



HAL
open science

Sensibilisation de l'adénocarcinome pancréatique canalaire à la chimiothérapie et à la radiothérapie par des molécules bioactives issues de l'alimentation

Véronique Buttiaux

► **To cite this version:**

Véronique Buttiaux. Sensibilisation de l'adénocarcinome pancréatique canalaire à la chimiothérapie et à la radiothérapie par des molécules bioactives issues de l'alimentation. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2018. Français. NNT : 2018BORD0332 . tel-01980609

HAL Id: tel-01980609

<https://theses.hal.science/tel-01980609>

Submitted on 14 Jan 2019

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.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE

L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

École doctorale Sciences de la Vie et de la Santé

Biologie cellulaire et physiopathologie

Par Véronique Vendrely

**Sensibilisation de l'adénocarcinome pancréatique canalaire à la
chimiothérapie et à la radiothérapie par des molécules bioactives
issues de l'alimentation**

Sous la direction de : Sandrine Dabernat

Soutenue le 12 Décembre 2018

Membres du jury :

Mme VARON, Christine	PUPH	Université de Bordeaux	Président
Mme BOUSQUET, Corinne	DR	INSERM, Toulouse	Rapporteur
M. BUSCAIL, Louis	PUPH	Université de Toulouse	Rapporteur
M. HENNEQUIN, Christophe	PUPH	Université Paris 7	Invité
Mme DABERNAT, Sandrine	PUPH	Université de Bordeaux	Examineur

Titre : Sensibilisation de l'adénocarcinome pancréatique canalaire à la chimiothérapie et à la radiothérapie par des molécules bioactives issues de l'alimentation

Contexte : L'adénocarcinome pancréatique canalaire (PDAC) est un cancer de mauvais pronostic en partie en raison de la résistance aux traitements conventionnels de chimiothérapie ou de radiothérapie. Certaines substances bioactives issues de l'alimentation (BFCs), pro-oxydantes sont capables de potentialiser l'action cytotoxique des drogues conventionnelles dans le PDAC. Par ailleurs ces BFCs pourraient augmenter les cassures de l'ADN induites par les radiations ionisantes. **Objectifs :** évaluer l'action combinée de BFCs en association avec la chimiothérapie et la radiothérapie dans des modèles de PDAC et identifier les mécanismes impliqués dans la chimio/radiosensibilisation. **Méthodes :** La survie cellulaire a été évaluée *in vitro* en présence de BFCs en combinaison sur 4 lignées tumorales pancréatiques. La production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) a été mesurée par cytométrie en flux et par microscopie à fluorescence. Les mécanismes moléculaires ont été décryptés par western-blot (voies de signalisation) et cytométrie en flux (cycle cellulaire et apoptose). Enfin nous avons évalué l'association de BFCs en gavage avec la chimiothérapie par gemcitabine intrapéritonéale et avec la radiothérapie de 2 Gy par fraction *in vivo*, sur des greffes sous-cutanée de cellules CAPAN-2. **Résultats :** *In vitro*, le resvératrol (R), la capsaïcine (C) et le sulforaphane (S) étaient cytotoxiques avec effet inhibiteur significativement plus élevé en combinaison (R+C), (C+S) ou (R+C+S), sans effet sur les fibroblastes. Par ailleurs, les combinaisons potentialisaient l'action autrement limitée de la gemcitabine sur les cellules testées *in vitro*. *In vivo*, l'addition de R+C au traitement par gemcitabine à dose réduite a permis une régression tumorale équivalente à celle obtenue avec la gemcitabine à pleine dose. Par ailleurs, *in vitro*, l'ajout des BFCs seuls et combinés à la radiothérapie augmente de façon significative la toxicité cellulaire sur la lignée épithéliale CAPAN-2, comparé au traitement par radiothérapie seule comme aux traitements par BFCs seuls ou combinés. *In vivo*, la combinaison R+C associée à la radiothérapie a permis une diminution significative des volumes tumoraux comparée à la radiothérapie seule. L'étude des voies de signalisation a montré une augmentation de protéines pro-apoptotiques avec l'association R+C, en rapport avec une induction augmentée de ROS, mais aussi, de façon surprenante, une inhibition de la réparation de l'ADN par inhibition de la phosphorylation d'ATM. Ces deux effets combinés précipitaient la mort des cellules tumorales. **Conclusions :** Les combinaisons de R+C ont un effet chimiosensibilisant et radiosensibilisant dans un modèle préclinique de PDAC, avec des mécanismes moléculaires identifiés pertinents dans le contexte des thérapies testées. En associant les BFCs, à la chimioradiothérapie avec gemcitabine, on peut espérer une double potentialisation de la radiothérapie et de la chimiothérapie, en augmentant l'efficacité de la RT, et en diminuant la dose de gemcitabine associée pour une même efficacité et une meilleure tolérance du traitement. **Mots clés :** Cancer du pancréas, Substances bioactives issues de l'alimentation, radiothérapie, chimiothérapie, resvératrol, capsaïcine

Titre : Pancreatic ductal adenocarcinoma sensitization to chemotherapy and radiotherapy by bioactive food components

Background: Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is of poor prognosis in part because of resistance to conventional treatments such as chemotherapy or radiotherapy. Some naturally occurring bioactive food components (BFCs), with pro-oxidant properties are able to potentiate the cytotoxic action of conventional drugs in the PDAC. In addition, these BFCs could increase the DNA breaks induced by ionizing radiation. **Objectives:** To evaluate the combined action of several BFCs in combination with chemotherapy and radiotherapy in PDAC models and to identify mechanisms involved in chemo / radiosensitization at the cellular and molecular levels. **Methods:** Cell survival was evaluated *in vitro* in the presence of BFCs in combination on 4 pancreatic tumor cell lines. The production of reactive oxygen species (ROS) was measured by flow cytometry and fluorescence microscopy. Molecular mechanisms have been decrypted by western blot (signaling pathways) and flow cytometry (cell cycle and apoptosis). Finally, we evaluated the association of BFCs in gavage with intraperitoneal gemcitabine chemotherapy and with radiotherapy (2 Gy/fraction) *in vivo*, on subcutaneous CAPAN-2 cell xenografts. **Results:** *In vitro*, resveratrol (R), capsaicin (C) and sulforaphane (S) were cytotoxic with significantly higher inhibitory effect in combination (R + C), (C + S) or (R + C + S), without effect on fibroblasts. In addition, the combinations potentiated the otherwise limited action of gemcitabine on cells tested *in vitro*. *In vivo*, the addition of R + C to treatment with gemcitabine at reduced dose allowed tumor inhibition equivalent to that obtained with gemcitabine at full dose. Furthermore, *in vitro*, the addition of BFCs alone and in combination with radiotherapy significantly increases cellular toxicity on the CAPAN-2 epithelial line, compared to radiotherapy alone and BFCs alone or combined. *In vivo*, the combination R + C associated with radiotherapy allowed a significant decrease in tumor volumes compared to radiotherapy alone. The study of signaling pathways showed an increase of pro-apoptotic proteins with the association R + C and radiotherapy, in relation with an increased induction of ROS, but also, surprisingly, an inhibition of the repair of the DNA by inhibition of ATM phosphorylation. These two combined effects precipitated the death of the tumor cells. **Conclusions:** Combinations of R + C have a chemosensitizing and radiosensitizing effect in a preclinical model of PDAC, with identified molecular mechanisms relevant in the context of the therapies tested. By combining BFCs with radiochemotherapy with gemcitabine, we can hope for a double potentiation of radiotherapy and chemotherapy, by increasing the effectiveness of RT, and by reducing the dose of gemcitabine associated for similar efficiency and better tolerance treatment.

Keywords : Pancreatic cancer, bioactive food components, radiotherapy, chemotherapy, resveratrol, capsaicin

BMGIC (Biothérapies des Maladies Génétiques, Inflammatoires et du Cancer)

INSERM U1035, Bâtiment TP 4è étage, 146 rue Léo Saignat
33076 BORDEAUX CEDEX

« Que ton alimentation soit ton médicament
et que ton médicament soit ta première médecine »

Hippocrate

Remerciements

J'adresse toute ma reconnaissance et mes remerciements à l'ensemble des personnes qui ont contribué, chacune à leur façon, à la réalisation de cette thèse de sciences :

Aux membres du jury de cette thèse, qui me font l'honneur de juger ce travail :

Madame Corinne Bousquet et Monsieur le Professeur Louis Buscail qui ont accepté le rôle de rapporteur, Madame le Professeur Christine Varon avec qui je vais avoir la chance de travailler au sein de la nouvelle équipe MIT et Monsieur le Professeur Christophe Hennequin, dont le parcours et l'expertise en radiothérapie sont un exemple pour moi.

A ma directrice de thèse, Madame le Professeur Sandrine Dabernat,

Merci de m'avoir accueillie et de m'avoir fait confiance dès 2014, merci de m'avoir encadrée pour ce travail avec rigueur et enthousiasme, merci pour ta disponibilité tout au long de cette aventure, même dans les mauvais moments et même enceinte jusqu'aux yeux ! Parce que cela a été quand même une sacrée aventure, on a traversé ensemble des moments tristes comme de vrais fous rires (indouche), des fuites sous l'orage, des diners à la maison, une semaine à Royan entre écriture d'article et bains de mer et enfin des choses improbables mais si heureuses. Finalement, dans la vie, les choses se passent rarement comme prévues, mais parfois c'est encore mieux ! Merci pour notre amitié. You rock !

A ma technicienne Isabelle Moranvilliers

Tu as été le pilier, celle qui assure la continuité dans les expériences alors que j'étais présente en discontinu. Merci pour ta bonne humeur et ton organisation, merci pour les aller-retours entre le laboratoire et le service de radiothérapie. Entre la culture cellulaire, les manipulations à l'animalerie et les western-blots, tu m'as tout appris. Bon, les dernières expériences montrent qu'il m'arrive encore de faire des bourdes sur les western-blot ! J'ai encore une marge de progression !

A mes étudiants en master 2, Samuel Amintas et Cécile Noël,

Merci à tous les deux d'avoir participé aux différents projets avec intérêt, bonne humeur et rigueur, et d'avoir essuyé mes premiers pas d'encadrante de master2. Cela a été et cela sera encore un plaisir de travailler avec vous. Et puis, Cécile, je suis tellement fière de toi !

Merci à toute l'équipe Biothérapie et à son directeur le Professeur François Moreau-Gaudry pour son accueil au sein de cette équipe, sa bienveillance et ses idées pertinentes. Un merci particulier à Aurélie Bedel pour son analyse critique et ses remarques constructives. Merci à Etienne, Olivier, Julian, Grégoire, Julie et Isabelle L , merci à Katia Obama pour son aide précieuse et son organisation, cette équipe est formidable !

.Merci à l'équipe de Jean-Michel Mérillon à l'ISVV et particulièrement à Stéphanie Krisa pour les BFCs

Tout ceci n'aurait pas été possible sans une réorganisation et une diminution de mon activité clinique pour me permettre de travailler au laboratoire :

A mon chef de service le docteur Renaud Trouette :

Merci de m'avoir fait confiance dans ce projet qui ne paraissait pas vraiment raisonnable et de m'avoir laissé la liberté de m'organiser comme je le souhaitais.

Merci à mes collègues, Aymeri, Thibaud et Nora qui ont pris le relais et qui m'ont encouragée. Un merci particulier à Charles qui s'est intéressé à ce travail et dont le regard critique a beaucoup apporté, merci de rejoindre l'équipe pour que nous puissions continuer ces projets de recherche fondamentale en radiothérapie.

Merci à mes internes qui ont vraiment assuré : Thomas, Maëlle, Mario et Claudia, je vous dois d'avoir pu travailler au laboratoire sereinement, en sachant que vous assuriez la continuité auprès des patients. Je vous dois beaucoup.

Merci à Catherine, Laura, Julie, Sarah et surtout Soulé et Benoît pour leur travail sur les dosimétries d'irradiation de cellules et de souris, et leur disponibilité pour mes travaux de recherche.

Merci à Hélène Demeaux qui a pris régulièrement de mes nouvelles.

Merci à Alain Ravaud et Guy Kantor pour leurs conseils.

A ma famille,

Merci avant tout à Benoît,

Je t'ai embarqué dans une aventure que tu n'as pas choisie mais qui a des conséquences pour nous tous. Que ce soit pour l'intendance que tu as géré souvent seul particulièrement l'année dernière, ou pour la hotline word (tables des matières et figures sur lesquelles je m'arrachais les cheveux), merci pour ton soutien indéfectible. Note quand même qu'après 23 ans de mariage, tu as la chance d'être avec une étudiante...

Merci à mes fils et neveu : entre Thibaud qui préparait les concours des grandes écoles d'ingénieur, Gabin en première année de médecine, et moi-même, l'ambiance était studieuse à la maison !

Merci à Tristan et Martin, pour qui je n'ai pas été très disponible, de ne pas m'en tenir rigueur et de m'encourager par un mot gentil ou un doudou déposé sur mon bureau pour me tenir compagnie quand je travaillais tard le soir.

Merci à mes frères et à mes parents pour leur soutien

Merci aux amis que j'ai peu vus mais qui ont continué à m'envoyer des messages d'encouragement et d'amitié, je pense particulièrement à Karine et Lilian, Anne-Sophie et Christophe, Nathalie et Ram, Vanessa, Anne, Claude, Corinne, Cathy et Christian, Daniel et Astrid, Pascale et mes amies les mirettes.

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
AMP	Adénosine mono-phosphate
ARN	Acide ribonucléique
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3 related
BER	Base excision repair
BFCs	Bioactive Food Components (Nutriments bioactifs de l'alimentation)
BR	Résecable Borderline
BRCA	Breast cancer associated protein
C ou CAP	Capsaïcine
CDB	Cassure double-brin
CDK	Cyclin-dependent kinase
Chk 1/2	Checkpoint kinase 1/2
COX	Cyclooxygénase
CRT	Chimioradiothérapie
CDB	Cassure double-brin
CSB	Cassure simple-brin
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phénylindole
DNA-PK	DNA-dependent protein kinase
DNA-PKcs	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ERK	Extracellular Signal Regulated Kinase
FACS	Fluorescent Activated Cell Sorter
GTP	Guanine triphosphate
HDAC	Histone Déacétylase
hENT1	human Equilibrative Nucleoside Transporter
IGF	Insulin Growth Factor

Jak	Janus tyrosine kinase
JNK	c-jun N-terminal Kinase
LA	Localement avancé
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MEK	MAPK/ERK kinase
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
NER	Nucleotide excision repair
NFκB	Nuclear factor κB
NHEJ	Non Homologous End Joining
PAR	Poly(ADP-ribose)
PARP	Poly(ADP-ribose) polymérase
PDAC	Adénocarcinome canalaire pancréatique
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
R ou RV	Resvératrol
RI	Radiations ionisantes
RH	Recombinaison homologue
ROS	Reactive oxygen species
RT	Radiothérapie
SBRT	Radiothérapie stéréotaxique extra-crânienne
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TCR	Transcription-coupled repair
TEL	Transfert d'énergie linéaire
TGF	Transforming Growth Factor
TK	Tyrosine kinase
TKI	Inhibiteur de tyrosine kinase
TS	Thymidylate synthase
XP	Xeroderma pigmentosum
5-FU	5-fluorouracile

Table des matières

Objectifs de la thèse	9
I. Introduction	11
I.A. L'adénocarcinome canalaire du pancréas	13
I.A.1. Généralités cliniques	13
I.A.1.a. Epidémiologie	13
I.A.1.b. Diagnostic	14
I.A.1.c. Principes du traitement	14
(1) Chirurgie	15
(2) Chimiothérapie	16
(3) Thérapies ciblées	17
(4) Radiothérapie	18
I.A.2. Caractéristiques biologiques	19
I.B. La chimiothérapie des cancers du pancréas	22
I.B.1. Les chimiothérapies conventionnelles et leurs effets biologiques	22
I.B.2. Nouveaux médicaments : thérapies ciblées et chimiothérapies liposomales	23
I.C. La radiothérapie	24
I.C.1. Les différents types de rayonnements ionisants	24
I.C.1.a. Les rayonnements électromagnétiques	24
I.C.1.b. Les rayonnements particuliers	25
I.C.2. Les effets chimiques et biologiques des RI	27
I.C.2.a. Les effets chimiques	27
I.C.2.b. Les dommages à l'ADN	28
I.C.2.C. Les effets cellulaires	28
I.D. Les différents types de mort cellulaire	30
I.D.1. Apoptose	30
I.D.2. Autophagie	30
I.D.3. Nécrose, nécroptose	30
I.D.4. Catastrophe mitotique	31
I.D.5. Sénescence	31
I.E. Les mécanismes de réparation de l'ADN	31
I.E.1. La réparation des cassures simple brin	31
I.E.2. La réparation des cassures double-brin de l'ADN (CDB)	32
I.F. Les substances bioactives issues de l'alimentation (BFCs)	35

I.F.1. Généralités.....	35
I.F.2. Les différentes familles de BFCs phytochimiques.....	35
(1) Les alcaloïdes.....	36
(2) Les terpènes.....	36
(3) Les polyphénols.....	36
(4) Les hétérosides.....	37
I.F.3. BFCs, cancers et chimiosensibilisation.....	39
I.F.3.a. Resvératrol et polyphénols.....	39
I.F.3.b. Capsaïcine (alcaloïdes).....	40
I.F.4.c. Sulforaphane et isothiocyanates.....	40
I.F.4. Biodisponibilité.....	40
I.F.5. Effets chemopréventifs.....	42
I.F.6. BFCs et radiothérapie.....	43
I.F.6.a. Radiosensibilisation.....	43
(1) Radiosensibilisation <i>in vitro</i>	43
(2) Radiosensibilisation <i>in vivo</i>	46
(3) Mécanismes impliqués dans la radiosensibilisation.....	48
I.F.6.b. Effets antioxydant et radioprotecteur.....	53
I.F.6.c. Effet différentiel entre cellules tumorales et cellules saines.....	54
I.F.7. BFCs en essai clinique.....	55
II. Chimiosensibilisation de l'adénocarcinome pancréatique par les BFCs.....	57
III. Radiosensibilisation de l'adénocarcinome pancréatique par les BFCs.....	71
IV. Résultats non publiés : Recherche d'autres radiosensibilisants : analogues du resveratrol et inhibiteurs de HDAC.....	99
IV.A. Introduction.....	101
IV.B. Matériels et méthodes.....	103
IV.B.1. Matériels :.....	103
(1) Lignées cellulaires utilisées :.....	103
(2) Agents radiosensibilisants potentiels :.....	104
IV.B.2. Méthodes :.....	104
(3) Culture cellulaire.....	104
(4) Irradiation.....	104
(5) Test de survie cellulaire <i>in vitro</i> (MTT).....	104
(6) Modèle préclinique sur souris xéno greffées.....	105

(7) Tests statistiques	105
IV.C. Résultats/discussion	105
(1) Détermination des IC50 des analogues du resvératrol	105
(2) Comparaison de l'effet cytotoxique de l'épsilon-viniferine et du resvératrol	107
(3) Effet cytotoxique de la combinaison de BFCs et d'inhibiteurs de HDAC.....	108
(4) Radiosensibilisation <i>in vitro</i> par HDACi et BFCs	111
(5) Association de BFCs et d'HDACi <i>in vivo</i>	112
IV.D. Conclusion	113
V. Discussion générale et perspectives.....	115
VI. Références	123

Table des illustrations

Figure 1 : Apparition des mutations des gènes clés KRAS, CDKN2A, SMAD4 et TP53 au cours de l'oncogénèse des PDAC _____	21
Figure 2 : Diffusion de la dose en fonction de l'épaisseur de tissu traversé par différents types de rayonnements _____	26
Figure 3 : effets directs et indirects (radiolyse de l'eau) induits par les RI _____	28
Figure 4 : Dommages à l'ADN induits par les RI _____	29
Figure 5 : Echelle de temps des effets des rayonnements ionisants _____	29
Figure 6 : Schéma des voies de réparation mises en jeu par les cassures double brin de l'ADN induites par l'irradiation _____	34
Figure 7 : Résumé du devenir des glucosinolates et de leurs produits de dégradation dans l'intestin humain _____	42
Figure 8 : Schéma récapitulatif des principaux mécanismes identifiés dans la radiosensibilisation par les BFCs _____	52
Figure 9 : Dommages cellulaires liés à l'irradiation et mécanismes de protection induits par les BFCs _____	54
Figure 10 : Modèle d'intervention des HDAC dans la réparation de dommages à l'ADN et intervention des HDACi _____	103
Figure 11 : Détermination des IC50 des analogues du resvératrol sur la lignée cellulaire pancréatique CAPAN-2 _____	106
Figure 12 : Comparaison de l'effet cytotoxique de l'épsilon-viniférine par rapport à celui du resvératrol, en association à la capsaïcine, sur les cellules CAPAN-2. _____	107
Figure 13 : Détermination des IC50 de l'acide valproïque (AV) et du sodium butyrate (NB) sur les lignées cellulaire pancréatique tumorales CAPAN-2, PANC-1, MIA-PaCa-2 et saines HPNE _____	108
Figure 14 : Effet cytotoxique de l'acide valproïque, en association avec le resvératrol, l'épsilon-viniférine et la capsaïcine sur les cellules CAPAN-2. _____	109
Figure 15 : Effet cytotoxique du butyrate de sodium, en association avec le resvératrol, l'épsilon-viniférine et la capsaïcine sur les cellules CAPAN-2 _____	110
Figure 16 Effet cytotoxique des BFCs et de l'acide valproïque seuls ou en combinaison, en association avec la radiothérapie sur la lignée cellulaire CAPAN-2 _____	111
Figure 17 : Effet de l'association de BFCs et d'acide valproïque sur un modèle préclinique de tumeurs pancréatiques _____	113

Table des tableaux

<i>Tableau 1 : Classification TNM selon l'AJCC.....</i>	<i>14</i>
<i>Tableau 2: Résécabilité des adénocarcinomes pancréatiques selon la classification NCCN2018.....</i>	<i>15</i>
<i>Tableau 3 : Familles de métabolites secondaires avec les principales substances bioactives issues de l'alimentation ainsi que des métabolites développés comme médicaments (non exhaustif).....</i>	<i>38</i>
<i>Tableau 4 : Radiosensibilisation par les BFCs in vitro et mécanismes impliqués</i>	<i>44</i>
<i>Tableau 5 : Radiosensibilisation par les BFCs in vivo et mécanismes impliqués</i>	<i>47</i>
<i>Tableau 6 : Caractérisation des stilbènes étudiés</i>	<i>101</i>

Objectifs de la thèse

Les liens entre alimentation et santé sont connus depuis l'antiquité. Des débats plus récents autour du « French Paradox » (1) aux polémiques sur la nourriture ultra-transformée, il ne se passe pas un jour où ces liens ne soient commentés à la une de l'actualité, témoignant d'une préoccupation croissante de la population et d'un enjeu sociétal. De nouvelles disciplines ont vu le jour : la nutriginomique étudie la façon dont notre alimentation module l'expression de nos gènes (épigénétique) alors que la nutriginétique s'intéresse à l'influence de notre génotype sur la nutrition (2).

L'incidence des cancers est en augmentation constante depuis 25 ans dans tous les pays. Cette évolution est non seulement liée à l'essor démographique, au vieillissement de la population et au développement des capacités de diagnostic ou de dépistage, mais elle résulte probablement aussi d'expositions accrues à des facteurs de risque de cancers, comportementaux ou environnementaux. Parmi eux, le rôle de la nutrition est désormais reconnu. En France le Plan National Nutrition et Santé, plan de santé publique lancé en 2001, publie une synthèse des connaissances les plus récentes sur les liens entre nutrition et cancer ainsi que des recommandations nutritionnelles en partenariat avec le réseau National Alimentation Cancer Recherche (NACRe)(3). Une alimentation riche en graisses saturées et en protéines animales, pauvre en fruits et légumes est associée à un risque accru de cancers. A l'inverse, un régime pauvre en alcool, en viandes et en graisses animales, riche en fruits et légumes, associé à une activité physique est considéré comme protecteur (3). Dans ce contexte, les chercheurs s'intéressent aux nutriments bioactifs de l'alimentation (BFCs, Bioactive Food Components) qui pourraient expliquer un effet préventif ou thérapeutique vis-à-vis des cancers. Ces molécules qui font partie de métabolites secondaires sont nombreuses (de l'ordre de 25000) et ont montré des effets antioxydants, anti-inflammatoires et antiprolifératifs potentiellement préventifs ou thérapeutiques sur de multiples cancers (2).

Parmi les cancers dont le pronostic reste redoutable, l'adénocarcinome pancréatique canalaire (PDAC) est associé à une survie globale à 5 ans inférieure à 10%, tous stades confondus (4). Ce pronostic catastrophique s'explique à la fois par un diagnostic tardif et par une résistance aux traitements conventionnels que sont la chimiothérapie et la radiothérapie. Les résultats des traitements conventionnels comme des nouveaux traitements (thérapies ciblées) restent décevants, de par la grande capacité des cellules tumorales pancréatiques à résister à la mort cellulaire. Un mode de sensibilisation pourrait consister en l'augmentation intracellulaire d'espèces réactives de l'oxygène (ROS, Reactive Oxygen Species) menant à une altération globale des fonctions cellulaires,

létale. Parmi les composés testés au cours des dernières années, un nombre croissant de molécules d'origine naturelle pro-oxydantes a été évalué, en particulier celles issues de l'alimentation. Dans le cas de l'adénocarcinome pancréatique, certaines de ces molécules sont capables de potentialiser l'action cytotoxique des drogues conventionnelles (5,6). Au début de notre travail, aucune étude n'avait évalué différents BFCs en combinaison dans le traitement du cancer du pancréas. De plus, l'association à la radiothérapie n'avait pas été explorée.

Les objectifs de ce travail sont de tester de nouveaux chimio et radiosensibilisants dans des modèles de PDAC et identifier les mécanismes directement impliqués dans la chimio/radiosensibilisation.

Notre projet proposait d'évaluer l'action combinée de BFCs en les sélectionnant selon plusieurs critères : un effet toxique et sélectif sur des cellules d'adénocarcinomes pancréatiques, une action inductrice de la mort cellulaire en agissant par l'intermédiaire de voies différentes, une action synergique ou additive avec la radiothérapie et la chimiothérapie. Dans un premier temps, nous avons évalué l'association de BFCs en association à la chimiothérapie par gemcitabine sur le cancer du pancréas, projet déjà en cours lors de mon arrivée au laboratoire et auquel j'ai été associée dès 2014. Ce travail a donné lieu au premier article que j'ai cosigné en premier auteur avec le Dr Evelyne Peuchant. Puis, dès 2015, le projet s'est orienté vers la sensibilisation de la radiothérapie, qui prenait tout son sens compte tenu de ma spécialité d'oncologue radiothérapeute. L'association de combinaisons avec la radiothérapie a été évaluée parce-que les BFCs pouvaient augmenter, par l'intermédiaire de ROS produits, les cassures de l'ADN induites par les radiations ionisantes (RI). Ce second travail m'a amené à mettre l'accent dans cette thèse sur les mécanismes de radiosensibilisation et de radioprotection attribués aux BFCs. Il a fait l'objet d'un second article en cours de soumission à Cancer Letters. Enfin, nous avons testé des combinaisons d'inhibiteurs d'histone-déacétylases et de ces BFCs avec plusieurs nouvelles molécules candidates dans le cadre d'une collaboration débutée à l'occasion de mon master Nutrition Humaine et Santé, avec l'équipe de Jean-Michel Mérillon (Institut des Sciences de la Vigne et du Vin).

I. Introduction

I.A. L'adénocarcinome canalaire du pancréas

I.A.1. Généralités cliniques

I.A.1.a. Epidémiologie

L'adénocarcinome canalaire du pancréas représente 90 % des tumeurs pancréatiques, il représente la 4^{ème} cause de décès par cancer en Europe et on estime qu'il sera la 2^{ème} à un horizon 2020-2030 (7). Son incidence a doublé chez les hommes et triplé chez les femmes entre 1982 et 2012 en France (8). Son pronostic reste catastrophique avec une survie globale à 5 ans de l'ordre de 7-8 % tous stades confondu (4).

Trois facteurs de risque sont bien identifiés:

- Tabagisme : le risque relatif est de 1,74 (95% CI : 1,61-1,87) pour les fumeurs actifs et de 1,2 (95% CI : 1,11-1,29) pour les fumeurs sevrés. Le risque diminue de moitié après 2 ans de sevrage (9).
- Obésité : le surpoids (BMI entre 25 et 30) ou l'obésité (BMI supérieur à 30) sont associés à un risque relatif augmenté de cancer pancréatique de 1,67 [IC 95% : 1,20-2,34] et de 2,58 [IC95% : 1,70-3,90] respectivement, indépendamment de la présence d'un diabète (10).
- les prédispositions génétiques représentent 5 à 10 % des cas (11), incluant des formes familiales et des syndromes génétiques identifiés comme les mutations de BRCA1-2, le syndrome de Peutz-Jeghers mais également le syndrome de Lynch ou la polypose adénomateuse familiale (12).

D'autres facteurs sont incriminés avec des niveaux de preuve moins forts : ainsi, une alimentation riche en graisses et viandes, et pauvres en fibres, ainsi que la sédentarité pourraient favoriser la survenue du cancer du pancréas (3). Par ailleurs, le diabète est associé au cancer du pancréas puisque un tiers des patients porteurs de cancer du pancréas ont un diabète, sans que l'on puisse préciser si le diabète est en cause dans la survenue du cancer (par hyperinsulinisme) ou l'inverse (13).

Enfin, certaines tumeurs sont secondaires à la transformation de tumeurs intra-canales papillaires et mucineuses (TIPMP) ou cystadénomes mucineux.

I.A.1.b. Diagnostic

La présentation clinique dépend de la localisation de la tumeur et de son extension : un ictère est classiquement révélateur d'une tumeur de la tête du pancréas, un diagnostic de diabète peut également être révélateur (14). Enfin un syndrome douloureux solaire est généralement associé à une tumeur localement évoluée avec envahissement coeliaque (15).

Le diagnostic repose sur l'examen histologique obtenu le plus souvent par biopsie de la tumeur sous échographie. Le bilan d'extension (scanner complet, IRM de diffusion à la recherche de métastases hépatiques) et le dosage de Ca19-9 font partie du bilan initial, permettant de définir le stade tumoral selon la classification TNM (tableau 1) ainsi que l'envahissement vasculaire selon la classification NCCN (tableau 2), base de la discussion de la stratégie thérapeutique (16).

Tableau 1 : Classification TNM selon l'AJCC

Table 1 TNM pancreatic cancer staging (AJCC)	
Stage	Definition
Primary tumor (T)	
T0	No evidence of primary tumor
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	Tumor limited to pancreas, ≤2 cm
T2	Tumor limited to pancreas, >2 cm
T3	Extension into peripancreatic tissues (excluding arteries)
T4	Tumor involves celiac axis or superior mesenteric artery
Regional lymph nodes (N)	
Nx	Regional lymph nodes not assessed
N0	No metastatic regional lymph nodes
N1	Metastatic regional lymph nodes
Distant metastasis (M)	
M0	No distant metastatic disease
M1	Distant metastatic disease

AJCC, American Joint Committee on Cancer.

I.A.1.c. Principes du traitement

La stratégie thérapeutique est décidée en réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP) avec la participation de chirurgiens, gastro-entérologues, oncologues médicaux, radiothérapeutes, radiologues, médecins nucléaires et anatomopathologistes. La stratégie dépend du bilan d'extension général de la maladie et de l'analyse des rapports vasculaires, permettant de définir la résecabilité(17). Dans la classification américaine NCCN, communément utilisée, une tumeur est classée comme borderline (BR) dès qu'il existe une atteinte veineuse avec irrégularité de contours,

ou supérieur à 180° ou en cas de contact artériel inférieur à 180° au niveau de l'artère mésentérique supérieure ou du tronc coeliaque. Elle est classée comme localement avancée (LA) en cas de contact artériel supérieur à 180° ou d'atteinte veineuse non réparable (tableau 2) (18).

Tableau 2: Résécabilité des adénocarcinomes pancréatiques selon la classification NCCN2018

Résécabilité	Artérielle	Veineuse
Résécable	Absence de contact tumoral artériel (tronc coeliaque [TC], artère mésentérique supérieure [AMS] ou artère hépatique commune [AHC])	Absence de contact tumoral avec la veine mésentérique supérieure (VMS) ou la veine porte (VP) ou contact $\leq 180^\circ$ sans irrégularité du contour veineux
Borderline	<p><u>Tumeur de la tête pancréatique/processus unciné:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Contact tumoral solide avec l'AHC sans extension au TC ou à la bifurcation de l'artère hépatique permettant une résection et une reconstruction complètes • Contact tumoral solide avec l'AMS $\leq 180^\circ$ • Contact tumoral solide avec une variante anatomique artérielle <p><u>Corps et queue du pancréas:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Contact tumoral solide $\leq 180^\circ$ avec le TC • Contact tumoral solide $> 180^\circ$ avec le TC sans atteinte de l'aorte et avec artère gastroduodénale intacte et non atteinte, permettant ainsi une procédure Appleby modifiée 	<ul style="list-style-type: none"> • Contact tumoral solide avec la VMS ou la VP $> 180^\circ$, contact $\leq 180^\circ$ avec irrégularité du contour de la veine ou thrombose veineuse mais permettant une résection et une reconstruction veineuses complètes • Contact tumoral solide avec la veine cave inférieure (VCI)
Non résécable	<ul style="list-style-type: none"> • Métastases à distance (incluant les métastases ganglionnaires non-régionales) <p><u>Tête/processus unciné:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Contact tumoral solide avec l'AMS $> 180^\circ$ • Contact tumoral solide $> 180^\circ$ avec le TC <p><u>Corps et queue:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Contact tumoral solide $> 180^\circ$ avec l'AMS ou le TC • Contact tumoral solide avec le TC avec atteinte aortique 	<p><u>Tête/processus unciné:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • VMS/VP non reconstructibles du fait de l'atteinte tumorale ou par thrombose • Contact avec la branche jéjunale de drainage la plus proximale de la VMS <p><u>Corps et queue:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • VMS/VP non reconstructibles du fait de l'atteinte tumorale ou par thrombose

(1) Chirurgie

Seule la résection chirurgicale complète, R0, permet une survie globale et sans récurrence prolongée, avec un espoir de guérison (19). Il s'agit d'une chirurgie morbide à réserver aux patients en bon état général sans dénutrition importante. Elle doit être réalisée par des chirurgiens entraînés ; il a été montré que le taux de résection R1 est plus important dans des centres à petit volume de chirurgie pancréatique (25,9% versus 22,6%, $p < 0.0001$; odd ratio 1,21; IC95% : 1,01-1,43) (20). Elle consiste

en une exérèse complète de la tumeur associée à un curage ganglionnaire élargi, avec exérèse de la lame rétroporte. Elle peut nécessiter des résections veineuses, techniquement réalisables en cas d'envahissement limité, mais associées à un pronostic inférieur, même en cas de résection complète R0 (21).

La pièce de résection est orientée par le chirurgien avec identification des limites de résection pour permettre l'examen anatomo-pathologique et le classement en résection complète R0, incomplète microscopique R1 ou macroscopique R2 (22).

(2) Chimiothérapie

La chimiothérapie est indiquée dès que la tumeur n'est pas résécable. Elle repose sur 4 types de molécules : le 5-Fluoro-Uracile (5FU), la gemcitabine (G), l'irinotécan et les sels de platine (cisplatine, oxaliplatine).

En cas de tumeur métastatique, une chimiothérapie par Folfirinox (5FU + Irinotecan + Oxaliplatine) est recommandée sous réserve de l'absence de contre-indications et de l'état général du patient. Selon l'essai randomisé Prodigé 4/ ACCORD 11, le folfirinox améliore la qualité de vie et augmente la survie globale (11,5 versus 6,8 mois, $P < 0.001$) comparativement à la gemcitabine (23).

En traitement adjuvant, la chimiothérapie recommandée jusqu'en 2018 reposait sur la gemcitabine pendant une durée de 6 mois depuis l'étude Conko-001 avec une amélioration de la survie globale comparativement à un groupe observationnel (survie à 5 ans de 20,7% versus 10,4% ; survie à 10 ans de 12,2% versus 7,7%) (24). La méta-analyse de Stocken et al qui regroupe 5 études avec 875 patients a confirmé le bénéfice en survie globale avec la chimiothérapie adjuvante : 19 versus 13.5 mois (HR = 0,75, IC95% : 0,64-0,90, $p = 0,001$)(25) . Il en est de même pour l'essai ESPAC-1 qui montre la supériorité du 5FU en adjuvant comparé à une absence de chimiothérapie avec une amélioration significative de la survie à 5 ans (21% vs 8%, $p=0,009$)(26). L'essai ESPAC-3 a comparé chez 1088 patient une chimiothérapie adjuvante par FUFOL (association de 5FU et d'acide folinique) pendant 6 mois à six cycles de gemcitabine administrée selon le schéma de Burris (27). La survie globale était identique dans les deux bras (23 mois dans le bras FUFOL versus 23,6 mois dans le bras gemcitabine, $p = 0,39$). La tolérance était meilleure dans le bras gemcitabine. Plus récemment, l'essai randomisé de phase 3 ESPAC-4, comparant une chimiothérapie adjuvante par gemcitabine à une association de gemcitabine et de capécitabine, a montré un bénéfice en survie globale (28 versus 25,5 mois ; HR=0.82 [95% CI : 0,68–0,98]) en faveur de l'association gemcitabine et capécitabine (28). Enfin les résultats de l'essai PRODIGE 24 présentés à l'ASCO 2018 montrent qu'une

chimiothérapie adjuvante par folfirinox (12 cycles) permet de quasiment doubler la probabilité de survie sans récurrence à 3 ans (39,7 % versus 21,4 % ; HR=0,58 [95%CI: 0,46-0,73], p < 0,0001) comparée à la chimiothérapie adjuvante par gemcitabine (6 cycles) après résection R0 ou R1. Cette étude franco-canadienne de phase 3, qui a inclus 493 patients retrouvait également un bénéfice en termes de survie globale (54,4 versus 35 mois de survie médiane) et de survie sans métastase (30,4 versus 17 mois) en faveur du bras folfirinox, au prix néanmoins d'une toxicité plus importante (diarrhée, neuropathie) (29). Pour les tumeurs localement évoluées non résécables, le folfirinox a été utilisé en analogie avec les formes métastatiques et permet dans 20 à 30 % des cas une résection chirurgicale secondaire (30,31).

De nouvelles molécules sont actuellement utilisées dans le traitement de l'adénocarcinome pancréatique comme le Nab-Paclitaxel qui a montré, dans l'étude de phase III MPACT une augmentation de la survie globale et de la survie sans progression associée à la gemcitabine comparée à la gemcitabine seule (45). L'association gemcitabine et nab-paclitaxel n'a pas été comparée au folfirinox.

L'irinotecan liposomal, le nal-IRI (MM-398) en association au LV5FU2 (association de 5-FU et d'acide folinique) a également montré une augmentation de la survie globale (6,1 versus 4,2 mois) comparée au LV5FU2 seul dans l'essai randomisé de phase 3 NAPOLI-1 en seconde ligne métastatique (46).

(3) **Thérapies ciblées**

L'erlotinib (molécule anti-EGFR) a montré dans une étude de phase III, une augmentation significative mais modeste (2 semaines) de la survie globale associée à de la gemcitabine dans les cancers du pancréas métastatiques (47). De plus, il n'a pas fait la preuve de son efficacité dans l'essai LAP07 (cancers localement avancés) et n'est pas indiqué que ce soit pour les tumeurs localement avancées ou métastatiques(32). L'olaparib (molécule anti-PARP1) fait également l'objet actuellement d'une étude de phase III, l'étude POLO, qui évalue l'intérêt de cette molécule dans les cancers du pancréas métastatiques avec mutation germinale du gène BRCA, en traitement d'entretien contre placebo (NCT02184195). A ce jour, les thérapies ciblées dans le cancer du pancréas ont encore une action limitée et décevante.

(4) Radiothérapie

(a) Chimioradiothérapie

La place de la radiothérapie dans le traitement des adénocarcinomes pancréatiques reste controversée.

Les années 1980 ont vu l'apparition des premières associations de chimioradiothérapie (CRT), qui reste indiquée en adjuvant aux Etats-Unis depuis le premier essai randomisé du Gastrointestinal Tumor Study Group (GITSG) (33). L'essai de l'European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) n'est pas venu confirmer le bénéfice de l'association CRT adjuvante (34). Quant à l'essai ESPAC-1, il concluait à une survie moins bonne chez les patients ayant reçu une CRT en comparaison avec ceux n'en ayant pas reçu (15,9 mois versus 17,9 mois ; $p=0,05$) (26). Enfin, l'essai de phase II randomisé mené par l'EORTC, la Fédération Francophone de Cancérologie Digestive (FFCD) et le GERCOR, a montré des résultats de survie identiques entre un traitement adjuvant par une chimiothérapie à base de gemcitabine et deux cycles de gemcitabine suivis d'une chimioradiothérapie avec gemcitabine concomitante chez des patients R0 (32). La survie sans progression et la survie globale étaient identiques dans les deux bras.

La CRT est discutée après chimiothérapie pour les tumeurs localement évoluées. Dans l'essai de phase 3 randomisé LAP-07, l'apport de la CRT (radiothérapie à la dose de 54Gy avec capecitabine concomitante) versus chimiothérapie seule (2 mois de Gemcitabine) a été évalué chez des patients présentant un cancer du pancréas localement avancé stable après 4 mois de monothérapie par gemcitabine. Même si la CRT n'a pas montré de supériorité comparée à la chimiothérapie en terme de survie globale, elle a cependant permis une diminution de la progression locale (32% versus 46%, $p=0,03$) et une augmentation du temps sans traitement (6.1 versus 3.7 mois, $p=0,02$), dans un contexte où la qualité de vie est essentielle (32). De nombreuses équipes ont rapporté leur expérience d'utilisation du folfirinox pour les patients ayant des cancers du pancréas LA ou BR dans des séries rétrospectives. Dans la méta-analyse publiée par Suker et al en 2016, 13 études incluant 689 patients (dont 52% LA) traités par folfirinox ont été analysées (30). Pour les patients avec une tumeur LA traitée par folfirinox, la survie médiane était de 24,2 mois. Parmi ces patients, 57% avaient également reçu une chimioradiothérapie. Le taux de résection secondaire était de 26%, comparés à 33 % dans la méta-analyse de Gillen (35). Ainsi une stratégie associant chimiothérapie d'inductions suivie de chimioradiothérapie pourrait rendre résécable des tumeurs considérées initialement non résécables. De façon intéressante, il est montré que les patients qui ont pu bénéficier d'une résection secondaire ont un meilleur pronostic, comparable à celui des patients opérés d'emblée (36). De même, 10 à 15 % des patients présentent une réponse complète ou sub-complète associée à un bon pronostic (31).

L'intérêt de la radiothérapie en néoadjuvant est également discuté chez les patients classés résécables borderline, pour lesquels l'enjeu est l'obtention d'une résection complète R0. En effet, même si ces tumeurs sont techniquement résécables, le risque de résection microscopiquement incomplète (R1) est élevé, variant de 23 à 63 % en particulier en cas de résection veineuse(37). Par ailleurs un traitement néoadjuvant permettrait de sélectionner les bons candidats à la chirurgie, c'est-à-dire les patients dont la maladie n'évolue pas rapidement sous forme métastatique. Dans la méta-analyse de Pétrelli, un traitement néoadjuvant permettait un taux de résection secondaire de 68 % pour les cancer du pancréas borderline (38). En France, l'essai prospectif de phase 2 PANDAS-PRODIGE 44 (NCT02676349) compare une chimioradiothérapie néoadjuvante après chimiothérapie (Folfirinox) à la chimiothérapie néoadjuvante avant chirurgie. L'objectif principal est le taux de résection R0 (39).

(b) Radiothérapie stéréotaxique

Une approche émergente concerne l'utilisation de la radiothérapie stéréotaxique (SBRT) qui permettrait de lutter contre la radiorésistance intrinsèque des adénocarcinomes pancréatiques par l'utilisation de fortes doses par fraction, et de limiter la dose reçue par les tissus sains. L'étalement réduit de la radiothérapie permet également de ne pas interrompre longtemps une chimiothérapie systémique efficace. L'analyse poolée de 19 essais de radiothérapie stéréotaxique incluant 1009 patients avec des protocoles hétérogènes (dose totale de 18 à 50 Gy en une à 8 fractions) a montré une bonne tolérance avec moins de 10 % de toxicité de grade supérieur ou égale à 3. Seules trois études rapportaient un taux de toxicité de grade supérieur ou égal à trois, correspondant à des ulcères gastro-duodénaux, qui semblent liés à de fortes doses par fraction. Ces études incluaient des patients porteurs de cancers du pancréas LA et BR dans des proportions variables. Tous les patients avaient une chimiothérapie systémique avant ou après la SBRT. La survie médiane était de 17 mois, comparable aux essais de chimioradiothérapie. La survie sans récurrence locale à un an était encourageante à 72,5 %. Le taux de contrôle local semblait corrélé à la dose totale et au nombre de fractions (40).

I.A.2. Caractéristiques biologiques

L'agressivité et la résistance aux traitements des PDAC pourrait être liée aux multiples altérations génétiques intéressant à la fois les gènes suppresseurs de tumeurs et les oncogènes. Les analyses génomiques de PDAC montrent un profil de mutations complexes avec 4 mutations fréquentes intéressant les gènes *KRAS*, *TP53*, *SMAD4* et *CDKN2A* parmi de nombreuses autres mutations moins

fréquentes (figure 1). Ces mutations peuvent être rattachées à des voies de signalisation majeures comme les voies de réparation de l'ADN et les voies de régulation du cycle cellulaire (41).

- *KRAS* : Les mutations de *KRAS* sont présentes dans plus de 90 % cancers du pancréas et surviennent précocément dans la progression de la maladie. Il active les kinases de la famille RAK et MEK qui participent à la prolifération cellulaire (42). La survenue de mutations au niveau des codons 12, 13 ou 61 inhibe l'activité GTPase de RAS, conduisant à une protéine RAS oncogénique constitutivement activée.
- *TP53* : le gène suppresseur de tumeur TP53 est un acteur clé de la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose, en réponse au stress oxydatif ou aux dommages à l'ADN. Il est muté dans plus de 50 % des PDAC. Ces mutations surviennent tardivement dans la progression de la maladie (42).
- *SMAD4* : membre de la famille du TGF β , il s'agit d'un gène suppresseur de tumeur, qui est transloqué dans le noyau après activation des récepteurs TG β F et inhibe la croissance cellulaire. Sa mutation favorise la progression tumorale et l'invasion métastatique, elle est également associée à la radiorésistance (43).
- *CDKN2A* (connu également sous le nom de p16 ou INK4A) est un gène inhibiteur du cycle cellulaire. Sa mutation est précoce dans l'oncogenèse pancréatique, présente dans 40% des néoplasies pancréatiques intra-épithéliales. Comme *TP53*, *CDKN2A* joue un rôle important dans le contrôle du passage de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire ainsi que du maintien de l'intégrité du génome lors d'un dommage à l'ADN

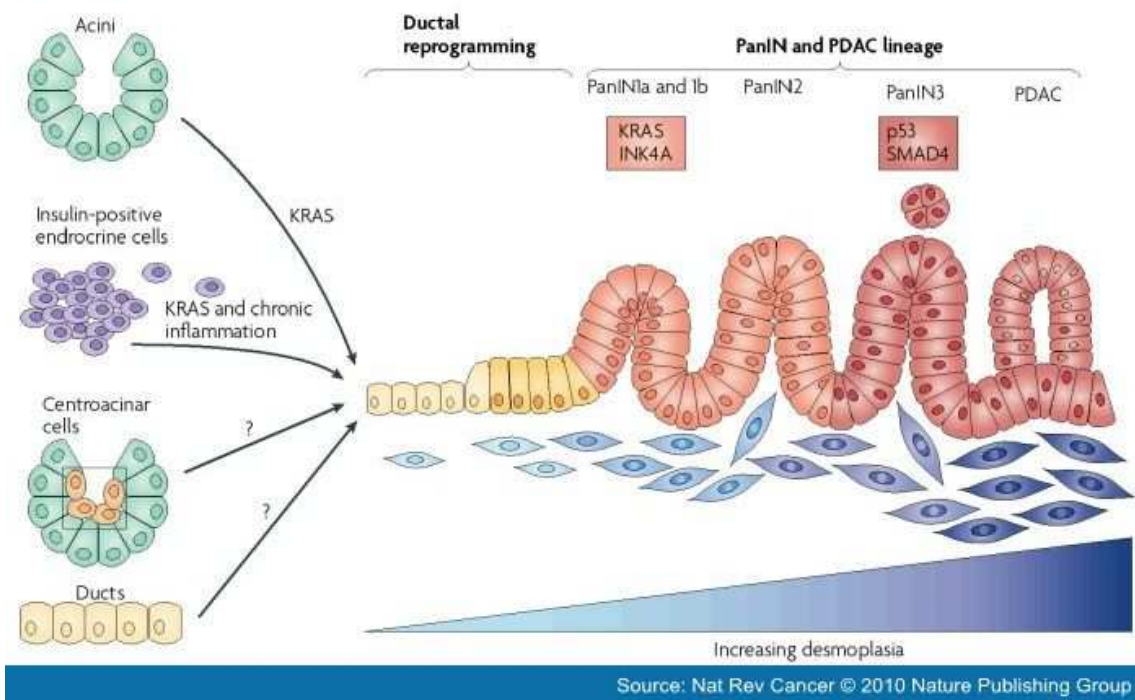


Figure 1 : Apparition des mutations des gènes clés KRAS, CDKN2A, SMAD4 et TP53 au cours de l'oncogénèse des PDAC (Nat Rev Cancer)

Plus récemment, la caractérisation extensive de ces mutations a été permise par les approches génomiques intégratives (whole genome sequencing). Ainsi, l'analyse de 456 PDAC a permis d'identifier une moyenne de 32 gènes mutés de façon récurrente touchant 10 voies de signalisation (44). Cette multiplicité de mutations et de voies de signalisation impactées peut expliquer la résistance des tumeurs aux différentes thérapies ciblées développées. Elles peuvent néanmoins être regroupées selon 4 sous types : squameux, progéniteur pancréatique, immunogène et ADEX (avec différenciation aberrante endocrine exocrine). Ces sous-types sont associés à des types histologiques et à des pronostics différents, ils permettent d'envisager de nouvelles pistes thérapeutiques en fonction des voies prédominantes qui leur sont associées (44). Enfin, l'étude du microenvironnement tumoral montre qu'il joue un rôle majeur dans la résistance des cancers du pancréas aux traitements conventionnels, et permet là encore d'envisager de nouvelles pistes (45).

I.B. La chimiothérapie des cancers du pancréas

I.B.1. Les chimiothérapies conventionnelles et leurs effets biologiques

Elles reposent sur 3 classes de chimiothérapie :

- Les antimétabolites

Le 5-FU et la gemcitabine appartiennent à la classe des antimétabolites de type antiprimidique dont l'action s'effectue essentiellement par l'inhibition de la synthèse de l'ADN. La gemcitabine est un analogue synthétique de la deoxycytidine, avec laquelle elle entre en compétition. Il s'agit d'une prodrogue qui dépend de protéines de transport pour rentrer dans la cellule. Parmi ces protéines, hENT1 (human equilibrative nucleoside transporter) semble la plus importante et son niveau d'expression conditionne la sensibilité de la tumeur à la gemcitabine (46). Dans la cellule, la gemcitabine est phosphorylée en métabolites actifs (dérivés monophosphate, diphosphate et triphosphate) qui vont inhiber la synthèse de l'ADN par plusieurs mécanismes: la forme triphosphate est incorporée dans l'ADN intracellulaire alors que la forme monophosphate peut induire l'apoptose, enfin la forme diphosphate bloque la synthèse de l'ADN (47).

Le 5-FU est métabolisé en 5F-dUMP (5-fluorodésoxyuridine monophosphate) qui empêche la synthèse endogène de la thymidine par inhibition de la thymidilate synthase. Il s'agit de la principale voie de cytotoxicité du 5-FU. Il peut également agir par incorporation dans l'ARN, en bloquant sa maturation, sous forme de 5-FUTP (5-fluorouridine triphosphate) ou dans l'ADN sous forme de 5-FdUTP (5-fluorodésoxyuridine triphosphate), ce qui provoque sa fragmentation (48).

- Les sels de platine

Ils font partie des agents alkylants et agissent en se fixant sur les bases puriques (A et G) de l'ADN, qu'ils déforment, empêchant ainsi la réplication et la transcription (49). Le cisplatine est transporté dans la cellule par Ctr1 (Copper transporter 1), activé dans son entrée dans la cellule pour interagir avec les bases puriques. Il agit également par induction du stress oxydant, mécanisme responsable de sa toxicité en particulier rénale et digestive (nausées retardées). Il a été remplacé par l'oxaliplatine en chimiothérapie des cancers du pancréas (16,23).

- Inhibiteur de la topoisomérase

L'irinotécan est un dérivé de la camptothécine, issue de la feuille de *camptotheca acuminata*, qui fait partie des alcaloïdes, utilisée en médecine traditionnelle chinoise. Il s'agit d'une prodrogue dont le métabolite actif appelé SN-38 inhibe la topoisomérase 1. Il est utilisé en association avec l'éloxatine et le 5-FU dans le protocole folfirinox en première ligne métastatique et en adjuvant. Sa cytotoxicité passe par l'induction de lésions simple-brin de l'ADN qui bloquent la fourche de réplication de l'ADN et sont responsables de l'activité cytotoxique (23).

I.B.2. Nouveaux médicaments : thérapies ciblées et chimiothérapies liposomales

Beaucoup d'espoirs ont été fondés sur le développement de thérapies ciblées dans le traitement des cancers du pancréas : de nombreux agents comme les inhibiteurs des farnesyl transférases, les inhibiteurs de métalloprotéinases ou des antiangiogéniques ont montré des résultats prometteurs dans les études précliniques ou cliniques de phase précoce mais ces résultats n'ont pas été confirmés par les essais de phase 3 (50). Parmi eux, les inhibiteurs de l'épidermal growth factor receptor (EGFr) ont été étudiés dans la mesure où la voie de signalisation médiée par EGF est impliquée dans l'oncogénèse des cancers du pancréas. L'erlotinib est un inhibiteur de tyrosine kinase spécifique de l'EGFr qu'il inhibe. Il a montré des résultats intéressants en préclinique, mais des résultats modestes en phase 3 chez les patients métastatiques (51), non confirmés en cas de tumeur localement évoluée (32), ni en adjuvant (52).

L'olaparib (ALD 2281) est un inhibiteur de Poly(ADP-ribose) polymérase (PARP) qui a montré son intérêt dans les cancers de l'ovaire avec ou sans mutation BRCA1 ou BRCA2. Il s'agit d'un médicament oral qui est indiqué en maintenance après chimiothérapie à base de sels de platine chez les patientes en rémission partielle ou complète pour adénocarcinome séreux de l'ovaire (53)

L'olaparib pourrait avoir des applications plus larges dans les cancers dont les voies de réparation de l'ADN sont défectueuses, il a été évalué en phase 1 dans les cancers du pancréas BRCA1 ou BRCA2 muté, en association à la chimiothérapie (54). Il est en cours d'évaluation en essai de phase 3 chez les patients métastatiques (étude POLO, NCT02184195).

Enfin de nouvelles chimiothérapies sont développées avec des formulations permettant une meilleure pénétration à l'intérieure des cellules tumorales. Ainsi, le Nab-paclitaxel est constitué de nanoparticules de paclitaxel lié à de l'albumine sérique humaine. L'albumine facilite la transcytose endothéliale de composants plasmatiques et des études in vitro ont démontré que sa présence favorise le transport du paclitaxel à travers les cellules endothéliales (55). En association à la gemcitabine, il a permis d'augmenter la survie globale (survie médiane : 8,5 vs. 6,7 mois, $p < 0.001$) comparé à la gemcitabine seule dans l'essai de phase 3 randomisé MPACT (56).

L'irinotécan liposomal (PEP02-MM-398) permet selon les études pré-cliniques d'améliorer la pharmacocinétique et la biodistribution tumorale de l'irinotécan et de son métabolite actif le SN38, comparé à la forme libre de l'irinotécan, avec une accumulation moindre dans les organes associés aux effets toxiques secondaires (57). La pharmacocinétique de l'irinotécan et de son métabolite actif SN38 a été confirmée dans le premier essai de phase 1 sur l'homme pour des tumeurs solides réfractaires, permettant de définir une dose maximale tolérée de 120 mg/m²/ 3 semaines, puis, l'essai Napoli 1 a montré que la Nal-IRI associé à 5FU-elvorine augmentait la survie globale comparé à 5FU-elvorine chez les patients métastatiques, en progression après gemcitabine (survie médiane: 6,1 vs.4,2 mois, p = 0,012) (58).

I.C. La radiothérapie

I.C.1. Les différents types de rayonnements ionisants

Les radiations ionisantes (RI) correspondent à des rayonnements qui possèdent une énergie associée supérieure à 30 électrons-volts (eV), seuil au-dessus duquel ils peuvent arracher un électron aux atomes qui constituent la matière. L'interaction des rayonnements avec la matière est caractérisée par leur libre parcours moyen et leur transfert d'énergie linéique (TEL). Le TEL représente, en un point de la trajectoire d'une particule ionisante, la densité d'énergie absorbée par le milieu rapportée à l'unité de longueur de la trajectoire : on l'exprime usuellement en keV/μm. Le TEL dépend du type de rayonnement et de son énergie. L'énergie déposée par le rayonnement dans la matière est exprimée en Gray (1 Gy =1 J/kg).

I.C.1.a. Les rayonnements électromagnétiques

Les rayonnements électromagnétiques comprennent les rayons γ et les rayons X. Ils sont de même nature (photons de haute énergie) mais d'origines différentes. Les rayons γ sont émis lors de la désintégration de certains noyaux atomiques. Les rayons X sont produits par collision d'électrons accélérés avec une cible, par exemple par les accélérateurs linéaires présents dans nos services de radiothérapie.

Ils interagissent avec la matière suivant trois effets dépendant de l'énergie du photon et de la matière traversée :

- **l'effet photoélectrique** : l'énergie du photon est absorbée par un électron de la couche interne d'un atome, qui va être éjecté.

- **l'effet Compton** : l'énergie du photon est transférée en partie à un électron des couches périphériques de l'atome cible, avec émission d'un électron secondaire possédant l'énergie échangée dans l'interaction.

- **l'effet de production de paire** : le photon interagit avec le noyau des atomes, créant ainsi l'émission d'une paire positon/négaton (émission β^+/β^-). Le positon s'annihile ensuite en créant deux photons de 511 keV. L'énergie du photon incident doit être supérieure à 1,022 MeV pour que ce phénomène se produise.

I.C.1.b. Les rayonnements particuliers

Les rayonnements particuliers sont constitués de particules chargées ou non chargées, qui peuvent être animées d'une vitesse élevée, de l'ordre de celle de la lumière.

- Les électrons sont caractérisés par une perte progressive d'énergie cinétique au cours d'interactions avec les noyaux et du cortège électronique des atomes du matériau traversé. Les atomes sont ionisés par la mise en mouvement des électrons du milieu, à l'origine d'ionisations en cascade. Leur dépôt d'énergie est rapidement limité en fonction de l'épaisseur du tissu traversé.
- Les protons et les ions sont des atomes comme l'hydrogène (protons H⁺), le carbone (C⁶⁺), le néon (Ne¹⁰⁺). Qui sont accélérés par des accélérateurs type cyclotrons ou synchrotrons. Ils sont caractérisés par un dépôt d'énergie dans la matière qui suit une courbe typique avec un dépôt d'énergie maximum en fin de parcours (pic de Bragg), et sans dépôt d'énergie derrière. Ce pic de Bragg se forme à une certaine profondeur dépendant de la masse et de l'énergie du rayonnement (figure 2) (59).

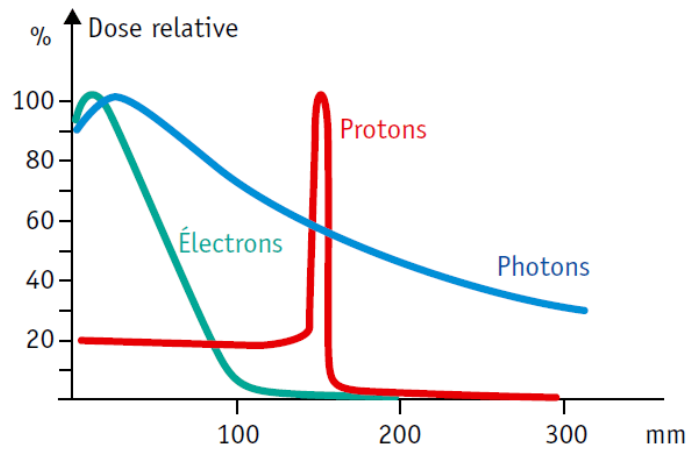


Figure 2 : Diffusion de la dose en fonction de l'épaisseur de tissu traversé par différents types de rayonnements

L'accessibilité limitée à ce type de rayonnement en France fait que les indications sont restreintes aux tumeurs cérébrales, tumeurs de la choroïde et tumeurs de l'enfant.

- Les neutrons interagissent avec les noyaux des atomes de la matière traversée selon deux types d'interactions :
 - Capture : le neutron est absorbé par le noyau, le rendant instable. Pour revenir à un état stable il va émettre un rayonnement particulaire ou électromagnétique.
 - Diffusion : le neutron perd de l'énergie en la transférant à des protons. Le retour à l'équilibre se fait par émission de plusieurs photons.
- Les particules α sont des particules d'hélium (${}^4_2\text{He}$) issues de la désintégration de noyaux radioactifs ou produites par des cyclotrons. Elles ont un fort TEL mais une pénétration faible (quelques centimètres dans l'air). Elles sont rapidement arrêtées par la matière : une feuille de papier suffit. Elles n'occasionnent pas de dommages en cas d'exposition externe mais sont dangereuses en cas de contamination interne
- Les rayonnements β correspondent à un type de désintégration avec émission d'une particule β . On parle de désintégration β^- ou β^+ selon que la particule émise est un électron ou un positron (antiparticule de l'électron). Les particules β^+ sont rapidement annihilées par rencontre avec les électrons présents dans le milieu, à l'origine de la production de deux photons colinéaires d'énergie 511 keV. La détection de ces deux photons est à la base de la tomographie par émission de positrons (TEP).

I.C.2. Les effets chimiques et biologiques des RI

I.C.2.a. Les effets chimiques

Ils sont liés à l'ionisation des molécules du milieu irradié, en particulier à la formation de radicaux libres. Cette ionisation est le plus souvent indirecte par radiolyse de l'eau à l'origine de radicaux libres qui vont à leur tour interagir avec d'autres molécules. L'effet direct, produisant l'ionisation de molécules d'intérêt comme l'ADN est plus important avec les particules α . Les radicaux libres issus de la radiolyse de l'eau sont des oxydants puissants et interagissent ensuite avec les constituants des acides nucléiques (désoxyribose, bases), les lipides insaturés des membranes cellulaires, et certains acides aminés (figure 3) (60).

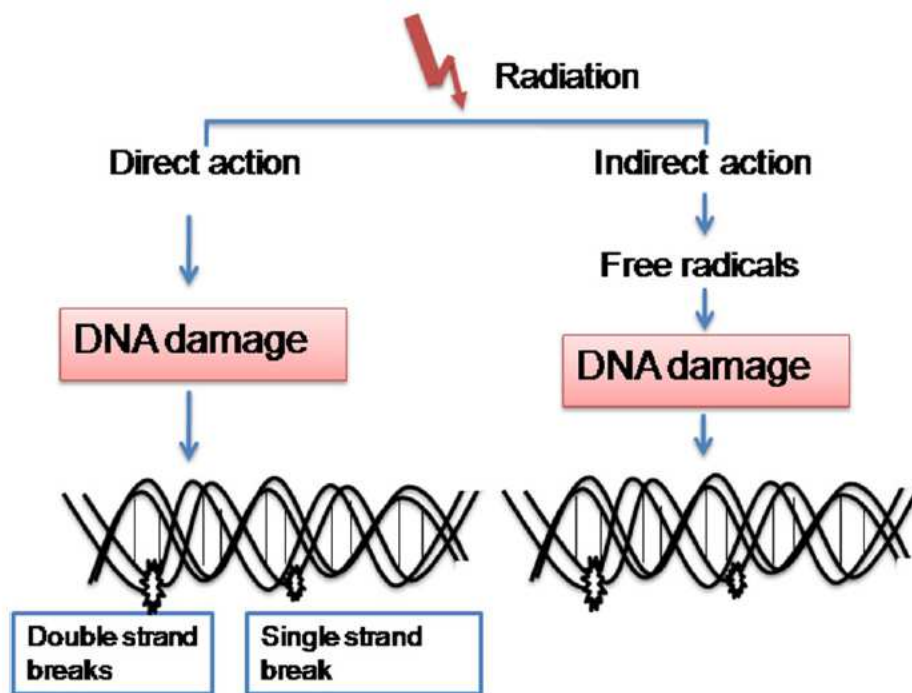


Figure 3 : effets directs et indirects (radiolyse de l'eau) induits par les RI (60)

I.C.2.b. Les dommages à l'ADN

Les radicaux libres, issus de la radiolyse de l'eau, réagissent avec les groupements phosphates, le cycle désoxyribolactone ou les bases puriques ou pyrimidiques de l'ADN, aboutissant à des cassures simple ou double brin, mais aussi des sites abasiques et des dommages de bases (figure 3). D'autres lésions comme des pontages ADN-ADN et ADN-protéines ou des lésions multiples localisées peuvent se produire.

I.C.2.C. Les effets cellulaires

En plus des dommages à l'ADN, l'irradiation induit également des effets cellulaires caractérisés par l'apparition d'un stress oxydatif et une chute du potentiel de membrane mitochondrial, l'activation de voies de signalisation modifiant l'expression des gènes et le cycle cellulaire pour permettre la réparation de l'ADN. Lorsque la réparation est incomplète ou incorrecte, des mutations et des aberrations chromosomiques associées à une modification du phénotype peuvent apparaître. L'ensemble de ces effets peut aboutir à la mort cellulaire (mort clonogénique) ou perte de la capacité proliférative avec un délai de plusieurs jours (figures 4 et 5).

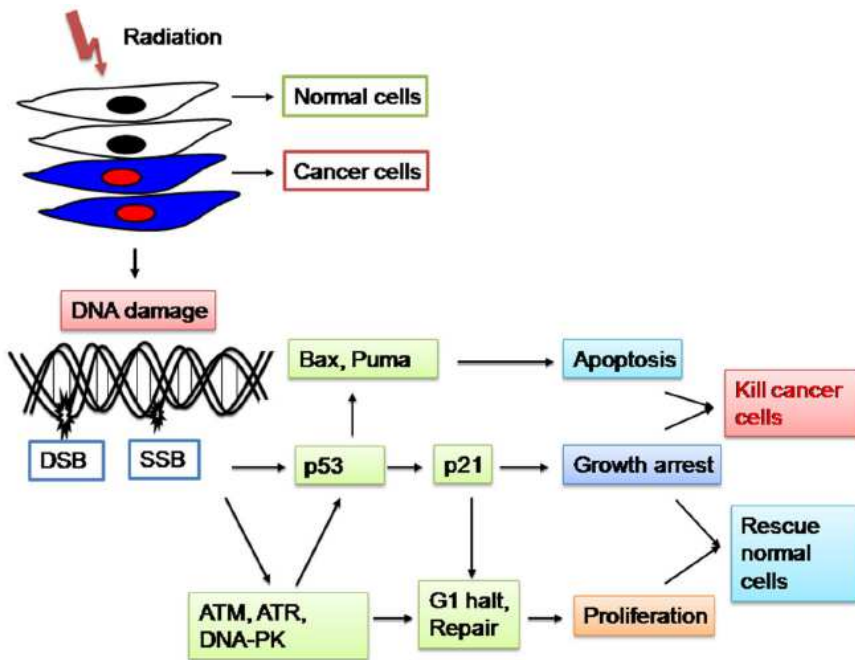


Figure 4 : Dommages à l'ADN induits par les RI: les cassures simple ou double brin bloquent la capacité de division et de prolifération des cellules tumorales alors que les cellules saines sont réparées.(60)

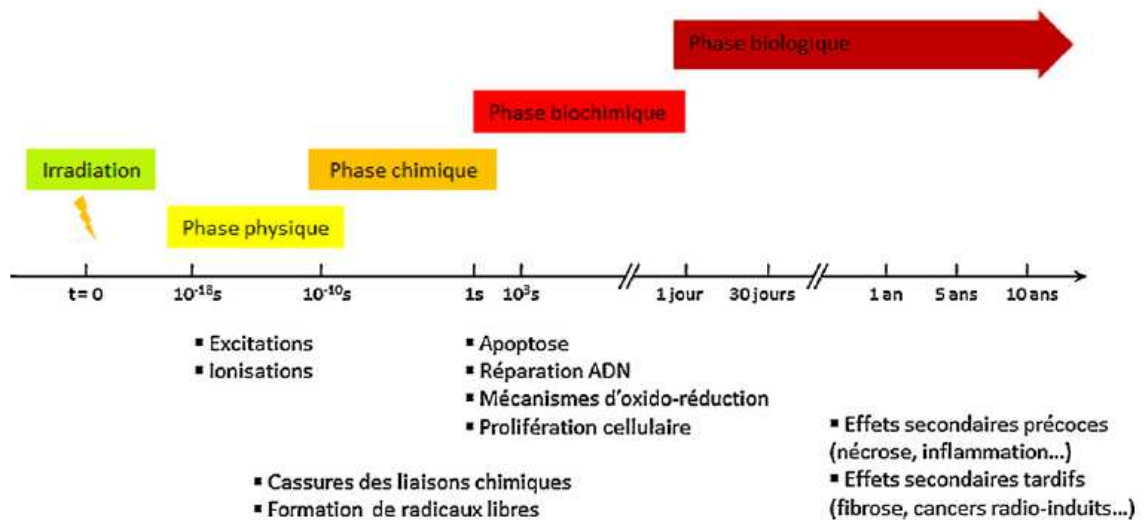


Figure 5 : Echelle de temps des effets des rayonnements ionisants (61)

I.D. Les différents types de mort cellulaire

I.D.1. Apoptose

Elle constitue la voie la plus commune de mort cellulaire programmée, décrite par Kerr et al. en 1972(62), elle est nécessaire au développement embryologique, au fonctionnement du système immunitaire et à l'homéostasie tissulaire. Elle est médiée par des protéases de la famille des caspases, présentes à l'état de précurseurs inactifs dans la cellule, qui vont être clivées et entraîner l'apoptose par une cascade d'activations. L'activation des caspases initiatrices (caspases 8 et 9) peut être secondaire à 2 voies. La voie extrinsèque est déclenchée par la liaison de ligands comme FASL ou tumour necrosis factor (TNF) à leurs récepteurs membranaires FAS et TNF récepteur, qui va induire la formation du deathinduced signalling complex (DISC). Ce complexe recrute à son tour la caspase-8 et déclenche la cascade d'activations des procaspases (63). La voie intrinsèque est déclenchée par différents facteurs intra ou extra-cellulaires comme l'hypoxie ou les dommages à l'ADN induits par l'irradiation. Elle aboutit à la perméabilisation de la membrane mitochondriale et à la formation de l'apoptosome, complexe protéique qui déclenche l'activation des caspases (64). L'étape de perméabilisation de la membrane mitochondriale est régulée par les protéines de la famille bcl2 (65).

I.D.2. Autophagie

L'autophagie est d'abord un mécanisme d'élimination de protéines non nécessaires, qui vont être dirigées puis dégradées dans les lysosomes. Mais il s'agit également d'un mécanisme de mort cellulaire différent de la nécrose ou de l'apoptose, caractérisé sur le plan morphologique par la production d'autophagosomes, qui sont des vésicules produites à partir du réticulum endoplasmique. Sur le plan moléculaire, l'autophagie met en jeu les protéines phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), qui intervient dans les étapes précoces de l'autophagie et la kinase target of rapamycin (TOR) qui la régule négativement. En conséquence, l'inhibition de TOR induit le blocage du cycle cellulaire et l'autophagie (66).

I.D.3. Nécrose, nécroptose

Par opposition aux mécanismes de mort cellulaire programmée, la nécrose est un processus non régulé de destruction traumatique de la cellule, qui provoque le relargage de composants intracellulaires. Elle est généralement secondaire à des agressions extérieures de type infectieuses, inflammatoires ou ischémiques qui provoquent la défaillance des mécanismes d'homéostasie

cellulaire (63). Elle est caractérisée par d'importants dommages cellulaires comme la distorsion membranaire, la destruction des organites et un œdème cellulaire.

I.D.4. Catastrophe mitotique

Il s'agit d'un type de mort cellulaire causée par des mitoses aberrantes. Elle est caractérisée sur le plan morphologique par des cellules géantes, multinucléées, qui contiennent des chromosomes non condensés. Dans les cellules normales, le passage en mitose est lié à l'activation de CDK1 qui phosphoryle plusieurs substrats responsables de la division du noyau, de la condensation des chromosomes et de la séparation des centrosomes. Le point de contrôle (checkpoint) G2 bloque le cycle cellulaire si la cellule subit un dommage au niveau de l'ADN pour permettre la réparation avant d'engager la mitose. L'activation de G2 est secondaire à la détection d'un dommage à l'ADN par ATM et ATR, qui activent à leur tour les checkpoint kinase 1 (CHK1) et 2 (CHK2). Ces kinases phosphorylent CDC25C, molécule responsable de l'activation de la cycline kinase CDK1. La CDC25C phosphorylée s'associe à une molécule cible de p53 et inactive CDK1, aboutissant à l'arrêt du cycle cellulaire en G2. Par ailleurs, p53 participe à l'arrêt du cycle cellulaire par une autre voie mettant en jeu p21. Si ce point de contrôle G2 est défectueux, la cellule peut s'engager dans une mitose aberrante aboutissant à la mort cellulaire par catastrophe mitotique(63,67).

I.D.5. Sénescence

Il s'agit d'une forme d'arrêt permanent du cycle cellulaire. Elle peut également être déclenchée en réponse aux lésions de l'ADN. Sur le plan moléculaire, elle s'accompagne de changements métaboliques et d'une activité β -galactosidase. Elle nécessite la mise en jeu d'inhibiteurs du cycle cellulaire comme p53, p21 et p16 (68).

I.E. Les mécanismes de réparation de l'ADN

I.E.1. La réparation des cassures simple brin

- La réparation par excision de base (BER)

Elle intervient dans la réparation des cassures simple brin (CSB°), qui sont d'abord détectées par la protéine PARP-1 (69). Par ses deux motifs en doigts de zinc, PARP1 vient se placer au niveau de la cassure et provoque une courbure de l'ADN, permettant l'accès des autres protéines de réparation au site de la cassure. Elle intervient également dans le signalement et le recrutement de facteurs de réparation, comme la protéine XRCC1 (X-ray cross complementing protein 1) (70). Une fois recrutée

sur la CSB, XRCC1 met en jeu des facteurs impliqués dans le traitement des extrémités de la CSB, l'incorporation de nucléotides sur le site de la brèche et la ligation.

- la réparation par excision de nucléotide (NER)

Elle consiste en l'excision d'un segment de plusieurs nucléotides encadrant la lésion. Après détection de la lésion, elle fait intervenir des hélicases pour ouvrir la double hélice d'ADN, des endonucléases et une ADN polymérase pour synthétiser le segment enlevé sur le modèle du brin opposé (71).

On peut distinguer deux voies selon la localisation de la lésion :

- la voie de réparation globale du génome (*Global Genomic Repair*, GGR) lorsque la lésion se situe dans un domaine non transcrit de l'ADN,

- la voie de réparation couplée à la transcription (*Transcription-Coupled Repair*, TCR) lorsque la lésion se situe dans un domaine transcrit

- la réparation des mésappariements de bases (mismatch repair : MMR)

Il s'agit d'un système de reconnaissance et de réparation des erreurs de réplication. Ces erreurs sont liées à l'incorporation d'un nucléotide incorrect dans le brin d'ADN synthétisé, responsable d'un mésappariement (deux bases non complémentaires en vis-à-vis). Le MMR passe par la reconnaissance du brin matrice par rapport au brin nouvellement synthétisé, basée sur la présence de méthylations spécifiques. Elle fait intervenir les protéines hMSH2, hMSH6 (human MutS homologous protein), hMLH1 (human MutL homologous mismatch repair protein 1) et PMS2 (Postmeiotic (72). Des mutations dans les gènes codant les protéines hMLH1, hMSH2 et hMSH6 créent des défauts du MMR, à l'origine de cancers colorectaux.

I.E.2. La réparation des cassures double-brin de l'ADN (CDB)

Les CDB font partie des lésions de l'ADN induites par les RI ou par les chimiothérapies. Elles peuvent être réparées principalement par la suture non-homologue des extrémités clivées (Non Homologous End Joining, NHEJ) ou la réparation par recombinaison homologue (RH) (figure 6).

- La réparation par NHEJ

Le NHEJ met en jeu le complexe DNA-PK, composé de l'hétérodimère Ku70/Ku80 et de la protéine DNA-PKcs (DNA-PK catalytic subunit) qui détecte la CDB, puis provoque la résection des oligonucléotides simple-brin situés aux extrémités de la brèche par une nucléase, avant suture par

une ligase. Cette étape de résection entraîne une perte d'information génétique, raison pour laquelle le mécanisme de réparation NHEJ est infidèle (73).

- La réparation par recombinaison homologue

A l'inverse, la recombinaison homologue est fidèle car la séquence d'ADN lésée est resynthétisée à l'identique à partir de la chromatide sœur ou du chromosome homologue. La RH se produit uniquement dans les phases S ou G2 où les chromosomes homologues sont rapprochés. La CDB est détectée par le complexe MRN (Mre11-RAD50-NBS1). L'activité nucléase de Mre11 effectue la résection des extrémités de la CDB de 5' vers 3'. Les protéines RPA et Rad52 viennent alors se fixer sur les extrémités 3', évitant leur dégradation par les exonucléases. La protéine RAD51 est recrutée et va rechercher les séquences homologues sur la chromatide sœur apparié, sous le contrôle de BRCA1 et BRCA2. Les polymérases interviennent alors et synthétisent la séquence manquante en prenant comme matrice la séquence homologue intacte sur la chromatide sœur (74).

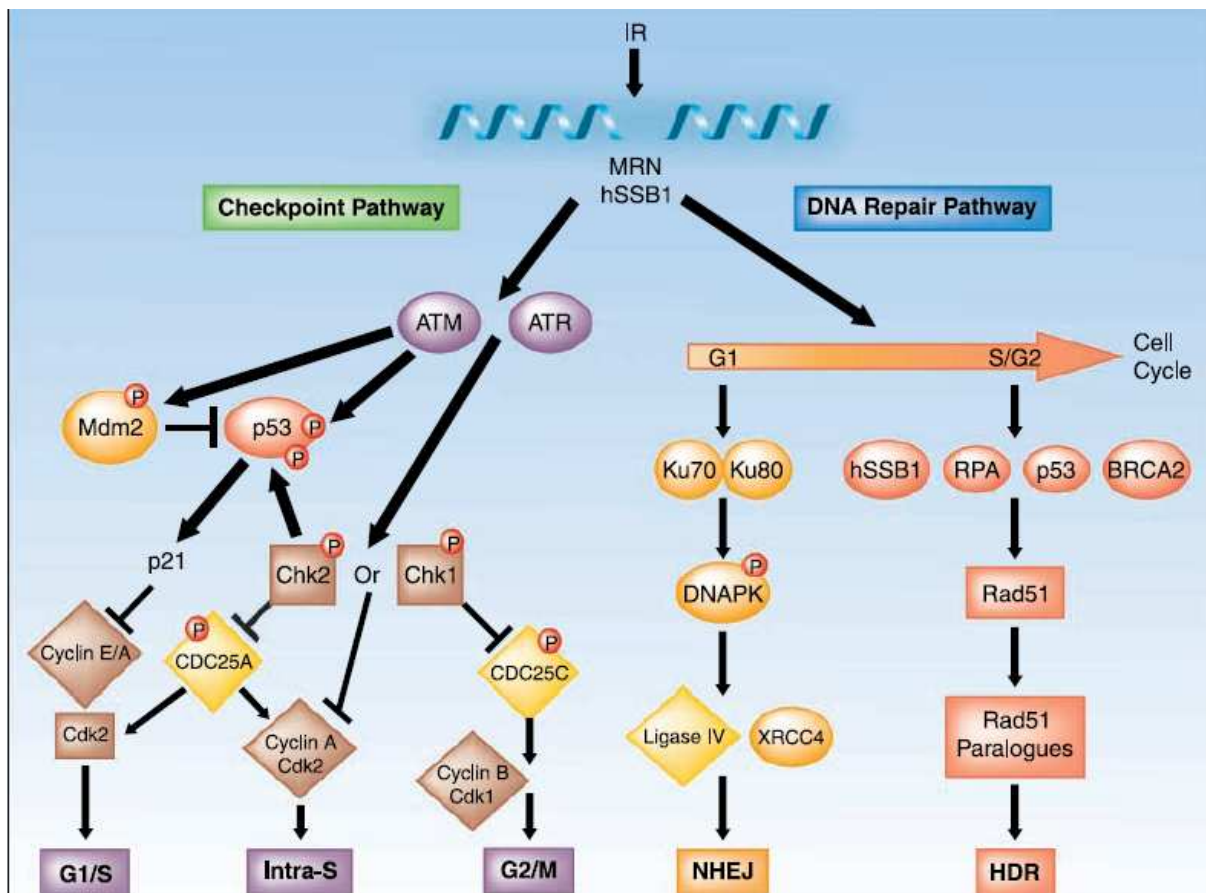


Figure 6: Schéma des voies de réparation mises en jeu par les cassures double brin de l'ADN induites par l'irradiation (75)

I.F. Les substances bioactives issues de l'alimentation (BFCs)

I.F.1. Généralités

Le régime méditerranéen, frugal, pauvre en viandes et riche en fruits et légumes est reconnu comme associé à une longévité importante et préventif de maladies chroniques cardiovasculaires ou de certains cancers (76,77). Les chercheurs se sont intéressés aux nutriments présents dans ces régimes, qui pourraient expliquer ces effets. Parmi eux, les polyphénols sont les plus étudiés, car ils ont été impliqués dans l'effet protecteur controversé du vin dans le « French Paradox », qui montrait une différence de mortalité cardio-vasculaire en fonction de la consommation de matières grasses (1). Ils ont montré des effets cardioprotecteurs par action antioxydante anti-inflammatoire, anti-angiogénique (78), mais aussi neuroprotecteurs par inhibition des dépôts β -amyloïdes impliqués dans la physiopathologie des maladies neurodégénératives (79,80). Néanmoins les polyphénols ne représentent qu'une partie des BFCs.

Selon la définition de l'American Dietetic Association, les BFCs sont des « composés de la nourriture physiologiquement actifs, issus de sources animales ou végétales, y compris les composés appartenant à la nourriture d'un régime alimentaire de base, pour lesquels un rôle a été démontré en santé et dont la consommation est sans danger pour la santé » (2). Dans cette partie, nous restreindrons notre analyse aux BFCs phytochimiques, mais certains composés fongiques ou d'origine animale ont montré également de propriétés anticancéreuses. Enfin, l'exploration émergente du microbiote intestinal met en évidence un rôle des bactéries dans la survenue ou la progression des cancers (81). Ces bactéries ont des interactions étroites et complexes avec les BFCs. Elles peuvent être consommées dans notre alimentation (probiotique) ou être modifiées par notre alimentation, les BFCs jouant alors le rôle de prébiotiques. Enfin elles peuvent modifier le métabolisme et l'absorption d'autres BFCs (82).

I.F.2. Les différentes familles de BFCs phytochimiques

Les substances bioactives issues de l'alimentation font partie des métabolites secondaires (non indispensables à la vie cellulaire). Ces métabolites secondaires sont classés en 3 grandes familles, auxquelles on ajoute classiquement les hétérosides (Tableau 3).

(1) Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des composés azotés, basiques, le plus souvent issus des végétaux. Ils comprennent des molécules non consommées dans l'alimentation, à l'origine de médicaments comme la morphine, la vincristine, le taxol, mais aussi de molécules bioactives consommables comme la quinine et la caféine. Ils sont souvent caractérisés par leur amertume. Ils comprennent également la capsaïcine et ses analogues, issus des piments : ce composé permet à la plante et à ses graines d'être moins exposés à la prédation.

(2) Les terpènes

Ils sont en fait une classe d'hydrocarbures, constitués d'association de structures d'isoprène. Ils sont issus principalement de conifères et comprennent des molécules aussi diverses que la térébenthine, le caoutchouc ou des molécules présentes dans notre alimentation comme le lycopène et le β carotène.

(3) Les polyphénols

Les polyphénols comprennent les substances bioactives issues de l'alimentation les plus étudiées en cancérologie. Ils sont présents dans notre alimentation, de l'ordre de 1g/ j apportés par les fruits et légumes, le vin, le thé et le chocolat (83). Pour les végétaux, ils ont non seulement un rôle dans la défense contre les parasites et pathogènes, mais contribuent également aux propriétés organoleptiques des feuilles, fruits et de leurs produits dérivés comme le vin ou l'huile d'olive. On distingue 4 classes différentes :

(a) Les acides phénols

Ce sont des composés aromatiques avec une ou plusieurs fonctions alcool. En fonction de leur structure, on distingue les composés en C6-C1 comme l'acide acétyl-salicylique (issu naturellement du saule et de la reine des prés), la vanilline (vanillier) ou l'acide gallique (châtaignier) et les composés en C6-C3 comme les acides chlorogéniques présents dans le café, la pomme et l'artichaut. Ils comprennent également les coumarines, qui jouent un rôle de phytoalexine (issues du marronnier d'inde par exemple).

(b) Les flavonoïdes

Ce sont des molécules en C6-C3-C6, très répandues chez les végétaux. Elles comprennent les flavonones comme la naringénine (présentes dans les agrumes), les flavones comme l'apigénine ou les isoflavones qui ont une activité oestrogénique, les flavonols comme la quercétine (oignon, brocoli), les flavanols comme les catéchines (vin, thé) et les anthocyanes qui donnent aux fruits leurs couleurs bleu et rouge.

(c) Les tanins

Il s'agit d'un groupe hétérogène de composés phénoliques, historiquement utilisés pour le tannage de peaux d'animaux (permettant de rendre le cuir imputrescible). Les tanins entraînent la précipitation des protéines dans la salive, responsable de leur caractéristique astringence.















(d) Les stilbènes

Ils sont proches des flavonoïdes, mais avec une structure en C6-C2-C6. Ils comprennent le resvératrol et ses analogues (picéatanol, epsilon-viniférine) présents dans certains fruits comme les mûres, les cacahuètes ou plus particulièrement dans les raisins et le vin mais aussi dans certaines plantes médicinales tel que la renouée du Japon utilisée en thé dans le traitement des maladies cardiovasculaires. Le resvératrol (R) se trouve sous deux formes isomères, trans- et cis-, seul le trans-resvératrol est la forme bioactive (79).

(4) Les hétérosides

Ce groupe est constitué de dérivés glycosylés de composés terpéniques, phénoliques et plus rarement d'alcaloïdes. Il comprend la famille des glucosinolates présents dans les choux, brocolis, choux de Bruxelles, radis, moutarde. Ces glucosinolates ne sont pas eux-mêmes bioactifs et sont dégradés en isothiocyanates (dont le sulforaphane) par une enzyme la myrosinase ou par le microbiote intestinal.

Tableau 3 : Familles de métabolites secondaires avec les principales substances bioactives issues de l'alimentation ainsi que des métabolites développés comme médicaments (non exhaustif).

Polyphénols	Acides phénols	Acide gallique	$C_7H_6O_5$	Châtaigne	
		Acide salicylique	$C_7H_6O_3$	Saule Reine des prés	
		Vanilline	$C_8H_8O_3$	Vanille	
	Flavonoïdes	Naringénine (flavanone)	$C_{15}H_{12}O_5$	Pamplemousse	
		Isoflavones (flavone)	NA	Soja	
		Quercétine (flavonol)	$C_{15}H_{10}O_7$	Oignon Câpres Brocoli	
	Catéchine (flavanol)	$C_{15}H_{14}O_6$	Thé Vin		
	Stilbènes	Resvératrol	$C_{14}H_{12}O_3$	Raisin	
Alcaloïdes		Capsaïcine	$C_{18}H_{27}NO_3$	Piment	
		Piperine	$C_{17}H_{19}NO_3$	Poivre Bolet	
Terpènes		β -carotène	$C_{40}H_{56}$	Carotte Potiron	
		Lycopène	$C_{40}H_{56}$	Tomate Pastèque	
Hétérosides		Sulforaphane	$C_6H_{11}NOS_2$	Brocoli Crucifères	
		Benzyl- isothiocyanate	C_8H_7NS	Papaye Moutarde	

I.F.3. BFCs, cancers et chimiosensibilisation

De nombreuses études ont montré un impact des BFCs dans la survenue des cancers ou dans le contrôle de la progression tumorale (2). Plus de 500 BFCs ont été identifiés comme capables de diminuer la cancérogénèse en interférant avec différentes voies de signalisation cellulaire. Ces composés, anti-oxydants à faibles concentrations, deviennent pro-oxydants en forte concentration, et peuvent agir, selon les doses, à différents stades de la tumorigénèse comme l'initiation et la progression (2). Parmi les BFCs, les substances qui ont été le plus étudiées sont les polyphénols avec le resvératrol, la curcumine, la quercétine, la génysteine et la catéchine, les isothiocyanates comme le sulforaphane ou les alcaloïdes comme la capsaïcine.

I.F.3.a. Resvératrol et polyphénols

Parmi ses effets, le resvératrol à faible dose présente des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et immunomodulatrices (84). A forte dose, le resvératrol a au contraire une activité pro-oxydante anticancéreuse faisant intervenir un grand nombre de mécanismes allant du blocage des œstrogènes et des androgènes jusqu'à la modulation de l'expression de gènes (85). Ainsi, dans certaines cellules tumorales, le resvératrol peut moduler la médiation de nombreuses cibles cellulaires impliquées dans les voies de signalisation du cancer, notamment les voies de signalisation cellulaire qui contrôlent la division cellulaire et l'apoptose selon différents mécanismes en fonction de la nature des cellules tumorales(86). Quelques études ont montré que le resvératrol peut sensibiliser les cellules tumorales à l'action des agents chimio-thérapeutiques conventionnels mais le mécanisme de cette synergie est différent en fonction du type de cellules tumorales (87). L'équipe de Harikumar et al. a étudié le resvératrol sur des lignées de cellules d'adénocarcinomes humains présentant des mutations K-RAS et TP53 ainsi que dans un modèle de greffe orthotopique de cellules tumorales pancréatiques humaines. Il a été observé que le resvératrol potentialise l'action de la gemcitabine en induisant l'apoptose (5).

De même, la curcumine qui est le pigment principal du curcuma présente des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et d'immunomodulation. De plus, certaines études ont suggéré que la curcumine contribuerait à inhiber la prolifération cellulaire et l'angiogenèse à différentes étapes du développement de cancers (88).

I.F.3.b. Capsaïcine (alcaloïdes)

La capsaïcine (C) fait partie de la famille des capsaïcinoïdes, c'est un composé actif du piment. Elle possède de nombreuses propriétés pharmacologiques telles que des activités analgésiques (principalement), anti-obésité et anticancéreuse (89), notamment sur les cellules tumorales pancréatiques (90). Cette inhibition de la croissance des cellules tumorales pancréatiques est due, en partie, à l'induction de l'apoptose par la production de radicaux libres oxygénés (90,91). Actuellement, les applications cliniques de la capsaïcine chez l'homme sont limitées au traitement de la douleur (92). Son activité analgésique est médiée par le récepteur vanilloïde TRPV1. Elle a montré une activité antitumorale dans des modèles précliniques de cancers du pancréas, du colon, du rein, de mélanome, de gliome et radiosensibilisante dans le cancer de la prostate (91,93–95).

I.F.4.c. Sulforaphane et isothiocyanates

D'autres substances sont également étudiées en tant qu'agents anticancéreux, comme le sulforaphane (S), qui est un composé organosulfuré du groupe des isothiocyanates. On le retrouve principalement dans les légumes crucifères comme les brocolis, les choux de Bruxelles. Il inhibe aussi la croissance de plusieurs types de cellules tumorales selon différents mécanismes, dont l'induction de ROS. Il est considéré comme anti-oxydant à faible dose et pro-oxydant à fortes dose, mais certaines études suggèrent qu'il pourrait avoir un effet pro-tumoral à faible dose (de l'ordre de 1 à 5 μM) (96). De même le sulforaphane peut promouvoir l'angiogénèse à faible concentration mais l'inhiber à forte concentration (96). Il agit également en activant l'apoptose et en bloquant le cycle cellulaire en G2M, par une activité histone déacétylase *in vitro* et *in vivo* sur des lignées tumorales pancréatiques (46). Dans une autre étude, il permettait une réduction de 45 % de volume tumoral par inhibition de la voie Hedgehog dans un modèle préclinique de cancer du pancréas. Enfin, il inhibait l'activation de NFkB induite par le sorafenib (98). Il fait l'objet d'un essai clinique de phase 3 randomisé en adjuvant de la chimiothérapie dans les cancers du pancréas localement évolué (essai POUWER, ID : NCT01879878) (99).

I.F.4. Biodisponibilité

La biodisponibilité des différents BFCs est variable et souvent faible, ce qui pose problème dès que l'on espère transposer les résultats des études *in vivo* chez l'homme. Par exemple, on estime que 1 à 10 % des polyphénols consommés sont détectés dans le plasma ou dans les urines (83). Cette faible biodisponibilité des polyphénols est liée à une stabilité faible au pH physiologique, à leur nature hydrophobe, à un métabolisme hépatique rapide et à leur élimination rénale. En particulier, les

études cliniques chez l'homme sur la pharmacocinétique, le métabolisme et la tolérance du resvératrol administré par voie orale ont montré qu'il pouvait être utilisé à la dose de 1g/j dans les essais thérapeutiques en cours ou futurs, mais que les concentrations atteintes dans les tissus seraient en deça des concentrations utilisées dans les études précliniques sauf pour les tissus digestifs, qui bénéficient d'une absorption directe (100). Après son absorption digestive, il est rapidement métabolisé sous forme glucurono-conjuguée. Le microbiote intestinal joue également un rôle dans la métabolisation et participe aux variations inter-individuelles de ratio entre les formes libres et glucuro-conjuguée. Néanmoins, il a été montré que certains métabolites du resvératrol pouvaient également être actifs. De même, la curcumine, qui fait également partie des polyphénols, fait l'objet de recherche d'analogues ou de nanoformulations pour augmenter sa biodisponibilité (101–104). L'association de plusieurs BFCs peut aussi modifier la biodisponibilité, ainsi la pipérine (alcaloïde) pourrait augmenter l'activité de la curcumine (105).

Même si la capsaïcine a des effets thérapeutiques analgésiques mais aussi à visée antitumorale en préclinique, son action est limitée par ses effets secondaires à type de sensation de brûlure muqueuse et de crampes intestinales. Aussi, les efforts sont mis sur la recherche d'analogues ou le développement de dérivés synthétiques qui pourraient être plus efficaces et mieux tolérés. Parmi les analogues, l'EVO issu du fruit *Evodia* ou la resiniferatoxine semblent prometteurs, de même plusieurs dérivés synthétiques comme l'arvanil ou l'olvanil sont en cours de développement (89). Quant au sulforaphane, il provient de la dégradation des glucosinolates présents dans les crucifères par une enzyme la myrosinase. Cette enzyme est inactivée au-dessus de 60 °C, mais elle est présente dans le microbiote intestinal, à des taux variables en fonction de la composition de ce dernier (figure 7) (106).

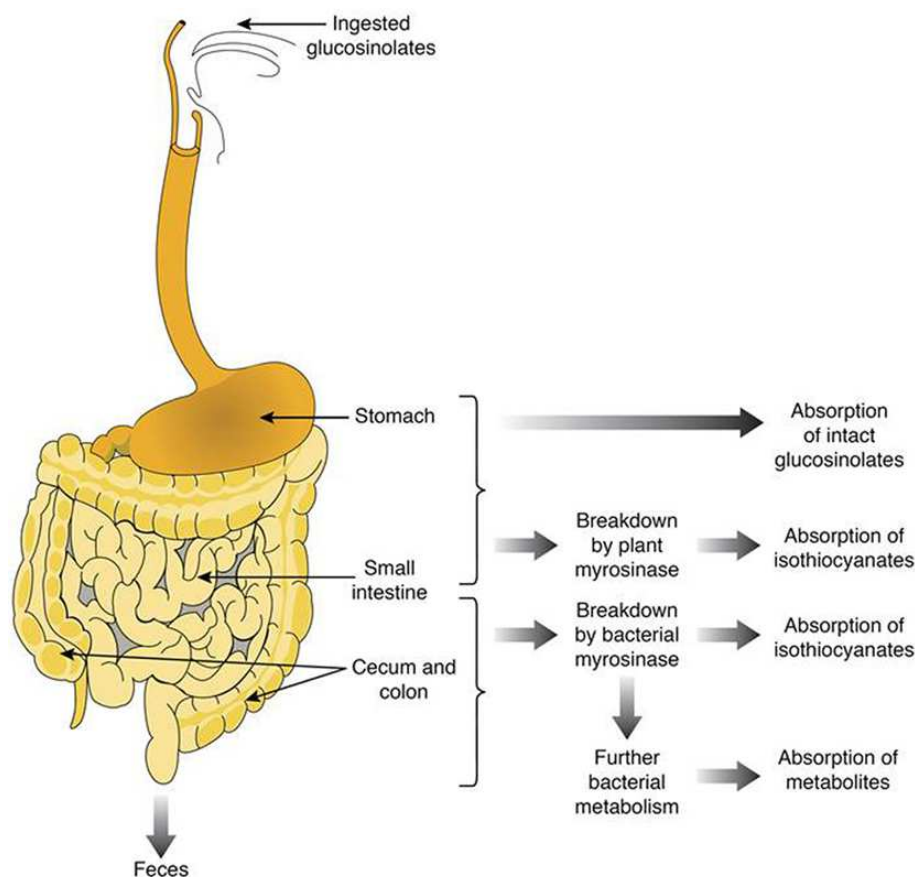


Figure 7 : Résumé du devenir des glucosinolates et de leurs produits de dégradation dans l'intestin humain (106).

I.F.5. Effets chemopréventifs

Les relations entre nutrition et cancers sont de mieux en mieux connues et font l'objet de recommandations dans le cadre du Plan National Nutrition et Santé (disponible sur http://www.mangerbouger.fr/pro/IMG/pdf/Pr_ventionPrimaireCancers.pdf). Ces recommandations ont été établies par un groupe d'experts sur la base d'une analyse de la littérature publiée entre 2006 et 2014, à propos des relations entre 10 facteurs nutritionnels et cancers (3). Cette analyse conclut notamment à une relation entre consommation de fruits et légumes et réduction de risque de cancers de la bouche, du pharynx, du larynx, de l'œsophage et de l'estomac, probable également pour les cancers du pancréas (liée à la vitamine B9) et les cancers colorectaux (rôle des fibres), et pour les cancers du poumon (rôle des fruits).

Parallèlement les BFCs issus de ces fruits et légumes ont montré des propriétés chemopréventives à tous les stades d'évolution du cancer de l'initiation à la progression sur différentes lignées tumorales *in vitro* et *in vivo* (2). L'effet anti-oxydant des BFCs, régulièrement mis en avant est peut être lié à la

fois à un effet direct lié à la neutralisation des radicaux libres ou à effet chélateur comme pour les polyphénols, mais aussi à l'activation d'enzymes antioxydantes comme la SuperOxyde Dismutase (107) par l'activation de la voie Keap1-Nrf2-ARE par le sulforaphane(96).

Pour autant, aucun complément alimentaire à base de BFCs n'a à ce jour montré d'effet préventif convaincant sur la survenue de cancers, probablement parce que les mécanismes préventifs sont multifactoriels : par exemple, un complément alimentaire ne peut pas remplacer l'action des fibres liées à la consommation fruits et légumes. De plus, il est probable que l'effet préventif soit lié à l'exposition au long cours à de multiples micronutriments mélangés (108). Enfin, il est possible que la consommation de BFCs à des doses 10 fois plus élevées (correspondant au niveau de doses présents dans les compléments alimentaires) que celles présentes dans l'alimentation, puisse avoir un effet contraire comme l'ont montré les études interventionnelles sur le β -carotène. Actuellement la consommation de BFCs à visée chemopréventive reste liée à un régime varié et riche en fruits et légumes et ne peut être remplacée par des compléments alimentaires.

I.F.6. BFCs et radiothérapie

La littérature publiée ces 5 dernières années à propos de l'effet des BFCs sur la radiothérapie a augmenté de façon exponentielle. Les molécules les plus étudiées font partie de la famille des polyphénols avec par ordre décroissant la curcumine, le resvératrol, la quercétine, la catéchine et la génistéine. Les isothiocyanates avec le sulforaphane et les alcaloïdes avec la capsaïcine sont moins étudiés. Si les études *in vitro* sont nombreuses, l'expérimentation pré-clinique reste plus restreinte.

De façon intéressante, les mêmes BFCs auraient des effets de radiosensibilisation vis-à-vis des cellules tumorales et au contraire de radioprotection vis-à-vis des cellules saines. Cette dualité, dont les mécanismes restent mal compris, serait particulièrement intéressante si elle était confirmée dans des essais cliniques.

I.F.6.a. Radiosensibilisation

(1) Radiosensibilisation *in vitro*

De nombreuses études ont mis en évidence une radiosensibilisation des cellules tumorales de différentes lignées cancéreuses (colon, glioblastome, sein, rein, leucémie, lymphome de Burkitt, médulloblastome, mélanome, tumeurs ORL) (tableau 4). Plusieurs études montrent une toxicité des BFCs seules sur les cellules tumorales, qui n'est pas retrouvée sur les cellules saines (109). Par

exemple, le resvératrol diminuait la survie cellulaire des lignées tumorales prostatiques hormonorésistante PC3 et hormonosensible 22RV1 tout en restant peu toxique sur la lignée cellulaire épithéliale saine PNT1A. Cet effet différentiel est également constaté pour la radiosensibilisation. : aucune différence significative de fraction survivante à 2 Gy n'était constatée pour les cellules saines PNT1A aux doses de resvératrol radiosensibilisantes pour les lignées tumorales (109). Cette radiosensibilisation sélective des cellules tumorales est également retrouvée avec la capsaïcine (94).

De plus, certaines lignées tumorales sont caractérisées par leur radiorésistance intrinsèque, comme la lignée tumorale prostatique PC3 (109), ou ont des caractéristiques de cellules souches cancéreuses qui leur confèrent une radiorésistance comme les lignées de glioblastome GBM-CSC-like qui expriment CD33 (110,111). On note que ces lignées peuvent être sensibilisées à l'irradiation par le resvératrol.

Tableau 4 : Radiosensibilisation par les BFCs in vitro et mécanismes impliqués

Ref	BFC	Lignée cellulaire	Tumeur	Dose (μ M)	Dose RT (Gy)	Mort cellulaire	Mécanisme
Baatout (112)	R	EOL-1	leucémie	50 -100	2, 4, 6, 8	apoptose nécrose	augmentation directe de l'apoptose
Scarlati (113)	R	DU145	prostate	0,5-32	0,5-2	ND	augmentation de céramide endogène
Rashid (109)	R	PC3, 22RV1 PNT1A	prostate	2,5-10	2-8	apoptose catastrophe mitotique	Induction voie AMPK inhibition voie Akt mTOR
Fang (114)	R	PC3	prostate	0-50	2, 4, 8	Apoptose	Augmentation de Fas et TRAILR1
Fang (115)	R	SK-Mel-5, HTB-65	mélanome	0-50	0-4	apoptose	ND
Ivanov (116)	R	LUI205, WM35, SW1	mélanome	25-100	2,5-5	apoptose	Inhibition de STAT3 et NF κ B
Tak (117)	R Pip	B16F10 CT26	mélanome colon	0-20	5	apoptose	augmentation des ROS
Lu (110)	R	MB-CSC	médulloblastome	100	0-10	ND	ND
Kao (111)	R	GBM-CSClike (CD133)	glio	100	2	apoptose	inhibition de STAT3
Aravindan	R	MCF-7	Sein	100	2-4	apoptose	inhibe la voie NF κ B

(118,119)	Cur Gen	SK-N-MC	neuroblastome				
Veerarag -havan (120)	Cur Rse Nle	MiaPaCa-2 BxPc3 Panc-1	pancréas	50-100	10	apoptose	inhibe la voie NFκB
Assad (121)	Cur R Eg	HeLa	col	50	2	ND	Inhibe la voie Akt-mTor
Javvadi (122)	Cur	HeLa	col	10	2-15	ND	augmentation des ROS activation de ERK1/2 pas d'effet sur la voie NFκB ni AKT
Calaf (123)	Cur	MCF-10F	sein	15-60	α 150ke V	apoptose	augmente cleaved PARP
Hsu (124)	Cur	Hep3B, HepG2 (CHC)	CHC	0-50	0-10	apoptose	Inhibe la voie NFκB
Wang (125)	Cur	CNE2 (orl)	ORL	ND	2	ND	modification de l'expression d'ARN non codants
Pan (102)	T83 (Cur)	CNE1 CNE2	ORL	0,5	4-8	apoptose	arrêt du cycle en G2M, inhibe jab1
Qiao (126,127)	Cur	Nawalma Raji Ramos	Burkitt LMNH	2 20 50	5	apoptose	bloque PI3K/AKT inhibe NFκB
Sandur (128)	Cur	HCT116, HT29	colon	25	2-6	apoptose	inhibe NFκB inhibe AKT
Jayakumar (101)	DIMC (Cur)	A549 MCF7 PC3	Poumon Sein Prostate	2,5 5 10	2-4	apoptose	Augmentation des ROS Inhibe DNA repair
Chendil (129)	Cur		prostate	2-4	5	apoptose	Diminue TNFα et NFκB
Naumann (130)	S	BxPc3, AsPC- 1 Panc-1, MiaPaca2	pancréas	1-10	2,6	ND	bloque le cycle cellulaire en G2M augmente les dommages à l'ADN inhibe la transcription de <i>KU70</i> , <i>KU80</i> , <i>XRCC4</i>

Cur : curcumine, DIMC et T83 sont des analogues de la curcumine, R : resvératrol, Eg :

Pip : pipérine, Rse : raspberry extract, Nle: Neem Leaf extract , Gen: génistéine (isoflavone de soja)

(2) **Radiosensibilisation *in vivo***

Les études *in vivo* sont moins nombreuses et hétérogènes tant dans les doses de BFCs utilisées que dans les schémas d'irradiation. Deux études montrent une augmentation de la survie de souris traitées par les BFCs et interprètent cette amélioration de la survie comme en rapport avec l'effet anti-tumoral, or ces deux études utilisent de faibles doses de resvératrol (100 μ M) et de curcumine (10 μ M) respectivement, ce qui pourrait correspondre à un effet radioprotecteur vis-à-vis des tissus sains (tableau 5).

Tableau 5 : Radiosensibilisation par les BFCs in vivo et mécanismes impliqués

Ref	BFC	Lignée C	Souris	BFC	RT (Gy)	effet	Mort cellulaire	Mécanisme
WANG (131)	R	GBM-CSClike glioblastome	balbc- nude	150mg/kg ip, 1j/2	6 J3-J9	R+RT diminue sign volume T/RT	autophagie apoptose	ND
YANG (132)	R	GBM-CSClike glioblastome	SCID- balbc (ortho)	100 µM	0-10	R ou STAT3i diminuent le volume T/Ct Augmente la survie des souris	apoptose, pas d'autophagie	Inhibe IL6 et en aval STAT3
Venier (94)	C	PC3, LNCap, DU145 Prostate	nu/nu	5 mg/kg gavage 1j/2	6	RT+C diminue volume et masse T/RT seule	apoptose	inhibition de NFκB
LIU (133)	Cur	œsophage	NPG	10µM/j 12j	20/ 3fr/4j	augmente la survie des souris irradiées (163 j/55) RT +cur diminuent masse T/CT	Radioprotection ?	inhibition de NFκB
YANG (134)	Cur	HT29 colon	balbc- nude	20 mg/kg ip/j	10 X2/s	Cur+RT diminuent volume T/RT	apoptose	Modifie l'expression de gènes de réparation
LI (135)	Cur	ACHN rein	balbc nude	25mg/kg IP/j	2/j pdt 5j	Cur+RT diminuent volume T et masse T vs RT seule ou cur	apoptose	inhibition de NFκB
MENG (136)	Cur	U251 glio	balbc- nude (ortho)	60mg/kg	18 stereo	diminution de volume T / RT RT induit EMT inhibée par cur	ND	inhibition de Hedgehog signaling pathway
FAN (137)	Cur	LN229 orl	balbc- nude	50, 100 et 150mg/kg IP pdt 7 j	4 x3 1j/2	Cur+RT diminuent masse T vs RT seule	ND	Inhibe MDR1
KUNNU MAKARA (138)	Cur	HCT116 colon	nu/nu	1G/kg per os	4 2x/s	Cur +RT augmentent le temps jusqu'à reprogression tumorale	angiogénèse	inhibe NFκB inhibe l'angiogénèse
SHEHZAD (139)	Cur Pip	HCT-15 Colon B16F10 melanome	C57- BL6	500mg/kg 50mg/kg	5 à J21	Cur +RT diminuent volume T/cur ou pip ou RT	Apoptose ROS	Génération ROS Inhibe Prp4K
REN (140)	S	CHC	balbc nu/nu	40 µM/j	4 /j	effet sur les volumes T	apoptose	inhibe NFκB

R : resvératrol, C : capsaïcine, Cur : curcumine, Pip : piperine, S : sulforaphane, RT: radiothérapie, CT: contrôle, T: tumoral

(3) Mécanismes impliqués dans la radiosensibilisation

(a) Effet pro-oxydant et production de ROS

La première hypothèse relative aux mécanismes de la radiosensibilisation induite par les BFCs est liée à leur effet pro-oxydant et à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Ces ROS s'ajouteraient aux radicaux libres issus de la radiolyse de l'eau secondaire à l'irradiation, aboutissant à un stress oxydant irréversible, augmentant les dommages à l'ADN, aux protéines et aux lipides. Tak et al. ont montré qu'un traitement par resvératrol (polyphénol) et pipérine (alcaloïde) augmentait l'apoptose et la mort cellulaire induite par l'irradiation d'une lignée tumorale murine CT26 (colon). Le niveau de ROS intracellulaires était augmenté non seulement dans les cellules traitées par irradiation comparées aux contrôles, mais également de façon significative dans les cellules traitées par BFCs et irradiation comparées aux cellules irradiées (117). Enfin, les niveaux de glutathion, qui fait partie des antioxydants intracellulaires, était significativement diminués dans les cellules traitées par resvératrol et pipérine comparées aux contrôles. De même la curcumine est responsable d'une augmentation significative de ROS en association à l'irradiation de la lignée tumorale HeLa (cancer du col utérin), alors que l'ajout de N acétyl-cystéine qui agit comme ROS-scavenger, inhibe cette production de ROS et diminue la radiosensibilisation induite par la curcumine (122).

(b) Modulation de l'apoptose

L'apoptose est une des voies de mort cellulaire induite par l'irradiation. Elle est fortement augmentée par l'ajout de BFCs dans la vaste majorité des études publiées *in vitro* et *in vivo*. Elle est mise en évidence par immunohistochimie (Ac anti-cleaved-caspase 3) 1h après l'irradiation de cellules tumorales prostatiques et augmentée significativement par l'ajout de resvératrol, ou sur le plan morphologique par l'apparition d'aberrations nucléaires, de micronoyaux ou de noyaux polylobés (109). Elle est mise en évidence également par une augmentation de l'expression de ses marqueurs comme cleaved caspase 3, ou du rapport bax/bcl2 (augmentation de bax pro-apoptotique et diminution de bcl2, anti-apoptotique). Enfin la modification du potentiel de membrane mitochondrial par les ROS, associé à l'ouverture de larges pores dans la membrane mitochondriale déclenchant l'apoptose, a également été mise en évidence (117).

(c) Effets sur le cycle cellulaire

Dans les études qui s'intéressent aux effets sur le cycle cellulaire, les résultats sont hétérogènes. La radiothérapie induit un arrêt du cycle cellulaire en G2M, qui peut être majoré par les BFCs. Ainsi le sulforaphane associé à l'irradiation augmenterait le nombre de cellules en G2M comparé à l'irradiation seule sur des lignées tumorales pancréatiques Panc-1, MiaPaCa-2, BxPc3 et AsPC-1 (130).

D'autres études au contraire constatent une modification de l'arrêt du cycle cellulaire induit par la radiothérapie. Dans l'étude de Rashid sur les lignées tumorales prostatiques, l'irradiation induisait un arrêt en G2-M alors que l'ajout de resvératrol empêchait cet arrêt en G2M, mais accumulait les cellules en phase G1-S et augmentait d'un facteur 2 la population de cellules en sub-G1, témoignant d'une induction de l'apoptose (109). Ce résultat est conforté par la mise en évidence d'une induction par l'irradiation de l'expression de p53 et des inhibiteurs des cyclines dépendantes kinases (CDKI) p21 et p 27, induction augmentée par l'ajout de resvératrol.

(d) Modulation de la réparation de l'ADN

Les traitements par BFCs augmentent les dommages à l'ADN comme peuvent en attester les marquages par l'anticorps anti-phospho- γ H2AX en immuno-histochimie. Le sulforaphane multiplie par un facteur 3,5 ce marquage 12h après l'irradiation de lignées tumorales pancréatiques, comparé à l'irradiation seule (130). De plus, ce marquage persiste 24h après le co-traitement alors qu'il disparaît dans les cellules traitées par radiothérapie seule, témoignant de la persistance des dommages non réparés. Par ailleurs, les niveaux de protéines Ku70, Ku80 et XRCC4, impliquées dans le processus de réparation Non Homologous End Joining (NHEJ) étaient diminués en cas de traitement par sulforaphane suggérant une inhibition de l'expression des gènes impliqués dans la réparation (130). Enfin dans l'étude de Wang, une augmentation significative des dommages à l'ADN est mise en évidence par le test des comètes 3h après resvératrol et irradiation d'une lignée cellulaire humaine de cellules souches de gliome (GSC-SU2) comparée à l'irradiation seule. Cette augmentation significative est maintenue 12h après l'irradiation uniquement pour les cellules co-traitées, suggérant selon les auteurs une inhibition de la réparation de l'ADN. Néanmoins, cette étude met également en évidence une augmentation de l'apoptose précoce et tardive par marquage à l'annexin V. Il est possible que la persistance de la queue de la comète 12h après l'irradiation soit due aux fragments apoptotiques et ne soit pas le témoin d'une inhibition de la réparation de l'ADN. Enfin une inhibition de phosphorylation d'ATM, est mise en évidence *in vitro* dans une étude montrant la radiosensibilisation par la curcumine de la lignée tumorale rénale ACHN, or la phosphorylation d'ATM est une des premières étapes de la réparation de l'ADN.

(e) Autophagie

Dans l'étude de Wang, le resvératrol a un effet radiosensibilisant dans un modèle préclinique de glioblastome non seulement par un mécanisme d'induction de l'apoptose mais également par autophagie, mise en évidence par les produits de clivage LC3B-I et II *in vitro* et *in vivo*. De plus, l'examen en microscopie électronique des coupes de tumeurs montre des autophagosomes caractéristiques(131). Par contre, ce mécanisme d'autophagie n'est pas retrouvé avec des doses plus faibles de resvératrol dans une autre étude (132). L'autophagie peut également être induite par le sulforaphane, mais ce mécanisme n'a pas été recherché en association avec l'irradiation (96).

(f) Modulation des voies de radiorésistance

(i) Voie Akt-mTor

La voie Akt-mTor est constitutivement activée dans les cancers du col de l'utérus HPV induits. Elle provoque la transcription de gènes pro-survie et inhibe la transcription de gènes impliqués dans l'apoptose (109). Elle peut être inhibée par le resvératrol : la phosphorylation d'Akt est constatée 1h après irradiation de lignées tumorales prostatiques et s'accompagne d'une phosphorylation de mTor. Le traitement par resvératrol à 2,5 ou 5 μ M ajouté à l'irradiation réduisait significativement ou empêchait la phosphorylation d'Akt (109). Or la phosphorylation d'Akt peut être régulée par ATM : l'utilisation d'un inhibiteur de la phosphorylation d'ATM (KU55933) inhibait non seulement la phosphorylation d'ATM induite par l'irradiation mais également la phosphorylation d'Akt. De façon paradoxale dans cette étude, la phosphorylation d'ATM et de son substrat H2AX, puis la phosphorylation d'AMPK induite entre 1h et 4h après irradiation étaient significativement augmentées par le resvératrol. Cependant, les images de western-blot fournies par les auteurs ne montrent pas une différence franche de P-ATM ou P-APMK en présence de resvératrol (109). Cette inhibition de la voie Akt-mTor par le resvératrol est retrouvée également pour les lignées leucémiques (112).

(ii) Voie NF κ B

NF κ B est un médiateur de signaux pro-survie et intervient dans les mécanismes de radiorésistance de nombreuses tumeurs (141). Il est activé par l'irradiation qui provoque une dissociation de NF κ B et de par phosphorylation de I κ k, et translocation dans le compartiment nucléaire où NF κ B régule l'expression de gènes impliqués dans la prolifération, la différenciation et le contrôle du cycle cellulaire comme Bcl-xL (anti-apoptotique), cyclin D1, matrix metalloproteinase 9 (MMP-9), vascular endothelial growth factor (VEGF) et COX-2 (142). Il est également activé constitutivement dans les cellules de cancer colorectal, mais pas dans les cellules saines (143). La curcumine est connue pour

supprimer l'activation de NFκB (144) et cette inhibition est impliquée dans la radiosensibilisation dans plusieurs études *in vitro* (119). Elle n'est pas exclusivement liée à la curcumine et a été également retrouvée liée à la radiosensibilisation par le resvératrol et la génistéine, notamment sur la lignée tumorale MCF-7 (sein) en conditions d'hypoxie (118), et à la capsaïcine sur plusieurs lignées tumorales prostatiques (94). L'étude par qPCR montre une expression fortement augmentée de 53 gènes pro-survie, induite par l'activation de NFκB par l'irradiation, alors qu'elle est inhibée par les traitements par curcumine, resvératrol ou génistéine (118). Des résultats similaires ont été mis en évidence avec l'extrait de framboise noire et la feuille de margousier en radiosensibilisation de lignées tumorales pancréatiques MiaPaCa-2, Panc-1 et BxPc3 (120). Par contre, cette inhibition de la voie NFκB n'est pas retrouvée lors du traitement par curcumine et radiothérapie de la lignée tumorale HeLa (cancer du col utérin) (122).

(i) Voie STAT3

Le Signal Transducer and Activator of Transcription STAT3 est activé constitutivement dans de nombreux cancers (prostate, sein, leucémie, myélome, ORL). Il intervient dans l'expression de gènes qui suppriment l'apoptose, régulent le cycle cellulaire, l'invasion et l'angiogénèse (145). La voie de signalisation STAT3 est connue pour contribuer à la progression tumorale et à la survie de cellules souches de gliome. La présence de STAT3 augmente d'ailleurs avec le grade des gliomes. Il est activé par phosphorylation par la protéine Jak (famille des tyrosine kinases), liée à l'IL6. La radiosensibilisation par le resvératrol de lignées cellulaires de glioblastome CD33+, avec des propriétés de cellules souches, passerait par l'inhibition de STAT3 (111). Ce mécanisme est retrouvé *in vivo* par une seconde équipe, et serait secondaire à une diminution d'IL6 (132).

Nous proposons un schéma récapitulatif simplifiant les différents mécanismes impliqués dans la radiosensibilisation des BFCS (figure 8).

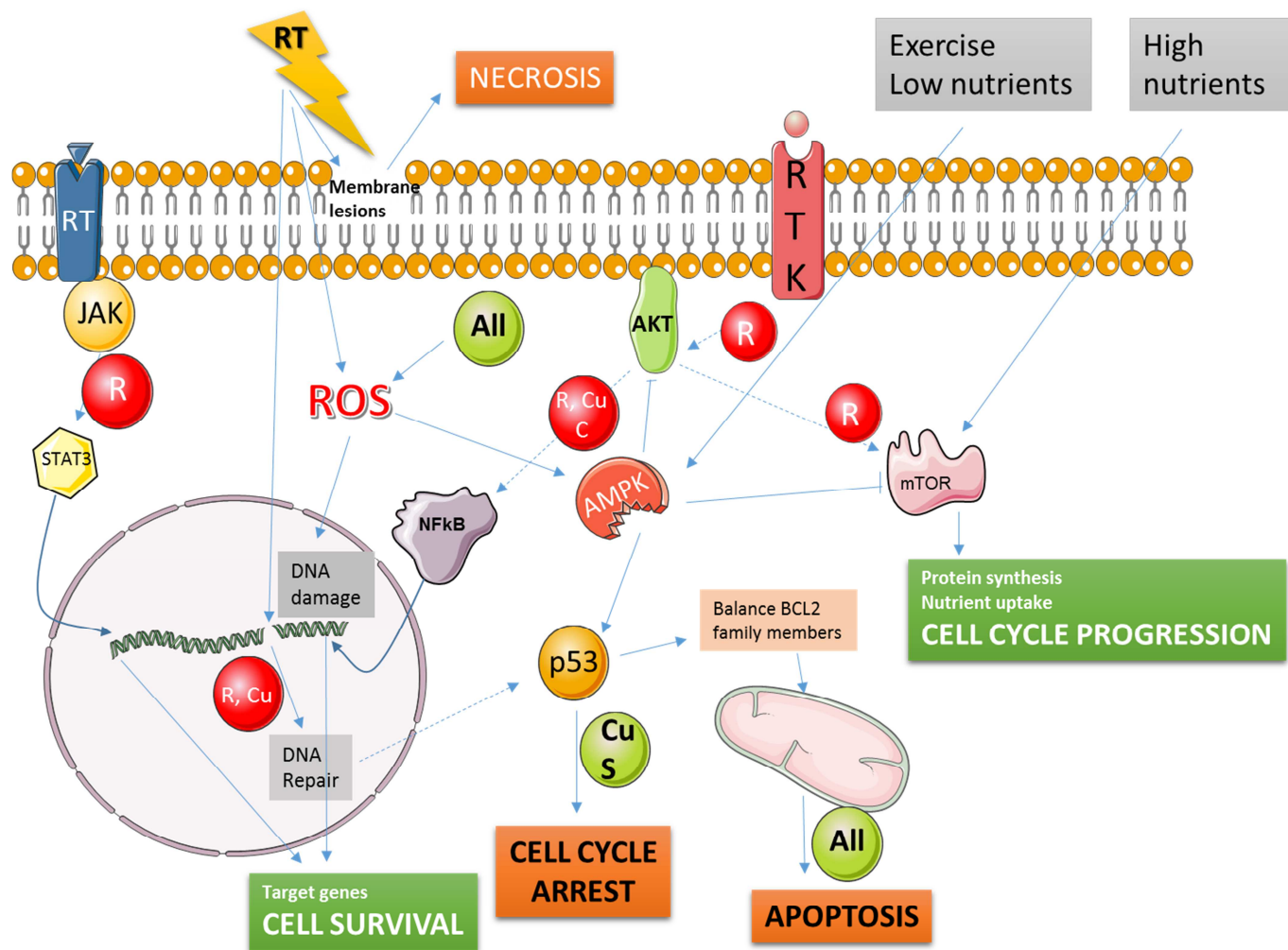


Figure 8 : schéma récapitulatif des principaux mécanismes identifiés dans la radiosensibilisation par les BFCs. Les voies de signalisation aboutissent à différents effets pro-survie (rectangle vert) ou de mort cellulaire (rectangle orange). Les flèches signifient une activation (en pointillé lorsque cette activation passe par différentes étapes non montrées). Les traits avec une barre signifient une inhibition. Les BFCs sont notés en rouge quand ils inhibent un mécanisme ou en vert lorsqu'ils l'activent R : resvératrol, Cu : Curcumine, S : sulforaphane, C : Capsaïcine.

I.F.6.b. Effets antioxydant et radioprotecteur

De manière intéressante, il existe des études évaluant l'effet radioprotecteur des BFCs. La première hypothèse est que la majorité des BFCs ont des effets antioxydants à faible dose qui pourraient neutraliser les radicaux libres induits par l'irradiation (146). Néanmoins d'autres mécanismes ont été mis en évidence comme un retard à la division cellulaire laissant suffisamment de temps pour la réparation des dommages à l'ADN (figure 9) (147). Parmi les BFCs étudiés, un intérêt particulier a été porté aux flavonoïdes notamment les isoflavones de soja avec la génistéine, l'épicatéchine du thé vert, l'apigénine et la quercétine (146). Ainsi dans un modèle préclinique de tumeur bronchique non à petites cellules, la génistéine à 50mg/kg/j pendant 30 jours diminuait les lésions de pneumopathie radique après une irradiation de 12 Gy, tout en augmentant l'effet anti-tumoral (148). Le même type d'effet a été également montré *in vivo* avec la silibinine (flavonoïde issu du chardon) (149).

Un effet radioprotecteur intestinal a été montré chez des souris traitées par resvératrol donné quotidiennement à la dose de 40 mg/kg 1 jour avant et 5 jours après irradiation abdominale (7 Gy) (150). La même équipe a montré que le resvératrol à la dose de 20 mg/kg/j 7 jours avant et jusqu'à 30 jours après irradiation (6 ou 7,2 Gy) pouvait induire une protection hématopoïétique en réduisant l'aplasie aiguë provoquée par une irradiation corporelle totale et en préservant les cellules souches, gardant par la suite leur capacité de greffe (151). Cette protection était liée à une diminution des ROS et à l'activation de SIRT1. Enfin, certains ont montré que la quercétine pouvait réduire la fibrose cutanée dans un modèle de souris C3H/HeN irradiée focalement à la dose de 35 Gy, en réduisant l'expression de TGF β , suggérant un action préventive vis-à-vis des toxicités tardives (152). De même la curcumine a montré des effets radioprotecteurs cutanés en préclinique en réduisant l'expression de cytokines(IL-1 IL-6, IL-18, TNF α et TGF β) (153).

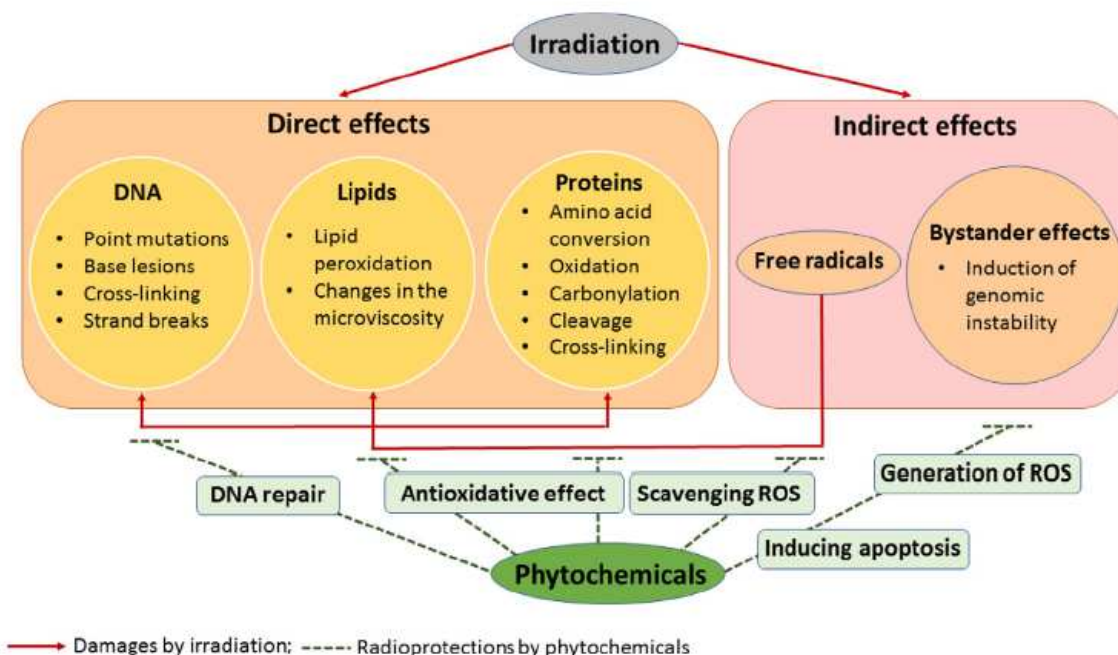


Figure 9 : Dommages cellulaires liés à l’irradiation et mécanismes de protection induits par les BFCs.(146). Les flèches rouges représentent les effets de l’irradiation alors que les traits en pointillés vert représentent les effets radioprotecteurs induits par les BFCs.

Plusieurs essais cliniques évaluant un effet radioprotecteur des BFCs sont publiés, mais sont de qualité très inégale. Des pistes semblaient intéressantes dans la prévention des radioépithélites cutanées par une association de resvératrol, lycopène, vitamine C et anthocyanine (Ixor®) ou par la curcumine (154), suggérant une diminution des symptômes dans les groupes traités, mais sans randomisation ou sans double aveugle. La seule étude de grande ampleur qui a évalué la curcumine en prévention de la radioépithélite chez 686 patientes et avec une méthodologie rigoureuse n’a pas montré l’effet escompté (155).

1.F.6.c. Effet différentiel entre cellules tumorales et cellules saines

Il semble que l’effet différentiel entre cellules tumorales et cellules saines soit lié à l’effet anti ou pro-oxydant des BFCs, dépendant avant tout de leur concentration. Par exemple, des concentrations élevées de curcumine (>50 µM) entraînent la production de ROS (156,157) alors que de faibles doses (de l’ordre de 10 µM) diminuent la production de ROS (158). De même, le resvératrol connu pour ses effets antioxydants à faible concentration, peut avoir des effets pro-oxydants dépendant de la

concentration mais également du pH, par un mécanisme d'auto-oxydation (107). Cet effet-dose pourrait être majoré par une accumulation des BFCs ou de leurs métabolites au niveau des tissus tumoraux, par des mécanismes d'efflux différents ou des métabolismes cellulaires différents (100). Enfin, les effets radioprotecteurs ou au contraire radiosensibilisant peuvent dépendre du cycle cellulaire : ainsi, la curcumine et le *trans*-resvératrol aux mêmes concentrations avaient un effet radiosensibilisant pour les lymphocytes en cycle et radioprotecteur pour des lymphocytes en phase G0 (159).

I.F.7. BFCs en essai clinique

Alors que les études précliniques sont nombreuses, il y a encore peu d'études cliniques évaluant les BFCs en prévention ou en traitement des cancers, et encore moins d'essais thérapeutiques randomisés contre placebo en double aveugle (100,160).

La plupart des études publiées sont des essais de phase 1 ou 2 évaluant la dose maximale tolérée ainsi que la biodisponibilité des produits. A cet égard, plusieurs études ont évalué le resvératrol ou un analogue micronisé (SRT501) avant intervention chirurgicale pour cancer du côlon ou métastases hépatiques de cancer du côlon, et retrouvaient une concentration jugée suffisante pour obtenir un effet clinique au niveau des tissus tumoraux (100,161). De façon intéressante, un essai a évalué un traitement quotidien par curcumine pendant un an contre placebo en prévention de la récurrence de polypes chez des patients suivis pour polypose adénomateuse familiale : si le traitement par curcumine était bien toléré, il ne permettait pas de diminuer l'incidence des polypes ni leur taille (162).

Parmi les essais bien conduits, randomisés en double aveugle contre placebo, deux essais ont évalué le sulforaphane (60 mg/j) ou une combinaison de curcuma, grenade, thé vert, brocoli (curcumine, épicatechine, sulforaphane, acide ellagique et quercétine) chez des patients en récurrence biologique après traitement local d'un cancer de prostate (163,164). Ces deux essais ont montré une différence significative de temps de doublement du PSA en faveur des groupes traités par BFCs, qui sont encourageants mais nécessitent d'être confirmés sur de plus grandes cohortes de patients.

Un seul essai clinique a évalué l'effet radiosensibilisant d'une association de curcumine (3g/j) versus placebo, à une irradiation à la dose de 74 Gy pour cancer de la prostate, et a évalué le statut oxydant des patients par le dosage d'enzymes anti-oxydantes (superoxyde dismutase, catalase et glutathion peroxydase). Le traitement par curcumine associé à l'irradiation était bien toléré, il était associé à une augmentation des enzymes anti-oxydantes, mais aucune différence de taux de PSA n'était

constatée. Par contre de nombreux essais cliniques ont évalué l'effet radioprotecteur de BFCs sur la toxicité cutanée ou muqueuse liée à l'irradiation (146): la curcumine notamment a soulevé des espoirs (165,166). Cependant le seul essai randomisé puissant (686 patientes) en double aveugle contre placebo évaluant l'effet de la curcumine sur la toxicité cutanée induite par l'irradiation de cancer du sein n'a pas confirmé les effets radioprotecteurs attendus (167).

Parallèlement à l'augmentation exponentielle des publications précliniques sur BFCs et cancers, une recherche sur clinicaltrials.gov montre que le nombre d'essais cliniques explose également. Parmi les essais à suivre, l'essai POUDER évalue un traitement par sulforaphane associé à la chimiothérapie palliative chez des patients traités pour cancer du pancréas localement avancé (ID NCT01879878) (99), un essai dans les cancers du rectum évalue la radiosensibilisation par la curcumine, malheureusement avec un objectif primaire inatteignable de doublement du taux de stérilisation complète (ID NCT00745134)

II. Chimiosensibilisation de l'adénocarcinome pancréatique par les BFCs

Accepted Manuscript

Resveratrol and capsaicin used together as food complements reduce tumor growth and rescue full efficiency of low dose gemcitabine in a pancreatic cancer model

Véronique Vendrely, Evelyne Peuchant, Etienne Buscail, Isabelle Moranvillier, Benoit Rousseau, Aurélie Bedel, Aurélie Brillac, Hubert de Verneuil, François Moreau-Gaudry, Sandrine Dabernat

PII: S0304-3835(17)30017-4

DOI: [10.1016/j.canlet.2017.01.002](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.01.002)

Reference: CAN 13182

To appear in: *Cancer Letters*

Received Date: 1 September 2016

Revised Date: 16 December 2016

Accepted Date: 8 January 2017

Please cite this article as: V. Vendrely, E. Peuchant, E. Buscail, I. Moranvillier, B. Rousseau, A. Bedel, A. Brillac, H. de Verneuil, F. Moreau-Gaudry, S. Dabernat, Resveratrol and capsaicin used together as food complements reduce tumor growth and rescue full efficiency of low dose gemcitabine in a pancreatic cancer model, *Cancer Letters* (2017), doi: 10.1016/j.canlet.2017.01.002.

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.



Resveratrol and capsaicin used together as food complements reduce tumor growth and rescue full efficiency of low dose gemcitabine in a pancreatic cancer model

Véronique Vendrely^{2,3*}, Evelyne Peuchant^{1,2,3*}, Etienne Buscaïl^{1,2,3}, Isabelle Moranvillier^{1,2}, Benoit Rousseau¹, Aurélie Bedel^{1,2,3}, Aurélia Brillac^{1,2}, Hubert de Verneuil^{1,2,3}, François Moreau-Gaudry^{1,2,3} and Sandrine Dabernat^{1,2,3,&}

¹ Université de Bordeaux, Bordeaux, France

² INSERM U1035, Bordeaux, France

³ CHU de Bordeaux, Bordeaux, France

*Equal contributions

Running title: BFC combination therapy in pancreatic cancer

&Corresponding author:

Université de Bordeaux

INSERM U1035

146, rue Léo Saignat

33076 Bordeaux Cedex

Email: sandrine.dabernat@u-bordeaux.fr

Phone: +33(0) 5 57 57 92 55

Fax: +33(0) 5 57 57 13 74

Key words (5 max): pancreatic cancer, resveratrol, capsaicin, sulforaphane, bioactive food component

Abbreviations:

PDAC: Pancreatic ductal adenocarcinoma

BFCs: Bioactive Food Components or Compounds

BITC: Benzyl Isothiocyanate

ROS: Reactive Oxygen Species

CSC: Cancer Stem Cell

PDX: Patient Derived Xenograft

FOLFIRINOX: Association of Oxaliplatin, Irinotecan and 5 Fluorouracile

IC50: Half maximal inhibitory concentration

CI: Combination Index

C: Capsaicin

R: Resveratrol

S: Sulforaphane

P: Piceatannol

G: Gemcitabine

MAP kinase: Mitogen Activated Protein kinase

TRPV: Transient Receptor Potential cation channel Vanilloid

HIGHLIGHTS

BFCs used in combination are highly toxic to pancreatic tumor cells but spare healthy cells.

Resveratrol analogues and capsaicin treatment diminishes tumor mass *in vivo*.

BFCs combinations potentiate chemotherapy in pancreatic cancer preclinical model.

BFCs rescue full efficiency of chemotherapy when gemcitabine dose is lowered by 1/3rd.

BFCs could be used as nutrition complements during pancreatic adenocarcinoma therapy.

ABSTRACT

Pancreatic adenocarcinoma, highly resistant to all current anti-cancer treatments, necessitates new approaches promoting cell death. We hypothesized that combined actions of several Bioactive Food Components (BFCs) might provide specific lethal effect towards tumor cells, sparing healthy cells. Human tumor pancreatic cell lines were tested *in vitro* for sensitivity to resveratrol, capsaicin, piceatannol, and sulforaphane cytotoxic effects. Combination of two or three components showed striking synergetic effect with gemcitabine *in vitro*. Each BFC used alone did not affect pancreatic tumor growth in a preclinical *in vivo* model, whereas couples of BFCs had anti-tumor activity. In addition, tumor toxicity was similar using gemcitabine alone or a combination of BFCs and two thirds of gemcitabine dose. Moreover, BFCs enhanced fibrotic response as compared to gemcitabine treatment alone. Reactive oxygen species (ROS) and apoptosis increases were observed, while cell cycle was very mildly affected. This study raises the possibility to use BFCs as beneficial food complements in the therapy of pancreatic adenocarcinoma, especially for patients unable to receive full doses of chemotherapy.

1. INTRODUCTION

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is the 4th cause of cancer mortality in occidental countries [1]. At the time of diagnosis 5-year survival is very limited (1 to 4%). Surgical resection offers the best chances of survival but is possible for only less than 20 % of the patients, since pancreatic cancers are often diagnosed at advanced stages. However, even resectable PDACs display a high rate of recurrence [2]. Systemic chemotherapy includes the nucleoside analog gemcitabine, and more recently the association of oxaliplatin, irinotecan and 5 Fluorouracile (FOLFIRINOX) or nab-paclitaxel but with limited efficiency [3,4]. Extensive efforts have been made to identify adjuvant or neoadjuvant therapies capable of improving the poor prognosis of PDAC, based on the molecular targets involved in cancer progression, such as *KRAS* or *TP53*. Unfortunately, phase III studies of targeted therapies in combination with gemcitabine have shown limited or even no improvement in patient survival [5]. Other non-chemotherapy approaches such as radiotherapy, targeted therapies and non-conventional therapies have also failed to produce valuable clinical benefits [6]. Even the recent hope residing in metformin failed to improve the outcome of patients with locally advanced or metastatic pancreatic cancer [7]. Thus, there is still an urgent need to find new therapeutic options to help manage this deadly cancer.

Bioactive food components (BFCs) are physiologically active constituents in foods or dietary supplements, including those needed to meet basic human nutrition needs, that have been demonstrated to have a role in health and to be safe for human consumption in intended food and dietary supplement uses (as to the American Dietetic Association). Some can have direct antitumor effects or be valuable as cancer preventing agents. They seem to be efficient because they can control both the apoptosis response and the metabolic pathways of the cancer cells [8]. Moreover they affect cancer stem cell (CSC) maintenance by inhibiting several CSC-promoting pathways, limiting self-renewal and inducing differentiation and apoptosis [9]. Resveratrol, capsaicin and isothiocyanates BFCs are of particular interest in the field since: (i) they were already tested as single

BFC combined with conventional treatment, (ii) they induce strong oxidative stress, (iii) they were already evaluated in clinical trials and (iv) they were tested on pancreatic cancer models.

Resveratrol is a polyphenol, belonging to stilbenes, involved in the so-called “French paradox” and has been extensively analyzed as a protective or therapeutic agent [10]. In pancreatic cancer models, resveratrol was shown to exert an antitumor effect synergistic with gemcitabine [11]. Many other *in vitro* and clinical studies have been conducted involving anticancer activity of resveratrol through many cellular pathways [1,12], including increased reactive oxygen species (ROS) production [2,13]. In the KRAS^{G12D} mice, a model of spontaneous pancreatic adenocarcinoma, resveratrol treatment over a 10-month period reduced pancreatic lesions compared with mice that did not receive resveratrol treatment, indicating that resveratrol reduced spontaneous pancreatic tumors [3,4,14]. Several clinical trials have shown that resveratrol can be safe and reasonably well-tolerated at doses of up to 5 g/day [5,15]. Capsaicin, found in hot peppers, is an alkaloid that has been used to treat pain and inflammation. It is used in human, mostly as a pain reliever [6,16]. Like resveratrol, capsaicin suppresses the growth of cancer cells by NF-κB inactivation, ROS generation [7,17-19]. Moreover, young LSL-Kras^{G12D}/Pdx1-Cre mice treated with a single dose of caerulein develop pancreatic cancer lesions. This is significantly reduced when they are fed daily for eight weeks with capsaicin [8,20]. The isothiocyanates found in cruciferous vegetables such as broccolis, cabbages or cauliflower have well-documented anticancer activities. For example, benzyl isothiocyanate (BITC) reduces pancreatic cancer tumor growth by ways common to resveratrol and capsaicin such as NF-κB inhibition [9,21] or ROS induction [10,22], but also through antiangiogenic effect dependant on STAT3 [11,23]. The isothiocyanate sulforaphane sensitizes pancreatic CSCs to chemotherapy by inhibiting their self-renewal potential, apoptosis resistance and NF-κB activity [24,25]. A prospective clinical trial with sulforaphane-enriched broccoli sprout extracts is ongoing in Germany to examine its action on pancreatic cancer treatment (ClinicalTrials.gov Identifier NCT01879878, Trials 2014, 15:204).

Most of the studies reporting antitumor action of BFCs evaluated them as a unique component used with the conventional drug for the cancer model. In this work, we attempted to evaluate whether combinations of BFCs could exert enhanced anticancer activity with or without conventional treatment *in vitro* and in a preclinical xenograft model.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Animals, pancreatic cell lines and antibodies, tissue specimens

The 8 to 12 week-old NOD/Shi-SCID IL2R γ null mice (NSG) were produced and housed at the University of Bordeaux animal facility A2, according to the rules and regulations of the Institutional Animal Care and Use Committee (agreement number A33063916). Pancreatic cell lines origins have been described earlier [26]. Genomic *KRAS* PCR amplification and sequencing were carried out to control the identity of the cells [27]. Human fibroblasts were obtained from mammoplasties after the patients have given consent. MCF7 cells were obtained from the ATCC (Teddington, United Kingdom). The BXPC-3 and CAPAN-2 were maintained in RPMI (Invitrogen, Saint Aubin, France) with 10% Fetal Calf Serum (FCS, Invitrogen) with Penicillin/Streptomycin 1/100 (Invitrogen). Human fibroblasts, MiaPaCa-2 and PANC-1 cells were maintained in DMEM with 10% FCS and 1/100 Penicillin/Streptomycin (Invitrogen). The HPNE cells were maintained in 75% DMEM 1g/L glucose, 25% M3 Base Medium (Fisher Scientific, Illkirch, France) 10 ng/mL of Epidermal Growth Factor (Sigma Aldrich, Lyon, France), 10% FCS and 2 mM of L-glutamine (Invitrogen). Resveratrol (R), sulforaphane (S), capsaicin (C) and BITC were from Sigma Aldrich. Piceatannol (P) was purchased from Enzo life sciences (Villeurbanne, France) and Gemcitabine (Gemzar $\text{\textcircled{C}}$, Lilly, Neuilly-sur-Seine, France) at the pharmacy of Bordeaux University hospital.

2.2 *In vitro* cell survival assay

Cells were plated at 3×10^3 cells per well in 96-well plates. The day after, increasing doses of BFCs or combinations of BFCs at their IC50 with or without gemcitabine (G) were applied and cells were kept

in culture for 48h. Each point was done at least in quadruplet. The experiments were carried out more than 3 times. Cells were washed with PBS and treated with MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) solution (Promega, Charbonnières, France) for 1.5h to determine cell viability by reading optical densities (OD) at 490nm. Results are expressed as cell viability: $(OD_{\text{treated}}/OD_{\text{untreated}}) \times 100$. Cells were grown in 96-well plates, then stained and fixed with 0.5% crystal violet solution in methanol for 15 minutes at room temperature. Cells were washed twice in PBS, air-dried and observed with an inverted microscope.

2.3 Isolation of RNA, cDNA synthesis, PCR Analysis for *KRAS* mutational status and protein extraction and western-blotting

Total RNA was isolated using Trizol® and treated by DNase according to the manufacturer's instructions (Invitrogen and Ambion, Saint Aubin, France). cDNAs were synthesized using Reverse transcriptase cDNA synthesis kit (Roche Applied Science, Meylan, France). PCRs for *KRAS* were carried out with the Promega PCR master mix (Promega) [28]. Protein extracts and western blotting were performed as already described [26]. At least 3 independent blots were performed for each protein.

2.4 Cell cycle analysis, apoptosis detection and ROS detection

Cell cycle analyses were performed as already described [26]. Apoptosis was revealed by FITC-Annexin V staining of the cells (Apoptosis Kit, Beckman Coulter) followed by detection by flow cytometry. For ROS detection, cells were seeded in 12-well plate (2×10^5 cells per well), then treated with single BFCs or combinations at their IC50 for 3h. Cells were washed in PBS and incubated for 30 minutes à 37°C with DCFH-DA (Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate, 10µM, Invitrogen). Stained cells were evidenced by fluorescent microscopy.

2.5 Xenografts of the CAPAN-2 cells

Mice were injected subcutaneously with 8×10^5 cells in 100 µl serum-free medium in the right and the left flanks. When tumors were visible, measures with a caliper were done 3 times a week. When

the tumors reached about 100 mm³, mice were treated by BFCs and/or gemcitabine 3 times a week during 3 weeks. Gemcitabine was diluted in PBS and injected intraperitoneally and BFCs diluted in ethanol were given by gavage, with doses as indicated in the legend of figure 6. Control mice were administrated with ethanol (2% v/v in PBS) or PBS. Treatment tolerance was evaluated everyday by observing the mice and using the Lloyds' distress animal scoring system [29]. Tumors were resected and weighed between 19 and 21 days after starting the treatments.

2.6 Statistical analysis

Statistical tests were performed using the Graph-Pad Prism software (6.04, GraphPad). *In vitro* results are expressed as mean \pm SD, analyzed by unpaired, bilateral Student's t tests. Results *in vivo* are expressed as mean \pm SEM, analyzed by 2-tailed Mann-Whitney test.

3. RESULTS

3.1 Combinations of BFCs are very potent to kill pancreatic tumor cell lines *in vitro*

Half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of BFCs were determined on several pancreatic tumor cell lines (BXPC-3, CAPAN-2, MiaPaCa-2 and PANC-1) and on one mammary tumor cell line (MCF7) and compared to toxicity on normal human fibroblasts and Human Pancreatic Normal Epithelial Cells (HPNE). All tumor cell lines were sensitive to the tested BFCs in a dose-dependent manner (Figure 1A to 1D, Table 1). Of note, low doses of all the tested compounds boosted cell survival of fibroblasts, but not tumor cells. Importantly, BFCs used at pancreatic cell line IC₅₀ were not toxic on human fibroblast.

Next, combination treatments were performed in cell culture using the mean IC₅₀ for each BFC, on two of the pancreatic cell lines: the CAPAN-2 and the BXPC-3, and on fibroblasts. BITC combined with either resveratrol or capsaicin was 1.7 and 68 times less toxic than combinations with sulforaphane and triple association was 38 times less efficient (data not shown). So for further examination, only sulforaphane was tested. The best double combination was resveratrol + capsaicin on both tested cell lines since they increased single treatment toxicity without any toxic effect on

fibroblasts (Figure 1E to 1G). Indeed, use of sulforaphane was not necessarily better with resveratrol or capsaicin but was always toxic on fibroblasts (Figure 1G). Treatment with all 3 BFCs maximized the toxicity on the tumor cells but was also deleterious for fibroblasts. Crystal violet staining of the treated cells revealed a diminution of the cell density and a change in cell phenotype, with cells losing their epithelial characteristics (Figure 1H).

3.2 Combinations of BFCs provoke cell accumulation in S phase, induce pancreatic tumor cell death and strongly increase ROS production

Used alone, resveratrol or capsaicin tended to stop the cells in G1 and S phases, respectively, and sulforaphane in G2/M in CAPAN-2 cells (Figure 2). Interestingly, all double or triple combinations induced significant accumulation of cells in the S phase except for C+S. Moreover Annexin V staining revealed an increase in the proportion of positive cells when treated with the combinations, especially the triple one, both in CAPAN-2 and BXPC-3 cells (Figure 3), suggesting that apoptosis is triggered by combination treatments. Moreover, strong reactive oxygen species (ROS) increase was evidenced in the cells when the BFCs were used in double or triple combinations (CAPAN-2 cells, Figure 4).

3.3 Combinations of BFCs synergize with gemcitabine

As double or triple combinations of BFCs were very efficient in killing the tested pancreatic cell lines, we asked whether they could improve gemcitabine toxicity *in vitro*. Combination treatments with gemcitabine were performed for CAPAN-2 and BXPC-3 cell lines, using the IC50 for each BFC and 2 concentrations of gemcitabine (1 and 10 μ M). As shown in Figure 5A, each BFC increased moderately the toxicity of gemcitabine. However, resveratrol, capsaicin and gemcitabine all together killed all the CAPAN-2 cells, regardless of gemcitabine concentration. In BXPC-3 cells, more sensitive to gemcitabine than CAPAN-2 cells, R+C association was more efficient than gemcitabine alone, and treatment with all three compounds did not achieve better toxicity than R+C together (Figure 5B). Combination indexes (CI) were determined with cytotoxicity results obtained at different

concentrations of the BFCs alone or in combination with the CompuSyn software [30] for the CAPAN-2 cells. When CI is close to 1, the drugs displayed additive effects. When $CI < 0.7$, drugs have synergistic actions. When $CI > 1.1$, drugs have antagonist actions. We found that all the associations of BFCs were strongly synergistic *in vitro* on CAPAN-2 cells (Table 2). All the double or triple combinations were synergistic with gemcitabine. Interestingly sulforaphane and gemcitabine achieved an antagonist effect.

3.4 Combinations of BFCs induce reduction of tumor mass and rescue toxicity of low dose of gemcitabine.

To test whether the toxic activity of BFCs was found in growing tumor masses, mice bearing subcutaneous pancreatic tumors were treated with BFCs. The use of resveratrol in cancer treatment applications is hindered by its rapid metabolism and subsequent low bioavailability [31]. This obstacle could be overcome by using piceatannol, which is a naturally occurring hydrostilbene, analogue of resveratrol, but which possibly holds a greater biopotency because of the additional hydroxyl group [32]. Interestingly, piceatannol can suppress tumor growth through regulation of apoptosis [33]. We first validated its cytotoxic activity *in vitro* according to the same protocol used for the other BFCs. We found that piceatannol had a similar IC_{50} value ($67.4 \mu M$) as resveratrol ($73 \mu M$) and exerted cytotoxic activity in a dose-dependent manner and in combination with other BFCs (supplemental Figure 1A and B). Thus we decided to treat the mice with piceatannol at a lower dose (20 mg/kg versus 50 mg/kg) but at the same frequency as for resveratrol, and by the same route. Single treatments (C, R or P) did not affect the end point tumor masses as compared to controls but the combination R+C or P+C displayed a statistically significant 40% drop of tumor mass (Figure 6A), suggesting that both stilbenes in combination with capsaicin had similar antitumor activities. At first, we had decided not to use sulforaphane *in vivo* due to its unspecific cytotoxic activity on fibroblasts *in vitro*, in particular in combination with the other BFCs. However, to promote *in vivo* antitumor effect of the BFCs we decided to treat the mice with the triple combination. Surprisingly,

sulforaphane abrogated the combined effect of piceatannol and capsaicin since no difference in tumor masses was observed in the condition P+C+S as compared to controls (Figure 6A). Thus, we sought to examine whether increasing the amount of BFCs could improve their antitumor activity. The mice were treated with doses three times higher than the initial doses. Increasing the quantity of BFCs was well-tolerated by the mice as they did not show any sign of suffering nor weight loss (data not shown), but it did not improve the antitumor activity of the combination R+C, nor did it reveal an effect of the components used alone (Figure 6B).

Next we examined whether co-treatment of BFCs combinations with gemcitabine negatively impacted tumor masses. When an efficient dose of gemcitabine was used (G_1 , Figure 6C), the addition of R+C or P+C did not improve tumor toxicity. When gemcitabine infusion was reduced by 33% (inefficient dose of gemcitabine $G_{2/3}$, Figure 6C), the tumors tended to be smaller than when BFCs were used in double combinations, but the results did not reach statistical significance. Importantly, efficacy of inefficient dose ($G_{2/3}$) of gemcitabine combined to R+C was equivalent to results obtained with the G_1 efficient dose. Augmented fibrosis levels within the tumor may sign response to treatment by observing that tumor cells have been overgrown by fibrotic stroma [34]. Moreover, fibrosis evaluation by pathologists is a criteria for tumor response to treatment [35-37]. Analysis of histological sections of the tumors revealed an important fibrotic reaction when they received the combination treatments with gemcitabine, with similar impact at G_1 and $G_{2/3}$ doses (Figure 6D). Thus, it is possible that BFCs did increase antitumor response to gemcitabine but replacement of tumor cells by fibrosis limited changes in tumor masses.

3.5 Combination treatments positively regulate intrinsic apoptosis signaling pathway

As mechanistic aspects of the antitumor effects of the chosen BFCs have been already described, the main signaling pathways involved in the BFC response in the pancreatic cancer cell lines were assessed. Resveratrol or Piceatannol-containing combinations showed similar results. Capsaicin and piceatannol alone or in combination induced increase in phosphorylation of the stress response MAP

kinase p38 and decrease in phosphorylation of the survival kinase AKT. By contrast, ERK or STAT1 phosphorylation status were not modulated by treatments. Interestingly, pro-apoptotic signal of the BCL-2 family members was greatly increased (Figure 7). Phosphorylation of NFκB was not detected and NFκB protein level was constant in all tested extracts, as was p53 expression. In the same way, the stress response P-JNKs and total JNKs remained unchanged (data not shown). Thus, it is possible that the increased cell death observed *in vitro* and the limited tumor progression observed *in vivo* was induced by apoptosis up-regulation when capsaicin was used combined with resveratrol or piceatannol. We explored other cell death inducing pathways and found no difference of Light Chain 3 LC3B conversion as a marker of increased autophagy and no difference in acidic beta-galactosidase staining as a marker of senescence (data not shown).

4. DISCUSSION:

Although interest in bioactive food components has risen in the past years, very few studies focused on challenging their anticancer properties in combination. Preclinical studies revealed synergistic or additive effects on tumors with conventional chemotherapies or radiotherapy. The BFC, which seemed to capture more attention for combinatory approaches was curcumin [38-40]. These studies did not test the antitumor activities of the combination associated with chemotherapy as we did. We used gemcitabine because it is still the main first line therapy for pancreatic cancer. Our results were rather disappointing since combinations of resveratrol analogues and capsaicin did not have additive effect with chemotherapy macroscopically. However, microscopic analysis showed intense fibrosis in P (or R) +C probably induced by stronger response to treatment, rather than being preexisting fibrosis in the treated tumors [34]. Importantly however, the addition of BFCs to a 33% reduced dose of gemcitabine achieved the same effect than an efficient complete dose used alone. Thus, BFCs could rescue gemcitabine efficiency in patients displaying adverse gemcitabine-related side effects (in particular thrombocytopenia), leading clinicians to revise treatment dose. More importantly, treatment of mice carrying PDXs would provide very valuable information on possible clinical applications. Another aspect that would be worth developing is to combine BFCs with radiotherapy.

We found that CAPAN-2 cells displayed strong ROS production and accumulation in S phase after combination treatment. These features characterize catastrophic mitosis also responsible of cell death induced by radiation ref). Indeed, intense ROS production could add to the oxidant action of radiations and induce more damages in the DNA than the cancer cell can repair. In this context, Lip-FLLL32, a curcumin analog has been studied *in vitro* and *in vivo* in association with radiotherapy and showed significant tumor mass reduction in comparison with radiotherapy alone [41].

To our big surprise we found that addition of sulforaphane in animal treatments completely abrogated the antitumor effect of resveratrol and capsaicin. Sulforaphane was found to inhibit pancreatic cancer cell growth in several reports, one of them showing *in vivo* data with an oral administration of 20 mg/kg [42]. We used a dose ten times lower. Thus, it is possible that the quantity of sulforaphane delivered within the tumor was too low and induced the opposite effect. Indeed, like resveratrol, sulforaphane has anti-oxidant properties. The impact of sulforaphane depends on the dose and is known as the hormetic action that we did observe on fibroblasts treatments (Figure 1). It would be worth to try higher doses or a different route of administration to test this hypothesis. Alternatively, we found that sulforaphane combined with gemcitabine displayed a CI equals to 1.14, suggesting a possible antagonist effect of the combination.

We provide for the first time evidence for piceatannol growth inhibition of a pancreatic tumor model. Piceatannol is a metabolite of resveratrol obtained by hydroxylation by CYP1B1 [33]. It might be more stable and bioavailable than resveratrol due to the presence of an extra phenolic group. Both molecules bear anti-oxidant properties at low concentrations but they can form reactive metabolites able to induce cell death. Our work shows that both molecules impact the cell and its signaling pathways in very similar ways, probably because piceatannol can be a metabolite of resveratrol. Moreover, piceatannol has been shown to enhance antitumor efficacy of gemcitabine in lung cancer cells by modulating pro-apoptotic BCL-2 family members, as found here [43]. However, the report does not mention any *in vivo* application of the co-treatment.

The best combination found here, i.e. resveratrol analogues and capsaicin induced apoptosis *in vitro* in colon carcinoma cells [44]. We found that ROS production was exacerbated with combination treatment, which could result in activation of the stress response MAP kinase p38, as already described for other cancer cells [45]. In addition, AKT activation was decreased, by R+C treatments in agreement with capsaicin impact on PANC-1 pancreatic cells [46]. This could participate in apoptosis induction, in particular in the control of BCL-2/BAX balance, since AKT is a well-known pro-survival factor linked to KRAS dysregulation in pancreatic adenocarcinoma [47]. Interestingly, we found the same unbalance of BCL2 and BAX towards apoptosis in pancreatic cancer cells than in colon carcinoma [44]. This is in agreement with effects generally attributed to resveratrol [19] even in combination with curcumin [48]. Other cell death pathways such as autophagy or senescence were not impacted by combination treatment, suggesting, as recapitulated in Figure 7B, that apoptosis was the main cell death inductor. In this model, we propose that capsaicin acts throughout its receptors TRPV1 and TRPV2, since their transcripts were strongly expressed in all tested pancreatic cell lines but were 10 times less abundant in fibroblasts (data not shown). Finally, cell cycle was found arrested mainly in S phase by combination treatment. It is possible that BFCs directly interfered with cell cycle progression as previously reported. It is also likely that ROS induced DNA damage overwhelming cell DNA repair pathways resulting in apoptosis induction. This latter hypothesis needs further exploration of DNA repair response to capsaicin and resveratrol combination treatment.

In normal mouse cerebral cortical neurons, the association of resveratrol and capsaicin opposed glutamate-induced neuron death and oxidative stress *in vitro*. This discrepancy could be accounted for differences in doses [49], but it seems that the BFCs were used at similar ranges about 50-100 μM . We believe that it is more about the pathological status of the cell. Indeed we found that the combination of capsaicin and resveratrol was not toxic to healthy fibroblasts. Alternatively, combinations of BFCs could differentially impact cells according to the cell cycle phase status as found for radiomodulation by resveratrol and curcumin only in cycling cells [50].

In conclusion, we found that *in vitro* treatments of pancreatic cell lines with combinations of BFCs and gemcitabine were very potent to induce cell death. *In vivo*, although resveratrol analogues in association with capsaicin had moderate effects on tumor mass, no synergistic action was found with active dose of gemcitabine, but rescued efficiency of low dose of chemotherapy. However, increased response to treatment was evidenced on histological sections. This study highlights the potential use of BFCs as nutrition complements during pancreatic adenocarcinoma therapy, especially for patients unable to receive full doses of chemotherapy.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Katia Obama and Isabelle Lamy for administrative assistance and financial management, and the staff of University of Bordeaux animal facility, in particular Muriel Fèvre for technical assistance. Figure 7B was made with the free online Servier medical art material (<http://servier.fr/smart/banque-dimages-powerpoint>). This work was supported by grants from the Ligue régionale contre le cancer (Comité Dordogne) and the Institut National du Cancer (INCa), France.

6. REFERENCES

- [1] R.L. Siegel, K.D. Miller, A. Jemal, Cancer statistics, 2016, CA: a Cancer Journal for Clinicians. 66 (2016) 7–30. doi:10.3322/caac.21332.
- [2] J.M. Sutton, Neoadjuvant therapy for pancreas cancer: Past lessons and future therapies, Wjg. 20 (2014) 15564. doi:10.3748/wjg.v20.i42.15564.
- [3] T. Conroy, F. Desseigne, M. Ychou, O. Bouché, R. Guimbaud, Y. Becouarn, et al., FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer, N Engl J Med. 364 (2011) 1817–1825. doi:10.1056/NEJMoa1011923.
- [4] D.D. Von Hoff, T. Ervin, F.P. Arena, E.G. Chiorean, J. Infante, M. Moore, et al., Increased Survival in Pancreatic Cancer with nab-Paclitaxel plus Gemcitabine, N Engl J Med. 369

- (2013) 1691–1703. doi:10.1056/NEJMoa1304369.
- [5] M.J. Moore, D. Goldstein, J. Hamm, A. Figer, J.R. Hecht, S. Gallinger, et al., Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group, *Journal of Clinical Oncology*. 25 (2007) 1960–1966. doi:10.1200/JCO.2006.07.9525.
- [6] C. Neuzillet, A. Tijeras-Raballand, P. Bourget, J. Cros, A. Couvelard, A. Sauvanet, et al., State of the art and future directions of pancreatic ductal adenocarcinoma therapy, *Pharmacol Ther.* 155 (2015) 80–104. doi:10.1016/j.pharmthera.2015.08.006.
- [7] S. Kordes, M.N. Pollak, A.H. Zwinderman, R.A. Mathôt, M.J. Weterman, A. Beeker, et al., Metformin in patients with advanced pancreatic cancer: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2 trial, *Lancet Oncology*. 16 (2016) 839–847. doi:10.1016/S1470-2045(15)00027-3.
- [8] J. Keijer, M. Bekkenkamp-Grovenstein, D. Venema, Y.E.M. Dommels, *Biochimica et Biophysica Acta, BBA - Bioenergetics*. 1807 (2011) 697–706. doi:10.1016/j.bbabi.2010.08.007.
- [9] F. Pistollato, F. Giampieri, M. Battino, The use of plant-derived bioactive compounds to target cancer stem cells and modulate tumor microenvironment, *Food and Chemical Toxicology*. 75 IS - (2015) 58–70. doi:10.1016/j.fct.2014.11.004.
- [10] J.M. Pezzuto, Resveratrol as an inhibitor of carcinogenesis, *Pharmaceutical Biology*. (2008). doi:10.1080/13880200802116610.
- [11] K.B. Harikumar, A.B. Kunnumakkara, G. Sethi, P. Diagaradjane, P. Anand, M.K. Pandey, et al., Resveratrol, a multitargeted agent, can enhance antitumor activity of gemcitabine in vitro and in orthotopic mouse model of human pancreatic cancer, *Int. J. Cancer*. 127 (2010) 257–268. doi:10.1002/ijc.25041.
- [12] J. Tomé-Carneiro, M. Larrosa, A. González-Sarrías, F.A. Tomás-Barberán, M.T. García-Conesa, J.C. Espín, Resveratrol and clinical trials: the crossroad from in vitro studies to

- human evidence, *Curr. Pharm. Des.* 19 (2013) 6064–6093.
- [13] A. Tsubura, Resveratrol induces apoptosis via ROS-triggered autophagy in human colon cancer cells, *Int J Oncol.* 40 (2012) 1020. doi:10.3892/ijo.2012.1325.
- [14] S. Shankar, D. Nall, S.-N. Tang, D. Meeker, J. Passarini, J. Sharma, et al., Resveratrol Inhibits Pancreatic Cancer Stem Cell Characteristics in Human and KrasG12D Transgenic Mice by Inhibiting Pluripotency Maintaining Factors and Epithelial-Mesenchymal Transition, *PLoS ONE.* 6 (2011) e16530. doi:10.1371/journal.pone.0016530.g009.
- [15] K.R. Patel, E. Scott, V.A. Brown, A.J. Gescher, W.P. Steward, K. Brown, Clinical trials of resveratrol, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1215 (2011) 161–169. doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05853.x.
- [16] A.J.M. Michael J Iadarola, The Vanilloid Agonist Resiniferatoxin for Interventional-Based Pain Control, *Current Topics in Medicinal Chemistry.* 11 (2011) 2171.
- [17] S.R. Boreddy, S.K. Srivastava, Pancreatic cancer chemoprevention by phytochemicals, *Cancer Letters.* 334 (2013) 86–94. doi:10.1016/j.canlet.2012.10.020.
- [18] K.C. Pramanik, S.R. Boreddy, S.K. Srivastava, Role of mitochondrial electron transport chain complexes in capsaicin mediated oxidative stress leading to apoptosis in pancreatic cancer cells, *PLoS ONE.* 6 (2011) e20151. doi:10.1371/journal.pone.0020151.
- [19] R. Zhang, I. Humphreys, R.P. Sahu, Y. Shi, S.K. Srivastava, In vitro and in vivo induction of apoptosis by capsaicin in pancreatic cancer cells is mediated through ROS generation and mitochondrial death pathway, *Apoptosis.* 13 (2008) 1465–1478. doi:10.1007/s10495-008-0278-6.
- [20] H. Bai, H. Li, W. Zhang, K.A. Matkowskyj, J. Liao, S.K. Srivastava, et al., Inhibition of chronic pancreatitis and pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN) by capsaicin in LSL-KrasG12D/Pdx1-Cre mice, *Carcinogenesis.* 32 (2011) 1689–1696. doi:10.1093/carcin/bgr191.
- [21] S. Batra, R.P. Sahu, P.K. Kandala, S.K. Srivastava, Benzyl Isothiocyanate-Mediated Inhibition

- of Histone Deacetylase Leads to NF- B Turnoff in Human Pancreatic Carcinoma Cells, *Molecular Cancer Therapeutics*. 9 (2010) 1596–1608. doi:10.1158/1535-7163.MCT-09-1146.
- [22] R.P. Sahu, R. Zhang, S. Batra, Y. Shi, S.K. Srivastava, Benzyl isothiocyanate-mediated generation of reactive oxygen species causes cell cycle arrest and induces apoptosis via activation of MAPK in human pancreatic cancer cells, *Carcinogenesis*. 30 (2009) 1744–1753. doi:10.1093/carcin/bgp157.
- [23] R.P.S.S.K.S. Srinivas Reddy Boreddy, Benzyl Isothiocyanate Suppresses Pancreatic Tumor Angiogenesis and Invasion by Inhibiting HIF- α /VEGF/Rho-GTPases: Pivotal Role of STAT-3, *PLoS ONE*. 6 (2011) e25799. doi:10.1371/journal.pone.0025799.
- [24] J.W. Lampe, Sulforaphane: from chemoprevention to pancreatic cancer treatment? *Gut*. 58 (2009) 900–902. doi:10.1136/gut.2008.166694.
- [25] V. Rausch, L. Liu, G. Kallifatidis, B. Baumann, J. Mattern, J. Gladkich, et al., Synergistic Activity of Sorafenib and Sulforaphane Abolishes Pancreatic Cancer Stem Cell Characteristics, *Cancer Research*. 70 (2010) 5004–5013. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-0066.
- [26] M. Lafitte, I. Moranvillier, S. Garcia, E. Peuchant, J. Iovanna, B. Rousseau, et al., FGFR3 has tumor suppressor properties in cells with epithelial phenotype, *Molecular Cancer* 2013 12:1. 12 (2013) 1. doi:10.1186/1476-4598-12-83.
- [27] Z. Wang, S. Desmoulin, S. Banerjee, D. Kong, Y. Li, R.L. Deraniyagala, et al., A comprehensive in vitro characterization of pancreatic ductal carcinoma cell line biological behavior and its correlation with the structural and genetic profile, *Molecular Analysis of the Inhibitory Effect of N-Acetyl-L-Cysteine on the Proliferation and Invasiveness of Pancreatic Cancer Cells*. 445 (2004) 236–247. doi:10.1007/s00428-004-1053-x.
- [28] S. Chiosea, Y. Shuai, K. Ciepły, M.N. Nikiforova, S. Dacic, EGFR fluorescence in situ hybridization-positive lung adenocarcinoma: incidence of coexisting KRAS and BRAF mutations, *Human Pathology*. 41 (2010) 1053–1060. doi:10.1016/j.humpath.2010.01.008.

- [29] M.H. Lloyd, S.E. Wolfensohn, Practical use of distress scoring systems in the application of humane endpoints, *Humane Endpoints in Animal Experiments for* (1999).
- [30] T.C. Chou, Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method, *Surgical Oncology*. 22 (2010) 440–446. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1947.
- [31] E. Wenzel, V. Somoza, Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol, *Mol Nutr Food Res*. 49 (2005) 472–481. doi:10.1002/mnfr.200500010.
- [32] S.J. Dias, K. Li, A.M. Rimando, S. Dhar, C.S. Mizuno, A.D. Penman, et al., Trimethoxy-resveratrol and piceatannol administered orally suppress and inhibit tumor formation and growth in prostate cancer xenografts, *Prostate*. 73 (2013) 1135–1146. doi:10.1002/pros.22657.
- [33] H. Piotrowska, M. Kucinska, M. Murias, Biological activity of piceatannol: leaving the shadow of resveratrol, *Mutat. Res*. 750 (2012) 60–82. doi:10.1016/j.mrrev.2011.11.001.
- [34] D.J. Hartman, A.M. Krasinskas, Neoadjuvant chemoradiotherapy for adenocarcinoma of the pancreas: analysis of histopathology and outcome, *Int J Gastrointest Cancer*. 136 (2003) 121–128. doi:10.5858/arpa.2011-0144-RA.
- [35] Y.S. Chun, H.S. Cooper, S.J. Cohen, A. Konski, B. Burtness, C.S. Denlinger, et al., Significance of pathologic response to preoperative therapy in pancreatic cancer, *Ann Surg Oncol*. 18 (2011) 3601–3607. doi:10.1245/s10434-011-2086-4.
- [36] C. Tosolini, C.W. Michalski, J. Kleeff, Response evaluation following neoadjuvant treatment of pancreatic cancer patients, *Wjgs*. 5 (2013) 12–15. doi:10.4240/wjgs.v5.i2.12.
- [37] R.R. White, H.B. Xie, M.R. Gottfried, B.G. Czito, H.I. Hurwitz, M.A. Morse, et al., Significance of histological response to preoperative chemoradiotherapy for pancreatic cancer, *Ann Surg Oncol*. 12 (2005) 214–221. doi:10.1245/ASO.2005.03.105.
- [38] J. Ravindran, S. Prasad, B.B. Aggarwal, Synergistic Effect of Garcinol and Curcumin on Antiproliferative and Apoptotic Activity in Pancreatic Cancer Cells, *Aaps J*. 2012 (2009) 495–

510. doi:10.1208/s12248-009-9128-x.
- [39] A. Thakkar, D. Sutaria, B.K. Grandhi, J. Wang, S. Prabhu, The molecular mechanism of action of aspirin, curcumin and sulforaphane combinations in the chemoprevention of pancreatic cancer, *Oncol Rep.* 29 (2013) 1671–1677. doi:10.3892/or.2013.2276.
- [40] R. Mezencev, L. Wang, W. Xu, B. Kim, T.A. Sulchek, G.W. Daneker, et al., Molecular analysis of the inhibitory effect of N-acetyl-L-cysteine on the proliferation and invasiveness of pancreatic cancer cells, *Anticancer Drugs.* 24 (2013) 504–518.
doi:10.1097/CAD.0b013e32836009d7.
- [41] X. Wu, W. Tang, R.T. Marquez, K. Li, C.A. Highfill, F. He, et al., Overcoming chemo/radio-resistance of pancreatic cancer by inhibiting STAT3 signaling, *Oncotarget.* 7 (2016) 11708–11723. doi:10.18632/oncotarget.7336.
- [42] S.-H. Li, J. Fu, D.N. Watkins, R.K. Srivastava, S. Shankar, Sulforaphane regulates self-renewal of pancreatic cancer stem cells through the modulation of Sonic hedgehog-GLI pathway, *Mol. Cell. Biochem.* 373 (2013) 217–227. doi:10.1007/s11010-012-1493-6.
- [43] Bin Xu, Z.-Z. Tao, Piceatannol Enhances the Antitumor Efficacy of Gemcitabine in Human A549 Non-Small Cell Lung Cancer Cells, *Oncol Res.* 22 (2014) 213–217.
doi:10.3727/096504015X14386062091398.
- [44] M.Y. Kim, L.J. Trudel, G.N. Wogan, Apoptosis induced by capsaicin and resveratrol in colon carcinoma cells requires nitric oxide production and caspase activation, 29 (2009) 3733–3740.
<http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=19846903&retmode=ref&cmd=prlinks>.
- [45] T. Liu, G. Wang, H. Tao, Z. Yang, Y. Wang, Z. Meng, et al., Capsaicin mediates caspases activation and induces apoptosis through P38 and JNK MAPK pathways in human renal carcinoma, *BMC Cancer.* 16 (2016) 790. doi:10.1186/s12885-016-2831-y.
- [46] J.-H. Zhang, F.-J. Lai, H. Chen, J. Luo, R.-Y. Zhang, H.-Q. Bu, et al., Involvement of the

- phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in apoptosis induced by capsaicin in the human pancreatic cancer cell line PANC-1, *Oncol Lett.* 5 (2013) 43–48. doi:10.3892/ol.2012.991.
- [47] S. Eser, A. Schnieke, G. Schneider, D. Saur, Oncogenic KRAS signalling in pancreatic cancer. *Br J Cancer.* 2014 Aug 26;111(5):817-22. doi:10.1038/bjc.2014.215.
- [48] A.R. Pavan, G.D.B.D. Silva, D.H. Jornada, D.E. Chiba, G.F.D.S. Fernandes, C. Man Chin, et al., Unraveling the Anticancer Effect of Curcumin and Resveratrol, *Nutrients.* 8 (2016). doi:10.3390/nu8110628.
- [49] S. Mukherjee, J.I. Dudley, D.K. Das, Dose-dependency of resveratrol in providing health benefits, *Dose Response.* 8 (2009) 478–500. doi:10.2203/dose-response.09-015.Mukherjee.
- [50] N. Sebastià, A. Montoro, D. Hervás, G. Pantelias, V.I. Hatzi, J.M. Soriano, et al., Curcumin and trans-resveratrol exert cell cycle-dependent radioprotective or radiosensitizing effects as elucidated by the PCC and G2-assay, *Mutat. Res.* 766-767 (2014) 49–55. doi:10.1016/j.mrfmmm.2014.05.006.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Combinations of BFCs are very potent to kill pancreatic tumor cell lines

Dose-response experiments were carried out for resveratrol (A), capsaicin (B), sulforaphane (C) and BITC (D) by treatment tumor cell lines of pancreatic origin (PANC-1, BXPC-3, MiaPaCa-2 and CAPAN-2) and the mammary gland tumor cell line MCF7. Human Pancreatic Normal Epithelial (HPNE) cells and primary cultures of human fibroblasts obtained from mammoplasties were used as healthy, non-tumor cells. Combination treatments were performed at IC50 for each BFC on CAPAN-2 cells (E), BXPC-3 cells (F) and human fibroblasts (G). DMSO is the control condition containing cell culture medium with DMSO used for BFC dilution. C: capsaicin, R: resveratrol, S: sulforaphane. **p<0.01,

*** $p < 0.001$ by one way ANOVA multiple comparisons. $p < 0.001$ for all BFCs used alone and in combination against the control condition (DMSO) for tumor cells. For fibroblasts, only comparisons with the control condition are shown. (H) CAPAN-2 cells were cultured in a 12-well plate and with or without combination treatments. Remaining cells were revealed by violet crystal stain. Pictures were taken either at macroscopic (upper picture) or microscopic (bottom pictures) levels. Original magnification x200.

Figure 2: Cell cycle is not affected by BFC treatments

(A) CAPAN-2 cells were analyzed by flow cytometry after permeabilization and staining with propidium iodide. Top left dot plot shows the morphological characteristics of the cells. Histograms depict the distribution of cells according to their DNA content. P3: cells in subG1, i.e. apoptotic, P4, cells in G1 phase, P5, cells in S phase and P6, cells in G2 and M phases. We show representative histograms of one experiment repeated 2 times. The bottom histogram bars are the mean \pm SD of cells in the different phases of the cell cycle. CAPAN-2 cells, $n=4$ to 6 independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ by bilateral unpaired student's t test versus control DMSO condition.

Figure 3: Combinations of BFCs induce pancreatic tumor cell lines apoptosis

Cells were treated with single BFCs or double or triple combinations of resveratrol (R), capsaicin (C) and sulforaphane (S). (A) Cells were detached and stained with FITC conjugated anti-Annexin V antibody and analyzed by flow cytometry and dot plots are shown together with mean \pm SD percentages of Annexin V-positive cells as histogram bars. CT corresponds to unstained cells. (B) Percentages of Annexin V- positive cells have been determined. * $p < 0.01$ compared to BFCs alone by a bilateral unpaired student's t test (except for a: ns compared to resveratrol alone). No statistical analysis was carried out for BXPC-3 cells because the experiment was carried out 2 times.

Figure 4: Combinations of BFCs induce strong ROS production

(A) CAPAN-2 cells were treated with the different BFCs alone or in combination and ROS production was revealed by DCFDA fluorescence. (B) DCFDA fluorescence intensities were quantified and

plotted as an histogram of mean \pm SD for CAPAN-2 and BXP-3 cells treated by resveratrol (R), capsaicin (C), sulforaphane (S) alone or in combination * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$, ns: not significant by a bilateral unpaired student's t test. Original magnification: X200

Figure 5: Combinations of BFCs synergize with gemcitabine in vitro

(A) Double combinations of resveratrol (R), capsaicin (C) and sulforaphane (S) were used with or without gemcitabine (G, 1 or 10 μ M) for CAPAN-2 cells. (B) BXP-3 cells were treated with the double combination R+C with or without gemcitabine (1 or 10 μ M). ** $p < 0.0001$, *** $p < 0.00001$, ns: not significant against the control condition by one way ANOVA multiple comparisons.

Figure 6: Combinations of BFCs induce reduction of tumor mass and potentiate gemcitabine toxicity.

(A) CAPAN-2 cells were injected subcutaneously in NSG immune-deficient mice. When tumors reached about 100mm³, mice received BFCs alone or in combination orally 3 times a week, for 3 weeks. Tumor masses are represented as mean \pm SEM calculated from pooled experiments, as compared to the control group mean masses obtained in each experiment. Control groups (CT n=32 individual tumors) received ethanol orally and PBS IP. R: resveratrol, 50mg/kg (n=11 individual tumors), C: Capsaicin 5mg/kg (n=8 individual tumors), P: piceatannol 20mg/kg (n=10 individual tumors), S: sulforaphane 3mg/kg (P+C+S, n=15 individual tumors). (B) 3(R+C): mice were given 150mg/kg of resveratrol in combination with 15 mg/kg of capsaicin (n=5 individual tumors) or single doses at 3R (150mg/kg n=5 individual tumors) and 3C: 15mg/kg (n=6 individual tumors). (C) Gemcitabine chemotherapy was given IP in association or not with R+C or P+C. G₁: 12.5 mg/kg (n=18 individual tumors), G_{2/3}: 8.3mg/kg (2/3rd of the G₁ dose, n=7 individual tumors). R+C+G₁ n=6 individual tumors, P+C+G₁ n=16 individual tumors, R+C+G_{2/3} n=5 individual tumors, P+C+G_{2/3} n=7 individual tumors. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns: not significant by a two-tailed Mann Whitney test against CT condition except otherwise specified by the lines. (D) Tumors were collected, fixed

and embedded in paraffin. Sections were stained by hematoxylin and eosin. Fibrosis is visualized by long pink fibers in between the epithelial tumor clusters. Original magnification x100.

Figure 7: Combination treatments positively regulate apoptosis signaling pathway

A. CAPAN-2 tumors protein extracts were subjected to western blotting with the indicated antibodies. Representative blots are shown. Densitometry was performed to compare intensity of protein content in each line. Histogram bars on the right display densitometry analysis results. C: Capsaicin 5mg/kg, P: piceatannol 20mg/kg, G₁: gemcitabine 12.5 mg/kg and G_{2/3}: gemcitabine 8.3mg/kg. Shown results are representative of 3 independent experiments for AKT, STAT1 and BAX, 4 for P38 and 5 for ERK and BCL2. B. Proposed model of molecular signals inducing apoptosis following treatment with capsaicin (CAP) and resveratrol (RES) analogs.

Supplemental Figure 1: CAPAN-2 cells are sensitive to piceatannol alone or in combination with capsaicin or sulforaphane

(A) Dose-response experiments were carried out for piceatannol treatment of the CAPAN-2 tumor cell line. IC₅₀ was 47 μ M. Combination treatments were performed at IC₅₀ for each BFC on CAPAN-2 cells. ***p<0.0001, ns: not significant against the control DMSO condition Multiple comparisons of the means were performed with one-way ANOVA tests.

AUTHOR'S CONTRIBUTIONS

VV: design, analysis, assembly and interpretation of data, manuscript writing.

EP: conception, design, interpretation of data, financial support.

IM: collection and assembly of data.

BR: design, collection of data.

AB: design, analysis and interpretation of data, final approval of the manuscript.

EB: manuscript writing, final approval of the manuscript.

AC: collection, analysis of data.

HV: design, final approval of the manuscript.

FMG: design, financial support, final approval of the manuscript.

SD: conception, design, collection, analysis, assembly and interpretation of data, financial support, manuscript writing.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

Table 1: Half maximal effective doses IC₅₀ (μM)

CELL LINE	RESVERATROL	CAPSAICIN	BITC	SULFORAPHANE
BXPC-3	75	163	15	11
CAPAN-2	73	197	8	17
PANC-1	97	185	21	18
MiaPaCa-2	82	187	16	16
MCF-7	50	93	18	16
Average ±SD	73±15	153±38	15± 4.5	15.5± 2
Fibroblasts	>300	>400	50	30
HPNE	260	>300	24	18

Cells were treated with increasing doses of BFCs for 48h. MTT assays were performed to quantify cell toxicity. IC₅₀ determined using the GraphPad Prism 6 software are expressed in μM. HPNE: Human Pancreatic Normal Epithelial Cells.

Table 2: Combination indexes for BFCs and gemcitabine

Combination Indexes (CI)	Capsaicin (200 μ M)	Resveratrol (75 μ M)	Sulforaphane (15 μ M)	Gemcitabine (165 μ M)
Capsaicin	-	0.16	0.28	0.5
Resveratrol	0.16	-	ND	0.87
Sulforaphane	0.28	ND	-	1.14
Gemcitabine + Capsaicin	-	0.05	0.12	-
Capsaicin + Resveratrol	-	-	0.10	0.05

Software treatment of the data was used to determine CIs for each double or triple combination and

IC50 for each drug on CAPAN-2 cells

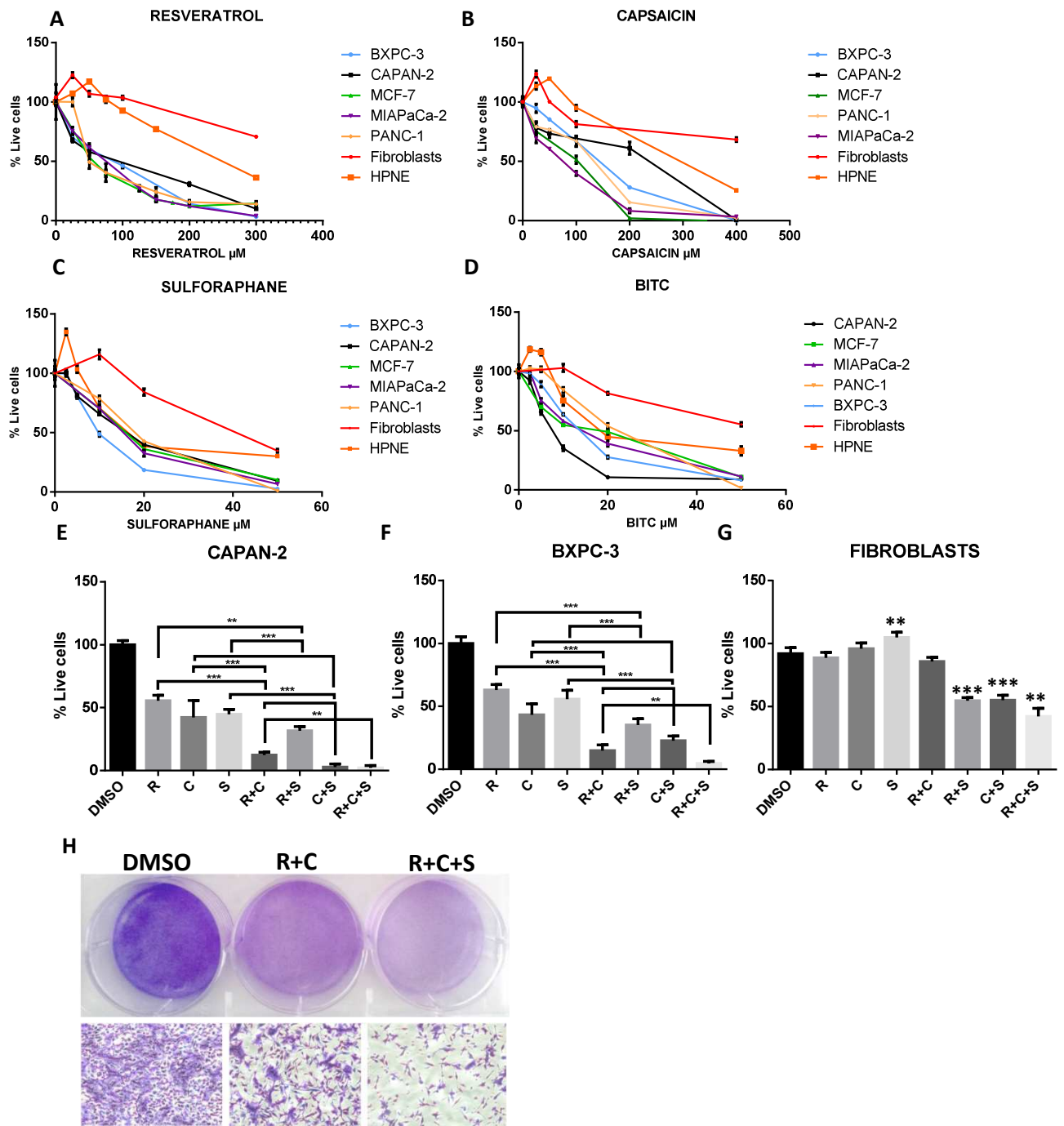
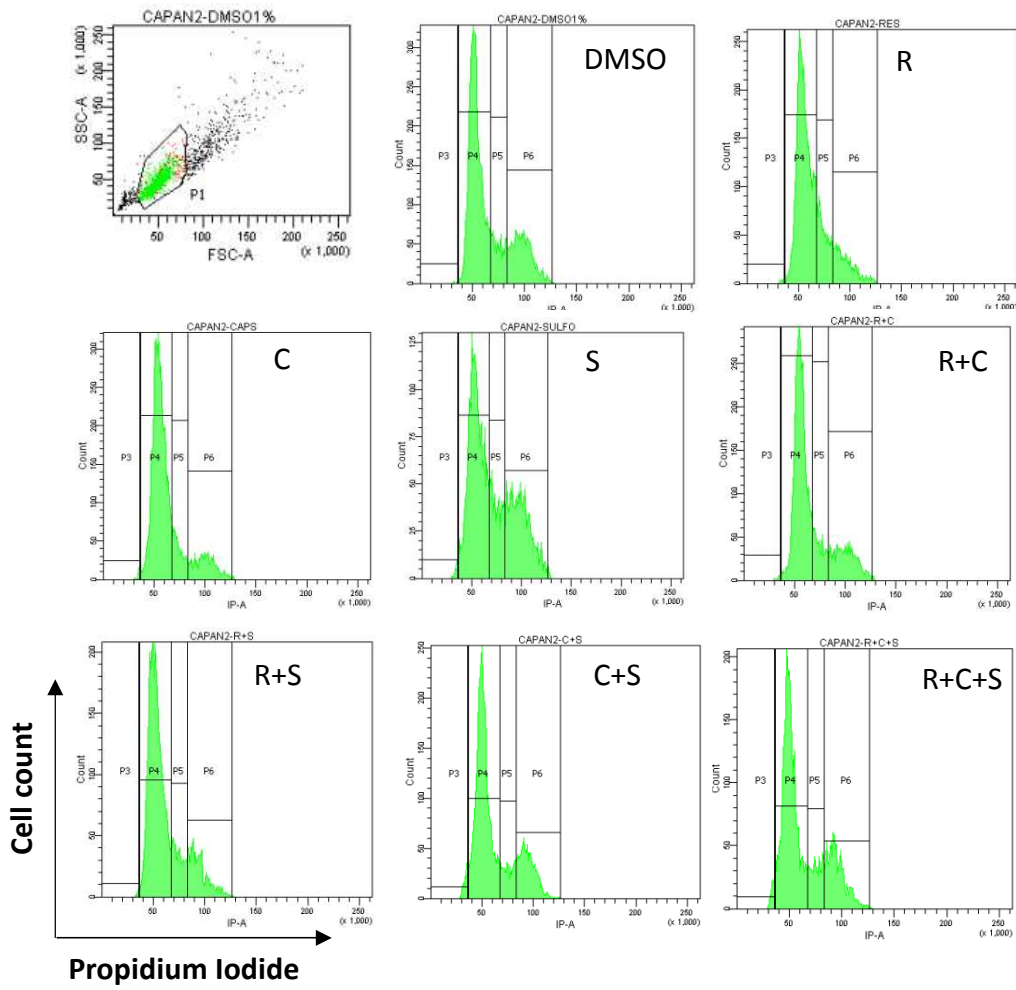


Figure 1



CAPAN-2

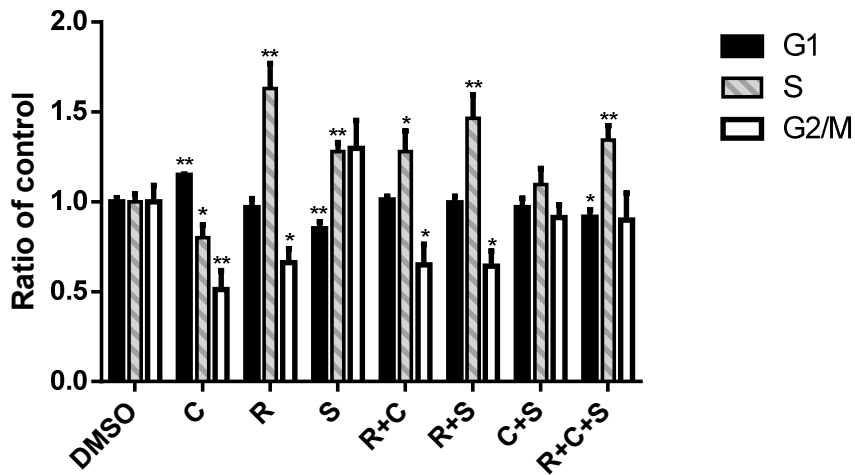


Figure 2

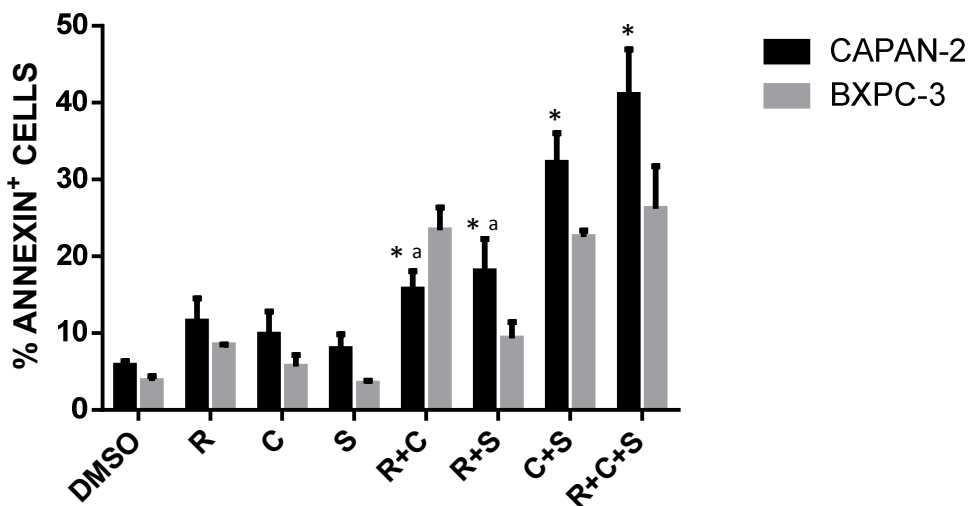
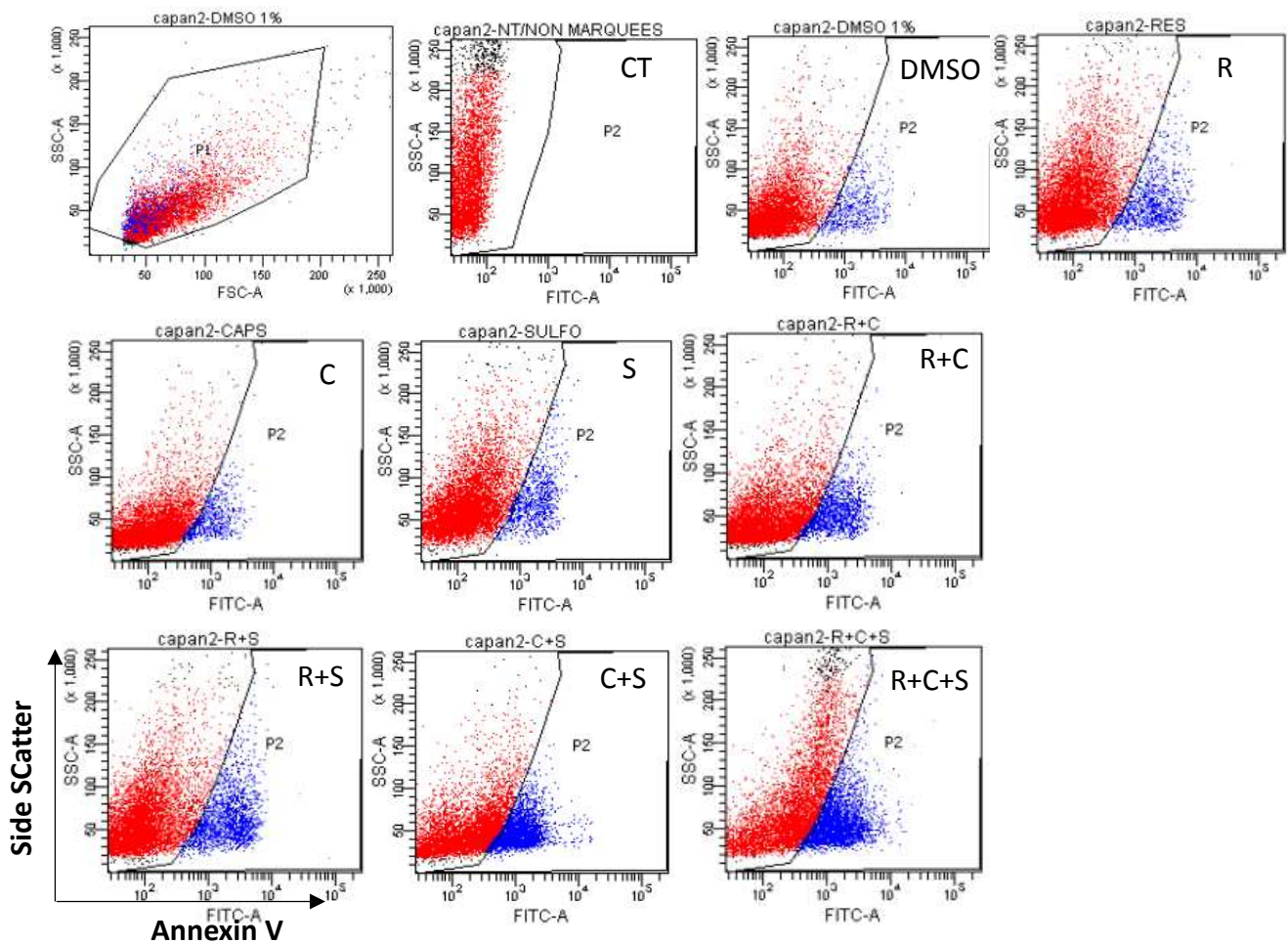
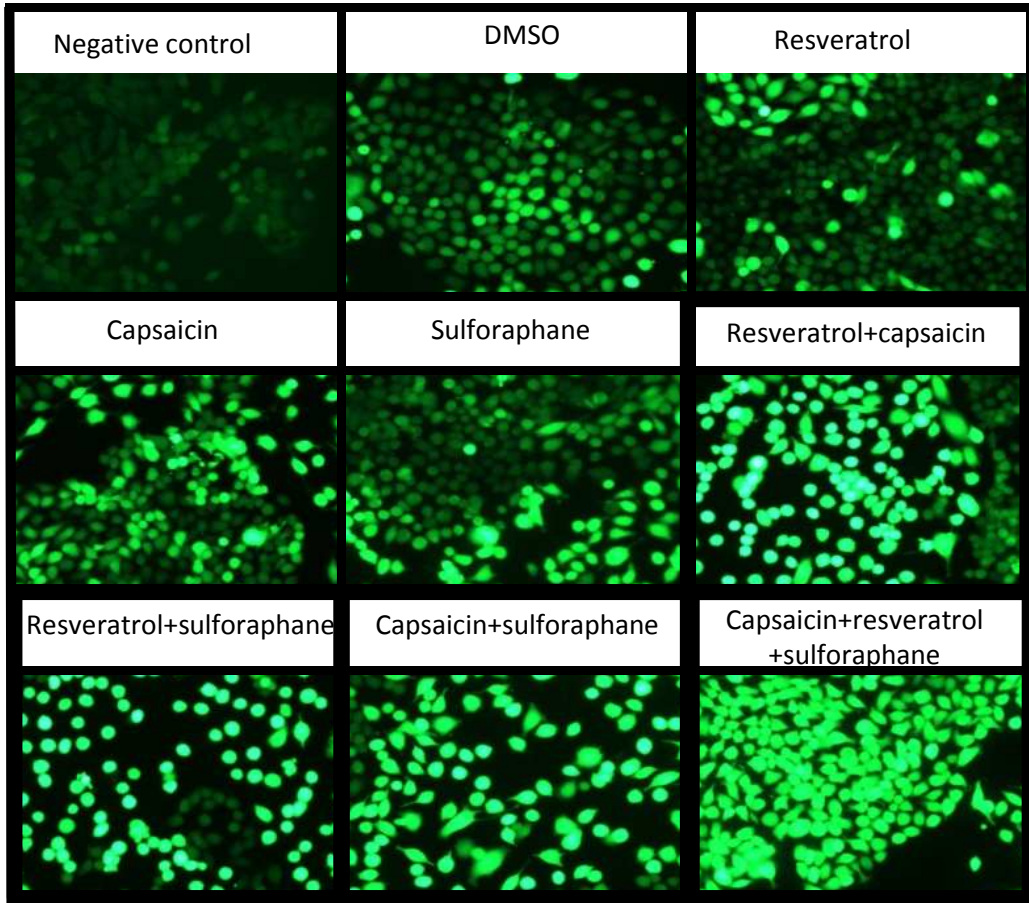


Figure 3

A



B

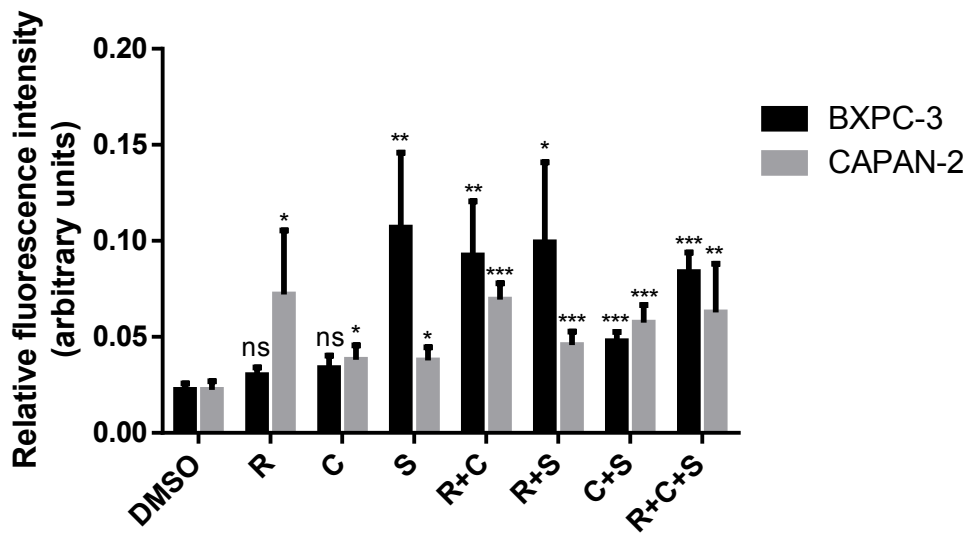
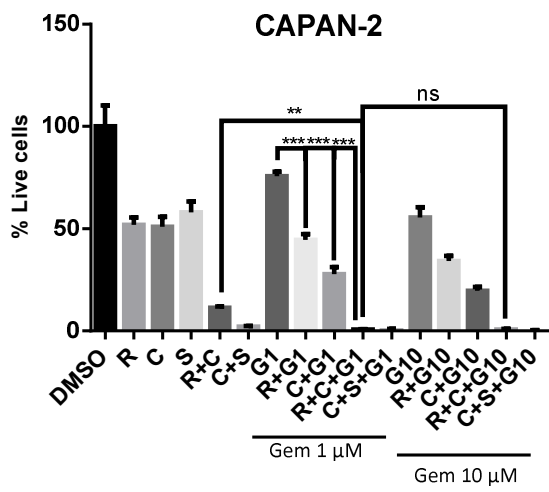


Figure 4

A



B

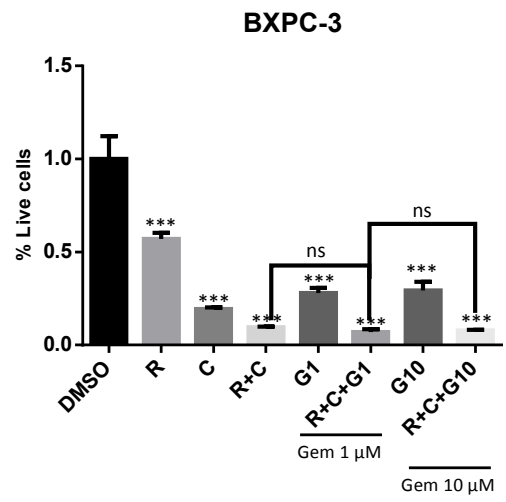


Figure 5

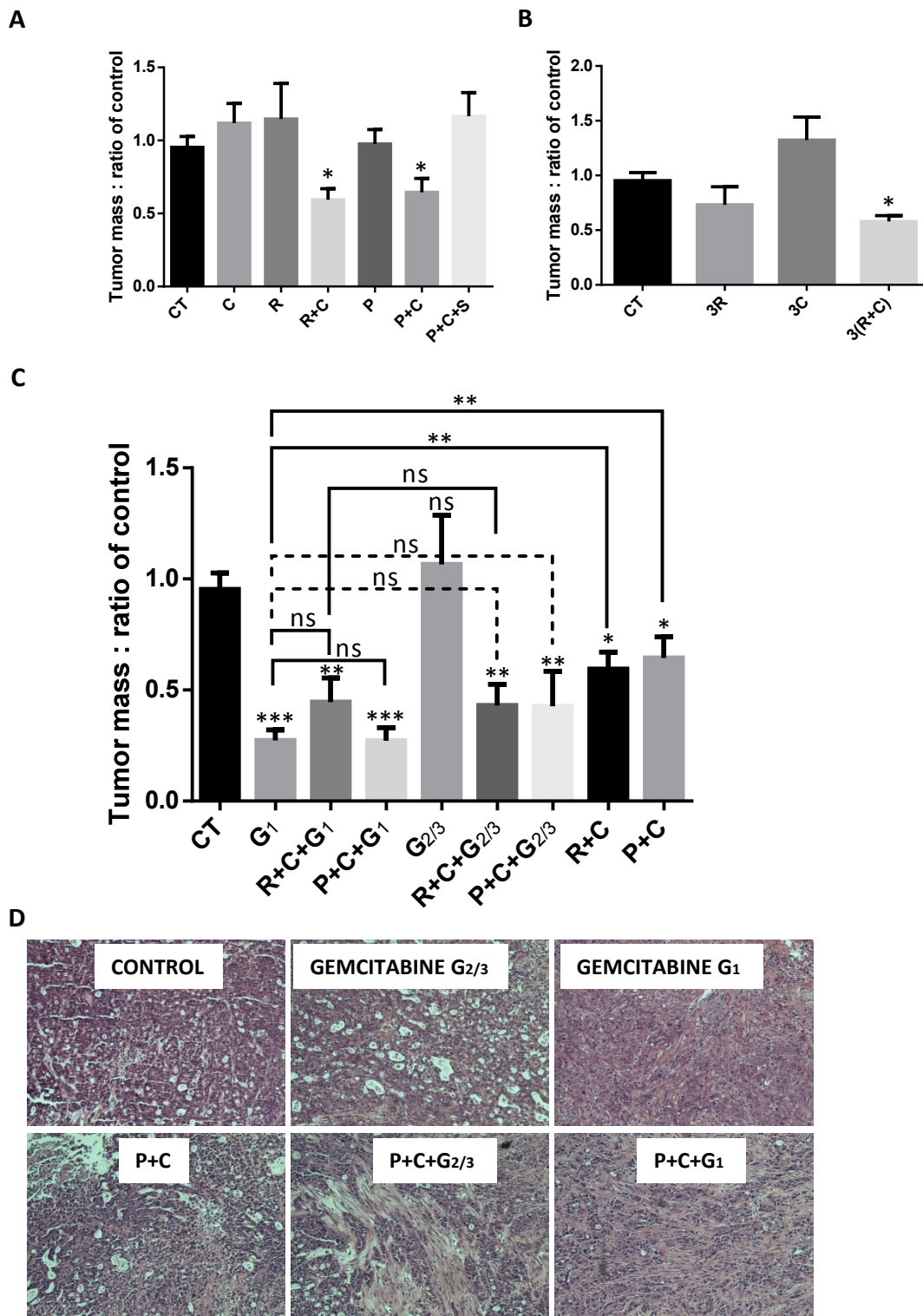


Figure 6

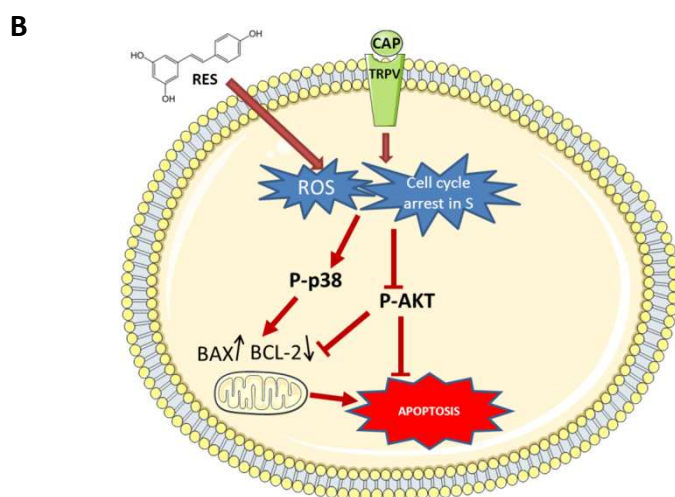
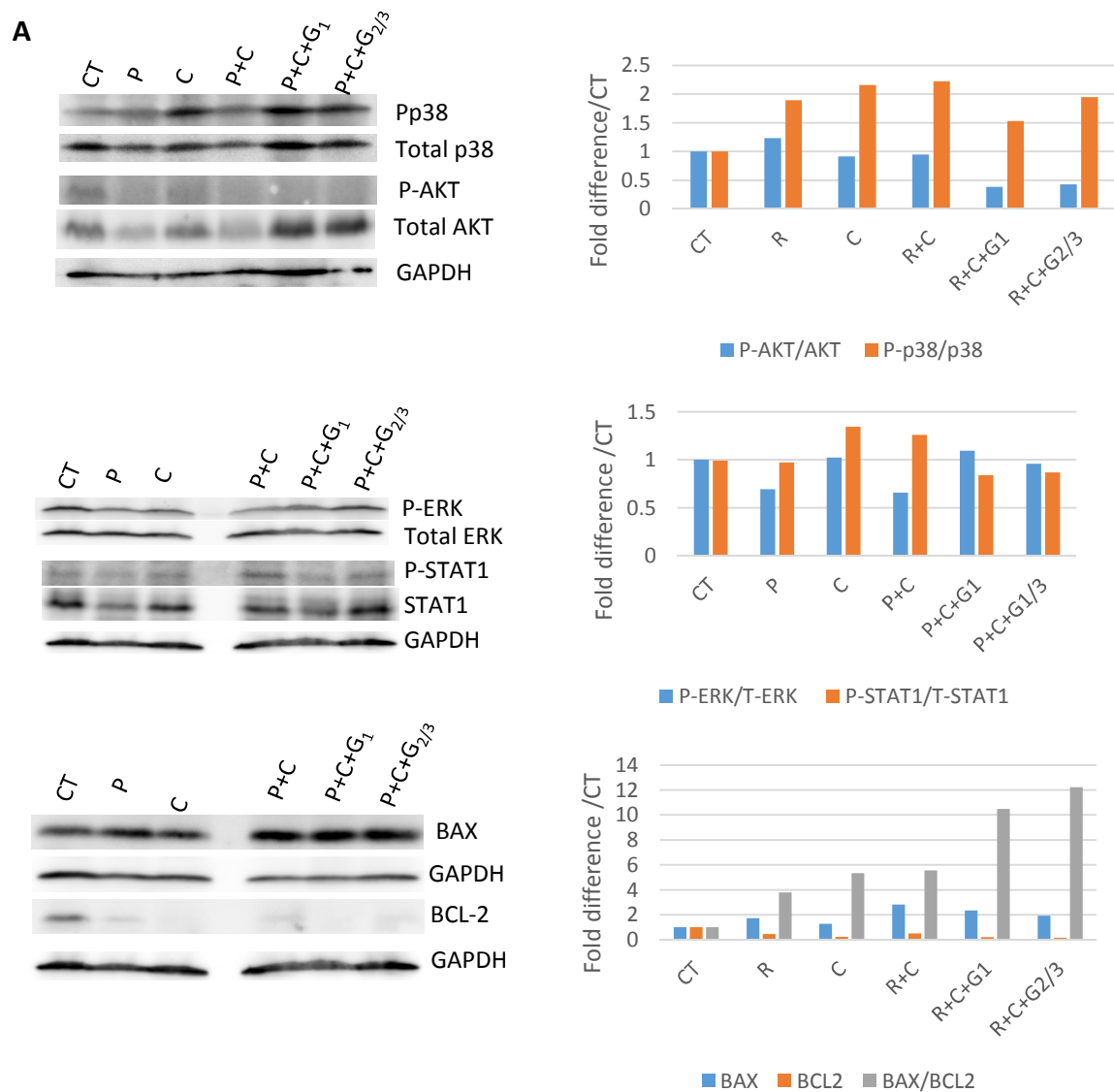


Figure 7

HIGHLIGHTS

BFCs used in combination are highly toxic to pancreatic tumor cells but spare healthy cells.

Resveratrol analogues and capsaicin treatment diminishes tumor mass *in vivo*.

BFCs combinations potentiate chemotherapy in pancreatic cancer preclinical model.

BFCs rescue full efficiency of chemotherapy when gemcitabine dose is lowered by 1/3rd.

BFCs could be used as nutrition complements during pancreatic adenocarcinoma therapy.

III. Radiosensibilisation de l'adénocarcinome pancréatique par les BFCs

Article soumis à Cancer Letters, en cours de révision

Combination treatment of resveratrol and capsaicin radiosensitizes pancreatic tumor cells by unbalancing DNA repair response to radiotherapy towards cell death

Véronique Vendrely^{1,2}, Samuel Amintas^{2,3}, Cécile Noel³, Isabelle Moranvillier^{1,3}, Isabelle Lamrissi^{1,3}, Benoit Rousseau³, Soulé Coulibaly², Aurélie Bedel^{1,2,3}, François Moreau-Gaudry^{1,2,3}, Etienne Buscaïl^{1,2,3}, Laurence Chiche^{1,2,3}, Geneviève Belleannée², Charles Dupin² and Sandrine Dabernat^{1,2,3,&}

¹INSERM U1035, Bordeaux, France

²CHU de Bordeaux, Bordeaux, France

³Université de Bordeaux, Bordeaux, France

Running title: BFC combination with radiotherapy in pancreatic cancer

[&]Corresponding author:

Université de Bordeaux

INSERM U1035

146, rue Léo Saignat

33076 Bordeaux Cedex

Email: sandrine.dabernat@u-bordeaux.fr

Phone: +33(0) 5 57 57 13 74

Fax: +33(0) 5 57 57 13 74

ABSTRACT

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) remains one of the deadliest cancers because it is highly resistant to every available therapeutic strategy, in particular conventional chemotherapy or radiotherapy (RT). Sensitizing tumor cells to existing treatments remains a good option to obtain fast and applicable results. Considering that ionizing radiations induce radiolysis-derived reactive oxygen species (ROS), we hypothesized that ROS-inducing bioactive food components (BFCs) could exacerbate ROS-related cell damages, including DNA double stranded breaks (DSBs), leaving the cellular ROS scavenging systems overwhelmed, and precipitating tumor cell death. Combination of resveratrol and capsaicin radiosensitized radiosensitive tumor cells, but RT did not increase BFC combination toxicity in radioresistant tumor cells. BFC addition to RT increased ROS production and led to significant tumor volume reduction in xenografted mouse preclinical model. Strikingly, BFCs inhibited RT-induced DNA damage molecular response by strongly limiting the first steps of DSB repair, and by keeping cells in cell cycle, provoking exacerbated intrinsic apoptosis. This study positions BFCs as potent radiosensitizers when combined, and identifies an actionable molecular pathway by resveratrol and capsaicin combination.

HIGHLIGHTS

Resveratrol and capsaicin used in combination increase radiosensitivity of pancreatic tumor cells.

Combined Bioactive Food Components (BFCs) addition to radiotherapy increases radio-induced reactive oxygen species.

BFCs combination with radiotherapy was more potent to limit tumor progression than radiotherapy alone.

Resveratrol and capsaicin strongly inhibit DNA double stranded break repair induced by radiotherapy.

BFCs might be an option as nutrition complements to radiosensitize pancreatic adenocarcinoma.

Keywords : Resveratrol, Capsaicin, Radiotherapy, Pancreatic Ductal Adenocarcinoma, DNA repair

Abbreviations

PDAC: Pancreatic ductal adenocarcinoma

BFCs: Bioactive Food Components or Compounds

ROS: Reactive Oxygen Species

CSC: Cancer Stem Cell

folfirinox: Association of Oxaliplatin, Irinotecan and 5 Fluorouracile

IC50: Half maximal inhibitory concentration

C: Capsaicin

R: Resveratrol

RT: Radiotherapy

DSBs: Double Stranded Breaks

5FU: 5 Fluoro-Uracile

ATM: Ataxia Telangiectasia Mutated

Chk: checkpoint kinase

EMT: Epithelial to Mesenchymal Transition

ATR: ATM and Rad3-related

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Katia Obama and Isabelle Lamy for administrative assistance and fund management, and the staff of University of Bordeaux animal facility, in particular Julien Izotte for technical assistance.

FUNDING SOURCES

This work was supported by grants from the Ligue régionale contre le cancer (Comité Dordogne), France.

1. INTRODUCTION:

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is associated with a poor prognosis, since the 5-year global survival rate remains under 10% (1). Given an increased incidence over the last decades, PDAC is becoming a major public health issue and is projected to become the second cancer killer in 2030 (2). This poor prognosis can be explained by the late diagnosis due to aspecific symptomatology but also by PDAC resistance towards conventional treatments as chemotherapy and radiotherapy (3). Such innate and acquired resistances most probably come from the multiple genomic aberrations found in PDAC. Indeed, more than 60 different mutations and 10 dysfunctional pathways have been identified by large scale high-throughput analyses(4), conferring multiple survival options to the tumor cells. Initially based on knowledge of PDAC, studies have tested clinically or are still evaluating radiosensitizing compounds inhibiting key oncogenic cell pathways such as ras, raf, EGFR and IGFR1 or modulating immune environment, with conflicting results or toxic issues(5). Thus, no specific radiosensitizers is currently admitted for PDAC, apart from 5-fluorouracil (5-FU) or gemcitabine, albeit with very limited success(6). Exposure to ionizing radiations induces a variety of DNA lesions, of which DNA double-stranded breaks (DSB) are the most lethal, and, if left unrepaired, lead to genomic instability or cell death. This is why several pathways have been proposed to contribute to radioresistance, mostly involved in DNA repair (7). Thus, it is very worthy to target DNA damage/repair pathways to increase RT-induced cell death. As conventional therapeutic approaches have been disappointing in PDAC, we looked for alternatives in the emerging field of BFCs. BFCs are physiologically active constituents in food or dietary supplements, including those that meet basic human nutrition needs, that have been demonstrated to have a role in health and to be safe for human consumption for intended food and dietary supplement uses (the American Dietetic Association). Among BFCs, resveratrol (a member of the stilbene family) and capsaicin (a vanilloid compound) had shown promising results on PDAC cell lines, by increasing Reactive Oxygen Species (ROS) production, and by potentiating chemo and/or radiotherapy (8). We found that combination of resveratrol and capsaicin potentiated a reduced dose of gemcitabine, resulting in full effect recovery

of high dose of gemcitabine, in a preclinical mouse model (9). As BFCs, radiotherapy induces ROS production. Therefore, using several BFCs as an induction or a combination treatment with RT might overwhelm tumor cells in scavenging ROS, resulting in increased cell death. As we already showed that resveratrol and its analogues in combination with capsaicin increased chemotherapy toxicity, we ought to test whether this approach was valid for radiosensitization.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Animals and cell lines

The 8 to 12 week-old Swiss Nude male mice (Charles River, Saint-Germain-sur-l'Arbresle, France) were housed at the University of Bordeaux animal facility A2, according to the rules and regulations of the Institutional Animal Care and Use Committee (agreement number B33-063-916). Pancreatic cell lines origins have been described earlier (10). Genomic *KRAS* PCR amplification and sequencing were carried out to control the identity of the cells (11). Their homozygous or heterozygous status WT or mutant towards *KRAS* mutation was confirmed on a regular basis on sampled genomic DNA by droplet digital PCR (ddPCR™ *KRAS* G12/G13 Screening Kit, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Human primary fibroblasts were obtained from mammoplasties after the patients had given written consent. Cell culture was carried out as already described (9). Resveratrol (R), and capsaicin (C) were from Sigma Aldrich. Highly concentrated solutions (200mM each) were prepared in ethanol.

2.2. *In vitro* cell survival assay and cell irradiation

Cells were plated at 7×10^3 cells per well in 96-well plates. The day after, resveratrol and capsaicin alone or in combinations at their IC50, IC50/2 or IC50/4 were applied in the morning. Plates were irradiated with 2-8 Gy delivered by a linear accelerator (Elekta™) using 6MV photons. Cells were kept in culture for an additional 72h before cell viability was measured as already described (9). Each point was done at least in quadruplet. Each experiment was repeated at least twice.

2.3. Protein extraction and western-blotting

Protein extracts and western blotting were performed as already described (10). The following primary antibodies were used: anti-Phospho-ATM, anti-Phospho- γ H2A.X, anti-Phospho-p53(ser15), anti-Phospho-Chk1, anti-phospho-Chk2, anti-Bax, anti-Bcl2 (Cell Signaling).

2.4. ROS detection after irradiation

For ROS detection, cells were seeded in 12-well plate (2×10^5 cells per well), 24h before the experiment. Cells were washed in PBS and incubated for 30 minutes at 37°C with Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) (DCFDA Cellular ROS Detection Assay, Abcam, 113851), then treated with single BFCs or combinations at their IC50 and/or irradiated with a 6Gy dose. Fluorescence intensity was detected by flow cytometry (BD FACSCanto II Flow Cytometer #338962).

2.5 Xenografts of the Capan-2 cells

Mice were injected subcutaneously with 8×10^5 cells in 100 μ l serum-free medium in the right and the left flanks. When the tumors reached about 100 mm³, mice were given BFCs or vehicle by gavage, 3 times a week. Resveratrol dose was 50mg/kg and capsaicin dose was 5mg/kg. Control mice were administrated with ethanol (2% v/v in PBS). The same day mice were fed the BFCs, they were irradiated with 2Gy per fraction delivered using 6 MV photons on a linear accelerator (Elekta™). Treatment tolerance was evaluated with the Lloyds' distress animal scoring system(12). Resected tumors were weighed between 19 and 21 days after starting the treatments.

2.6. Histology and morphometric analysis

Tumors were collected, fixed in 10% normal buffered formalin, and sectioned (4 μ m sections) after paraffin embedding. Slides were stained with trichrome masson stain to highlight fibrosis (appearing green). Fibrosis was evaluated by 2 distinct operators. Pictures were taken under an inverted Nikon Microscope (Eclipse Ti Nikon, Champigny sur Marne, France). They were treated the NIS-Elements Nikon software, connected with a video camera. Tumor necrosis and atypical nuclei were determined by a trained pathologist of Bordeaux University Hospital (GB). Cellularity was quantified on fluorescence images by counting the number of nuclei (stained with DAPI) per field (n=1566, n=1853,

n=1577, for CT, RT and RT+BFCs groups, respectively). KI67 stain was performed by immunohistochemistry with anti-KI67 primary antibody (Leica) and anti-mouse secondary antibody (Dako). Number of KI67-positive nuclei over total nuclei was counted on pictures (total cell number n=1746, n=877, n=1385, for CT, RT and RT+BFCs groups, respectively).

2.7. Statistical analysis

Statistical tests were performed using the Graph-Pad Prism software (6.04, GraphPad). *In vitro* results are expressed as mean \pm SD, analyzed by unpaired, bilateral Student's t tests. Results *in vivo* are expressed as mean \pm SEM, analyzed by 2-tailed Mann-Whitney test or unpaired t test with Welch's correction (fibrosis and necrosis).

3. RESULTS

3.1. Combination of BFCs radiosensitizes radiosensitive pancreatic tumor cells *in vitro*

To assess tumor cell *line* sensitivity to X-rays irradiation, the Capan-2 cells were irradiated with increasing doses of X-rays and cell survival was determined 48, 72 or 96h after irradiation. The maximal dose-response cytotoxicity was obtained 72h after irradiation (Figure 1A). Next, we found that Capan-2 and BxPC3- cells were sensitive to irradiation with lethal dose 50 (DL50) around 4Gy and 6Gy respectively. By contrast, PANC-1 and Mia PaCa-2 cells were radioresistant (Figure 1B).

To determine whether irradiation and combination BFCs (resveratrol and capsaicin) could have additive effects, we determined the best combination concentration allowing further measurable radiotoxicity. We chose to work on one radiotherapy-sensitive cell line to (Capan-2) and one resistant cell line (PANC-1). BFC combination cytotoxicity using resveratrol and capsaicin inhibitory cytotoxic dose 50 (IC50) was too strong to see any additive effect of irradiation. We tested combination treatment at IC50/2 and IC50/4 and found that the best option was to treat the cells with BFCs at half of their IC50, leading to about 50% cell cytotoxicity ($p < 0.001$ as compared to control condition). Next, we treated the cells with BFCs (IC50/2), or BFCs alone (IC50) and radiotherapy (RT, 6Gy). For Capan-2

cells, we found that each BFC used alone could significantly sensitize cells to RT (Figure 2, $p < 0.001$ when comparing RT alone to RT + R or C). Combination treatment, even at IC50/2 had a significant stronger effect ($p < 0.001$ when comparing BFCs and BFCs+RT). For the PANC-1 cell line, no sensitization by BFCs alone or in combination was evidenced.

Thus, RT cytotoxic effect was increased by combination of BFCs for radiosensitive cells but not for radioresistant cells *in vitro*.

3.2. Combination of BFCs increases radio-induced reactive oxygen species (ROS) production *in vitro*

We previously demonstrated that combination treatment increased ROS production in Capan-2 cells (9). As X-Rays irradiation induces the production of ROS, we hypothesized that combination treatment of BFCs and RT could exacerbate ROS production. We treated cells *in vitro* with BFCs and RT and ROS production was quantified (Figure 3). As expected, RT induced significant increase of ROS ($p < 0.01$, as compared to control condition) and BFCs further enhanced this effect ($p < 0.01$ as compared to RT alone).

Thus, BFCs increased ROS production resulting from irradiation.

3.3. Combination treatment of RT and BFCs was efficient to inhibit tumor progression *in vivo*

We have already shown that the R+C combination diminished tumor progression when used alone (9). To test whether the combined toxic activity of BFCs and RT was efficient in growing tumors, mice bearing subcutaneous pancreatic tumors from Capan-2 xenografts were treated with RT or RT + BFCs. Tumor masses were significantly lower for RT and RT+BFCs groups compared to control group ($p = 0.006$ and $p = 0.001$, respectively, Figure 4A) and tended to be smaller in the RT+BFCs group compared to RT group. We found that tumor progression was significantly slower in the RT+BFCs group as compared to the control group ($p < 0.001$), and to a lesser extent in the RT group. Interestingly, RT+BFCs effect was significantly higher than RT alone, leading to stagnation of tumor growth (Figure 4A), and a tumor volume difference of 40% ($p < 0.05$).

To further explore treatment impact on tumor progression, we analyzed histologic sections and performed morphometric analyses. Tumors treated by RT or RT+BFCs displayed increased fibrosis,

significantly different from control tumors, suggesting that RT induced desmoplastic reaction (Figure 5A a,d and g). Treated tumors also underwent significant enhanced necrotic reaction as compared to control group, suggesting that treatment was efficient (Figure 5B). However, no significant differences were evidenced when tumors were irradiated with or without BFCs. Moreover, RT-treated group displayed more numerous atypical nuclei (66% of 12 slides) than RT+BFC or control groups (40% of 10 and 8 slides, respectively). Furthermore, cellularity diminished, especially in the RT+BFCs group, with nuclei displaying condensed chromatin as observed in apoptotic cells. Ki67 staining, revealing cycling cells, showed that CT and RT+BFCs tumor groups had similar proportion of cells active in the cell cycle as compared to tumors treated with RT only (Figure 5A a, d and g).

Taken together these results showed a modest effect of BFC addition in RT treatment, leading to keep cells cycling and potentially inducing chromatin condensation.

3.4. BFCs modified molecular tumor response to RT treatment

X-Ray radiations induce diverse lesions in cells, involving radiolysis-derived ROS including DNA damages. To understand molecular responses to RT of treated tumors, we performed western blotting focusing on proteins involved in double stranded break repair pathway. One of the earliest events recruits ataxia telangiectasia mutated (ATM) to the DNA break, which phosphorylates histone γ H2A.X at serine 139 (Figure 6A) (13). Control tumors displayed low levels of phospho-H2A.X, whereas RT treated tumors showed a massive increase as compared to control group (about 40-fold, $p < 0.01$, Figure 6B). Surprisingly, addition of BFCs with RT strongly inhibited γ H2A.X phosphorylation ($p < 0.05$), keeping its level similar as that observed for control tumors. To investigate this unexpected result, we looked at ATM autophosphorylation (Ser1981), which is necessary for ATM kinase activity. BFC treatment diminished ATM phosphorylation as compared to RT alone (Figure 6C, $p < 0.05$). Next, we looked at downstream effectors of the double-stranded break DNA repair pathway. Both checkpoint kinases (Chk), Chk1 and Chk2 were activated by phosphorylation after RT treatment, with or without BFCs, similarly (Figure 6D). Phosphorylation of p53 (Ser15) was significantly increased in

RT treated tumors with BFCs (Figure 6E). Ratios of BAX/BCL2 proteins increased significantly only in RT+BFC tumors ($p < 0.05$, Figure 6F).

Cell growth stagnation and cell death can occur by senescence and necroptosis induction, respectively. We evaluated senescence after combination treatment (RT+BFC) *in vitro*, by acidic beta-galactosidase stain and found very few beta-galactosidase-positive cells in all tested conditions (data not shown). Western blotting of proteins involved in necroptosis cascade such as phospho-RIP3 and phospho-MLKL found no differences between groups (not shown).

Thus, these results suggest that BFC addition to RT opposes RT-induced cell cycle arrest and precipitates cells in apoptotic death.

4. DISCUSSION

Although bioactive food components have caught attention for chemosensitization, few studies have focused on radiosensitization. As for chemotherapy, tumor cells respond with diverse amplitudes to radiotherapy, as exemplified in our study. We found the pancreatic tumor cell lines BxPC-3 and Capan-2 sensitive, while Mia PaCa-2 and PANC-1 cells were resistant. When considering their genotypes (14), PANC-1 and Mia PaCa-2 are both mutated on *KRAS*, *TP53* and *CDKN2A/p16*, while wild type (WT) for *SMAD4*. BxPC-3 and Capan-2 are both WT for *p16* and have different mutational status for the 3 other main mutated genes in PDAC. *CDKN2A/p16* is a cyclin-dependent kinase inhibitor. Its presence might render tumor cells more vulnerable to ionizing radiations as previously reported (15), especially because *CDKN2A/p16* proficient tumor cells may still be able to reactivate pRB and its antiproliferative properties (16). Alternatively, PANC-1 and Mia PaCa-2 both retains valid *SMAD4* gene, but this may not be involved in RT resistance since *SMAD4* re-expression in Pancreatic tumor cells does not seem to reactivate *SMAD4* inhibitory pathways, especially when cells have evolved through epithelial to mesenchymal transition (EMT) (18). We and others have previously shown that PANC-1 cells have undergone EMT, and they also carry more cancer stem cell (CSC) like cells, which could confer acute resistance to radiotherapy (17).

Several BFCs radiosensitize tumor cells such as the polyphenols curcumin (18) and quercetin (19) or the sulfamide sulforaphane (20), for example. Considering our previous work on pancreatic tumor cell chemosensitization by combination of capsaicin and resveratrol (9), we tested the same approach with radiotherapy. We found that ionizing radiations *in vitro* cytotoxicity was amplified by BFC addition, at two different doses (IC_{50} or $IC_{50}/2$ for resveratrol or capsaicin) for the Capan-2 cell line. By contrast, PANC-1 cells, although sensitive to BFC treatment were resistant to radiotherapy,

whether or not BFCs were added. This suggests that radioresistance relies on specific capacity of PANC-1 towards radiotherapy. Others have reported failure in radiosensitizing the PANC-1 cell line (21). This resistance may depend on the expression level of the apoptosis inhibitor survivin (21,22). Alternatively, as already mentioned above, PANC-1 cells may carry intrinsic radioresistance linked to their CSC-like phenotype, that could not be counteracted by BFC addition.

By contrast to PANC-1 response, Capan-2 cells were more sensitive to radiotherapy in the presence of BFCs. Increased cell toxicity was observed when cells were irradiated and treated with a single BFC at their specific IC50 and maintained when resveratrol and capsaicin were used together, even at half their IC50. Several reports showed that resveratrol as well as capsaicin carry tumor cell toxicity by increasing ROS levels (23–25). When starting this study, we predicted that ROS production by different pathways and by converging actions of resveratrol and capsaicin and radiotherapy could increase the amplitude of ROS-induced DNA damages. We showed *in vitro* that cells treated with ionizing radiations produced ROS with a significant increase in the presence of BFCs. This is in agreement with published work showing a ROS-dependent radiosensitization of colon cancer cells by resveratrol (26).

We performed *in vivo* evaluation of the combination treatment RT+BFCs in a subcutaneous xenograft model, with BFC administration by gavage and a full body irradiation program. Tumor volume analysis confirmed significant radiosensitization by BFCs. We observed a trend of lower mean masses that could reach significance if the experiments were continued over a longer period. However, total body irradiation resulted in aplasia, which prevented further irradiations. Alternatively, similar tumor masses could still carry difference only visible at the microscopic level. To address this question, we analyzed sections of tumors within all the groups. We found that fibrotic reaction and necrosis were similarly increased in RT-treated groups, with or with BFCs, underlying efficiency of the treatments. This suggests that RT might be the main effector of tumor toxicity with a minimal modulation by BFCs. Moreover, we found a modest diminution of cellularity in the RT+BFCs treated group that could account for the observed loss of mass as compared to control.

As already reported by us and others, resveratrol or capsaicin treatment, as well as both combined induced high levels of apoptosis, involving several intracellular factors leading to unbalanced pro/anti-BCL2 members (9,27,28). We found the same impact in the present study in tumor treated with RT+BFCs, further confirmed with decreased cellularity and chromatin compaction visualized on histological section. Interestingly, RT alone did not change significantly BAX/BCL2 ratio as compared to control tumors. In fact, RT treatment alone led to significant increase in BCL2 levels (Figure 5, $p < 0.01$), and a trend to diminish BAX levels. Irradiated Mia PaCa-2 cells also changed their BAX to

BCL2 balance in the same way (20), the control of BCL2 family member levels being known as a mechanism of RT resistance (29). Our result suggests that addition of BFCs to irradiation counteracts this resistance mechanism.

The gene suppressor p53 is at the crossroad between apoptosis induction and cell cycle arrest for DNA repair (Figure 5A). We found an increase in phospho-stabilization of p53 on ser15 (and also ser6 and ser9, not shown) in RT+BFC group. Checkpoint Kinases 1 and 2 observed activation probably resulted in p53 phosphorylation. When p53 is stabilized by phosphorylation, it first stops the cell cycle by CKI production. Interestingly, the proliferation marker KI67 was turned down in RT only treated tumors and was maintained as in controls in the presence of BFCs. Thus, our results suggest that RT induces cell cycle arrest, which is counteracted by BFCs, precipitating tumor cells in unrepaired mitosis, and exacerbated apoptosis. This effect was previously described by resveratrol treatment (30). Moreover, capsaicin induced apoptosis in irradiated prostate cancer cells by opposing NFkB survival signal, independently of cell cycle arrest (31).

Next, we searched for BFC impact on RT response in earlier stages of DNA damage response. Importantly, we found profound differences between control and treated groups, and more surprisingly between RT alone and RT+BFCs groups. As the first hypothesis was that increased ROS might induce enhanced DSBs, we looked at γ H2.AX phosphorylation, which is one of the first steps of DSB DNA repair response (13), witnessing its beginning. Strikingly, and unexpectedly, γ H2.AX phosphorylation displayed a sharp increase after RT treatment, completely annihilated in the presence of BFCs. We found that this was probably due to inhibition of ATM activation, since ATM phosphorylation was no more detectable in the presence of BFCs. Resveratrol alone enhances IR-induced DNA-damage response signals, probably by ROS-related DSBs, leading to ATM activation and radiosensitization of prostate cancer cells (30) or in chronic treatment. Moreover, resveratrol alone can directly activate ATM (32). In the same way, capsaicin is known to induce ROS production and thereby DNA damages (25), but no direct action has been described on ATM activation. Interestingly, combination of resveratrol and capsaicin leads to strong ATM inhibition, as shown in the present study. This is in agreement with the inhibitory action of resveratrol on DNA repair expression members, including ATM in MCF7 cells by downregulating their expression (33). Resveratrol also exerted global homologous repair and non-end joining DNA repair inhibition in an ATM-p53-dependent pathway (34). In the same way, the other polyphenol curcumin inhibited ATM in irradiated tumor kidney cells (35). Importantly, ATM-deficient pancreatic tumor cells were more susceptible to ionizing radiation than ATM-proficient cells (36). All these data concur with the present results. So, in light of our data and published results, we hypothesize that, in one hand, additive ROS production by RT and BFCs induce ROS-related DSBs. Normal RT-related ATM-

dependent DNA repair pathway is inhibited by BFCs, including DNA lesions recognition by ATM and cell cycle arrest. In the other hand, p53-related apoptosis induction is maintained and majored by cell cycle maintenance (Figure 7).

Despite ATM inhibition, we found phosphorylation of the downstream checkpoint kinases CHK1 and CHK2. We believe that ATR (ATM and Rad3-related) and DNA-PKc activities are maintained in the presence of BFCs and trigger p53-dependant apoptotic response (Figure 7). This is further supported by the fact that ATM is the major actor of γ H2.AX phosphorylation, ATR and DNA-PKcs carrying only limited activity (13).

In conclusion, future studies are needed to optimize RT + BFCs combined effects as compared to RT used alone, by increasing the frequency of BFC treatments, or majoring their bio-availability with more systemic administration. Another option currently under investigation in our lab is to perform focal irradiation delivering high doses to improve RT-related toxicity. Nonetheless, we are describing interesting mechanistic aspects of resveratrol and capsaicin combined action on DNA repair pathway.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Katia Obama and Isabelle Lamy for administrative assistance and fund management, and the staff of University of Bordeaux animal facility, in particular Julien Izotte for technical assistance.

FUNDING SOURCES

This work was supported by grants from the Ligue régionale contre le cancer (Comité Dordogne), France.

6. REFERENCES

1. Cowppli-Bony A, Uhry Z, Remontet L, Voirin N, Guizard A-V, Trétarre B, et al. Survival of solid cancer patients in France, 1989–2013: a population-based study. *Eur J Cancer Prev.* nov 2017;26(6):461-8.
2. Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, Rosenzweig AB, Fleshman JM, Matrisian LM. Projecting Cancer Incidence and Deaths to 2030: The Unexpected Burden of Thyroid, Liver, and Pancreas Cancers in the United States. *Cancer Res.* 1 juin 2014;74(11):2913-21.
3. Kim BM, Hong Y, Lee S, Liu P, Lim JH, Lee YH, et al. Therapeutic Implications for Overcoming Radiation Resistance in Cancer Therapy. *Int J Mol Sci.* 2014;16(11):26880-913.

4. Waddell N, Pajic M, Patch A-M, Chang DK, Kassahn KS, Bailey P, et al. Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature*. 2015;518(7540):495-501.
5. Seshacharyulu P, Baine MJ, Soucek JJ, Menning M, Kaur S, Yan Y, et al. Biological determinants of radioresistance and their remediation in pancreatic cancer. *Biochim Biophys Acta BBA - Rev Cancer*. août 2017;1868(1):69-92.
6. Zhu C-P, Shi J, Chen Y-X, Xie W-F, Lin Y. Gemcitabine in the chemoradiotherapy for locally advanced pancreatic cancer: A meta-analysis. *Radiother Oncol*. mai 2011;99(2):108-13.
7. Chand S, O'Hayer K, Blanco FF, Winter JM, Brody JR. The Landscape of Pancreatic Cancer Therapeutic Resistance Mechanisms. *Int J Biol Sci*. 2016;12(3):273-82.
8. Boreddy SR, Srivastava SK. Pancreatic cancer chemoprevention by phytochemicals. *Cancer Lett*. 2013;334(1):86-94.
9. Vendrely V, Peuchant E, Buscail E, Moranvillier I, Rousseau B, Bedel A, et al. Resveratrol and capsaicin used together as food complements reduce tumor growth and rescue full efficiency of low dose gemcitabine in a pancreatic cancer model. *Cancer Lett* [Internet]. [cité 13 janv 2017]; Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304383517300174>
10. Lafitte M, Moranvillier I, Garcia S, Peuchant E, Iovanna J, Rousseau B, et al. FGFR3 has tumor suppressor properties in cells with epithelial phenotype. *Mol Cancer*. 2013;12(1):1.
11. Wang Z, Desmoulin S, Banerjee S, Kong D, Li Y, Deraniyagala RL, et al. A comprehensive in vitro characterization of pancreatic ductal carcinoma cell line biological behavior and its correlation with the structural and genetic profile. *Mol Anal Inhib Eff N-Acetyl--Cysteine Prolif Invasiveness Pancreat Cancer Cells*. 2004;445(3):236-47.
12. Lloyd MH, Wolfensohn SE. Practical use of distress scoring systems in the application of humane endpoints. *Hum Endpoints Anim Exp ...* [Internet]. 1999; Disponible sur: http://lal.org.uk/uploads/editor/HEP_Lloyd.pdf
13. Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A, Chen DJ. ATM Phosphorylates Histone H2AX in Response to DNA Double-strand Breaks. *J Biol Chem*. 9 nov 2001;276(45):42462-7.
14. Deer EL, González-Hernández J, Coursen JD, Shea JE, Ngatia J, Scaife CL, et al. Phenotype and Genotype of Pancreatic Cancer Cell Lines: *Pancreas*. mai 2010;39(4):425-35.
15. Agarwal P, Lutful Kabir FM, DeInnocentes P, Curtis R. Tumor Suppressor Gene p16/INK4A/CDKN2A and Its Role in Cell Cycle Exit, Differentiation, and Determination of Cell Fate. In: Cheng Y, éditeur. *Tumor Suppressor Genes* [Internet]. InTech; 2012 [cité 4 sept 2018]. Disponible sur: <http://www.intechopen.com/books/tumor-suppressor-genes/tumor-suppressor-gene-p16-ink4a-cdkn2a-and-its-role-in-cell-cycle-exit-differentiation-and-determina>
16. Knudsen ES, Wang JYJ. Targeting the RB-pathway in Cancer Therapy. *Clin Cancer Res*. 15 févr 2010;16(4):1094-9.
17. Wang L, Li P, Hu W, Xia Y, Hu C, Liu L, et al. CD44+CD24+ subset of PANC-1 cells exhibits radiation resistance via decreased levels of reactive oxygen species. *Oncol Lett*. août 2017;14(2):1341-6.

18. Sebastià N, Montoro A, Hervás D, Pantelias G, Hatzi VI, Soriano JM, et al. Curcumin and trans-resveratrol exert cell cycle-dependent radioprotective or radiosensitizing effects as elucidated by the PCC and G2-assay. *Mutat Res.* 2014;766-767:49-55.
19. Lagerweij T, Hiddingh L, Biesmans D, Crommentuijn MHW, Cloos J, Li X-N, et al. A chemical screen for medulloblastoma identifies quercetin as a putative radiosensitizer. *Oncotarget* [Internet]. 14 juin 2016 [cité 13 sept 2018];7(24). Disponible sur: <http://www.oncotarget.com/fulltext/7980>
20. Kubota N. Benzyl isothiocyanate sensitizes human pancreatic cancer cells to radiation by inducing apoptosis. *Int J Mol Med* [Internet]. 10 août 2011 [cité 3 sept 2018]; Disponible sur: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijmm.2011.770>
21. Galloway NR, Aspe JR, Sellers C, Wall NR. Enhanced Antitumor Effect of Combined Gemcitabine and Proton Radiation in the Treatment of Pancreatic Cancer: *Pancreas.* oct 2009;38(7):782-90.
22. Asanuma K, Kobayashi D, Furuya D, Tsuji N, Yagihashi A, Watanabe N. A Role for Survivin in Radioresistance of Pancreatic Cancer Cells. *Jpn J Cancer Res.* sept 2002;93(9):1057-62.
23. Heiss EH, Schilder YDC, Dirsch VM. Chronic Treatment with Resveratrol Induces Redox Stress- and Ataxia Telangiectasia-mutated (ATM)-dependent Senescence in p53-positive Cancer Cells. *J Biol Chem.* 14 sept 2007;282(37):26759-66.
24. Xie L, Xiang G-H, Tang T, Tang Y, Zhao L-Y, Liu D, et al. Capsaicin and dihydrocapsaicin induce apoptosis in human glioma cells via ROS and Ca²⁺-mediated mitochondrial pathway. *Mol Med Rep.* nov 2016;14(5):4198-208.
25. Yang K, Pyo J, Kim G-Y, Yu R, Han I, Ju S, et al. Capsaicin induces apoptosis by generating reactive oxygen species and disrupting mitochondrial transmembrane potential in human colon cancer cell lines. *Cell Mol Biol Lett* [Internet]. 1 janv 2009 [cité 4 sept 2018];14(3). Disponible sur: <http://www.degruyter.com/view/j/cmb.2009.14.issue-3/s11658-009-0016-2/s11658-009-0016-2.xml>
26. Tak J-K, Lee J-H, Park J-W. Resveratrol and piperine enhance radiosensitivity of tumor cells. *BMB Rep.* 30 avr 2012;45(4):242-6.
27. Kim MY, Trudel LJ, Wogan GN. Apoptosis induced by capsaicin and resveratrol in colon carcinoma cells requires nitric oxide production and caspase activation. 2009;29(10):3733-40.
28. Liu T, Wang G, Tao H, Yang Z, Wang Y, Meng Z, et al. Capsaicin mediates caspases activation and induces apoptosis through P38 and JNK MAPK pathways in human renal carcinoma. *BMC Cancer.* 2016;16(1):790.
29. Thomas S, Quinn BA, Das SK, Dash R, Emdad L, Dasgupta S, et al. Targeting the Bcl-2 family for cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets.* janv 2013;17(1):61-75.
30. Rashid A, Liu C, Sanli T, Tsiani E, Singh G, Bristow RG, et al. Resveratrol enhances prostate cancer cell response to ionizing radiation. Modulation of the AMPK, Akt and mTOR pathways. *Radiat Oncol.* 2011;6(1):144.

31. Venier NA, Colquhoun AJ, Sasaki H, Kiss A, Sugar L, Adomat H, et al. Capsaicin: A novel radio-sensitizing agent for prostate cancer: Capsaicin as a Radio-Sensitizer. *The Prostate*. févr 2015;75(2):113-25.
32. Lee J-H, Guo Z, Myler LR, Zheng S, Paull TT. Direct Activation of ATM by Resveratrol under Oxidizing Conditions. *Hammond E, éditeur. PLoS ONE*. 16 juin 2014;9(6):e97969.
33. Leon-Galicia I, Diaz-Chavez J, Garcia-Villa E, Uribe-Figueroa L, Hidalgo-Miranda A, Herrera LA, et al. Resveratrol induces downregulation of DNA repair genes in MCF-7 human breast cancer cells: *Eur J Cancer Prev*. janv 2013;22(1):11-20.
34. Gatz SA, Keimling M, Baumann C, Dörk T, Debatin K-M, Fulda S, et al. Resveratrol modulates DNA double-strand break repair pathways in an ATM/ATR-p53- and -Nbs1-dependent manner. *Carcinogenesis*. mars 2008;29(3):519-27.
35. Li G, Wang Z, Chong T, Yang J, Li H, Chen H. Curcumin enhances the radiosensitivity of renal cancer cells by suppressing NF- κ B signaling pathway. *Biomed Pharmacother*. oct 2017;94:974-81.
36. Ayars M, Eshleman J, Goggins M. Susceptibility of ATM-deficient pancreatic cancer cells to radiation. *Cell Cycle*. 19 mai 2017;16(10):991-8.

7. FIGURE AND FIGURE LEGENDS

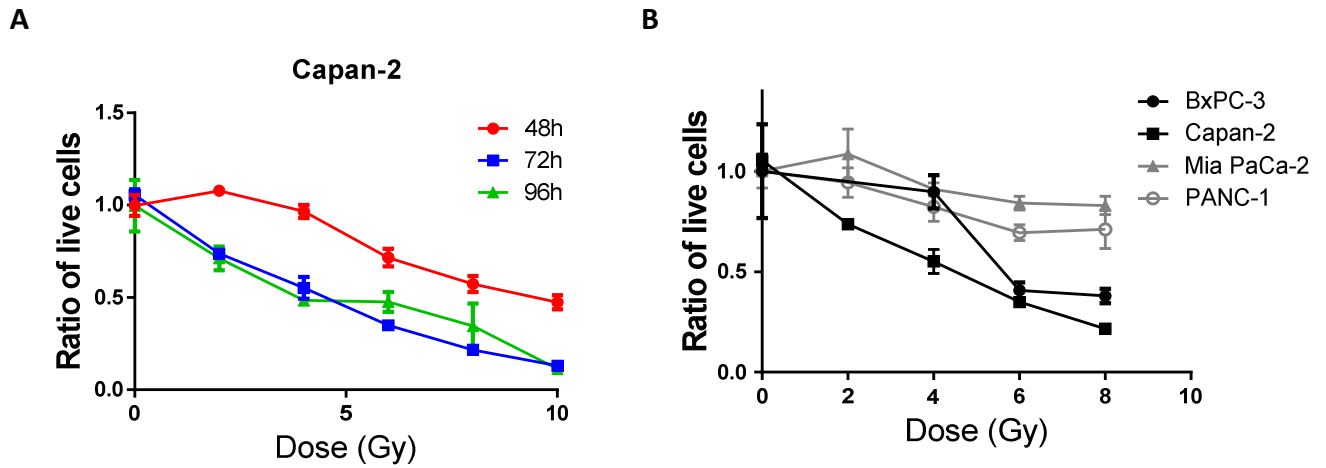


Figure 1: Pancreatic cancer cells display different radiosensitivities

Cells were irradiated with increasing doses of X-Rays and cell viability was quantified A) according to different times post irradiation in CAPAN-2 cell line B) according to pancreatic tumor cell lines 72 hours post irradiation.

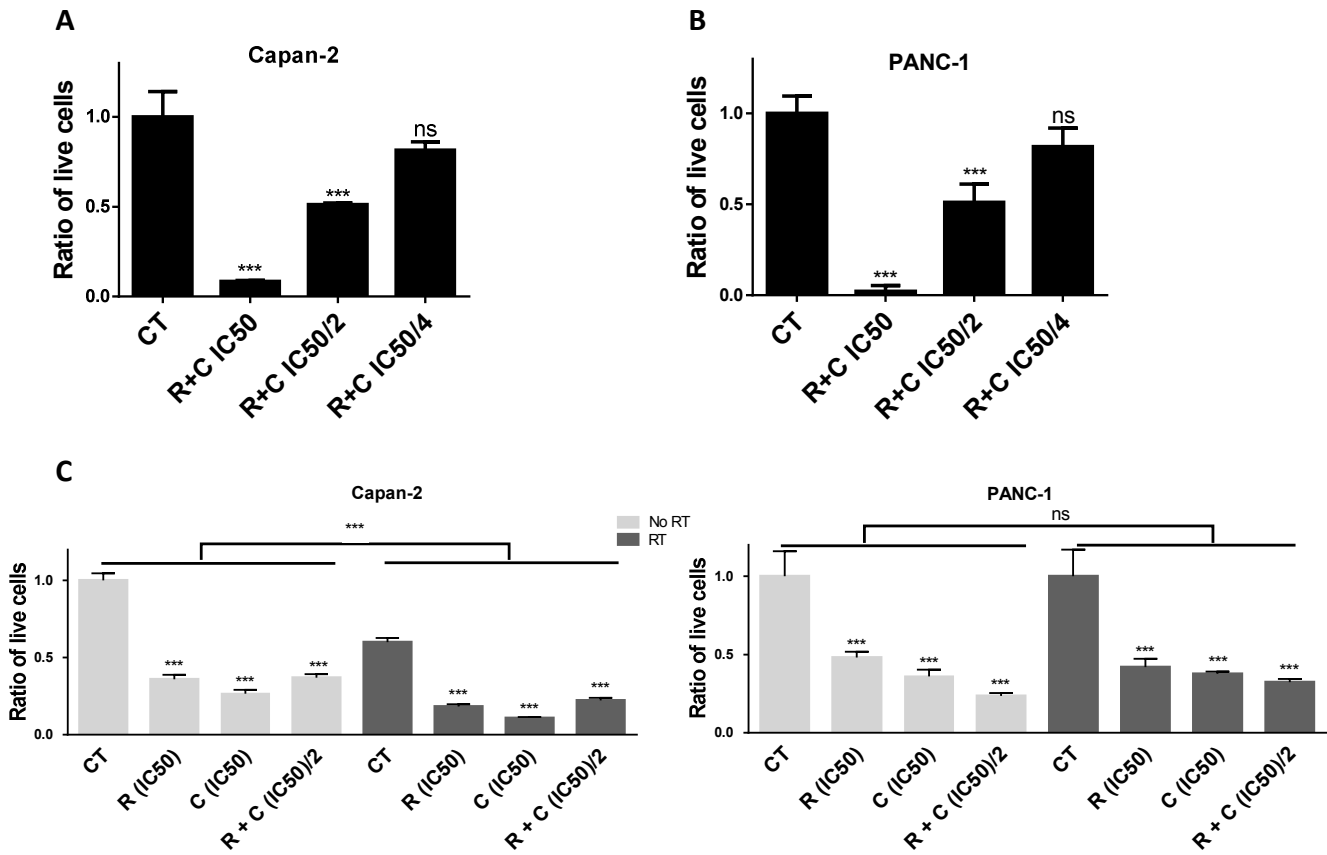


Figure 2: Combination of resveratrol and capsaicin radiosensitizes radiosensitive but not radioresistant pancreatic tumor cells

Before combination effect of radiotherapy and BFCs was tested, cell viability was determined in the presence of BFCs at different doses: IC50, IC50/2 and IC50/4, for the radiosensitive Capan-2 cells (A) and for the radioresistant PANC-1 cells (B). Both cell lines were then treated with single BFCs (at IC50) or with combination BFCs at IC50/2 each, and a radiation dose of 6Gy. Cell viability was determined 72h after irradiation. ***: $p < 0.001$, ns: not significant when conditions with or without irradiation are compared. R: resveratrol, C: capsaicin, RT: radiotherapy, CT: control treated with vehicle. Regardless of RT or CT conditions, ratio of live cells are lower in BFC conditions than without BFC ($p < 0.001$)

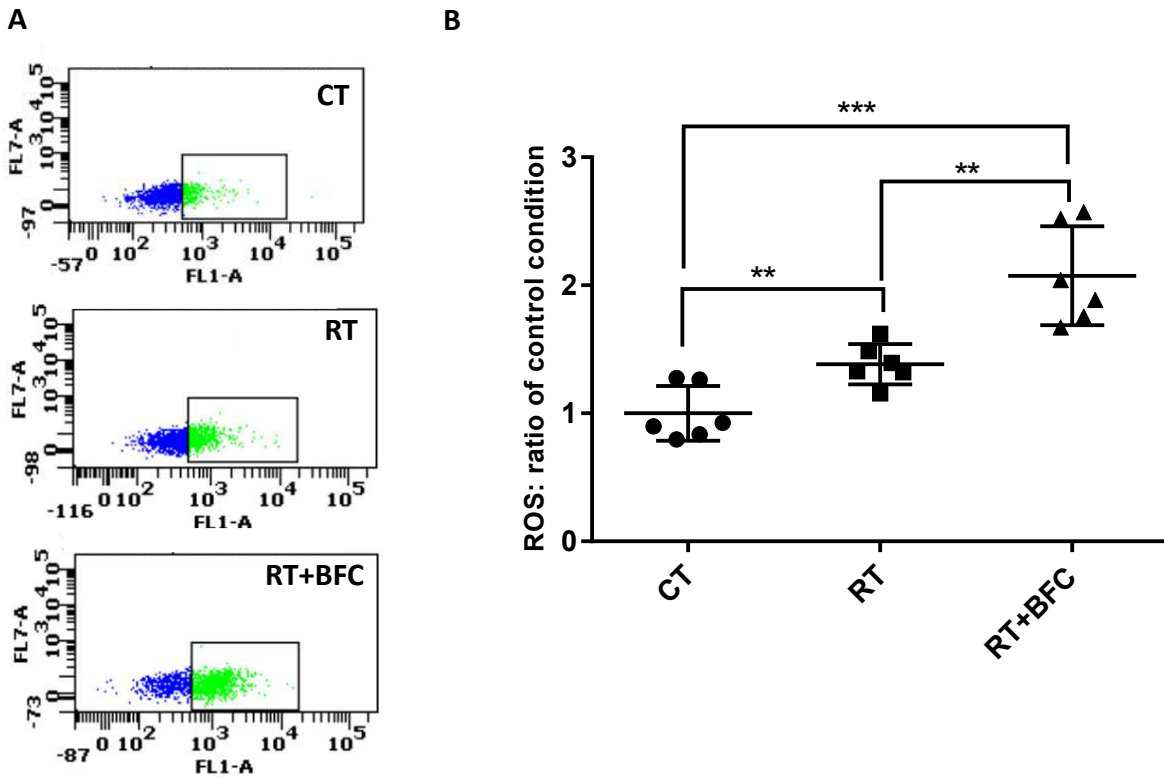


Figure 3: BFC addition to radiotherapy enhances oxygen reactive species production

Cells were incubated for 30 minutes at 37°C with DCFH-DA, then treated with radiotherapy (RT), or combination treatment of BFCs (resveratrol and capsaicin) and RT or were treated with vehicle (CT). Fluorescence increase in cells, marking the production of ROS was quantified by flow cytometry. A) Representative dot plots are shown for each condition. B) Individual results were plotted and mean \pm SD are shown for each condition. **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

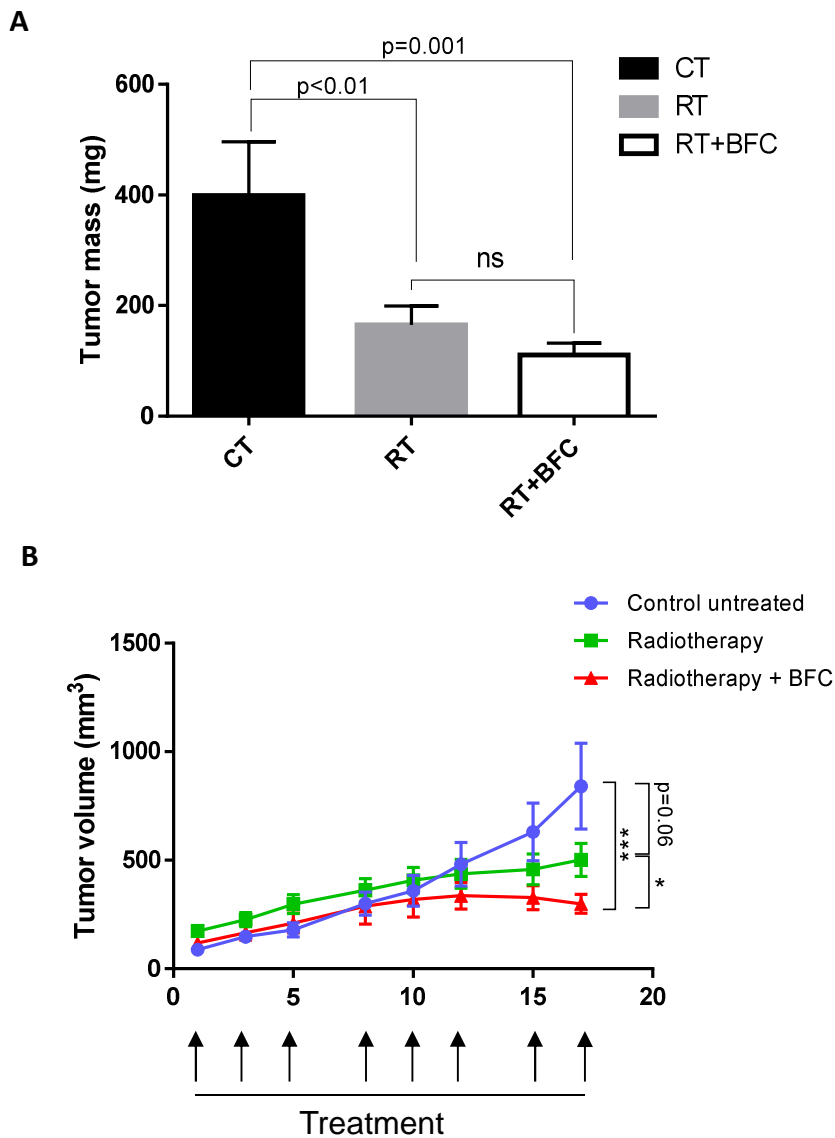


Figure 4: BFC addition to radiotherapy modulates xenografted tumor RT response

Capan-2 cells were injected subcutaneously in nude immune-deficient mice. When tumors reached about 100mm³, mice received BFCs in combination by gavage and/or were irradiated (2 Gy whole body treatment) 3 times a week, for 3 weeks. Control group (CT n=12 individual tumors) received vehicle orally. RT group received vehicle orally (n= 23 individual tumors). BFC + RT group received a combination of resveratrol 50 mg/kg (R) and capsaicin 5 mg/kg (C) (n= 18 individual tumors). (A) Tumor masses are represented as mean \pm SEM calculated from pooled experiments, as compared to the control group mean masses. (B) Tumor volumes are represented as mean \pm SEM calculated from pooled experiments, as compared to the control group mean volume. .*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ns: not significant by a two-tailed Mann Whitney test.

Figure 5: BFC addition to radiotherapy keeps tumor cells cycling

(A) Tumors were collected, fixed and embedded in paraffin. Sections were stained by Trichrome Masson (a, d, g), original magnification X100. DAPI and KI67 staining are shown for each condition (b, e, h and c, f, i respectively) original magnification X100 and X300, respectively. Fibrosis is visualized by long green fibers in between the epithelial tumor clusters. (B) Mean \pm SEM tumor fibrosis and necrosis quantifications are displayed. Mean \pm SEM cellularity and KI67 positive nuclei are presented. Yellow arrows point atypical nuclei whereas red arrows show typical DNA-containing apoptotic vesicles.

A

Figure 6: BFC addition to radiotherapy results in striking inhibition of DSB repair pathway favoring cell death response

(A) Molecular response to radiotherapy: exposure to ionizing radiations induces DNA double-stranded breaks (DSB), leading to DNA damage repair pathways activation with cell cycle arrest and eventually apoptosis induction. Western blotting was performed for at least 3 tumors of each condition. Densitometry analysis are presented under each blot as a ratio of control condition. Statistical analysis was performed for each quantification: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns: not significant by a two-tailed Mann Whitney test. (B) Immunoblot with anti-phospho-ser139- γ H2.AX. (C) Immunoblot with anti-phospho-ser1981-ATM. (D) Immunoblot with anti-phospho-ser345-CHK1 and anti-phospho-Thr68-CHK2. (E) Immunoblot with anti-phospho-ser15-p53. (G) Immunoblot with anti-bcl2 and anti-bax. BFC: resveratrol + capsaicin, RT: radiotherapy, CT: control treated with vehicle

Figure 7: Proposed model of molecular modulation of radiotherapy response by combination treatment of resveratrol and capsaicin

Proposed actions exerted by combination of resveratrol and capsaicin in RT treated xenografted pancreatic tumors according to known DNA damages pathways. Cell scheme was downloaded from Servier Medical Art, licensed under a Creative Common Attribution 3.0 Generic License. <http://smart.servier.com/>. Red arrows delineate induction and red lines with bar end symbolize inhibition.

AUTHOR'S CONTRIBUTIONS

VV: conception, design, analysis, assembly and interpretation of data, manuscript writing.

SA: collection and assembly of data, interpretation of data.

CN: collection and assembly of data, interpretation of data.

IM: design, collection and assembly of data.

IL: collection and assembly of data.

BR: design, collection of data.

SC: radiotherapy dose and course validation, collection of data

AB: design, analysis and interpretation of data, final approval of the manuscript.

FMG: design, financial support, final approval of the manuscript.

EB: financial support, final approval of the manuscript.

GB: analysis of data.

LC: design, interpretation of data and final approval of the manuscript.

CD: design, interpretation of data and final approval of the manuscript.

SD: conception, design, analysis, assembly and interpretation of data, financial support, manuscript writing.

**IV. Résultats non publiés : Recherche d'autres radiosensibilisants :
analogues du resveratrol et inhibiteurs de HDAC**

IV.A. Introduction

Outre le resvératrol, d'autres stilbènes présentent des propriétés antiprolifératives dans certaines lignées de cellules cancéreuses (168,169). Dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Pr Jean-Michel Mérillon, nous avons été amenés à tester plusieurs stilbènes comme la Vitisin A qui induit la mort cellulaire de cellules cancéreuses prostatiques par augmentation de l'expression de récepteur de mort cellulaire (170) et la Vitisin B, toxique dans des cellules leucémiques (171), l'ampelopsine A, qui induit une forte production de ROS ayant un effet antitumoral sur des cellules de cancer du colon (172), le piceid (PID), l'astringine (AS) et enfin, l'épsilon-viniférine (EV) ayant également démontré des activités antitumorales (79), y compris en combinaison avec la chimiothérapie (tableau 6) (173).

Tableau 6 : Caractérisation des stilbènes étudiés

Nom	Formule	Structure	masse molaire (g/mol)
Resvératrol	$C_{14}H_{12}O_8$		228,24
Vitisin A	$C_{26}H_{25}O_{14}^+$		561,46
Vitisin B	$C_{25}H_{25}O_{12}^+$		517,45
Ampelopsine A	$C_{15}H_{12}O_8$		320,25
e-viniferine	$C_{28}H_{22}O_6$		454,47
Piceid	$C_{20}H_{22}O_8$		390,38
Astringine	$C_{20}H_{22}O_9$		406,38

Ces analogues du resvératrol sont susceptibles d'avoir les mêmes modes d'action et d'augmenter les dommages à l'ADN en association avec la radiothérapie, par induction de ROS, en particulier, ceux constitués de polymères de resvératrol. Par ailleurs, ces molécules n'ont pas été testées sur des modèles pancréatiques.

Par ailleurs, la modification de la chromatine impacte l'état de repliement de l'ADN génomique, ce qui module sa structure, et son activité, en particulier transcriptionnelle. Les histone-désacétylases (HDAC) jouent un rôle important au niveau de la régulation transcriptionnelle de l'ADN, en favorisant la compaction (inhibition) locale de la chromatine (Figure 10). Elles modulent ainsi de nombreuses réponses cellulaires impliquant l'accessibilité de la chromatine, dont les mécanismes de réparation des dommages à l'ADN (174) (Figure 10). Plusieurs publications décrivent les inhibiteurs des histone désacétylases (HDACi) comme capables de potentialiser ou même d'exercer une activité antitumorale, avec des résultats suffisamment prometteurs pour la mise en place d'essais cliniques (175). Le butyrate de sodium et l'acide valproïque, déjà utilisés en clinique pour d'autres indications, sont des HDACi qui ont démontré une toxicité pour les cellules tumorales pancréatiques en combinaison avec une chimiothérapie (175).

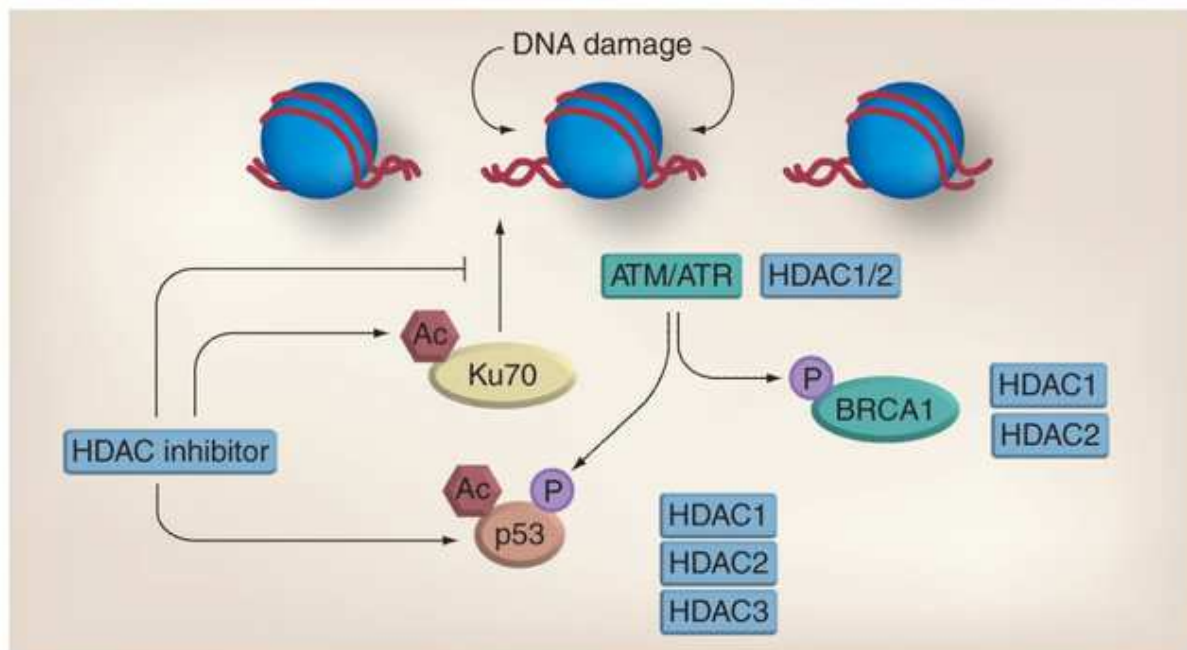


Figure 10 : Modèle d'intervention des HDAC dans la réparation de dommages à l'ADN et intervention des HDACi (176). Les inhibiteurs de HDAC la réparation de l'ADN en interagissant avec de nombreux facteurs tels que ATM, ATR, BRCA1 et p53. Les inhibiteurs de HDACs augmentent l'acétylation de Ku70 et de p53 et altèrent leurs fonctions. Les traitements combinés avec des inhibiteurs de HDAC et des facteurs de dommage à l'ADN aboutissent à une augmentation synergique de dommage à l'ADN et une diminution de la cinétique de réparation. Ac: Acétylation; ATM: Ataxia telangiectasia-mutated; ATR: Ataxia telangiectasia and Rad3- related; HDAC: Histone deacetylase.

Cependant, il n'existe pas d'analyses précliniques *in vivo* de ces molécules en combinaison avec la RT dans les modèles de PDAC. De plus, en associant à la RT, les BFCs qui génèrent de nombreux dommages sur l'ADN et les HDACi, qui en inhibent la réparation (Figure 10), on peut espérer améliorer son efficacité vis-à-vis du PDAC.

IV.B. Matériels et méthodes

IV.B.1. Matériels :

(1) Lignées cellulaires utilisées :

La lignée pancréatique non tumorale HPNE transformée par l'expression forcée de la télomérase humaine a été incluse dans cette étude. La lignée CAPAN-2 est une lignée tumorale pancréatique de phénotype épithélial mutée sur le gène K-RAS. La lignée PANC-1 est une lignée tumorale de phénotype intermédiaire présentant à la fois des caractéristiques épithéliales et mésenchymateuses.

Enfin, la lignée MIA-PaCa-2 présente un phénotype mésenchymateux. Ces 2 dernières lignées présentent des mutations dans les gènes K-RAS, TP53 et CDKN2a/p16.

(2) **Agents radiosensibilisants potentiels :**

Le resvératrol ainsi que la capsaïcine (Sigma Aldrich) ont été préparés en solution titrée à 200 mM dans l'éthanol. L'épsilon-viniférine, la vitisin A, la vitisin B, l'ampelopsine A, le picéid et l'astringine ont été fournis par l'Institut de la Vigne et du Vin (Dr. S Krisa) et mis en solution titrés à 10 mM dans l'éthanol. Le butyrate de sodium et l'acide valproïque (Sigma Aldrich) ont été dilués dans de l'eau stérile à 500 mM et 50 mM.

IV.B.2. Méthodes :

(3) **Culture cellulaire**

Les cellules ont été cultivées au laboratoire dans une étuve à 37°C à 5% de CO₂. Les milieux de culture RPMI (RPMI 1640 Medium Gibco®) ou DMEM (DMEM Gibco®) ont été additionnés de sérum de veau fœtal (Foetal Bovine Serum, qualified, Gibco®) décomplémenté à 5% ainsi que d'un mélange pénicilline (10000 U/ml) + streptomycine (10000 U/ml) dilué au 250ème et d'amphotéricine B à une concentration de 2,5 µg/ml. De l'EGF à 5% a été rajouté dans le milieu DMEM de culture des cellules HPNE.

(4) **Irradiation**

L'irradiation a été réalisée sur des cellulesensemencées en plaques de 96 puits, par un faisceau antérieur en photons X de 6 MV produits par un accélérateur de particules Elekta™.

(5) **Test de survie cellulaire *in vitro* (MTT)**

Des tests de survie cellulaire ont été réalisés pour évaluer l'action cytotoxique des substances naturelles et des drogues inhibitrices de HDAC, seules ou combinées par détermination de l'indice de cytotoxicité 50 (IC₅₀). Pour cela, $1,2 \cdot 10^4$ cellules par puits ont étéensemencées dans des plaques 96 puits, puis traitées le lendemain avec des doses croissantes de chaque composé dilué dans l'éthanol (BFCs) ou simplement dans du milieu de culture (inhibiteurs de HDACs). Elles ont été maintenues en culture pendant 72h, puis lavées avec du Phosphate Buffer Saline (PBS) et incubées avec du MTS (Méthyl Thiazol Sulfate) pendant 3 h suivie d'une lecture de l'absorbance au spectrophotomètre à

490 nm. Chaque condition de traitement est réalisée au minimum en quadrupla. Les résultats sont exprimés par la survie cellulaire en calculant le ratio DO test / DO témoin.

(6) **Modèle préclinique sur souris xénogreffées**

Pour l'étude *in vivo* testant l'effet antitumoral de la combinaison des BFCs et des inhibiteurs de HDACs, des xénogreffes de cellules humaines CAPAN-2 ont été réalisées chez 20 souris immunodéprimées NSGTM (NOD/Shi-scid/IL-2R γ null) âgées de 8 à 12 semaines. Les tumeurs ont été induites par greffe sous-cutanée de cellules CAPAN-2 dans 100 μ l de milieu sans sérum au niveau des flancs droits et gauches de chaque souris sous anesthésie par isoflurane. Les tumeurs ont été mesurées trois fois par semaine à partir du jour où elles ont été visibles et jusqu'à ce qu'elles atteignent 100 mm³. Par la suite, les souris ont été réparties dans différents groupes de traitement : un groupe contrôle, un groupe R+C traité par du resvératrol (50 mg/kg) et de la capsaïcine (5 mg/kg), un groupe EV+C traité par epsilon-viniférine (50 mg/kg) et capsaïcine (5mg/kg) et un groupe EV+C+VPA traité par acide valproïque en plus de l'épsilon-viniférine et de la capsaïcine administrés en gavage 3 fois /semaine pendant 21 jours. L'acide valproïque a été dilué à une concentration de 0,07 mg/l dans l'eau de boisson du groupe de souris correspondant. Au cours de ces expérimentations *in vivo*, les souris ont été pesées 3 fois par semaine et leur tolérance aux traitements a été surveillée tous les jours selon Lloyds' distress animal scoring system (177). Trois jours après la dernière séance de gavage, les souris ont été sacrifiées et les tumeurs ont été prélevées pour des évaluations morphométriques et moléculaires.

(7) **Tests statistiques**

Le logiciel GraphPad® a été utilisé pour réaliser les analyses statistiques. Pour comparer les valeurs de plus de 2 conditions, un test ANOVA était réalisé. Lorsque celui-ci était significatif, les valeurs de chaque groupe ont été comparées entre elles 2 à 2 par un test de Mann-Whitney ou un test de student. Pour l'ensemble des tests, le risque alpha était de 5%, et une valeur de $p < 0.05$ était considérée comme significativement différente.

IV.C. Résultats/discussion

(1) **Détermination des IC50 des analogues du resvératrol**

Dans le cadre de la collaboration avec l'ISVV, nous avons évalué plusieurs stilbènes avec en particulier des analogues du resvératrol. Par ailleurs, des inhibiteurs d'HDAC ont également été

évalués. Afin de déterminer la toxicité des différents composés sur plusieurs lignées cellulaires pancréatiques, des tests de survie cellulaire ont été réalisés, d'abord sur une des lignées disponibles, la lignée Capan-2. Pour chaque molécule, une gamme de concentration a été testée pour permettre la détermination de l'IC50 (Figure 11).

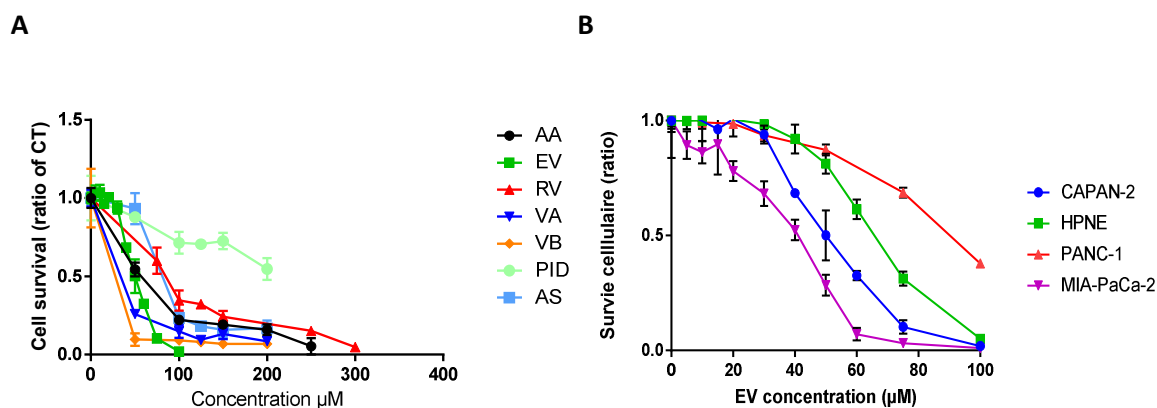


Figure 11 : Détermination des IC50 des analogues du resvératrol sur la lignée cellulaire pancréatique Capan-2.

A) Chaque point a été quadruplé : Courbes de survie cellulaire pour des doses croissantes (résultats préliminaires, 1 expérience). AA : Ampelopsine A, EV : Epsilon-viniférine, RV : Resvératrol, VA : Vitisin A, VB : Vitisin B, PID : Picéid, AS : Astringine. B) Courbes de survie de cellules de différentes lignées en présence de doses croissantes d'E-Viniférine. 2 expériences indépendantes sauf pour PANC-1 (1 expérience).

Les IC50 pour les cellules CAPAN-2 de l'EV (67 μM) et du resvératrol (75 μM) sont du même ordre de grandeur et comparables à celui du picéatannol, un autre analogue du resvératrol testé par notre équipe (178). L'IC50 de l'EV est également similaire à celui trouvé dans la lignée de cellules cancéreuses hépatiques HepG2 (169). Ainsi, l'effet de ces composés ne semble pas nécessiter un ajustement de leur concentration, lorsqu'ils sont utilisés seuls, qu'ils soient monomériques ou dimériques. De plus, il est intéressant de constater que l'EV est plus toxique sur les lignées cancéreuses que sur la lignée de cellules pancréatiques normales transformées (HPNE), à l'exception des cellules PANC-1, qui nécessite une reproduction de l'expérience (figure 11). Ce résultat est en accord avec celui obtenu pour le resvératrol, qui avait montré une toxicité forte sur toutes les lignées cancéreuses, affectant peu les HPNE et les cellules fibroblastiques primaires (178).

(2) Comparaison de l'effet cytotoxique de l'épsilon-



Afin de comparer l'effet cytotoxique de l'épsilon-viniférine par rapport à celui de son analogue le resvératrol, nous avons réalisé plusieurs tests de survie cellulaire. Nous avons choisi la lignée CAPAN-2 qui avait été déjà testée avec les combinaisons de BFCs au laboratoire, et qui était sensible à l'EV. Pour l'EV et le resvératrol, l'ajout de la capsaïcine augmente significativement l'effet cytotoxique du traitement mais la combinaison epsilon-viniférine + capsaïcine présente un meilleur effet cytotoxique que la combinaison resvératrol + capsaïcine (Figure 12).

Ainsi, l'EV en combinaison avec la capsaïcine, présente une cytotoxicité 2,8 fois plus forte que la combinaison resvératrol+capsaïcine ($p < 0,05$). Ceci est en accord avec les résultats obtenus sur les cellules HepG2 qui ont montré que l'EV était plus cytotoxique que le resvératrol, cytotatique (169). La combinaison du picéatannol (analogue du resvératrol monomère) et de la capsaïcine, n'était pas plus efficace que resvératrol+capsaïcine (178). Ainsi, l'EV, dimère de resvératrol, pourrait potentialiser l'apoptose induite par le resvératrol ou le picéatannol (monomères), en combinaison avec la capsaïcine. Comme le resvératrol, l'EV pourrait induire une forte production d'espèces réactives de l'oxygène, ce qui en combinaison avec la capsaïcine déborderait les systèmes d'élimination cellulaire. Ces hypothèses restent à explorer.

(3) Effet cytotoxique de la combinaison de BFCs et



Après avoir comparé l'épsilon-viniférine au resvératrol, nous avons étudié les combinaisons de ces 2 molécules avec des inhibiteurs de HDACs. Les HDACi étant déjà décrits comme des agents radiosensibilisants et inhibiteurs de la croissance tumorale dans plusieurs types de cancers (179), l'étude de leurs propriétés à la fois cytotoxique et radiosensibilisante sur l'adénocarcinome pancréatique semblait intéressante. Nos premiers résultats ont montré une cytotoxicité dose-dépendante de l'acide valproïque (AV) et du sodium butyrate (NB) sur les cellules tumorales pancréatiques (Figure 13A et 13B). De manière intéressante, celle de l'AV était plus importante sur les lignées cancéreuses que sur les cellules pancréatiques HPNE avec un IC50 multiplié de 2 à 5 fois pour les cellules tumorales (Figure 13C). Cet effet sélectif vis-à-vis des cellules tumorales a déjà été publié pour plusieurs inhibiteurs de HDACs (180), sans toutefois identifier un/des mécanisme(s) d'action précis. De façon surprenante d'ailleurs, les HDACi modulent les mêmes ensembles de gènes dans les cellules cancéreuses et les cellules de même type saines (48). Ces résultats suggèrent que

l'effet sélectif est lié à la modulation de la réparation des dommages à l'ADN plutôt qu'à la modulation différentielle de panels de gènes, par exemple en intervenant sur les modifications d'histones au niveau des cassures double-brin. Le butyrate de sodium (NB) s'est révélé plus toxique pour les cellules HPNE que pour les cellules tumorales testées (CAPAN-2 et PANC-1, Figure 13B). Ce résultat n'est pas en accord avec les données de la littérature qui rapportent des effets similaires du sodium butyrate et de l'acide valproïque. Cela suggère que les voies modulées par les HDACi testés sont distinctes, au moins dans les cellules HPNE.

La survie des cellules CAPAN-2 traitées par plusieurs combinaisons de BFCs et d'inhibiteurs de HDACs a ensuite été mesurée *in vitro*. L'effet cytotoxique du resvératrol était potentialisé par les 2 inhibiteurs de HDACs, de façon dose-dépendante (figures 14 et 15).

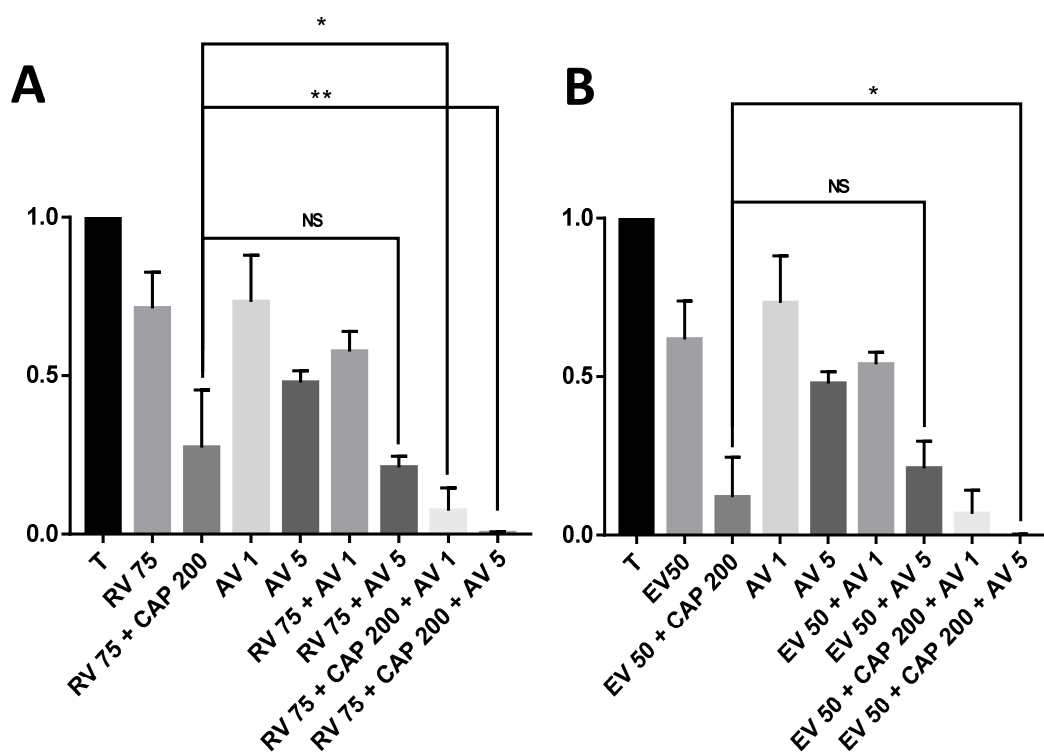


Figure 14 : Effet cytotoxique de l'acide valproïque, en association avec le resvératrol, l'épsilon-viniférine et la capsaïcine sur les cellules CAPAN-2.

A: Effet cytotoxique des combinaisons de RV, CAP et AV (3 expériences indépendante, chaque condition en quadruplicata).

B: Effet cytotoxique des combinaisons de EV, CAP et AV (3 expériences indépendante, chaque condition en quadruplicata). T: témoin non traité, RV: resvératrol, CAP: capsaïcine, AV: acide valproïque, EV: epsilon-viniférine. Les chiffres correspondent aux concentrations dans le milieu des drogues testées en μM pour RV, EV et CAP et en mM pour AV.

**, * : $p < 0.001$ et $p < 0.01$ respectivement.

Les doubles combinaisons étaient aussi efficaces que celles avec la capsaïcine pour l'AV (Figure 14A) et pour le NB (Figure 15A), même si une différence significative était observée à 5mM. Les triples combinaisons incluant l'acide valproïque amplifiaient l'activité cytotoxique menant à des pourcentages de survie cellulaire quasiment nuls (Figure 14A). Les triples combinaisons incluant le butyrate de sodium ne donnent pas de résultats significativement différents des doubles combinaisons, mais ont été obtenus que sur une seule expérience qui devra être réitérée pour pouvoir vérifier ces premiers résultats (Figure 15A).

Des résultats similaires ont été obtenus lorsque l'épsilon-viniférine était utilisée à la place du resvératrol (Figures 14B et 15B). Cependant l'épsilon-viniférine, la capsaïcine et à la fois l'acide valproïque et le sodium butyrate (à 5mM), montraient un effet cytotoxique significativement plus important par rapport aux doubles combinaisons (Figures 14B et 15B).

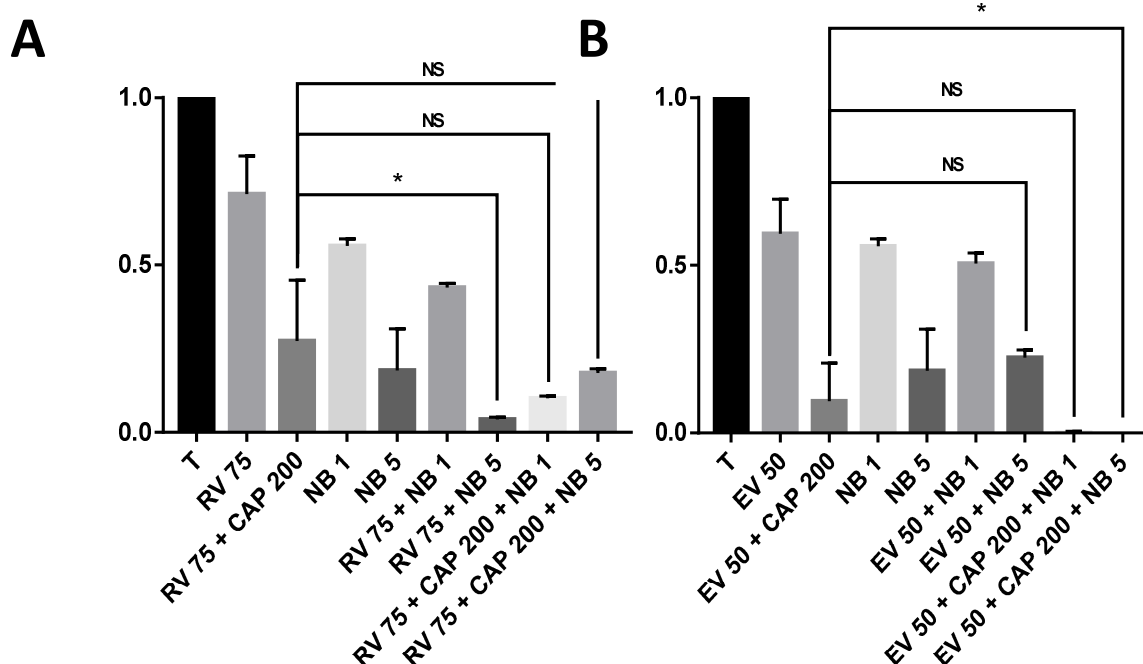


Figure 15 : Effet cytotoxique du butyrate de sodium, en association avec le resvératrol, l'épsilon-viniférine et la capsaïcine sur les cellules CAPAN-2

A: Effet cytotoxique des combinaisons de RV, CAP et NB (2 expériences indépendantes, chaque condition en quadruplicate). **B:** Effet cytotoxique des combinaisons de EV, CAP et NB (Une expérience indépendante, chaque condition en quadruplicate). T: témoin non traité, RV: resvératrol, CAP: capsaïcine, NB: butyrate de sodium, EV: epsilon-viniférine. Les chiffres correspondent aux concentrations dans le milieu des drogues testées en μM pour RV, EV et CAP et en mM pour NB.

* : $p < 0.05$

L'association de molécules inhibitrices de HDACs avec les BFCs potentialise donc leur activité cytotoxique sur les cellules CAPAN-2. Les BFCs ont été décrites comme activant la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Présents en quantité importante, ces ROS induisent des lésions à l'ADN et notamment des cassures double-brin. En inhibant les mécanismes de réparation de l'ADN par modulation des modifications d'histones localement (33), plutôt qu'en modulant l'expression de gènes, les inhibiteurs de HDACs et les BFCs pourraient potentialiser la radiothérapie par des voies différentes.

(4) Radiosensibilisation *in vitro* par HDACi et BFCs

L'objectif premier de ces analyses *in vitro* était de tester la possibilité que les HDACi pourraient participer au débordement des systèmes de réparation des dommages de l'ADN, déjà probablement sollicités par l'action des BFCs, induits par les dommages liés à la radiothérapie. Les cellules CAPAN-2 ont donc été traitées par les BFCs/HDACi en présence ou en absence d'irradiation (Figure 16). Nous avons choisi de tester l'acide valproïque qui était plus efficace en triple combinaison qu'en double.

Figure 16 : Effet cytotoxique des BFCs et de l'acide valproïque seuls ou en combinaison, en association avec la radiothérapie sur la lignée cellulaire CAPAN-2

*Les cellules ont été traitées par les molécules seules à leur IC50 ou en combinaison à l'IC50/2, et irradiées à la dose de 6 Gy. La survie cellulaire a été déterminée 72h après l'irradiation. ***: p<0.001, ns: non significatif lorsque les conditions avec et sans irradiation sont comparées. R: resveratrol, C: capsaïcine, CT: contrôle traité par éthanol. Une expérience.*

Ce sont encore des résultats préliminaires qui restent à reproduire, mais il semble qu'une association de 2 BFCs (R+C ou EV+C) et de l'acide valproïque, utilisés à leur demi-IC50, potentialise la radiothérapie. Nous envisageons d'explorer les voies de réponse aux dommages à l'ADN, l'impact sur le cycle cellulaire et la mort cellulaire afin de caractériser les mécanismes d'action de ces combinaisons.

(5) Association de BFCs et d'HDACi *in vivo*

Nos résultats *in vitro* étant encourageants, en particulier pour les combinaisons d'inhibiteurs de HDACs et de BFCs, ces combinaisons ont ensuite été testées *in vivo* sur le modèle préclinique de souris NSG xénogreffées. L'acide valproïque a été choisi plutôt que le sodium butyrate puisque les effets cytotoxiques combinés avec les BFCs étaient systématiquement statistiquement différents et les doses à administrer et la toxicité chez la souris étaient décrites dans la littérature (182). L'étude des volumes tumoraux montre un effet significatif des différentes combinaisons testées comparées au groupe contrôle. L'ajout de l'acide valproïque donne des résultats comparables à ceux obtenus avec R+C ou EV+C. Enfin, la combinaison de capsaïcine avec le resvératrol ou l'épsilon-viniférine donne des résultats similaires (Figure 17), alors que nous espérons que le dimère aurait une action anti-tumorale plus importante.

Les résultats *in vitro* montraient un effet cytotoxique très prometteur de l'EV seul ou en association avec la radiothérapie. Notre hypothèse était que l'EV pourrait être plus efficace de par sa structure de dimère du resvératrol. L'EV comme le miyabenol (trimère du resvératrol) ont montré des effets cytotoxiques et une forte induction de l'apoptose, avec de manière intéressante des effets différents sur le cycle cellulaire *in vitro* (183,184). *In vivo*, les analyses de volume tumoral ne montrent pas plus d'efficacité mais des résultats similaires avec epsilon-viniférine ou resvératrol. Des résultats publiés montrent que comparé au resvératrol, l'EV n'a pas de meilleur pouvoir chimiopotentialisant sur des cellules tumorales de colon (168). Cette similitude entre EV et RV, retrouvée également avec le picéatannol confirme néanmoins un effet systématique lié à la classe moléculaires (stilbènes). Quant à l'acide valproïque, l'absence d'amélioration d'efficacité antitumorale pourrait être liée au mode d'administration : l'acide valproïque avait été dilué dans l'eau de boisson des souris, ce qui ne permet pas de quantifier précisément la dose reçue par chaque souris. Il est probable qu'une administration en injection intrapéritonéale soit plus reproductible et plus efficace (182).

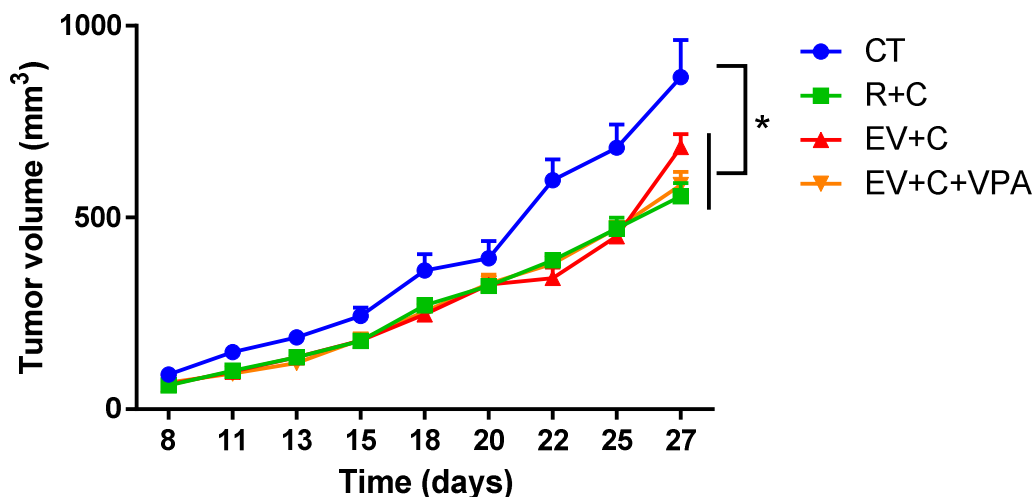


Figure 17 : Effet de l'association de BFCs et d'acide valproïque sur un modèle préclinique de tumeurs pancréatiques.

Les cellules Capan-2 étaient greffées en sous-cutanées dans les flancs de souris immuno-déficientes NSG. Lorsque les tumeurs atteignaient 100 mm³, les souris recevaient en combinaison les BFCs et l'acide valproïque en gavage, 3 fois par semaine, pendant 3 semaines. CT: groupe contrôle (CT n=10 tumeurs). R+C: groupe traité par resvératrol 50 mg/kg (R) et capsaïcine 5 mg/kg (C) (n=10 tumeurs). EV+C: groupe traité par epsilon-viniférine 50 mg/kg et capsaïcine 5 mg/kg (n=10 tumeurs). EV+C+VA : groupe traité par EV+C aux doses mentionnées ci-dessus et acide valproïque dilué dans l'eau de boisson. Les volumes tumoraux sont représentés en moyenne \pm écart-type comparée à la moyenne des volumes tumoraux du groupe contrôle. * $p < 0.05$, selon le test Mann Whitney.

IV.D. Conclusion

Ainsi, les résultats préliminaires de cet ensemble d'expériences montrent un effet potentialisateur des combinaisons HDACis et BFCs, utilisées sans radiothérapie ou chimiothérapie.

De nouveaux tests *in vitro* sur des lignées cellulaires saines telles que des fibroblastes, des cellules mononuclées du sang ou des kératinocytes permettront d'évaluer l'effet sélectif antitumoral des substances et combinaisons testées. Des études de lignées cellulaires cancéreuses pancréatiques traitées par des combinaisons de gemcitabine et/ou de RT, BFC et HDACi permettront de mettre en évidence le potentiel effet radio et chimiosensibilisant de ces combinaisons, pour la première fois.

Dans un second temps, les résultats obtenus devront être validés *in vivo* sur les modèles précliniques testés préliminairement. Nous avons la possibilité de réaliser des irradiations focalisées depuis l'acquisition et l'installation en 2018 dans l'animalerie de Talence d'un irradiateur préclinique XENX

(XStrahl). Ce type d'irradiation permet à la fois d'éviter la toxicité induite par une irradiation corporelle totale, et de se rapprocher des conditions de traitement chez l'homme. Nous avons validé notre protocole d'irradiation focalisée sur un modèle de souris Rag2C^{-/-}, en proposant une irradiation focalisée en dose unique par 2 faisceaux tangentiels centrés sur la tumeur. Dans un second temps, des greffes orthotopiques pourront être réalisées pour valider la meilleure combinaison thérapeutique.

V. Discussion générale et perspectives

Dans un contexte où les effets anticancéreux des BFCs sont de plus en plus explorés (83), nous nous sommes intéressés à l'action chimiosensibilisante et radiosensibilisante de la combinaison de BFCs issus de familles différentes (polyphénols avec le resvératrol, alcaloïdes avec la capsaïcine et hétérosides avec le sulforaphane). De nombreuses études ont évalué la sensibilisation de la chimiothérapie par différents BFCs utilisés isolément et dans différents types de cancers (83,89,185). Au début de notre travail, aucune étude de combinaison de BFCs n'était publiée dans le cadre du traitement du cancer du pancréas. Or ces molécules présentent des mécanismes d'action communs, en particulier une induction de l'apoptose (30,41,57,77-79) ou un effet pro-oxydant (91,178,186), de plus on peut supposer qu'il existe également des mécanismes spécifiques susceptibles d'agir de façon additive ou synergique. Nous avons montré que la capsaïcine, le resvératrol et le sulforaphane, utilisés seuls, entraînaient une cytotoxicité *in vitro*, et que leur combinaison était plus efficace que le traitement par chaque BFC. Cette efficacité a été confirmée *in vivo* avec la combinaison de capsaïcine et de resvératrol alors qu'utilisé isolément la capsaïcine ou le resvératrol ne montrait pas de différence significative de volume tumoral dans un modèle préclinique de cancer du pancréas. Cette combinaison a également montré une meilleure efficacité et une induction significativement plus forte de l'apoptose comparée à chaque substance utilisée isolément sur une lignée cellulaire de mélanome (93). De plus d'autres combinaisons comme resvératrol et pipérine (polyphénol et alcaloïde) ou curcumine et proanthocyanidine (polyphénols) ont montré de meilleurs résultats que chaque BFC seul sur des lignées cellulaires tumorales de cancer du colon et de mélanome (117,187).

L'analyse de la littérature fait la part belle à l'effet chimiosensibilisant des BFCs dans plusieurs types de cancers solides ou liquides, et en association avec des molécules de chimiothérapie de classes différentes. Les études avec la radiothérapie sont plus rares même si on constate une augmentation exponentielle des publications sur ce sujet dans les 5 dernières années.

Notre premier travail de sensibilisation de la gemcitabine par les BFCs a montré que l'ajout de capsaïcine et de resvératrol à une dose réduite de gemcitabine permettait de retrouver l'efficacité de la dose pleine de gemcitabine dans un modèle préclinique. Si cet effet était confirmé chez l'homme, un co-traitement par les BFCs pourrait être indiqué à chaque fois que la dose de gemcitabine doit être réduite devant une toxicité, ce qui arrive fréquemment en pratique clinique, notamment en cas de thrombopénie (188).

Dans un second temps, il nous a paru intéressant d'explorer la radiosensibilisation dans la mesure où nous avons mis en évidence un fort effet pro-oxydant de la combinaison capsaïcine et resvératrol et que cet effet pouvait s'additionner à l'effet de la radiothérapie pour augmenter les dommages à l'ADN. Alors qu'un effet radiosensibilisant net était mis en évidence *in vitro*, nous avons constaté un effet plus modeste *in vivo*, qui aurait peut-être été plus important si nous avons pu poursuivre

l'expérience. En effet, l'irradiation corporelle totale répétée des souris entraînait une aplasie progressive limitante, et pouvait induire de nombreuses modifications physiologiques et métaboliques interagissant avec l'effet anti-tumoral. Les prochaines expériences pourront être réalisées avec irradiation focalisée des tumeurs en dose unique ou fractionnée.

La recherche des mécanismes impliqués a permis de confirmer une production augmentée de ROS avec l'ajout de BFCs à la chimiothérapie comme à la radiothérapie, retrouvée également dans de nombreuses études (90,91,117,122,189). De plus, l'analyse moléculaire des tumeurs a mis en évidence une induction augmentée de l'apoptose en ajoutant les BFCs à l'irradiation. Cet effet est communément retrouvé dans les études de chimiosensibilisation et de radiosensibilisation (83,89,109,190). Les mécanismes moléculaires impliqués intéressent principalement les voies de signalisation NFkB ou Akt-mTor qui sont mises en évidence pour différents BFCs tant en chimiosensibilisation qu'en radiosensibilisation (figure 9) (94,119,125). Ces mécanismes communs sont très décrits probablement car ce sont les mécanismes les plus recherchés, introduisant un biais sélectif d'exploration mécanistique. Il serait intéressant d'utiliser des approches plus globales de type OMICS pour identifier des mécanismes non encore décrits qui pourraient être impliqués dans les effets synergiques et additifs.

De façon inattendue, l'analyse moléculaire des tumeurs irradiées et traitées par BFCs comparées aux tumeurs irradiées sans BFCs a mis en évidence un mécanisme d'inhibition de la réparation de l'ADN par inhibition de la phosphorylation d'ATM. Une inhibition de l'expression d'ATM par le resvératrol avait également été mise en évidence dans la lignée tumorale MCF7 de cancer du sein (191,192) ainsi qu'avec la curcumine (135). D'autres études ont montré que certains BFCs pouvaient inhiber l'expression de gènes de la réparation comme *Ku70*, *Ku80*, *XRCC4* (130) ou *LIG4*, *PNKP*, *XRCC5* et *CCNH* (134), ce qui est en accord avec nos résultats, et pourrait expliquer l'absence de P-ATM en présence de BFCs. Il serait intéressant d'étudier également les voies de réparation de l'ADN dans la chimiosensibilisation par les BFCs. En effet, les BFCs pourraient induire des dommages à l'ADN par les ROS et en empêcher ensuite la réparation, facilitant ainsi l'effet de la chimiothérapie.

Enfin, l'examen des coupes histologiques des tumeurs a montré une augmentation des cellules apoptotiques, de chromatine condensée et de noyaux irréguliers témoignant de la mort cellulaire par apoptose, mais aussi de zones de nécrose, induites par les lésions directes de l'irradiation. Cette nécrose pourrait être également secondaire à l'apoptose augmentée par les BFCs. Nous avons évalué l'activation de protéines impliquées dans la nécroptose (Phospho-RIP1, Phospho-RIP3 et Phospho-MLKL) sans trouver de différence dans les tumeurs irradiées avec ou sans BFCs.

Dans la mesure où nous avons montré une potentialisation de la gemcitabine par les BFCs d'une part et une radiosensibilisation par ces mêmes BFCs d'autre part, nous projetons de poursuivre ce travail en étudiant l'association de BFCs à la chimioradiothérapie avec gemcitabine. En effet, en pratique clinique, seules deux molécules de chimiothérapie, le 5Fluoro-Uracile et la gemcitabine, sont utilisées en association avec la radiothérapie dans le traitement des cancers du pancréas. La gemcitabine est reconnue comme un radiosensibilisant majeur, au prix d'une toxicité importante sur les tissus sains. En associant les BFCs, en particulier la combinaison resvératrol + capsaïcine, qui stimulent la production de ROS, à la chimioradiothérapie avec gemcitabine, on peut espérer une double potentialisation de la radiothérapie et de la chimiothérapie, en augmentant l'efficacité de la RT, et en diminuant la dose de gemcitabine associée pour une même efficacité et une meilleure tolérance du traitement.

Par ailleurs, il paraît intéressant d'approfondir l'étude des HDACi et d'autres BFCs susceptibles d'avoir une efficacité /biodisponibilité différentes. Certains BFCs comme les isothiocyanates, dont fait partie le sulforaphane, ont d'ailleurs montré une activité inhibitrice de HDAC, qui serait secondaire à l'inactivation de la voie NFκB (97). Par ailleurs, le sulforaphane a montré une activité anti-tumorale sur des lignées tumorales pancréatiques en modulant plusieurs voies de signalisation comme STAT3, AMPk ou Hedgehog (193–195) ou en association au sorafenib (98). Compte-tenu de son activité inhibitrice de HDAC, il serait intéressant de l'évaluer à plus forte dose *in vivo* en association avec la radiothérapie, d'autant plus que des résultats intéressants de radiosensibilisation *in vitro* de 4 lignées tumorales pancréatiques ont été publiés récemment (130). Dans notre premier travail, le sulforaphane avait été évalué en association avec la capsaïcine et le resvératrol ou le picéatannol avec des résultats très intéressants *in vitro*, puisqu'il s'agissait de la combinaison la plus cytotoxique. Par contre, de manière étonnante, l'addition de sulforaphane venait contrer l'action de la combinaison capsaïcine et picéatannol qui permettait une diminution de 40 % du volume tumoral moyen par rapport au contrôle. Il est possible que la dose du sulforaphane ait été insuffisante, provoquant un effet antioxydant plutôt que pro-oxydant, puisque les souris étaient traitées à une dose de 3 mg/kg en gavage 3 fois par semaine alors que d'autres études ont retrouvé un effet anti-tumoral avec une dose de 20 mg/kg (193). Ces questions de doses, voies d'administration et biodisponibilité sont majeures pour l'utilisation des BFCs et l'effet qu'on en attend. Le resvératrol par exemple, qui a été le plus étudié, a une biodisponibilité faible. Sa tolérance est bien connue, et il peut être consommé à une dose comprise entre 1 et 5g/jour, néanmoins il présente une activité inductrice du cytochrome P450 qui peut entraîner des interactions médicamenteuses, aussi la dose retenue dans les essais cliniques est de 1g/jour (100,196). A cette dose néanmoins, la concentration retrouvée dans les tissus est en dessous des concentrations utilisées dans les études pré-cliniques,

sauf dans le duodénum et le colon qui bénéficient du passage digestif (100). De même la biodisponibilité de la curcumine ou du sulforaphane est limitée, quant à la capsaïcine, sa dose est limitée par la tolérance au piment. Aussi la recherche d'analogues avec de meilleures disponibilités (102,197,198) ou de nouvelles formulations par exemple sous forme liposomale ou couplées à des nanoparticules sont à l'étude (89).

Alors que les BFCs ont un effet radiosensibilisant, mis en évidence *in vitro* et *in vivo* sur différents types de lignées tumorales, un effet radioprotecteur des tissus sains est également abondamment décrit (146). Cette dualité, particulièrement intéressante, ferait des BFCs des candidats idéaux pour la radiosensibilisation. Les mécanismes de cet effet différentiel pourraient être liés à la dose différente de BFCs dans les tissus tumoraux comparés aux tissus sains, liée à la capacité différente des cellules à capter et métaboliser ces molécules, avec un effet anti-oxydant à faible dose et un effet pro-oxydant à forte dose. Par exemple, des concentrations élevées de curcumine (>50 μM) induisent la production de ROS, alors que des doses faibles (autour de 10 μM) diminuent le taux de ROS (158). Cet effet dose est important à considérer, ce d'autant que la biodisponibilité des BFCs reste limitée et dépendante de multiples facteurs. L'effet pro-apoptotique des BFCs pourrait également être lié au cycle cellulaire, expliquant une cytotoxicité sur les cellules tumorales proliférantes qui épargnerait les cellules saines quiescentes (159). Enfin, le métabolisme cellulaire peut être différent entre cellules tumorales et saines, avec par exemple une élimination plus rapide du resvératrol et de ses métabolites dans les cellules saines comparées aux cellules tumorales (199). Parmi les effets radioprotecteurs à explorer, une étude récente suggère un effet radioprotecteur intestinal chez des souris traitées par resvératrol donné quotidiennement à la dose de 40 mg/kg 1 jour avant et 5 jours après irradiation abdominale (7 Gy) (150). La dose de resvératrol étant proche des doses données à visée pro-oxydante que nous avons utilisée dans notre travail (50 mg/kg), nous avons prélevé les intestins des souris traitées par irradiation corporelle totale avec ou sans capsaïcine et resvératrol pour rechercher ultérieurement les lésions radiques. La même équipe a mis en évidence une protection par le resvératrol vis-à-vis de l'aplasie aiguë en cas d'irradiation corporelle totale (151), que nous n'avons pas retrouvé chez nos souris (résultats non montrés).

L'existence d'un effet anti ou pro-oxydant dépendant de la dose ne manque cependant pas d'interroger quant à l'innocuité des nombreux compléments alimentaires commercialisés, parfois avec le soutien de certains confrères, à base de divers BFCs à forte dose et souvent combinés. Précédemment, plusieurs études d'intervention ont montré que le β -carotène en complément alimentaire à forte dose, entre 20 et 30 mg/j alors que les apports recommandés sont de 2,1 mg/, ne prévenait pas l'apparition de cancers. Au contraire, chez les sujets exposés à des cancérogènes tels

que les fumeurs, la consommation au long cours de compléments en β -carotène à des doses non nutritionnelles (20 à 30 mg/j) augmente significativement le risque de cancer du poumon (200,201).

De façon générale, autant les publications précliniques sont légion, autant les résultats d'essais cliniques bien menés évaluant les BFCs en chemoprévention, chimiosensibilisation, radiosensibilisation ou radioprotection manquent encore. Cependant, de nombreux essais sont recensés sur clinicaltrials.gov. Parmi les essais en cours, un essai randomisé (POUDER) évalue le sulforaphane à la dose de 90 mg/j contre placebo chez des patients porteurs de cancer du pancréas localement évolué traités par chimiothérapie (ID NCT01879878) (99). En radiosensibilisation, un essai américain évalue la curcumine en association à une chimioradiothérapie standard préopératoire dans les cancers du rectum avec un objectif principal de taux de stérilisation complète (ID NCT00745134). Les réponses cliniques ne devraient pas tarder à voir le jour.

Ainsi, le champ de recherches de l'association de BFCs aux traitements conventionnels du cancer est encore très ouvert. Les BFCs explorés aujourd'hui ne représentent qu'une petite partie des BFCs disponibles, les interactions avec le microbiote, le développement de la nutriginétique et de la nutriginomique ouvrent des perspectives nouvelles. Ce domaine de recherche explose devant la nécessité de réponses scientifiques et rigoureuses, dans un contexte sociétal où des informations contradictoires et passionnées font quotidiennement la une de l'actualité. Les changements sociétaux actuels favorisent la prise de molécules d'origine naturelle, alors que leur efficacité comme leur innocuité reste à démontrer. Parmi ces molécules, certaines confirmeront peut-être des propriétés thérapeutiques anti-cancéreuses exploitables pour nos patients sous réserve de formulation améliorant leur biodisponibilité et d'essais cliniques bien conduits.

VI. Références

1. Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet*. juin 1992;339(8808):1523-6.
2. Milner JA. Nutrition and cancer: Essential elements for a roadmap. *Cancer Lett*. oct 2008;269(2):189-98.
3. Latino-Martel P, Cottet V, Druesne-Pecollo N, Pierre FHF, Touillaud M, Touvier M, et al. Alcoholic beverages, obesity, physical activity and other nutritional factors, and cancer risk: A review of the evidence. *Crit Rev Oncol Hematol*. mars 2016;99:308-23.
4. Cowppli-Bony A, Uhry Z, Remontet L, Voirin N, Guizard A-V, Trétarre B, et al. Survival of solid cancer patients in France, 1989–2013: a population-based study. *Eur J Cancer Prev*. nov 2017;26(6):461-8.
5. Harikumar KB, Kunnumakkara AB, Sethi G, Diagaradjane P, Anand P, Pandey MK, et al. Resveratrol, a multitargeted agent, can enhance antitumor activity of gemcitabine in vitro and in orthotopic mouse model of human pancreatic cancer. *Int J Cancer*. 2010;127(2):257-68.
6. Bin Xu, Tao Z-Z. Piceatannol Enhances the Antitumor Efficacy of Gemcitabine in Human A549 Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Oncol Res*. 2014;22(4):213-7.
7. Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, Rosenzweig AB, Fleshman JM, Matrisian LM. Projecting Cancer Incidence and Deaths to 2030: The Unexpected Burden of Thyroid, Liver, and Pancreas Cancers in the United States. *Cancer Res*. 1 juin 2014;74(11):2913-21.
8. Bouvier A-M, Uhry Z, Jooste V, Drouillard A, Remontet L, Launoy G, et al. Focus on an unusual rise in pancreatic cancer incidence in France. *Int J Epidemiol*. 01 2017;46(6):1764-72.
9. Iodice S, Gandini S, Maisonneuve P, Lowenfels AB. Tobacco and the risk of pancreatic cancer: a review and meta-analysis. *Langenbecks Arch Surg*. juill 2008;393(4):535-45.
10. Li D, Morris JS, Liu J, Hassan MM, Day RS, Bondy ML, et al. Body mass index and risk, age of onset, and survival in patients with pancreatic cancer. *JAMA*. 24 juin 2009;301(24):2553-62.
11. de Mestier L, Danset J-B, Neuzillet C, Rebours V, Cros J, Soufir N, et al. Pancreatic ductal adenocarcinoma in BRCA2 mutation carriers. *Endocr Relat Cancer*. 2016;23(10):T57-67.
12. Benzel J, Fendrich V. Familial Pancreatic Cancer. *Oncol Res Treat*. 2018;41(10):611-8.
13. Huxley R, Ansary-Moghaddam A, Berrington de González A, Barzi F, Woodward M. Type-II diabetes and pancreatic cancer: a meta-analysis of 36 studies. *Br J Cancer*. 6 juin 2005;92(11):2076-83.
14. Chari ST, Leibson CL, Rabe KG, Ransom J, de Andrade M, Petersen GM. Probability of pancreatic cancer following diabetes: a population-based study. *Gastroenterology*. août 2005;129(2):504-11.
15. Modolell I, Guarner L, Malagelada JR. Vagaries of clinical presentation of pancreatic and biliary tract cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 1999;10 Suppl 4:82-4.

16. Neuzillet C, Gaujoux S, Williet N, Bachet J-B, Baugeon L, Colson Durand L, et al. Pancreatic cancer: French clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up (SNFGE, FFCD, GERCOR, UNICANCER, SFCD, SFED, SFRO, ACHBT, AFC). *Dig Liver Dis Off J Ital Soc Gastroenterol Ital Assoc Study Liver*. 18 août 2018;
17. Seufferlein T, Bachet JB, Van Cutsem E, Rougier P, on behalf of the ESMO Guidelines Working Group. Pancreatic adenocarcinoma: ESMO-ESDO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2012;23(suppl 7):vii33-40.
18. Choti MA, Dixon E, Tyler D. Pretreatment Assessment of Resectable and Borderline Resectable Pancreatic Cancer: Expert Consensus Statement by Callery et al. *Ann Surg Oncol*. juill 2009;16(7):1734-5.
19. Neoptolemos JP, Stocken DD, Dunn JA, Almond J, Beger HG, Pederzoli P, et al. Influence of resection margins on survival for patients with pancreatic cancer treated by adjuvant chemoradiation and/or chemotherapy in the ESPAC-1 randomized controlled trial. *Ann Surg*. 2001;234(6):758.
20. Bilimoria KY, Talamonti MS, Sener SF, Bilimoria MM, Stewart AK, Winchester DP, et al. Effect of Hospital Volume on Margin Status after Pancreaticoduodenectomy for Cancer. *J Am Coll Surg*. oct 2008;207(4):510-9.
21. Delperro JR, Boher JM, Sauvanet A, Le Treut YP, Sa-Cunha A, Mabrut JY, et al. Pancreatic Adenocarcinoma with Venous Involvement: Is Up-Front Synchronous Portal-Superior Mesenteric Vein Resection Still Justified? A Survey of the Association Française de Chirurgie. *Ann Surg Oncol*. juin 2015;22(6):1874-83.
22. Farges O, Bendersky N, Truant S, Delperro JR, Pruvot FR, Sauvanet A. The Theory and Practice of Pancreatic Surgery in France: *Ann Surg*. nov 2017;266(5):797-804.
23. Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouché O, Guimbaud R, Becouarn Y, et al. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med*. 2011;364(19):1817-25.
24. Oettle H, Post S, Neuhaus P, Gellert K, Langrehr J, Ridwelski K, et al. Adjuvant Chemotherapy With Gemcitabine vs Observation in Patients Undergoing Curative-Intent Resection of Pancreatic Cancer: A Randomized Controlled Trial. *JAMA*. 17 janv 2007;297(3):267.
25. Stocken DD, Büchler MW, Dervenis C, Bassi C, Jeekel H, Klinkenbijn JHG, et al. Meta-analysis of randomised adjuvant therapy trials for pancreatic cancer. *Br J Cancer*. avr 2005;92(8):1372-81.
26. Neoptolemos JP, Bassi C, Fernandez-Cruz L, Falconi M, Spooner D. A Randomized Trial of Chemoradiotherapy and Chemotherapy after Resection of Pancreatic Cancer. *N Engl J Med*. 2004;11.
27. Neoptolemos JP, Stocken DD, Bassi C, Ghaneh P, Cunningham D, Goldstein D, et al. Adjuvant chemotherapy with fluorouracil plus folinic acid vs gemcitabine following pancreatic cancer resection: a randomized controlled trial. *JAMA*. 8 sept 2010;304(10):1073-81.
28. Neoptolemos JP, Palmer DH, Ghaneh P, Psarelli EE, Valle JW, Halloran CM, et al. Comparison of adjuvant gemcitabine and capecitabine with gemcitabine monotherapy in patients with resected pancreatic cancer (ESPAC-4): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *The Lancet*. mars 2017;389(10073):1011-24.

29. Gerard JP. Improved Sphincter Preservation in Low Rectal Cancer With High-Dose Preoperative Radiotherapy: The Lyon R96-02 Randomized Trial. *J Clin Oncol*. 2004;22(12):2404-9.
30. Suker M, Beumer BR, Sadot E, Marthey L, Faris JE, Mellon EA, et al. FOLFIRINOX for locally advanced pancreatic cancer: a systematic review and patient-level meta-analysis. *Lancet Oncol*. juin 2016;17(6):801-10.
31. Marthey L, Sa-Cunha A, Blanc JF, Gauthier M, Cueff A, Francois E, et al. FOLFIRINOX for Locally Advanced Pancreatic Adenocarcinoma: Results of an AGEO Multicenter Prospective Observational Cohort. *Ann Surg Oncol*. 2014;22(1):295-301.
32. Hammel P, Huguet F, van Laethem J-L, Goldstein D, Glimelius B, Artru P, et al. Effect of Chemoradiotherapy vs Chemotherapy on Survival in Patients With Locally Advanced Pancreatic Cancer Controlled After 4 Months of Gemcitabine With or Without Erlotinib: The LAP07 Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 3 mai 2016;315(17):1844.
33. Kalsner MH, Ellenberg SS. Pancreatic cancer. Adjuvant combined radiation and chemotherapy following curative resection. *Arch Surg Chic Ill 1960*. août 1985;120(8):899-903.
34. Klinkenbijnl JH, Jeekel J, Sahmoud T, van Pel R, Couvreur ML, Veenhof CH, et al. Adjuvant radiotherapy and 5-fluorouracil after curative resection of cancer of the pancreas and periampullary region: phase III trial of the EORTC gastrointestinal tract cancer cooperative group. *Ann Surg*. déc 1999;230(6):776-82; discussion 782-784.
35. Gillen S, Schuster T, Meyer zum Büschenfelde C, Friess H, Kleeff J. Preoperative/Neoadjuvant Therapy in Pancreatic Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis of Response and Resection Percentages. Seiler C, éditeur. *PLoS Med*. 20 avr 2010;7(4):e1000267.
36. Denost Q, Laurent C, Adam J, Capdepon M, Vendrely V, Collet D, et al. Pancreaticoduodenectomy following chemoradiotherapy for locally advanced adenocarcinoma of the pancreatic head. *HPB*. sept 2013;15(9):716-23.
37. Delpero JR, Bachellier P, Regenet N, Le Treut YP, Paye F, Carrere N, et al. Pancreaticoduodenectomy for pancreatic ductal adenocarcinoma: a French multicentre prospective evaluation of resection margins in 150 evaluable specimens. *HPB*. janv 2014;16(1):20-33.
38. Petrelli F, Coiu A, Borgonovo K, Cabiddu M, Ghilardi M, Lonati V, et al. FOLFIRINOX-based neoadjuvant therapy in borderline resectable or unresectable pancreatic cancer: a meta-analytical review of published studies. *Pancreas*. 2015;44(4):515-521.
39. Huguet F, Rivin Del Campo E, Antoni D, Vendrely V, Hammel P. [Role of radiation therapy in the management of pancreatic cancer]. *Cancer Radiother J Soc Francaise Radiother Oncol*. oct 2018;22(6-7):552-7.
40. Petrelli F, Comito T, Ghidini A, Torri V, Scorsetti M, Barni S. Stereotactic Body Radiation Therapy for Locally Advanced Pancreatic Cancer: A Systematic Review and Pooled Analysis of 19 Trials. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1 févr 2017;97(2):313-22.
41. Jones S, Zhang X, Parsons DW, Lin JC-H, Leary RJ, Angenendt P, et al. Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science*. 26 sept 2008;321(5897):1801-6.

42. Cicenas J, Kvederaviciute K, Meskinyte I, Meskinyte-Kausiliene E, Skeberdyte A, Cicenas J. KRAS, TP53, CDKN2A, SMAD4, BRCA1, and BRCA2 Mutations in Pancreatic Cancer. *Cancers*. 28 avr 2017;9(5).
43. Wang F, Xia X, Yang C, Shen J, Mai J, Kim H-C, et al. *SMAD4* Gene Mutation Renders Pancreatic Cancer Resistance to Radiotherapy through Promotion of Autophagy. *Clin Cancer Res*. 1 juill 2018;24(13):3176-85.
44. Bailey P, Chang DK, Nones K, Johns AL, Patch A-M, Gingras M-C, et al. Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature*. 3 mars 2016;531(7592):47-52.
45. Abbas S. Molecular biology of adenocarcinoma of the pancreatic duct, current state and future therapeutic avenues. *Surg Oncol*. 2013;22(2):69-76.
46. Spratlin JL, Mackey JR. Human Equilibrative Nucleoside Transporter 1 (hENT1) in Pancreatic Adenocarcinoma: Towards Individualized Treatment Decisions. *Cancers*. 2 déc 2010;2(4):2044-54.
47. Maréchal R, Bachet J, Mackey JR, Dalban C, Demetter P, Graham K, et al. Levels of Gemcitabine Transport and Metabolism Proteins Predict Survival Times of Patients Treated With Gemcitabine for Pancreatic Adenocarcinoma. *Gastroenterology*. sept 2012;143(3):664-674.e6.
48. Aparicio T, Ducreux M, Chaussade S. [5-fluorouracil: metabolism and current indications in digestive cancer treatment]. *Gastroenterol Clin Biol*. janv 2002;26(1):38-47.
49. Dasari S, Bernard Tchounwou P. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol*. oct 2014;740:364-78.
50. Kelley RK, Ko AH. Erlotinib in the treatment of advanced pancreatic cancer. *Biol Targets Ther*. mars 2008;2(1):83-95.
51. Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, Figer A, Hecht JR, Gallinger S, et al. Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol*. 2007;25(15):1960-6.
52. Sinn M, Bahra M, Liersch T, Gellert K, Messmann H, Bechstein W, et al. CONKO-005: Adjuvant Chemotherapy With Gemcitabine Plus Erlotinib Versus Gemcitabine Alone in Patients After R0 Resection of Pancreatic Cancer: A Multicenter Randomized Phase III Trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 10 oct 2017;35(29):3330-7.
53. Pujade-Lauraine E, Ledermann JA, Selle F, Gebski V, Penson RT, Oza AM, et al. Olaparib tablets as maintenance therapy in patients with platinum-sensitive, relapsed ovarian cancer and a BRCA1/2 mutation (SOLO2/ENGOT-Ov21): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2017;18(9):1274-84.
54. Bendell J, O'Reilly EM, Middleton MR, Chau I, Hochster H, Fielding A, et al. Phase I study of olaparib plus gemcitabine in patients with advanced solid tumours and comparison with gemcitabine alone in patients with locally advanced/metastatic pancreatic cancer. *Ann Oncol*. 2015;26(4):804-11.

55. Stinchcombe TE. Nanoparticle albumin-bound paclitaxel: a novel Cremphor-EL-free formulation of paclitaxel. *Nanomed.* août 2007;2(4):415-23.
56. Von Hoff DD, Ervin T, Arena FP, Chiorean EG, Infante J, Moore M, et al. Increased Survival in Pancreatic Cancer with nab-Paclitaxel plus Gemcitabine. *N Engl J Med.* 2013;369(18):1691-703.
57. Chiang N-J, Chang J-Y, Shan Y-S, Chen L-T. Development of nanoliposomal irinotecan (nal-IRI, MM-398, PEP02) in the management of metastatic pancreatic cancer. *Expert Opin Pharmacother.* juill 2016;17(10):1413-20.
58. Wang-Gillam A, Li C-P, Bodoky G, Dean A, Shan Y-S, Jameson G, et al. Nanoliposomal irinotecan with fluorouracil and folinic acid in metastatic pancreatic cancer after previous gemcitabine-based therapy (NAPOLI-1): a global, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Lond Engl.* 6 févr 2016;387(10018):545-57.
59. Loeffler JS, Durante M. Charged particle therapy--optimization, challenges and future directions. *Nat Rev Clin Oncol.* juill 2013;10(7):411-24.
60. Baskar R, Dai J, Wenlong N, Yeo R, Yeoh K-W. Biological response of cancer cells to radiation treatment. *Front Mol Biosci.* 2014;1:24.
61. Lacombe J, Mange A, Azria D, Solassol J. Identification de marqueurs prédictifs de la réponse à la radiothérapie par approche protéomique. *Cancer/Radiothérapie.* févr 2013;17(1):62-9.
62. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics. *Br J Cancer.* août 1972;26(4):239-57.
63. Okada H, Mak TW. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer.* août 2004;4(8):592-603.
64. Kluck RM, Esposti MD, Perkins G, Renken C, Kuwana T, Bossy-Wetzel E, et al. The pro-apoptotic proteins, Bid and Bax, cause a limited permeabilization of the mitochondrial outer membrane that is enhanced by cytosol. *J Cell Biol.* 15 nov 1999;147(4):809-22.
65. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer.* sept 2002;2(9):647-56.
66. Levine B, Klionsky DJ. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell.* avr 2004;6(4):463-77.
67. Chan TA, Hermeking H, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. 14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature.* 7 oct 1999;401(6753):616-20.
68. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 26 sept 1995;92(20):9363-7.
69. Fernet, V. Ponette, E. Deniaud-Alex M. Poly(ADP-ribose) polymerase, a major determinant of early cell response to ionizing radiation. *Int J Radiat Biol.* janv 2000;76(12):1621-9.

70. Godon C, Cordelières FP, Biard D, Giocanti N, Mégnin-Chanet F, Hall J, et al. PARP inhibition versus PARP-1 silencing: different outcomes in terms of single-strand break repair and radiation susceptibility. *Nucleic Acids Res.* août 2008;36(13):4454-64.
71. Christmann M, Tomicic MT, Roos WP, Kaina B. Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology.* 15 nov 2003;193(1-2):3-34.
72. Jiricny J. The multifaceted mismatch-repair system. *Nat Rev Mol Cell Biol.* mai 2006;7(5):335-46.
73. O'Driscoll M, Jeggo PA. The role of double-strand break repair - insights from human genetics. *Nat Rev Genet.* janv 2006;7(1):45-54.
74. Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kaçmaz K, Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem.* 2004;73:39-85.
75. Bolderson E, Richard DJ, Zhou B-BS, Khanna KK. Recent advances in cancer therapy targeting proteins involved in DNA double-strand break repair. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 15 oct 2009;15(20):6314-20.
76. Bonaccio M, Di Castelnuovo A, Costanzo S, Gialluisi A, Persichillo M, Cerletti C, et al. Mediterranean diet and mortality in the elderly: a prospective cohort study and a meta-analysis. *Br J Nutr.* oct 2018;120(8):841-54.
77. Sofi F, Cesari F, Abbate R, Gensini GF, Casini A. Adherence to Mediterranean diet and health status: meta-analysis. *BMJ.* 11 sept 2008;337(sep11 2):a1344-a1344.
78. Guo X, Tresserra-Rimbau A, Estruch R, Martínez-González MA, Medina-Remón A, Fitó M, et al. Polyphenol Levels Are Inversely Correlated with Body Weight and Obesity in an Elderly Population after 5 Years of Follow Up (The Randomised PREDIMED Study). *Nutrients.* 3 mai 2017;9(5).
79. Biais B, Krisa S, Cluzet S, Da Costa G, Waffo-Teguo P, Mérillon J-M, et al. Antioxidant and Cytoprotective Activities of Grapevine Stilbenes. *J Agric Food Chem.* 21 juin 2017;65(24):4952-60.
80. Basli A, Soulet S, Chafer N, Mérillon J-M, Chibane M, Monti J-P, et al. Wine Polyphenols: Potential Agents in Neuroprotection. *Oxid Med Cell Longev.* 2012;2012:1-14.
81. Garrett WS. Cancer and the microbiota. *Science.* 3 avr 2015;348(6230):80-6.
82. Tian S, Liu X, Lei P, Zhang X, Shan Y. Microbiota: a mediator to transform glucosinolate precursors in cruciferous vegetables to the active isothiocyanates. *J Sci Food Agric.* mars 2018;98(4):1255-60.
83. Tresserra-Rimbau A, Lamuela-Raventos RM, Moreno JJ. Polyphenols, food and pharma. Current knowledge and directions for future research. *Biochem Pharmacol.* oct 2018;156:186-95.
84. Burns J, Yokota T, Ashihara H, Lean MEJ, Crozier A. Plant Foods and Herbal Sources of Resveratrol. *J Agric Food Chem.* mai 2002;50(11):3337-40.

85. Carter LG, D’Orazio JA, Pearson KJ. Resveratrol and cancer: focus on in vivo evidence. *Endocr Relat Cancer*. 2014;21(3):R209-25.
86. Jang M. Cancer Chemopreventive Activity of Resveratrol, a Natural Product Derived from Grapes. *Science*. 10 janv 1997;275(5297):218-20.
87. Alkhalaf M, El-Mowafy A, Renno W, Rachid O, Ali A, Al-Attyiah R. Resveratrol-induced Apoptosis in Human Breast Cancer Cells Is Mediated Primarily through the Caspase-3-dependent Pathway. *Arch Med Res*. févr 2008;39(2):162-8.
88. Imran M, Ullah A, Saeed F, Nadeem M, Arshad MU, Suleria HAR. Curcumin, anticancer, & antitumor perspectives: A comprehensive review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 24 mai 2018;58(8):1271-93.
89. Friedman JR, Nolan NA, Brown KC, Miles SL, Akers AT, Colclough KW, et al. Anticancer Activity of Natural and Synthetic Capsaicin Analogs. *J Pharmacol Exp Ther*. mars 2018;364(3):462-73.
90. Zhang R, Humphreys I, Sahu RP, Shi Y, Srivastava SK. In vitro and in vivo induction of apoptosis by capsaicin in pancreatic cancer cells is mediated through ROS generation and mitochondrial death pathway. *Apoptosis*. 2008;13(12):1465-78.
91. Xie L, Xiang G-H, Tang T, Tang Y, Zhao L-Y, Liu D, et al. Capsaicin and dihydrocapsaicin induce apoptosis in human glioma cells via ROS and Ca²⁺-mediated mitochondrial pathway. *Mol Med Rep*. nov 2016;14(5):4198-208.
92. Szallasi A, Blumberg PM. Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev*. 1999;51(2):159-212.
93. Kim MY. Nitric oxide triggers apoptosis in A375 human melanoma cells treated with capsaicin and resveratrol. *Mol Med Rep*. févr 2012;5(2):585-91.
94. Venier NA, Colquhoun AJ, Sasaki H, Kiss A, Sugar L, Adomat H, et al. Capsaicin: A novel radio-sensitizing agent for prostate cancer: Capsaicin as a Radio-Sensitizer. *The Prostate*. févr 2015;75(2):113-25.
95. Kim MY, Trudel LJ, Wogan GN. Apoptosis induced by capsaicin and resveratrol in colon carcinoma cells requires nitric oxide production and caspase activation. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2015;779(10):3733-40.
96. Bao Y, Wang W, Zhou Z, Sun C. Benefits and risks of the hormetic effects of dietary isothiocyanates on cancer prevention. *PLoS ONE*. 2014;9(12):e114764.
97. Batra S, Sahu RP, Kandala PK, Srivastava SK. Benzyl Isothiocyanate-Mediated Inhibition of Histone Deacetylase Leads to NF- κ B Turnoff in Human Pancreatic Carcinoma Cells. *Mol Cancer Ther*. 2010;9(6):1596-608.
98. Rausch V, Liu L, Kallifatidis G, Baumann B, Mattern J, Gladkich J, et al. Synergistic Activity of Sorafenib and Sulforaphane Abolishes Pancreatic Cancer Stem Cell Characteristics. *Cancer Res*. 2010;70(12):5004-13.

99. Lozanovski VJ, Houben P, Hinz U, Hackert T, Herr I, Schemmer P. Pilot study evaluating broccoli sprouts in advanced pancreatic cancer (POUDER trial) - study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*. 2014;15(1):204.
100. Patel KR, Scott E, Brown VA, Gescher AJ, Steward WP, Brown K. Clinical trials of resveratrol. *Ann N Y Acad Sci*. 2011;1215:161-9.
101. Jayakumar S, Patwardhan RS, Pal D, Sharma D, Sandur SK. Dimethoxycurcumin, a metabolically stable analogue of curcumin enhances the radiosensitivity of cancer cells: Possible involvement of ROS and thioredoxin reductase. *Biochem Biophys Res Commun*. 09 2016;478(1):446-54.
102. Pan Y, Wang M, Bu X, Zuo Y, Wang S, Wang D, et al. Curcumin analogue T83 exhibits potent antitumor activity and induces radiosensitivity through inactivation of Jab1 in nasopharyngeal carcinoma. *BMC Cancer*. 1 juill 2013;13:323.
103. Kasinski AL, Du Y, Thomas SL, Zhao J, Sun S-Y, Khuri FR, et al. Inhibition of I κ B kinase-nuclear factor-kappaB signaling pathway by 3,5-bis(2-fluorobenzylidene)piperidin-4-one (EF24), a novel monoketone analog of curcumin. *Mol Pharmacol*. sept 2008;74(3):654-61.
104. Shaikh J, Ankola DD, Beniwal V, Singh D, Kumar MNVR. Nanoparticle encapsulation improves oral bioavailability of curcumin by at least 9-fold when compared to curcumin administered with piperine as absorption enhancer. *Eur J Pharm Sci Off J Eur Fed Pharm Sci*. 28 juin 2009;37(3-4):223-30.
105. Shoba G, Joy D, Joseph T, Majeed M, Rajendran R, Srinivas PS. Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. *Planta Med*. mai 1998;64(4):353-6.
106. Barba FJ, Nikmaram N, Roohinejad S, Khelifa A, Zhu Z, Koubaa M. Bioavailability of Glucosinolates and Their Breakdown Products: Impact of Processing. *Front Nutr*. 2016;3:24.
107. Salehi B, Mishra A, Nigam M, Sener B, Kilic M, Sharifi-Rad M, et al. Resveratrol: A Double-Edged Sword in Health Benefits. *Biomedicines*. 9 sept 2018;6(3):91.
108. Liu RH. Potential Synergy of Phytochemicals in Cancer Prevention: Mechanism of Action. *J Nutr*. 1 déc 2004;134(12):3479S-3485S.
109. Rashid A, Liu C, Sanli T, Tsiani E, Singh G, Bristow RG, et al. Resveratrol enhances prostate cancer cell response to ionizing radiation. Modulation of the AMPK, Akt and mTOR pathways. *Radiat Oncol*. 2011;6(1):144.
110. Lu K-H, Chen Y-W, Tsai P-H, Tsai M-L, Lee Y-Y, Chiang C-Y, et al. Evaluation of radiotherapy effect in resveratrol-treated medulloblastoma cancer stem-like cells. *Childs Nerv Syst*. mai 2009;25(5):543-50.
111. Kao C-L, Huang P-I, Tsai P-H, Tsai M-L, Lo J-F, Lee Y-Y, et al. Resveratrol-induced apoptosis and increased radiosensitivity in CD133-positive cells derived from atypical teratoid/rhabdoid tumor. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1 mai 2009;74(1):219-28.
112. Baatout S, Derradji H, Jacquet P, Ooms D, Michaux A, Mergeay M. Enhanced radiation-induced apoptosis of cancer cell lines after treatment with resveratrol. *Int J Mol Med*. juin 2004;13(6):895-902.

113. Scarlatti F, Sala G, Ricci C, Maioli C, Milani F, Minella M, et al. Resveratrol sensitization of DU145 prostate cancer cells to ionizing radiation is associated to ceramide increase. *Cancer Lett.* août 2007;253(1):124-30.
114. Fang Y, DeMarco VG, Nicholl MB. Resveratrol enhances radiation sensitivity in prostate cancer by inhibiting cell proliferation and promoting cell senescence and apoptosis. *Cancer Sci.* juin 2012;103(6):1090-8.
115. Fang Y, Bradley MJ, Cook KM, Herrick EJ, Nicholl MB. A potential role for resveratrol as a radiation sensitizer for melanoma treatment. *J Surg Res.* août 2013;183(2):645-53.
116. Ivanov VN, Partridge MA, Johnson GE, Huang SXL, Zhou H, Hei TK. Resveratrol sensitizes melanomas to TRAIL through modulation of antiapoptotic gene expression. *Exp Cell Res.* mars 2008;314(5):1163-76.
117. Tak J-K, Lee J-H, Park J-W. Resveratrol and piperine enhance radiosensitivity of tumor cells. *BMB Rep.* 30 avr 2012;45(4):242-6.
118. Aravindan S, Natarajan M, Herman TS, Awasthi V, Aravindan N. Molecular basis of 'hypoxic' breast cancer cell radio-sensitization: phytochemicals converge on radiation induced Rel signaling. *Radiat Oncol.* 2013;8(1):46.
119. Aravindan N, Madhusoodhanan R, Ahmad S, Johnson D, Herman TS. Curcumin inhibits NFkappaB mediated radioprotection and modulate apoptosis related genes in human neuroblastoma cells. *Cancer Biol Ther.* avr 2008;7(4):569-76.
120. Veeraraghavan J, Natarajan M, Lagisetty P, Awasthi V, Herman TS, Aravindan N. Impact of curcumin, raspberry extract, and neem leaf extract on rel protein-regulated cell death/radiosensitization in pancreatic cancer cells. *Pancreas.* oct 2011;40(7):1107-19.
121. Assad DX, Borges GA, Avelino SR, Guerra ENS. Additive cytotoxic effects of radiation and mTOR inhibitors in a cervical cancer cell line. *Pathol - Res Pract.* févr 2018;214(2):259-62.
122. Javvadi P, Segan AT, Tuttle SW, Koumenis C. The Chemopreventive Agent Curcumin Is a Potent Radiosensitizer of Human Cervical Tumor Cells via Increased Reactive Oxygen Species Production and Overactivation of the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway. *Mol Pharmacol.* 1 févr 2008;73(5):1491-501.
123. Calaf GM, Echiburú-Chau C, Wen G, Balajee AS, Roy D. Effect of curcumin on irradiated and estrogen-transformed human breast cell lines. *Int J Oncol.* févr 2012;40(2):436-42.
124. Hsu F-T, Liu Y-C, Liu T-T, Hwang J-J. Curcumin Sensitizes Hepatocellular Carcinoma Cells to Radiation via Suppression of Radiation-Induced NF- κ B Activity. *BioMed Res Int.* 2015;2015:1-7.
125. Wang Q, Fan H, Liu Y, Yin Z, Cai H, Liu J, et al. Curcumin enhances the radiosensitivity in nasopharyngeal carcinoma cells involving the reversal of differentially expressed long non-coding RNAs. *Int J Oncol.* mars 2014;44(3):858-64.
126. Qiao Q, Jiang Y, Li G. Curcumin enhances the response of non-Hodgkin's lymphoma cells to ionizing radiation through further induction of cell cycle arrest at the G2/M phase and inhibition of mTOR phosphorylation. *Oncol Rep.* janv 2013;29(1):380-6.

127. Qiao Q, Jiang Y, Li G. Inhibition of the PI3K/AKT-NF- κ B Pathway With Curcumin Enhanced Radiation-Induced Apoptosis in Human Burkitt's Lymphoma. *J Pharmacol Sci.* 2013;121(4):247-56.
128. Sandur SK, Deorukhkar A, Pandey MK, Pabón AM, Shentu S, Guha S, et al. Curcumin Modulates the Radiosensitivity of Colorectal Cancer Cells by Suppressing Constitutive and Inducible NF- κ B Activity. *Int J Radiat Oncol.* oct 2009;75(2):534-42.
129. Chendil D, Ranga RS, Meigooni D, Sathishkumar S, Ahmed MM. Curcumin confers radiosensitizing effect in prostate cancer cell line PC-3. *Oncogene.* févr 2004;23(8):1599-607.
130. Naumann P, Liermann J, Fortunato F, Schmid TE, Weber K-J, Debus J, et al. Sulforaphane enhances irradiation effects in terms of perturbed cell cycle progression and increased DNA damage in pancreatic cancer cells. Ahmad A, éditeur. *PLOS ONE.* 10 juill 2017;12(7):e0180940.
131. Wang L, Long L, Wang W, Liang Z. Resveratrol, a potential radiation sensitizer for glioma stem cells both in vitro and in vivo. *J Pharmacol Sci.* déc 2015;129(4):216-25.
132. Yang Y-P, Chang Y-L, Huang P-I, Chiou G-Y, Tseng L-M, Chiou S-H, et al. Resveratrol suppresses tumorigenicity and enhances radiosensitivity in primary glioblastoma tumor initiating cells by inhibiting the STAT3 axis. *J Cell Physiol.* mars 2012;227(3):976-93.
133. Liu G, Wang Y, Li M. Curcumin sensitized the antitumour effects of irradiation in promoting apoptosis of oesophageal squamous-cell carcinoma through NF- κ B signalling pathway. *J Pharm Pharmacol.* oct 2018;70(10):1340-8.
134. Yang G, Qiu J, Wang D, Tao Y, Song Y, Wang H, et al. Traditional Chinese Medicine Curcumin Sensitizes Human Colon Cancer to Radiation by Altering the Expression of DNA Repair-related Genes. *Anticancer Res.* 2018;38(1):131-6.
135. Li G, Wang Z, Chong T, Yang J, Li H, Chen H. Curcumin enhances the radiosensitivity of renal cancer cells by suppressing NF- κ B signaling pathway. *Biomed Pharmacother.* oct 2017;94:974-81.
136. Meng X, Cai J, Liu J, Han B, Gao F, Gao W, et al. Curcumin increases efficiency of γ -irradiation in gliomas by inhibiting Hedgehog signaling pathway. *Cell Cycle.* 18 juin 2017;16(12):1181-92.
137. Fan H, Shao M, Huang S, Liu Y, Liu J, Wang Z, et al. MiR-593 mediates curcumin-induced radiosensitization of nasopharyngeal carcinoma cells via MDR1. *Oncol Lett.* juin 2016;11(6):3729-34.
138. Kunnumakkara AB, Diagaradjane P, Guha S, Deorukhkar A, Shentu S, Aggarwal BB, et al. Curcumin Sensitizes Human Colorectal Cancer Xenografts in Nude Mice to -Radiation by Targeting Nuclear Factor- B-Regulated Gene Products. *Clin Cancer Res.* 1 avr 2008;14(7):2128-36.
139. Momtazi-Borojeni A.A. et al. (2018) Curcumin in Advancing Treatment for Gynecological Cancers with Developed Drug- and Radiotherapy-Associated Resistance. In: . *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology.* Springer, Berlin, Heidelberg

140. Ren K, Li Z, Li Y, Zhang W, Han X. Sulforaphene enhances radiosensitivity of hepatocellular carcinoma through suppression of the NF- κ B pathway: Ren et al. *J Biochem Mol Toxicol*. août 2017;31(8):e21917.
141. Aggarwal BB. Nuclear factor- κ B: The enemy within. *CANCER CELL*. 2004;6.
142. Weichselbaum RR, Hallahan D, Fuks Z, Kufe D. Radiation induction of immediate early genes: effectors of the radiation-stress response. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 30 août 1994;30(1):229-34.
143. Voboril R, Weberova-Voborilova J. Constitutive NF-kappaB activity in colorectal cancer cells: impact on radiation-induced NF-kappaB activity, radiosensitivity, and apoptosis. *Neoplasma*. 2006;53(6):518-23.
144. Singh S, Aggarwal BB. Activation of transcription factor NF-kappa B is suppressed by curcumin. *J Biol Chem*. 20 oct 1995;270(42):24995-5000.
145. Wang H, Lathia JD, Wu Q, Wang J, Li Z, Heddleston JM, et al. Targeting Interleukin 6 Signaling Suppresses Glioma Stem Cell Survival and Tumor Growth. *Stem Cells*. oct 2009;27(10):2393-404.
146. Fischer N, Seo E-J, Efferth T. Prevention from radiation damage by natural products. *Phytomedicine*. août 2018;47:192-200.
147. Lachumy SJ, Oon CE, Deivanai S, Saravanan D, Vijayarathna S, Choong YS, et al. Herbal remedies for combating irradiation: a green anti-irradiation approach. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP*. 2013;14(10):5553-65.
148. Hillman GG, Singh-Gupta V, Runyan L, Yunker CK, Rakowski JT, Sarkar FH, et al. Soy isoflavones radiosensitize lung cancer while mitigating normal tissue injury. *Radiother Oncol J Eur Soc Ther Radiol Oncol*. nov 2011;101(2):329-36.
149. Son Y, Lee HJ, Rho JK, Chung SY, Lee CG, Yang K, et al. The ameliorative effect of silibinin against radiation-induced lung injury: protection of normal tissue without decreasing therapeutic efficacy in lung cancer. *BMC Pulm Med*. 5 juill 2015;15:68.
150. Zhang H, Yan H, Zhou X, Wang H, Yang Y, Zhang J, et al. The protective effects of Resveratrol against radiation-induced intestinal injury. *BMC Complement Altern Med*. 16 août 2017;17(1):410.
151. Zhang H, Zhai Z, Wang Y, Zhang J, Wu H, Wang Y, et al. Resveratrol ameliorates ionizing irradiation-induced long-term hematopoietic stem cell injury in mice. *Free Radic Biol Med*. janv 2013;54:40-50.
152. Horton JA, Li F, Chung EJ, Hudak K, White A, Krausz K, et al. Quercetin inhibits radiation-induced skin fibrosis. *Radiat Res*. août 2013;180(2):205-15.
153. Okunieff P, Xu J, Hu D, Liu W, Zhang L, Morrow G, et al. Curcumin protects against radiation-induced acute and chronic cutaneous toxicity in mice and decreases mRNA expression of inflammatory and fibrogenic cytokines. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1 juill 2006;65(3):890-8.

154. Franco R, Calvanese M, Murino P, Manzo R, Guida C, Gennaro D, et al. Skin toxicity from external beam radiation therapy in breast cancer patients: protective effects of Resveratrol, Lycopene, Vitamin C and anthocianin (Ixor®). *Radiat Oncol.* 2012;7(1):12.
155. Ryan JL, Heckler CE, Ling M, Katz A, Williams JP, Pentland AP, et al. Curcumin for Radiation Dermatitis: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial of Thirty Breast Cancer Patients. *Radiat Res.* juill 2013;180(1):34-43.
156. Bhaumik S, Anjum R, Rangaraj N, Pardhasaradhi BV, Khar A. Curcumin mediated apoptosis in AK-5 tumor cells involves the production of reactive oxygen intermediates. *FEBS Lett.* 6 août 1999;456(2):311-4.
157. Galati G, Sabzevari O, Wilson JX, O'Brien PJ. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxy radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. *Toxicology.* 1 août 2002;177(1):91-104.
158. Chan W-H, Wu C-C, Yu J-S. Curcumin inhibits UV irradiation-induced oxidative stress and apoptotic biochemical changes in human epidermoid carcinoma A431 cells. *J Cell Biochem.* 1 oct 2003;90(2):327-38.
159. Sebastià N, Montoro A, Hervás D, Pantelias G, Hatzi VI, Soriano JM, et al. Curcumin and trans-resveratrol exert cell cycle-dependent radioprotective or radiosensitizing effects as elucidated by the PCC and G2-assay. *Mutat Res.* 2014;766-767:49-55.
160. Tomé-Carneiro J, Larrosa M, González-Sarrías A, Tomás-Barberán FA, García-Conesa MT, Espín JC. Resveratrol and clinical trials: the crossroad from in vitro studies to human evidence. *Curr Pharm Des.* 2013;19(34):6064-93.
161. Howells LM, Berry DP, Elliott PJ, Jacobson EW, Hoffmann E, Hegarty B, et al. Phase I Randomized, Double-Blind Pilot Study of Micronized Resveratrol (SRT501) in Patients with Hepatic Metastases--Safety, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics. *Cancer Prev Res (Phila Pa).* 1 sept 2011;4(9):1419-25.
162. Cruz-Correa M, Hylind LM, Marrero JH, Zahurak ML, Murray-Stewart T, Casero RA, et al. Efficacy and Safety of Curcumin in Treatment of Intestinal Adenomas in Patients With Familial Adenomatous Polyposis. *Gastroenterology.* 2018;155(3):668-73.
163. Cipolla BG, Mandron E, Lefort JM, Coadou Y, Della Negra E, Corbel L, et al. Effect of Sulforaphane in Men with Biochemical Recurrence after Radical Prostatectomy. *Cancer Prev Res (Phila Pa).* 1 août 2015;8(8):712-9.
164. Thomas R, Williams M, Sharma H, Chaudry A, Bellamy P. A double-blind, placebo-controlled randomised trial evaluating the effect of a polyphenol-rich whole food supplement on PSA progression in men with prostate cancer—the UK NCRN Pomi-T study. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* juin 2014;17(2):180-6.
165. Belcaro G, Hosoi M, Pellegrini L, Appendino G, Ippolito E, Ricci A, et al. A Controlled Study of a Lecithinized Delivery System of Curcumin (Meriva®) to Alleviate the Adverse Effects of Cancer Treatment: MERIVA® IN CANCER SUPPORTIVE CARE. *Phyther Res.* mars 2014;28(3):444-50.

166. Rao S, Dinkar C, Vaishnav LK, Rao P, Rai MP, Fayad R, et al. The Indian Spice Turmeric Delays and Mitigates Radiation-Induced Oral Mucositis in Patients Undergoing Treatment for Head and Neck Cancer: An Investigational Study. *Integr Cancer Ther.* mai 2014;13(3):201-10.
167. Ryan Wolf J, Heckler CE, Guido JJ, Peoples AR, Gewandter JS, Ling M, et al. Oral curcumin for radiation dermatitis: a URCC NCORP study of 686 breast cancer patients. *Support Care Cancer* (2018) 26: 1543
168. Colin D, Gimazane A, Lizard G, Izard J-C, Solary E, Latruffe N, et al. Effects of resveratrol analogs on cell cycle progression, cell cycle associated proteins and 5fluoro-uracil sensitivity in human derived colon cancer cells. *Int J Cancer.* 15 juin 2009;124(12):2780-8.
169. Colin D, Lancon A, Delmas D, Lizard G, Abrossinow J, Kahn E, et al. Antiproliferative activities of resveratrol and related compounds in human hepatocyte derived HepG2 cells are associated with biochemical cell disturbance revealed by fluorescence analyses. *Biochimie.* déc 2008;90(11-12):1674-84.
170. Shin D, Kwon H-Y, Sohn EJ, Nam MS, Kim JH, Lee JC, et al. Upregulation of Death Receptor 5 and Production of Reactive Oxygen Species Mediate Sensitization of PC-3 Prostate Cancer Cells to TRAIL Induced Apoptosis by Vitisin A. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol.* 2015;36(3):1151-62.
171. Wu S-S, Chen L-G, Lin R-J, Lin S-Y, Lo Y-E, Liang Y-C. Cytotoxicity of (-)-vitisin B in human leukemia cells. *Drug Chem Toxicol.* juill 2013;36(3):313-9.
172. Park GB, Jeong J-Y, Kim D. Ampelopsin-induced reactive oxygen species enhance the apoptosis of colon cancer cells by activating endoplasmic reticulum stress-mediated AMPK/MAPK/XAF1 signaling. *Oncol Lett.* déc 2017;14(6):7947-56.
173. Özdemir F, Apaydın E, Önder Nİ, Şen M, Ayrım A, Ögünç Y, et al. Apoptotic effects of ε-viniferin in combination with cis-platin in C6 cells. *Cytotechnology.* juin 2018;70(3):1061-73.
174. Johnson DP, Spitz GS, Tharkar S, Quayle SN, Shearstone JR, Jones S, et al. HDAC1,2 inhibition impairs EZH2- and BBAP-mediated DNA repair to overcome chemoresistance in EZH2 gain-of-function mutant diffuse large B-cell lymphoma. *Oncotarget.* 10 mars 2015;6(7):4863-87.
175. Damaskos C, Garmpis N, Karatzas T, Nikolidakis L, Kostakis ID, Garmpi A, et al. Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitors: Current Evidence for Therapeutic Activities in Pancreatic Cancer. *Anticancer Res.* 2015;35(6):3129-35.
176. Thurn KT, Thomas S, Moore A, Munster PN. Rational therapeutic combinations with histone deacetylase inhibitors for the treatment of cancer. *Future Oncol.* févr 2011;7(2):263-83.
177. Lloyd MH, Wolfensohn SE. Practical use of distress scoring systems in the application of humane endpoints. *Hum Endpoints Anim Exp.* 1999.
178. Vendrely V, Peuchant E, Buscail E, Moranvillier I, Rousseau B, Bedel A, et al. Resveratrol and capsaicin used together as food complements reduce tumor growth and rescue full efficiency of low dose gemcitabine in a pancreatic cancer model. *Cancer Lett.* 01 2017;390:91- 102.

179. Munshi A, Kurland JF, Nishikawa T, Tanaka T, Hobbs ML, Tucker SL, et al. Histone deacetylase inhibitors radiosensitize human melanoma cells by suppressing DNA repair activity. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1 juill 2005;11(13):4912-22.
180. Lee J-H, Choy ML, Ngo L, Foster SS, Marks PA. Histone deacetylase inhibitor induces DNA damage, which normal but not transformed cells can repair. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 17 août 2010;107(33):14639-44.
181. Bolden JE, Shi W, Jankowski K, Kan C-Y, Cluse L, Martin BP, et al. HDAC inhibitors induce tumor-cell-selective pro-apoptotic transcriptional responses. *Cell Death Dis.* 28 févr 2013;4:e519.
182. Ohdo S, Nakano S, Ogawa N. Chronopharmacological study of sodium valproate in mice: dose-concentration-response relationship. *Jpn J Pharmacol.* mai 1988;47(1):11-9.
183. Barjot C, Tournaire M, Castagnino C, Vigor C, Vercauteren J, Rossi J-F. Evaluation of antitumor effects of two vine stalk oligomers of resveratrol on a panel of lymphoid and myeloid cell lines: Comparison with resveratrol. *Life Sci.* nov 2007;81(23-24):1565-74.
184. Nivelles L, Hubert J, Courrot E, Jeandet P, Aziz A, Nuzillard J-M, et al. Anti-Cancer Activity of Resveratrol and Derivatives Produced by Grapevine Cell Suspensions in a 14 L Stirred Bioreactor. *Molecules.* 16 mars 2017;22(3):474.
185. Lampe JW. Sulforaphane: from chemoprevention to pancreatic cancer treatment? *Gut.* 2009;58(7):900-2.
186. Thakkar A, Sutaria D, Grandhi BK, Wang J, Prabhu S. The molecular mechanism of action of aspirin, curcumin and sulforaphane combinations in the chemoprevention of pancreatic cancer. *Oncol Rep.* 2013;29(4):1671-7.
187. Ravindranathan P, Pasham D, Balaji U, Cardenas J, Gu J, Toden S, et al. A combination of curcumin and oligomeric proanthocyanidins offer superior anti-tumorigenic properties in colorectal cancer. *Sci Rep.* 14 sept 2018;8(1):13869.
188. Scheithauer W, Ramanathan RK, Moore M, Macarulla T, Goldstein D, Hammel P, et al. Dose modification and efficacy of nab-paclitaxel plus gemcitabine vs. gemcitabine for patients with metastatic pancreatic cancer: phase III MPACT trial. *J Gastrointest Oncol.* juin 2016;7(3):469-78.
189. Tsubura A. Resveratrol induces apoptosis via ROS-triggered autophagy in human colon cancer cells. *Int J Oncol.* 2012;40(4):1020.
190. Kma L. Synergistic Effect of Resveratrol and Radiotherapy in Control of Cancers. *Asian Pac J Cancer Prev.* 30 nov 2013;14(11):6197-208.
191. Leon-Galicia I, Diaz-Chavez J, Garcia-Villa E, Uribe-Figueroa L, Hidalgo-Miranda A, Herrera LA, et al. Resveratrol induces downregulation of DNA repair genes in MCF-7 human breast cancer cells: *Eur J Cancer Prev.* janv 2013;22(1):11-20.
192. Gatz SA, Keimling M, Baumann C, Dörk T, Debatin K-M, Fulda S, et al. Resveratrol modulates DNA double-strand break repair pathways in an ATM/ATR-p53- and -Nbs1-dependent manner. *Carcinogenesis.* mars 2008;29(3):519-27.

193. Li S-H, Fu J, Watkins DN, Srivastava RK, Shankar S. Sulforaphane regulates self-renewal of pancreatic cancer stem cells through the modulation of Sonic hedgehog-Gli pathway. *Mol Cell Biochem.* 2013;373(1-2):217-27.
194. Forster T, Rausch V, Zhang Y, Isayev O, Heilmann K, Schoensiegel F, et al. Sulforaphane counteracts aggressiveness of pancreatic cancer driven by dysregulated Cx43-mediated gap junctional intercellular communication. *Oncotarget.* 2014;5(6):1621-34.
195. Boreddy SR, Sahu RP, Srivastava SK. Benzyl isothiocyanate suppresses pancreatic tumor angiogenesis and invasion by inhibiting HIF- α /VEGF/Rho-GTPases: pivotal role of STAT-3. *PLoS One.* 2011;6(10):e25799.
196. Gescher A, Steward WP, Brown K. Resveratrol in the management of human cancer: how strong is the clinical evidence? *Ann N Y Acad Sci.* 2013;1290:12-20.
197. Piotrowska H, Kucinska M, Murias M. Biological activity of piceatannol: leaving the shadow of resveratrol. *Mutat Res.* 2012;750(1):60-82.
198. Courtois A, Jourdes M, Dupin A, Lapèze C, Renouf E, Biais B, et al. In Vitro Glucuronidation and Sulfation of ϵ -Viniferin, a Resveratrol Dimer, in Humans and Rats. *Molecules.* 3 mai 2017;22(5):733.
199. Henry C, Vitrac X, Decendit A, Ennamany R, Krisa S, Mérillon J-M. Cellular Uptake and Efflux of *trans*-Piceid and Its Aglycone *trans*-Resveratrol on the Apical Membrane of Human Intestinal Caco-2 Cells. *J Agric Food Chem.* févr 2005;53(3):798-803.
200. Tanvetyanon T, Bepler G. Beta-carotene in multivitamins and the possible risk of lung cancer among smokers versus former smokers: A meta-analysis and evaluation of national brands. *Cancer.* 1 juill 2008;113(1):150-7.
201. Paolini M, Abdel-Rahman SZ, Sapone A, Pedulli GF, Perocco P, Cantelli-Forti G, et al. β -Carotene: a cancer chemopreventive agent or a co-carcinogen? *Mutat Res Mutat Res.* juin 2003;543(3):195-200.

