human colon cancer*. J Oncol, 2009. **2009**: p. 867915.
236. Notarnicola, M., C. Messa, and M.G. Caruso, *A significant role of lipogenic enzymes in colorectal cancer*. Anticancer Res, 2012. **32**(7): p. 2585-90.
237. Minville-Walz, M., et al., *Inhibition of stearyl-CoA desaturase 1 expression induces CHOP-dependent cell death in human cancer cells*. PLoS One, 2010. **5**(12): p. e14363.
238. Lupu, R. and J.A. Menendez, *Pharmacological inhibitors of Fatty Acid Synthase (FASN)--catalyzed endogenous fatty acid biogenesis: a new family of anti-cancer agents?* Curr Pharm Biotechnol, 2006. **7**(6): p. 483-93.
239. Scaglia, N., J.W. Chisholm, and R.A. Igal, *Inhibition of stearylCoA desaturase-1 inactivates acetyl-CoA carboxylase and impairs proliferation in cancer cells: role of AMPK*. PLoS One, 2009. **4**(8): p. e6812.
240. Bourre, J.M., M. Piciotti, and O. Dumont, *Delta 6 desaturase in brain and liver during development and aging*. Lipids, 1990. **25**(6): p. 354-6.
241. Chen, Q. and A. Nilsson, *Desaturation and chain elongation of n - 3 and n - 6 polyunsaturated fatty acids in the human CaCo-2 cell line*. Biochim Biophys Acta, 1993. **1166**(2-3): p. 193-201.
242. Irazu, C.E., S. Gonzalez-Rodriguez, and R.R. Brenner, *Delta 5 desaturase activity in rat kidney microsomes*. Mol Cell Biochem, 1993. **129**(1): p. 31-7.
243. Haghighi, F., et al., *DNA methylation perturbations in genes involved in polyunsaturated Fatty Acid biosynthesis associated with depression and suicide risk*. Front Neurol, 2015. **6**: p. 92.
244. Calder, P.C., *Polyunsaturated fatty acids and inflammation*. Biochem Soc Trans, 2005. **33**(Pt 2): p. 423-7.
245. Nomura, D.K., et al., *Monoacylglycerol lipase regulates a fatty acid network that promotes cancer pathogenesis*. Cell, 2010. **140**(1): p. 49-61.
246. Ye, L., et al., *Monoacylglycerol lipase (MAGL) knockdown inhibits tumor cells growth in colorectal cancer*. Cancer Lett, 2011. **307**(1): p. 6-17.
247. Houten, S.M. and R.J. Wanders, *A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid beta-oxidation*. J Inherit Metab Dis, 2010. **33**(5): p. 469-77.
248. Morita, M. and T. Imanaka, *Peroxisomal ABC transporters: structure, function and role in disease*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1822**(9): p. 1387-96.
249. Liu, Y., *Fatty acid oxidation is a dominant bioenergetic pathway in prostate cancer*. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2006. **9**(3): p. 230-4.

250. Khasawneh, J., et al., *Inflammation and mitochondrial fatty acid beta-oxidation link obesity to early tumor promotion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(9): p. 3354-9.
251. Samudio, I., et al., *Pharmacologic inhibition of fatty acid oxidation sensitizes human leukemia cells to apoptosis induction*. J Clin Invest, 2010. **120**(1): p. 142-56.
252. Zaugg, K., et al., *Carnitine palmitoyltransferase 1C promotes cell survival and tumor growth under conditions of metabolic stress*. Genes Dev, 2011. **25**(10): p. 1041-51.
253. Serhan, C.N., *Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology*. Nature, 2014. **510**(7503): p. 92-101.
254. Yates, C.M., P.C. Calder, and G. Ed Rainger, *Pharmacology and therapeutics of omega-3 polyunsaturated fatty acids in chronic inflammatory disease*. Pharmacol Ther, 2014. **141**(3): p. 272-82.
255. Calder, P.C., *Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1851**(4): p. 469-84.
256. Wang, D. and R.N. Dubois, *Eicosanoids and cancer*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(3): p. 181-93.
257. Li, X. and H.H. Tai, *Activation of thromboxane A2 receptor (TP) increases the expression of monocyte chemoattractant protein -1 (MCP-1)/chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2) and recruits macrophages to promote invasion of lung cancer cells*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e54073.
258. Sakai, H., et al., *Upregulation of thromboxane synthase in human colorectal carcinoma and the cancer cell proliferation by thromboxane A2*. FEBS Lett, 2006. **580**(14): p. 3368-74.
259. Serhan, C.N., et al., *Maresins: novel macrophage mediators with potent antiinflammatory and proresolving actions*. J Exp Med, 2009. **206**(1): p. 15-23.
260. Yang, P., Y. Jiang, and S.M. Fischer, *Prostaglandin E3 metabolism and cancer*. Cancer Lett, 2014. **348**(1-2): p. 1-11.
261. Terano, T., J.A. Salmon, and S. Moncada, *Biosynthesis and biological activity of leukotriene B5*. Prostaglandins, 1984. **27**(2): p. 217-32.
262. Kohli, P. and B.D. Levy, *Resolvins and protectins: mediating solutions to inflammation*. Br J Pharmacol, 2009. **158**(4): p. 960-71.
263. Habel, P., et al., *Docosahexaenoic acid suppresses arachidonic acid-induced proliferation of LS-174T human colon carcinoma cells*. World J Gastroenterol, 2009. **15**(9): p. 1079-84.
264. Vincentini, O., et al., *Docosahexaenoic acid modulates in vitro the inflammation of celiac disease in intestinal epithelial cells via the inhibition of cPLA2*. Clin Nutr, 2011. **30**(4): p. 541-6.
265. Wu, S., et al., *Fish consumption and colorectal cancer risk in humans: a systematic review and meta-analysis*. Am J Med, 2012. **125**(6): p. 551-9 e5.
266. Geelen, A., et al., *Fish consumption, n-3 fatty acids, and colorectal cancer: a meta-analysis of prospective cohort studies*. Am J Epidemiol, 2007. **166**(10): p. 1116-25.
267. Song, M., et al., *Marine omega-3 polyunsaturated fatty acids and risk of colorectal cancer according to microsatellite instability*. J Natl Cancer Inst, 2015. **107**(4).
268. Anti, M., et al., *Effect of omega-3 fatty acids on rectal mucosal cell proliferation in subjects at risk for colon cancer*. Gastroenterology, 1992. **103**(3): p. 883-91.
269. Bougnoux, P., et al., *Improving outcome of chemotherapy of metastatic breast cancer by docosahexaenoic acid: a phase II trial*. Br J Cancer, 2009. **101**(12): p. 1978-85.

270. Minami, Y., et al., [*omega-3 Fatty acid-containing diet (Racol) reduces toxicity of chemoradiation therapy for patients with esophageal cancer*]. *Gan To Kagaku Ryoho*, 2008. **35**(3): p. 437-40.
271. Cockbain, A.J., et al., *Anticorectal cancer activity of the omega-3 polyunsaturated fatty acid eicosapentaenoic acid*. *Gut*, 2014. **63**(11): p. 1760-8.
272. Boudreau, M.D., et al., *Suppression of tumor cell growth both in nude mice and in culture by n-3 polyunsaturated fatty acids: mediation through cyclooxygenase-independent pathways*. *Cancer Res*, 2001. **61**(4): p. 1386-91.
273. Calviello, G., et al., *n-3 PUFAs reduce VEGF expression in human colon cancer cells modulating the COX-2/PGE2 induced ERK-1 and -2 and HIF-1alpha induction pathway*. *Carcinogenesis*, 2004. **25**(12): p. 2303-10.
274. Oh DY, T.S., Bae EJ, Imamura T, Morinaga H, Fan W, Li P, Lu WJ, Watkins SM, Olefsky JM., *GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects*. *Cell*, 2010.
275. Wu, Q., et al., *Identification of G-protein-coupled receptor 120 as a tumor-promoting receptor that induces angiogenesis and migration in human colorectal carcinoma*. *Oncogene*, 2013. **32**(49): p. 5541-50.
276. Chung, H., et al., *Omega-3 fatty acids reduce obesity-induced tumor progression independent of GPR120 in a mouse model of postmenopausal breast cancer*. *Oncogene*, 2015. **34**(27): p. 3504-13.
277. Rachidi, S.M., et al., *Molecular profiling of multiple human cancers defines an inflammatory cancer-associated molecular pattern and uncovers KPNA2 as a uniform poor prognostic cancer marker*. *PLoS One*, 2013. **8**(3): p. e57911.
278. Uray, I.P., Y. Liang, and S.M. Hyder, *Estradiol down-regulates CD36 expression in human breast cancer cells*. *Cancer Lett*, 2004. **207**(1): p. 101-7.
279. Koch, M., et al., *CD36-mediated activation of endothelial cell apoptosis by an N-terminal recombinant fragment of thrombospondin-2 inhibits breast cancer growth and metastasis in vivo*. *Breast Cancer Res Treat*, 2011. **128**(2): p. 337-46.
280. Chmurzynska, A., *The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): function, structure and polymorphism*. *J Appl Genet*, 2006. **47**(1): p. 39-48.
281. Bao, Z., et al., *A novel cutaneous Fatty Acid-binding protein-related signaling pathway leading to malignant progression in prostate cancer cells*. *Genes Cancer*, 2013. **4**(7-8): p. 297-314.
282. Fujii, K., et al., *Proteomic study of human hepatocellular carcinoma using two-dimensional difference gel electrophoresis with saturation cysteine dye*. *Proteomics*, 2005. **5**(5): p. 1411-22.
283. Sinha, P., et al., *Increased expression of epidermal fatty acid binding protein, cofilin, and 14-3-3-sigma (stratifin) detected by two-dimensional gel electrophoresis, mass spectrometry and microsequencing of drug-resistant human adenocarcinoma of the pancreas*. *Electrophoresis*, 1999. **20**(14): p. 2952-60.
284. Jing, C., et al., *Identification of the messenger RNA for human cutaneous fatty acid-binding protein as a metastasis inducer*. *Cancer Res*, 2000. **60**(9): p. 2390-8.
285. Zhang, F., et al., *Dietary fatty acids affect lipid metabolism and estrogen receptor expression in N-methyl-N-nitrosourea-induced rat mammary cancer model*. *Clin Lab*, 2015. **61**(3-4): p. 389-95.
286. Kheirleisid, E.A., et al., *Clinical applications of gene expression in colorectal cancer*. *J Gastrointest Oncol*, 2013. **4**(2): p. 144-57.
287. Dharmarajan, S., et al., *Liver fatty acid-binding protein (L-Fabp) modifies intestinal fatty acid composition and adenoma formation in ApcMin/+ mice*. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2013. **6**(10): p. 1026-37.

288. Guo, D., et al., *Targeting SREBP-1-driven lipid metabolism to treat cancer*. *Curr Pharm Des*, 2014. **20**(15): p. 2619-26.
289. Huang, W.C., et al., *Activation of androgen receptor, lipogenesis, and oxidative stress converged by SREBP-1 is responsible for regulating growth and progression of prostate cancer cells*. *Mol Cancer Res*, 2012. **10**(1): p. 133-42.
290. Li, J.N., et al., *Sterol regulatory element-binding protein-1 participates in the regulation of fatty acid synthase expression in colorectal neoplasia*. *Exp Cell Res*, 2000. **261**(1): p. 159-65.
291. Georgiadi, A. and S. Kersten, *Mechanisms of gene regulation by fatty acids*. *Adv Nutr*, 2012. **3**(2): p. 127-34.
292. Deng, X., et al., *Docosahexaenoic acid inhibits proteolytic processing of sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) via activation of AMP-activated kinase*. *Biochim Biophys Acta*, 2015.
293. Vecchini, A., et al., *Dietary alpha-linolenic acid reduces COX-2 expression and induces apoptosis of hepatoma cells*. *J Lipid Res*, 2004. **45**(2): p. 308-16.
294. Blouin, J.M., et al., *Down-regulation of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene in human colon tumors and induction by omega-3 fatty acids*. *Biochimie*, 2010. **92**(12): p. 1772-7.
295. Waters, K.M., C.W. Miller, and J.M. Ntambi, *Localization of a polyunsaturated fatty acid response region in stearoyl-CoA desaturase gene 1*. *Biochim Biophys Acta*, 1997. **1349**(1): p. 33-42.
296. Hardie, D.G., *Sensing of energy and nutrients by AMP-activated protein kinase*. *Am J Clin Nutr*, 2011. **93**(4): p. 891S-6.
297. Zhou, G., et al., *Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action*. *J Clin Invest*, 2001. **108**(8): p. 1167-74.
298. Winder, W.W., et al., *Phosphorylation of rat muscle acetyl-CoA carboxylase by AMP-activated protein kinase and protein kinase A*. *J Appl Physiol* (1985), 1997. **82**(1): p. 219-25.
299. Foster, D.W., *Malonyl-CoA: the regulator of fatty acid synthesis and oxidation*. *J Clin Invest*, 2012. **122**(6): p. 1958-9.
300. Zhou, W., et al., *Malonyl-CoA decarboxylase inhibition is selectively cytotoxic to human breast cancer cells*. *Oncogene*, 2009. **28**(33): p. 2979-87.
301. Flavin, R., G. Zadra, and M. Loda, *Metabolic alterations and targeted therapies in prostate cancer*. *J Pathol*, 2011. **223**(2): p. 283-94.
302. Xiang, X., et al., *AMP-activated protein kinase activators can inhibit the growth of prostate cancer cells by multiple mechanisms*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **321**(1): p. 161-7.
303. Andrade-Vieira, R., J.H. Han, and P.A. Marignani, *Omega-3 polyunsaturated fatty acid promotes the inhibition of glycolytic enzymes and mTOR signaling by regulating the tumor suppressor LKB1*. *Cancer Biol Ther*, 2013. **14**(11): p. 1050-8.
304. Narayanan, B.A., N.K. Narayanan, and B.S. Reddy, *Docosahexaenoic acid regulated genes and transcription factors inducing apoptosis in human colon cancer cells*. *Int J Oncol*, 2001. **19**(6): p. 1255-62.
305. Habermann, N., et al., *Modulation of gene expression in eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid treated human colon adenoma cells*. *Genes Nutr*, 2009. **4**(1): p. 73-6.
306. Fenton, J.I. and S.J. McCaskey, *Curcumin and docosahexaenoic acid block insulin-induced colon carcinoma cell proliferation*. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2013. **88**(3): p. 219-26.

307. Rogers, K.R., et al., *Docosahexaenoic acid alters epidermal growth factor receptor-related signaling by disrupting its lipid raft association*. *Carcinogenesis*, 2010. **31**(9): p. 1523-30.
308. Liu, G., et al., *Omega 3 but not omega 6 fatty acids inhibit AP-1 activity and cell transformation in JB6 cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(13): p. 7510-5.
309. Singh, J., R. Hamid, and B.S. Reddy, *Dietary fat and colon cancer: modulating effect of types and amount of dietary fat on ras-p21 function during promotion and progression stages of colon cancer*. *Cancer Res*, 1997. **57**(2): p. 253-8.
310. Toit-Kohn, J.L., L. Louw, and A.M. Engelbrecht, *Docosahexaenoic acid induces apoptosis in colorectal carcinoma cells by modulating the PI3 kinase and p38 MAPK pathways*. *J Nutr Biochem*, 2009. **20**(2): p. 106-14.
311. Engelbrecht, A.M., et al., *Differential induction of apoptosis and inhibition of the PI3-kinase pathway by saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids in a colon cancer cell model*. *Apoptosis*, 2008. **13**(11): p. 1368-77.
312. Rocha, G.Z., et al., *Metformin amplifies chemotherapy-induced AMPK activation and antitumoral growth*. *Clin Cancer Res*, 2011. **17**(12): p. 3993-4005.
313. Kliewer, S.A., et al., *Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(9): p. 4318-23.
314. Pegorier, J.P., C. Le May, and J. Girard, *Control of gene expression by fatty acids*. *J Nutr*, 2004. **134**(9): p. 2444S-2449S.
315. Michalik, L., et al., *International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors*. *Pharmacol Rev*, 2006. **58**(4): p. 726-41.
316. Varga, T., Z. Czimmerer, and L. Nagy, *PPARs are a unique set of fatty acid regulated transcription factors controlling both lipid metabolism and inflammation*. *Biochim Biophys Acta*, 2011. **1812**(8): p. 1007-22.
317. Miyata, K.S., et al., *The orphan nuclear hormone receptor LXR alpha interacts with the peroxisome proliferator-activated receptor and inhibits peroxisome proliferator signaling*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(16): p. 9189-92.
318. Suzuki, K., et al., *Docosahexaenoic acid induces adipose differentiation-related protein through activation of retinoid x receptor in human choriocarcinoma BeWo cells*. *Biol Pharm Bull*, 2009. **32**(7): p. 1177-82.
319. Peters, J.M., Y.M. Shah, and F.J. Gonzalez, *The role of peroxisome proliferator-activated receptors in carcinogenesis and chemoprevention*. *Nat Rev Cancer*, 2012. **12**(3): p. 181-95.
320. Tanaka, T., et al., *Ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma inhibit chemically induced colitis and formation of aberrant crypt foci in rats*. *Cancer Res*, 2001. **61**(6): p. 2424-8.
321. Niho, N., et al., *Concomitant suppression of hyperlipidemia and intestinal polyp formation in Apc-deficient mice by peroxisome proliferator-activated receptor ligands*. *Cancer Res*, 2003. **63**(18): p. 6090-5.
322. Yang, W.L. and H. Frucht, *Activation of the PPAR pathway induces apoptosis and COX-2 inhibition in HT-29 human colon cancer cells*. *Carcinogenesis*, 2001. **22**(9): p. 1379-83.
323. Yoshinaga, M., et al., *The expression of both peroxisome proliferator-activated receptor delta and cyclooxygenase-2 in tissues is associated with poor prognosis in colorectal cancer patients*. *Dig Dis Sci*, 2011. **56**(4): p. 1194-200.
324. Wang, D., et al., *Crosstalk between peroxisome proliferator-activated receptor delta and VEGF stimulates cancer progression*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(50): p. 19069-74.

325. Wang, D., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor delta promotes colonic inflammation and tumor growth*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(19): p. 7084-9.
326. Bardon, S., et al., [*Dietary fatty acids and cancer: potential cellular and molecular mechanisms*]. Bull Cancer, 2005. **92**(7): p. 697-707.
327. Fajas, L., et al., *PPARgamma controls cell proliferation and apoptosis in an RB-dependent manner*. Oncogene, 2003. **22**(27): p. 4186-93.
328. Shen, D., C. Deng, and M. Zhang, *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists inhibit the proliferation and invasion of human colon cancer cells*. Postgrad Med J, 2007. **83**(980): p. 414-9.
329. Allred, C.D., et al., *PPARgamma1 as a molecular target of eicosapentaenoic acid in human colon cancer (HT-29) cells*. J Nutr, 2008. **138**(2): p. 250-6.
330. Sun, H., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-mediated up-regulation of syndecan-1 by n-3 fatty acids promotes apoptosis of human breast cancer cells*. Cancer Res, 2008. **68**(8): p. 2912-9.
331. Wannous, R., et al., *PPARbeta mRNA expression, reduced by n-3 PUFA diet in mammary tumor, controls breast cancer cell growth*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1831**(11): p. 1618-25.
332. Hofmanova, J., et al., *Interaction of dietary fatty acids with tumour necrosis factor family cytokines during colon inflammation and cancer*. Mediators Inflamm, 2014. **2014**: p. 848632.
333. Zand, H., et al., *Docosahexaenoic acid sensitizes Ramos cells to Gamma-irradiation-induced apoptosis through involvement of PPAR-gamma activation and NF-kappaB suppression*. Mol Cell Biochem, 2008. **317**(1-2): p. 113-20.
334. Chen, F., et al., *Phosphorylation of PPARgamma via active ERK1/2 leads to its physical association with p65 and inhibition of NF-kappabeta*. J Cell Biochem, 2003. **90**(4): p. 732-44.
335. Hou Y, M.F., Chadee K., *PPARgamma is an E3 ligase that induces the degradation of NF-kB/p65*. Nat Commun, 2012.
336. Singer, P., et al., *Anti-inflammatory properties of omega-3 fatty acids in critical illness: novel mechanisms and an integrative perspective*. Intensive Care Med, 2008. **34**(9): p. 1580-92.
337. Fujise, T., et al., *Long-term feeding of various fat diets modulates azoxymethane-induced colon carcinogenesis through Wnt/beta-catenin signaling in rats*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007. **292**(4): p. G1150-6.
338. Calviello, G., et al., *Docosahexaenoic acid induces proteasome-dependent degradation of beta-catenin, down-regulation of survivin and apoptosis in human colorectal cancer cells not expressing COX-2*. Carcinogenesis, 2007. **28**(6): p. 1202-9.
339. Turk, H.F. and R.S. Chapkin, *Membrane lipid raft organization is uniquely modified by n-3 polyunsaturated fatty acids*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2013. **88**(1): p. 43-7.
340. Skender, B., et al., *DHA-mediated enhancement of TRAIL-induced apoptosis in colon cancer cells is associated with engagement of mitochondria and specific alterations in sphingolipid metabolism*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1841**(9): p. 1308-17.
341. Sung, B., et al., *Gossypol induces death receptor-5 through activation of the ROS-ERK-CHOP pathway and sensitizes colon cancer cells to TRAIL*. J Biol Chem, 2010. **285**(46): p. 35418-27.

342. Lim, S.J., et al., *Docosahexaenoic acid sensitizes colon cancer cells to sulindac sulfide-induced apoptosis*. *Oncol Rep*, 2012. **27**(6): p. 2023-30.
343. Reddy, B.S., et al., *Prevention of colon cancer by low doses of celecoxib, a cyclooxygenase inhibitor, administered in diet rich in omega-3 polyunsaturated fatty acids*. *Cancer Res*, 2005. **65**(17): p. 8022-7.
344. Granci, V., et al., *Colon cancer cell chemosensitisation by fish oil emulsion involves apoptotic mitochondria pathway*. *Br J Nutr*, 2013. **109**(7): p. 1188-95.
345. Calviello, G., et al., *Docosahexaenoic acid enhances the susceptibility of human colorectal cancer cells to 5-fluorouracil*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2005. **55**(1): p. 12-20.
346. Cai, F., et al., *Interaction of omega-3 polyunsaturated fatty acids with radiation therapy in two different colorectal cancer cell lines*. *Clin Nutr*, 2014. **33**(1): p. 164-70.
347. Benais-Pont, G., et al., *Omega-3 polyunsaturated fatty acids and ionizing radiation: combined cytotoxicity on human colorectal adenocarcinoma cells*. *Nutrition*, 2006. **22**(9): p. 931-9.
348. Wang, D. and R.N. Dubois, *The role of COX-2 in intestinal inflammation and colorectal cancer*. *Oncogene*, 2010. **29**(6): p. 781-8.
349. Soumaoro, L.T., et al., *Expression of 5-lipoxygenase in human colorectal cancer*. *World J Gastroenterol*, 2006. **12**(39): p. 6355-60.
350. Yao, L., et al., *Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Upregulate 15-PGDH Expression in Cholangiocarcinoma Cells by Inhibiting miR-26a/b Expression*. *Cancer Res*, 2015. **75**(7): p. 1388-98.
351. Novak, T.E., et al., *NF-kappa B inhibition by omega -3 fatty acids modulates LPS-stimulated macrophage TNF-alpha transcription*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2003. **284**(1): p. L84-9.
352. Zhao, Y., et al., *Eicosapentaenoic acid prevents LPS-induced TNF-alpha expression by preventing NF-kappaB activation*. *J Am Coll Nutr*, 2004. **23**(1): p. 71-8.
353. Gravaghi, C., et al., *Cox-2 expression, PGE(2) and cytokines production are inhibited by endogenously synthesized n-3 PUFAs in inflamed colon of fat-1 mice*. *J Nutr Biochem*, 2011. **22**(4): p. 360-5.
354. Jia, Q., et al., *Reduced colitis-associated colon cancer in Fat-1 (n-3 fatty acid desaturase) transgenic mice*. *Cancer Res*, 2008. **68**(10): p. 3985-91.
355. Nowak, J., et al., *Colitis-associated colon tumorigenesis is suppressed in transgenic mice rich in endogenous n-3 fatty acids*. *Carcinogenesis*, 2007. **28**(9): p. 1991-5.
356. Garcia-Lora, A., I. Algarra, and F. Garrido, *MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape*. *J Cell Physiol*, 2003. **195**(3): p. 346-55.
357. Schreiber, R.D., L.J. Old, and M.J. Smyth, *Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion*. *Science*, 2011. **331**(6024): p. 1565-70.
358. Chapkin, R.S., et al., *Immunomodulatory effects of (n-3) fatty acids: putative link to inflammation and colon cancer*. *J Nutr*, 2007. **137**(1 Suppl): p. 200S-204S.
359. Bruchard, M. and F. Ghiringhelli, *[Tumor microenvironment: regulatory cells and immunosuppressive cytokines]*. *Med Sci (Paris)*, 2014. **30**(4): p. 429-35.
360. Letourneau, S., et al., *IL-2- and CD25-dependent immunoregulatory mechanisms in the homeostasis of T-cell subsets*. *J Allergy Clin Immunol*, 2009. **123**(4): p. 758-62.
361. Wang, K., et al., *Interleukin-17 receptor a signaling in transformed enterocytes promotes early colorectal tumorigenesis*. *Immunity*, 2014. **41**(6): p. 1052-63.

362. Denys, A., A. Hichami, and N.A. Khan, *n-3 PUFAs modulate T-cell activation via protein kinase C-alpha and -epsilon and the NF-kappaB signaling pathway*. J Lipid Res, 2005. **46**(4): p. 752-8.
363. Monk, J.M., et al., *n3 PUFAs reduce mouse CD4+ T-cell ex vivo polarization into Th17 cells*. J Nutr, 2013. **143**(9): p. 1501-8.
364. Berger, H., et al., *SOCS3 transactivation by PPARgamma prevents IL-17-driven cancer growth*. Cancer Res, 2013. **73**(12): p. 3578-90.
365. Allen, M.J., et al., *n-3 PUFAs reduce T-helper 17 cell differentiation by decreasing responsiveness to interleukin-6 in isolated mouse splenic CD4(+) T cells*. J Nutr, 2014. **144**(8): p. 1306-13.
366. Rodriguez, M., et al., *Polarization of the innate immune response by prostaglandin E2: a puzzle of receptors and signals*. Mol Pharmacol, 2014. **85**(1): p. 187-97.
367. Yessoufou, A., et al., *Docosahexaenoic acid reduces suppressive and migratory functions of CD4+CD25+ regulatory T-cells*. J Lipid Res, 2009. **50**(12): p. 2377-88.
368. Vivier, E., et al., *Functions of natural killer cells*. Nat Immunol, 2008. **9**(5): p. 503-10.
369. Waldhauer, I. and A. Steinle, *NK cells and cancer immunosurveillance*. Oncogene, 2008. **27**(45): p. 5932-43.
370. Levy, E.M., M.P. Roberti, and J. Mordoh, *Natural killer cells in human cancer: from biological functions to clinical applications*. J Biomed Biotechnol, 2011. **2011**: p. 676198.
371. Fiala, M., *Curcumin and omega-3 fatty acids enhance NK cell-induced apoptosis of pancreatic cancer cells but curcumin inhibits interferon-gamma production: benefits of omega-3 with curcumin against cancer*. Molecules, 2015. **20**(2): p. 3020-6.
372. Mao, Y., et al., *Inhibition of tumor-derived prostaglandin-e2 blocks the induction of myeloid-derived suppressor cells and recovers natural killer cell activity*. Clin Cancer Res, 2014. **20**(15): p. 4096-106.
373. Gabrilovich, D.I. and S. Nagaraj, *Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(3): p. 162-74.
374. Diaz-Montero, C.M., et al., *Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy*. Cancer Immunol Immunother, 2009. **58**(1): p. 49-59.
375. Wu, P., et al., *gammadeltaT17 cells promote the accumulation and expansion of myeloid-derived suppressor cells in human colorectal cancer*. Immunity, 2014. **40**(5): p. 785-800.
376. Trikha, P. and W.E. Carson, 3rd, *Signaling pathways involved in MDSC regulation*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1846**(1): p. 55-65.
377. Young, M.R. and M.E. Young, *Effects of fish oil and corn oil diets on prostaglandin-dependent and myelopoiesis-associated immune suppressor mechanisms of mice bearing metastatic Lewis lung carcinoma tumors*. Cancer Res, 1989. **49**(8): p. 1931-6.
378. Sica, A. and A. Mantovani, *Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas*. J Clin Invest, 2012. **122**(3): p. 787-95.
379. Mantovani, A., et al., *Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes*. Trends Immunol, 2002. **23**(11): p. 549-55.

380. Steidl, C., et al., *Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma*. *N Engl J Med*, 2010. **362**(10): p. 875-85.
381. Ren, F., et al., *Interferon-gamma and celecoxib inhibit lung-tumor growth through modulating M2/M1 macrophage ratio in the tumor microenvironment*. *Drug Des Devel Ther*, 2014. **8**: p. 1527-38.
382. Komatsu, W., et al., *Docosahexaenoic acid suppresses nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in interferon-gamma plus lipopolysaccharide-stimulated murine macrophages by inhibiting the oxidative stress*. *Free Radic Biol Med*, 2003. **34**(8): p. 1006-16.
383. Cianchi, F., et al., *Cyclooxygenase-2 activation mediates the proangiogenic effect of nitric oxide in colorectal cancer*. *Clin Cancer Res*, 2004. **10**(8): p. 2694-704.
384. Li, C.C., et al., *Effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on prostate cancer cell migration and invasion induced by tumor-associated macrophages*. *PLoS One*, 2014. **9**(6): p. e99630.
385. Chouaib, S., et al., *Hypoxia promotes tumor growth in linking angiogenesis to immune escape*. *Front Immunol*, 2012. **3**: p. 21.
386. Fox, P.L. and P.E. DiCorleto, *Fish oils inhibit endothelial cell production of platelet-derived growth factor-like protein*. *Science*, 1988. **241**(4864): p. 453-6.
387. Terano, T., T. Shiina, and Y. Tamura, *Eicosapentaenoic acid suppressed the proliferation of vascular smooth muscle cells through modulation of various steps of growth signals*. *Lipids*, 1996. **31 Suppl**: p. S301-4.
388. Kornfeld, S., et al., *Reducing endothelial NOS activation and interstitial fluid pressure with n-3 PUFA offset tumor chemoresistance*. *Carcinogenesis*, 2012. **33**(2): p. 260-7.
389. Curti, B.D., et al., *Interstitial pressure of subcutaneous nodules in melanoma and lymphoma patients: changes during treatment*. *Cancer Res*, 1993. **53**(10 Suppl): p. 2204-7.
390. Yilmaz, M., G. Christofori, and F. Lehenbre, *Distinct mechanisms of tumor invasion and metastasis*. *Trends Mol Med*, 2007. **13**(12): p. 535-41.
391. Nguyen, D.X., P.D. Bos, and J. Massague, *Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization*. *Nat Rev Cancer*, 2009. **9**(4): p. 274-84.
392. Alexiou, D., et al., *Serum levels of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 in colorectal cancer patients: correlations with clinicopathological features, patient survival and tumour surgery*. *Eur J Cancer*, 2001. **37**(18): p. 2392-7.
393. Kontogianna, M., et al., *omega-3 fatty acids decrease endothelial adhesion of human colorectal carcinoma cells*. *J Surg Res*, 2000. **92**(2): p. 201-5.
394. Iwamoto, S., et al., *Effects of fatty acids on liver metastasis of ACL-15 rat colon cancer cells*. *Nutr Cancer*, 1998. **31**(2): p. 143-50.
395. Filipowicz, W., S.N. Bhattacharyya, and N. Sonenberg, *Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?* *Nat Rev Genet*, 2008. **9**(2): p. 102-14.
396. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. *Cell*, 1993. **75**(5): p. 843-54.
397. Reinhart, B.J., et al., *The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 2000. **403**(6772): p. 901-6.
398. Ruvkun, G. and J. Giusto, *The Caenorhabditis elegans heterochronic gene lin-14 encodes a nuclear protein that forms a temporal developmental switch*. *Nature*, 1989. **338**(6213): p. 313-9.

399. Olsen, P.H. and V. Ambros, *The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in Caenorhabditis elegans by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation*. Dev Biol, 1999. **216**(2): p. 671-80.
400. Moss, E.G., R.C. Lee, and V. Ambros, *The cold shock domain protein LIN-28 controls developmental timing in C. elegans and is regulated by the lin-4 RNA*. Cell, 1997. **88**(5): p. 637-46.
401. Lagos-Quintana, M., et al., *Identification of novel genes coding for small expressed RNAs*. Science, 2001. **294**(5543): p. 853-8.
402. Saini, H.K., S. Griffiths-Jones, and A.J. Enright, *Genomic analysis of human microRNA transcripts*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(45): p. 17719-24.
403. Monteys, A.M., et al., *Structure and activity of putative intronic miRNA promoters*. RNA, 2010. **16**(3): p. 495-505.
404. Lee, Y., et al., *MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II*. EMBO J, 2004. **23**(20): p. 4051-60.
405. Lee, Y., et al., *The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing*. Nature, 2003. **425**(6956): p. 415-9.
406. Han, J., et al., *Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex*. Cell, 2006. **125**(5): p. 887-901.
407. Lund, E., et al., *Nuclear export of microRNA precursors*. Science, 2004. **303**(5654): p. 95-8.
408. Chendrimada, T.P., et al., *TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing*. Nature, 2005. **436**(7051): p. 740-4.
409. Kawamata, T. and Y. Tomari, *Making RISC*. Trends Biochem Sci, 2010. **35**(7): p. 368-76.
410. Ha, M. and V.N. Kim, *Regulation of microRNA biogenesis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(8): p. 509-24.
411. Lim, L.P., et al., *Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs*. Nature, 2005. **433**(7027): p. 769-73.
412. Peter, M.E., *Targeting of mRNAs by multiple miRNAs: the next step*. Oncogene, 2010. **29**(15): p. 2161-4.
413. Hashimoto, Y., Y. Akiyama, and Y. Yuasa, *Multiple-to-multiple relationships between microRNAs and target genes in gastric cancer*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e62589.
414. Valinezhad Orang, A., R. Safaralizadeh, and M. Kazemzadeh-Bavili, *Mechanisms of miRNA-Mediated Gene Regulation from Common Downregulation to mRNA-Specific Upregulation*. Int J Genomics, 2014. **2014**: p. 970607.
415. Chang, J., et al., *Liver-specific microRNA miR-122 enhances the replication of hepatitis C virus in nonhepatic cells*. J Virol, 2008. **82**(16): p. 8215-23.
416. Tsai, N.P., Y.L. Lin, and L.N. Wei, *MicroRNA mir-346 targets the 5'-untranslated region of receptor-interacting protein 140 (RIP140) mRNA and up-regulates its protein expression*. Biochem J, 2009. **424**(3): p. 411-8.
417. Kiriakidou, M., et al., *An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation*. Cell, 2007. **129**(6): p. 1141-51.
418. Petersen, C.P., et al., *Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells*. Mol Cell, 2006. **21**(4): p. 533-42.
419. Chendrimada, T.P., et al., *MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6*. Nature, 2007. **447**(7146): p. 823-8.
420. Maroney, P.A., et al., *Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells*. Nat Struct Mol Biol, 2006. **13**(12): p. 1102-7.

421. Wu, L., J. Fan, and J.G. Belasco, *MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(11): p. 4034-9.
422. Eulalio, A., et al., *P-body formation is a consequence, not the cause, of RNA-mediated gene silencing*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(11): p. 3970-81.
423. Liu, J., et al., *MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(7): p. 719-23.
424. Behm-Ansmant, I., et al., *mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes*. Genes Dev, 2006. **20**(14): p. 1885-98.
425. Jakymiw, A., et al., *Disruption of GW bodies impairs mammalian RNA interference*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(12): p. 1267-74.
426. Liu, J., et al., *A role for the P-body component GW182 in microRNA function*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(12): p. 1261-6.
427. van Kouwenhove, M., M. Kedde, and R. Agami, *MicroRNA regulation by RNA-binding proteins and its implications for cancer*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(9): p. 644-56.
428. Calin, G.A., et al., *Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(9): p. 2999-3004.
429. Zhang, B., et al., *microRNAs as oncogenes and tumor suppressors*. Dev Biol, 2007. **302**(1): p. 1-12.
430. Gattolliat, C.H., et al., *MicroRNA and targeted mRNA expression profiling analysis in human colorectal adenomas and adenocarcinomas*. Eur J Cancer, 2015. **51**(3): p. 409-20.
431. Asangani, I.A., et al., *MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer*. Oncogene, 2008. **27**(15): p. 2128-36.
432. Xiong, B., et al., *MiR-21 regulates biological behavior through the PTEN/PI-3K/Akt signaling pathway in human colorectal cancer cells*. Int J Oncol, 2013. **42**(1): p. 219-28.
433. Talotta, F., et al., *An autoregulatory loop mediated by miR-21 and PDCD4 controls the AP-1 activity in RAS transformation*. Oncogene, 2009. **28**(1): p. 73-84.
434. Zhang, Z., et al., *miR-21 plays a pivotal role in gastric cancer pathogenesis and progression*. Lab Invest, 2008. **88**(12): p. 1358-66.
435. Feng, Y.H., et al., *MicroRNA-21-mediated regulation of Sprouty2 protein expression enhances the cytotoxic effect of 5-fluorouracil and metformin in colon cancer cells*. Int J Mol Med, 2012. **29**(5): p. 920-6.
436. Valeri, N., et al., *MicroRNA-21 induces resistance to 5-fluorouracil by down-regulating human DNA MutS homolog 2 (hMSH2)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(49): p. 21098-103.
437. Shi, L., et al., *MiR-21 protected human glioblastoma U87MG cells from chemotherapeutic drug temozolomide induced apoptosis by decreasing Bax/Bcl-2 ratio and caspase-3 activity*. Brain Res, 2010. **1352**: p. 255-64.
438. Zhang, J., et al., *miR-21, miR-17 and miR-19a induced by phosphatase of regenerating liver-3 promote the proliferation and metastasis of colon cancer*. Br J Cancer, 2012. **107**(2): p. 352-9.
439. Niu, J., et al., *DNA damage induces NF-kappaB-dependent microRNA-21 up-regulation and promotes breast cancer cell invasion*. J Biol Chem, 2012. **287**(26): p. 21783-95.

440. Shin, V.Y., et al., *NF-kappaB targets miR-16 and miR-21 in gastric cancer: involvement of prostaglandin E receptors*. *Carcinogenesis*, 2011. **32**(2): p. 240-5.
441. Schetter, A.J., et al., *Association of inflammation-related and microRNA gene expression with cancer-specific mortality of colon adenocarcinoma*. *Clin Cancer Res*, 2009. **15**(18): p. 5878-87.
442. Iliopoulos, D., et al., *STAT3 activation of miR-21 and miR-181b-1 via PTEN and CYLD are part of the epigenetic switch linking inflammation to cancer*. *Mol Cell*, 2010. **39**(4): p. 493-506.
443. Toiyama, Y., et al., *Serum miR-21 as a diagnostic and prognostic biomarker in colorectal cancer*. *J Natl Cancer Inst*, 2013. **105**(12): p. 849-59.
444. Shi, C., et al., *Novel evidence for an oncogenic role of microRNA-21 in colitis-associated colorectal cancer*. *Gut*, 2015.
445. Sicard, F., et al., *Targeting miR-21 for the therapy of pancreatic cancer*. *Mol Ther*, 2013. **21**(5): p. 986-94.
446. Yan, L.X., et al., *Knockdown of miR-21 in human breast cancer cell lines inhibits proliferation, in vitro migration and in vivo tumor growth*. *Breast Cancer Res*, 2011. **13**(1): p. R2.
447. Martin del Campo, S.E., et al., *MiR-21 enhances melanoma invasiveness via inhibition of tissue inhibitor of metalloproteinases 3 expression: in vivo effects of MiR-21 inhibitor*. *PLoS One*, 2015. **10**(1): p. e0115919.
448. Schetter, A.J., H. Okayama, and C.C. Harris, *The role of microRNAs in colorectal cancer*. *Cancer J*, 2012. **18**(3): p. 244-52.
449. Akao, Y., Y. Nakagawa, and T. Naoe, *let-7 microRNA functions as a potential growth suppressor in human colon cancer cells*. *Biol Pharm Bull*, 2006. **29**(5): p. 903-6.
450. Johnson, C.D., et al., *The let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in human cells*. *Cancer Res*, 2007. **67**(16): p. 7713-22.
451. Viswanathan, S.R., et al., *Lin28 promotes transformation and is associated with advanced human malignancies*. *Nat Genet*, 2009. **41**(7): p. 843-8.
452. Michael, M.Z., et al., *Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia*. *Mol Cancer Res*, 2003. **1**(12): p. 882-91.
453. Chen, X., et al., *Role of miR-143 targeting KRAS in colorectal tumorigenesis*. *Oncogene*, 2009. **28**(10): p. 1385-92.
454. Clape, C., et al., *miR-143 interferes with ERK5 signaling, and abrogates prostate cancer progression in mice*. *PLoS One*, 2009. **4**(10): p. e7542.
455. Sachdeva, M., et al., *p53 represses c-Myc through induction of the tumor suppressor miR-145*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(9): p. 3207-12.
456. Gregersen, L.H., et al., *MicroRNA-145 targets YES and STAT1 in colon cancer cells*. *PLoS One*, 2010. **5**(1): p. e8836.
457. Guo, S.L., et al., *Akt-p53-miR-365-cyclin D1/cdc25A axis contributes to gastric tumorigenesis induced by PTEN deficiency*. *Nat Commun*, 2013. **4**: p. 2544.
458. Singh, R. and N. Saini, *Downregulation of BCL2 by miRNAs augments drug-induced apoptosis--a combined computational and experimental approach*. *J Cell Sci*, 2012. **125**(Pt 6): p. 1568-78.
459. Qi, Y., X. Li, and S. Zhao, *miR-29b inhibits the progression of esophageal squamous cell carcinoma by targeting MMP-2*. *Neoplasia*, 2015. **62**(3): p. 384-90.
460. Slaby, O., et al., *Altered expression of miR-21, miR-31, miR-143 and miR-145 is related to clinicopathologic features of colorectal cancer*. *Oncology*, 2007. **72**(5-6): p. 397-402.

461. Schetter, A.J., et al., *MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma*. JAMA, 2008. **299**(4): p. 425-36.
462. Shibuya, H., et al., *Clinicopathological and prognostic value of microRNA-21 and microRNA-155 in colorectal cancer*. Oncology, 2010. **79**(3-4): p. 313-20.
463. Cheng, H., et al., *Circulating plasma MiR-141 is a novel biomarker for metastatic colon cancer and predicts poor prognosis*. PLoS One, 2011. **6**(3): p. e17745.
464. Huang, Z., et al., *Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer*. Int J Cancer, 2010. **127**(1): p. 118-26.
465. Hofslis, E., et al., *Identification of serum microRNA profiles in colon cancer*. Br J Cancer, 2013. **108**(8): p. 1712-9.
466. Clarke, R.G., et al., *Effect of eicosapentaenoic acid on the proliferation and incidence of apoptosis in the colorectal cell line HT29*. Lipids, 1999. **34**(12): p. 1287-95.
467. Chen, Z.Y. and N.W. Istfan, *Docosahexaenoic acid is a potent inducer of apoptosis in HT-29 colon cancer cells*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2000. **63**(5): p. 301-8.
468. Llor, X., et al., *The effects of fish oil, olive oil, oleic acid and linoleic acid on colorectal neoplastic processes*. Clin Nutr, 2003. **22**(1): p. 71-9.
469. Reddy, B.S., *Omega-3 fatty acids in colorectal cancer prevention*. Int J Cancer, 2004. **112**(1): p. 1-7.
470. Bertazza, L. and S. Mocellin, *The dual role of tumor necrosis factor (TNF) in cancer biology*. Curr Med Chem, 2010. **17**(29): p. 3337-3352.
471. Klionsky, D.J. and P. Codogno, *The mechanism and physiological function of macroautophagy*. J Innate Immun, 2013. **5**(5): p. 427-33.
472. Kim, N., et al., *Docosahexaenoic Acid Induces Cell Death in Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells by Repressing mTOR via AMPK Activation and PI3K/Akt Inhibition*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 239764.
473. Shin, S., et al., *The omega-3 polyunsaturated fatty acid DHA induces simultaneous apoptosis and autophagy via mitochondrial ROS-mediated Akt-mTOR signaling in prostate cancer cells expressing mutant p53*. Biomed Res Int, 2013. **2013**: p. 568671.
474. Hetz, C., *The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(2): p. 89-102.
475. Fasano, E., et al., *DHA induces apoptosis by altering the expression and cellular location of GRP78 in colon cancer cell lines*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1822**(11): p. 1762-72.
476. Narayanan, B.A., et al., *Modulation of inducible nitric oxide synthase and related proinflammatory genes by the omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid in human colon cancer cells*. Cancer Res, 2003. **63**(5): p. 972-9.
477. Wang, T.M., et al., *Docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid reduce C-reactive protein expression and STAT3 activation in IL-6-treated HepG2 cells*. Mol Cell Biochem, 2013. **377**(1-2): p. 97-106.
478. Grau, R., et al., *Peroxisome-proliferator-activated receptor alpha agonists inhibit cyclo-oxygenase 2 and vascular endothelial growth factor transcriptional activation in human colorectal carcinoma cells via inhibition of activator protein-1*. Biochem J, 2006. **395**(1): p. 81-8.
479. Mandal, C.C., et al., *miR-21 is targeted by omega-3 polyunsaturated fatty acid to regulate breast tumor CSF-1 expression*. Carcinogenesis, 2012. **33**(10): p. 1897-908.

480. Christofferson, D.E., et al., *A novel role for RIP1 kinase in mediating TNFalpha production*. Cell Death Dis, 2012. **3**: p. e320.
481. Giros, A., et al., *Regulation of colorectal cancer cell apoptosis by the n-3 polyunsaturated fatty acids Docosahexaenoic and Eicosapentaenoic*. Cancer Prev Res (Phila), 2009. **2**(8): p. 732-42.
482. Balasa, B., et al., *Elotuzumab enhances natural killer cell activation and myeloma cell killing through interleukin-2 and TNF-alpha pathways*. Cancer Immunol Immunother, 2015. **64**(1): p. 61-73.
483. Finisguerra, V., et al., *MET is required for the recruitment of anti-tumoural neutrophils*. Nature, 2015. **522**(7556): p. 349-53.
484. Reuben, A., et al., *T lymphocyte-derived TNF and IFN-gamma repress HFE expression in cancer cells*. Mol Immunol, 2015. **65**(2): p. 259-66.
485. Bullock, M.D., et al., *Stratifying risk of recurrence in stage II colorectal cancer using deregulated stromal and epithelial microRNAs*. Oncotarget, 2015. **6**(9): p. 7262-79.
486. Challagundla, K.B., et al., *Exosome-mediated transfer of microRNAs within the tumor microenvironment and neuroblastoma resistance to chemotherapy*. J Natl Cancer Inst, 2015. **107**(7).
487. Fabbri, M., et al., *MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(31): p. E2110-6.
488. Patel, S.A. and N.J. Gooderham, *IL6 mediates immune and colorectal cancer cell crosstalk via miR-21 and miR-29b*. Mol Cancer Res, 2015.
489. Evans, J.M., et al., *Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients*. BMJ, 2005. **330**(7503): p. 1304-5.