



HAL
open science

**L'action ambivalente de l'agent anti-cancéreux
5-Fluorouracile sur les cellules myéloïdes
immunosuppressives sous contrôle de l'acide
docosahexaénoïque : Rôle de l'inflammasome NLRP3 et
de la voie JNK dans la sécrétion de l'IL-1beta**

Adélie Dumont

► **To cite this version:**

Adélie Dumont. L'action ambivalente de l'agent anti-cancéreux 5-Fluorouracile sur les cellules myéloïdes immunosuppressives sous contrôle de l'acide docosahexaénoïque : Rôle de l'inflammasome NLRP3 et de la voie JNK dans la sécrétion de l'IL-1beta. Physiologie [q-bio.TO]. Université Bourgogne Franche-Comté, 2018. Français. NNT : 2018UBFCI013 . tel-02139419

HAL Id: tel-02139419

<https://theses.hal.science/tel-02139419v1>

Submitted on 24 May 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.

THESE DE DOCTORAT DE L'ETABLISSEMENT UNIVERSITE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE

PREPAREE A L'UMR INSERM 1231 « LIPIDES, NUTRITION, CANCER »

EQUIPE CANCER ET REPONSE IMMUNITAIRE ADAPTATIVE

Ecole doctorale n° 554
Environnement-Santé

Doctorat de Sciences-Vie
Par
Adélie Dumont

**L'action ambivalente de l'agent anti-cancéreux 5-Fluorouracile sur les cellules myéloïdes immunosuppressives sous contrôle de l'acide docosahexaénoïque :
Rôle de l'inflammasome NLRP3 et de la voie JNK dans la sécrétion de l'IL-1 β**

Thèse présentée et soutenue à Dijon, le 19 décembre 2018

Composition du Jury :

M. Masson David	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, CHU François Mitterrand, Dijon Equipe Lipoprotéines et transfert des lipides dans l'inflammation stérile et septique, INSERM 1231	Président
Mme Py Bénédicte	Chargée de Recherche, CIRI, Lyon Equipe Inflammasome NLRP3, INSERM 1111	Rapporteur
Mme Prévost-Blondel Armelle	Directrice de Recherche, Institut Cochin, Paris Equipe Présentation de l'antigène par les cellules dendritiques, INSERM 1016	Rapporteur
Mme Pétrilli Virginie	Chargée de Recherche, CRCL, Lyon Equipe Inflammasome et cancer, INSERM 1052	Examinatrice
M. Ghiringhelli François	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, CGFL, Dijon Equipe Cancer et réponse immunitaire adaptative, INSERM 1231	Examinateur
M. Rialland Mickaël	Maître de conférences, Université de Bourgogne, Dijon Equipe cancer et réponse immunitaire adaptative, INSERM 1231	Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens à exprimer en premier lieu ma gratitude à tous les membres de mon jury de thèse pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'évaluer ce projet de thèse et pour le temps qu'ils y ont consacré.

- Je remercie chaleureusement le Pr David Masson pour avoir accepté de participer à ce jury et de l'avoir présidé. Merci pour vos conseils et votre bienveillance.
- Je remercie les Docteurs Bénédicte Py et Armelle Prévost-Blondel pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail de thèse. Merci pour vos remarques constructives et vos conseils.
- Je remercie le Docteur Virginie Pétrilli pour avoir accepté d'examiner ce travail de thèse.
- Je remercie le Pr François Ghiringhelli pour avoir accepté de participer à ce jury mais également pour m'avoir accueilli au sein de son équipe de recherche.
- Pour finir, je remercie mon directeur de thèse, le Docteur Mickaël Riolland. Merci pour m'avoir formée à la recherche, inculquée ta rigueur scientifique, permis d'acquérir un raisonnement scientifique et incitée à me dépasser. J'espère au moins que tu es fier du docteur que je suis devenue! Merci pour ta présence, ton aide, la formation et le temps que tu m'as accordé tout au long de mon passage au labo. J'ai beaucoup appris grâce à toi et t'en remercie sincèrement.

Je remercie la ligue contre le cancer pour son soutien financier qui m'a permis de financer ma quatrième année de thèse.

Je remercie tous les membres de mon équipe de recherche avec un merci particulier au Docteur Cédric Rébé pour ses conseils avisés au cours des travaux de cette thèse.

Je remercie également les autres équipes du centre de recherche U1231 :

Merci aux équipes HSPpathies, SAPHIHR, LIIC du 3^{ème} étage avec une mention spéciale pour Gaëtan, Burhan et Marinette pour votre bonne humeur et votre gentillesse au labo mais aussi pour tous les bons moments passés ensemble en dehors du labo ! Merci Marinette pour les bons moments en weekends, en vacances et autres soirées, « raclette en terrasse »... toutes ces bières et parties de Times up partagées !! Bon courage pour la suite, pour moi tu déchires ! alors il n'y a pas de raison qu'il n'y ait que moi qui le vois ! ☺

Un immense merci à tous les membres de l'équipe LIPNESS pour votre sympathie et votre gentillesse ! Merci au mailing « jeudi vomis » pour ces bonnes soirées passées avec vous. Une petite pensée aux futurs docteurs Aloïs et Thibaut c'est bientôt votre tour, alors bon courage pour la suite ! Bon courage à toi aussi, Antoine, il te reste encore un peu plus de temps mais je ne doute pas que tu réussiras brillamment !

Merci également à l'équipe NuTox, en particulier Kévin, Jean-François et Christophe pour votre disponibilité et le soin apporté à mes souris quand j'ai eu besoin de travailler chez vous !

Merci à toute l'équipe Bioperoxil pour votre sympathie et votre disponibilité.

Je remercie le personnel de la plateforme de cytométrie pour leur conseil et leur disponibilité. Je remercie également tout le personnel du centre de zootechnie pour leur bienveillance et pour le soin qu'ils apportent aux animaux. Et enfin, je remercie les membres de la plateforme lipidomique pour leur sympathie et leur efficacité.

Viens le moment de remercier tous mes collègues du quotidien donc merci à tous les membres du bâtiment Gabriel !! Un immense merci à Charles ! Pour toutes nos conversations scientifiques qui nous ont permis d'avancer sur notre projet, j'ai beaucoup appris de toi ! Merci pour ta sympathie, ta bonne humeur, je te souhaite beaucoup de bonheur avec ta petite famille adorable ! Merci à Michel pour tes encouragements, pour la thèse, le papier mais aussi juste avant ma présentation à Vegas ! Merci à Jérôme pour ta bonne humeur, l'écho de tes sifflements de bon matin dans les couloirs et merci à Sandrine, d'être un peu notre maman au labo et d'être présente en cas de problème ! Merci à toute la « Bande à Pacsou » ! Pacsou, il est temps que je te le dise : je suis fan de toi ! Merci pour ta gentillesse, ta bonne humeur et ton sens de l'humour le seul bémol est que tu ne sais pas reconnaître les vrais artistes ! ;). Merci à Patou pour ta gentillesse, ta bienveillance et également ce côté maternel que tu as toi aussi avec nous. Merci à Laurent pour ton sens de l'humour et ton 58 POWER. Merci beaucoup à Tony pour ta gentillesse et pour les tonnes de conseils que tu aimes nous prodiguer ! Je tiens à te remercier particulièrement du soutien que tu m'as apporté pendant l'écriture de cette thèse et les répétitions de la soutenance ! Plein de bonnes choses à toi et ta petite famille ! ^^ Merci à Aziz d'être toujours là quand une manip coince, d'avoir ce don pour toujours voir le bon côté même quand une manip a été vouée à l'échec, en somme, merci de m'avoir souvent remonté le moral dans les périodes creuses de résultats. Merci à Line pour tout ce que tu fais pour nous comme accourir quand on a fait « une piscine » en salle commune, quand on casse un bocal au milieu du labo pour nous donner un coup de main ! Merci à Sabrina, pour ta bonne humeur et ton efficacité, je suis ravie de t'avoir eu quelques mois à mes côtés et t'avoir appris quelques techniques de recherche, j'espère que tu t'épanouiras dans ces nouvelles fonctions entre enseignement et recherche ! Merci également à Vincent et à Loïc, notre macgyver, pour avoir réparé nombre de chose au labo ! Et merci également aux autres, Julia, Jean-Marc, Jean, Naim, Amira, Vi. Enfin, le plus gros des mercis à mes collègues de bureau ! Merci à Chloé, alias Georges, toute fraîchement débarquée et pourtant si bien intégrée ! Certainement du à ta gentillesse, ton immense joie de vivre et ton indéniable sens de la communication ! Ravie d'avoir fait votre connaissance à toi et à Alex, merci pour ces soirées passées ensemble et pour les suivantes ! Merci à toi Escoul pour ton précieux soutien quotidien au labo, pour ton aide. Je suis ravie que tu aies débarqué au labo en cours de route ce fut un immense plaisir de te rencontrer et travailler avec toi, de partager tous ces duos musicaux et de savoir que je pouvais toujours compter sur toi ! Merci pour tous les bons moments passés avec Marine et toi, je garderai notamment en mémoire notre escapade américaine :D ! Je vous souhaite à tous les deux tous mes vœux de bonheur pour la suite et je nous souhaite de passer encore plein d'autres moments bercés de « sweet home Alabama ». Ma Tanouche, une section remerciement d'une thèse ne suffirait pas pour énumérer tout ce pourquoi je dois te remercier ! Simplement, merci d'être là et merci d'être toi ! Voilà maintenant 5 ans que l'on se connaît et que l'on se voit presque tous les jours. Merci d'avoir été une collègue et amie en or, d'avoir toujours été là quand j'avais besoin de toi. Tu es épatante tant par ta gentillesse que par tes qualités logistiques ! Merci pour tous les bons moments que l'on a passés ensemble en dehors du labo, la Corse, les weekends alsaciens, le ski ! Merci aussi à Toto pour sa bonne humeur, je vous souhaite plein de bonheur pour la suite ! Merci aussi à toute ta famille pour leur accueil et leur générosité à chaque fois que nous sommes venus les voir ! Merci également aux anciens ! Merci à Aurélie pour m'avoir formé à mes débuts, je n'aurais pas pu imaginer meilleur mentor que toi ! Beaucoup de bonheur pour toi et JB pour la suite. Et enfin, merci à ma Lolotte !! Merci tout d'abord d'avoir grandement contribué à ce projet de thèse et à l'avancement du papier, ce projet c'est aussi le tien ! Merci de m'avoir permis de vivre cette thèse avec un peu plus de légèreté ! Grâce à toi les sacrifices aux aurores ou les nocturnes en cyto

étaient presque de bons moments ! Sans toi tout aurait été beaucoup plus compliqué ! Je suis assez fière également de l'ingénieure que tu es devenue, tu es une bosseuse avec un grand sens de la rigueur et de l'organisation ! Ce fut un très grand plaisir de t'encadrer à tes débuts ! Je jalouse un peu tes nouveaux collègues ! Au de-là de ça, nos 3 années de collaboration m'ont non seulement permis d'avoir une collègue fantastique mais également une indéfectible amie ! Alors Lolotte merci surtout pour tous les moments passés en dehors du labo, les weekends au ski, à Annecy, en Alsace, les vacances à Barcelone, à Majorque et pour toutes les soirées passées ensemble (plus ou moins gravées dans nos mémoires :/), les concerts... Merci pour ton écoute, ton soutien, ta bonne humeur, ta gentillesse, tous nos fous rires et pour tous les suivants aussi nombreux qu'ils pourront être !

Je remercie également Nana pour nos soirées au resto à nous remémorer nos souvenirs depuis la maternelle qui m'ont permis de me changer les idées aux moments où j'en avais besoin. Quentin pour tes nombreux encouragements, les weekends et bières en terrasse où tu étais là pour m'écouter parler de mes déboires quotidiens, chacun de tes passages dijonnais me remontait le moral, merci pour tout ! Alex, Kévin, Cindy et Jéjé, même si l'on ne se voit plus beaucoup, savoir que vous êtes là pour moi est déjà une source de réconfort, merci d'être des supers copains fidèles ! Enfin, je te remercie Vincent, là où tu es. Je crois que tu savais que je deviendrai docteur bien avant que je ne songe à faire une thèse. Bien plus que m'encourager tu m'as toujours poussée à dépasser mes limites tout comme tu peux le faire. De toi, je retiens ta bonté, ta joie de vivre et ton courage et essaie de faire de mon mieux pour être presque à la hauteur de l'exemple que tu nous as montré. De là où tu es j'espère que tu es fier de moi.

Pour finir, je remercie toute ma famille, mes parents qui m'ont toujours soutenu, vous rendre fiers de moi est ma principale motivation. Mes grand-mères, d'être fières de moi en toutes circonstances, il n'est pas forcément simple de discerner la différence entre étudiant, chercheur, doctorant et éleveur de souris !!! Merci à mes parrain et marraine. Merci à mes cousins et cousines, Francine, Greg et Loulou !!! Elise et Tintin et Alex, Steph et Amélia ! Merci à mon papy et à tonton Fifi, j'espère que vous êtes également fiers de moi de là où vous êtes. Et merci à Killian pour le plus grand des soutiens que tu m'as apporté sur cette fin de thèse qui a sans doute été tout autant éprouvante pour toi que pour moi ! Merci pour ton calme et ta compréhension face à mes sautes d'humeur, merci pour ton soutien dans les moments de doute, merci pour ton réconfort dans les baisses de moral. J'espère être le même pilier pour toi lorsque ce sera ton tour ! Merci à ta famille de m'avoir aussi gentiment accueillie et pour leur compréhension pendant ces quelques mois.

Résumé

Selon une étude précédente, une limitation à l'efficacité anticancéreuse du 5-Fluorouracile (5-FU) repose sur la sécrétion d'IL-1 β par des cellules myéloïdes immunosuppressives (MDSC). La libération d'IL-1 β mature provient de l'activation de NLRP3 induite par le 5-FU et de l'augmentation de l'activité de la caspase-1 dans les MDSC, qui favorise la reprise de la croissance tumorale chez des souris traitées avec 5-FU. L'acide docosahexaénoïque (DHA) appartient à la famille des acides gras oméga-3 et possède des propriétés anticancéreuses et anti-inflammatoires qui pourraient améliorer la chimiothérapie à base de 5-FU. Dans ces travaux, nous démontrons que le DHA inhibe la sécrétion d'IL-1 β induite par le 5-FU dans une lignée cellulaire de MDSC (MSC-2). Chez des souris porteuses de tumeurs traitées par 5-FU, nous avons montré qu'un régime alimentaire enrichi en DHA réduit la concentration d'IL-1 β circulante et la récurrence tumorale après une injection de 5-FU. Le traitement par 5-FU conduit à l'activation de JNK dans les MDSC et l'inhibiteur de JNK SP600125 diminue la sécrétion d'IL-1 β . De plus, le DHA est capable de contrecarrer l'activation de JNK induite par 5-FU dans les MDSC, entraînant la chute de la libération de l'IL-1 β . De plus, nous avons montré que la supplémentation en DHA dans les MDSC exposées au 5-FU diminuait l'activité de la caspase-1 ainsi que la modification des interactions entre NLRP3 et la caspase-1, ASC ou β -arrestine-2. De manière inattendue, la régulation de l'activité de la caspase-1 par le DHA était indépendante de JNK, ce qui suggère que le DHA pourrait contrôler la sécrétion de l'IL-1 β par le biais de l'inflammasome NLRP3 et de la voie JNK. Enfin, nous avons trouvé une corrélation négative entre la teneur en DHA dans le plasma et l'induction du niveau d'IL-1 β ou de la caspase-1 dans le sang de patients traités par chimiothérapie à base de 5-FU. L'ensemble de ces données fournissent de nouvelles informations sur la régulation de la sécrétion de l'IL-1 β par le DHA et son bénéfice potentiel dans la chimiothérapie à base de 5-FU.

Mots clefs : DHA, 5-FU, MDSC, NLRP3, IL-1 β , JNK

Abstract

A limitation to 5-Fluorouracil (5-FU) anti-cancer efficacy relies on the secretion of IL-1 β by myeloid-derived suppressor cells (MDSC) according to a previous pre-clinical report. The release of mature IL-1 β originates from 5-FU-mediated NLRP3 activation with increased caspase-1 activity in MDSC and sustains tumor growth recovery in 5-FU-treated mice. Docosahexaenoic acid (DHA) belongs to omega-3 fatty acid family and harbors both anti-cancer and anti-inflammatory properties which might could improve 5-FU chemotherapy. Here, we demonstrate that DHA inhibits 5-FU-induced IL-1 β secretion produced by a MDSC cell line (MSC-2). In tumor-bearing mice treated with 5-FU, we showed that a DHA-enriched diet reduces circulating IL-1 β concentration and tumor recurrence after 5-FU injection. 5-FU treatment led to JNK activation in MDSC and JNK inhibitor SP600125 decreased IL-1 β secretion. Moreover, DHA was able to counteract 5-FU-mediated JNK activation in MDSC leading to the drop of IL-1 β release. In addition, we showed that DHA supplementation in 5-FU-exposed MDSC decreases caspase-1 activity along with a modification of the interactions between NLRP3 and caspase-1, ASC or β -arrestin-2. Unexpectedly, the regulation of caspase-1 activity by DHA was independent of JNK which suggests that DHA could control IL-1 β secretion through both NLRP3 inflammasome and JNK pathway. Interestingly, we found a negative correlation between DHA content in plasma and the induction of circulating IL-1 β level or caspase-1 activity in patients treated with 5-FU-based chemotherapy.

Together, these data provide new insights on the regulation of IL-1 β secretion by DHA and its potential benefit in 5-FU-based chemotherapy.

Keywords: DHA, 5-FU, MDSC, NLRP3, IL-1 β , JNK

Table des matières

Liste des figures	10
Liste des tableaux	10
Liste des abréviations	12
Introduction	15
I. Le cancer	16
A. Définition et caractéristiques du cancer	16
1. Définition et Histoire	16
2. Caractéristiques	16
B. Epidémiologie du cancer/Facteurs de risque/prévention	25
1. Epidémiologie	25
2. Facteurs de risques	26
3. Prévention	26
C. Stratégies anti-cancéreuses	28
1. Chirurgie	28
2. Irradiation	28
3. Chimiothérapies	29
4. Hormonothérapies	33
5. Immunothérapies	33
6. Résistance aux chimiothérapies	36
II. Le système immunitaire : acteur clé dans l'initiation et la progression tumorale	39
A. Système immunitaire et progression tumorale	39
B. Les cellules myéloïdes immunosuppressives (MDSC)	42
1. Origine des MDSC	43
2. Caractéristiques phénotypiques des MDSC	43
3. Génération des MDSC	45
a. Expansion des MDSC	46
i. Influence des cytokines et facteurs de croissance	46
ii. Facteurs de transcription impliqués dans l'expansion des MDSC	48
b. Rétro-différenciation des cellules matures	49
c. Mécanismes d'activation des MDSC	49
d. Recrutement et devenir des MDSC au sein de la tumeur	50
e. Fonctions immunosuppressives des MDSC	51
f. L'activité immunosuppressive des MDSC est dépendante de leur localisation	54

4. Les MDSC comme cible thérapeutique.....	55
5. Effets ambivalents des chimiothérapies sur les MDSC.....	58
III. Inflammation et cancer	60
A. Généralités.....	60
B. Activation de l'inflammation : les Pattern Recognition Receptor	62
1. Les CLR (C-type lectin receptors)	62
2. Les TLR (Toll-like receptors).....	63
3. Les RLR (RIG-I like receptors).....	64
4. Les NLR (NACHT-LRR containing receptor).....	65
C. Les inflammasomes	66
1. Les récepteurs NLRP.....	67
D. Inflammasome NLRP3	68
1. Structure et activation de l'inflammasome NLRP3.....	69
2. Mécanismes d'activation de l'inflammasome NLRP3.....	70
a. Activateurs de l'inflammasome NLRP3.....	70
b. Signal 1 : le « priming ».....	71
i. <i>Priming transcriptionnel</i>	71
ii. <i>Priming non-transcriptionnel</i>	71
c. Signal 2 : l'activation	72
i. <i>Efflux de K⁺</i>	73
ii. <i>Le modèle des mitochondries endommagées, ROS et ADN mitochondriaux</i>	74
iii. <i>Le modèle de la déstabilisation lysosomale</i>	76
iv. <i>La signalisation calcique</i>	76
d. Modifications post-traductionnelles de NLRP3	76
e. Activation non canonique	78
3. Conséquences de l'activation de l'inflammasome NLRP3	78
a. La pyroptose.....	78
b. La maturation de cytokines pro-inflammatoires	79
i. <i>Maturation et sécrétion de l'IL-1β</i>	79
ii. <i>Maturation et sécrétion de l'IL-18</i>	82
iii. <i>Clivage et sécrétion de l'IL-33</i>	82
C. Inflammasome NLRP3 et cancer	82
IV. Acides Gras omega 3 : Propriétés anti-inflammatoires et anti-cancéreuses.....	86
A. Métabolisme des acides gras.....	86
1. Structure et nomenclature	86

2. Les acides gras saturés (AGS)	87
3. Les acides gras mono-insaturés (AGMI).....	88
4. Les acides gras polyinsaturés (AGPI).....	89
5. Les sources alimentaires des acides gras	91
6. Métabolisme des AGPI et médiateurs lipidiques	93
7. Métabolisme lipidique dans la tumeur	93
a. Modifications métaboliques	93
b. Conséquences de la modification du métabolisme lipidique dans la progression tumorale	94
8. Apport en AGPI n-3 : quels effets ?.....	95
B. Effets protecteurs des AGPI n-3	96
C. Potentiel anti-tumoral des AGPI n-3	96
1. Effets des AGPI n-3 sur la viabilité des cellules cancéreuses	97
2. Effets des AGPI n-3 dans les propriétés invasives des cellules cancéreuses	98
3. Effets des AGPI n-3 sur le micro-environnement tumoral.....	99
3. Effets des AGPI n-3 sur l'efficacité des thérapies anti-cancéreuses.....	100
D. Signalisation des AGPI n-3	105
1. Récepteurs membranaires aux AGPI n-3	105
a. Les récepteurs couplés aux protéines G.....	105
b. Le récepteur CD36.....	109
2. Facteurs de transcription dont l'activité est dépendante des AGPI n-3.....	110
a. Les récepteurs nucléaires activés par les proliférateurs des peroxysomes (PPAR)	110
b. NFκB.....	111
3. Les micro-ARN : miR-21.....	112
E. AGPI n-3 et inflammasome NLRP3	113
<i>Hypothèse et objectif du projet</i>	116
<i>Résultats</i>	119
I. Rappel introductif	120
II. Publication	121
<i>Discussion</i>	122
I. Le DHA inhibe la formation et l'activité de l'inflammasome NLRP3	123
II. Le DHA inhibe la sécrétion d'IL-1β en régulant la voie JNK.....	125
III. Action adjuvante du DHA pour les chimiothérapies à base de 5-FU.....	128
<i>Conclusion et perspectives</i>	130

Matériels et méthodes	133
I. Lignées cellulaires	134
1. EL4.....	134
1. MSC2	134
II. Traitement des cellules	135
1. Traitements par les acides gras.....	135
2. Autres réactifs	135
III. Etude de l'expression génique.....	135
1. Extraction des ARN totaux	135
2. Reverse Transcription des ARN messagers.....	136
3. Réaction de polymérisation en chaîne quantitative en temps réel	136
IV. Etude de l'expression protéique.....	137
1. Extraction des protéines totales	137
2. Précipitation des protéines du surnageant.....	137
3. Western blot	138
V. Proximity ligation assay.....	139
VI. Analyses par cytométrie en flux	141
1. Activité Caspase 1.....	141
2. LysoTracker	141
VII. ELISA IL1 β	141
VIII. Manipulations <i>in vivo</i>	142
1. Croissance tumorale	142
2. Activité caspase 1	143
3. Dosage IL-1 β	144
4. Marquage p-JNK	144
IX. Patients.....	144
1. Activité caspase 1 sur les MDSC circulantes	145
2. Analyse lipidomique	145
X. Analyses statistiques	146
Références bibliographiques	147
Annexes	205
Annexe 1.....	206
Annexe 2.....	207
Annexe 3 :	207
Liste des publications et présentations issues des travaux de thèse	207

Liste des figures

Figure 1 Les 10 caractéristiques fondamentales du cancer	17
Figure 2 Les "points de contrôle du système immunitaire"	24
Figure 3 Incidence mondiale des cancers	25
Figure 4 Biosynthèse de DéoxyThymidineTriphosphate (dTTP) : activité thymidylate synthase	31
Figure 5 Mécanisme d'action simplifié du 5-FU	32
Figure 6 Différentes approches d'immunothérapie	36
Figure 7 Théorie de l'immuno-éditing des tumeurs	42
Figure 8 Accumulation et différenciation des MDSC	46
Figure 9 Localisation et fonctions immunosuppressives des MDSC	55
Figure 10 Structure des NLR humains	66
Figure 11 Structure simplifiée de l'inflammasome NLRP3	69
Figure 12 Mécanismes d'activation de l'inflammasome NLRP3	73
Figure 13 Modifications post-traductionnelles de NLRP3	78
Figure 14 Clivages de la pro-IL-1 β	80
Figure 15 Voies de sécrétion de l'IL-1 β	81
Figure 16 Structure d'un triglycéride (A), d'un phospholipide (B) et d'un ester de cholestérol (C)	87
Figure 17 Biosynthèse des AGS et AGMI	89
Figure 18 Structure et métabolisme des Acides gras omega 6 et omega 3	91
Figure 19 Effets anti-cancéreux des AGPI n-3	105
Figure 20 Signalisation MAPK ciblée par la β -arrestine-2	107
Figure 21 Implication des récepteurs GPR40 et GPR120 selon le modèle cellulaire et le type de cancer (Houthuijzen, 2016)	109
Figure 22 Schéma d'hypothèse du projet de thèse	118
Figure 23 Schéma de conclusion : Mode d'action du DHA dans l'inhibition de la sécrétion d'IL-1 β induite par le 5-FU au sein des MDSC	132
Figure 24 Croissance tumorale 5-FU+SP600125	207

Liste des tableaux

Tableau 1 Exemples de différentes classes de chimiothérapies et les traitements commercialisés	30
Tableau 2 Phénotypes et propriétés suppressives des MDSC, neutrophiles et monocytes	44
Tableau 3 Exemples de stratégies thérapeutiques anti-cancéreuses ciblant les MDSC	56
Tableau 4 Exemple de signalisation par les CLR	62
Tableau 5 Les TLR et leurs ligands	63
Tableau 6 Localisation et ligands des RLR	64
Tableau 7 Effets anti et pro-tumoraux de NLRP3, IL-18 et IL-1 β	85
Tableau 8 Apports nutritionnels conseillés en acides gras pour un adulte consommant 2000 kcal (en % d'apport énergétique)	92
Tableau 9 Exemple d'essais cliniques portant sur une combinaison adjuvante entre AGPI n-3 et chimiothérapies	102
Tableau 10 Séquences des amorces utilisées pour les RT-qPCR	136

Tableau 11 Programme des cycles de RT-qPCR.....	137
Tableau 12 Liste des anticorps primaires utilisés en Western Blot	139
Tableau 13 Liste des anticorps primaires utilisés en PLA	140
Tableau 14 Composition du régime alimentaire	143
Tableau 15 Liste des AG nommés (famille, formule et abréviation)	206

Liste des abréviations

5-FU : 5-Fluorouracil

5-LOX : 5-Lipooxygénase

A

AA : Acide Arachidonique

ACC : Acétyl-CoA Carboxylase

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADNmt : ADN mitochondriaux

AG : Acide Gras

AGLC : Acides gras à longue chaîne

AGMI : Acide Gras MonoInsaturés

AGPI : Acide Gras PolyInsaturés

AGS : Acide Gras Saturés

ALA : Acide α -Linoléique

ALR : AIM2-Like Receptor

AMPc : Adenosine MonoPhosphate cyclique

AOM : AzOxyMethazone

APC : *Adenomatous Polyposis Coli*

ARG1 : Arginase 1

ARN : Acid RiboNucléique

ARNm : ARN messenger

ASC : Apoptosis-associated Speck-like protein Containing a CARD

ATP : Adénosine Tri-Phosphate

B

BIR : Domaine Baculovirus Inhibitor Repeat

BMDM : Macrophages Dérivés de Moelle Osseuse

BRCC3 : BRCA1/BRCA2-Containing Complex Subunit 3

BSA : Sérum Albumine Bovine

C

C/EBP : CCAAT Enhancer Binding Protein

CAPS : Syndrome Périodique Associé à la Cryopyrine

CARD : Domaine de Recrutement des Caspases

CCL2/5 : Chemokine Ligand

CLR : C-Type Lectin Receptor

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

COX : CycloOxygénase

CRP : Protéine C-Réactive

CRC : Cancer ColoRectal

CTLA4 : Cytotoxic T-Lymphocyte - Associated protein -4

CXCL1/2/5/6/8/12 : Chemokine (CXC motif) Ligand

D

DAMP : Damage-Associated Molecular Pattern

DGLA : Acide Di-homo- γ -Linoléique

DHA : Acide DocosaHexaénoïque

DPD : DihydroPyrimidine Déshydrogénase

DR5 : Death Receptor 5

DSS : Dextran Sulfate Sodium

dTMP : desoxyThymidine MonoPhosphate

dTTP : desoxyThymidine TriPhosphate

dUMP : désoxyUridine MonoPhosphate

E

EC : Ester de Cholestérol

EGF : Epidermal Growth Factor

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

ELOVL2/5 : ELongation Of Very Long fatty acids 2/5

EPA : Acide EicosaPentaénoïque

EPIC : European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition

F

FADS : Fatty Acid DeSaturase

FAS : Fatty Acid Synthase

FdUMP : Fluoro déoxyUridine MonoPhosphate

FdUTP : Fluoro déoxyUridine TriPhosphate

FOLFIRI : 5-FU + IRInotecan

FOLFOX : 5-FU + OXaliplatine

FOLFOXIRI : 5-FU + OXaliplatine + IRInotecan

FUTP : Fluoro Uridine TriPhosphate

G

GLA : Acide γ -Linoléique

GM-CSF : Granulocyte Macrophage - Colony Stimulating Factor

GPR40/120 : Récepteur couplé aux Protéines G 40/120

H

HDTA : acide hexadeca 4,7,10,13
tetraénoïque
HER2 : Human Epidermal growth factor
Receptor 2
HIF1 α : Hypoxia-Inducible Factor 1 alpha
HMGB1 : High Mobility Group Box-1
HSP : Heat Shock Protein

I

IDO : Indolamine-2,3-DeOxygénase
IFN γ : Interféron gamma
IL-1/2/6/10/12 : InterLeukine 1/2/6/10/12
IL-1Ra : Antagoniste du récepteur à l'IL-1
iNOS : Nitric Oxide Synthase inductible
IP₃ : Inositol triPhosphate
IRAK1/4 : Kinase Associée au Récepteur à
l'IL-1
IRE-1 : Inositol-Requiring Enzyme -1
IRF : Interferon Regulatory Factor

J

JAK : JAnus Kinase
JNK : C-Jun Terminal Kinase

K

KO : Knock-Out

L

LA : Acide Linoléique
LDL : Lipoprotéine de faible densité
LGP2 : Laboratory of Genetic and
Physiology 2
LOX1 : LDL oxydée de type Lectine
LPCAT2 :
LysoPhosphatidylCholineAcétylTransferase 2
LPS : LipoPolySaccharide
LRR : domaine répété Riche en Résidus
Leucine
LT Lymphocyte T
LXR Liver X receptor

M

M1/2 : Macrophage 1/2
MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase
M-CSF : Macrophage - Colony Stimulating
Factor
MDA5 : Melanoma Différenciation
Associated Gene 5
MDSC : Myeloid Derived Suppressor cells,
cellules myéloïdes immunosuppressives
M-MDSC : MDSC Monocytaire
MMP : MetalloProteinase Matricielle

MW : Muckle Wells

N

n-3 : Omega-3
n-6 : Omega-6
NACHT : Nucleotide-binding and
oligomerization domain
NADPH : Nicotinamide Adénine
Dinucléotide Phosphate
NE : Neutrophile Elastase
NF κ B : Nuclear Factor κ B
NK : Natural Killer
NLR : NACHT LRR containing Receptor
NLRP3 : NACHT, LRR and PYD domains-
containing protein 3
NOS : Nitric Oxide Synthase

O

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

P

PAMP : Pathogen-Associated Molecular
Pattern
PD-1 : Programmed Death - 1
PDGF : Platelet Derived Growth Factor
PD-L1 : Programmed Death - Ligand 1
PFD : Pore Forming Domain
PGE2/3 : ProstaGlandine E 2/3
PI3K : Phospho-Inositide 3 Kinase
PIP₂ : Phosphatidyl Inositol 2,3
bisphosphate
PL : PhosphoLipides
PLA2 : PhosphoLipase A2
PMN-MDSC : MDSC PolyMorphoNucléaire
PPAR : Récepteur nucléaire Activé par les
Proliférateurs des Peroxysomes
PR-3 : PRotéinase 3
PRR : Pattern Recognition Receptors
PYD : Domaine PYrine

Q

QDV : Qualité De Vie

R

RE : Réticulum Endoplasmique
RIG-1 : Rétinoic Acid-Inductible Gene 1
RIP1 : Receptor-Interacting Protein 1
RLR : Retinoic Acid-Inductible Gene 1 Like
Receptor
Romo1 : Modulateur 1 des espèces
réactives de l'Oxygène
ROR γ T : RAR-related Orphan Receptor γ T

ROS : Espèce Réactive de l'Oxygène

RXR : Retinoid X Receptor

S

SCD : Stéarol-CoA Desaturase

SCF : Stem Cell Factor

SDA : Acide Stéaridonique

siARN : Petit ARN interférant

SNO : Substitution Nutritionnelle Orale

STAT1/3/5/6 : Signal Transducer and

Activator of Transcription 3/5

T

TAK1 : TGF- β Activated Kinase

TAM : Tumor Associated Macrophage

TAN : Tumor Associated Neutrophile

TCR : Récepteur des Cellules T

TEM : Transition Epithélio-

Mésenchymateuse

TG : TriGlycéride

TGF- β : Transforming Growth Factor beta

Th1/2/17: Lymphocyte T Helper 1/2/17

TLR : Toll-Like Receptor

TNF α : Facteur de Nécrose Tumorale alpha

TRCP1 : canal cationique récepteur de
potentiel 1

Treg : Lymphocyte T régulateur

TS : Thymidylate Synthase

TWIST : Twist related protein

V

VCAM-1 : Molécule d'Adhésion Cellulaire
Vasculaire

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VEGFR : Vascular Endothelial Growth
Factor Receptor

W

WNT : Wingless int

Z

ZEB1 : Zinc finger E-box-binding homeobox 1

Introduction

I. Le cancer

A. Définition et caractéristiques du cancer

1. Définition et Histoire

Aujourd'hui, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) définit le cancer comme « un terme général appliqué à un grand groupe de maladies qui peuvent toucher n'importe quelle partie de l'organisme. L'une de ses caractéristiques est la prolifération rapide de cellules anormales qui peuvent essaimer dans d'autres organes, formant ce qu'on appelle des métastases ». Les plus anciennes descriptions de ces masses anormales ont été faites bien avant que le terme « cancer » ne soit introduit. En effet, dès 3000 ans avant JC, le papyrus chirurgical Edwin Smith, un des plus anciens documents de l'histoire médicale, relate huit cas de tumeurs ou ulcères de la poitrine, décrits par l'auteur comme une maladie grave sans options curatives, la solution palliative proposée était la cautérisation.

Le terme cancer est attribué au médecin philosophe grec Hippocrate (460-370 avant JC), connu comme le père de la médecine, qui utilisa les termes grecs carcinos et carcinoma. Il compara le cancer à un crabe, par analogie à l'aspect des tumeurs du sein avec ce crustacé. C'est ensuite le médecin romain Celsus (28 avant JC -50 après JC) qui traduit le mot grec « carcinos » en « cancer ». Puis Galien (131-201 après JC) utilisa le terme grec « oncos » pour désigner une grosseur ou une tumeur maligne. Au XVIIe siècle, Gendron, conçoit le cancer comme une modification tissulaire localisée qui s'étend par prolifération cellulaire, curable si elle est extirpée dans sa totalité.

2. Caractéristiques

Le passage de la cellule normale à une cellule cancéreuse est un processus appelé transformation. Selon la théorie réductionniste, cette transformation est due à une suite d'évènements successifs et notamment à une accumulation de mutations qui confère à la cellule un avantage prolifératif et de survie entraînant l'apparition d'un clone cancéreux puis de différents sous-clones qui vont alors se multiplier de façon anarchique pour former une tumeur. Au contraire l'approche holiste se base sur l'étude de la biologie des systèmes et met en avant l'importance des autres systèmes, comme le système tissulaire, dans le développement des tumeurs. Finalement, l'état des connaissances actuelles voudrait que le développement d'une tumeur prenne en compte ces deux théories. En

2000, Hanahan et Weinberg ont résumé les caractéristiques propres à la cellule cancéreuse, qui se rapprochent du modèle réductionniste, qu'ils ont par la suite mis à jour en 2011 en prenant en compte les critères autres que génétiques pour expliquer le développement tumoral (Hanahan and Weinberg, 2000, 2011), (figure 1).

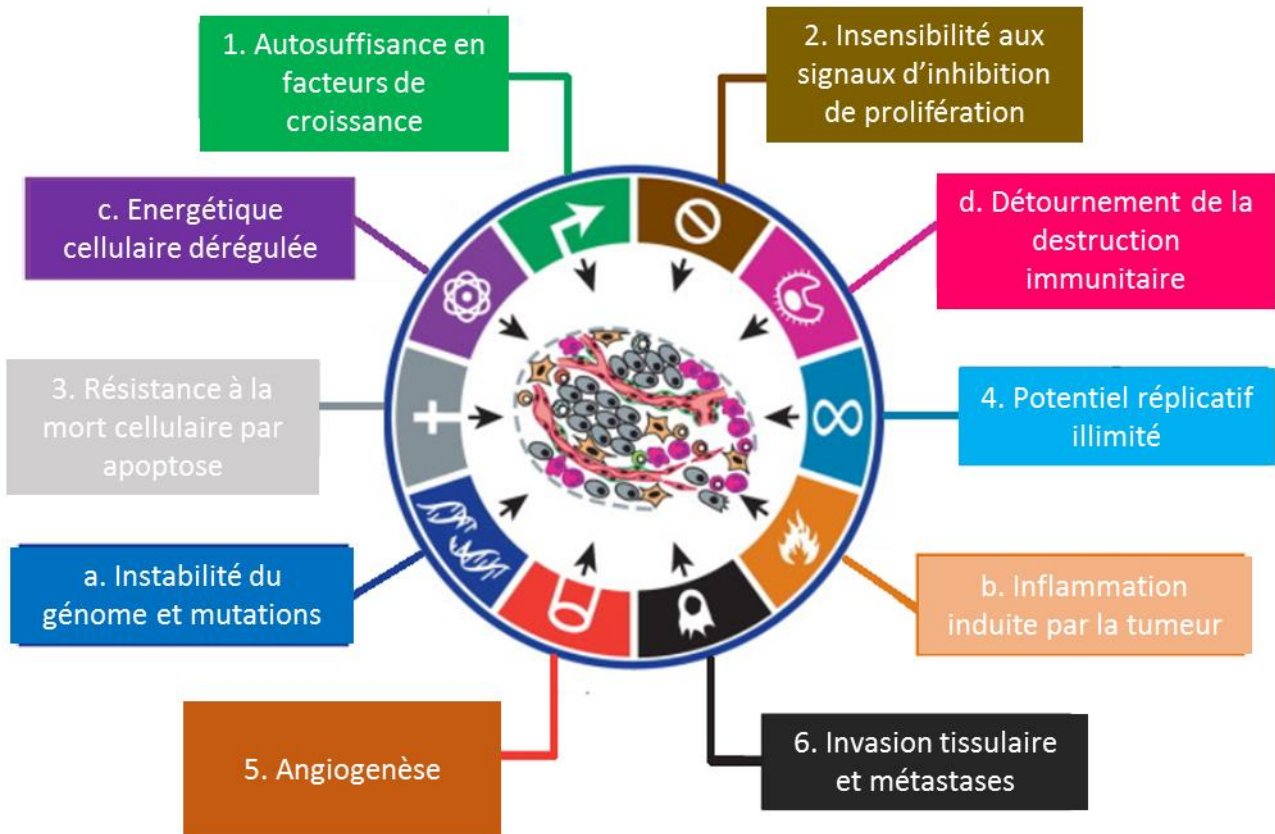


Figure 1 Les 10 caractéristiques fondamentales du cancer
D'après (Hanahan and Weinberg, 2011), (Hanahan and Weinberg, 2000)

1. Autosuffisance en facteur de croissance

A l'intérieur d'un tissu sain, la prolifération cellulaire est minutieusement contrôlée afin de maintenir une homéostasie cellulaire et ainsi une bonne architecture du tissu. Pour proliférer, une cellule normale a besoin de signaux de croissance mitogéniques lui permettant d'entrer dans le cycle cellulaire (passage de G0 à G1). Ces signaux de prolifération peuvent être : des facteurs de croissance, des composants de la matrice extra-cellulaire ou des molécules d'interaction, qui vont être perçus par la cellule grâce à des récepteurs transmembranaires ou des intégrines, ces signaux sont nécessaires à la prolifération des cellules normales. De nombreux oncogènes agissent en détournant ces signaux et vont conférer à la cellule transformée la capacité de proliférer rapidement et sans contrôle. Parmi, les différentes stratégies de prolifération, on peut énumérer :

une production de facteurs de croissance par la cellule cancéreuse permettant une stimulation autocrine de la prolifération ; une augmentation du nombre de récepteurs aux facteurs de croissance à la surface des cellules cancéreuses les rendant hypersensibles aux signaux de prolifération (Witsch *et al.*, 2010). Par exemple, le récepteur au facteur de croissance épidermique (Epidermal growth Factor Receptor EGFR) voit son expression augmentée dans de nombreux cancers solides pouvant atteindre jusqu'à 80% de surexpression chez les patients atteints de cancer colorectal faisant de ce récepteur une cible pour les thérapies anti-cancéreuses (Cunningham *et al.*, 2005; Francoual *et al.*, 2006). L'induction d'une prolifération soutenue est également dépendante d'une suractivation des voies de signalisation prolifératives telles que les voies : RAS-MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase), PI3K (Phosphoinositide 3 kinase), TGF- β (Transforming Growth Factor β) et WNT (Wingless Int). Cette dernière est fortement impliquée dans le contrôle de la prolifération cellulaire, en particulier grâce à la régulation de la β -caténine. Des altérations génétiques dans cette voie de signalisation sont retrouvées dans plus de 90 % des cellules cancéreuses du côlon dont l'inactivation bi-allélique du gène *APC* (*Adenomatous Polyposis Coli*), ou des mutations dans le gène de la β -caténine (*CTNNB1*) à l'origine d'une augmentation de la stabilité et du taux de la β -caténine (Cancer Genome Atlas Network, 2012).

2. Insensibilité aux signaux d'inhibition de la prolifération

En plus de ces signaux prolifératifs, l'intégrité du tissu sain est également dépendante de multiples signaux antiprolifératifs permettant le maintien des cellules en quiescence. Ces signaux antiprolifératifs vont essentiellement dépendre de deux suppresseurs de tumeurs, les protéines du Rétinoblastome (Rb) et P53. Rb intègre différents signaux environnants pour décider de l'entrée de la cellule en division, passage en G1, ou au contraire de rentrer en phase de quiescence, phase G0.

3. Résistance à la mort cellulaire par apoptose

Le consensus selon lequel l'apoptose serait une barrière au développement du cancer a été énoncé la première fois en 1972 par Kerr, Wyllie et Currie (Kerr *et al.*, 1972). La résistance à l'apoptose des cellules cancéreuses peut être acquise à travers une variété de stratégies. La plus fréquente est la perte de fonctionnalité du suppresseur de tumeur P53. L'un des principaux rôles de P53 est de contrôler la réponse cellulaire aux dommages causés à l'ADN et à différents types de stress. Les signaux de stress induisent l'accumulation et l'activation biochimique de P53 qui va alors entraîner un arrêt du cycle cellulaire ou l'induction de l'apoptose des cellules subissant ces

stress. En cas de perte de la fonctionnalité de P53, les cellules ne vont pas mourir par apoptose, et ainsi continuer leur prolifération en accumulant des dommages à l'ADN, pouvant aboutir au développement d'une tumeur. Cette perte de fonctionnalité est considérée comme responsable de plus de 50% des cancers chez l'Homme (May and May, 1999).

4. *Potentiel réplcatif illimité*

L'acquisition des trois précédentes capacités ; autosuffisance en facteur de croissance, insensibilité aux signaux antiprolifératifs, et résistance à l'apoptose crée un microenvironnement propice à la croissance cellulaire. Toutes ces perturbations cellulaires ne sont, en général, pas suffisantes à la génération de la majorité des populations de cellules qui constituent les tumeurs macroscopiques et ne garantissent pas une croissance tumorale expansive. Les premiers travaux de Hayflick démontrent que des cellules normales non transformées en culture ont un potentiel réplcatif déterminé (Hayflick, 1965). Une fois que les populations cellulaires ont progressé à travers un certain nombre de doublements, elles cessent de croître, ce processus est appelé la sénescence. En effet, les chromosomes ont à leur extrémité des séquences hexanucléotidiques répétées en tandem, que l'on appelle télomères. Ces télomères protègent les chromosomes et vont s'éroder au fur et à mesure des divisions cellulaires, perdre alors leur fonction protectrice et mener la cellule à un état de crise. L'état de crise se caractérise par une mort cellulaire massive qui parfois mène à l'émergence de cellules immortalisées, qui auront acquis la capacité à se multiplier sans limite, une variante occasionnelle (Wright *et al.*, 1989). Les cellules transformées ont aussi la capacité de synthétiser la télomérase, cet enzyme permet la réparation des télomères et leur maintien à leur longueur initiale leur permettant ainsi de se développer à l'infini.

5. *Angiogenèse*

Les nutriments et l'oxygène apportés par le système sanguin sont cruciaux à la fonction et à la survie cellulaire. Pendant l'organogenèse, la proximité entre cellules et vaisseaux sanguins est assurée par la croissance coordonnée de vaisseaux et de parenchyme. Du fait de la nécessité de vaisseaux sanguins à proximité, il semblerait que les cellules en prolifération aient la capacité intrinsèque d'induire la croissance de nouveaux vaisseaux. Afin de progresser vers une plus grande taille, les néoplasies naissantes développent une capacité angiogénique, décrite comme un switch angiogénique entre vascularisation quiescente et apparition continue de nouveaux vaisseaux soutenant cette croissance néoplasique. L'importance de l'angiogenèse dans le développement des tumeurs est étudiée depuis de nombreuses années. Judah Folkman, a démontré *in vivo* la

nécessité de l'angiogenèse pour la croissance d'explants de tumeurs et que l'ajout d'anticorps anti-VEGF (vascular Endothelial Growth Factor) inhibe la néo-vascularisation et la croissance des tumeurs sous-cutanées chez la souris (Folkman, 1971). Ces résultats ont motivé le développement d'inhibiteurs spécifiques VEGF/VEGF-R dans des protocoles cliniques. La combinaison entre chimiothérapies et anti-VEGF dans le traitement des cancers gastriques, colorectaux, du sein, ou des poumons augmentent la survie et/ou la survie sans progression (Jain *et al.*, 2006; Mawalla *et al.*, 2018).

6. Invasion tissulaire et métastase

Au cours du développement de la plupart des types de cancer chez l'Homme, des cellules cancéreuses de la masse tumorale primaire colonisent et envahissent les tissus adjacents. Les cellules tumorales peuvent également emprunter les systèmes sanguin et lymphatique pour coloniser des tissus éloignés de la tumeur primaire. La formation d'une nouvelle colonie est appelée métastase. Celles-ci sont responsables de 90% des décès par cancer. Les cellules cancéreuses doivent s'adapter aux changements permanents et aux conditions souvent hostiles de son environnement. Les capacités d'invasion et métastatique des cellules cancéreuses permettent d'échapper à la tumeur primitive et de coloniser de nouveaux sites dans le corps où, au moins au début, les nutriments et l'espace ne sont pas limitants. Les cellules aux capacités métastatiques acquièrent des propriétés phénotypiques modulant leurs interactions avec l'environnement comme une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). Ce processus est un phénomène proche de celui observé lors du développement embryonnaire et est induit sous la dépendance des facteurs de transcription SNAIL, TWIST et ZEB. Les cellules cancéreuses acquièrent ainsi des propriétés de cellules souches avec de fortes fonctions tumorigéniques. Les conséquences de la TEM sur les cellules cancéreuses consistent en une augmentation de leur motilité, de leurs propriétés d'invasion et de dissémination (Brabletz *et al.*, 2018).

Ces premières caractéristiques proposées par Hanahan et Weinberg en 2000, sont propres à la cellule cancéreuse. Grâce aux nombreux travaux de recherche qui ont été développés depuis, il a été admis que le développement tumoral ne dépend pas uniquement des cellules tumorales mais également du microenvironnement tumoral. C'est pourquoi, ces mêmes auteurs ont judicieusement mis à jour ces caractéristiques de la tumeur en prenant en compte le microenvironnement tumoral (Hanahan and Weinberg, 2011) :

a. Instabilité du génome et les mutations

Les caractéristiques énumérées précédemment dépendent en grande partie d'une succession d'altérations génomiques à l'origine des cellules néoplasiques. Dans la cellule, un système de détection d'erreur associé à la réplication de l'ADN et à sa réparation permet un taux de mutation spontanée très faible. Cette machinerie de surveillance du génome devient défectueuse au cours du processus de transformation, principalement par la perte de fonction de P53, le gardien du génome. En avril 2018, l'initiative PanCancer a publié une analyse de 33 types de cancers chez plus de 10 000 patients, classant les cancers selon leur constitution cellulaire et génétique et indépendamment de leur origine anatomique. Ces résultats ont généré l'« Atlas du génome du cancer » qui pourrait encourager les cliniciens à utiliser des informations génomiques complètes pour mieux cibler les stratégies thérapeutiques anticancéreuses. En effet, cette étude a pu identifier environ 300 gènes responsables de la croissance tumorale. Un peu plus de la moitié des tumeurs analysées portent des mutations qui pourraient être ciblées par des thérapies déjà approuvées (<https://portal.gdc.cancer.gov/>). On peut citer, par exemple la mutation non-sens BRAF V600E, qui est la mutation la plus retrouvée (565 cas/10 202), ou encore les mutations de P53 qui sont retrouvées parmi les plus fréquentes (R175H : 156/10 202 ; R273C : 125/10 202 ; R248Q : 121/10 202).

b. Inflammation induite par la tumeur

La relation entre cancer et inflammation a été établie par le médecin allemand Rudolf Virchow qui montra en 1863 que l'inflammation chronique causée par certains irritants pouvait engendrer une importante prolifération cellulaire. Depuis de nombreuses années, il a été constaté une infiltration des tumeurs solides par des cellules des systèmes immunitaires inné et adaptatif, semblable à une inflammation dans un tissu non-néoplasique (Coussens and Werb, 2002; Dvorak, 1986; Pagès *et al.*, 2010). Les données cliniques et expérimentales actuelles démontrent que l'inflammation et plus particulièrement l'inflammation chronique favorise la carcinogenèse. Les dégâts tissulaires, leur réparation et le taux de prolifération plus élevé retrouvés dans un tissu inflammé augmentent la probabilité de mutations et de translocations chromosomales durant la mitose. L'inflammation permet également la mise en place d'un microenvironnement favorable au développement de la tumeur et des métastases ainsi qu'à l'installation d'un microenvironnement immunosuppresseur limitant la réponse immunitaire anti-tumorale. Par exemple, Les maladies inflammatoires

chroniques de l'intestin (maladie de Crohn et colites ulcératives) sont des facteurs de risque des cancers colorectaux (Hemminki *et al.*, 2009; Jess *et al.*, 2012).

c. Énergétique cellulaire dérégulée

En 1924, Otto Warburg montra que l'un des changements principaux des cellules tumorales était une diminution de la production d'ATP (Adenosine Triphosphate) par la voie de la phosphorylation oxydative compensée par une production d'ATP par la voie de fermentation du glucose en lactate. Ce changement est appelé l'effet Warburg (Warburg, 1956). Or, la transformation d'une molécule de glucose en lactate n'apporte que deux molécules d'ATP tandis que *via* la phosphorylation oxydative, le catabolisme du glucose génère 36 molécules d'ATP. Dans le cas des cellules cancéreuses en prolifération, cette reprogrammation métabolique a lieu en dépit d'une concentration en oxygène normale, c'est pourquoi Warburg émit dans un premier temps l'hypothèse d'un défaut de la chaîne respiratoire mitochondriale. Cependant, des travaux ultérieurs ont montré que la plupart des cellules cancéreuses ne présentaient pas d'altération de la fonction mitochondriale (Weinhouse, 1976). La voie de la glycolyse permet de produire de l'ATP plus rapidement mais, par mole de glucose, sa production reste néanmoins plus faible que par celle de la phosphorylation oxydative. L'hypothèse actuelle voudrait que ce ne soit pas uniquement pour la production d'ATP que cette voie serait activée mais parce que cette glycolyse aérobique permet aux cellules cancéreuses d'augmenter la concentration des deux produits finaux : le lactate et le pyruvate. Après ces premières constatations de la dérégulation de la voie de la glycolyse par les cellules cancéreuses, de nombreuses études ont également montré d'autres altérations touchant les voies métaboliques de la cellule cancéreuse. Il est désormais bien admis que le métabolisme énergétique de la cellule cancéreuse, permettant la génération de substrats énergétiques soutenant les besoins en croissance et prolifération, joue un rôle primordial dans l'oncogenèse et la progression tumorale. Ainsi, la reprogrammation métabolique menée par les cellules cancéreuses va leur conférer des bénéfices à plusieurs niveaux : Les cellules cancéreuses vont d'une part renforcer leurs mécanismes d'influx des métabolites, leur permettant une parfaite acquisition des nutriments nécessaires à la prolifération. D'autre part, ces nutriments vont être dirigés préférentiellement vers les voies métaboliques contribuant aux propriétés tumorigènes de ces cellules. La reprogrammation métabolique aura également des conséquences sur la différenciation des cellules cancéreuses elles-mêmes ainsi que des composants du microenvironnement tumoral (Pavlova and Thompson, 2016).

d. Blocage de la réponse immunitaire anti-tumorale

La réponse immunitaire de l'hôte contre la tumeur est le résultat d'une compétition entre signaux inhibiteurs ou activateurs. Les points de contrôle du système immunitaire sont des régulateurs importants de l'homéostasie immunitaire et de la prévention de l'auto-immunité. Ils contribuent au maintien de la tolérance au soi et de la régulation du type, de l'amplitude et de la durée de la réponse immunitaire. En conditions physiologiques, ces points de contrôle permettent au système immunitaire de répondre à des infections ou même de lutter contre les cellules cancéreuses tout en protégeant les tissus adjacents de dégâts qui pourraient être causés par un emballement de la réponse immunitaire. En effet, l'action du système immunitaire est régulée de manière très stricte. Pour s'activer, un lymphocyte a besoin de la reconnaissance du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) sur une cellule présentatrice d'antigène mais également la reconnaissance d'un ligand pour son récepteur de co-stimulation, comme par exemple l'axe CD28-CD86, ces molécules co-stimulatrices permettent l'activation et l'amplification de la réponse immunitaire. Une fois activé, et pour éviter un emballement du système immunitaire, le lymphocyte va se mettre à exprimer des récepteurs de co-inhibition, entraînant l'inhibition de la réponse immunitaire puis la mort du lymphocyte. Parmi les ligands des récepteurs de co-inhibition les plus étudiés, aussi appelés « point de contrôle du système immunitaire » on peut citer : PDL1 (Programmed Death-Ligand 1), CD80/86 ou encore Galectin-9 qui ont pour récepteur respectif à la surface des lymphocytes : PD1 (Programmed Death 1), CTLA4 (cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4), Tim-3, les différentes molécules de co-inhibition et leurs récepteurs sont illustrés en figure 2. Aujourd'hui le ciblage thérapeutique de ces « points de contrôle du système immunitaire » constitue une stratégie prometteuse dans le traitement des maladies auto-immunes, inflammatoires ou du cancer.

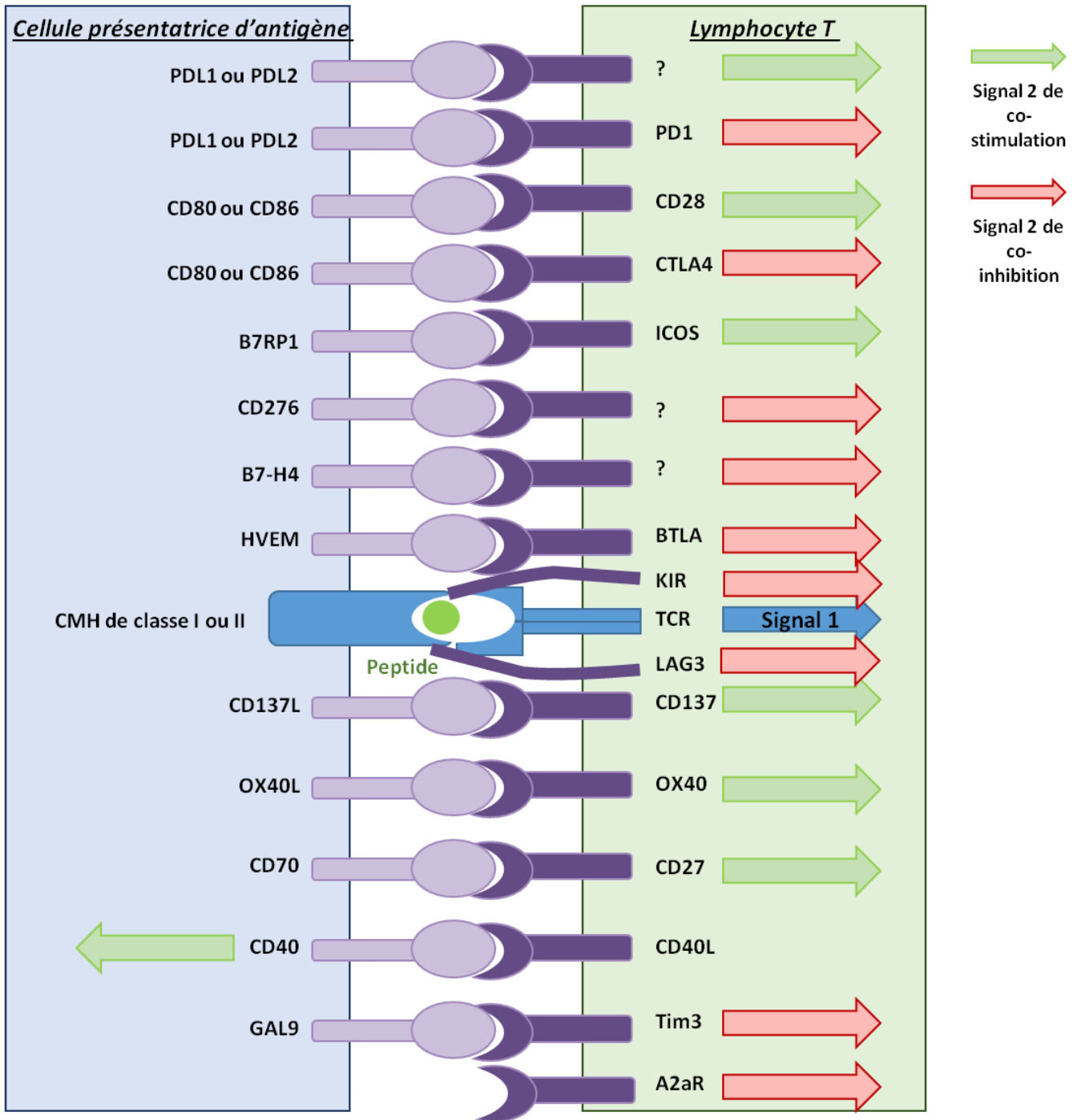


Figure 2 Les "points de contrôle du système immunitaire"
D'après (Pardoll, 2012)

Les cellules tumorales contrôlent également l'inhibition indirecte de la réponse immunitaire par le biais du recrutement de cellules régulatrices immunosuppressives. En effet, la tumeur sécrète également différents facteurs de croissance ou cytokines qui vont mener au recrutement de cellules régulatrices immunosuppressives telles que les lymphocytes T Helper (Th) 2, Th17, les

lymphocytes T régulateurs (Treg) ou encore les cellules myéloïdes immunosuppressives (MDSC). Le mécanisme immunosuppressif des MDSC sera décrit plus en détails dans le chapitre suivant.

B. Epidémiologie du cancer/Facteurs de risque/prévention

1. Epidémiologie

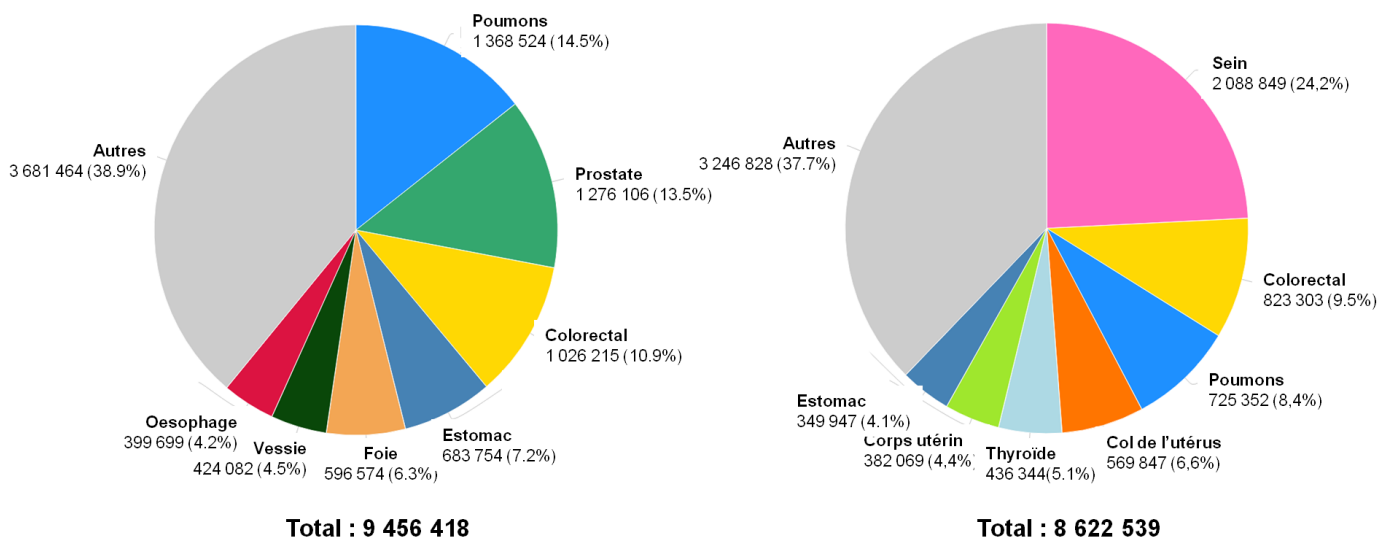


Figure 3 Incidence mondiale des cancers

Nombre de nouveaux cas estimés au niveau mondial en 2018 chez l'homme (gauche) et chez la femme (droite) selon l'étude GLOBOCAN 2018

En 1965, l'OMS a créé un centre épidémiologique propre à l'étude de l'incidence des cancers. Le département d'épidémiologie descriptive du Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) a permis de réaliser des estimations sur l'incidence du cancer dans le monde. Ces données ont été récoltées dans le cadre des projets GLOBOCAN. En 2018, La dernière étude GLOBOCAN a estimé à 18 millions le nombre de nouveaux cas de cancers diagnostiqués et à 9,5 millions le nombre de décès par cancer à l'échelle mondiale tout sexe confondu. Chez la femme, le cancer du sein est le plus répandu avec 2 millions de nouveaux cas prédits cette année puis vient le cancer colorectal avec 800 mille nouveaux cas. Chez l'homme, ce sont les cancers du poumon et de la prostate qui ont été les plus diagnostiqués avec respectivement 1,3 et 1,2 million de cas puis le cancer colorectal avec 1 million de nouveaux cas (Figure 3).

La compréhension des processus biologiques à l'origine du cancer reste un enjeu mondial pour la mise en œuvre d'approches innovantes en termes de prévention, de dépistage précoce et de réponse prédictive aux traitements.

2. Facteurs de risques

Les facteurs de risque sont multiples. D'une part, l'hérédité est un facteur déterminant chez environ 5 à 10 % des patients atteints d'un cancer, en particulier pour les cancers du sein, de l'ovaire et du côlon. Le développement de cancer suite à une exposition environnementale est estimé à 90% des cas, dont la plupart est due aux 5 principaux facteurs de risque comportementaux et alimentaires : le tabagisme, la consommation d'alcool, le manque d'exercice physique, un indice de masse corporelle élevé, et une faible consommation de fruits et légumes. Certaines infections chroniques sont également des facteurs de risque du cancer. Les cancers dus à des infections par le virus de l'hépatite B, le virus de l'hépatite C, le virus du papillome humain, le virus d'Epstein Barr ou la bactérie *Helicobacter Pylori* représentent environ 15 % des cas de cancers diagnostiqués en 2012 (Plummer *et al.*, 2016). Dans le cas du cancer colorectal (CRC), les antécédents familiaux de CRC ou de cancer de l'ovaire, la présence d'adénome colorectal, les maladies héréditaires (polypose adénomateuse familiale et le syndrome de Lynch (cancer colorectal héréditaire sans polypose)) sont des facteurs de risque élevé. On retrouve également des facteurs de risque associés à une inflammation chronique comme les antécédents personnels de colite ulcéreuse ou de maladie de Crohn. De plus en plus d'études tendent à démontrer l'importance de l'alimentation comme facteur de risque dans le développement de cancers. Celle-ci a notamment été mise en cause dans le développement des cancers du foie, du sein, de la prostate et du côlon (Béliveau and Gingras, 2007; Key *et al.*, 2004).

3. Prévention

Aujourd'hui, diverses études nutritionnelles, dont l'étude EPIC (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition), s'interrogent sur le rôle que peuvent tenir l'alimentation et le mode de vie d'un individu dans l'apparition d'un cancer. L'étude EPIC est menée sur une cohorte de 521 000 patients (hommes et femmes) dans 10 pays européens. Cette étude a débuté en 1990 et tous les ans de nouvelles publications viennent enrichir nos connaissances sur le lien entre cancer et nutrition. Concernant le mode de vie des individus, des études ont montré qu'il

existait une corrélation inverse entre l'activité physique et le risque de développer un cancer colorectal qui peut être expliquée par la diminution de la quantité de graisse abdominale et des biomarqueurs caractéristiques d'un dysfonctionnement métabolique (Aleksandrova *et al.*, 2017). En ce qui concerne les habitudes nutritionnelles, cette étude a pu mettre en évidence un lien entre un régime riche en fibres et l'incidence de différents cancers. En effet, les risques de cancer de la partie supérieure du tractus gastro-intestinal et du poumon sont inversement corrélés avec la consommation de fruits ainsi que les risques des cancers du côlon et du foie sont inversement corrélés à la consommation totale de fibres (Bingham and Riboli, 2004; Bradbury *et al.*, 2014). Cette étude a également permis de mettre en évidence qu'un régime alimentaire dit méditerranéen, composé essentiellement de fruits, légumes, céréales et poissons, ainsi qu'une faible consommation de lipides saturés, permet une meilleure survie à long terme des populations ayant adopté ce régime (Trichopoulou *et al.*, 2005). Des résultats non consensuels sur le lien entre cancers et consommation d'acides gras polyinsaturés (AGPI) sont retrouvés dans la littérature scientifique. Cette littérature fait apparaître que certaines huiles végétales (blé, carthame, tournesol) riches en précurseur d'acides gras oméga-6 (acide linoléique) contribueraient à une augmentation du risque de cancers. Tandis que le précurseur d'acides gras oméga-3 (acide α -linoléique), contenu dans des huiles végétales (lin, noix, colza) ainsi que les acides gras polyinsaturés oméga-3 (AGPI n-3) tel que l'EPA (acide éicosapentaénoïque) et le DHA (acide docosahexaénoïque), essentiellement présents dans les poissons et les huiles de poisson, diminueraient l'incidence de cancers (Azrad *et al.*, 2013). D'autre part, il a été montré que la consommation d'acide gras saturés contenus dans l'huile de palme, les produits d'origine animale ou les produits raffinés par exemple, était positivement associée à un risque élevé de cancer colorectal tandis que la consommation d'acides gras polyinsaturés oméga-3 d'origine marine montre une corrélation inverse (Hodge *et al.*, 2015). De même, l'apport élevé en sucre est également associé à une augmentation du risque de cancer colorectal (Sieri *et al.*, 2017). Finalement, le mode de vie et les habitudes alimentaires peuvent jouer un rôle important dans l'apparition et la prévention de certains cancers, ainsi, aider les consommateurs à faire de meilleurs choix alimentaires pour une meilleure qualité nutritionnelle est un des enjeux de la politique de santé publique européenne actuelle. Désormais, dans différents pays de l'Union Européenne, dont la France, les industries agro-alimentaires se doivent de publier un « NutriScore » sur les produits de consommation à disposition des consommateurs, reflétant la qualité nutritionnelle de chacun de ces produits. Une première étude, sur une cohorte

européenne, a déjà montré que la consommation de produits à « haut score » était associée à un risque plus élevé de cancer (Deschasaux *et al.*, 2018).

C. Stratégies anti-cancéreuses

Lorsqu'une tumeur maligne est détectée chez un patient, la première étape est de déterminer l'extension locale et métastatique de la tumeur, c'est ce qui conditionnera le traitement et la possibilité de retirer ou non cette tumeur.

1. Chirurgie

La chirurgie est un traitement local du cancer qui a pour objectif d'enlever la tumeur, les ganglions drainants et les éventuelles métastases. Cette exérèse large, destinée à ne laisser localement aucune cellule cancéreuse, est la condition essentielle de la guérison.

Les possibilités de pratiquer une chirurgie dépendent de la localisation et du nombre de métastases. En effet, si les métastases sont situées au niveau du péritoine, dû à un cancer du pancréas, de l'estomac ou du côlon par exemple, et qu'elles sont peu nombreuses et très localisées, elles peuvent être retirées en même temps que la tumeur primitive. En revanche, dans un cancer colique, les métastases vont préférentiellement se situer au niveau du foie, dans ce cas une deuxième intervention est programmée deux ou trois mois plus tard. Pendant ce laps de temps une chimiothérapie est réalisée pour réduire la taille des métastases et faciliter leur exérèse. L'intervention consiste à retirer la partie du foie touchée. Le foie étant capable de se régénérer, il est donc possible d'en retirer une partie importante.

2. Irradiation

La découverte en 1895 des rayons X par Wilhelm Conrad Röntgen représente une véritable révolution dans le monde médical. En effet, il est désormais possible de visualiser l'intérieur du corps humain. L'utilisation des rayons X, pour traiter les maladies de la peau, naît après une constatation notable. En effet, après la prise de cliché radiologique, nécessitant de longs temps de pose, la peau des patients ainsi que celle des manipulateurs présente des rougeurs. Ce sont les prémices de l'utilisation des rayonnements pour le traitement du cancer. La radiothérapie quant à elle est apparue au début du XXème siècle avec la découverte du radium par Marie et Pierre Curie. En 1905, l'action bénéfique du radium pour le traitement des tumeurs de la peau et du col de l'utérus est reconnue, c'est la naissance de la curiethérapie. Malheureusement, constamment exposée à la radioactivité, Marie Curie développe en 1934 une anémie aplasique, maladie grave de

la moelle osseuse et finit par en succomber. La radiothérapie est un traitement loco-régional qui consiste à utiliser des rayonnements ionisants capables d'atteindre les tissus profonds après avoir traversé la peau et les tissus superficiels. Ces rayonnements ont la capacité de détruire les cellules cancéreuses en induisant des altérations de l'ADN comme des cassures simple et double brin ainsi que des modifications des bases nucléotidiques. Les rayonnements vont aussi avoir une action sur l'immunité tumorale locale. En effet, l'irradiation entraîne un relargage d'IFN γ (Interféron gamma), cet interféron a la capacité d'induire PDL1 à la surface des cellules cancéreuses. PDL1 est un inhibiteur de point de contrôle immunitaire, c'est-à-dire qu'il a la capacité de bloquer la réponse immunitaire induite par les lymphocytes T sur le site tumoral. Une étude démontre l'effet synergique d'une irradiation associée à un anticorps bloquant anti-PDL1 dans le but de rétablir une réponse immunitaire anti-tumorale (Deng *et al.*, 2014). Une stabilisation de la masse tumorale est alors observée, l'association de l'irradiation avec un modulateur de la réponse immunitaire semble donc être une piste prometteuse pour le développement de nouveaux traitements.

3. Chimiothérapies

Au début des années 1900, le chimiste allemand Paul Ehrlich a développé des médicaments pour traiter les maladies infectieuses. Il a été le premier à répertorier l'efficacité de nombreux produits chimiques pour leur potentiel cytotoxique dans un modèle animal. En 1908, un modèle de lapin utilisé pour étudier la syphilis, a montré les effets bénéfiques de l'arsenic pour traiter cette maladie. Ehrlich s'est également intéressé à certains médicaments pour le traitement du cancer, comme les agents alkylants. Puis, le développement des traitements chimiothérapeutiques a connu son essor lors de la seconde guerre mondiale. Les chercheurs de l'université de Yale aux Etats-Unis ont constaté en 1943 la régression de lymphomes suite à l'administration d'ypérite, mieux connu sous le nom de gaz moutarde (Goodman *et al.*, 1946; Krumbhaar and Krumbhaar, 1919). Ces résultats ont conduit au développement des premiers agents alkylants, incluant des dérivés oraux, comme le cyclophosphamide.

Aujourd'hui, les agents chimiothérapeutiques sont répertoriés en plusieurs classes selon leurs modes d'action. On y retrouve les antimétabolites, les agents alkylants, les inhibiteurs de topoisomérase, les inhibiteurs mitotiques... (Tableau 1).

Tableau 1 Exemples de différentes classes de chimiothérapies et les traitements commercialisés.

Classe	Type	Exemples
Agents alkylants	Moutarde à l'azote	<ul style="list-style-type: none"> méchloréthamine (Mustargen) cyclophosphamide (Cytoxan)
	Nitrosourées	<ul style="list-style-type: none"> carmustine (BiCNU, BCNU) lomustine (CeeNU, CCNU)
	Sels métalliques	<ul style="list-style-type: none"> cisplatine (Platinol AQ, Platinol) oxaliplatine (Eloxatin)
Antimétabolites	Antifoliques	<ul style="list-style-type: none"> méthotrexate raltitrexed (Tomudex) pemetrexed (Alimta)
	Analogues de la purine	<ul style="list-style-type: none"> cladribine (Leustatin) thioguanine (Lanvis, 6-TG)
	Analogues de la pyrimidine	<ul style="list-style-type: none"> azactidine (Vidaza) fluorouracil (Adrucil, 5-FU) gemcitabine (Gemzar)
Produits naturels	Antibiotiques (anthracyclines)	<ul style="list-style-type: none"> bléomycine (Blenoxane) doxorubicine (Adriamycin)
	Enzymes	<ul style="list-style-type: none"> asparaginase (Kidrolase)
	Taxanes	<ul style="list-style-type: none"> docétaxel (Taxotere) paclitaxel (Taxol)
	Antimitotiques	<ul style="list-style-type: none"> vinblastine (Velbe)
	Inhibiteurs de la topoisomérase I	<ul style="list-style-type: none"> irinotécan (Camptosar) topotécan (Hycamtin)
	Inhibiteurs de la topoisomérase II	<ul style="list-style-type: none"> étoposide (Vepesid) téniposide (Vumon)

Pour ce projet de thèse, nous nous sommes intéressés à l'agent chimiothérapeutique 5-Fluorouracil (5-FU), cette molécule est classée parmi les antimétabolites. Un antimétabolite est une substance chimique qui exerce sa fonction en empêchant la synthèse des nucléotides composant les molécules d'ADN (acide désoxyribonucléique) ou d'ARN (acide ribonucléique). Un des moyens d'y parvenir est d'inhiber la biosynthèse de la thymidine ou l'action de la thymidylate

synthase (TS). Cet enzyme permet la méthylation de la desoxyuridine monophosphate (dUMP) en desoxythymidine monophosphate (dTMP) en utilisant comme donneur de méthyle le 5,10-méthylentetrahydrofolate (5,10-CH₂THF). Enfin le dTMP subit une double phosphorylation produisant la desoxythymidine triphosphate (dTTP), précurseur essentiel de la biosynthèse et de la réparation de l'ADN (figure 4). L'activité de la TS est, seule, impliquée dans la synthèse *de novo* de thymidine, par conséquent, cibler cet enzyme limitant de la biosynthèse d'ADN inhibe la prolifération des cellules, et ceci est d'autant plus vrai que les cellules ont un taux de prolifération très important. Il existe deux moyens d'inhiber l'activité de la TS : utiliser des dérivés de bases fluorés (fluoropyrimidines notamment, comme le 5-FU) qui vont inhiber l'enzyme par compétition avec le substrat cellulaire ou utiliser des anti-folates qui vont inhiber le co-substrat et renforcer l'effet du 5-FU.

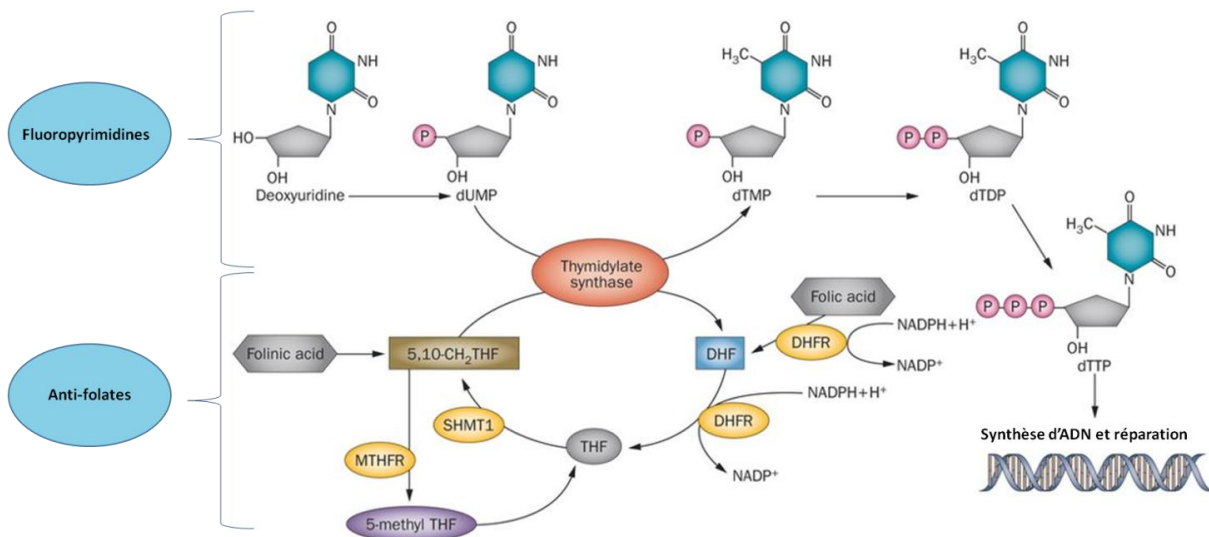


Figure 4 Biosynthèse de DéoxyThymidineTriphosphate (dTTP) : activité thymidylate synthase
D'après (Wilson et al., 2014)

En 1957, Heidelberger synthétise le premier dérivé pyrimidique fluoré à activité anti-tumorale : le 5-FU (Heidelberger *et al.*, 1957). Le 5-FU sera approuvé par la « food and drug administration » pour son utilisation dans les thérapies anti-cancéreuses en 1962. Ce 5-FU va pénétrer dans les cellules puis être catalysé par une action d'une pyrimidine phosphorylase (uridine et thymidine phosphorylases étant fortement exprimées en cas de cancer) et uridine cytidine kinase pour une transformation en trois métabolites actifs : le FdUMP qui a une forte affinité pour la TS et inhibe son activité, le FdUTP et FUTP qui s'incorporent dans les molécules d'ADN et d'ARN respectivement, causant ainsi des dommages à ces molécules à l'origine de l'action cytotoxique du 5-FU (figure 5). De plus, le FdUMP inhibe l'activité de la TS et prive la cellule de thymidines.

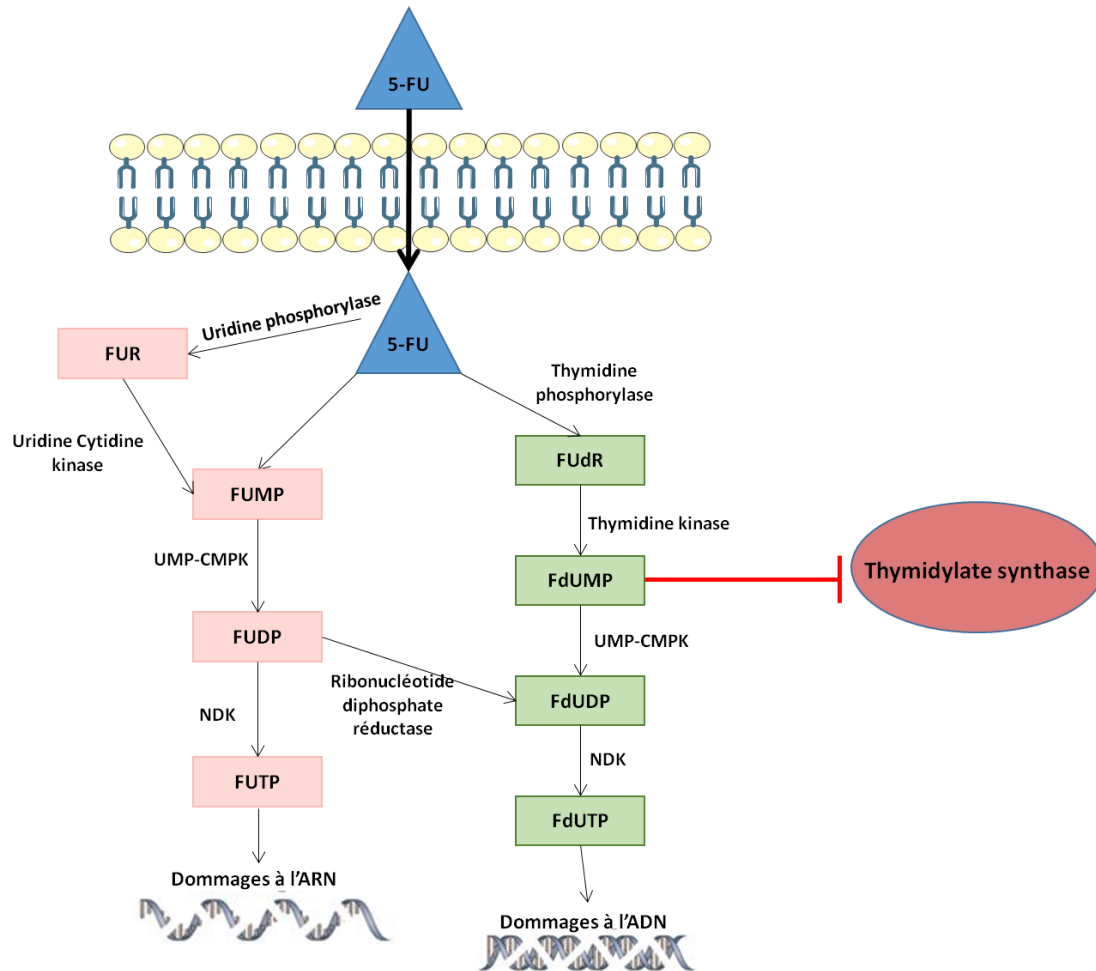


Figure 5 Mécanisme d'action simplifié du 5-FU
D'après (Wilson et al., 2014)

Aujourd'hui, plus de 60 ans après sa découverte, le 5-FU fait toujours partie de l'arsenal chimiothérapeutique couramment utilisé dans le traitement des tumeurs solides dont les cancers colorectal, du pancréas, du sein, de la tête et du cou, gastrique et ovarien. Ce sont dans les thérapies du cancer colorectal que le 5-FU, seul, montre sa plus grande efficacité avec 5 à 10 % de patients répondants (Sargent *et al.*, 2009). En effet, lorsqu'un cancer colorectal est diagnostiqué, l'approche curative utilisée est dépendante du stade du cancer. Pour les stades I et II, l'option curative est la chirurgie. Au stade III et au-delà, la chirurgie est accompagnée d'une thérapie adjuvante. Avant les années 2000, le 5-FU était utilisé comme seule chimiothérapie cytotoxique dans le traitement adjuvant des cancers colorectaux de stade III, néanmoins plusieurs études montrent que son utilisation n'offre pas d'amélioration significative dans la survie des patients (Buyse *et al.*, 1988; Gastrointestinal Tumor Study Group, 1984; Higgins *et al.*, 1984; Panettiere *et al.*, 1988). A partir des années 2000, il a été démontré que son utilisation avec d'autres agents cytotoxiques tels que l'oxaliplatine ou l'irinotecan offrait de meilleurs résultats curatifs, et une

meilleure survie globale des patients (Sánchez-Gundín *et al.*, 2018). Plusieurs combinaisons entre ces agents cytotoxiques sont possibles et sont reconnues par les protocoles portant les acronymes suivant : FOLFOX (5-FU+Oxaliplatine) (André *et al.*, 2009), FOLFIRI (5-FU+irinotecan) (Fuchs *et al.*, 2007), FOLFOXIRI (5-FU+Oxaliplatine+irinotecan) (Loupakis *et al.*, 2014).

4. Hormonothérapies

L'hormonothérapie est envisageable quand la tumeur est dite hormono-dépendante, c'est-à-dire quand les cellules tumorales ont besoin d'hormones pour se développer (cancer du sein, de l'utérus ou de la prostate). Le cancer du sein est l'un des cancers les plus diagnostiqués chez la femme en France, les cellules hormono-sensibles possèdent à leur surface des récepteurs capables de détecter les hormones telles que l'œstrogène ou la progestérone qui passent dans le sang et les captent. Une fois la liaison entre les hormones et leurs récepteurs établie, une cascade de réactions déclenche la stimulation de leur croissance. Le cancer du sein HER2 (Human Epidermal growth factor receptor 2) positif représente 15 à 20 % des cancers diagnostiqués chez les patientes (Slamon *et al.*, 1987, 1989). Le récepteur HER2 fait partie de la famille des récepteurs à l'EGFR (Epithelial Growth Factor Receptor). L'EGFR est impliqué dans la régulation positive de la prolifération et de la survie des cellules et, en particulier, des cellules cancéreuses. Ainsi, bloquer ces récepteurs HER2 permet de contrôler la croissance tumorale (Hudziak *et al.*, 1989).

L'hormonothérapie est un traitement qui module l'action des hormones afin de ralentir ou de faire cesser la croissance de cellules cancéreuses hormono-dépendantes. Cette thérapie affecte les taux d'hormone de tout l'organisme, elle est donc considérée comme un traitement systémique. Ce traitement consiste à administrer une substance qui passe par les vaisseaux sanguins pour atteindre toutes les cellules. Si la tumeur ne présente pas à sa surface les récepteurs hormonaux, cette thérapie n'aura aucune efficacité.

5. Immunothérapies

À la fin des années 1950, Prehn a été le premier à montrer que des souris préalablement greffées avec une tumeur, puis traitées chirurgicalement, rejetaient plus rapidement une nouvelle greffe tumorale en comparaison à des souris naïves, suggérant une mémoire immunologique contre la tumeur (Prehn and Lappé, 1971). Le groupe de Thierry Boon identifiait, en 1991, le premier antigène tumoral reconnu par des lymphocytes T, MAGE 1, chez un patient atteint de mélanome (Bruggen *et al.*, 1991). Mais, il a fallu attendre le début des années 2000 avec l'essor des modèles murins, associés à différents types d'immunodéficiences, pour démontrer que l'immunité

adaptative, et en particulier les lymphocytes T, jouaient un rôle clé dans le contrôle de la croissance tumorale, aussi bien induites par des carcinogènes chimiques que lors du développement de tumeurs spontanées (Shankaran *et al.*, 2001). Sur le plan clinique, la corrélation observée dans certains cancers entre la forte infiltration de lymphocytes T CD8+ et une meilleure survie des patients confortait ce rôle clé du système immunitaire, même si la signification clinique de cet infiltrat lymphocytaire peut varier suivant les tumeurs. De plus, Zitvogel *et al.* ont confirmé, dans des modèles précliniques, que l'efficacité de certaines chimiothérapies et autres traitements conventionnels était abolie en l'absence de lymphocytes T (Zitvogel *et al.*, 2013). Malgré ces découvertes, qui appuient le rôle clé du système immunitaire dans un contexte tumoral, l'immunothérapie est longtemps restée une option thérapeutique peu efficace. Aujourd'hui une nouvelle approche du cancer, impliquant le rôle du microenvironnement tumoral et son rôle immunosuppresseur vis-à-vis des lymphocytes T, a permis de mettre en place de nouvelles stratégies de traitement. En effet, les molécules de co-inhibition (CTLA-4, PD1...) exprimées par les lymphocytes T pourraient expliquer le manque d'efficacité des lymphocytes T à inhiber la croissance tumorale. L'immunothérapie suscite aujourd'hui un réel engouement au sein de la communauté scientifique, la revue britannique *Sciences* a placé l'immunothérapie des cancers au premier rang des avancées scientifiques en 2013 (Couzin-Frankel, 2013) et les chercheurs James P. Allison et Tasuku Honjo ont reçu, cette année, le prix Nobel de médecine pour leur découverte des thérapies ciblant les molécules de co-inhibition CTLA4 et PD1.

L'immunothérapie spécifique consiste donc à exploiter le système immunitaire pour générer une réponse anti-tumorale, qui se prolonge une fois le traitement terminé. En cas de cancer, les cellules tumorales sont capables de détourner les dispositifs de contrôle du système immunitaire pour éviter d'être détectées puis détruites. Pour cela, la tumeur déclenche des mécanismes qui inactivent les cellules immunitaires et plus particulièrement les lymphocytes T et les cellules tueuses naturelles (NK : Natural killer), acteurs majeurs de ces mécanismes de défense, qui empêchent alors une réponse adaptée de l'organisme pour lutter contre les cellules cancéreuses. On dit que la tumeur verrouille la réponse immunitaire anti-tumorale. Aujourd'hui, des traitements appelés « inhibiteurs de points de contrôle immunitaire ou immune checkpoint inhibitors » peuvent bloquer des éléments clés de ces mécanismes comme les anti-CTLA4, les anti-PD1 ou les anti-PL1, pour les plus étudiés. En 2011, l'ipilimumab (anti-CTLA4) a été le premier à avoir été approuvé par la Food and Drug Administration (Ledford, 2011). Le blocage de ces freins

peut alors réactiver le système immunitaire, lui permettant de lutter plus efficacement contre les cellules tumorales (Sharma and Allison, 2015).

Il existe également d'autres alternatives que l'inhibition des points de contrôle du système immunitaire dans les stratégies d'immunothérapie (Figure 6):

- L'immunothérapie non-spécifique entraînant une stimulation globale du système immunitaire par l'injection de cytokines stimulatrices (IL-2, IL-12)
- L'immunothérapie spécifique active basée sur le principe de la vaccination, ou par la génération de récepteurs de cellules T chimériques reconnaissant des antigènes propres à la tumeur (CAR T cells therapy). Cette nouvelle approche d'immunothérapie montre déjà des résultats prometteurs. La première étude publiée une augmentation du taux de rémission à 3 ans des patients atteints de leucémie aiguë de 83 % contre 15 % avec les traitements classiques (Maude *et al.*, 2018). Deux hôpitaux français parisiens (Hôpitaux Saint-Louis et Robert Debré) ont récemment été labellisés « centre expert pour le traitement par les cellules CAR T ».
- L'immunothérapie par les anticorps monoclonaux dirigés contre les cellules tumorales, ou les molécules pro-angiogéniques et pro-prolifératives.

Dans cette dernière catégorie, sont retrouvés les anticorps anti-VEGF (Bevacizumab), et anti-EGFR (Cetuximab et Panitumumab) qui peuvent être également associés aux protocoles FOLFOX, FOLFIRI et FOLFOXIRI, précédemment cités, dans la thérapie du cancer colorectal (Sánchez-Gundín *et al.*, 2018).

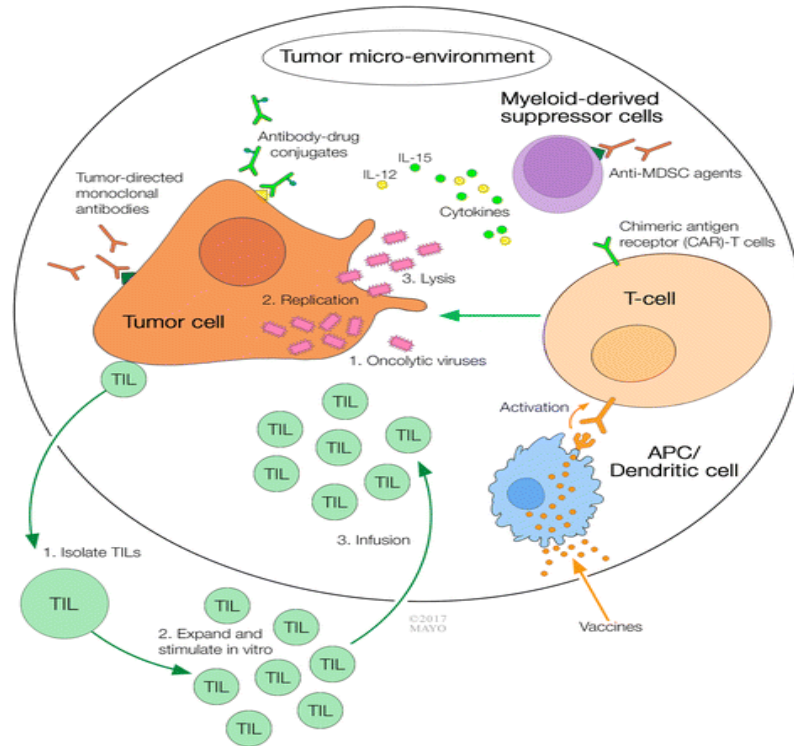


Figure 6 Différentes approches d'immunothérapie
 D'après (Marin-Acevedo et al., 2018)

6. Résistance aux chimiothérapies

La résistance aux différentes thérapies anti-cancéreuses reste un enjeu majeur dans le traitement des cancers. Les cellules cancéreuses possèdent ou acquièrent la possibilité de contourner les mécanismes d'action des médicaments de chimiothérapie. La résistance intrinsèque, est présente avant même l'administration des premières chimiothérapies, sans aucune phase de sensibilité initiale. La chimiorésistance acquise apparaît, quant à elle, après une réponse initiale à la chimiothérapie. Cette chimiorésistance acquise peut résulter de la diminution de la pénétration cellulaire du médicament, de la modification de la cible du médicament ou encore de l'inactivation d'une enzyme de dégradation.

Plusieurs mécanismes de résistance au 5-FU sont aujourd'hui décrits, comme une expression élevée de la thymidylate synthase (TS) empêchant une action complète du 5-FU (Johnston *et al.*, 1995; Pritchard *et al.*, 1997). Il peut exister également une résistance pharmacocinétique au 5-FU. L'augmentation de l'activité de l'enzyme dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD), qui métabolise le 5-FU au niveau hépatique, peut conduire à une résistance au 5-FU. Des études montrent que les tumeurs à faible teneur en DPD pourraient être plus sensibles au 5-FU (Fukuda *et al.*, 2006). De

plus, Salonga *et al.* révèlent que la faible expression de l'ARNm de la DPD dans les tumeurs colorectales métastatiques serait liée à la réponse anti-tumorale au 5-FU (Salonga *et al.*, 2000). D'autres phénomènes peuvent être à l'origine de la résistance au 5-FU, tels qu'un défaut dans les mécanismes de mise en place du processus d'apoptose. Une étude a montré qu'un faible taux de protéines pro-apoptotiques comme P53 ou bax et un taux élevé de protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2 et Bcl-XL, dans des lignées cancéreuses coliques sont corrélés avec une plus grande résistance au 5-FU (Violette *et al.*, 2002). Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) peuvent interférer avec l'efficacité du 5-FU. Il a été montré que le 5-FU est capable d'induire la production de ROS et d'entraîner alors un stress oxydatif aigu pouvant mener à l'apoptose et à la nécrose cellulaire (Hwang *et al.*, 2001). Cependant, certaines cellules cancéreuses ont une expression accrue du modulateur 1 des espèces réactives de l'oxygène (Romo1) qui provoque un stress oxydatif, cette fois-ci persistant, favorisant la progression tumorale. Le taux d'expression de Romo1 est corrélé avec la résistance au 5-FU et interférer avec l'expression de ce modulateur par le biais d'ARN interférents restaure la réponse au traitement 5-FU (Hwang *et al.*, 2007). La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) présente chez les cellules cancéreuses est un frein à l'efficacité du traitement 5-FU. Le curcumin sensibilise les lignées coliques cancéreuses HCT116 et SW480 résistantes au 5-FU, *via* une augmentation de miR-200c, microARN ciblant l'ARNm de ZEB1, inhibant la TEM (Toden *et al.*, 2015). D'autres microARN peuvent également être impliqués dans la résistance à cette chimiothérapie. En effet, miR-587 augmentent la résistance au 5-FU en diminuant l'expression protéique de la sous-unité régulatrice 1B de la sérine/thréonine phosphatase 2A (PPP2R1B), un inhibiteur de la voie AKT (Zhang *et al.*, 2016c). L'implication de la voie de signalisation PI3K/AKT dans la résistance au 5-FU a été également confirmée par une étude montrant qu'un traitement par l'insuline de la lignée cancéreuse colique humaine HT29 diminue l'activité cytotoxique de différentes chimiothérapies dont le 5-FU, et que l'utilisation de l'inhibiteur PI3K/AKT, Ly294002, reverse cet effet (Chen *et al.*, 2011). La reprogrammation métabolique que subissent les cellules cancéreuses peut, elle aussi, participer à cette résistance. Le remodelage du métabolisme lipidique consiste principalement en une lipogenèse *de novo* accentuée permettant la synthèse de lipides constituant les membranes et de seconds messagers dérivant de lipides. La LysoPhosphatidylCholineAcetylTransférase 2 (LPCAT2), enzyme impliqué dans la biosynthèse des phospholipides entrant dans la composition des membranes cellulaires, régule la réponse aux chimiothérapies 5-FU et oxaliplatine. En effet, Alexia Cotte *et al.*, ont montré que les cellules cancéreuses coliques avec une forte expression de LPCAT2 accumulaient plus de

gouttelettes lipidiques. La présence de ces gouttelettes empêche une mise en place correcte de la signalisation des caspases et inhibe la réponse du stress du réticulum endoplasmique diminuant ainsi le pouvoir cytotoxique du 5-FU (Cotte *et al.*, 2018).

Ces mécanismes de résistance sont attribuables à la cellule cancéreuse, mais il peut également exister des mécanismes de résistance dépendants du microenvironnement tumoral et notamment d'une population de cellules immunitaires pro-tumorales, les cellules dérivées myéloïdes immunosuppressives ou MDSC (myeloid derived suppressor cells).

II. Le système immunitaire : acteur clé dans l'initiation et la progression tumorale

L'essor et l'intérêt des immunothérapies s'expliquent par la compréhension qu'en plus des cellules cancéreuses, les cellules non-néoplasiques jouent un rôle très important dans la carcinogenèse, la progression tumorale et la formation des métastases. Notamment, les cellules mésenchymateuses, les composants cellulaires du système vasculaire ou encore les cellules du système immunitaire.

A. Système immunitaire et progression tumorale

La participation du système immunitaire dans le contrôle de la progression tumorale a été mise en évidence pour la première fois à la fin du XIX^{ème} siècle par le docteur William Coley. En effet, il observa un lien entre la disparition des tumeurs et l'apparition d'une maladie infectieuse, l'érysipèle, infection due à un streptocoque et entraînant une fièvre importante (Coley, 1891). Convaincu de sa découverte, il tenta de lutter contre le cancer et créa une mixture appelée « toxine de Coley », composée de bactéries inactivées qu'il injecta directement dans la tumeur stimulant le système immunitaire et entraînant une régression tumorale chez le patient, il fut alors à l'origine de la première approche d'immunothérapie anti-tumorale (Coley, 1893). Mais ce n'est que plusieurs années plus tard, au début du XX^{ème} siècle, que Paul Ehrlich évoque la théorie de l'immunosurveillance des tumeurs. Il suggéra que malgré une fréquence élevée de transformations tumorales, l'apparition modérée de tumeurs chez l'Homme était due à la capacité du système immunitaire à s'opposer au développement tumoral (Ehrlich, 1909). Ce sont Frank Macfarlane Burnet et Lewis Thomas, à la fin des années 1950, qui établiront les bases fondamentales de cette théorie qui met en avant l'idée selon laquelle le système immunitaire est en alerte perpétuelle contre les cellules néoplasiques émergentes pour les éliminer et prévenant ainsi l'apparition des tumeurs (Burnet, 1970, 1957). De nombreux arguments supportent la théorie de l'immunosurveillance des tumeurs, notamment l'observation d'une incidence plus élevée des cancers chez des patients en situation d'immunodéficience primaire (ataxie télangiectasie, syndrome de Wiskott Aldrich, trisomie 21) (Doll and Kinlen, 1970) ou secondaire (syndrome d'immunodéficience acquise) (Boshoff and Weiss, 2002). De plus, l'utilisation de molécules immunosuppressives chez les patients greffés constituerait un facteur de risque plus élevé de cancer chez ces patients (Chapman *et al.*, 2013). Néanmoins, le concept d'immunosurveillance va

rapidement être mis à mal par l'impossibilité de confirmer un lien direct entre hôte immunodéficient et apparition de tumeurs spontanées ou chimio induites (Kaplan, 1971; Stutman, 1976).

Aujourd'hui, ce concept a été révisé, on parle désormais d'immunoediting du cancer qui définit les relations entre système immunitaire et cellules cancéreuses (Dunn *et al.*, 2002, 2004). Ce concept comprend 3 phases : l'élimination, l'équilibre et l'échappement et permet de donner une explication à l'apparition des tumeurs chez des individus immunocompétents (figure 7).

La phase d'élimination, reprend le concept d'immunosurveillance, ici les immunités innée et adaptative coopèrent pour détruire les tumeurs en développement, bien avant qu'elles ne deviennent cliniquement apparentes (Iwasaki and Medzhitov, 2010). Au cours de cette phase, les cellules tumorales vont exprimer des molécules induites par le stress provoqué par la transformation des cellules sous l'action de carcinogènes ou agents génotoxiques. Les cellules tumorales vont exprimer la calréticuline qui pourra activer les lymphocytes T CD8+ et leur permettra d'exercer l'action cytotoxique par la sécrétion d'IFN γ ou de granules cytotoxiques comme le système granzyme B/Perforine. Les lymphocytes T CD8 vont également être capables d'induire la mort des cellules cancéreuses par activation des récepteurs de mort Fas ou TRAIL présents à leur surface. Les cellules tumorales expriment également à leur surface le ligand NKG2D permettant l'activation de cellules NK qui exercent également une action cytolytique en utilisant le système granzyme B/Perforine. La présence de NKG2D permet aussi l'activation de lymphocytes T non conventionnels comme les lymphocytes T $\gamma\delta$. En plus des cellules NK, d'autres cellules du système immunitaire inné comme les macrophages de type M1 et les neutrophiles vont également exercer une action anti-tumorale en sécrétant des cytokines comme le facteur de nécrose tumorale α (TNF α), de l'IL-1, IL-12 ou par la production de ROS (Mittal *et al.*, 2014). Si la réponse est efficace, les cellules cancéreuses peuvent être éliminées. Si toutefois ce n'est pas le cas, les cellules tumorales peuvent entrer dans la phase d'équilibre.

Dans la phase d'équilibre, les cellules tumorales persistent et deviennent dormantes, malgré la surveillance du système immunitaire (Aguirre-Ghiso, 2007). La pression continue du système immunitaire peut entraîner l'émergence de variants tumoraux qui deviendront invisibles à la reconnaissance par ce système immunitaire permettant le basculement dans la phase d'échappement.

La phase d'échappement représente l'échec du système immunitaire. Durant cette phase le système immunitaire ne peut plus contenir la tumeur qui devient cliniquement apparente. Cette phase est caractérisée par une modification de la signalisation de l'IFN γ , induisant une diminution de la présentation du CMH1 et une augmentation de PDL1 à la surface des cellules. Ces modifications sont à l'origine d'un défaut dans la présentation de l'antigène, diminuant ainsi leur reconnaissance par les lymphocytes T CD8+. Le système immunitaire, innée comme acquis, n'a alors plus aucun moyen de détecter les cellules tumorales (Poschke *et al.*, 2011). Une augmentation de l'expression de PDL1 est couramment retrouvée sur les cellules tumorales, ce qui leur permet d'inhiber la réponse anti-tumorale mise en place par les lymphocytes infiltrant la tumeur, qui expriment pour la majorité PD1 (Chen and Mellman, 2017; Iwai *et al.*, 2017; Topalian *et al.*, 2012). Les cellules tumorales et les cytokines qu'elles produisent participent à la mise en place de nouvelles populations cellulaires immunosuppressives comme les MDSC, les lymphocytes T régulateurs ou les macrophages de type M2 qui vont être impliqués dans la production de molécules modulatrices comme l'arginase 1, IDO (Indoleamine 2,3 dioxygénase) ou iNOS (Nitric Oxide Synthase inductible) ou de cytokines immunosuppressives telles que l'IL-10 ou le TGF β . Ces mécanismes limitent l'action du système immunitaire et notamment l'activité des lymphocytes T CD4+ et CD8+, contre la tumeur.

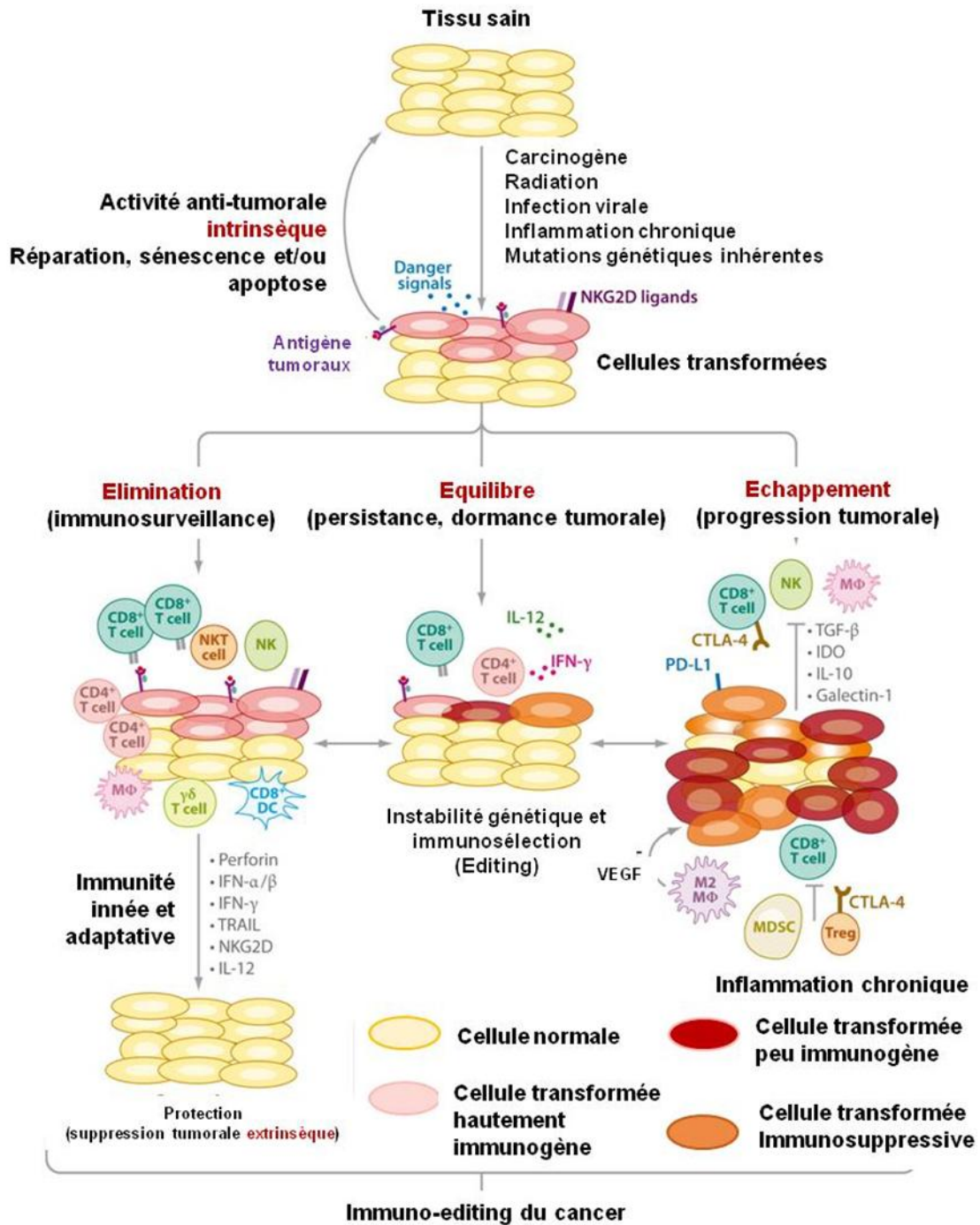


Figure 7 Théorie de l'immuno-éditing des tumeurs
D'après (Vesely et al., 2011)

B. Les cellules myéloïdes immunosuppressives (MDSC)

Lors de la phase d'échappement tumorale, des populations dites immunosuppressives peuvent émerger. Parmi ces populations, on retrouve des sous populations T CD4⁺ : Treg (Lymphocytes T

régulateurs) et Th17 (lymphocytes T Helper 17). Ainsi qu'une population de cellules myéloïdes immatures : les MDSC (Myeloid Derived Suppressor Cells).

1. [Origine des MDSC](#)

Historiquement, les MDSC ont été décrites pour la première fois en 1987, dans un modèle murin de cancer du poumon, comme des cellules dérivées de la moelle osseuse et exerçant une inhibition de la prolifération des cellules T (Young *et al.*, 1987). Or, le lien entre cellules myéloïdes et progression tumorale apparaît dans la littérature dès le début du XX^{ème} siècle. En effet, en 1929 il a été décrit une augmentation de l'hématopoïèse extra-médullaire et une hyperneutrophilie chez les individus atteints d'un cancer, et en 1965, l'équipe de Robinson montra que cette hématopoïèse augmentée est associée à une augmentation de la quantité du facteur de croissance hématopoïétique GM-CSF (Granulocytes-Macrophages Colony Stimulating Factor) et avec une différenciation des cellules myéloïdes anormale (Robinson, 1965). Leur rôle dans l'inhibition de la réponse immunitaire a été décrit plus en détail en 1978 par Bennett, qui montra que ces cellules myéloïdes anormales étaient capables de limiter le nombre et l'activité des lymphocytes T cytotoxiques (Bennett *et al.*, 1978). De par leur caractéristique phénotypique (absence de marqueur de cellules matures) et de leurs caractéristiques fonctionnelles, les MDSC ont reçu le nom de « null cells » ou suppresseurs naturels, cellules myéloïdes immatures, cellules suppressives immatures. C'est en 2007 que fut publié la nomenclature officielle de MDSC, ce terme désignera non pas une population leucocytaire définie mais une population hétérogène de cellules immatures aux propriétés immunosuppressives (Gabrilovich *et al.*, 2007; Talmadge and Gabrilovich, 2013; Veglia *et al.*, 2018).

2. [Caractéristiques phénotypiques des MDSC](#)

L'hétérogénéité phénotypique, morphologique et fonctionnelle des MDSC fait que leur caractérisation est compliquée. Néanmoins, la communauté scientifique s'est accordée sur une standardisation de la nomenclature et la caractérisation de ces cellules chez l'Homme et la souris (Bronte *et al.*, 2016; Veglia *et al.*, 2018). Deux populations de MDSC, basées sur les caractéristiques morphologique et phénotypique des MDSC, sont alors identifiées : les MDSC polymorphonucléaires (PMN-MDSC) et monocytiques (M-MDSC).

Chez la souris, on peut caractériser la population générale de MDSC par les marqueurs CD11b et Gr1, l'antigène Gr1 est exprimé sur les cellules précurseurs myéloïdes, granulocytes, et de façon

transitoire sur les monocytes ; il possède deux épitopes : Ly6C ou Ly6G (Hestdal *et al.*, 1991). La discrimination des sous-populations se fait grâce à l'expression suivante de ces marqueurs: CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C^{low} pour les PMN-MDSC et CD11b⁺ Ly6G⁻ Ly6C^{high} pour les M-MDSC.

Chez l'Homme, la caractérisation de la population totale de MDSC n'est pas clairement déterminée, en revanche, les sous-populations peuvent être discriminées ainsi : HLADR⁻CD33⁺ CD14⁻ CD15⁺ pour les PMN-MDSC et HLA-DR⁻ CD33⁺ CD14⁺ CD15⁻ pour les M-MDSC.

Bien que les MDSC présentent des caractéristiques phénotypiques et morphologiques proches des neutrophiles ou des monocytes, elles diffèrent de ces populations principalement de par leur génération et leur puissante activité immunosuppressive. Ces différences phénotypiques et fonctionnelles entre MDSC, neutrophiles et monocytes sont illustrées en tableau 2.

Tableau 2 Phénotypes et propriétés suppressives des MDSC, neutrophiles et monocytes
D'après (Veglia et al., 2018)

Chez l'Homme				
	Neutrophiles	PMN-MDSC	Monocytes	M-MDSC
Phénotype	CD11b ⁺ CD14 ⁻ CD15 ⁺ CD66b ⁺ LOX-1 ⁻	CD11b ⁺ CD14 ⁻ CD15 ⁺ CD66b ⁺ LOX-1 ⁺	CD14 ⁺ CD15 ⁻ HLADR ⁺	CD14 ⁺ CD15 ⁻ HLADR ^{-/low}
Densité	Forte	Faible	Faible	Faible
Activité immunosuppressive	-	+	-	++
Chez la souris				
	Neutrophiles	PMN-MDSC	Monocytes	M-MDSC
Phénotype	CD11b ⁺ Ly6G ^{high} Ly6C ^{low}		CD11b ⁺ Ly6G ⁻ Ly6C ^{high}	
Activité immunosuppressive	-	+	-	++

3. Génération des MDSC

La myélopoïèse est un processus finement régulé qui aboutit à des cellules bien différenciées aux fonctionnalités propres : les cellules de la lignée myéloïdes (granulocytes, monocytes, macrophages, cellules dendritiques). L'activation classique de ces cellules a pour but de protéger l'hôte contre des agressions par les bactéries, les virus, de remodeler les tissus après une blessure, ou de résoudre une inflammation. Cette activation est de courte durée et cesse lorsque les stimuli ne sont plus présents. En opposition, dans des conditions pathologiques, et plus particulièrement en cas de cancer, cette myélopoïèse est fortement dérégulée. En effet, la tumeur va sécréter des médiateurs inflammatoires qui vont stimuler une « hématopoïèse d'urgence » et plus particulièrement une stimulation de la prolifération des cellules immatures de la lignée myéloïde et une inhibition de leur différenciation donnant naissance aux MDSC (Youn *et al.*, 2012). Ces médiateurs inflammatoires sécrétés par la tumeur pourraient également entraîner une rétro-différenciation des cellules myéloïdes en cellules immunosuppressives (Tcyganov *et al.*, 2018). C'est pourquoi, chez les souris saines ou chez les individus ne présentant pas de pathologies inflammatoires ou de cancer, les MDSC ne sont retrouvées qu'à l'état de « trace » dans le sang ou les organes lymphoïdes secondaires. Au contraire, en cas de cancer, on observe une augmentation de ces cellules dans le sang, les organes lymphoïdes ainsi que leur apparition dans la tumeur (Almand *et al.*, 2001; Ochoa *et al.*, 2007).

La production de MDSC nécessite deux conditions : 1) L'expansion des MDSC et 2) l'activation des fonctions immunosuppressives de ces cellules (Condamine *et al.*, 2015).

a. Expansion des MDSC

i. Influence des cytokines et facteurs de croissance

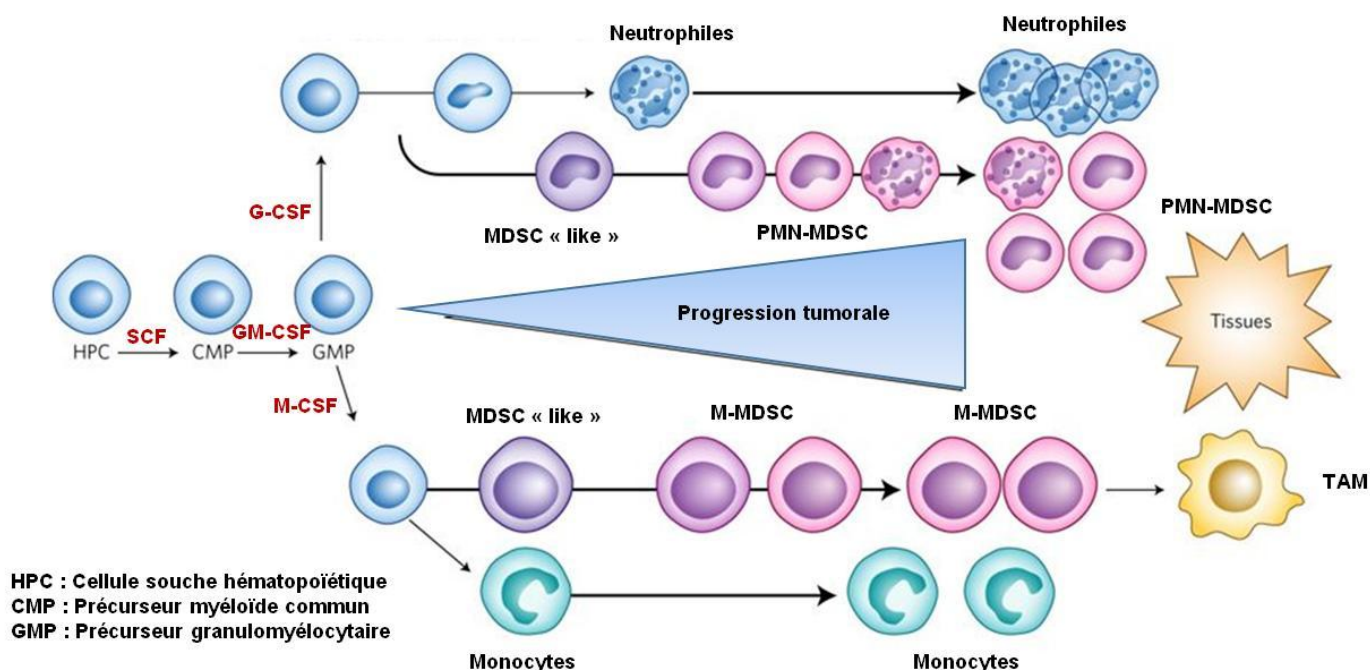


Figure 8 Accumulation et différenciation des MDSC
D'après (Veglia et al., 2018)

La première étape d'accumulation des MDSC est due à une génération importante de cellules immatures, conséquence d'une myélopoïèse exacerbée notamment par la présence des facteurs de croissance de la famille CSF (Colony Stimulating Factor) ou du SCF (Stem Cell Factor). La tumeur va produire en quantité ces facteurs de croissance qui vont soutenir la prolifération des cellules souches hématopoïétiques et leur engagement vers les progéniteurs myéloïdes. Le SCF va d'abord permettre la différenciation des cellules souches hématopoïétiques en cellules myéloïdes pluripotentes. Puis, le GM-CSF permet la différenciation des cellules myéloïdes pluripotentes en progéniteurs granulomonocytaires (Dolcetti *et al.*, 2010; Morales *et al.*, 2010). Ces progéniteurs s'orientent ensuite vers la voie des progéniteurs monocytaires sous l'action du M-CSF (Kowanetz *et al.*, 2010; Okazaki *et al.*, 2006; Waight and Abrams, 2011) ou vers les progéniteurs granulocytaires sous l'action du G-CSF (Menetrier-Caux *et al.*, 1998) (figure 8). De plus, nous avons vu précédemment que la tumeur a la capacité d'induire le processus de néo-angiogenèse, et ce notamment par la production de VEGF. Ce facteur de croissance joue également un rôle important dans la génération de MDSC en inhibant l'activité et la différenciation des cellules dendritiques

induisant alors l'accumulation de cellules immatures. En effet, l'utilisation d'un anticorps anti-VEGF chez des souris porteuses de tumeurs rétablit la maturation des cellules dendritiques et, chez l'Homme, l'administration d'un anticorps monoclonal anti-VEGF diminue le nombre de cellules dendritiques immatures (Gabrilovich *et al.*, 1998, 1996). Nous avons également évoqué la création d'un environnement immunosuppresseur provoqué par l'inflammation induite par la tumeur pour atteindre son plein développement. Ce statut immunosuppresseur induit par l'inflammation et particulièrement par les cytokines pro-inflammatoires passe, entre autre, par l'accumulation des MDSC. L'implantation de cellules tumorales sur-exprimant l'IL-1 β dans des souris favorise un recrutement plus important des MDSC au niveau de la tumeur (Song *et al.*, 2005). De même, la surexpression conditionnée de l'IL-1 β dans le foie de souris favorise l'inflammation locale, l'apparition de cancer et le recrutement de MDSC. L'utilisation de l'IL1Ra, un antagoniste des récepteurs à l'IL-1 β , inhibe le recrutement des MDSC et l'apparition de carcinome hépatique (Tu *et al.*, 2008). Une inflammation réduite dans des souris IL1R $^{-/-}$ montre une apparition de cancer moins importante ainsi qu'un recrutement moindre de MDSC mais l'injection d'IL-6 restaure la quantité de MDSC dans ces souris (Bunt *et al.*, 2007). Des études ont montré que le taux plasmatique d'IL-6 était corrélé avec la quantité de MDSC circulantes chez des patients atteints de carcinome œsophagien squameux (Chen *et al.*, 2014). De la même manière, la quantité de M-MDSC est corrélée avec la teneur en IL-6 et IL-10 dans l'ascite des patientes atteintes d'un cancer des ovaires avancé (Wu *et al.*, 2017). L'IL-10 contrôle également l'augmentation de M-MDSC dans le lymphome B non-Hodgkinien (Xiu *et al.*, 2015). D'autres études montrent que dans un contexte d'inflammation chronique le TNF α contribue au blocage de la différenciation des cellules myéloïdes immatures et à l'acquisition des fonctions suppressives des MDSC. L'inhibition de TNF α pendant une inflammation chronique réduit les propriétés immunosuppressives des MDSC et favorise leur maturation en macrophages ou cellules dendritiques permettant la restauration des fonctions immunitaires *in vivo* (Sade-Feldman *et al.*, 2013). Dans différents modèles d'inflammation ou de cancer la signalisation du TNF α par le récepteur au TNF 2 (TNFR2) semble impliquée dans la différenciation, la fonction et la survie des MDSC (Polz *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2012). Dans des modèles murins de carcinogenèse, la neutralisation du TNF entraîne une accumulation réduite de MDSC et un retard dans la croissance tumorale (Atrekhany *et al.*, 2016). La prostaglandine E2 (PGE2), un médiateur lipidique aux propriétés pro-inflammatoires, participe à la progression tumorale en favorisant l'accumulation de MDSC (Eruslanov *et al.*, 2010; Sinha *et al.*, 2007). Son induction entraîne une très forte accumulation de MDSC dans le

micro-environnement des tumeurs ovarienne et gastrique (Kalinski, 2012; Obermajer *et al.*, 2011a).

ii. Facteurs de transcription impliqués dans l'expansion des MDSC

On dénombre un certain nombre de facteurs de transcription impliqués dans l'expansion des MDSC. En particulier les facteurs STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription), C/EBP β (CCAAT-Enhancer Binding Protein) et IRF8 (Interferon Regulatory Factor) qui jouent un rôle primordial dans la différenciation des MDSC (Condamine *et al.*, 2015).

STAT3 est un des principaux facteurs de transcription impliqués dans l'accumulation de MDSC. Les MDSC issues de souris porteuses de tumeur présentent un niveau important de phosphorylation de STAT3 comparées aux précurseurs de la lignée myéloïde de souris sans tumeur (Nefedova *et al.*, 2004; Rébé *et al.*, 2013). De plus, le traitement de souris porteuses de tumeur par différents inhibiteurs de STAT3 ; curcubitacine I (Nefedova *et al.*, 2005), nifuroxazide (Yang *et al.*, 2015), niclosamide (Ye *et al.*, 2014) par exemple ; entraîne une diminution de l'accumulation de MDSC dans la rate, le sang ou la tumeur. De même que l'ablation génétique de STAT3 au sein de la lignée myéloïde limite la croissance tumorale et restaure une réponse immunitaire anti-tumorale par les cellules effectrices (cellules T, B, NK) (Kortylewski *et al.*, 2005). Ainsi, STAT3 est donc fortement impliqué dans l'inhibition de la différenciation des cellules de la lignée myéloïde et le maintien du phénotype immature et immunosuppresseur des MDSC. L'activation de STAT3 dans ces cellules est liée principalement aux cytokines IL-6, IL-10 ou le VEGF sécrétés par la tumeur (Bunt *et al.*, 2007; Sica and Bronte, 2007). De plus, les facteurs de transcription de la famille C/EBP sont exprimés dans les cellules de la lignée myéloïde, mais seul C/EBP β semble impliqué dans l'expansion des MDSC. L'équipe de V. Bronte a montré que dans les souris déficientes pour ce facteur de transcription, dans le système hématopoïétique, on observait une diminution de la proportion de MDSC chez des souris porteuses de sarcome MCA203, bien que cette diminution affecte l'ensemble des MDSC, la population CD11b⁺ Gr1^{int}, représentant la fraction M-MDSC est la plus touchée (Marigo *et al.*, 2010). Le facteur de transcription IRF8 est impliqué dans la différenciation et la survie des précurseurs granulomonocytaires. Il semblerait qu'il puisse réguler la différenciation des MDSC et plus particulièrement celle des PMN-MDSC. Dans un modèle de souris porteuses de tumeur de mélanome B16F10, les souris déficientes en IRF8 présentent une accumulation importante de MDSC au niveau de la rate et de la tumeur comparée aux souris sauvages (Mattei *et al.*, 2012). De même, en accord avec ces résultats une surexpression de IRF8

entraîne une moindre accumulation de MDSC dans des modèles de carcinome mammaire spontané, et même si la diminution concerne les deux sous types de MDSC celles-ci concerne de manière plus importante le sous type PMN-MDSC (Stewart *et al.*, 2009; Waight *et al.*, 2013).

[b. Rétro-différenciation des cellules matures](#)

La génération de M-MDSC peut dépendre également d'une retro-différenciation des monocytes circulants. Plusieurs études ont montré que des monocytes de donneurs sains peuvent acquérir un phénotype de MDSC (inhibition de l'expression de HLADR) et des propriétés immunosuppressives lorsqu'ils sont mis en contact avec des cellules cancéreuses de mélanome (Mao *et al.*, 2013) ou de gliome (Rodrigues *et al.*, 2010). Une étude récente a montré qu'il peut exister une conversion des neutrophiles en PMN-MDSC immunosuppressives après une activation du stress du reticulum endoplasmique (RE) (Condamine *et al.*, 2016a). On distingue les PMN-MDSC des neutrophiles par leur expression du récepteur 1 aux LDL oxydées de type lectine (LOX1). Condamine *et al.*, ont montré que les « neutrophiles » LOX1+ (représentant 30 à 40% des neutrophiles dans la tumeur) présentent une puissante activité suppressive sur la prolifération des cellules T (Condamine *et al.*, 2016a). L'utilisation d'inducteurs du stress du RE, comme la thapsigargine, entraîne la surexpression de LOX1 à la surface des neutrophiles induisant leur conversion en cellules immunosuppressives de type PMN-MDSC. L'utilisation d'inhibiteur de la réponse du stress du RE comme le B-I09, inhibiteur de IRE1 (Inositol-Requiring Enzyme), prévient l'acquisition de propriétés suppressives par les neutrophiles (Condamine *et al.*, 2016a; Tang *et al.*, 2014).

La simple accumulation des cellules immatures myéloïdes n'est pas suffisante à la production de MDSC, il faut également une activation pathologique qui résulte de la combinaison entre la stimulation persistante du compartiment myéloïde et la présence de signaux de bas bruit provenant de la tumeur ou des sites d'inflammation chronique.

[c. Mécanismes d'activation des MDSC](#)

De la même manière que leur génération, l'activation des MDSC va être dépendante du microenvironnement créé par la tumeur et notamment par la présence de cytokines (IFN γ , IL-1 β , IL-4, IL-13..) ou des molécules pouvant activer les récepteurs de type Toll (TLR) (Gabrilovich and Nagaraj, 2009; Veglia *et al.*, 2018). La présence de ces cytokines induit une signalisation dépendante des voies JAK/STAT, et plus particulièrement l'activité des facteurs de transcription STAT1 et STAT6. En effet, les MDSC dépourvues de ces facteurs de transcription perdent leurs capacités d'inhibition de la réponse immunitaire. Les exosomes issus de cellules tumorales sont

également impliqués dans l'activation des MDSC. Ces exosomes expriment Hsp72, une protéine de choc thermique. Hsp72 est reconnue par le récepteur TLR2 à la surface des MDSC et la liaison Hsp72/TLR2 déclenche, par l'intermédiaire de Myd88, la sécrétion d'IL-6 qui va de manière autocrine entraîner la phosphorylation de STAT3. Cette activation de STAT3 rend les MDSC actives et leur confère leurs propriétés immunosuppressives (Chalmin *et al.*, 2010). D'autres facteurs comme le récepteur à l'adénosine A2b ou les alarmines S100A9 et S100A8 peuvent être impliqués dans l'activation des MDSC.

d. Recrutement et devenir des MDSC au sein de la tumeur

Le microenvironnement présent au niveau tumoral s'avère agressif vis-à-vis des cellules présentes : Hypoxie, forte concentration en agents oxydants (ROS, NO, peroxy-nitrites), cytokines pro-inflammatoires, apport limité en nutriments... (Gabrilovich *et al.*, 2012). Pour autant, la tumeur va également sécréter de nombreux facteurs chemoattractants responsables du recrutement des MDSC. Les chemokines ligands CCL2, CCL5, et CSF1 favorisent le recrutement des M-MDSC au site tumoral. Le routage des PMN-MDSC est quant à lui favorisé par l'expression de CXCL1, CXCL5, CXCL6, CXCL8, CXCL12 (Chang *et al.*, 2016; Chun *et al.*, 2015; Kumar *et al.*, 2016; Talmadge and Gabrilovich, 2013; Toh *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2018) ou encore du gène 1 induit par l'IL-4 (IL4L1) (Bod *et al.*, 2017). Interférer avec la signalisation CCL2-CCR2, diminue le flux de cellules myéloïdes à la tumeur et retarde la croissance tumorale (Hart *et al.*, 2009; Hartwig *et al.*, 2017). Dans la tumeur, les MDSC ne vont pas avoir le même devenir, les PMN-MDSC vont avoir un temps de survie assez court, tandis que les M-MDSC vont séjourner plus longtemps et y exercer une puissante activité anti-tumorale. Cette caractéristique fait également que ce sont les M-MDSC qui sont le plus étudiées dans l'environnement intra-tumoral. Dans le contexte tumoral, le microenvironnement permet en plus de l'activation des M-MDSC et des PMN-MDSC, leur différenciation respective en TAM (tumor associated macrophages) et en TAN (tumor associated neutrophils). Ces deux sous-types ont également des propriétés immunosuppressives (Bronte *et al.*, 2016). La quantité de MDSC au sein de la tumeur est corrélée positivement à son volume et contribue à l'expansion tumorale (Condamine *et al.*, 2015). En effet, elles vont exercer d'une part un rôle immunosuppresseur en supprimant la réponse immunitaire innée et adaptative anti-tumorale mais également un rôle indépendamment de cette activité immunosuppressive.

e. [Fonctions immunosuppressives des MDSC](#)

- Déplétion en acides aminés essentiels

Un des premiers mécanismes décrit concernant le rôle immunosuppresseur des MDSC est leur capacité à priver les lymphocytes T, responsables de la réponse anti-tumorale, des acides aminés essentiels à leur bon fonctionnement et plus particulièrement les acides aminés L-Arginine, Cystéine et tryptophane.

La L-Arginine sert de substrat pour deux enzymes : l'oxyde nitrique synthase (NOS), qui génère le NO, et la citrulline; et l'arginase 1, qui convertit la L-Arginine en urée et en L-Ornithine. Le métabolisme de la L-Arginine a été le premier mécanisme expliquant le potentiel immunosuppresseur majeur des MDSC (Bronte *et al.*, 2005; Kusmartsev and Gabrilovich, 2005). L'activation des MDSC par l'IFN γ ou les ligands des TLR entraîne la surexpression de la NOS inducible (iNOS) et de l'arginase 1, sous la dépendance des facteurs de transcription STAT3, STAT1 et NF κ B (Raber *et al.*, 2012). Rodriguez *et al.* ont démontré une corrélation entre la disponibilité de la L-Arginine et la régulation de la prolifération des lymphocytes T (Rodriguez *et al.*, 2005, 2007). En effet, l'activité accrue de l'arginase 1 dans les MDSC amplifie le catabolisme de l'arginine, privant ainsi leur micro-environnement en Arginine. L'inhibition de la prolifération des cellules T, causée par le manque de la L-arginine, a été associée à une diminution de l'expression de différentes cyclines bloquant les lymphocytes T en phase G0-G1 du cycle cellulaire (Rodriguez *et al.*, 2007). La faible teneur en L-Arginine régule également les fonctions des lymphocytes T en inhibant l'expression de CD3 ζ , essentiel à l'activation du TCR (Rodriguez *et al.*, 2002). En effet, chez la souris, la déplétion en MDSC restaure la prolifération des cellules T et l'expression de la chaîne CD3 ζ (Zea *et al.*, 2005). Chez des patients atteints d'un cancer de la prostate, il a été montré que l'inhibition de la voie STAT3 inhibe l'expression de l'arginase 1 et restaure l'activité cytotoxique des Lymphocytes T CD8 $^{+}$ (Hossain *et al.*, 2015).

La Cystéine est un métabolite issu du catabolisme de la cystine ou de la méthionine, et est une molécule essentielle au bon fonctionnement des lymphocytes T. En effet, ces cellules ne possèdent pas la capacité de produire la cystéine et doivent la capter dans leur environnement. Les MDSC expriment le transporteur Xc, qui capture la cystéine, en revanche ces cellules n'expriment pas le transporteur requis pour exporter cette cystéine (ASC), induisant alors la séquestration de cet acide aminé. Ainsi, les MDSC privent les cellules T de la cystéine, essentiel à leur activation (Srivastava *et al.*, 2010). Les MDSC ont également la faculté de produire l'enzyme indolamine 2,3 dioxygénase (IDO) induisant alors la réduction locale des niveaux de tryptophane (Yu *et al.*, 2013).

- Les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote

Les ROS sont des dérivés de l'oxygène dont certains électrons se trouvent dans un état énergétique excité, donc très réactifs. Une des caractéristiques majeures des MDSC est leur capacité à produire des ROS. Les MDSC, isolées de souris porteuses de tumeurs, produisent des niveaux plus élevés de ROS que leurs homologues issus de souris saines. Des études ont démontré que l'inhibition des ROS dans les MDSC supprime l'effet négatif de ces cellules chez les souris et les patients atteints de cancers (Kusmartsev and Gabrilovich, 2005; Schmielau and Finn, 2001). La production de ROS par les « neutrophiles » isolés du sang de 16 patients atteints d'un carcinome du larynx, a été comparée à celle des neutrophiles obtenus à partir de 15 personnes saines. Les niveaux de ROS sont sensiblement plus élevés chez les patients cancéreux que chez les volontaires sains suggérant un rôle immunosuppresseur de ces « neutrophiles » qui s'apparenteraient à des MDSC (Szuster-Ciesielska *et al.*, 2004). De plus, les intégrines, CD11b, ainsi que CD18 et CD29, permettent l'interaction entre les MDSC et les cellules T spécifiques de l'antigène (Kusmartsev *et al.*, 2004). Le blocage de ces intégrines inhibe la production de ROS et la suppression par les MDSC de la réponse T CD8+. Un certain nombre de cytokines et de facteurs de croissance produits par la tumeur peuvent induire la production de ROS, y compris le TGF β (Transforming growth factor beta), l'IL-10, l'IL-6, l'IL-3, le PDGF (Platelet-derived growth factor), le GM-CSF (Granulocyte macrophage colony-stimulating factor) (Sauer *et al.*, 2001). Des niveaux élevés de ROS ont été observés dans de nombreuses tumeurs et contribuent à la tumorigenèse, la formation de métastases ainsi qu'à l'angiogenèse (Agostinelli and Seiler, 2006; Mantovani *et al.*, 2003; Waris and Ahsan, 2006). Nous avons vu que l'enzyme iNOS est fortement induite dans les MDSC et qu'elle permet la conversion de la L-Arginine en citrulline et NO. Le NO peut d'une part inhiber à lui seul l'activité des lymphocytes T en inhibant différentes voies de signalisation comme JAK3/STAT5, l'expression du CMH ou induire l'apoptose des cellules T (Gabrilovich and Nagaraj, 2009). D'autre part, le NO va pouvoir réagir avec l'anion superoxyde pour former le peroxynitrite, un puissant agent oxydant qui est capable d'entraîner la nitration ou la nitrosylation des acides aminés, cystéine, méthionine, tryptophane et tyrosine (Dilek *et al.*, 2012). Ainsi, le peroxynitrite va alors inhiber la fonction des lymphocytes T CD8+ par nitration des molécules CD8 et TCR, et nitrosylation du TCR et du CD3 ζ , inhibant la reconnaissance des antigènes et l'activation des lymphocytes (Nagaraj *et al.*, 2007, 2010a).

- Inhibition de la réponse immunitaire par voie cytokinique

Les MDSC sont liées au dysfonctionnement de l'activation des cellules T dans le cancer, grâce à la production de TGF- β et d'IL-10 (Beck *et al.*, 2003; Terabe *et al.*, 2003; Young *et al.*, 1996). Les MDSC permettent la diminution de la production d'IL-12 par les macrophages, ainsi que l'augmentation de leur propre production d'IL-10 en réponse à des signaux provenant des macrophages. Ce couplage réciproque entre les MDSC et les macrophages est susceptible de dévier l'immunité cellulaire TCD4⁺ et TCD8⁺ vers une réponse de type 2 impliquée dans la promotion tumorale (Bunt *et al.*, 2009). Par leur production de TGF β et d'IL-10 les MDSC vont également promouvoir le recrutement des cellules T régulatrices (Treg) impliqués dans l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T effecteurs (Ostrand-Rosenberg and Sinha, 2009; Pan *et al.*, 2010). Ces deux cytokines vont participer également à l'inhibition des fonctions des cellules NK (Mao *et al.*, 2014).

- Inhibition de la réponse immunitaire par expression des points de contrôle

En réponse à l'hypoxie, les MDSC expriment le facteur de transcription HIF-1 α (Hypoxia Inducible Factor 1) qui va alors induire l'expression de PDL1, provoquant une augmentation de la signalisation PDL1/PD1 conduisant à l'anergie des cellules T et la résistance des cellules tumorales aux signaux pro-apoptotiques (Black *et al.*, 2016; Duraiswamy *et al.*, 2013). D'autres récepteurs inhibiteurs de la réponse immunitaire vont également être exprimés à la surface des MDSC, tels que les membres de la famille des récepteurs de surface B7 comme CD80 ou la galectine 9 (Blank and Mackensen, 2007; Dardalhon *et al.*, 2010). De plus, les MDSC expriment également la protéase ADAM17, responsable du clivage de la L-sélectine CD62L, une molécule de la membrane plasmique nécessaire à la domiciliation des cellules T naïves vers les ganglions lymphatiques, limitant alors leur recirculation vers les ganglions où ils sont supposés être activés. (Hanson *et al.*, 2009).

- Immunosuppression par induction du stress du réticulum endoplasmique

Le stress du réticulum endoplasmique (RE) est impliqué dans les propriétés suppressives des MDSC. En effet, les MDSC issues de souris porteuses de tumeur ou de patients atteints d'un cancer surexpriment plusieurs marqueurs du stress du RE tels que XBP1 et CHOP et présentent un large RE, caractéristique de ce stress (Condamine *et al.*, 2014). L'induction du stress du RE par la thapsigargine polarise les neutrophiles en PMN-MDSC à activité immunosuppressive (Condamine

et al., 2016b). En outre, la déplétion de CHOP au sein des MDSC inhibe leur capacité à réprimer la réponse des cellules T voire stimule ces cellules (Thevenot *et al.*, 2014).

- Activité non-immunosuppressive : régulation de l'angiogenèse

Les MDSC participent également activement à l'angiogenèse (Murdoch *et al.*, 2008). Une étude montre que la co-injection de cellules murines de cancer colique (MC26) et de MDSC dans la souris balb/c provoque une croissance et un niveau de vascularisation plus important que l'injection seule de cellules cancéreuses (Yang *et al.*, 2004). Ces cellules vont également être capables de sécréter différents facteurs à activité pro-angiogénique tels que les métalloprotéinases matricielles (MMP), le VEGF ou le facteur de croissance fibroblastique (FGF) (Du *et al.*, 2008; Kujawski *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2004). Dans des modèles pré-cliniques, la persistance des MDSC dans le microenvironnement tumoral est associée à une résistance aux traitements anti-angiogéniques (Shojaei and Ferrara, 2008). Un traitement par anti-VEGF associé à des molécules qui ciblent les MDSC lève la résistance aux anti-angiogéniques (Shojaei *et al.*, 2007).

f. [L'activité immunosuppressive des MDSC est dépendante de leur localisation](#)

Les mécanismes d'action développés ci-dessus ne vont pas concerner les deux sous-types de MDSC à la fois. Chaque sous-type va agir préférentiellement selon certains mécanismes mais va également favoriser l'un ou l'autre de ces mécanismes en fonction de sa localisation (figure 9). Il est désormais bien admis que l'activité immunosuppressive des MDSC est bien plus puissante au niveau tumoral que dans les organes lymphoïdes secondaires comme la rate. De plus, les M-MDSC présentent une activité immunosuppressive plus importante que les PMN-MDSC. Les PMN-MDSC représentent la population majoritaire de MDSC au niveau de la rate et des ganglions alors que ce ratio est inversé au niveau de la tumeur, expliquant que l'activité immunosuppressive est plus importante à ce site (Messmer *et al.*, 2015; Solito *et al.*, 2014; Youn *et al.*, 2013). Les PMN-MDSC vont produire une majorité de ROS tels que l'anion superoxyde ou de l'H₂O₂ tandis que les M-MDSC produisent plus de NO. L'instabilité des ROS fait que les PMN-MDSC ont besoin d'un contact cellules-cellules pour exercer leur effet sur les cellules T, expliquant l'inhibition spécifique de l'antigène des PMN-MDSC au niveau des organes lymphoïdes secondaires (Nagaraj *et al.*, 2010a). Au niveau de ces tissus lymphoïdes, les M-MDSC produisent du NO et des cytokines immunosuppressives de demi-vie plus importante que les ROS permettant une action spécifique ou non de l'antigène sur les lymphocytes. Les deux sous-types vont être capables de dépléter l'environnement en acides aminés L-Arginine, Cystéine et Tryptophane par les mécanismes

évoqués ci-dessus. La forte expression du facteur de transcription STAT3 va également bloquer la différenciation des M-MDSC en cellules dendritiques ou monocytes.

En ce qui concerne le site tumoral, les PMN-MDSC vont séjourner que peu de temps. Sous l'influence des conditions hypoxiques elles vont présenter une forte expression d'arginase 1 et d'iNOS impliquée dans l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T et vont rapidement mourir ou être polarisées en neutrophiles dérivés des tumeurs. Quant aux M-MDSC, les conditions hypoxiques vont favoriser l'expression d'HIF1 α dans ces cellules et leur permettre d'exprimer les points de contrôle inhibiteurs de la réponse immunitaire entraînant l'abolition des fonctions des cellules T effectrices. L'hypoxie va également entraîner une inhibition de l'activité de STAT3 permettant la différenciation des M-MDSC en macrophages associés à la tumeur (TAM) (Figure 9)

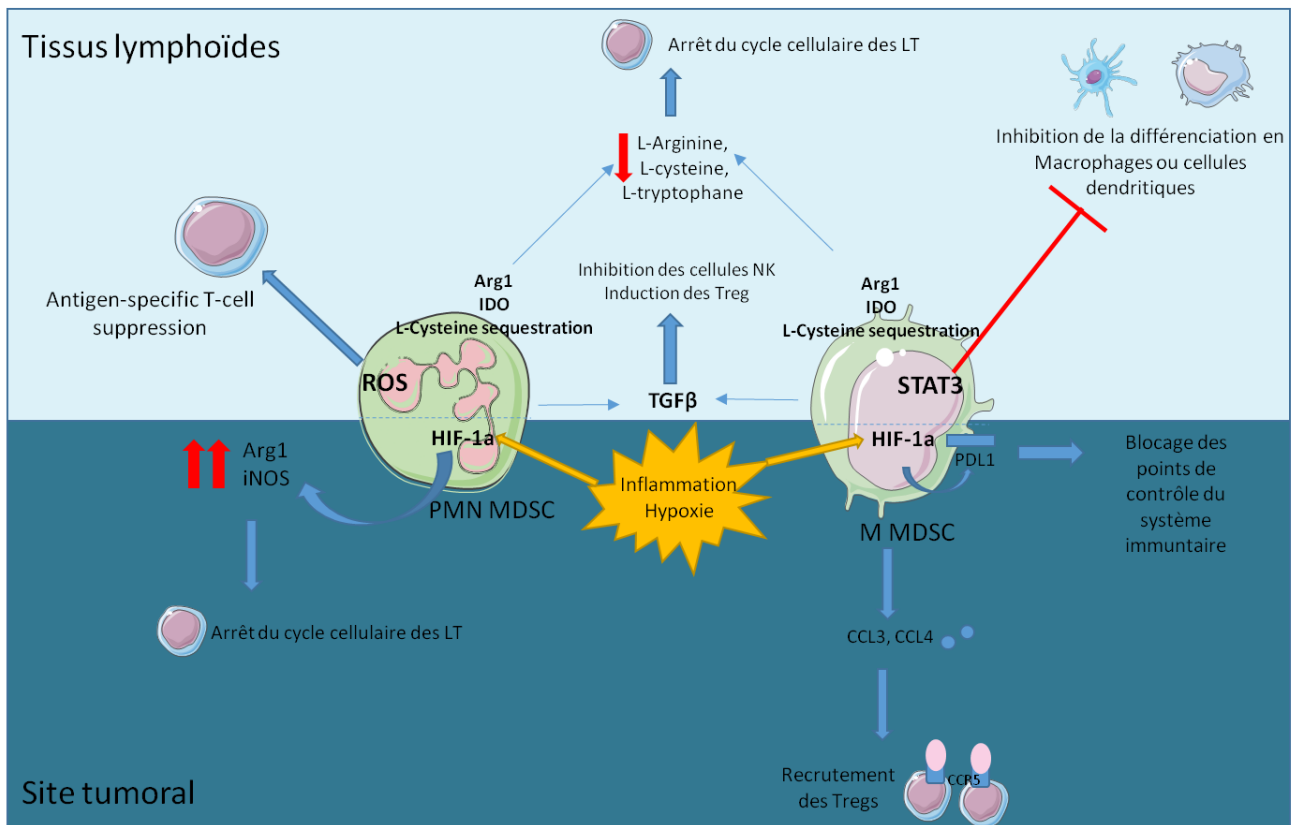


Figure 9 Localisation et fonctions immunosuppressives des MDSC

4. Les MDSC comme cible thérapeutique

Interférer avec le développement et les fonctions des MDSC apparaît être une stratégie prometteuse dans le traitement du cancer afin de débloquent la réponse anti-tumorale du système immunitaire. Une étude montre que la déplétion des MDSC par un anticorps anti-Gr1 ou un anti-Ly6G dans des modèles murins de cancer permet d'améliorer la réponse immunitaire

Chapitre II : Le système immunitaire : acteur clé dans l'initiation et la progression tumorale

antitumorale (Srivastava *et al.*, 2012). Cette approche peut s'avérer être une stratégie prometteuse dans les tumeurs où les MDSC jouent un rôle prépondérant dans l'échappement tumoral. Par ailleurs, un criblage d'agents anticancéreux a permis de mettre en évidence l'effet de certaines de ces molécules dans la lutte contre les MDSC (Alizadeh and Larmonier, 2014).

Tableau 3 Exemples de stratégies thérapeutiques anti-cancéreuses ciblant les MDSC

D'après (Najjar and Finke, 2013)

Mécanisme d'action	Molécules	Effets	Références
Induction de la différenciation des MDSC	ATRA	Favorise la différenciation des MDSC en cellules dendritiques chez l'Homme et la souris, amélioration de la réponse des LT.	(Gabrilovich <i>et al.</i> , 2001)
		Corrélation entre fortes concentrations plasmatiques d'ATRA et diminution du nombre de MDSC	(Mirza <i>et al.</i> , 2006)
	Vitamine D3	Diminution du taux de MDSC chez les patients atteints d'un carcinome squameux de la tête et du cou traités avec de la vitamine D3	(Lathers <i>et al.</i> , 2004; Ugel <i>et al.</i> , 2009)
	Sunitinib	Diminution des taux de MDSC et Treg et amélioration de la réponse des LT	(Ozao-Choy <i>et al.</i> , 2009)
		Réduit la viabilité des PMN MDSC et inhibe la prolifération des M MDSC	(Ko <i>et al.</i> , 2010)
	Axitinib	Réduit les niveaux de MDSC, Treg et favorise la réponse des LT chez les souris porteuses de tumeurs.	(Bose <i>et al.</i> , 2011)
	Gemcitabine	Diminution des MDSC spléniques, amélioration de l'activité anti-tumorale dans 5 modèles de cancer du poumon. Induction d'apoptose dans les splénocytes.	(Suzuki <i>et al.</i> , 2005)
	5-FU	Induction de la mort par apoptose des MDSC spléniques et intra-tumorales sans effets sur les LT, LB, NK et cellules dendritiques.	(Vincent <i>et al.</i> , 2010a)
	Docetaxel	Diminution des MDSC spléniques et polarisation en M1, augmentation de la réponse des LT cytotoxiques.	(Kodumudi <i>et al.</i> , 2010)

Chapitre II : Le système immunitaire : acteur clé dans l'initiation et la progression tumorale

Mécanisme d'action	Molécules	Effets	Références
Inhibition de la fonction des MDSC	CDDO-Me	Inhibition des fonctions immunosuppressives des MDSC <i>in vitro</i> .	(Nagaraj <i>et al.</i> , 2010b)
	Inhibiteur de PDE-5	Chez la souris diminution de fonctions suppressives dépendante de ARG1 et NOS2. Chez l'homme restauration de la prolifération des LT	(Serafini <i>et al.</i> , 2006)
		Diminution du nombre et des fonctions suppressives des MDSC chez les patients atteints de mélanome.	(Umansky and Sevko, 2012)
		Amélioration de la survie des souris porteuses de tumeurs par un mécanisme dépendant de l'activité des LT CD8.	(Meyer <i>et al.</i> , 2011)
	Inhibiteurs de COX-2	Inhibition du nombre de MDSC. Inhibition de la quantité de CCL2 et CXCL12	(Fujita <i>et al.</i> , 2011; Obermajer <i>et al.</i> , 2011b)
	Nitro aspirine	Augmentation du nombre et de l'activité antigène spécifique des LT <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> par diminution de l'activité ARG et NOS dans les CD11b+	(Santo <i>et al.</i> , 2005)

Nous allons détailler, plus précisément, les mécanismes ciblant les MDSC associés à l'utilisation des chimiothérapies.

En 2005, une première équipe montre qu'une chimiothérapie, la gemcitabine généralement utilisée pour son action contre les cellules cancéreuses, était également capable de diminuer la proportion de MDSC (Suzuki *et al.*, 2005). En effet, l'équipe de Steven Albelda a montré que la gemcitabine, appartenant à la famille des anti-métabolites était capable de réduire la proportion des MDSC dans la rate de souris porteuses de tumeurs de cinq modèles de cancer du poumon différents (TC1, LLC, AE17, AB12, et L1C2). La gemcitabine est capable d'induire une mort par apoptose spécifique aux MDSC (sans action sur les lymphocytes T CD4 et CD8, lymphocytes B, macrophages, ou cellules NK). Cette réduction du taux de MDSC est associée avec une augmentation de l'activité anti-tumorale des lymphocytes T CD8 et une activation des cellules NK. L'action de la gemcitabine sur les MDSC a également été confirmée dans un modèle de souris porteuses de tumeur mammaire 4T1 (Le *et al.*, 2009).

En 2010, Kodumudi *et al.* ont montré que les propriétés anti-tumorales du docétaxel, chimiothérapie appartenant à la famille des taxanes, étaient liées à une induction de la mort par

apoptose des MDSC. D'autre part, le docétaxel entraîne une augmentation des marqueurs de différenciation des macrophages CMHII, CD86 et plus particulièrement l'orientation vers un phénotype « M1-like » par l'apparition du marqueur CCR7. Ces cellules vont sécréter plus d'IL-12 et moins d'IL-10 par rapport aux cellules des souris non traitées. Cette polarisation est permise par une inhibition de l'activation de STAT3 (Kodumudi *et al.*, 2010).

Egalement en 2010, notre équipe de recherche a montré que le 5-FU, appartenant, comme la gemcitabine, à la famille des anti-métabolites, entraîne la déplétion des MDSC par l'activation de la caspase 3 et de la caspase 7 induisant la mort par apoptose de ces cellules sans aucune action sur la quantité des autres populations immunitaires (Lymphocytes T et B, cellules NK, cellules dendritiques) dans la rate et la tumeur de souris porteuses de tumeurs EL4. Dans ce cas, la déplétion en MDSC est également associée à une restauration de la réponse anti-tumorale des lymphocytes T CD4 et CD8, sans induction de la maturation de ces MDSC vers un phénotype de macrophages ou cellules dendritiques (Vincent *et al.*, 2010a).

En 2014, le groupe de N. Larmonier montre que la doxorubicine est capable d'entraîner une diminution de la quantité de MDSC de souris traitées porteuses de tumeur mammaire 4T1, et de restaurer la réponse immunitaire anti-tumorale en augmentant la prolifération et l'activité cytotoxique des lymphocytes T CD4 et CD8 et des cellules NK. Cette restauration est permise grâce à la diminution de la production de ROS et de l'expression de l'ARG1 et de NOS2 dans les MDSC par la doxorubicine (Alizadeh *et al.*, 2014). La déplétion de MDSC a également été confirmée chez des patients porteurs de différents cancers traités avec de la doxorubicine.

5. Effets ambivalents des chimiothérapies sur les MDSC

Cependant, il arrive parfois que les chimiothérapies deviennent inefficaces avec le temps. Nous avons vu, dans le chapitre précédent, différents mécanismes de résistance associés plus particulièrement à la chimiothérapie 5-FU. Une des explications de la résistance est l'activation de mécanismes d'échappement mis en place par la tumeur. Néanmoins les MDSC peuvent également participer à cet échappement. En effet, notre équipe de recherche a pu mettre en avant des effets biologiques ambivalents liés à la déplétion des MDSC par la gemcitabine et le 5-FU. La gemcitabine et le 5-FU, dans un modèle *in vivo* de tumeur EL4 sont capables d'entraîner une diminution importante de la taille de la tumeur corrélée avec une diminution de la quantité de MDSC (Vincent *et al.*, 2010a). Cependant, l'effet thérapeutique reste transitoire, comme cela peut être le cas chez

les patients traités, la tumeur finit par développer un nouveau mécanisme d'échappement. Cet échappement passe par l'activation de l'inflammasome NLRP3 au sein des MDSC. La gemcitabine et le 5-FU entraînent une déstabilisation de la membrane du lysosome qui conduit au relargage de la cathepsine B. Cette protéase va alors se fixer sur un complexe multi-protéique appelé inflammasome NLRP3 composé des protéines NLRP3, ASC et pro-caspase-1. La fixation de la cathepsine B entraîne l'activation de l'inflammasome permettant le clivage de la pro-caspase-1 en caspase-1 active à l'origine de la maturation de la pro-IL-18 et de la pro-IL-1 β en IL-18 et IL-1 β . La forme mature, bioactive, de l'IL-1 β va permettre la polarisation des lymphocytes T Helper vers un phénotype sécrétant de l'IL-17, qui favorise l'angiogenèse et la reprise de la croissance tumorale. Ce mécanisme met en avant le rôle crucial que possède l'IL-1 β dans la résistance au 5-FU. L'utilisation d'un antagoniste des récepteurs à l'IL-1 β , empêchant alors son action suite à un traitement par le 5-FU, permet de limiter l'expansion et l'activité des Th17 tout en maintenant l'effet cytotoxique sur les MDSC et ainsi un maintien de l'effet thérapeutique du 5-FU (Bruchard *et al.*, 2013). Ces observations ont permis de mettre en place un essai clinique de phase II (IRAFU). Cet essai clinique a mis en évidence que la combinaison entre un antagoniste des récepteur à l'IL-1 β (anakinra), le 5-FU et le bevacizumab (anti-VEGF) augmente la survie sans progression et la survie globale des patients atteints d'un cancer colorectal métastatique (Isambert *et al.*, 2018).

III. Inflammation et cancer

A. Généralités

L'inflammation est la réaction immunitaire la plus anciennement décrite, les premières observations de réaction inflammatoire ont été faites dès 1600 av J-C par les égyptiens qui avaient décrit le phénomène de rougeur, accompagnant un coup ou une plaie. Au premier siècle après J-C, Aulus Cornelius Celsus rapporte quatre symptômes cardinaux de l'inflammation « *Rubor et tumor cum calore et dolore* » traduit par rougeur et gonflement associés à la chaleur et à la douleur. Un siècle plus tard Claude Galien ajoute un cinquième symptôme, « *functio laesa* »; la perte de fonction. L'approche scientifique de l'inflammation a véritablement commencé au XIXe siècle avec les travaux sur le mécanisme d'infection bactérienne réalisé par Ehrlich et ceux de Metchnikoff sur la phagocytose -prix Nobel de médecine et physiologie en 1908- mettant en avant les deux pans fondamentaux de l'immunité, l'immunité innée et l'immunité adaptative. La progression des connaissances sur l'inflammation a connu son essor durant le XXe siècle (Medzhitov and Janeway, 1997).

L'inflammation peut être décrite comme une réponse immunitaire coordonnée de l'organisme face à une agression par :

- un micro-organisme infectieux ou non
- une atteinte tissulaire et cellulaire d'origine physique ou chimique
- un agent endogène (protéines mutées, dysfonctionnement tissulaire...)

L'inflammation aiguë est donc l'ensemble des mécanismes réactionnels de défense et de réparation formé de la phase d'initiation (activation), amplification et résolution. La phase d'initiation, également qualifiée de phase vasculaire, se déclenche immédiatement après la lésion tissulaire. Cette phase provoque une vasodilatation associée à une augmentation du débit sanguin dans la microcirculation qui irrigue la région lésée, responsable de la chaleur et la rougeur. La perméabilité vasculaire est également augmentée et est responsable d'une extravasation des fluides plasmatiques qui se répandent dans les tissus, à l'origine du gonflement, de la douleur et de la perte de fonctionnalité. L'augmentation de la perméabilité vasculaire est aussi une étape précoce de la phase d'amplification car elle facilite la diapédèse des neutrophiles, lymphocytes et monocytes. Ces leucocytes vont migrer vers le siège de la lésion où ils éliminent les agents pathogènes et les débris cellulaires. La phase de résolution consiste en la réparation du tissu endommagé soit par

régénération des cellules endommagées soit par remplacement des cellules détruites par des cellules d'un autre type comme les cellules conjonctives responsables des cicatrices. Une réaction inflammatoire est un processus immunitaire généralement bénéfique, puisqu'elle permet d'éliminer un agent pathogène. En revanche, lorsqu'elle est non maîtrisée par l'organisme, elle aura des effets délétères pouvant être graves. En effet, l'inflammation peut s'étendre à d'autres parties de l'organisme, et être responsable de lésions locales ou généralisées et mener à un choc septique. Une réaction inflammatoire non maîtrisée peut également devenir chronique. La polyarthrite rhumatoïde, l'athérosclérose, la tuberculose ou l'IBD (Inflammatory Bowel Disease) qui regroupe la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse font partie des nombreuses pathologies présentant une inflammation chronique (Nathan, 2002). La réponse inflammatoire doit donc être une réponse rapide et organisée, proportionnée, afin d'éliminer tous corps étrangers et réparer les tissus lésés tout en assurant l'intégrité du reste de l'organisme.

Historiquement, le système immunitaire fut décrit comme la première ligne de défense de l'organisme, capable de reconnaître le « soi » du « non-soi » (Bretscher and Cohn, 1970; Janeway, 1992, 1993). Néanmoins, cette théorie obsolète n'expliquait pas pourquoi ce dernier est tolérant vis-à-vis des bactéries des flores commensales de notre organisme. En 1994, Polly Matzinger propose l'hypothèse selon laquelle le système immunitaire réagit aux signaux de danger de l'organisme, on observe une évolution du concept de « danger » vers le concept de « dommages » (Matzinger, 1994). L'immunité innée, impliquée dans la reconnaissance de dangers, est présente chez tout organisme pluricellulaire et constitue la base cellulaire et moléculaire de l'inflammation. Les cellules du système immunitaire inné (les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules NK, les polynucléaires dont les neutrophiles) possèdent des récepteurs à leurs surfaces; les PRRs (Pattern Recognition Receptors) pour lesquels des voies de signalisation leurs sont associées (Medzhitov and Janeway, 1997).

Ces PRRs reconnaissent des signaux exogènes, d'origine microbienne, les PAMPs (Pathogen-associated molecular pattern) ou des signaux endogènes, d'origines particulières ou chimiques reconnus par les DAMPs (Damage associated molecular patterns). Cette reconnaissance de motif permet à un nombre limité de PRR de reconnaître une grande diversité de pathogènes. Cette large capacité de reconnaissance est augmentée par la diversité des localisations de ces PRR. On distingue, quatre familles principales de récepteurs

au sein de la superfamille des PRR : les récepteurs aux lectines de type C (C-type lectin receptors ou CLR), les récepteurs de type RIG-I (retinoic acid-inductible gene I (RIG-I) like receptors ou RLR), les récepteurs de type Toll (Toll-like receptors ou TLR) et les récepteurs contenant un domaine de fixation des nucléotides et d'oligomérisation (NACHT Nucleotide-binding and oligomerization domain) et un domaine Riche en Résidu Leucine (LRR) (NLR). Auxquels on peut ajouter d'autres PRR comme cGAS ou AIM2. Les TLR et les CLR, sont des récepteurs transmembranaires et surveillent le milieu extracellulaire et les compartiments endosomaux, tandis que les RLR et les NLR scrutent la présence de motifs microbiens ou de signaux de danger intracellulaires (Schroder and Tschopp, 2010).

B. Activation de l'inflammation : les Pattern Recognition Receptor

1. Les CLR (C-type lectin receptors)

Les membres de la famille des CLR sont présents sur toutes les cellules immunitaires innées et possèdent un domaine conservé de reconnaissance des sucres entrant dans la composition des parois des champignons, virus et mycobactéries (Geijtenbeek and Gringhuis, 2009). La reconnaissance des ligands par les CLR entraîne l'internalisation du pathogène, sa dégradation puis la présentation des antigènes. Les CLR ont la capacité de déclencher une réponse antimicrobienne propre ou de concert avec d'autres PRR et notamment les TLR (tableau 4).

Tableau 4 Exemple de signalisation par les CLR

Action avec un autre PRR	CLR	Ligands	Récepteur partenaire	Réponse antimicrobienne	Références
Non	Dectin-1	β -glucane		IL-2, IL-10	(Rogers <i>et al.</i> , 2005)
	Dectin-2	α -mannose	FcR γ	TNF α , IL-1Ra	(Sato <i>et al.</i> , 2006)
	Mincle	α -mannose	FcR γ	TNF α , IL-10	(Yamasaki <i>et al.</i> , 2009)
Oui	Dectin-1	β -glucane	TLR2, TLR4	TNF α , IL-10	(Ferwerda <i>et al.</i> , 2008)
	DCIR	Mannotriose, glycoprotéines	TLR8	TNF α , IL-12	(Meyer-Wentrup <i>et al.</i> , 2009)

2. Les TLR (Toll-like receptors)

Tableau 5 Les TLR et leurs ligands
D'après (Takeuchi and Akira, 2010)

TLR	Localisation	Ligand	Origine du ligand
TLR1	Membrane plasmique	Triacyl lipoprotéine	Bactéries
TLR2	Membrane plasmique	Lipoprotéine	Bactéries, virus, parasites, « soi »
TLR3	Endolysosome	ARN double brin	Virus
TLR4	Membrane plasmique	Lipopolysaccharide	Bactéries, virus, « soi »
TLR5	Membrane plasmique	Flagelline	Bactéries
TLR6	Membrane plasmique	Diacyl lipoprotéine	Bactéries, virus
TLR7 (TLR8 humain)	Endolysosome	ARN simple brin	Virus, bactéries, « soi »
TLR9	Endolysosome	CpG	Virus, bactéries, protozoaires, « soi »
TLR10	Endolysosome	Inconnu	Inconnu
TLR11	Membrane plasmique	Molécule proche des profilines	Protozoaire

Le premier gène Toll a été identifié en 1988, comme codant une protéine transmembranaire impliquée dans la polarisation dorso-ventrale au cours du développement de la drosophile (Hashimoto *et al.*, 1988). En 1996, l'équipe de Jules Hoffmann, récipiendaire du prix Nobel de médecine 2011, montre que ce récepteur est également capable d'induire une puissante

réponse anti-fongique (Lemaitre *et al.*, 1996). Les TLR sont impliqués dans la détection des pathogènes extracellulaires et intracellulaires au sein des lysosomes et endosomes. Dix TLR ont été identifiés chez l'Homme et douze chez la souris, ils possèdent une homologie de structure composée d'une partie N-terminale répétée riche en leucine, un domaine transmembranaire et un domaine C-terminal cytoplasmique composée d'un domaine Toll/IL-1 récepteur (TIR). Chaque TLR va reconnaître des PAMP distincts issus de virus, bactéries, mycobactéries, champignons ou parasites illustrés en tableau 5. Après liaison avec leurs ligands respectifs, les TLR vont recruter différentes protéines adaptatrices contenant un domaine TIR et induire différentes voies de signalisation sous-jacentes. Cette signalisation va être à l'origine de la sécrétion de cytokines inflammatoires, d'interféron de type I, de chimiokines, ou de peptides antimicrobiens (Kawai and Akira, 2010). Ces signaux permettent le recrutement des neutrophiles, l'activation des macrophages, la maturation des cellules dendritiques et contribuent à l'induction de la réponse adaptative (Kawai and Akira, 2011).

3. Les RLR (RIG-I like receptors)

Les RLR sont des PRR cytosoliques impliqués dans la reconnaissance virale, cette famille est composée des récepteurs RIG-1, MDA5 (melanoma differentiation-associated gene 5) et LGP2 (Laboratory of genetics and physiology 2). Les récepteurs RIG-I et MDA5 possèdent en extrémité N-terminale deux domaines CARD (Domaine de recrutement des caspases), un domaine central DExD/H-box hélicase et un domaine C-terminal impliqué dans la reconnaissance des ARN, le récepteur LGP2 ne possède quant à lui pas de domaine CARD à son extrémité N terminale (Bruns and Horvath, 2014; Loo and Gale, 2011). Les différents ligands de ces RLR sont illustrés en tableau 6. L'activation des RLR entraîne l'activation des facteurs de transcription NFκB et IRF3 aboutissant à la synthèse d'interféron de type I et de cytokines pro-inflammatoires (Stone *et al.*, 2017).

Tableau 6 Localisation et ligands des RLR

RLR	Localisation	Ligands	Origine des ligands
RIG-I	Cytoplasme	Courts ARN double brin (db) 5'triphosphate ARN db	Virus à ARN Virus à ADN
MDA5	Cytoplasme	Long ARN db	Virus à ARN (<i>Picomaviridae</i>)
LGP2	cytoplasme	Inconnu	Virus à ARN

4. [Les NLR \(NACHT-LRR containing receptor\)](#)

L'étude du domaine N-terminal permet de distinguer quatre sous-groupes au sein des NLR :

- Les NLRA
- Les NLRB
- Les NLRP (NLR containing a PYD, anciennement Nalp)
- Les NLRC et Naips (NLR containing a CARD)

Ils possèdent un domaine central NACHT et pour la plupart un domaine LRR (domaine répété riche en résidus Leucine) en C-terminal.

Chez l'Homme, 22 NLR ont été identifiés et 34 chez la souris (Corridoni *et al.*, 2014; Martinon *et al.*, 2009). Les macrophages et plus généralement les cellules de la lignée myéloïde expriment la plus grande partie de ces NLR (Guarda *et al.*, 2011). Cette famille est constituée de récepteurs intracellulaires caractérisés par la présence d'un domaine NACHT (Nucleotide-binding oligomerisation domain) conservé (Inohara and Nuñez, 2001). L'organisation générale des NLR comprend une région C-terminale riche en Leucine (LRR) responsable de la reconnaissance de motifs microbiens conservés ; un domaine central NACHT nécessaire pour la fixation des nucléotides et l'auto-oligomérisation ; et un domaine N-terminal impliqué dans l'initiation de la signalisation et constitué de domaines d'interaction protéine-protéine tels que le domaine de recrutement des caspases (CARD), le domaine pyrine (PYD) et le domaine BIR (baculovirus inhibitor repeat) (Figure 10).

Tous les NLR ne répondent pas aux mêmes signaux d'activation. En effet, les protéines NLRP1 et NLRP3 ont toutes deux la capacité de détecter des signaux de danger, provenant de molécules ou de composants extérieurs qui alertent le système immunitaire, indépendamment d'une infection microbienne. Tandis que, les protéines Nlrc : NOD1 (Nlrc1) et NOD2 (Nlrc2), répondent aux produits de dégradation dans le cytoplasme du peptidoglycane bactérien (Keestra-Gounder and Tsois, 2017). Cette différence de reconnaissance provient de la région N-terminale des NLR, aussi nommée région effectrice, indispensable à la transduction du signal (Figure 10).

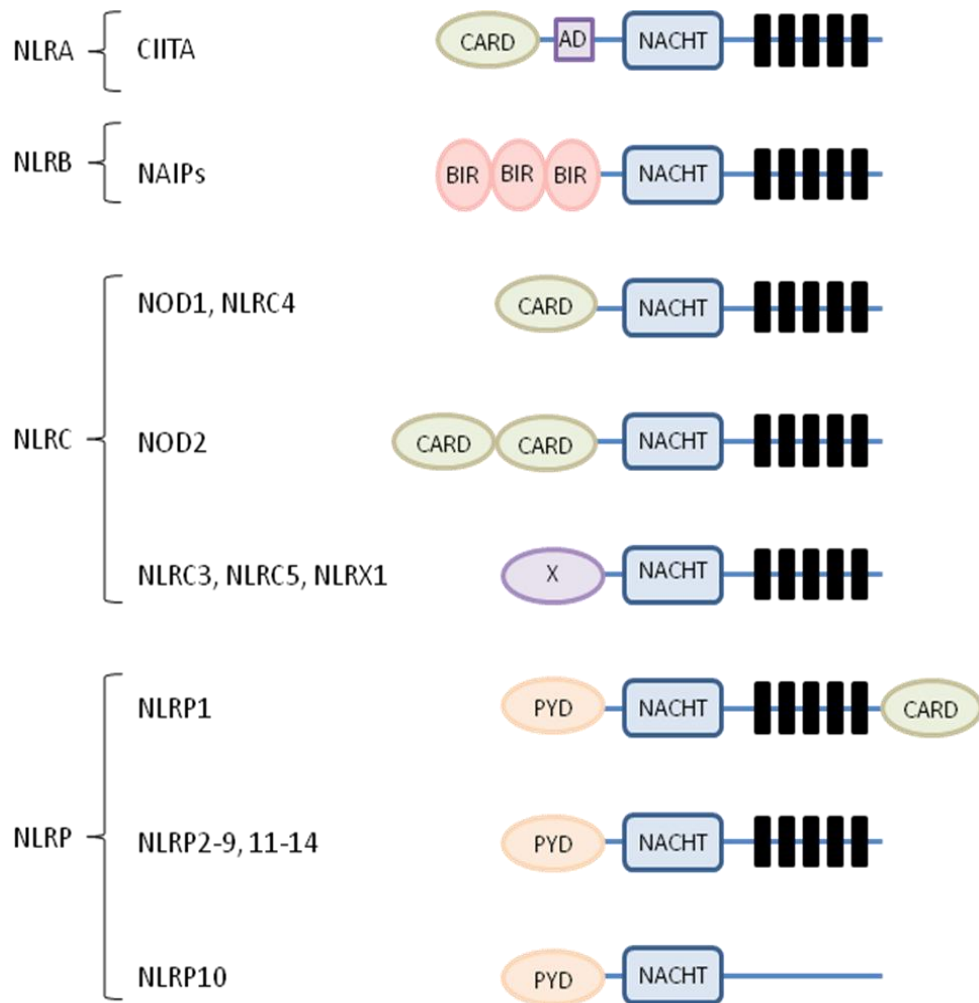


Figure 10 Structure des NLR humains

■■■■■, Extrémité C-terminale constituée d'un motif répété de résidus leucine impliqué dans la reconnaissance des motifs microbiens, NACHT, Domaine central conservé entre les différents NLR, PYD, CARD, BIR, extrémité N-terminale impliquée dans l'initiation des voies de signalisation

La découverte d'un macrocomplexe moléculaire comportant un PRR d'un type nouveau, activateur de caspase-1, a été désigné inflammasome (Martinon *et al.*, 2002).

C. Les inflammasomes

L'inflammasome est alors caractérisé comme un complexe multi-protéique qui entraîne le clivage auto-protéolytique et l'activation d'une caspase qui procède ensuite au clivage des

cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , IL-18 et IL-33 en réponse à différents signaux (Martinon *et al.*, 2002). En plus de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, l'activation de l'inflammasome peut entraîner une forme de mort cellulaire inflammatoire appelée pyroptose (Kayagaki *et al.*, 2015; Shi *et al.*, 2015).

Trois familles de récepteurs sont encore décrites à l'origine de l'activation de l'inflammasome: les NLR, les ALR (AIM2-like receptors) et les PYRIN. Ces récepteurs et la cascade inflammasome qui en résulte ont principalement été décrits dans les macrophages et les cellules dendritiques. Lors de mon projet de thèse, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à un inflammasome appartenant à la famille des NLR et plus précisément à la famille des NLRP : l'inflammasome NLRP3. La suite de mon propos se focalisera donc sur l'activation et la régulation de cet inflammasome.

Il a été montré que seuls cinq NLRP étaient capables de former un inflammasome fonctionnel et si l'activation de ces différents inflammasomes mène toujours à la production d'IL-1 β et d'IL-18, les circonstances et les types cellulaires dans lesquels se passe cette activation diffère.

1. Les récepteurs NLRP

Aujourd'hui, 14 NLRP sont référencés chez l'Homme. Il est possible de séparer les NLRP en deux sous-catégories, l'une contenant les NLRP4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 13 et 14, qui ne forment pas d'inflammasome ou dont l'inflammasome n'a pas encore été observé. L'autre sous-catégorie rassemble les NLRP1, 2, 3, 6, 12 capables de former un inflammasome fonctionnel. Les NLRP7, 8, 11 et 13 ne sont pas présents chez la souris ce qui rend leur étude plus complexe. Les NLRP ne formant pas d'inflammasome sont retrouvés dans les ovocytes, les embryons ou les testicules où ils jouent un rôle essentiel sur la fertilité ou le développement de l'embryon (Ponsuksili *et al.*, 2006; Tian *et al.*, 2009; Westerveld *et al.*, 2006). Certains NLRP ont également d'autres fonctions, comme NLRP4. NLRP4 est capable *via* son domaine NACHT de se lier à la Beclin1, une molécule importante dans la régulation de l'autophagie. Cette interaction inhibe l'induction de l'autophagie par Beclin1 (Jounai *et al.*, 2011). NLRP4 est également responsable de la régulation négative de la production d'interféron de type I grâce à son interaction avec l'ubiquitine ligase E3 DTX4 qui mène à la

dégradation de TBK1, molécule essentielle dans la voie de production des interférons de type I (Cui *et al.*, 2012). Aujourd'hui, parmi les NLRP formant des inflammasomes, c'est l'inflammasome NLRP3 qui est au centre de la majorité des études.

D. Inflammasome NLRP3

NLRP3 est présent dans les cellules myéloïdes, principalement les monocytes, les macrophages, les neutrophiles et les cellules dendritiques, les cellules épithéliales (Guarda *et al.*, 2011). NLRP3 est également retrouvé au niveau nucléaire dans les lymphocytes où, par coopération avec le facteur de transcription IRF4, il régule la différenciation Th2 (Bruchard *et al.*, 2015). Son implication a d'ores et déjà été démontrée dans le diabète, les allergies, les maladies inflammatoires chroniques, la goutte, l'athérosclérose, Alzheimer ou différents cancers. L'engouement pour l'étude de cet inflammasome est en majorité dû à la découverte de mutations dans le gène *CIAS* (codant pour la protéine NLRP3 ou cryopyrine). Ces mutations ont rapidement été associées à de nombreux désordres inflammatoires tels que les Syndromes Associés à la Cryopyrine (CAPS), cette découverte a redonné de nouvelles pistes pour la compréhension de la régulation de cet inflammasome (Hoffman *et al.*, 2001). Agostini *et al.*, rapportent en 2004 l'implication de la forme mutée de NLRP3 dans le syndrome de Muckle Wells (MW), une forme de CAPS. Des mutations sur le gène codant pour NLRP3 sont responsables d'une activation constitutive de cet inflammasome, et donc de sécrétion d'IL-1 β mature par les monocytes et les macrophages. En isolant des monocytes sanguins de patients sains ou atteints du syndrome MW, ils montrent que les monocytes mutés de patients produisent spontanément de l'IL-1 β à la différence des monocytes de patients sains pour lesquels une stimulation au LPS (lipopolysaccharide) est nécessaire (Agostini *et al.*, 2004). La surexpression des formes mutées de NLRP3 dans des THP1, montre que ces formes sont constitutivement actives et sont capables d'interagir avec ASC et d'entraîner l'activation de NF κ B et la sécrétion d'IL-1 β en absence de stimuli (Dowds *et al.*, 2004). Les souris exprimant les formes mutantes humaines de NLRP3 développent des signes cliniques semblables aux maladies humaines. Le statut inflammatoire est caractérisé non seulement par une augmentation de l'IL-1 β mais également par une infiltration de neutrophiles au niveau de la peau et un profil cytokinique de type Th17 (Brydges *et al.*, 2009; Meng *et al.*, 2009). L'activation constitutive de l'inflammasome NLRP3 représente donc une

cible thérapeutique intéressante pour le traitement de ces pathologies. Dans ce contexte le canakinumab, un anticorps monoclonal anti-IL1 β , est utilisé en clinique dans le but de limiter les effets pro-inflammatoires de l'IL-1 β en neutralisant son activité biologique. Ce traitement a démontré son efficacité chez des patients atteints d'autres formes de CAPS, qui regroupent l'urticaire familiale au froid, le syndrome de Muckle et Wells, et le syndrome CINCA/NOMID (syndrome chronique infantile neurologique cutané et articulaire néonatal) (Neven, 2008; Wulffraat and Woo, 2013).

1. Structure et activation de l'inflammasome NLRP3

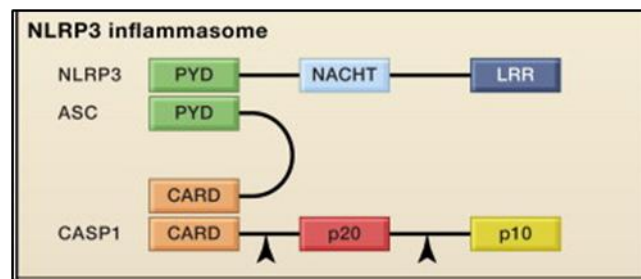


Figure 11 Structure simplifiée de l'inflammasome NLRP3
D'après (Schroder and Tschopp, 2010).

La formation de l'inflammasome NLRP3 consiste en la création d'une plateforme contenant le récepteur NLRP3, la protéase caspase-1 et nécessite également la protéine adaptatrice ASC (apoptosis associated speck-like protein containing a CARD) (figure 11). Nous avons vu précédemment (figure 10) que le récepteur NLRP3 est constitué de 3 domaines : PYD, NACHT et LRR. Le domaine PYD de NLRP3 recrute ASC, possédant également un domaine PYD et un domaine CARD impliqué dans le recrutement de la caspase-1. A la suite de la formation de ce complexe, la caspase-1 subit un clivage auto-protéolytique entraînant la libération des sous-unité p10 et p20, enzymatiquement actives (Broz *et al.*, 2010). Cette activité protéolytique de la caspase-1 n'est pas observée au cours de l'activation de l'inflammasome NLRP1b par la toxine létale de *Bacillus anthracis*. Néanmoins, la pro-forme non clivée caspase-1 est active (Guey *et al.*, 2014). Bien que la caspase-1 puisse exercer plusieurs fonctions dépendantes ou non de l'inflammasome, son rôle principal dans l'inflammasome est de cliver la pro-IL-1 β et la pro-IL-18 en IL-1 β et IL-18 matures lui valant son autre nom d'enzyme de conversion de l'IL-1 β . La formation de l'inflammasome NLRP3

est médiée par la formation de specks d'ASC, filaments qui forment une structure oligomérique d'environ 1 μm (Stutz *et al.*, 2013) qui génèrent une structure en forme d'étoile visible en microscopie électronique (Lu *et al.*, 2014). Ces filaments sont constitués des protéines ASC et pro-caspase-1 et sont impliqués dans l'attraction des domaines PYD de NLRP3 et ASC ainsi que des domaines CARD d'ASC et de la pro-caspase-1 formant ainsi l'inflammasome NLRP3.

2. Mécanismes d'activation de l'inflammasome NLRP3

a. Activateurs de l'inflammasome NLRP3

Le nombre de molécules identifiées capables d'activer NLRP3 a considérablement augmenté ces dernières années ; elles sont capables d'induire une ou plusieurs régulations physiologiques détectées par l'inflammasome aboutissant à son activation. Des signaux de danger exogènes, d'origines infectieuses ou environnementales, activent cet inflammasome. Plusieurs pathogènes comme *Staphylococcus aureus* (Muñoz-Planillo *et al.*, 2009a), *Listeria monocytogenes* (Kim *et al.*, 2010) et le virus *influenza A* (Allen *et al.*, 2009) activent l'inflammasome NLRP3. D'autres DAMP ont pour origine des sels et irritants de polluants environnementaux tels que l'amiante, la silice, l'Alum (hydroxyde d'aluminium, principal adjuvant des vaccins actuels) ou encore les nanoparticules (Dostert *et al.*, 2008a; Martinon *et al.*, 2006; Yazdi *et al.*, 2010). Les signaux de danger endogènes, activateurs de l'inflammasome NLRP3, peuvent être issus de la cellule elle-même, de la matrice extracellulaire, du plasma ou des tissus. Il peut s'agir de molécules modifiées, libérées dans le milieu extracellulaire lors des processus de mort. Les cellules nécrotiques vont activer la réponse immunitaire adaptative *via* un relargage de cristaux de monosodium urate (Shi *et al.*, 2003). Martinon *et al.*, ont montré que ces cristaux entraînent l'activation de l'inflammasome NLRP3 et de la caspase-1 (Martinon *et al.*, 2006). La nécrose permet également la libération d'autres molécules comme l'ATP (Mariathasan *et al.*, 2006), les ions potassium (K^+), et le HMGB1 (Lotze and Tracey, 2005). D'autres molécules présentes en quantité importante chez les individus en situation pathologique sont également identifiées comme activateurs de l'inflammasome NLRP3 telles que le calcium pyrophosphate déhydrate (CPPD), impliqué dans la goutte (Martinon *et al.*, 2006), le glucose (Feng *et al.*, 2016), ou encore les plaques amyloïdes, impliquées dans les maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer (Masters *et al.*, 2010).

L'activation de l'inflammasome NLRP3 nécessite deux signaux. Le premier signal appelé le «priming» puis un deuxième signal constitué de signaux de stress cellulaire induit par les différents activateurs.

b. Signal 1 : le « priming »

i. *Priming transcriptionnel*

L'amplification de la réponse NLRP3 peut nécessiter l'augmentation de l'expression du gène et de la traduction de son ARNm. Les composés microbiens ou des molécules endogènes comme le facteur de nécrose tumorale (TNF) ou l'IL-1 β permettent cette augmentation grâce à l'activation du facteur de transcription NF κ B (Bauernfeind *et al.*, 2009; Franchi *et al.*, 2009). Le contrôle du priming transcriptionnel de NLRP3 dépend de différents PRR dont les TLR, NOD2 ou RAGE, les récepteurs des protéines du complément C3a et C5a peuvent également être impliqués dans ce priming (Alexiou *et al.*, 2010; Fritz *et al.*, 2006; Laudisi *et al.*, 2013; Mitchell *et al.*, 2007). L'activation de ces récepteurs va entraîner, par différents mécanismes, l'augmentation de l'expression des messagers de NLRP3 et de la pro-IL-1 β .

ii. *Priming non-transcriptionnel*

Le priming non-transcriptionnel a été mis en avant par des travaux montrant qu'un priming de courte durée (10 minutes), insuffisant pour induire une régulation transcriptionnelle de NLRP3, pouvait induire une activation de l'inflammasome NLRP3 (Juliana *et al.*, 2012; Schroder *et al.*, 2012). Ainsi, le priming de NLRP3 est également indépendant de la synthèse de nouvelles protéines et peut reposer sur des modifications post-traductionnelles contrôlant la teneur et l'activation de NLRP3. L'activation des récepteurs TLR2/TLR4 et TLR4/TLR3 entraîne, respectivement, l'activation des voies de signalisation Myd88/IRAK1/4 (les kinases 1 et 4 associées au récepteur à l'IL-1) et TRIF/IRAK1/FADD/caspase-8/RIP1, permettant par l'intermédiaire des ROS mitochondriaux, le priming de NLRP3 (Gros Lambert and Py, 2018a). A l'état basal, NLRP3 semble être constitutivement ubiquitiné, pour permettre son activation par ses agonistes, NLRP3 doit être déubiquitiné, cette déubiquitination est permise par l'action des ROS induits suite à l'activation des TLR (Juliana *et al.*, 2012). Plusieurs études ont montré que le taux de NLRP3 peut être régulé par différentes E3 ubiquitine ligase et déubiquitinase pendant cette phase de priming (Humphries *et al.*, 2018; Juliana *et al.*, 2012; Lopez-Castejon *et al.*, 2012). L'ubiquitination de NLRP3 sur son résidu K691 chez l'Homme ou K689 chez la souris par la E3 ubiquitine ligase skp1-cullin-F box L2 (SCF^{FBXL2}) dirige NLRP3 vers la dégradation protéasomale, diminuant

ainsi sa disponibilité et donc l'activité de l'inflammasome NLRP3 (Han *et al.*, 2015). L'inhibition de NLRP3 par ubiquitination peut également être impliquée dans le rétro-contrôle de l'inflammasome. Sous l'action du LPS, l'E3 ubiquitine ligase Trim31 ubiquitine NLRP3 pour l'envoyer vers la dégradation par le protéasome (Song *et al.*, 2016). Au contraire, une étude récente montre que l'E3 ubiquitine ligase Pellino 2 transfère une étiquette ubiquitine sur NLRP3 après une stimulation au LPS dans des macrophages dérivés de moelle osseuse en culture (BMDM) et que les BMDM issues de souris déficientes pour Pellino2 sécrètent moins d'IL-1 β après stimulation, indépendamment d'une régulation transcriptionnelle de cette cytokine (Humphries *et al.*, 2018). Cette fois-ci l'ubiquitination de NLRP3 tend à induire son activation, la régulation par ubiquitination de NLRP3 est donc fortement régulée et est spécifique des E3 ligases et des résidus cibles. De plus, le priming de NLRP3 dépend également de sa modification par phosphorylation. Il a été montré que la phosphorylation du résidu Sérine 194 chez la souris par la kinase c-Jun terminale 1 (JNK1) est nécessaire au priming et à l'oligomérisation de NLRP3, permettant de constituer l'inflammasome NLRP3 (Song *et al.*, 2017b).

c. Signal 2 : l'activation

Suite à l'étape de priming, l'inflammasome NLRP3 devient alors compétent pour être activé par les différents stimuli. Aucun consensus d'activation n'est établi pour chacun des activateurs. Ce sont en fait les cascades d'évènements cellulaires induites par ces activateurs qui vont être à l'origine de l'activation de l'inflammasome. On dénombre actuellement quatre mécanismes d'activation pour l'inflammasome NLRP3. Le premier est l'efflux de K⁺ qui est relié à tous les activateurs, ou presque, de l'inflammasome NLRP3. Le second est l'endommagement des mitochondries à l'origine de la libération de ROS et d'ADN mitochondriaux dans le cytosol ainsi que d'une perte de potentiel membranaire mitochondrial, le troisième est consécutif à l'endommagement ou la rupture de la membrane des phagolysosomes (déstabilisation lysosomale) qui fait suite à l'internalisation de cristaux et enfin le dernier est dépendant de la signalisation calcique (figure 12).

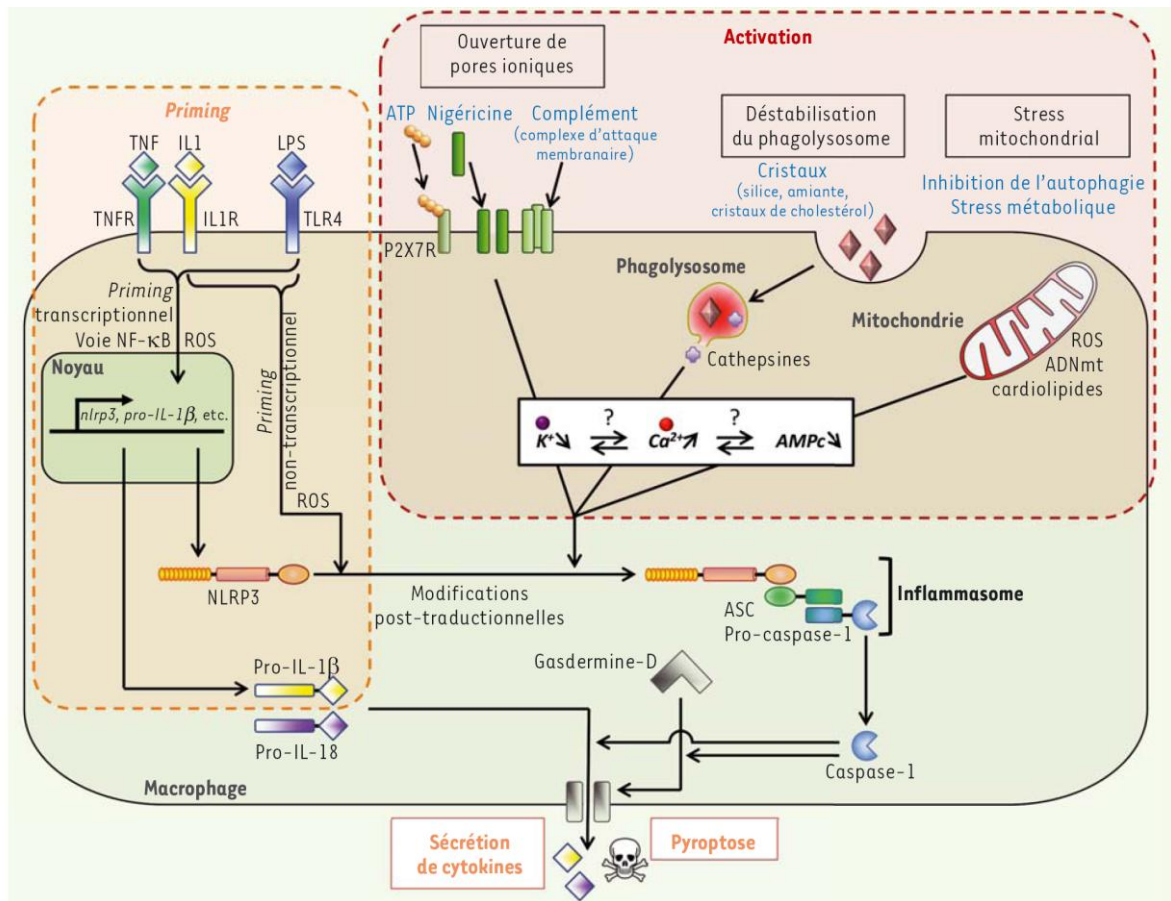


Figure 12 Mécanismes d'activation de l'inflammasome NLRP3
 D'après (Gros Lambert and Py, 2018b)

i. Efflux de K+

Le premier fait relatif à l'implication du potassium dans la sécrétion d'IL-1 β date de 1994. Cette étude montre que la nigéricine, un ionophore de potassium, entraîne la maturation de l'IL-1 β dans des macrophages de souris traitées par le LPS (Perregaux and Gabel, 1994). Plusieurs études ont ensuite décrypté l'implication des ions K⁺ dans l'activation de NLRP3. Ces études ont montré qu'une forte concentration en K⁺ inhibait l'activation des inflammasomes NLRP3 et NLRP1 sans action sur les inflammasomes NLRC4 ou AIM2 (Franchi *et al.*, 2007; Pétrilli *et al.*, 2007). Le potassium régule plus particulièrement l'assemblage des composants de l'inflammasome. En effet, l'étude *in vitro* de l'assemblage de l'inflammasome à partir d'un lysat de macrophages montre que seul en présence d'un tampon de concentration faible en K⁺ la protéine adaptatrice ASC est recrutée et l'IL-1 β clivée en sa forme mature (Pétrilli *et al.*, 2007). L'efflux de potassium est induit par la grande majorité des activateurs de l'inflammasome NLRP3 (Muñoz-Planillo *et al.*, 2013). Lors de la mort des cellules par apoptose, l'ATP va être libéré dans le compartiment extra-cellulaire, il va alors se

lier à son récepteur à la surface des autres cellules, le récepteur purinergique P2X₇ (Cruz *et al.*, 2007; Mariathasan *et al.*, 2006). L'activation de P2X₇ par l'ATP provoque un efflux rapide de K⁺ ainsi que le recrutement et la formation de pores par la pannexine-1 (Ferrari *et al.*, 2006). Les pannexines peuvent former des canaux, appelés pannexons, nécessaires à la libération d'ATP ; ce système est observé dans plusieurs types cellulaires (Pelegrin and Surprenant, 2006). Kanneganti *et al.* propose un modèle d'activation de l'inflammasome NLRP3 consécutive à la formation de pores par la pannexine-1 qui permettrait à des activateurs extracellulaires, en particulier des PAMPs, d'entrer dans le cytoplasme et de l'activer (Kanneganti *et al.*, 2007). Néanmoins, l'implication de la pannexine-1 dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 n'a pas été confirmée par les souris déficientes en pannexine-1 (Qu *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013). Par ailleurs, il a été démontré que certaines toxines bactériennes sont capables de former des pores, comme l'hémolysine α de *S. aureus*, conduisant à un efflux de K⁺, indépendamment de P2X₇, et à l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Muñoz-Planillo *et al.*, 2009). En 2012, une étude propose un mécanisme commun à tous les activateurs de NLRP3 et pour lequel l'efflux de K⁺ est une étape nécessaire mais non suffisante pour l'activation de l'inflammasome (Compan *et al.*, 2012). Les activateurs connus de NLRP3 peuvent induire un changement de volume des cellules (turgescence ou plasmolyse). La variation du volume cellulaire est proposée comme signal de danger pouvant être détecté par l'inflammasome. Lors du gonflement cellulaire en condition hypotonique, le potassium sort des cellules *via* des canaux potassiques ce qui entraînerait un changement conformationnel des récepteurs NLRP3 et favoriserait leur activation. De plus, l'efflux de potassium permet la liaison entre le domaine LRR de NLRP3 et le domaine catalytique de la kinase nek7. Cette interaction est nécessaire à l'activation de NLRP3, et est induite par nombreux stimuli tels que l'ATP, la nigéricine, les cristaux MSU et l'alum. Il est important de noter que cette activation de NLRP3 par nek7 est indépendante de son activité kinase (He *et al.*, 2016; Schmid-Burgk *et al.*, 2016; Shi *et al.*, 2016).

ii. Le modèle des mitochondries endommagées, ROS et ADN mitochondriaux

La production de ROS reste l'une des réponses à une infection ou une blessure les plus conservées au cours de l'évolution. Les agonistes de NLRP3 entraînent la production de ROS (Cruz *et al.*, 2007) et induisent l'activation de l'inflammasome NLRP3. L'utilisation d'inhibiteurs des ROS, ROS scavengers, inhibe l'activation de cet inflammasome (Cassel *et al.*, 2008; Cruz *et al.*, 2007; Dostert *et al.*, 2008a; Gross *et al.*, 2009; Pétrilli *et al.*, 2007).

L'augmentation des ROS dans le cytoplasme inactive la Thiorédoxine (TRX) ce qui permet à la protéine interagissant avec le TRX (TXNIP) de se fixer directement sur le récepteur NLRP3 pour activer l'inflammasome (Tschopp and Schroder, 2010). La TXNIP, une protéine liée à la résistance à l'insuline, relie l'activation de l'inflammasome NLRP3 au diabète de type 2 (Zhou *et al.*, 2011). Initialement, la production de ROS intracellulaire par la NADPH oxydase, liée aux phagosomes et activée lors de l'internalisation de particules, a été proposée comme signal d'activation de l'inflammasome NLRP3 (Dostert *et al.*, 2008a). Cependant, il a été montré plus tard que les macrophages murins et humains déficients pour cet enzyme ont une activation normale de l'inflammasome NLRP3 (van Bruggen *et al.*, 2010). Les ROS mitochondriaux ont été mis en cause dans l'activation de l'inflammasome grâce à une étude montrant la colocalisation des inflammasomes NLRP3 avec les mitochondries dans l'espace périnucléaire lors de l'activation de l'inflammasome (Zhou *et al.*, 2011). Les inducteurs de l'inflammasome NLRP3 vont entraîner une relocalisation des mitochondries au niveau de l'espace péri-nucléaire, ainsi les protéines ASC, présentes au niveau de la mitochondrie, vont se retrouver à proximité des protéines NLRP3, présentes au niveau du réticulum endoplasmique. La migration des mitochondries est un processus dépendant des micro-tubules. Les activateurs de NLRP3 vont endommager les mitochondries, entraînant alors une déplétion en NAD^+ , induisant l'acétylation de l' α -tubuline favorisant ainsi leur polymérisation. L'utilisation d'un inhibiteur de la polymérisation des micro-tubules, la colchicine, inhibe l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Misawa *et al.*, 2013). Les mitochondries endommagées peuvent également libérer de l'ADN mitochondrial (ADNmt) oxydé suite à la perte de leur potentiel de membrane ce qui provoque une activation directe de l'inflammasome NLRP3 lors de l'apoptose (Shimada *et al.*, 2012). L'activation de l'inflammasome NLRP3 par l'ADNmt est un élément dépendant du priming. En effet la libération d'ADNmt requière sa réplication préalable induite par le LPS *via* l'activité du facteur de transcription IRF1 et de la Cytidine/Uridine Monophosphate Kinase 2 (CMPK2), impliquée dans la fourniture en nucléotides pour la réplication de l'ADNmt (Zhong *et al.*, 2018). L'autophagie, en permettant le renouvellement des organelles du cytoplasme dont les mitochondries, module également l'activité de l'inflammasome NLRP3. L'inhibition de l'autophagie augmente le nombre de mitochondries défectueuses et s'accompagne d'une accumulation de ROS et d'ADNmt oxydés dans le cytoplasme ce qui est corrélé avec une activation de l'inflammasome NLRP3 (Nakahira *et al.*, 2010). Il a aussi été montré que

l'autophagie permet d'éliminer les inflammasomes ubiquitinés (Shi *et al.*, 2012) et la pro-IL-1 β dans les cellules activées (Harris *et al.*, 2011).

iii. Le modèle de la déstabilisation lysosomale

Des particules comme l'amiante, la silice ainsi que l'amyloïde- β activent l'inflammasome NLRP3 après endocytose et dommages à la membrane lysosomale par un relargage dans le cytoplasme de la cathepsine B, une protéase à Cystéine de la famille des papaïnes (Chu *et al.*, 2009). Plusieurs études ont également montré que le CA-O74-Me, un inhibiteur pharmacologique de la cathepsine B, inhibe l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Dostert *et al.*, 2009; Halle *et al.*, 2008; Hornung *et al.*, 2008; Sharp *et al.*, 2009). Dans un modèle de MDSC, traitées avec une chimiothérapie (5-FU et Gemcitabine), l'activation de NLRP3 est effectuée par la fixation de la cathepsine B au niveau du domaine LRR de NLRP3 (Bruchard *et al.*, 2013).

iv. La signalisation calcique

Une étude montre que plusieurs activateurs de l'inflammasome NLRP3, dont l'ATP, la nigéricine et les cristaux d'acide urique, nécessitent une signalisation par le calcium (Murakami *et al.*, 2012). Le calcium est fourni par le milieu extracellulaire *via* les canaux d'entrée au calcium et est aussi libéré par le récepteur à l'inositol triphosphate (IP₃R) du réticulum endoplasmique. Il est suggéré que l'efflux de K⁺ et la rupture de lysosomes induisent, comme étape intermédiaire, un influx de Ca²⁺ dans le cytosol qui serait essentiel pour endommager les mitochondries et par la suite activer l'inflammasome NLRP3 (Murakami *et al.*, 2012). De plus, les canaux TRP (Transient Receptor Potential) modulent la concentration en Ca²⁺ intracellulaire lors de la régulation du volume cellulaire et ce changement de concentration est indispensable pour l'activation de TAK1 (Transforming Growth Factor (TGF) - β -Activated Kinase 1) (Fukuno *et al.*, 2011), kinase essentielle à la voie NF κ B dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Gong *et al.*, 2010).

d. Modifications post-traductionnelles de NLRP3

Nous avons vu précédemment qu'au cours de la phase de priming, NLRP3 peut subir différentes modifications post-traductionnelles le rendant alors compétent pour son activation. D'autres modifications post-traductionnelles de ce récepteur vont également être essentielles à l'activation de l'inflammasome NLRP3, indépendamment du priming. Une étude a montré que l'assemblage de l'inflammasome NLRP3 nécessite la déubiquitination de

NLRP3 sur son domaine LRR par la déubiquitineuse spécifique du résidu Lysine 63, BRCC3 (BRCA1/BRCA2-containing complex subunit 3) en aval d'une stimulation par les différents activateurs connus de NLRP3 (Py *et al.*, 2013a). Cette déubiquitination n'est pas dépendante des ROS et donc diffère des mécanismes présentés lors de la phase de priming (Juliana *et al.*, 2012). L'inhibition de BRCC3 augmente l'ubiquitination de NLRP3 et inhibe la formation de l'inflammasome sans pour autant augmenter sa dégradation par le protéasome (Py *et al.*, 2013). De la même manière, l'E3 ubiquitine ligase ARIH2 (Ariadne homolog 2) entraîne l'ubiquitination, des résidus Lysine 63 et 48, de NLRP3 inhibant alors l'activité de l'inflammasome sans réguler les teneurs en NLRP3 (Kawashima *et al.*, 2017). La régulation de NLRP3 peut également être dépendante d'ubiquitinations dégradatives. L'E3 ubiquitine ligase MARCH7 (membrane-associated ring-CH-type finger 7), sous l'effet d'une augmentation d'AMPc intracellulaire, entraîne l'ajout d'une chaîne d'ubiquitine par les résidus Lysine 48, dirigeant NLRP3 vers un processus de dégradation médié par l'autophagie (Yan *et al.*, 2015). L'activation ou l'inhibition de NLRP3 peut également être sous le contrôle de kinases et de phosphatases. Par exemple la phosphorylation du résidu Sérine 295 (S291 chez la souris) par la protéine kinase A (PKA) inhibe l'activation de NLRP3 (Guo *et al.*, 2016) tout comme la déphosphorylation du résidu Tyrosine 861 par la phosphatase PTPN22 (Spalinger *et al.*, 2017). Les modifications post-traductionnelles citées ne sont pas exhaustives, de nombreuses autres modifications régulant l'activation de NLRP3 ont été découvertes (Gros Lambert and Py, 2018a). Les mécanismes de priming ou d'activation par modifications post-traductionnelles de NLRP3 sont illustrés en figure 13.

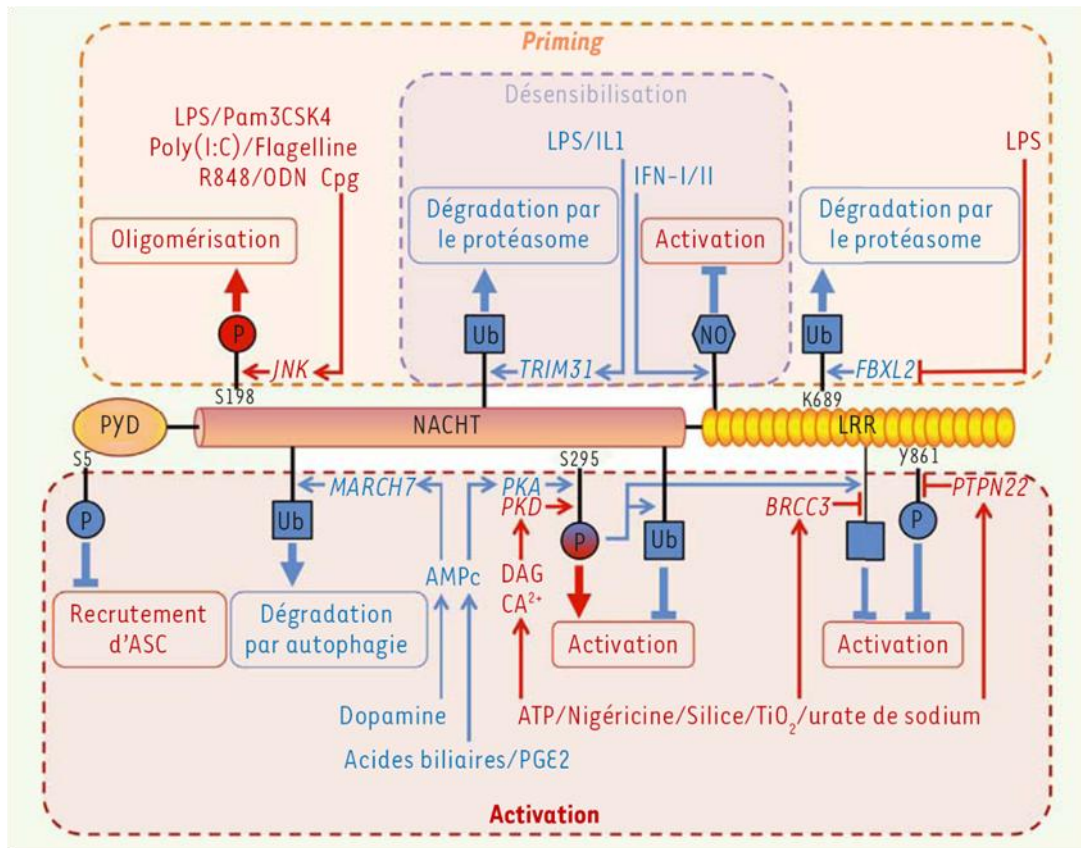


Figure 13 Modifications post-traductionnelles de NLRP3
 D'après (Gros Lambert and Py, 2018b)

e. Activation non canonique

La voie d'activation non canonique est dépendante des caspase-11, chez la souris, et caspase-4 et caspase-5 chez l'Homme. Les molécules de LPS dérivant de bactéries gram négatives peuvent directement se lier à la caspase 11/4/5 et initier l'oligomérisation de la caspase-11 et son activation. Une fois active, la caspase-11 clive la gasdermine D qui s'incorpore à la membrane plasmique pour y former des pores. La formation de ces pores entraînent alors un choc osmotique, puis une rupture de la membrane plasmique menant la cellule à la pyroptose. Le déclenchement de la pyroptose par la caspase-11 permet l'activation de l'inflammasme NLRP3 et donc de la caspase-1 qui elle est en mesure de cliver l'IL-1 β et l'IL-18 (Kayagaki *et al.*, 2011, 2015; Schmid-Burgk *et al.*, 2015).

3. Conséquences de l'activation de l'inflammasome NLRP3

a. La pyroptose

L'origine du mot pyroptose vient du grec « pyro » qui signifie « feu » permettant de décrire une mort cellulaire programmée pro-inflammatoire (Cookson and Brennan, 2001). La

pyroptose est un processus de mort programmée déclenchée par la caspase-1, elle est surtout retrouvée dans certains types cellulaires (dont les macrophages, les cellules dendritiques ou les neurones) mais également dans les cellules cancéreuses (Rébé *et al.*, 2015). La pyroptose est observée en réponse à de nombreux stimuli, comme les PAMPS ou les DAMPS, et est la conséquence d'une activation de l'inflammasome (Shi *et al.*, 2015). Il s'agit d'une mort cellulaire rapide, caractérisée par une rupture de la membrane plasmique et par la libération consécutive de substances pro-inflammatoires. Suite à l'activation de l'inflammasome NLRP3, la caspase-1 active et clive la gasdermine D en deux fragments, un fragment en N-terminal appelé pore-forming domain (PFD) et l'autre en C-terminal désigné repressor domain (RD) (Fink and Cookson, 2006; Kovacs and Miao, 2017). Le fragment PFD pourra former des trous dans les membranes, aboutissant à une augmentation de la pression osmotique, un afflux d'eau à l'intérieur de la cellule et un gonflement cellulaire. Ces étapes aboutissent à la lyse osmotique de la cellule et au relargage des composants inflammatoires vers le compartiment extra-cellulaire dont l'IL-1 β , l'IL-18 ou le HMGB1 (Miao *et al.*, 2011).

b. [La maturation de cytokines pro-inflammatoires](#)

L'activation par clivage de la caspase-1, suite à la formation de l'inflammasome NLRP3 déclenche la production des formes matures de l'IL-1 β , de l'IL-18 et de l'IL-33 à partir de leurs précurseurs respectifs. Ces cytokines vont ensuite être sécrétées dans le milieu extra-cellulaire.

i. *Maturation et sécrétion de l'IL-1 β*

L'IL-1 β est exprimée dans les cellules sous la forme d'un précurseur de 31 kDa, la pro-IL-1 β . Cette pro-IL-1 β est dépourvue d'activité biologique du fait de son incapacité à se lier au récepteur à l'IL-1 (IL-1R) et a donc besoin d'être clivée en sa forme mature bioactive de 17 kDa (Mosley *et al.*, 1987). Ce clivage est permis principalement par la caspase-1 (Kostura *et al.*, 1989). La caspase-1 clive la pro-IL-1 β à deux endroits distincts (figure 14) générant un fragment mineur de 26 kDa, dont la fonction est inconnue à l'heure actuelle, et une forme mature de 17 kDa. D'autres protéases clivent également la pro-IL-1 β , telles que, la neutrophile elastase (NE), la protéinase-3 (PR-3), la cathepsine G, la chymase ou la caspase-8, générant des fragments actifs de l'IL-1 β mais de plus faible activité que la forme à 17 kDa (figure 14) (Afonina *et al.*, 2015).

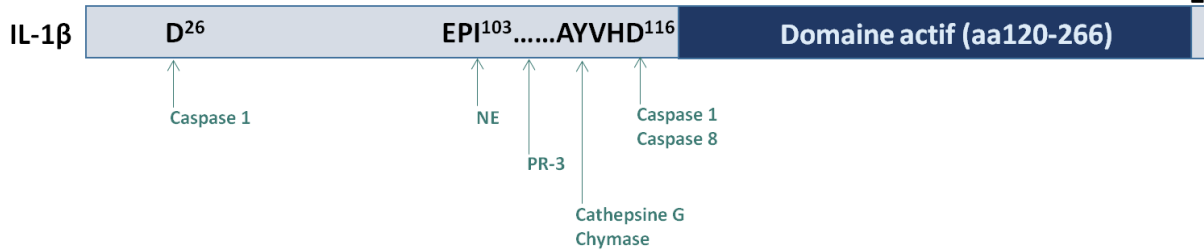


Figure 14 Clivages de la pro-IL-1 β
D'après (Afonina et al., 2015)

Les mécanismes de sécrétion de l'IL-1 β sont encore mal connus, cette sécrétion ne suit pas la voie de sécrétion conventionnelle empruntée par les autres cytokines. L'IL-1 β ne possède pas de séquence signal lui permettant de prendre la voie du système de sécrétion RE-Golgi et sa sécrétion n'est pas diminuée par les inhibiteurs de ce système de sécrétion conventionnelle (Piccioli and Rubartelli, 2013; Rubartelli *et al.*, 1990). Plusieurs mécanismes ont d'ores et déjà été proposés (figure 15). Tout d'abord, il a été montré que la lyse des cellules suite à l'induction de la pyroptose était associée à la sécrétion d'IL-1 β suggérant un mécanisme de sécrétion passif de cette cytokine (Brough and Rothwell, 2007; Cullen *et al.*, 2015). Néanmoins, la lyse osmotique peut être inhibée par l'utilisation d'osmoprotectant comme la glycine. Cette inhibition ne prévient pas toujours la sécrétion d'IL-1 β montrant que cette sécrétion peut se réaliser indépendamment de la rupture de la membrane plasmique (Fink and Cookson, 2006). D'autre part, des études ont également montré que les cellules vivantes ont également la capacité de sécréter l'IL-1 β (Conos *et al.*, 2016; Diamond *et al.*, 2017; Zanoni *et al.*, 2016). En effet, nous avons vu précédemment que la gasdermine D est également un substrat pour la caspase-1, et que sa coupure permet la migration des fragments clivés, N-terminaux, à la membrane plasmique et la formation de pores au sein de celle-ci. Ces pores vont permettre la libération de la forme mature de l'IL-1 β (Evavold *et al.*, 2018). Une étude récente a montré que la sécrétion de l'IL-1 β dépendante de la gasdermine D est un mécanisme de sécrétion rapide de l'IL-1 β et que le traitement par le LPS de neutrophiles issus de souris déficientes en gasdermine D permet également le relargage d'IL-1 β , mais de manière plus tardive que les neutrophiles issus de souris sauvages. Les auteurs montrent alors un mécanisme de sécrétion indépendant de la gasdermine D et précisent que ce mécanisme de sécrétion lente se fait grâce aux domaines membranaires riches en phosphatidyl-inositol diphosphate (Monteleone *et al.*, 2018). La sécrétion de l'IL-1 β

est également sous contrôle de la caspase-11 indépendamment d'une régulation de la caspase-1. En effet, sous l'action du LPS, la caspase-11 est activée et clive le canal cationique récepteur de potentiel 1 (TRPC1). L'absence de TRPC1, dans des souris déficientes pour ce canal, entraîne une sécrétion plus importante d'IL-1 β dans un modèle d'inflammation septique (Py *et al.*, 2014). La sécrétion d'IL-1 β dépend également de mécanismes vésiculaires comme la sécrétion par les lysosomes, la formation de corps multivésiculaires et d'exosomes, le relargage de micro-vésicule. En effet, les protéines pro-caspase-1 et pro-IL-1 β peuvent se retrouver internaliser dans des lysosomes sécrétoires, où la caspase-1 va s'activer et cliver l'IL-1 β qui sera sécrétée par exocytose. Ces deux précurseurs vont pouvoir être également englobés dans des vésicules qui vont être soit excrétées directement ou relarguées sous forme d'exosomes et permettre le relargage de l'IL-1 β mature après lyse des vésicules ou des exosomes (Monteleone *et al.*, 2015). La sécrétion de l'IL-1 β peut également être sous le contrôle de l'autophagie, Iula *et al.*, montrent dans des neutrophiles humains, une colocalisation entre IL-1 β et LC3 et que le traitement par le 3-Méthyladenine ou la wortmaninn inhibe la sécrétion de l'IL-1 β induite par le LPS (Iula *et al.*, 2018).

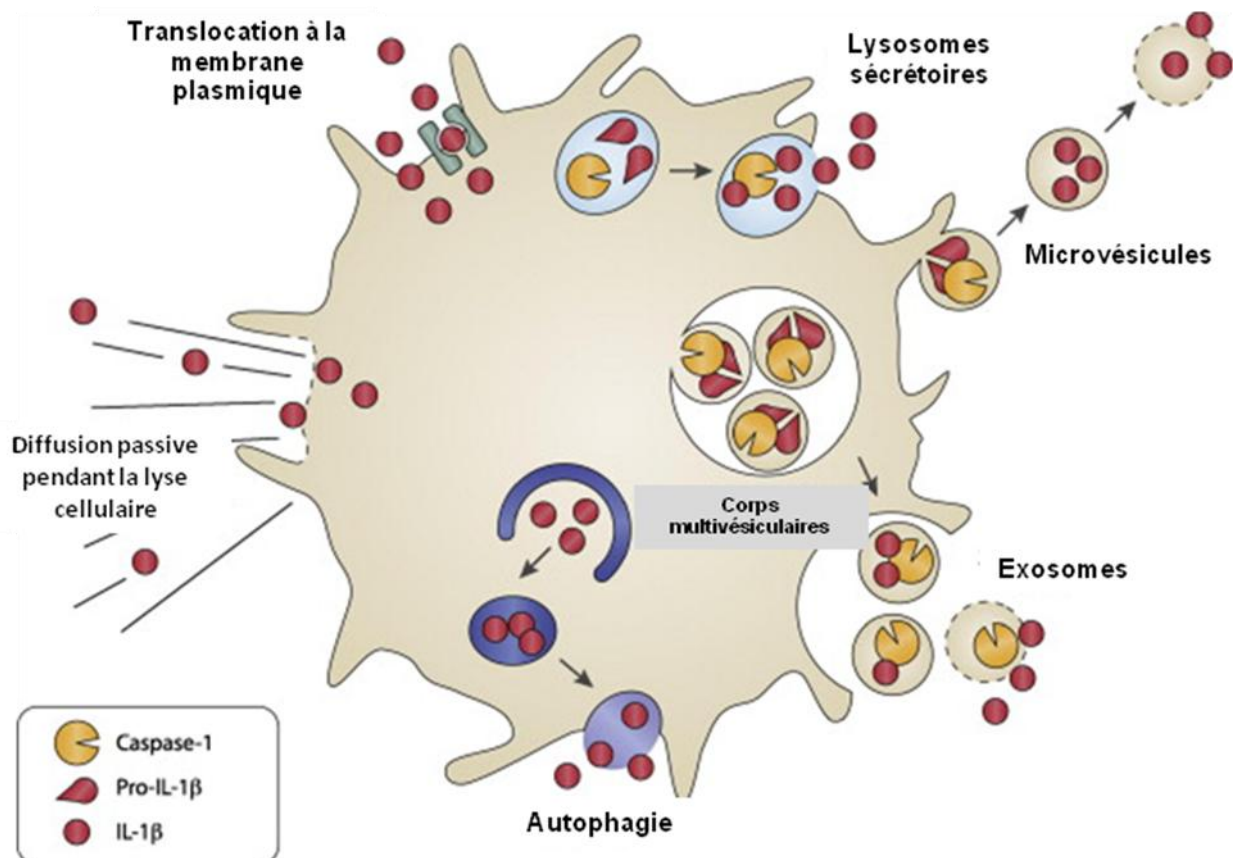


Figure 15 Voies de sécrétion de l'IL-1 β
D'après (Monteleone *et al.*, 2015)

ii. Maturation et sécrétion de l'IL-18

L'IL-18 est exprimée de manière constitutive dans la plupart des cellules sous la forme d'un précurseur de 24 kDa. La maturation de l'IL-18 est sous le contrôle de la caspase-1, qui clive la pro-IL-18 après le résidu Asp36 pour générer la forme bioactive de 17,2 kDa (Ghayur *et al.*, 1997; Gu *et al.*, 1997). La sécrétion et les fonctions de l'IL-18 sont également dépendantes de l'activité de la caspase-1 (Cordoba-Rodriguez *et al.*, 2004; Perregaux *et al.*, 2000). Peu d'études ont été effectuées sur les mécanismes de sécrétion de l'IL-18, l'hypothèse générale voudrait que l'IL-18, qui ne possède pas non plus de séquence leader pour le RE, soit sécrétée selon les mêmes mécanismes non-conventionnels que l'IL-1 β (Afonina *et al.*, 2015). L'IL-18 sécrétée favorise une réponse immunitaire de type 1 en induisant la prolifération et la production d'IFN γ par les lymphocytes Th1 et l'activation des cellules NK (Afonina *et al.*, 2015).

iii. Clivage et sécrétion de l'IL-33

L'IL-33 est exprimée de manière constitutive sous forme active. L'IL-33 possède à son extrémité N-terminale un domaine de liaison à la chromatine et à son extrémité C-terminale un domaine de liaison pour son récepteur ST2. L'IL-33, à l'instar de l'IL-1 β et de l'IL-18, ne possède pas de séquence de sécrétion et est donc sécrétée par des mécanismes de sécrétion non-conventionnels ou suite à des dommages cellulaires ou le déclenchement d'une mort cellulaire programmée. Le clivage de cette cytokine par la caspase-1, entraîne à la différence des cytokines précédentes, son inactivation (Lefrançais and Cayrol, 2012). L'IL-33 est associée à une réponse de type 2 en favorisant la sécrétion de cytokines associées aux Th2 (IL-4, IL-5 et IL-13) et permet aussi l'activation des cellules lymphoïdes innées de type 2 (iLC2) (Molofsky *et al.*, 2013).

C. Inflammasome NLRP3 et cancer

Au niveau intra-tumoral, les cellules stressées par l'hypoxie ou la diminution d'un apport en nutriments induisent une augmentation de la production de ROS. Comme développé précédemment, ces ROS activent certains inflammasomes dont NLRP3, qui conduit à la sécrétion des cytokines IL-1 β et IL-18. Cet environnement inflammatoire provoque des dommages à l'ADN, cassures et mutations ponctuelles. Ces dommages modifient les proto-oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeurs ou les gènes contrôlant le cycle cellulaire et

l'apoptose. L'ensemble de ces mutations participe à la mise en place de la carcinogénèse (Naik and Dixit, 2011). Aujourd'hui, plusieurs études démontrent que l'inflammasome NLRP3 est impliqué dans le cancer, et notamment le cancer colorectal, mais son rôle dans la progression tumorale reste encore ambigu. En effet, certaines études tendent à démontrer que NLRP3 joue un rôle pro-tumoral. NLRP3 induit la transition épithélio-mésenchymateuse dans les lignées humaines de cancer colique. Cependant cette régulation semble indépendante de l'activation de l'inflammasome car il n'y a pas d'activation de la caspase-1 ni la formation de specks d'ASC (Wang *et al.*, 2016). Un régime riche en cholestérol promeut la carcinogénèse chimio-induite par l'azoxyméthazone (AOM) via la libération de ROS mitochondriaux et l'activation de NLRP3 (Du *et al.*, 2016). De même, une étude montre que NLRP3 est impliqué dans le développement de colite suite à un traitement par le DSS (dextran sulfate sodium) (Bauer *et al.*, 2010). Cependant, d'autres études montrent que NLRP3 aurait un rôle protecteur contre l'apparition de cancer associé à une colite. Des souris déficientes pour les composants de l'inflammasome (Caspase-1, ASC, ou NLRP3) développent plus de colites récurrentes et de cancers associés à cette colite dans un modèle de tumeur chimio-induite par le DSS et l'AOM, l'augmentation de la taille de la tumeur induite est corrélée avec la réduction du taux d'IL-18 (Allen *et al.*, 2009; Zaki *et al.*, 2010a). La sécrétion d'IL-18 semble avoir un rôle protecteur vis-à-vis de la carcinogénèse colique. *In vitro*, le traitement des éosinophiles par l'IL-18 augmente leur capacité tumoricide envers les cellules cancéreuses coliques (Gatault *et al.*, 2015). Les souris déficientes en IL-18 sont également plus susceptibles au développement de tumeurs chimio-induites AOM-DSS et l'apport d'IL-18 recombinante à des souris Casp1^{-/-}, sous traitement AOM-DSS, réduit la dysplasie et les signes histologiques d'inflammation induits (Zaki *et al.*, 2010b). L'IL-18 favorise la réponse Th1 en favorisant la sécrétion d'IFN γ et l'activité des cellules NK. L'IL-18 permet également de réduire les métastases hépatiques (Chang *et al.*, 2007; Dupaul-Chicoine *et al.*, 2015; Zaki *et al.*, 2010b). Néanmoins, d'autres études montrent qu'au contraire l'IL-18 favorise l'apparition et la migration de métastases. Terme *et al.*, ont montré que l'injection d'IL-18 recombinante dans un modèle de métastase B16, augmente le nombre de foyers métastatiques au niveau pulmonaire et que l'augmentation de l'IL-18 au niveau tumoral est associée à une augmentation de PD-1 à la surface des cellules NK (Terme *et al.*, 2011). L'action de l'IL-1 β sur les cellules du système immunitaire varie en fonction de son profil d'expression. Lors d'une inflammation aiguë, l'IL-1 β est produite en grande

quantité pendant une durée limitée et favorise une immunité anti-tumorale en augmentant la production d'IFN γ par les lymphocytes T CD8 $^+$ (Ghiringhelli *et al.*, 2009). De même, une récente étude a publié qu'une forte concentration en IL-1 β associée à un recrutement important de macrophages au niveau tumoral inhibe la TEM des cellules cancéreuses du sein et ainsi réduit l'apparition de métastases (Castaño *et al.*, 2018). A l'inverse, lors d'une inflammation chronique, l'IL-1 β est produite de manière modérée mais continue, ce qui est notamment le cas dans les cancers colorectaux (Voronov and Apte, 2015). L'IL-1 β stimule la production de la cyclooxygénase 2 par les fibroblastes, un puissant médiateur inflammatoire qui favorise la prolifération et les capacités invasives des cellules cancéreuses coliques (Zhu *et al.*, 2012). Comme nous l'avons vu précédemment, l'IL-1 β est impliquée dans le recrutement, la différenciation et l'activation des MDSC, des Th17 et des Treg (Chung *et al.*, 2009; Mailer *et al.*, 2015; Tu *et al.*, 2008). En résumé, chacun des acteurs de l'inflammasome NLRP3 ou les cytokines qu'il produit peut jouer un rôle pro- ou anti-tumoral (Tableau 7). L'issue de l'activation de l'inflammasome dépend du contexte dans lequel se trouve la tumeur, de la localisation et du micro-environnement. Depuis quelques années, des investigations sur le rôle du microbiote intestinal émergent et mettent en avant le rôle de ce microbiote dans la progression tumorale. Le récepteur NLRP3 est capable de percevoir l'ADN bactérien et moduler le microbiote intestinal (Man *et al.*, 2016). Les résultats divergents obtenus sur le rôle de l'inflammasome NLRP3, notamment dans les modèles de carcinogénèse colique associée à la colite pourrait être dus à la différence de microbiote selon les laboratoires (Petrilli, 2017).

Ainsi, selon le contexte, s'opposer ou non à l'action de l'IL-1 β peut s'avérer une stratégie prometteuse dans les thérapies anti-cancéreuses. A la suite d'un traitement par le 5-FU, l'inflammasome NLRP3 va être activé dans les MDSC et ces cellules vont alors sécréter de l'IL-1 β . Mélanie Bruchard *et al.*, ont montré que cette IL-1 β va favoriser la polarisation des lymphocytes T CD4 en Th17. De par leur sécrétion d'IL-17, ces lymphocytes T CD4 favorisent la néo-angiogenèse et la reprise tumorale. L'utilisation d'un antagoniste aux récepteurs à l'IL-1 β (IL1Ra) prolonge l'effet du 5-FU (Bruchard *et al.*, 2013). Une autre étude a également regardé l'effet d'une combinaison entre le 5-FU et l'IL1Ra, les auteurs montrent que le 5-FU induit l'expression de l'IL-1 β au niveau intestinal et que l'utilisation de l'IL1Ra permet de diminuer l'inflammation de la muqueuse intestinale induite par le 5-FU et augmente la prolifération des cellules de la crypte (Wu *et al.*, 2011). L'utilisation de molécules à potentiel

anti-inflammatoire pourrait ainsi améliorer la réponse à cette chimiothérapie en s'opposant aux effets délétaires de l'IL-1 β . Parmi les molécules présentant une activité anti-inflammatoire, on retrouve les acides gras polyinsaturés de la famille oméga-3.

Tableau 7 Effets anti et pro-tumoraux de NLRP3, IL-18 et IL-1 β

Acteur	Effet anti-tumoral	Effet pro-tumoral
Inflammasome NLRP3	Inhibition de l'apparition de tumeurs chimio-induites (AOM+DSS)	Favorise l'apparition de tumeurs chimio-induites (DSS) Favorise les métastases (cancer du côlon)
IL-18	Favorise la réponse immunitaire de type 1 (Th1, NK) Diminue les métastases hépatiques Inhibe l'apparition de tumeurs chimio-induites (AOM+DSS)	Favorise les métastases pulmonaires dans un modèle de mélanome Inhibe l'activité des NK par augmentation de PD-1
IL-1β	<u>Forte concentration</u> (inflammation aiguë) Augmente la réponse cytotoxique des CD8+ Diminue la TEM dans un modèle de cancer du sein	<u>Faible concentration</u> (inflammation chronique) Favorise la néo-angiogenèse Favorise le recrutement de MDSC, Th17, Treg Prolifération des cellules cancéreuses

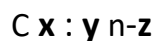
IV. Acides Gras omega 3 : Propriétés anti-inflammatoires et anti-cancéreuses

A. Métabolisme des acides gras

1. Structure et nomenclature

Les acides gras (AG) sont les constituants élémentaires des lipides. Ils sont composés d'une chaîne carbonée comportant, à une extrémité un groupement méthyle et à l'autre extrémité un groupement carboxylique. Ils se définissent par leur nombre de carbone, leur degré d'insaturation et la position de ces insaturations. Les acides gras à chaîne moyenne ou courte (AGCM) ont un nombre de carbones compris entre 4 et 10, et les acides gras dits à longue chaîne (AGLC) ont un nombre de carbones supérieur à 12. Cette chaîne carbonée peut être dépourvue de toute double liaison entre ces atomes de carbone et, dans ce cas, les acides gras sont dits saturés (AGS). Elle peut aussi présenter une ou plusieurs doubles liaisons, les acides gras sont alors désignés comme étant monoinsaturés (AGMI) ou polyinsaturés (AGPI). L'ensemble des AG nommés au cours de ce manuscrit, ainsi que leurs familles, formules et abréviations est listé en tableau 15 (annexe 1).

Par convention, la notation des acides gras est la suivante :



x représente le nombre d'atomes de carbone ; **y** représente le nombre de double liaison et **z** la position de la double liaison la plus proche de l'extrémité méthyle.

Ainsi, les acides gras des familles n-9 (oméga-9 ou ω -9), n-6 (oméga-6 ou ω -6) et n-3 (oméga-3 ou ω -3) ont leur première double liaison située respectivement à 9 carbones, 6 carbones et 3 carbones de l'extrémité $-CH_3$.

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

Les acides gras sont les constituants élémentaires des différentes classes de lipides complexes : les triglycérides, les phospholipides et les esters de cholestérol (figure 16) :

- Les triglycérides (TG) sont constitués d'une molécule de glycérol estérifiée par trois acides gras en position sn-1 (R1), sn-2 (R2) et sn-3 (R3) qui ne sont pas nécessairement les mêmes.

Les acides gras insaturés se fixent préférentiellement en position sn-2 (centrale) tandis que les positions sn-1 et sn-3 (périphériques) fixent des acides gras saturés. Ils sont principalement situés dans le tissu adipeux et constituent la forme de stockage principale d'énergie.

- Les phospholipides (PL) sont constitués d'une molécule de glycérol estérifiée par deux acides gras et un acide phosphorique, lui-même lié à un alcool aminé (figure 16) (choline, sérine, éthanolamine), un résidu glycérol ou une molécule d'inositol. On obtient alors des phosphatidylcholines (PC), phosphatidylsérines (PS), phosphatidyléthanolamines (PE), phosphatidylglycérols (PG) et enfin des phosphatidylinositols (PI). On les appelle des lipides de structure car ce sont des constituants des membranes cellulaires influençant entre autre sa fluidité.
- Les esters de cholestérol (EC) sont constitués d'une molécule de cholestérol liée à un acide gras à longue chaîne au niveau de son groupement hydroxyl. Ils représentent la forme de stockage intracellulaire (principalement dans le foie) et la forme de transport intravasculaire du cholestérol.

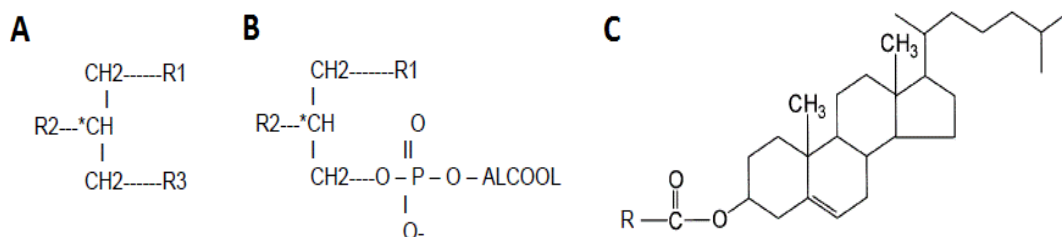


Figure 16 Structure d'un triglycéride (A), d'un phospholipide (B) et d'un ester de cholestérol (C).

2. Les acides gras saturés (AGS)

Les acides gras saturés sont présents dans le règne animal sous la forme de chaîne carbonée allant de 1 à 32 carbones. Cependant les acides gras les plus abondants sont le C16:0 (l'acide palmitique) et C18:0 (l'acide stéarique). En conditions physiologiques, la synthèse *de novo* des acides gras saturés se déroule dans le cytoplasme des cellules des tissus lipogéniques comme le foie, le tissu adipeux et les glandes mammaires. La synthèse des AGS se fait à partir de l'acétyl-Coenzyme A (CoA) provenant de l'oxydation mitochondriale du pyruvate et de la dégradation oxydative des acides aminés cétogènes. L'acétyl-CoA est pris en charge par l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) qui génère le malonyl-CoA. Il existe deux isoformes d'ACC : ACC1 exprimée dans tous les tissus,

essentiellement au niveau du tissu adipeux, du foie et des glandes mammaires et ACC2 principalement exprimée dans les muscles squelettique et cardiaque. Le malonyl-CoA est ensuite pris en charge par la fatty acid synthase (FAS), au niveau de son site de fixation des acyls (ACP). Cet enzyme est un complexe multienzymatique composé de 7 sous-unités qui possèdent des activités catalytiques différentes : acétyl/malonyl-CoA transférase, β -cetoacyl synthase, β -cetoacyl réductase, β -hydroxylacyl deshydratase, enoyl réductase, thioestérase. L'élongation se fait par cet enchaînement de réactions conduit par la FAS qui permet de transformer de l'acétyl-CoA à deux carbones, en acide palmitique (C16:0) à seize carbones en sept cycles réactionnels. A chaque tour, se rajoute deux carbones provenant du malonyl-CoA. Cette synthèse nécessite de l'énergie apportée par l'ATP (Adénosine Triphosphates) et du pouvoir réducteur du NADPH, H⁺ (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate).

3. Les acides gras mono-insaturés (AGMI)

Les AGMI sont issus de la désaturation des AGS. Cette réaction est catalysée majoritairement par la $\Delta 9$ -désaturase ou Stéaroyl-CoA Désaturase (SCD), un enzyme du réticulum endoplasmique. Elle introduit une double liaison en position $\Delta 9$ à partir du groupement carboxyle terminal des AG C16:0 et C18:0 conduisant respectivement à l'acide palmitoléique (C16 :1 n-7) et à l'acide oléique (C18 :1 n-9), pour ce qui concerne les 2 principaux AGMI. Quantitativement, l'acide oléique représente l'élément majeur des acides gras mono-insaturés et est activement synthétisé par les cellules.

A partir de ces acides gras monoinsaturés, les chaînes carbonées peuvent être allongées par des élongases et le nombre d'insaturations peut être augmenté par l'action de désaturases pour former les acides gras de la famille n-7 et n-9, formant les acides gras polyinsaturés (Figure 17).

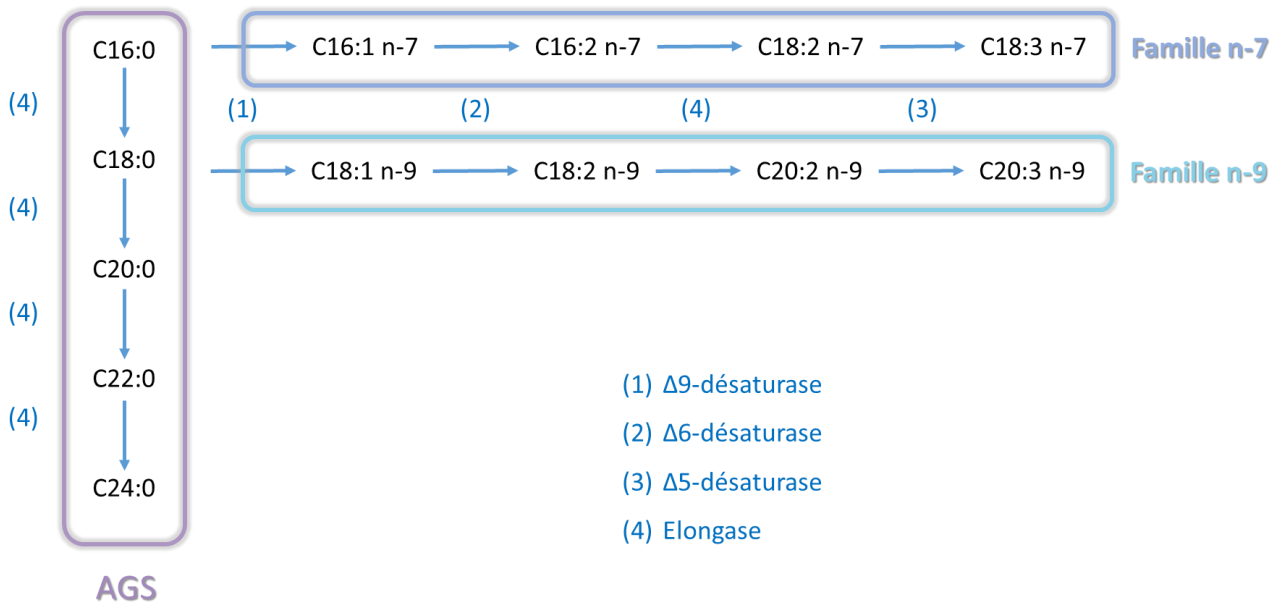


Figure 17 Biosynthèse des AGS et AGMI

4. Les acides gras polyinsaturés (AGPI)

Les précurseurs des AGPI de la famille n-6 et n-3 : acide linoléique (C18:2 n-6) et acide α -linoléique (C18:3 n-3), sont dits essentiels car ils sont nécessaires à la croissance normale et aux fonctions physiologiques de tous les tissus, et non synthétisables par l'Homme. L'acide linoléique et l'acide α -linoléique ont leur première double liaison située respectivement à 6 carbones (n-6) et 3 carbones (n-3) de l'extrémité méthyle. Or, les mammifères ne possèdent pas les désaturases nécessaires à l'insertion de ces doubles liaisons. Seuls les végétaux expriment les $\Delta 12$ et $\Delta 15$ -désaturases capables d'insérer une double liaison à 6 carbones (n-6) et 3 carbones (n-3) de l'extrémité méthyle à partir de l'acide oléique. Cependant, l'Homme peut ajouter à ces deux précurseurs des doubles liaisons vers l'extrémité carboxyle grâce aux désaturases FADS1 (Δ -5 désaturase) et FADS2 (Δ -6 désaturase), et allonger la chaîne carbonée grâce à une élongase pour obtenir les autres acides gras polyinsaturés essentiels n-6 et n-3. Le tissu principal où s'observe la biosynthèse des AGPI est le foie mais elle peut également s'effectuer au niveau d'autres organes comme le cerveau, les reins ou encore les intestins (Bourre *et al.*, 1990; Irazú *et al.*, 1993).

Le métabolisme des deux familles d'acides gras polyinsaturés n-3 et n-6 suit deux voies parallèles, dont au moins 3 enzymes communes sont impliquées : la $\Delta 6$ -désaturase (ou fatty acid desaturase 2, FADS2), les élongases-5 et 2 (ELOVL5 et ELOVL2) ainsi que la $\Delta 5$ -désaturase (ou fatty acid desaturase 1, FADS1) ces réactions sont réalisées dans le réticulum endoplasmique (figure 18).

Concernant la famille des AGPI n-6, l'acide linoléique (LA, C18 :2 n-6) est converti en acide γ -linoléique (GLA, C18 :3 n-6) par l'ajout d'une double liaison sous l'action de la $\Delta 6$ -désaturase puis l'ajout de 2 carbones par ELOVL5 permet d'obtenir l'acide dihomogamma-linoléique (DGLA, C20:3n-6). Le DGLA est ensuite converti en acide arachidonique (AA, C20:4 n-6) par la $\Delta 5$ -désaturase

Dans la famille des AGPI n-3, l'acide α -linoléique (ALA, C18:3 n-3) peut être converti par la $\Delta 6$ -désaturase en acide stéaridonique (SDA, C18:4 n-3) grâce à l'ajout d'une double liaison. L'élongation de SDA par ELOVL5 permet d'obtenir l'acide eicosatétraénoïque (C20:4 n-3) sur lequel est greffé une double liaison par la $\Delta 5$ -désaturase conduisant à la synthèse de l'acide eicosapentaénoïque (EPA, C20:5 n-3). L'EPA peut subir l'action de ELOVL5 suivie de ELOVL2 puis de la $\Delta 6$ -désaturase pour former successivement l'acide docosapentaénoïque (DPA, C22:5 n-3), l'acide tetracosapentaénoïque (C24:5 n-3) et l'acide tetracosahénoïque (C24:6 n-3). Ce dernier peut entrer dans la voie de β -oxydation peroxisomale pour raccourcir la chaîne de 2 carbones et ainsi obtenir l'acide docosahénoïque (DHA, 22 :6 n-3) (Figure 18).

Les désaturases étant communes aux deux familles, les acides gras oméga-3 et 6 entrent en compétition pour les enzymes du métabolisme des AGPI. En effet, un afflux de substrat oméga-6 compromet la génération d'EPA et de DHA à partir de leur précurseur ALA et inversement.

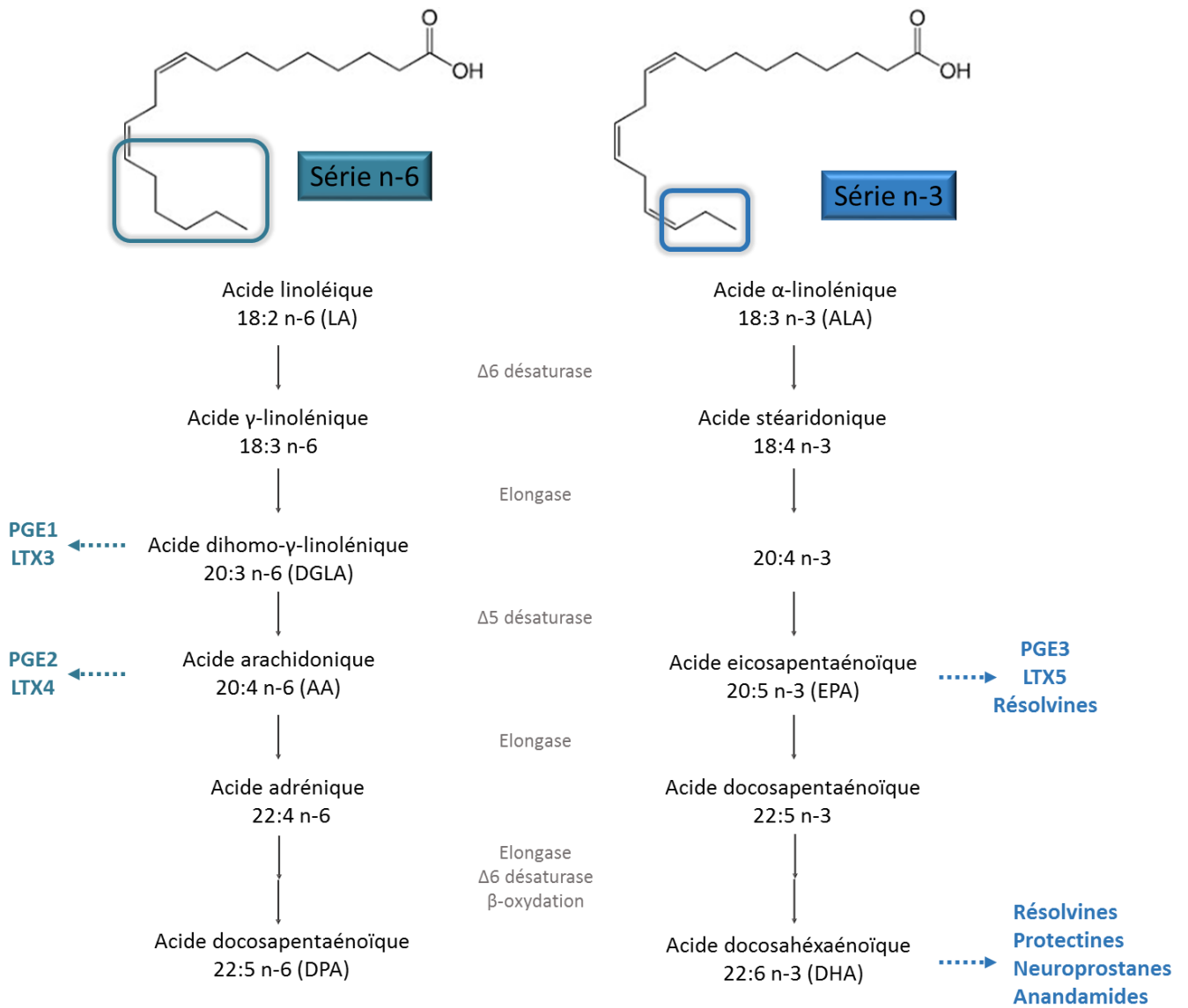


Figure 18 Structure et métabolisme des Acides gras omega 6 et omega 3

5. Les sources alimentaires des acides gras

Les acides gras représentent 30-35% de l'apport énergétique total dans les pays industrialisés. Les sources alimentaires les plus importantes sont les huiles végétales, les produits laitiers, les viandes, les graines, les poissons ou les huiles de poissons. Les acides gras sont majoritairement ingérés sous la forme de triglycérides représentant 95 à 98 % des lipides alimentaires.

En 2001, l'agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA) publie un rapport indiquant les apports nutritionnels conseillés (ANC) pour les acides gras chez l'adulte sain à partir de

données expérimentales, épidémiologiques et cliniques. Cependant, certaines données scientifiques ont amené l'AFSSA à les actualiser en 2010 (tableau 8).

Tableau 8 Apports nutritionnels conseillés en acides gras pour un adulte consommant 2000 kcal (en % d'apport énergétique).

D'après (Legrand et al., 2011)

Lipides totaux		35-40% Apport énergétique total
AG indispensables	Acide linoléique C18:2 n-6	4%
	Acide α-linolénique C18:3 n-3	1%
	Acide docosahexaénoïque DHA, C22:5 n-3	250 mg
AG non indispensables	Acide eicosapentaénoïque EPA, C20:5 n-3	250 mg
	Acide laurique (C12:0) + Acide myristique (C14 :0) + Acide palmitique (C16 :0)	≤8%
	Acides gras saturés totaux	≤12%
	Acide oléique C18:1 n-9	15-20%
	Autres AG non indispensables	-

Pour les AGPI, il est recommandé que le rapport AG oméga-6 / AG oméga-3 tende vers 5, pour éviter que les acides gras oméga-6 n'induisent une compétition excessive vis-à-vis des acides gras oméga-3. Cependant, on observe une forte consommation d'oméga-6 au détriment des oméga-3 favorisant certaines pathologies dont le cancer. En effet, des études menées par l'INCA sur la consommation alimentaire individuelle en France, rapporte que les apports en acide α-linolénique (oméga-3) sont très faibles, les taux sont compris entre 0,10 et 0,20 g/jour. En revanche, ceux de l'acide linoléique (oméga-6) sont compris entre 1 et 2 g/jour. Le rapport linoléique/α-linolénique dans la population française est de l'ordre de 12 à 15 au lieu de 5.

6. Métabolisme des AGPI et médiateurs lipidiques

Les AGPI, comme les autres acides gras vont entrer dans la composition des TG, PL ou EC. Sous leur forme de PL, ces AGPI vont s'incorporer à la membrane des cellules et vont être libérés dans le cytoplasme suite à l'action de la phospholipase A2 (PLA2). On retrouve une compétition entre n-6 et n-3, en particulier entre l'AA et les AG n-3 DHA et EPA pour la synthèse de dérivés oxygénés de ces acides gras qui vont jouer le rôle de puissants médiateurs lipidiques : les eicosanoïdes et docosanoïdes. Il existe différentes classes d'eicosanoïdes qui diffèrent en fonction de la voie métabolique empruntée et du précurseurs : les prostanoïdes (prostaglandines, prostacyclines et thromboxane) issus de la voie des cyclooxygénases (COX), les leucotriènes et les acides gras hydroperoxylés issus de l'activité de la lipooxygénase (LOX) et les résolvines dérivées de l'EPA, les acides gras hydroxylés et époxylés issus de l'activité des cytochromes P450 monooxygénases (CYP450) (Calder, 2005).

Les acides gras de la série n-6 vont tendre à produire des métabolites pro-inflammatoires comme la prostaglandine E2 (Boyce, 2005), tandis que les acides gras de la série n-3 génèrent des dérivés participant à la résolution de l'inflammation comme les résolvines ou les protectines (Spite *et al.*, 2014; Weylandt *et al.*, 2012).

La majorité de l'acide α -linoléique (ALA) est utilisée comme substrat pour la β -oxydation afin de fournir de l'énergie à la cellule et, dans une plus faible proportion (5%), utilisée pour la synthèse de l'EPA et du DHA. Le DHA peut également être rétroconverti en EPA par une réaction de β -oxydation peroxysomale. Contrairement au DHA, l'AA est synthétisé efficacement chez l'Homme par conversion de son précurseur, l'acide linoléique, dès lors que l'alimentation apporte une quantité suffisante de ce dernier.

7. Métabolisme lipidique dans la tumeur

a. Modifications métaboliques

Les cellules cancéreuses reprogramment leur métabolisme lipidique pour répondre à un taux anormalement élevé de prolifération et pour faire face à un environnement défavorable à leur multiplication. Les modifications de leur métabolisme lipidique sont dues principalement à une altération de l'expression des enzymes de la lipogénèse tout en conservant la capacité de capter des lipides dans le microenvironnement en fonction du contexte cellulaire. Dans des conditions physiologiques, l'alimentation constitue l'apport majeur en AG alors que la synthèse *de novo* est faible dans la plupart des organes à l'exception du foie et du tissu adipeux qui régulent

l'homéostasie lipidique. Cependant dans les tumeurs, 95% des AG proviennent de la synthèse *de novo* avec un taux de synthèse élevé d'AGS et AGMI (Zhang and Du, 2012). Ainsi dans les tumeurs coliques, on observe une accumulation des acides palmitique et oléique (Szachowicz-Petelska *et al.*, 2010). A l'inverse, on observe un appauvrissement en AGPI, notamment en AGPI n-3, dans des tumeurs coliques comparées à la muqueuse saine à l'exception d'un AGPI n-6, l'acide arachidonique (AA) (Oraldi *et al.*, 2009). Dans de nombreux cancers, on observe une augmentation de l'expression et de l'activité d'enzymes impliqués dans la lipogenèse tels que ACC, FAS et SCD (Notarnicola *et al.*, 2012). Ceci concorde avec les modifications de la composition lipidique des tumeurs et l'augmentation de la synthèse *de novo* des AGS et AGMI. La lipogenèse est donc un élément clé dans la prolifération cellulaire cancéreuse. L'extinction de l'expression d'ACC, FAS et SCD1 à l'aide d'ARN interférents (siARN) ou d'inhibiteurs pharmacologiques ralentit la prolifération et induit la mort par apoptose des cellules cancéreuses sans effet cytotoxique sur les cellules saines (Minville-Walz *et al.*, 2010). Ainsi, limiter la quantité d'AGS, AGMI ou d'AGPI n-6 s'avère délétère pour la survie des cellules cancéreuses alors qu'au contraire augmenter l'apport en AGPI n-3 pourrait s'avérer favorable.

b. [Conséquences de la modification du métabolisme lipidique dans la progression tumorale](#)

La modification du métabolisme lipidique participe à la polifération des cellules cancéreuses en approvisionnant la cellule en substrats énergétiques, en générant les acides gras qui seront importants dans la synthèse des PL participant à la synthèse des membranes cellulaires et des organelles. La reprogrammation lipidique modifie également la signalisation cellulaire par modification des molécules de signalisation ou par génération de médiateurs lipidiques (Röhrig and Schulze, 2016). Les lipides possèdent également un rôle crucial dans la progression tumorale et la résistance aux thérapies. De nombreuses études montrent une altération du profil lipidique chez les individus atteints de cancer. Les patients atteints de cancer colorectal présentent à l'intérieur de la membrane des érythrocytes une diminution de la quantité d'AGPI n-3 et un ratio AGPI n-6/AGPI n-3 plus élevé que les individus sains (Coviello *et al.*, 2014). Par ailleurs, il est possible de discriminer les patients avec un cancer colorectal localisé de ceux qui présentent des métastases hépatiques, par l'analyse de la composition en acide gras du site tumoral primaire. Les patients métastatiques possèdent une diminution de la teneur en EPA et une augmentation en acide γ -linoléique comparé aux patients sans métastases (Notarnicola *et al.*, 2018). Une étude basée sur un questionnaire alimentaire montre qu'une alimentation riche en oméga-6 augmente

la proportion d'acide arachidonique au niveau du tissu adipeux des patientes atteintes d'un cancer du sein et que cette augmentation est positivement corrélée avec l'apparition de métastases ganglionnaires (Petrek *et al.*, 1997). Nous avons vu, dans la chapitre 1, que la composition lipidique des cellules cancéreuses coliques, et notamment l'augmentation des gouttelettes lipidiques intra-cellulaires était associée à l'installation d'une résistance aux chimiothérapies dont le 5-FU (Cotte *et al.*, 2018).

8. Apport en AGPI n-3 : quels effets ?

Les niveaux sériques physiologiques de DHA libre sont d'environ 1 à 5 μM (Psychogios *et al.*, 2011), et à des niveaux plus élevés, sous sa forme estérifiée au sein des triglycérides et des phospholipides (Yates *et al.*, 2014). On peut les retrouver à une concentration d'environ 100 μM au sein des PL constituant les membranes des globules rouges (Yuzyuk *et al.*, 2018). Des travaux ont permis de mettre en évidence la répercussion d'une intervention nutritionnelle en AGPI n-3 sur le taux plasmatique de volontaires sains. Pour cela, Mori *et al.* ont réalisé une étude composée de personnes sans pathologies connues (entre 20-65 ans) divisées en 3 groupes : un groupe contrôle supplémenté en huile d'olive, un groupe EPA et un groupe DHA supplémenté avec 4g/jour d'EPA ou DHA (éthyl-ester). L'apport nutritionnel est sous forme de capsule sur une durée de 6 semaines. Ils ont constaté que la supplémentation en EPA augmente le taux d'EPA plasmatique de 494% sans changement significatif en DHA. La supplémentation en DHA augmente le taux plasmatique d'EPA et DHA de 52% et 167% respectivement. Il observe également une diminution du taux plasmatique d'AA de 25% et de 22% lors d'une supplémentation en EPA et DHA respectivement. Cette étude nous démontre que la consommation en EPA et DHA peut avoir un réel impact sur les proportions d'acides gras plasmatiques (Mori *et al.*, 2000). Une autre étude a démontré un effet dose réponse d'une supplémentation en huile de poisson chez des hommes sains d'une trentaine d'année répartis en 4 groupes. La supplémentation en huile de poisson est réalisée sur 12 semaines sous forme de capsule apportant soit 0 ; 1.5 ; 3 et 6 g /jr d'EPA/DHA (une capsule contenant 300 mg EPA et 200 mg DHA). On peut observer que l'augmentation de la dose d'huile de poisson consommée est corrélée à une augmentation du taux plasmatique d'EPA et DHA et à une diminution du taux plasmatique d'AA (Blonk *et al.*, 1990). Hillier *et al.* ont étudié l'effet d'un régime riche en huile de poisson (3,2g d'EPA + 2,2g de DHA/jour) sur la teneur en AG dans des biopsies de côlon chez 11 patients souffrant de maladie inflammatoire de l'intestin après 3, 6 et 12 mois de supplémentation (Hillier *et al.*, 1991). Après les 3 premières semaines, la teneur

en EPA dans la muqueuse intestinale a augmenté de 7 fois tandis que celle en DHA a doublé. Ces quantités se sont maintenues tout au long des 12 semaines, la diminution de la quantité d'AA n'est observée qu'au bout de 6 semaines. D'autres études montrent également que suivant la forme d'administration des AGPI n-3 (prise orale, émulsion), on retrouve une augmentation de la teneur en ces AG chez les différents individus (Davidson *et al.*, 2012; Mayer *et al.*, 2003). L'ensemble de ces études suggèrent le fait qu'il est aisé de moduler la quantité d'AGPI n-3 par le biais d'une intervention nutritionnelle, et que celle-ci doit être maintenue pendant une certaine période afin de retrouver un ratio n-3/n-6 favorable.

B. Effets protecteurs des AGPI n-3

Le risque de cancer et notamment de cancer colorectal, peut être réduit grâce à une modification des habitudes alimentaires incluant une augmentation de la consommation de fibres, et une réduction de l'apport en graisses (Vargas and Thompson, 2012). Des études épidémiologiques portant sur l'impact des AGPI sur le risque de cancer donnent parfois des résultats contradictoires. Cependant elles tendent à montrer qu'un ratio n-6/n-3 élevé augmente le risque de cancer de la prostate (Williams *et al.*, 2011) et du sein (Yang *et al.*, 2014a). De plus, une forte consommation d'huile d'olive (riche en acide gras monoinsaturé n-9 oléique) est associée à une diminution du risque de cancer notamment du côlon, du sein et de la peau (Carrillo *et al.*, 2012; Filik and Ozyilkan, 2003). D'autres études épidémiologiques ont également rapporté qu'une alimentation riche en AGPI n-3 (DHA et EPA) diminue le risque de cancer colorectal (Cockbain *et al.*, 2012; Geelen *et al.*, 2007; Kantor *et al.*, 2014; MacLean *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2012). Au contraire des cancers colorectaux à microsatellite stable (MSS), les individus avec une alimentation apportant une ration supérieure à 0,30g/jour d'AG oméga-3 ont un risque plus faible de développer un cancer colorectal à microsatellite instable (MSI) (Song *et al.*, 2015). Cependant, ces AGPI n-3 n'interviennent pas seulement au niveau de la prévention des cancers colorectaux, ces AG présentent également des effets curatifs.

C. Potentiel anti-tumoral des AGPI n-3

Les AGPI n-3 vont avoir un potentiel anti-tumoral à plusieurs niveaux. Ils vont pouvoir agir directement sur les cellules cancéreuses. De nombreux travaux ont en effet étudié l'impact des

AGPI n-3 *in vitro* et *in vivo* sur la prolifération de cellules tumorales. Il a également été montré que les AGPI n-3 pouvaient influencer le micro-environnement tumoral et l'efficacité des thérapies anti-cancéreuses, l'ensemble de ces actions module la croissance tumorale (figure 19).

1. Effets des AGPI n-3 sur la viabilité des cellules cancéreuses

Les propriétés anti-tumorales des AGPI n-3 peuvent avoir une action directe sur la survie des cellules tumorales. La prolifération et la survie des cellules cancéreuses sont liées à l'activation de voies de signalisation induites par des molécules de surface, comme des cytokines ou des facteurs de croissance. Les AGPI n-3 peuvent s'incorporer à la membrane plasmique des cellules cancéreuses et peuvent modifier la fluidité membranaire et altérer la composition des radeaux lipidiques (Turk and Chapkin, 2013). Ces radeaux lipidiques sont des microdomaines riches en cholestérol et glycosphingolipides en mouvement au sein de la membrane plasmique et auxquels sont associés des complexes protéiques actifs comme le récepteur à l'EGF, fortement exprimé dans les cancers colorectaux. En modifiant la fluidité membranaire, les AGPI n-3 peuvent inhiber les fonctions de l'EGFR. Ils peuvent également inhiber la transactivation de ce récepteur en réduisant la quantité de PGE2, empêchant alors sa signalisation (Buchanan *et al.*, 2003). Les AGPI n-3 pourront également interférer avec différentes voies de signalisation entraînant une inhibition de la survie cellulaire et une induction de l'apoptose (Rogers *et al.*, 2010). Les AGPI n-3 inhibent différentes voies de signalisation qui favorisent la progression du cancer colorectal : Wnt/ β -caténine (Calviello *et al.*, 2007), MAPK/ERK (Hawcroft *et al.*, 2012), PI3K/PTEN (Engelbrecht *et al.*, 2008; Toit-Kohn *et al.*, 2009), mTORC1/2 (Chen *et al.*, 2014b), AMPK α contrôlant la statut énergétique de la cellule (Zhou *et al.*, 2007). Les AGPI n-3 sont des molécules hautement oxydables, au niveau de leur groupement méthylène, leur accumulation dans les cellules cancéreuses augmente la peroxydation des lipides et le stress cellulaire oxydant par la production de ROS (Hossain *et al.*, 2008). Cette augmentation du niveau intracellulaire de ROS dans les cellules traitées par les AGPI n-3 pourrait induire l'apoptose de ces cellules (Simon *et al.*, 2000). Les travaux de Robert Chapkin et de son équipe ont montré qu'après injection d'AOM chez des rats supplémentés en huile de poisson, le niveau de ROS augmentait dans les colonocytes comparé à ceux des rats suivant un régime enrichi en huile de maïs, et que cette augmentation entraînait la mort par apoptose de ces cellules ainsi qu'une diminution de l'apparition de foyers de cryptes aberrants (Chang *et al.*, 1998; Crim *et al.*, 2008; Sanders *et al.*, 2004). Au niveau mitochondrial, le DHA peut activer des protéines pro-apoptotiques (Bax, Bid, cytochrome C) et au

contraire inhiber des protéines anti-apoptotiques (Bcl-2) (Skender *et al.*, 2014). Par ailleurs, une autre étude a montré que le DHA peut également induire l'expression du récepteur de mort DR5 (Death Receptor 5) dans des cellules cancéreuses coliques en augmentant le stress du réticulum endoplasmique (RE). En effet, le DHA induit une production de ROS responsable de l'induction du stress du RE. Ceci va induire l'activation du facteur de transcription CHOP régulant l'expression de gènes impliqués dans la mort cellulaire dont le récepteur DR5. Ainsi, l'induction de stress du RE par le DHA sensibilise les cellules cancéreuses coliques au traitement par le ligand de DR5 : TRAIL (Sung *et al.*, 2010).

De nombreuses études *in vivo* démontrent un effet anti-tumoral des AGPI n-3 (EPA et DHA) dans des modèles murins de carcinogénèse chimioinduite (AOM+DSS), des modèles transgéniques (modèles APC^{min/+}), ou de transplantation des cellules cancéreuses. Par exemple, des souris immunodéficientes Nude avec transplantation de cellules cancéreuses coliques humaines HT29 ou HCT116 soumises à un régime enrichi en EPA et DHA, voient leur croissance tumorale diminuée en association avec un enrichissement des tumeurs en EPA et DHA au détriment de l'AA, une diminution de la teneur en PGE2 et une plus faible vascularisation des tumeurs (Boudreau *et al.*, 2001; Calviello *et al.*, 2004; Fluckiger *et al.*, 2016).

2. Effets des AGPI n-3 dans les propriétés invasives des cellules cancéreuses

Les AGPI n-3 peuvent également moduler les propriétés invasives et de migration des cellules cancéreuses. Le traitement de lignées cancéreuses coliques (HCT116, CSC4, HCT8) par le DHA inhibe l'expression du Granzyme B et réduit leur capacité à subir la transition épithélio-mésenchymateuse et leur invasion dans un matrigel (D'Eliseo *et al.*, 2012). La diminution de l'expression des gènes impliqués dans les processus métastatiques a également été montrée par microarray dans un modèle de xénogreffes de cellules HT15 dans des souris nude sous régime enrichi en DHA comparé à un régime contrôle enrichi en huile de maïs (Zou *et al.*, 2015). Une étude a modélisé les métastases hépatiques par injection de cellules cancéreuses coliques (ACL-15) à des rats par la veine mésentérique supérieure et a montré une réduction de 40% du nombre et de 44% de la taille des métastases hépatiques dans les groupes traités par de l'EPA comparés aux contrôles (acides linoléique et palmitique). Cette diminution est associée à une réduction de la prolifération des cellules cancéreuses sans induction d'apoptose et une diminution de la molécule d'adhésion cellulaire vasculaire 1 (VCAM-1) (Iwamoto *et al.*, 1998).

3. Effets des AGPI n-3 sur le micro-environnement tumoral

Rappelons que les AGPI n-6 peuvent être métabolisés en eicosanoïdes pro-inflammatoires alors que l'EPA est métabolisé en eicosanoïdes anti-inflammatoires sous l'action de cyclooxygénases (COX) et lipooxygénases (LOX). L'enzyme COX-2 métabolise l'AA en PGE2 pro-inflammatoire mais métabolise également l'EPA en PGE3 anti-inflammatoire. Le DHA est également métabolisé en docosanoïdes tels que des protectines et résolvines à effet anti-inflammatoire. Il a été observé que le métabolisme des eicosanoïdes est modifié dans le cancer colorectal. En effet, COX-2 et 5-LOX sont surexprimées dans la plupart des tumeurs coliques et l'AA est l'acide gras majoritaire des phospholipides membranaires de ces tumeurs, cette surexpression entraîne alors une forte production de dérivés pro-inflammatoires ayant des effets pro-tumoraux tels que la PGE2 (Hull *et al.*, 2004; Soumaoro *et al.*, 2006; Wang and Dubois, 2010). Un apport alimentaire en AGPI n-3 permet un enrichissement des membranes en EPA et DHA augmentant la synthèse des dérivés anti-inflammatoires au détriment des dérivés pro-inflammatoires issus du métabolisme de l'AA (Vanamala *et al.*, 2008). De plus, les AGPI n-3 inhibent l'expression de la COX-2 et sont capables d'augmenter l'expression de la 15-PGDH impliquée dans la dégradation de PGE2 (Yao *et al.*, 2015). Les niveaux élevés de PGE2 permettent de soutenir la prolifération, la migration, l'invasion des cellules cancéreuses mais également de promouvoir l'installation d'un micro-environnement tumoral immunosuppresseur favorable à l'expansion de la tumeur (Hull *et al.*, 2004; Wang and DuBois, 2010). Ainsi, interférer avec la quantité de PGE2 grâce aux propriétés anti-inflammatoires du DHA et de l'EPA permet de limiter cette croissance tumorale et pourrait également limiter l'activation des MDSC par cette inhibition de la PGE2, impliquée dans l'accumulation et l'activation des MDSC. Nous avons vu préalablement que la tumeur était capable de mettre en place un mécanisme d'échappement à la surveillance du système immunitaire. Les AGPI n-3 et leurs métabolites peuvent agir en tant que modulateurs de la réponse immunitaire en induisant plus particulièrement une réponse immunitaire anti-tumorale ou en inhibant les réponses pro-tumorales. Il a été montré que le DHA joue un rôle anti-angiogénique et anti-tumoral en inhibant la différenciation des lymphocytes Th17 et leur sécrétion d'IL-17 *in vitro* et *ex vivo* (Monk *et al.*, 2013). Notre équipe de recherche a également mis en évidence que le DHA limite la croissance de mélanome (B16) et de cellules cancéreuses mammaires (4T1) chez des souris porteuses de tumeurs. En effet, le DHA inhibe l'expression de ROR γ T et d'IL-17 : facteurs clés de la différenciation et de l'activité des Th17 (Berger *et al.*, 2013a). De plus, les AGPI n-3 inhibent l'expression du récepteur à l'IL-6 à la surface des lymphocytes CD4 : une cytokine impliquée dans

la différenciation des Th17 (Allen *et al.*, 2014). Les AGPI n-3 sont également capables d'agir sur les lymphocytes T régulateurs (Treg) qui participent à l'échappement des tumeurs à l'immunosurveillance, en inhibant leur migration et leur activité par inhibition des récepteurs aux chimiokines : CCR4 et CXCR4 à leur surface et par l'augmentation de l'expression de p27^{kip1} impliquée dans l'inhibition de leur activité immunosuppressive (Yessoufou *et al.*, 2009). Une autre étude a également montré une diminution de la teneur plasmatique de la chimiokine CCL2 chez des patients atteints de cancer colorectal et ayant des métastases hépatiques, traités par de l'EPA (Cockbain *et al.*, 2014). Nous avons vu dans le chapitre 2 qu'interférer avec la signalisation de CCL2 prévenait le recrutement des MDSC au site tumoral. Les effets bénéfiques de l'EPA observés dans l'étude précédemment citée pourraient être attribués à une régulation des MDSC. Enfin, les AG omega-3 ont également la capacité de moduler la composition du microbiote intestinal avec pour conséquence une plus faible inflammation et la prévention de la dysbiose intestinale induite par un régime enrichi en AG omega-6. Trois études récentes ont révélé une synergie entre les inhibiteurs de point de contrôle du système immunitaire et le microbiome (Gopalakrishnan *et al.*, 2018; Matson *et al.*, 2018; Routy *et al.*, 2018). Des chercheurs commencent à faire l'hypothèse qu'il soit concevable qu'un apport optimal en DHA et en EPA pourrait générer un microbiote intestinal optimal favorisant une réponse aux immunothérapies (Ilag and Ilag, 2018).

3. Effets des AGPI n-3 sur l'efficacité des thérapies anti-cancéreuses

Nous avons vu que de nombreuses études épidémiologiques mettent en avant le rôle d'une alimentation riche en AGPI n-3 dans la diminution du risque de cancers, tels que les cancers du sein (Zheng *et al.*, 2013) et colorectaux (Cockbain *et al.*, 2012). Ces propriétés de prévention s'accompagnent également d'un potentiel curatif démontré dans des études interventionnelles adjuvantes sur des patients atteints notamment de cancers du sein (Hajjaji & Bougnoux, 2013) et colorectaux (Cockbain *et al.* 2014).

Aujourd'hui, de nombreuses études ont pour objectif de potentialiser le bénéfice de la chimiothérapie en utilisant des molécules capables de renforcer les effets de ce traitement et d'en diminuer la toxicité. En ce sens, plusieurs équipes ont testé l'efficacité des AG oméga-3 au cours des traitements chimiothérapeutiques. De nombreuses études ont tout d'abord montré une amélioration de l'efficacité des chimiothérapies, et notamment du 5-FU, par les AGPI n-3 *in vitro* ou sur des modèles de croissance tumorale. Une étude sur des cellules HT29 (lignée cellulaire d'un cancer colorectal humain) montre que l'utilisation du 5-FU en combinaison avec de l'EPA, permet

l'augmentation significative du nombre de cellules HT29 en apoptose tardive ou en nécrose (Belabed *et al.*, 2008). Vasudevan *et al.* montrent un effet anti-cancéreux synergique entre l'EPA et une thérapie à base de 5-FU et oxaliplatine *in vitro* et *in vivo* sur les modèles HCT116 et HT29 (Vasudevan *et al.*, 2014). D'autres nombreuses études réalisées *in vivo* montrent que les AGPI n-3 peuvent potentialiser l'activité anti-tumorale du 5-FU (réduction de la taille de la tumeur, augmentation de l'apoptose et des dommages à l'ADN) mais également de réduire la toxicité liée au 5-FU (Rani *et al.*, 2014, 2017; Sebe *et al.*, 2016). Une étude montre qu'une thérapie à base d'irinotécan et de 5-FU perturbe le stockage des graisses dans un modèle de rat avec en particulier une chute de la quantité d'omega-3. La combinaison entre AGPI n-3 et chimiothérapie restaure un stockage lipidique correct en limitant ainsi les effets secondaires associés au 5-FU (Ebadi *et al.*, 2017). Les omega-3 peuvent également agir sur l'efficacité des radiothérapies. Ainsi, des cellules HT29 résistantes à la radiation deviennent répondantes après un traitement par les AGPI n-3 et en particulier par le DHA (Cai *et al.*, 2014).

En 1999, l'équipe du Pr Bougnoux mît en évidence une activité des acides gras oméga-3 associés à la chimiothérapie sur des carcinomes mammaires. En effet, cette étude clinique a révélé que la réponse à la chimiothérapie est plus importante quand la tumeur se développe dans un environnement riche en acide gras oméga 3. Parmi les 56 patientes traitées, 26 (47 %) ont une réponse partielle ($n = 21$) ou complète ($n = 5$). L'étude montre que le taux d'acide gras oméga-3 est plus élevé dans les adipocytes des patientes présentant une réponse partielle ou complète ; comparé au groupe de patientes dont la tumeur a continué à évoluer : respectivement 0,90 et 0,72 % des lipides ($p = 0,004$) (Bougnoux *et al.*, 1999). Par la suite, plusieurs équipes se sont intéressées à l'association entre AGPI n-3 et chimiothérapies au cours d'essais cliniques traitant différents types de cancer. Certains de ces essais cliniques sont illustrés en tableau 9.

Tableau 9 Exemple d'essais cliniques portant sur une combinaison adjuvante entre AGPI n-3 et chimiothérapies

(QDV : Qualité de vie, SNO : substitution nutritionnelle orale, CRP : protéine C réactive). D'après (Morland *et al.*, 2016).

Type de patients	Chimiothérapie	Supplémentation (Dose/durée)	Effets biologiques bénéfiques	Références
Cancer pancréatique avancé	Gemcitabine	Emulsion lipidique riche en AGPI n-3 (4,3-8,6 g d'EPA+DHA par jour/16 semaines)	↑QDV	(Arshad <i>et al.</i> , 2017)
Cancer du pancréas Cancer du poumon	Gemcitabine avec ou sans autre agent chimiothérapeutique	SNO enrichi en AGPI n-3 (1,1g d'EPA ; DHA non précisé/jour/8 semaines)	↑QDV ↑Statut nutritionnel	(Bauer and Capra, 2005)
Cancers gastro-intestinaux et autres cancers	5-FU, leucovirin	Capsules gélatineuses (0,3g EPA + 0,4g DHA/jour/8 semaines)	Maintien du nombre et de la fonction des neutrophiles Maintien du poids corporel	(Bonatto <i>et al.</i> , 2012)
Cancer du sein métastatique	Cyclophospho-amide, 5-FU, Epirubicin	Capsules gélatineuses (1,8g DHA/jour/5 mois)	↑Temps avant progression ↑Survie à long terme ↓Anémie et thrombocytopénie	(Bougnoux <i>et al.</i> , 2009)
Cancer du poumon non à petites cellules avancé	Cis-platine et Gemcitabine	Capsules gélatineuses (2g EPA + 1,4g DHA/jour/66 jours)	↑Poids corporel ↓CRP et IL-6 plasmatiques	(Finocchiaro <i>et al.</i> , 2012)
Cancer du sein avec atteint ganglionnaire	Paclitaxel	Capsules gélatineuses (0,2g EPA + 1g DHA/jour/16 semaines)	↓Neuropathie périphérique	(Ghoreishi <i>et al.</i> , 2012)
Cancer colorectal	Xeloda. Oxaliplatine, 5-FU et/ou leucovirin	Capsules gélatineuses (2.2g EPA + 0,2 DHA) ou huile de poisson (2,2g EPA + 0,5g DHA/jour/10 semaines)	↓CRP sérique Maintien du poids corporel	(Mocellin <i>et al.</i> , 2013)

Chapitre IV : Acides Gras Omega 3 : Propriétés anti-inflammatoires et anti-cancéreuses

Type de patients	Chimiothérapie	Supplémentation (Dose/durée)	Effets biologiques bénéfiques	Références
Cancer du poumon non à petites cellules stade IIIB ou IV	Thérapies à base de platine	SNO enrichi en AGPI n-3 (2,2g EPA+0.9g DHA/jour/10 semaines)	↑des cycles de chimiothérapies ↑ Bénéfices cliniques ↑Taux de réponse à la chimiothérapie Maintien du poids corporel et de la masse musculaire	(Murphy <i>et al.</i> , 2011a, 2011b)
Cancer colorectal Stade IV	Non précisé	SNO enrichi en AGPI n-3 (2,2g EPA+0,9g DHA/jour/9 semaines)	Maintien du poids corporel ↓CRP ↑QDV	(Read <i>et al.</i> , 2007)
Cancer du poumon non à petites cellules stade IIIB ou IV	Paclitaxel + CisPlatine/CarboPlatine	SNO enrichi en AGPI n-3 (2,2g EPA+1g DHA/jour/8 semaines)	↓CRP et TNFα sérique ↓Fatigue et perte d'appétit ↑Apports en énergie et protéine Maintien du poids ↓Neuropathies	(Sánchez-Lara <i>et al.</i> , 2014)
Cancer colorectal Stade IV	5-FU+Oxaliplatine + acide folinique ou capecitabine	SNO enrichi en AGPI n-3 (2g EPA+0.9g DHA/jour/12 semaines)	↑Poids corporel	(Trabal <i>et al.</i> , 2010)
Cancer du poumon non à petites cellules stade IIIa-N2 ou IIIb	Thérapie à base de cisplatine ou docetaxel Cisplatine ou chimiothérapie d'induction, bevacizumab ; radithérapie	SNO enrichi en AGPI n-3 (2g EPA+0.9g DHA/jour/5 semaines)	↑QDV ↓Nausées et vomissements ↑Apport en énergie Maitien du poids corporel	(van der Meij <i>et al.</i> , 2010, 2012)

Ces différentes études ont pu montrer que l'association d'AGPI n-3 avec d'autres chimiothérapies améliore d'une part l'efficacité, la tolérance des chimiothérapies mais également les paramètres

métaboliques des patients. La majorité des études s'accordent pour mettre en avant que l'intervention nutritionnelle en AGPI n-3 augmente la qualité de vie des patients, diminue le risque de cachexie et augmente les défenses immunitaires du patient (Fuentes *et al.*, 2018; Morland *et al.*, 2016; Volpato and Hull, 2018). Une étude a suivi la supplémentation en huile de poisson (2g) dont 200 mg d'EPA et de DHA par jour durant neuf semaines de patients atteints d'un cancer colorectal, sous chimiothérapie. Les patients supplémentés montrent une diminution du ratio CRP/Albumine, marqueur d'inflammation (Silva *et al.*, 2012). De plus, une étude a montré qu'un apport en huile de poisson (2g/jour) pendant les neuf premières semaines de traitement de patients atteints d'un cancer colorectal retarde la progression tumorale, les chercheurs évoquent l'augmentation de l'action anti-néoplasique des chimiothérapies par cette alimentation enrichie en AGPI n-3 (Camargo *et al.*, 2016). Dernièrement, Van Blarigan *et al.* ont montré que les patients suivant un apport élevé en omega-3 d'origine marine pendant six mois après leur thérapie ne montraient pas de nouveaux signes de cancer (Van Blarigan *et al.*, 2018). D'autres études ont montré un bénéfice des AGPI n-3 sur le long terme. Song *et al.* ont montré qu'une forte consommation d'AGPI n-3 d'origine marine après le diagnostic du cancer colorectal est associée avec un risque plus faible de mortalité associée au cancer (Song *et al.*, 2017a). Concernant les effets de la combinaison entre AGPI n-3 et opération, il a été montré qu'une supplémentation orale péri-opérative (sept jours avant/sept jours après) de 2g d'EPA et 1 g de DHA ne montrait aucune amélioration significative des complications post-opératives (Sorensen *et al.*, 2014). Néanmoins, une récente méta-analyse a regroupé onze études utilisant une supplémentation nutritionnelle contenant des AGPI n-3 par voies entérique ou parentérique pendant la période péri-opérative de patients souffrant d'un cancer colorectal (Xie and Chang, 2016). Cette étude montre que la supplémentation en AGPI n-3 réduit les complications post-opératives, les niveaux de cytokines pro-inflammatoires, et la durée d'hospitalisation. L'équipe de Hull s'est intéressée à l'utilisation d'AGPI n-3 seuls chez des patients atteints de cancer colorectal avec métastases hépatiques. Cet essai clinique de phase II a montré que l'apport journalier de 2 g d'EPA, sous forme libre, avant la résection des métastases hépatiques prolongeait la survie à long terme des patients (Cockbain *et al.*, 2014). Ces premières données sont à l'origine d'un essai clinique de phase III (NCT03428477) et cette fois-ci, les patients seront supplémentés quotidiennement avec 4 g d'EPA sous forme d'ethyl-ester au moins deux semaines avant l'opération des métastases hépatiques puis la supplémentation sera maintenue sur le long terme après l'opération. A l'issue de cet essai clinique

les chercheurs évalueront la survie à long terme mais également la survie sans progression des patients (Volpato and Hull, 2018).

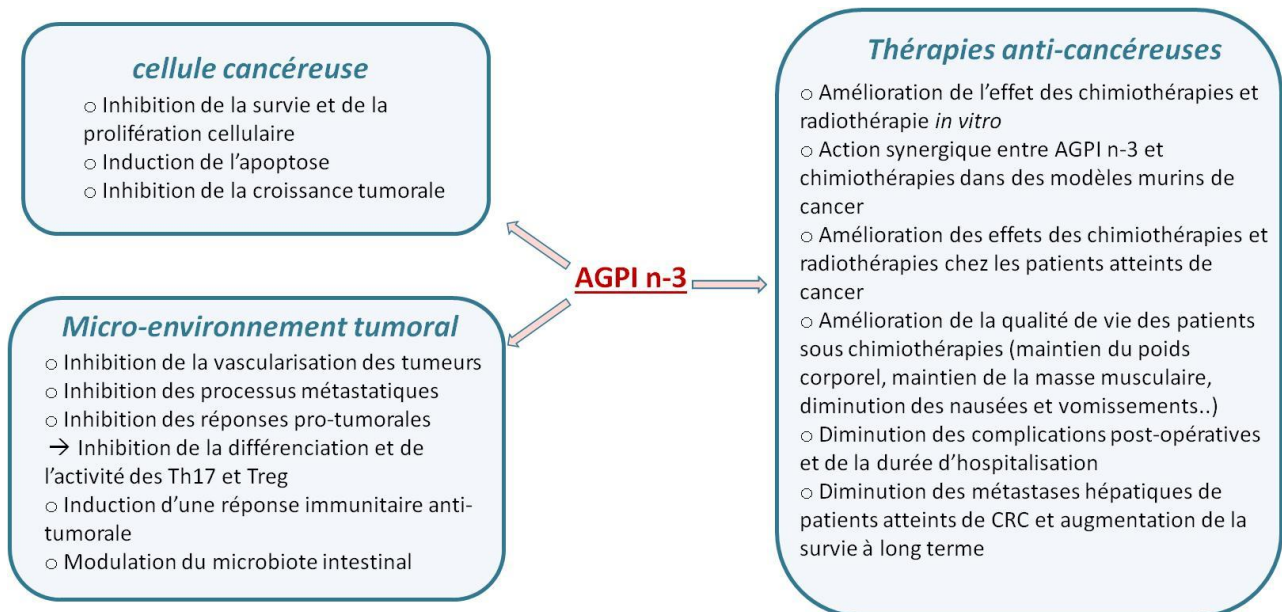


Figure 19 Effets anti-cancéreux des AGPI n-3

D. Signalisation des AGPI n-3

1. Récepteurs membranaires aux AGPI n-3

Les acides gras polyinsaturés en n-3 peuvent avoir une action directe sur les cellules en se fixant sur des récepteurs membranaires comme les GPR (G-Protein coupled Receptor) ou encore à des protéines de transports comme FAT/CD36 (Fatty Acid Translocase).

a. Les récepteurs couplés aux protéines G

Les récepteurs couplés aux protéines G (GPR) sont des molécules de signalisation importantes pour de nombreux aspects de la fonction cellulaire. Ils sont membres d'une grande famille qui partagent des motifs structuraux communs, tels que sept hélices transmembranaires et la capacité d'activer des protéines G hétérotrimères telles que G α s, G α i et G α q. Les ligands se lient spécifiquement aux GPR pour stimuler et induire différentes réponses cellulaires comme la modulation de la production d'AMPc ou encore de la voie de la phospholipase C, des canaux ioniques et des protéines kinases activées par des mitogènes (MAPK) (Gether, 2000; Ulloa-Aguirre *et al.*, 1999). Plusieurs groupes ont rapporté que les cinq récepteurs : GPR40, GPR41, GPR43, GPR84 et GPR120, peuvent être activés par des acides gras libres (AGL). Les acides gras à chaîne courte sont des agonistes spécifiques pour GPR41 et GPR43 (Tazoe *et al.*, 2008) et les AG à chaîne

moyenne pour GPR84 (Wang *et al.*, 2006). Les AG à longue chaîne (AGLC) peuvent activer GPR40 (Itoh *et al.*, 2003) et GPR120 (Hirasawa *et al.*, 2005).

Le récepteur GPR40 ou FFAR1 (Free Fatty Acid Receptor 1) est un récepteur couplé à une protéine G de type Gq. Il est fortement exprimé au niveau des cellules β du pancréas. La liaison de ses ligands va entraîner la libération de la sous-unité Gq qui va aller activer la phospholipase C, qui pourra libérer, à partir du phosphoinositol 4,5bis phosphate, le diacylglycérol (DAG) et l'inositol triphosphate (IP₃). L'IP₃ va alors se fixer sur ses récepteurs au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique et permettre la libération de Calcium (Hauge *et al.*, 2015). Du fait de son expression majoritaire au niveau des cellules du pancréas, l'intérêt de GPR40 comme cible thérapeutique se tourne plutôt vers des maladies métaboliques telles que le diabète. Néanmoins, une récente étude rétrospective japonaise montre une corrélation entre l'expression de GPR40 et la progression du cancer colorectal. La forte expression de GPR40 au niveau tumoral et un taux plasmatique élevé de triglycérides sont associés à des métastases ganglionnaires et distants (principalement hépatiques) et un mauvais pronostic (Nakashima *et al.*, 2018).

Le récepteur GPR120 (ou FFAR4) est principalement retrouvé au niveau du tissu adipeux, des macrophages et des cellules entéroendocrines. On peut également le retrouver, à des taux moindres, au niveau des muscles, des cellules β du pancréas et des hépatocytes. GPR120 est spécifiquement activé par des AGLC, en particulier par les AGPI n-3 : ALA, EPA et DHA. Ce récepteur est considéré comme un senseur d'AGLC n-3 au niveau des macrophages, expliquant en partie leurs effets anti-inflammatoires (Oh *et al.*, 2010). GPR120 est couplé à des protéines G de type Gq. Une fois la liaison entre GPR120 et ses ligands établie, GPR120 va être phosphorylé et permettre la liaison d'une protéine adaptatrice, la β -arrestine 2 (Burns and Moniri, 2010). Lorsque que la β -arrestine est liée à GPR120, elle va pouvoir interagir avec différentes molécules de signalisation sous-jacentes et notamment des protéines appartenant à la famille des MAPK (Brown and Sacks, 2009; Miller and Lefkowitz, 2001) (figure 20).

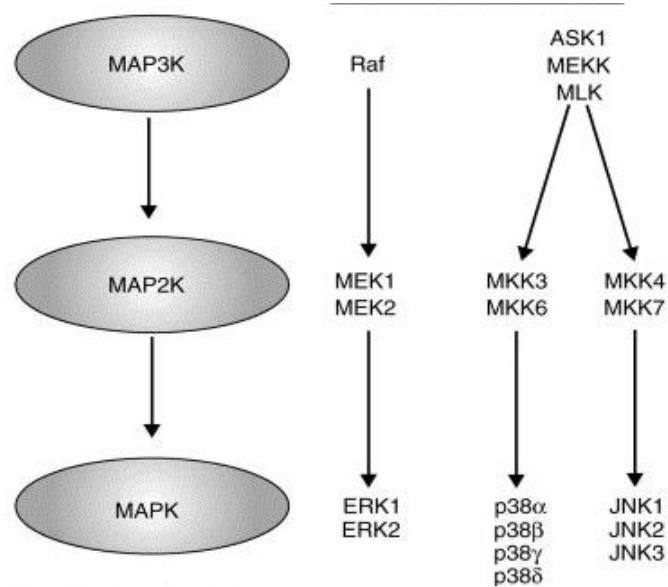


Figure 20 Signalisation MAPK ciblée par la β-arrestine-2
D'après (Miller and Lefkowitz, 2001)

La liaison du DHA à GPR120 des macrophages inhibe l'inflammation induite par le LPS et le TNF α . Le DHA entraîne la dissociation de la β -arrestine 2 de GPR120 qui va interagir avec TAK1, inhibant son activité et les voies de signalisation pro-inflammatoires médiées par NF κ B et JNK. Ceci entraîne une augmentation de la production de molécules et cytokines associées à un phénotype M2 telles que l'arginase 1 ou l'IL-10 et une inhibition de la production de cytokines associées à un phénotype M1 telles que l'IL-6 ou l'IL-1 β (Oh *et al.*, 2010). Une autre étude met également en avant les propriétés anti-inflammatoires du DHA *via* GPR120, par sa liaison au récepteur le DHA va inhiber l'activation de la cyclooxygénase 2 (COX2) et ainsi diminuer la production de PGE2 dans les RAW264.7 et des macrophages péritonéaux (Li *et al.*, 2013).

Plusieurs études ont montré une implication des récepteurs GPR40 et 120 dans la progression tumorale, la migration ou les métastases. Chacun de ses récepteurs ne semble pas avoir un rôle clairement défini dans la progression tumorale. Ainsi, suivant le ligand et le type de tumeur, ils vont avoir ou un rôle pro- ou anti-tumoral. Par exemple, Fukushima *et al.* ont montré que la perte de GPR40 dans des cellules cancéreuses pancréatiques favorisait la migration de ces cellules alors que la perte de GPR120 inhibait leur migration, après stimulation avec leur agoniste GW9508 (Fukushima *et al.*, 2015). A l'inverse, ces mêmes auteurs montrent que l'inhibition de l'expression de GPR120 par ARN interférents dans des cellules de mélanome favorise leur migration alors que l'inhibition de GPR40 l'inhibe (Fukushima *et al.*, 2016). Différents rôles des GPR40 et 120 dans l'invasion et les métastases en fonction du type tumoral sont illustrés en figure 21. Ces récepteurs

peuvent également être impliqués dans la prolifération des cellules cancéreuses, une étude montre qu'une nouvelle voie de signalisation DHA/EPA-GPR40/120 pourrait être liée à l'inhibition de la prolifération cellulaire, induite par les AGPI n-3 et à la promotion de l'apoptose dans les cellules de cancer colorectal, ce mécanisme pourrait expliquer l'action anti-cancéreuse des AGPI n-3 (Zhang *et al.*, 2016a). Néanmoins, l'implication de GPR120 dans la signalisation du DHA n'explique pas entièrement l'effet anti-tumorale du DHA, en effet, une étude montre que les AGPI n-3 inhibent dans les mêmes proportions la croissance tumorale de cellules cancéreuses mammaires transplantées dans des souris sauvages et des souris KO pour GPR120, suggérant donc que les AGPI n-3 exercent un effet anti-tumoral indépendamment de GPR120 (Chung *et al.*, 2015). Il est également important de souligner que GPR120 semble aussi impliqué dans le processus de résistance à certaines chimiothérapies. En effet, les chimiothérapies à base de platine vont favoriser la production de l'acide hexadeca-4,7,10,13 tétraénoïque (C16:4 n-3, HDTA) qui va contribuer à limiter l'efficacité de ces chimiothérapies (Roodhart *et al.*, 2011). Le HDTA induit par les sels de platine va se lier aux GPR120 présents sur les macrophages et induire la production de lysophosphatidylcholine 24:1 qui va protéger les cellules contre les dommages à l'ADN, l'utilisation d'antagonistes de GPR120 améliore l'effet des chimiothérapies (Houthuijzen *et al.*, 2017).

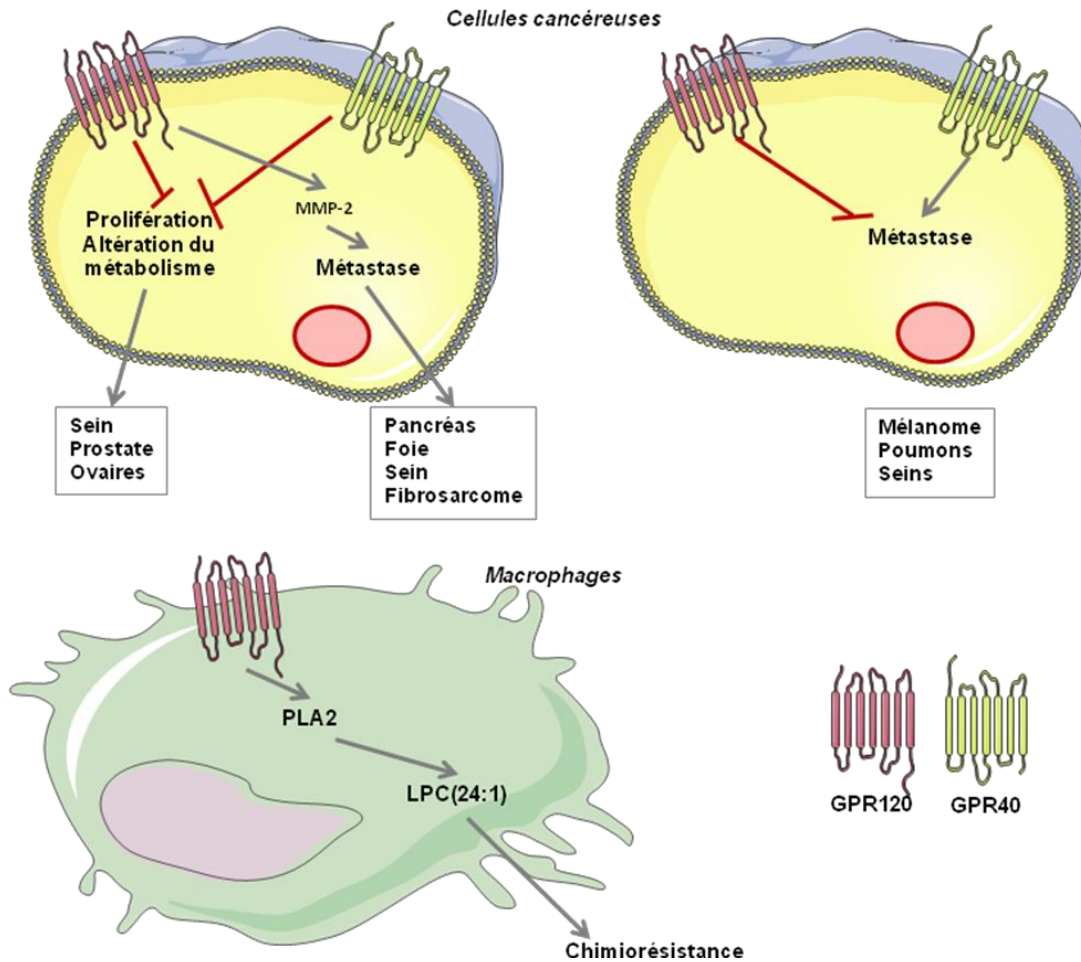


Figure 21 Implication des récepteurs GPR40 et GPR120 selon le modèle cellulaire et le type de cancer (Houthuijzen, 2016)

b. [Le récepteur CD36](#)

La protéine CD36 est une protéine membranaire se liant avec une forte affinité aux AGLC et facilite leur transport à l'intérieur des cellules. Elle a aussi été nommée Fatty Acid Translocase (FAT). Cette protéine possède une structure membranaire en épingle à cheveux avec un large domaine extracellulaire, 2 domaines transmembranaires et 2 domaines cytoplasmiques. Sa structure primaire est hautement conservée chez les mammifères et des analogues de CD36 ont été retrouvés chez la Drosophile (Smith, 2012). CD36 est un scavenger receptor exprimé dans de nombreuses cellules de mammifères, préférentiellement au niveau : des plaquettes sanguines, des cellules de l'endothélium vasculaire, des cellules immunitaires (macrophages, monocytes), certains types de neurones ainsi qu'au niveau intestinal (majoritairement dans les entérocytes mais également dans certaines cellules entéroendocrines) et les bourgeons du goût, lui conférant

un rôle dans beaucoup de processus physiologiques comme l'angiogenèse, l'inflammation, l'athérosclérose, le comportement ou encore le métabolisme lipidique (Silverstein and Febbraio, 2009). CD36 a été tout d'abord identifié comme étant un transporteur d'AGLC au niveau des cellules cardiaques (Tanaka *et al.*, 2001). L'utilisation d'un inhibiteur de CD36, le Sulfo-N-succinimidyl oleate (SSO), capable de se fixer sur le même site de liaison que les AGLC, entraîne une diminution du captage des AGLC au niveau musculaire ainsi qu'une diminution du captage des LDL oxydés par les macrophages (Kuda *et al.*, 2013). CD36 est également impliqué dans le captage des AGLC au niveau de la mitochondrie et joue un rôle dans la régulation de l'oxydation des lipides au cours de l'effort (Campbell *et al.*, 2004; Holloway *et al.*, 2006, 2009). L'expression de CD36 semble modulée dans le cancer et cette protéine pourrait jouer un rôle dans la progression tumorale. Néanmoins son rôle n'est pas clairement défini et dépend du modèle d'étude. En effet, une faible expression de CD36 est corrélée à une forte capacité de migration des cellules cancéreuses dans le cancer du côlon, de l'ovaire et du sein (Rachidi *et al.*, 2013). A l'inverse, une étude récente montre que CD36 est aussi largement impliqué dans le phénomène de métastase, la surexpression de CD36 dans des cellules à faible potentiel métastatique entraîne l'augmentation de la croissance tumorale au site primaire et l'apparition de métastases ganglionnaires dans des modèles de souris immunodéficientes ou immunocompétentes. Enfin l'utilisation d'un anticorps bloquant CD36, provoque une inhibition presque complète des métastases du cancer de la bouche chez l'Homme (Pascual *et al.*, 2017). De plus, une autre étude montre que les adipocytes de l'*omentum* vont être responsables de la surexpression de CD36 au niveau des cellules cancéreuses ovariennes, leur permettant une plus grande capture d'AGLC et ainsi soutenir leurs besoins énergétiques essentiels à leur prolifération (Ladanyi *et al.*, 2018).

2. Facteurs de transcription dont l'activité est dépendante des AGPI n-3

a. Les récepteurs nucléaires activés par les proliférateurs des peroxyosomes (PPAR)

Les PPAR sont des facteurs de transcription activés par interaction avec un ligand, dont les AGPI tel que le DHA. Il existe trois isoformes de PPAR : PPAR α , PPAR β/δ et PPAR γ .

PPAR α est exprimé principalement dans le foie, les reins, le coeur, les muscles et le tissu adipeux brun où il est responsable de l'induction des gènes de la lipolyse. PPAR β/δ est ubiquitairement exprimé et régule l'expression des gènes impliqués dans la β -oxydation. Tandis que PPAR γ est principalement exprimé par les cellules du tissu adipeux blanc où il est impliqué dans la différenciation adipocytaire et régule les gènes impliqués dans le stockage des lipides. Après

fixation d'un ligand, les PPAR peuvent former des hétérodimères avec RXR et LXR. La dimérisation avec RXR induit la liaison de PPAR à son élément de réponse (PPRE) sur le promoteur du gène cible impliqué notamment dans le métabolisme, l'adipogenèse et l'inflammation (Varga *et al.*, 2011). Les PPAR sont également impliqués dans la prolifération des cellules cancéreuses. PPAR α et PPAR γ possèdent des propriétés anti-tumorales (Peters *et al.*, 2012). En effet, leur activation par des ligands agonistes (troglitazone et bezafibrate) inhibe l'inflammation et la carcinogénèse colorectale chimioinduite chez des rats. Ces résultats démontrent que l'activation de PPAR α et γ dans le cancer colorectal permet de stopper la prolifération et/ou de faire entrer les cellules cancéreuses en apoptose. Le rôle de PPAR β/δ est plus controversé dans l'oncogénèse mais plusieurs résultats tendent à démontrer qu'il favoriserait la tumorigénèse en activant la prolifération cellulaire (Tachibana *et al.*, 2008).

Les AGPI n-3 étant des ligands des PPAR, ils peuvent moduler leurs activités transcriptionnelles permettant d'inhiber la prolifération cellulaire et d'entraîner l'apoptose des cellules cancéreuses (Shen *et al.*, 2007). Ces récepteurs nucléaires sont également impliqués dans les propriétés anti-tumorales des AGPI n-3. En effet, le DHA active PPAR γ et inhibe PPAR β/δ conduisant à une réduction de la prolifération de cellules de cancer du sein (Sun *et al.*, 2008; Wannous *et al.*, 2013). De plus, notre équipe de recherche a démontré que l'activation de PPAR γ par le DHA limite la croissance de cellules de mélanome (B16) et de cellules cancéreuses mammaires (4T1) chez des souris. En effet, le DHA active PPAR γ dans les cellules T pour inhiber la phosphorylation de STAT3 qui est impliquée dans l'expression de ROR γ C et d'IL-17 : facteurs clés de la différenciation et de l'activité des Th17 (Berger *et al.*, 2013a).

b. NF κ B

Le facteur de transcription NF κ B est impliqué dans la réponse immunitaire et inflammatoire. Il joue également un rôle clé dans certains cancers, tel que le cancer colorectal. En effet il est responsable de l'induction de l'expression de gènes pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α) et anti-apoptotiques (Bcl-2, c-FLIP, cIAPs) (Greten and Karin, 2004). L'effet anti-inflammatoire du DHA se traduit par une inhibition de NF κ B et induit l'apoptose de cellules cancéreuses coliques (Hofmanová *et al.*, 2014). Le DHA a été décrit comme inhibiteur de NF κ B de manière dépendante et indépendante de PPAR γ . En effet, une inhibition de PPAR γ avec un antagoniste (GW9662) abolit l'inactivation de NF κ B par le DHA (Zand *et al.*, 2008). PPAR γ est capable d'interagir avec NF κ B pour prévenir sa translocation nucléaire ou induire sa dégradation par le protéasome. Par exemple, le traitement de cellules cancéreuses coliques HT-29 avec un ligand de PPAR γ (ciglitazone),

augmente son interaction avec NFκB, inhibe l'activité transcriptionnelle de NFκB et augmente l'apoptose des cellules cancéreuses. Par ailleurs, l'interaction de PPARγ avec NFκB peut aboutir à son ubiquitination et à sa dégradation par le protéasome grâce à l'activité E3 ubiquitine ligase de PPARγ. En effet, des ligands de PPARγ (troglitazone et pioglitazone) induisent l'ubiquitination et la dégradation de NFκB conduisant à une diminution d'expression de COX-2 et IL-1β associée à une réduction de la croissance tumorale de xénogreffes HT-29 chez des souris Nude (Hou *et al.*, 2012b). Le DHA peut interagir avec NFκB en augmentant la phosphorylation et la dégradation d'IκB entraînant une réduction de la translocation nucléaire de NFκB (Singer *et al.*, 2008).

3. Les micro-ARN : miR-21

Les microARN sont des ARN non codants de 21 à 25 nucléotides qui contrôlent l'expression génique au niveau post-transcriptionnel. Plusieurs centaines de gènes codant pour des microARN ont été identifiés chez les animaux, et une quarantaine chez les plantes. Certains de ces gènes sont conservés entre espèces et parfois même entre *phyla*. Ces microARN régulent l'expression génique en s'appariant avec des ARNm cibles dont ils sont partiellement complémentaires. Cette hybridation réprime la traduction de la protéine correspondante ou clive l'ARNm cible au milieu du site de fixation du microARN. Ce dernier mécanisme est très similaire à celui mis en œuvre lors de l'interférence par ARN.

MiR-21 est un microARN exprimé par les cellules cancéreuses et sécrété dans le microenvironnement tumoral où il peut agir au sein des cellules du stroma, son expression peut être inhibée par le DHA (Bullock *et al.*, 2015). De plus, il semblerait que miR-21 puisse agir comme un ligand des récepteurs TLR à la surface des cellules immunitaires et ainsi induire la voie NFκB conduisant à l'expression et à la sécrétion de cytokines inflammatoires favorisant la progression tumorale (Fabbri *et al.*, 2012; Patel and Gooderham, 2015). Notre équipe de recherche a démontré que le DHA, par l'activation des kinases AMPKα et RIP1 déclenche la translocation nucléaire du facteur de transcription FOXO3a permettant sa fixation sur le promoteur de miR-21 diminuant ainsi l'expression de ce microARN. miR-21 va alors perdre sa capacité à dégrader l'ARNm du TNFα qui va alors pouvoir être sécrété et entraîner, par action autocrine, la mort par apoptose des cellules cancéreuses coliques. L'utilisation d'anticorps neutralisant l'action autocrine du TNFα sur les cellules cancéreuses prévient l'effet pro-apoptotique du DHA et abolit l'effet anti-cancéreux observé dans des souris nude avec tumeurs HCT-116 sous régime DHA (Fluckiger *et al.*, 2016). L'inhibition de miR-21 par le DHA pourrait permettre de bloquer le dialogue entre les cellules

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

D'autres travaux ont également montré une inhibition de microARN par les AGPI n-3, impliquée dans la résolution de l'inflammation. Dans des macrophages, les AGPI n-3 vont réguler l'expression de miR-21, miR-146-b et miR-129 qui sont impliqués, respectivement dans les voies de signalisation médiées par PDCD4, NF κ B et 5-LOX (Visioli *et al.*, 2012).

E. AGPI n-3 et inflammasome NLRP3

Les AGPI n-3 limiteraient le développement tumoral par leurs actions anti-inflammatoires en réduisant la production de TNF α , IL-1 β et IL-18 dans un modèle de colite (Gravaghi *et al.* 2011) et l'infiltration de macrophages et lymphocytes T au sein de la muqueuse intestinale dans un modèle murin de cancer associé à une colite (Jia Q *et al.* 2008). Bien que les AGPI n-3 diminuent la production de l'IL-1 β et IL-18, aucun lien avec la régulation de l'inflammasome n'a été évalué dans un contexte tumoral. Pourtant, EPA et DHA ont été décrits comme inhibiteurs de l'inflammasome NLRP3 dans des macrophages dans un modèle de diabète de type 2 (Yan *et al.*, 2013). Cette étude démontre que les AGPI n-3 sont capables d'inhiber l'activation de la caspase-1 ainsi que la sécrétion d'IL-1 β dans des macrophages (BMDM ou THP1) induite par différents activateurs de l'inflammasome NLRP3. L'apport en AGPI n-3 au cours d'un régime riche en graisse, prévient le développement de l'insulino-résistance et améliore la tolérance au glucose chez les animaux suivant ce régime. Les chercheurs montrent que les effets des AGPI n-3 sont abrogés dans des souris NLRP3 $^{-/-}$ et expliquent que les AGPI n-3 se lient aux récepteurs GPR120 et GPR40. Cette liaison entraîne l'interaction entre NLRP3 et la β -arrestine 2 expliquant la diminution de l'activation de l'inflammasome NLRP3. D'autres études montrent que les AGPI n-3 peuvent également intervenir au niveau du signal de priming de l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Martínez-Micaelo *et al.*, 2016; Williams-Bey *et al.*, 2014). Williams-Bey *et al.* montrent, en effet, que le DHA par sa liaison à GPR120 active la β -arrestine 2, qui induit une diminution de la translocation nucléaire de la sous-unité p62 de NF κ B entraînant alors une inhibition de l'expression de la proforme de l'IL- β . Cette étude montre aussi qu'un traitement par le DHA

entraîne l'induction de l'autophagie dans les macrophages qui est corrélée avec une inhibition de la sécrétion de l'IL- β (Williams-Bey *et al.*, 2014). Une autre étude met également en avant un lien entre AGPI n-3, autophagie et régulation de l'inflammasome NLRP3. Shen *et al.* montrent qu'un régime enrichi en AGPI n-3, comparé à un régime riche en huile de palme, permet une augmentation de l'expression de LC3-II et une inhibition de l'activité caspase-1 et de la sécrétion d'IL-1 β dans les macrophages péritonéaux (Shen *et al.*, 2017).

Les AGPI n-3 peuvent également être captés par la translocase CD36. Il a été démontré que CD36 est indispensable à la sécrétion d'IL-1 β au niveau des macrophages *via* NLRP3 (Sheedy *et al.*, 2013). En effet, CD36 a la capacité de capter des ligands solubles extra-cellulaires, comme les LDL oxydés ou les plaques amyloïdes, et de les internaliser. Ces ligands une fois à l'intérieur de la cellule vont être transformés en « cristaux » et induire une perméabilisation lysosomale puis une activation de l'inflammasome NLRP3. Il a également été montré que CD36 agit comme co-récepteur de TLR4 et TLR6, et que le priming de NLRP3 par les LDLox nécessite l'hétérotrimère TLR4-TLR6-CD36 (Sheedy *et al.*, 2013). La reconnaissance des pathogènes et notamment de l'acide lipoteichoïque dérivé de *Staphylococcus* et les lipoprotéines diacylées nécessite la formation d'un complexe entre TLR2, TLR6 et CD36 pour activer les voies de signalisation à l'origine de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-6, IL-1 β) (Hashimoto *et al.*, 2006; Silverstein and Febbraio, 2009; Triantafilou *et al.*, 2006). Le récepteur CD36 peut également induire une réponse pro-inflammatoire à une infection bactérienne indépendamment d'une coopération avec les récepteurs TLR mais en induisant des voies de signalisation dépendantes de JNK (Baranova *et al.*, 2008). Bien que les AGPI n-3 puissent être des ligands de CD36, aucun lien n'a été, pour l'heure, établi entre ces AG et la régulation de l'inflammasome NLRP3 *via* la signalisation par CD36.

Nous avons vu, que dans un contexte tumoral, des études démontrent que l'injection d'agent chimiothérapeutique tel que le 5-FU chez des souris porteuses de tumeurs suivant un régime riche en oméga-3, permet la sensibilisation des cellules aux traitements. Les modalités de l'action anti-cancéreuse des acides gras n-3 ont été expliquées par leurs propriétés anti-prolifératives contre la cellule cancéreuse, en inhibant notamment les voies des MAPK. De plus, les AGPI n-3 activent les voies de l'apoptose, répriment l'expression de VEGF et possèdent une action anti-inflammatoire. Nous avons également évoqué que l'action limitée des agents chimiothérapeutiques comme le 5-FU était dépendante de cellules du micro-environnement tumoral et en particulier de cellules immunitaires pro-tumorales, les MDSC sous la dépendance de

l'inflammasome NLRP3. La combinaison des faits reportés sur la participation des AGPI n-3 dans le contrôle de la progression tumorale, sur leur association bénéfique dans les protocoles de thérapies anti-cancéreuses ainsi que dans le contrôle de l'inflammation fait de ces molécules de potentiels candidats pour améliorer l'efficacité de l'agent anti-cancéreux 5-FU pouvant contrecarrer l'activation de l'inflammasome NLRP3 et la sécrétion d'IL-1 β induits par le 5-FU.

Hypothèse et objectif du projet

Nos travaux font suite à plusieurs études menées au sein de notre équipe, tout d'abord Vincent *et al.* ont démontré que la chimiothérapie 5-FU était capable d'éliminer de façon spécifique des cellules myéloïdes immunosuppressives (MDSC), sans affecter les autres cellules du système immunitaire, et que cette élimination participait aux effets thérapeutiques bénéfiques du 5-FU (Vincent *et al.*, 2010b). Puis Bruchard *et al.* ont montré que cette chimiothérapie n'offrait qu'un effet thérapeutique à court terme qui était suivi par une reprise de la croissance tumorale, due à une mise en place d'une résistance au 5-FU. Cette résistance est médiée par l'activation, par le 5-FU, de l'inflammasome NLRP3 dans les MDSC. Cette activation entraîne la sécrétion d'IL-1 β par les MDSC générant un environnement inflammatoire propice à l'installation de population CD4+ pro-tumorales (Th17) et à la reprise de la croissance tumorale (Bruchard *et al.*, 2013).

Les acides gras oméga-3 ont, par leurs propriétés anti-inflammatoires, pourraient donc être utilisées pour diminuer l'inflammation induite par les MDSC suite à une chimiothérapie et ainsi diminuer la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires dans le microenvironnement empêchant la reprise tumorale.

Ainsi, les objectifs de ce projet ont été (figure 22) :

- De démontrer la pertinence d'une association thérapeutique entre 5-FU et le DHA pour contrôler l'activation de l'inflammasome NLRP3 et la production de l'IL-1 β par les MDSC.
- De définir les mécanismes moléculaires régissant l'inhibition de la production de l'IL-1 β et l'activité de l'inflammasome NLRP3 dans ce contexte.

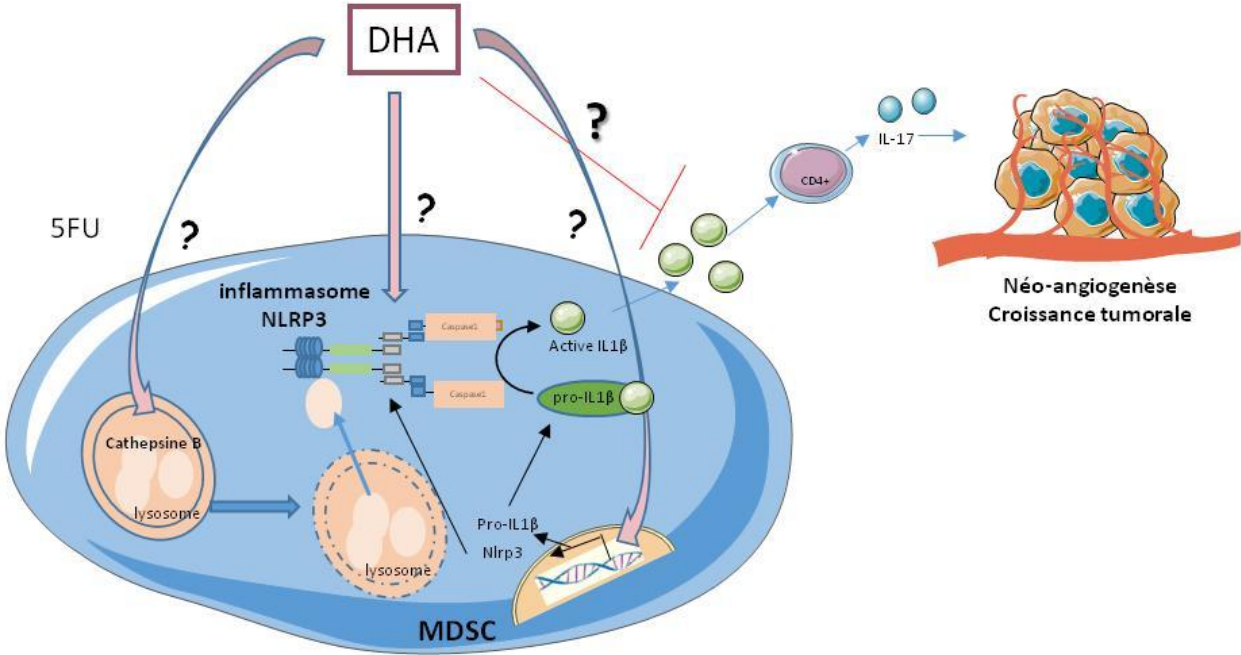


Figure 22 Schéma d'hypothèse du projet de thèse

Résultats

I. Rappel introductif

L'anti-métabolite 5-Fluorouracile (5-FU) appartient à la famille des fluoropyrimidines et fut synthétisé pour la première fois en 1957 par Heidelberger et Duschinsky (Duschinsky *et al.*, 1960). Cet agent anti-cancéreux demeure encore aujourd'hui le socle de régimes chimiothérapeutiques contre les cancers solides et principalement dans les cancers colorectaux (CRC). Les patients avec un CRC avancé se voient proposer une thérapie 5-FU en combinaison avec l'acide folinique et un agent cytotoxique oxaliplatine (régime FOLFOX) ou irinotecan (FOLFIRI). A ces cures chimiothérapeutiques sont associées une thérapie ciblée avec des anticorps anti-EGFR ou anti-VEGF pour les patients avec CRC métastatique. Malgré les effets bénéfiques de ces interventions thérapeutiques à base de 5-FU, le taux de survie sur le long terme de patients atteints de CRC métastatique reste encore trop modeste (Prenen *et al.*, 2013). La réponse à un traitement 5-FU pourrait être améliorée par la levée de résistances à l'effet cytotoxique initialement présentes ou acquises par la cellule cancéreuse. Le microenvironnement tumoral contribue également à restreindre l'effet anti-cancéreux du 5-FU par la production de l'IL-1 β suite à l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans les cellules myéloïdes immunosuppressives (MDSC) (Bruchard *et al.*, 2013). Cette sécrétion de l'IL-1 β induite par 5-FU soutient la différenciation des lymphocytes naïfs T CD4⁺ en lymphocytes Th17 pro-angiogéniques et conduit à la reprise de la progression tumorale malgré un effet anti-tumoral transitoire du 5-FU. L'enjeu thérapeutique est donc d'identifier de nouveaux agents anti-cancéreux prévenant l'induction de l'IL-1 β et/ou l'activation de sa voie de signalisation. Une récente étude clinique de phase 2 chez des patients atteints de CRC métastatique résistants aux chimiothérapies standard a montré qu'une chimiothérapie simplifiée constituée d'acide folinique et 5-FU associée à un anti-VEGF plus Anakinra (antagoniste de l'IL-1 β récepteur) semblerait prolonger la survie des patients jusqu'à 14,5 mois (Isambert *et al.*, 2018). La famille des acides gras oméga-3 à laquelle appartient l'acide docosahexaénoïque (DHA) présente des effets anti-cancéreux et anti-inflammatoires (Cockbain *et al.*, 2012). Cet acide gras est faiblement produit par l'organisme et est principalement apporté par une alimentation riche en poissons et dérivés. De nombreuses études rapportent que les huiles de poissons contenant principalement des acides gras oméga-3 diminuent le risque de développer un CRC et augmentent également la période sans la reprise tumorale ou la survie globale des patients (Song *et al.*, 2017a; Van Blarigan *et al.*, 2018). Ces effets bénéfiques liés à la consommation d'acides gras oméga-3 sont attribuables à des effets post-opératoires réduits et une meilleure

qualité de vie mais également par une réponse accrue aux régimes chimiothérapeutiques standard à base de 5-FU (Camargo *et al.*, 2016; Van Blarigan *et al.*, 2018).

L'objectif de ce travail de thèse fut donc d'évaluer l'effet du DHA sur la réponse au traitement 5-FU dans un modèle pré-clinique de cancer murin et sur l'activation de la sécrétion de l'IL-1 β par les MDSC suite à la chimiothérapie. Enfin, l'accès à des prélèvements sanguins de patients atteints de CRC métastatique avant et après leur cure chimiothérapeutique à base de 5-FU nous a permis de déterminer l'association entre la teneur en DHA plasmatique et l'induction de l'IL-1 β ou de l'activité caspase-1 dans les MDSC.

Nous avons montré par des approches *in vitro* et *vivo* que l'apport en DHA diminuait la sécrétion de l'IL-1 β induite par le traitement 5-FU. En corollaire de cette donnée, nous avons observé que les souris porteuses de tumeurs traitées par une seule injection de 5-FU voyaient une reprise de la croissance tumorale après régression transitoire plus marquée que pour les souris co-traitées par 5-FU et DHA. Le DHA agit sur la diminution de la sécrétion de l'IL-1 β par les MDSC en réprimant la formation et l'activation de l'inflammasome NLRP3 mais également en réduisant l'activation de JNK dépendante de la production de ROS. Pour conforter l'intérêt clinique du DHA chez les patients atteints de CRC avancés, nous avons identifié une corrélation inverse entre la teneur en DHA et l'induction de l'IL-1 β ou de l'activité caspase-1 dans les MDSC HLA-DR⁺ CD33⁺ CD15⁺.

Les données collectées ont permis de préciser le mécanisme cellulaire et moléculaire améliorant l'effet anti-cancéreux d'une chimiothérapie 5-FU et soutiennent l'idée qu'un apport nutritionnel en DHA pourrait être bénéfique aux patients atteints de CRC avancés.

II. Publication

Docosahexaenoic acid improves 5-Fluorouracil anti-cancer action through inhibition of NLRP3 inflammasome activity and JNK-dependent IL-1 β secretion in MDSC.

Adélie Dumont, Charlotte de Rosny, Trinh-Le-Vi Kieu, Sabrina Perrey, Hélène Berger, Aurélie Fluckiger, Tania Muller, Jean-Paul Pais de Barros, Aziz Hichami, Charles Thomas, Cédric Rébé, François Ghiringhelli and Mickaël Riolland.

Soumise à Oncogene.

Docosahexaenoic acid improves 5-Fluorouracil anti-cancer action through the inhibition of NLRP3 inflammasome activity and JNK-dependent IL-1 β secretion in MDSC.

Adélie Dumont^{1, 2}, Charlotte de Rosny^{1, 2}, Trinh-Le-Vi Kieu^{1, 2}, Sabrina Perrey², Hélène Berger^{1, 3}, Aurélie Fluckiger^{1, 2}, Tania Muller^{1, 2}, Jean-Paul Pais de Barros¹, Aziz Hichami^{1, 2}, Charles Thomas^{1, 2}, Cédric R  b  ^{1, 4}, François Ghiringhelli^{1, 3, 4} and Mickaël Rialland^{1, 2}.

¹ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) UMR 1231, Dijon, 21000, France.

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

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

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

Running title: DHA inhibits NLRP3 activity and IL-1 β secretion in MDSC

Corresponding author: Micka  l Rialland, Université Bourgogne Franche-Comté, INSERM UMR 1231, 6 boulevard Gabriel, Dijon, 21000, France. Tel: +33 (0)3 80 39 63 14. Fax: +33 (0)3 80 39 63 30. E-mail: mickael.rialland@u-bourgogne.fr

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

Abstract

A limitation to 5-Fluorouracil (5-FU) anti-cancer efficacy relies on the secretion of IL-1 β by myeloid-derived suppressor cells (MDSC) according to a previous pre-clinical report. The release of mature IL-1 β originates from 5-FU-mediated NLRP3 activation with increased caspase-1 activity in MDSC and sustains tumor growth recovery in 5-FU-treated mice. Docosahexaenoic acid (DHA) belongs to omega-3 fatty acid family and harbors both anti-cancer and anti-inflammatory properties which might could improve 5-FU chemotherapy. Here, we demonstrate that DHA inhibits 5-FU-induced IL-1 β secretion produced by a MDSC cell line (MSC-2). In tumor-bearing mice treated with 5-FU, we showed that a DHA-enriched diet reduces circulating IL-1 β concentration and tumor recurrence after 5-FU injection. 5-FU treatment led to JNK activation in MDSC and JNK inhibitor SP600125 decreased IL-1 β secretion. Moreover, DHA was able to counteract 5-FU-mediated JNK activation in MDSC leading to the drop of IL-1 β release. In addition, we showed that DHA supplementation in 5-FU-exposed MDSC decreases caspase-1 activity along with a modification of the interactions between NLRP3 and caspase-1, ASC or β -arrestin-2. Unexpectedly, the regulation of caspase-1 activity by DHA was independent of JNK which suggests that DHA could control IL-1 β secretion through both NLRP3 inflammasome and JNK pathway. Interestingly, we found a negative correlation between DHA content in plasma and the induction of circulating IL-1 β level or caspase-1 activity in patients treated with 5-FU-based chemotherapy.

Together, these data provide new insights on the regulation of IL-1 β secretion by DHA and its potential benefit in 5-FU-based chemotherapy.

Keywords

Docosahexaenoic acid, MDSC, 5-FU, IL-1 β , NLRP3, JNK

Introduction

Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer worldwide and remains as one of the leading cause of cancer-related death with a high mortality rate at the advanced stages¹². In solid cancer including CRC, the anti-metabolite 5-Fluorouracil (5-FU) represents one of the most commonly used chemotherapeutic drug. In order to enhance its anti-tumoral effect, 5-FU is associated with different cytotoxic agents such as oxaliplatin (FOLFOX) or irinotecan (FOLFIRI). Although the 5-FU-based regimen improves the overall survival of patients, the effect of the chemotherapeutic cures remains modest in long-term survival in patients with metastatic CRC²⁷. A reason for the limited action of the 5-FU-based chemotherapy is a 5-FU-mediated cancer cell death resistance related to overexpression of proteins such as thymidylate synthase³⁶, cyclooxygenase-2²⁸ or lysophosphatidylcholine acyltransferase 2¹⁰. Furthermore, 5-FU plays an ambivalent role on myeloid-derived suppressive cells (MDSC) which impair innate and adaptative antitumor immune functions through the control of T lymphocytes, NK and dendritic cells³. MDSC are characterized by the expression of CD11b⁺Gr1⁺ and consist of CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^{low} polymorphonuclear (PMN-MDSC) and CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C^{high} monocytic MDSC (M-MDSC) subpopulations in mice. In humans, MDSC characterization is more challenging but could be minimally defined as M-MDSC with CD11b⁺, CD15⁻, CD33⁺, HLA-DR^{neg/low}, CD14⁺ markers and PMN-MDSC with CD11b⁺, CD15⁺, CD33⁺, HLA-DR^{neg/low}, CD14⁻ markers³. The dual role of 5-FU on MDSC comes from its ability on the one hand to eradicate pro-tumoral myeloid cells and alleviate anticancer immune suppression³⁴ and on the other hand to trigger IL-1 β secretion by 5-FU-treated MDSC sustaining tumor growth⁴. The 5-FU-induced IL-1 β release involves the activation of nucleotide-binding domain leucine-rich repeat pyrin domain containing receptor 3 (NLRP3) inflammasome by cathepsin-B after lysosomal permeabilization in MDSC. Secretion of IL-1 β

triggers Th17 differentiation and production of IL-17A which enhances neoangiogenesis and tumor recurrence ⁴.

NLRP3 inflammasome is a multiprotein complex which is able to sense pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) produced by invading pathogens and damage-associated molecular patterns (DAMPs) generated through endogenous stress conditions ¹⁹. It is accepted that two signals are required for NLRP3 inflammasome activation and formation. The first priming signal induces NF- κ B-dependent transcription of IL-1 β , IL-18, caspase-1 and NLRP3 genes and make them available for NLRP3 inflammasome action. The second signal triggered by extracellular stimuli (i.e. microbial components, ATP, uric crystals) leads to induction of various molecular mechanisms including lysosomal permeability, potassium efflux, mitochondrial ROS production which promote NLRP3 oligomerization and formation of NLRP3 inflammasome complex. The assembly needs interaction of NLRP3 with the adaptor ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing CARD) recruiting and activating the pro-caspase-1. After self-cleavage, active caspase-1 induces processing of pro-IL-1 β and pro-IL-18 into bioactive IL-1 β and IL-18 that are secreted through non-classical pathways since they lack a secretory leader sequence ²⁶.

Consumption of omega-3 fatty acids (ω -3 FAs) have clinically proven and well documented health benefits for the prevention and management of cancers ^{9, 14}. Docosahexaenoic acid (DHA) is among the most biologically active members of ω -3 FA family with anti-cancer, anti-inflammatory and immune modulatory properties ^{1, 13, 39}. Thus, DHA-enriched diet is inversely associated with ulcerative colitis and Crohn's disease and would reduce the risk of colon cancer in patients with this chronic inflammation disorders ^{20, Chan, 2014 #139}. Furthermore, increase content of DHA in preclinical mouse models of colon cancer also support an anti-inflammatory function correlated to its anti-neoplastic action ^{5, 15, 18}. DHA alone or in association with chemotherapeutic agents dampens cancer cell growth by promoting apoptosis

^{6, 13}. Moreover, DHA can modify cancer neoangiogenesis through the repression of vascular endothelial growth factor expression or its ability to limit the differentiation of CD4⁺ T lymphocytes into pro-angiogenic Th17 lymphocyte resulting in an inhibitory effect on tumor growth ^{1, 5}.

Here, we carried out pre-clinical studies to investigate the ability of DHA to improve anti-neoplastic action of 5-FU by limiting the release of IL-1 β by MDSC. Moreover, thanks to blood samples from patients with 5-FU-based chemotherapy, we evaluated the correlation between plasma DHA levels and circulating IL-1 β content as well as caspase-1 activity in MDSC.

Results

DHA decreases 5-FU-induced IL-1 β in MDSC and enhances 5-FU anti-cancer properties

A limitation to 5-FU anti-cancer action is attributed to the induction of IL-1 β release by MDSC. In order to improve the 5-FU efficacy, we evaluated the ability of DHA to reduce the production of IL-1 β in MDSC exposed to the chemotherapeutic agent 5-FU. First, we confirmed by ELISA in the murine MDSC cell line named MSC-2 that a treatment for 24 hours with 5-FU (1 μ M) led to an increase in IL-1 β secretion in MSC-2 culture medium (Fig. 1a). The combination of 5-FU treatment with acid docosaheptaenoic (DHA, 20 to 60 μ M) inhibited secretion of IL-1 β induced by 5-FU in a dose-dependent manner (Fig. 1a). The decrease in 5-FU-induced IL-1 β secretion upon DHA exposure was not associated to a change in IL-1 β gene expression. Indeed, although exposure to 5-FU (1 μ M) for 24 hours increased IL-1 β mRNA levels, the co-treatment with DHA did not reduce IL-1 β mRNA levels (Fig. S1a). Furthermore, DHA addition did not affect 5-FU-mediated cell death rate which suggest that the inhibition of 5-FU-induced IL-1 β release by DHA is not related to a decrease in cell death (Fig. S1b). Eicosapentaenoic acid (EPA) and DHA belong to ω -3 FA family and both fatty acids counteract 5-FU action whereas oleic (OA, 60 μ M) and linoleic acids (LA, 60 μ M) were not able to reduce IL-1 β release (Fig. 1b). Then, the efficacy of DHA to control 5-FU-mediated IL-1 β secretion was investigated in mice bearing EL4 tumors (Fig. 1c and 1d). A single intraperitoneal (IP) injection of 5-FU (50 mg/kg) has been performed 15 days after subcutaneous EL4 transplantation in mice fed a standard diet; As expected, a marked increase in plasma IL-1 β level was observed 48 hours following 5-FU treatment as compared to control mice (Fig. 1c). Noteworthy, mice bearing EL4 tumors fed a DHA diet for 5 days prior to 5-FU injection showed a decrease in plasma IL-1 β level compared to 5-FU-injected mice fed a standard diet (Fig. 1c). Furthermore, we

confirmed that 5-FU therapy eradicates MDSC in tumor-bearing mice³⁴ that is not impacted by co-treatment with DHA (Fig. S1c). In vivo, DHA-enriched diet did not drastically affect tumor growth compared to standard diet (Fig. 1d). By contrast, 5-FU injection in EL4 tumor-bearing mice fed either a standard diet or a DHA-enriched diet resulted in a transient tumor growth regression. Of note, DHA diet improved action of 5-FU and significantly limited the tumor growth recurrence compared to 5-FU and standard diet (Fig. 1d). In addition, we showed that two-daily injections of non-esterified free DHA in 5-FU-treated tumor-bearing mice promoted a more drastic tumor regression and delayed tumor growth recovery compared to 5-FU-treated mice (Fig. s4d). Together these data highlighted a down-regulation of 5-FU-induced IL-1 β secretion by DHA-treated MDSC and a potentiation of 5-FU therapy in DHA-supplemented tumor-bearing mice.

DHA inhibits IL-1 β secretion dependent on 5-FU-mediated JNK activation

JNK regulates NLRP3 inflammasome assembly and subsequent IL-1 β secretion in macrophages by phosphorylating NLRP3 and ASC^{16, 32}. First, we evaluated the ability of 5-FU to activate JNK. Then, we assessed the ability of DHA to prevent such activation in MDSC. The phosphorylation of JNK (p-JNK) in 5-FU-treated MSC-2 was detected 8 hours post-treatment to reach a maximum at 12 hours (Fig. 2a). Interestingly, co-treatment with DHA inhibited 5-FU-induced JNK phosphorylation in a dose-dependent manner whereas OA treatment was inefficient (Fig. 2b). We performed flow cytometry analysis of p-JNK in splenic CD11b⁺ Gr1⁺ MDSC obtained from EL4 tumor-bearing mice treated by 5-FU and fed a control or a DHA-enriched diet. The 5-FU treatment induced an increase of p-JNK in MDSC from tumor-bearing mice fed control diet whereas DHA-enriched diet significantly reduced 5-FU-induced p-JNK level in these cells (Fig. 2c). Since we highlighted activation of JNK pathway in 5-FU-treated MDSC and its inhibition by DHA, we investigated the ability

of JNK to regulate IL-1 β release in our model. Exposure to the inhibitor of JNK (SP600125) led to a decrease in IL-1 β release in cell culture supernatant of MSC-2 treated by 5-FU for 24 hours without affecting cell death rate (Fig. 2d-e and S2a).

5-FU-mediated ROS production triggers JNK activation in MDSC

We hypothesized that reactive oxygen species (ROS), lysosomal pathway or caspase activation induced by 5-FU action might lead to JNK phosphorylation. Inhibitors of lysosomal activity (Bafilomycin A1 and Chloroquin) and caspases (ZVAD) did not impact on p-JNK level in MSC-2 exposed to 5-FU (Fig. 3a). By contrast, the phosphorylation of JNK triggered by 5-FU originates from ROS production since the ROS scavengers N-acetyl-cysteine (NAC) and Tempol (Tpol) were both able to reduce p-JNK expression (Fig. 3a). Accordingly, IL-1 β secretion induced by 5-FU was repressed by NAC and Tempol in MSC-2 (Fig. 3b). Altogether these data suggested that DHA decreased IL-1 β release through repression of ROS-dependent phosphorylation of JNK in MDSC.

DHA decreases caspase-1 activity in 5-FU-treated MDSC independently of JNK pathway

Caspase-1 activity is induced in 5-FU-treated MDSC through the formation and activation of NLRP3 inflammasome⁴. Therefore, we investigated the expression of NLRP3 inflammasome components by western-blotting and we did not observe any significant change in their expression suggesting that the effect of DHA on 5-FU-induced caspase-1 activity would rather involve the assembly of NLRP3 inflammasome (Fig. S3a). Then, we analysed caspase-1 activity which is involved in the processing of pro-IL-1 β into mature IL-1 β . Exposure to 5-FU for 12 hours increased the percentage of active caspase-1 positive MSC-2 cells while combination with DHA limited the effect of 5-FU by reducing the

percentage of caspase-1 positive cells in a dose-dependent manner (Fig. 4a). Accordingly, the treatment with 5-FU in tumor-bearing mice fed a standard diet promoted caspase-1 activation in MDSC (CD11b⁺ Gr1⁺ cells) purified from spleen. By contrast, MDSC originating from tumor-bearing mice treated by 5-FU and fed a DHA-enriched diet presented a lower caspase-1 activity (Fig. 4b). We postulated that the down-regulation of NLRP3 inflammasome activation mediated by DHA could involve the JNK pathway. Unexpectedly, JNK inhibitor (SP600125 at 4 μ M and 10 μ M) did not decrease caspase-1 activity in 5-FU-treated MSC-2 (Fig. 4c) assessed at 12 hours; a time point where p-JNK reached its highest expression (Fig. 2a). This data evidences that DHA reduces NLRP3 inflammasome activity by a JNK-independent mechanism.

DHA decreases NLRP3 inflammasome assembly in 5-FU-treated MDSC

The induction of caspase-1 activity inside the NLRP3 inflammasome requires the formation of a multiprotein complex through the spatial arrangement between the NLRP3 protein and the scaffold protein ASC which allows their interaction²². We explored the formation of NLRP3 inflammasome by *in situ* proximity ligation assay (PLA). The number of cells with a positive PLA signal (at least one red dot in a cell) evidencing NLRP3-ASC or NLRP3-caspase-1 proximity increased in MSC-2 treated with 5-FU (1 μ M) compared to untreated MSC-2 (Fig. 5a and 5b). The mean of red dot number per cell also increased in 5-FU-treated MSC-2 (Fig. S4a). By contrast, the addition of DHA in 5-FU-treated MSC-2 inhibited the interaction between either NLRP3 and ASC or NLRP3 and caspase-1 (Fig. 5a-b and S4a). The lysosomal permeabilization induced by 5-FU controls the activation and formation of NLRP3 inflammasome through cathepsin-B release and its binding to NLRP3⁴. Therefore, we analysed lysosomal permeabilization with a lysotracker in MSC-2 and the interaction of NLRP3 and cathepsin-B by *in situ* PLA. We confirmed that 5-FU

treatment activates lysosomal permeabilization (Fig. S4b) and increases the proportion of cells with a positive PLA signal as well as the mean of red dot number per cell highlighting the interaction between NLRP3 and cathepsin-B (Fig. 5c and S4c). Noteworthy, the combination with DHA did not repress neither the lysosomal permeabilization (Fig. S4b) nor the NLRP3 and cathepsin-B interaction (Fig. 5c and S4c). The scaffold protein β -arrestin-2 was reported to interact with NLRP3 leading to the inhibition of NLRP3 inflammasome activity³⁸. Therefore, we evaluated the effect of DHA on the interaction between NLRP3 and β -arrestin-2. The co-treatment of MSC-2 with 5-FU and DHA increases PLA positive cells as compared to control or 5-FU-treated MSC-2 suggesting that DHA-mediated inhibition caspase-1 activity occurred through the binding of β -arrestin-2 to NLRP3 (Fig. 5d and S4d). Here, the results suggest that DHA inhibits the formation of NLRP3 inflammasome induced by 5-FU in MDSC in a cathepsin-B-independent and a β -arrestin-2-dependent manner.

DHA content is associated with active caspase-1 and IL-1 β levels in 5-FU-treated patients

We determined the percentage of plasma DHA prior to a 5-FU-based chemotherapy (D0) in patients with colorectal cancer (n=46) and we investigated the correlation with plasma IL-1 β level one day after the chemotherapy (D1). The analysis of DHA content compared to 5-FU-mediated change of IL-1 β level in all patients did not lead to a significant correlation between these two parameters (Fig. S5a). By focusing on 5-FU-treated patients with an increase of IL-1 β level (n=26), we found a negative correlation between plasma DHA content and IL-1 β increase (Fig. 6a). The association between the plasma DHA content and active caspase-1 change (D0 and D1) in circulating MDSC of the patients treated with a 5-FU-containing chemotherapeutic regimen did not give a significant result

(data not shown). We also focused on patients with post-chemotherapeutic increased caspase-1 activity (Fig. S5c and S5d) and we showed a negative correlation between plasma DHA content and caspase-1 activity increase in HLA-DR⁻ CD33⁺ CD15⁺ MDSC (Fig. 5b and 5c).

Discussion

IL-1 β production contributes to cancer development and progression but also limits the anti-cancer effect of 5-FU through NLRP3 inflammasome activation in MDSC^{4, 8, 21, 40}. In NLRP3^{-/-} and IL-1 β ^{-/-} mice models, the treatment with 5-FU shows a long term tumor growth regression⁴. Therefore, the inhibition of NLRP3 inflammasome activity and/or IL-1 β secretion constitutes a way to correct 5-FU ambivalent action in cancer patients. In the present study, we found a negative association between plasma DHA content before treatment and induction of IL-1 β secretion or caspase-1 activity in HLA-DR⁻ CD33⁺ CD15⁺ cells from 5-FU-treated patients. Pre-clinical data described in this study allow us to speculate that plasma DHA would limit the secretion of IL-1 β as well as the activation of caspase-1 induced by 5-FU in these patients and would improve their response to 5-FU. A recent phase II trial (IRAFU) suggested that the use of IL-1 receptor antagonist (Anakinra) together with 5-FU and bevacizumab (anti-VEGF) increased progression-free survival and overall survival for metastatic colorectal cancer patients¹⁷. However, 78% of patients showed therapy-related grade 3 toxicity (neutropenia, diarrhea, high blood pressure and hepatic cholestasis)¹⁷. By contrast, omega-3 fatty acids such as DHA found in fish oils potentiated 5-FU-based therapy and reduced chemotherapy toxicities according to both epidemiological and pre-clinical studies^{7, 23, 29, 31, 33, 35, 37}. Nevertheless, the quality of fish oils seems to be important to obtain a positive effect on 5-FU action since the hexadeca-4,7,10,13-tetraenoic acid (16:4 n-3), a minor fatty acid found in fish oils, would limit efficacy of anti-cancer drugs such as 5-FU^{11, 30}. In this work, we demonstrated data demonstrating that highly purified DHA is able to enhance the anti-tumor efficacy of 5-FU in a murine cancer model by repressing 5-FU-induced IL-1 β secretion in MDSC under the control of NLRP3 inflammasome and JNK pathway. The maturation of bioactive IL-1 β in 5-FU-treated MDSC requires the activation of caspase-1 subsequently to NLRP3 inflammasome formation⁴. Here, we highlighted that

DHA inhibits the chemotherapeutic-induced NLRP3 inflammasome assembly evidenced by loss of NLRP3 and caspase-1 or ASC interaction leading to a decrease in caspase-1 activity in MDSC. NLRP3 inflammasome formation and activation in 5-FU-treated MDSC also requires lysosomal rupture and cathepsin-B release ⁴. DHA treatment did not prevent lysosomal rupture as well as interaction between NLRP3 and cathepsin-B. Such observations suggest that the regulation of NLRP3 inflammasome activity as evaluated by caspase-1 activity would involve an event subsequent to the interaction between cathepsin-B and NLRP3. The regulation of caspase-1 activity essential to IL-1 β maturation has been already described in DHA-treated macrophages exposed to LPS and nigericin ³⁸. The activation of G protein-coupled receptor 120 (GPR120) and GPR40 by DHA induces the binding of the downstream scaffold protein β -arrestin-2 on NLRP3 inflammasome leading to inhibition of caspase-1 activity ³⁸. In accordance with this previous report, we demonstrated using in situ PLA that DHA treatment increases the interaction between β -arrestin-2 and NLRP3 in 5-FU-treated MSC-2. Furthermore, GPR120 is expressed in MSC-2 (data not shown) and the GPR120- β -arrestin-2 pathway might reproduce the inhibition of NLRP3 inflammasome activity by DHA observed in macrophages.

Interestingly, we showed that 5-FU treatment triggers the activation of JNK pathway as evidenced by phosphorylation of JNK and its inactivation by SP600125 which blocked IL-1 β release. Prior publications reported the ability of JNK pathway to decrease IL-1 β secretion in inflammasome-activated macrophages. Indeed, JNK is involved in NLRP3 inflammasome activation and formation through the phosphorylation of NLRP3 and ASC ^{16, 32}. However, DHA-mediated JNK inactivation in MDSC did not appear to regulate NLRP3 activity since the inhibition of JNK pathway did not repress 5-FU-induced caspase-1 activity. Thus, the inactivation of JNK pathway by DHA would be involved in the inhibition of mature IL-1 β secretion step and independently of cell death since SP600125

did not change the rate of cell death induced by 5-FU. The regulation of IL-1 β release is a complex process and deserves further investigations. A critical point is the role of gasdermin D which once activated by caspase-1, contributes to IL-1 β secretion²⁴. Although the inhibition of ROS generation did not repress 5-FU-mediated caspase-1 activity in MDSC⁴, we showed here that IL-1 β secretion is controlled by 5-FU-generated ROS leading to activation of JNK independently of lysosomal and caspase activity. Such observations strengthen the hypothesis of a role for JNK in the step of mature IL-1 β secretion. The blockade of 5-FU-mediated JNK activation by DHA suggests a direct action on ROS production. However, we cannot exclude a supplementary mechanism involving β -arrestin-2 in the regulation of JNK. Indeed, the binding of the scaffold protein β -arrestin-2 onto TAB1 is able to inhibit JNK phosphorylation induced by TAK1 in LPS-treated macrophages²⁵ and might represent another mechanism for regulation of JNK-dependent IL-1 β secretion by DHA.

The present findings highlight DHA ability to regulate NLRP3 inflammasome activity and IL-1 β secretion dependent on JNK pathway in 5-FU-treated MDSC. Furthermore, we identified a negative correlation between plasma DHA level and increase in both circulating IL-1 β and caspase-1 activity in HLA-DR⁻ CD33⁺ CD15⁺ MDSC from patients with 5-FU-based chemotherapy. Altogether, our work suggests that DHA might have the potential to improve the anti-cancer effect of 5-FU chemotherapy.

Materials and methods

Reagents

Docosahexaenoic acid (DHA, C22:6 n-3), eicosapentaenoic acid (EPA, C20:5 n-3), oleic acid (OA, C18:1 n-9), linoleic acid (LA, C18:2 n-6), SP600125 (JNK inhibitor), N-acetyl-L-Cysteine (NAC), chloroquine (CQ), were purchased from Sigma-Aldrich. TEMPOL was obtained from Abcam (France), Bafilomycine A1 from Enzo (Enzo Life Sciences, France) and 5-FU from ACCORD.

Patients

Between October 2016 and July 2018 we collected whole blood from metastatic CRC patients ($n = 46$) at the Georges François Leclerc Cancer Center (Dijon, France). mCRC patients were diagnosed in our cancer center and received 5-Fluorouracil-based chemotherapy (mostly combination of 5-FU plus irinotecan or 5-FU plus oxaliplatin). All patients gave informed consent approved by the local Ethics Committee. The collection of blood sample is authorized by the French authorization (nr. AC2014-2460). No additional blood samples beyond those required for routine testing were taken. Whole blood of mCRC patients was sampled before (D0) and after one cycle of chemotherapy on EDTA-K2 tubes (BD Biosciences) for analysis.

Fatty acid analysis by GC-MS NCI

Twenty five microliters of plasma were spiked with 25 μ l of SI-Mix solution containing 1300 ng of myristic acid-d3, 5640 ng of palmitic acid-d3, 4200 ng of stearic acid-d3, 3252 ng of linoleic acid-d4, 5.2 ng of arachidic acid-d3, 2160 ng of arachidonic acid-d8, 54 ng of behenic acid-d3, 540 ng of DHA-d5, 26 ng of Lignoceric-d4 and 20 ng of cerotic acid-d4 in ethanol. Samples were further analyzed as previously described ².

Tumor growth, diet and 5-FU treatment

All studies with mice were conducted in accordance with the local guidelines for animal experimentation. Protocol no. 8821 was approved by the institutional animal care and use committee of Université de Bourgogne-Franche-Comté. To induce tumor formation, 10^6 EL4 cells were subcutaneously injected into female C57BL/6J mice (7-9 weeks) from Charles River Laboratories (France). Once tumors are measurable, EL4 tumor-bearing mice were randomly assigned to either a group of mice daily fed an isocaloric control diet with sunflower oil or a 3% DHA-enriched diet (Omegavie DHA90 TG, Polaris Nutritional Lipids, France). After one week of experimental diet, mice received a single intra-peritoneal injection of 5-FU at 50 mg per kg body weight (tumor size ~ 100 mm²). Tumor growth was monitored over the time and tumor surface was calculated according to the formula: length \times width.

Cell culture

MSC-2 cell line kindly provided by V. Bronte (Istituto Oncologico, Padova, Italy) is CD11b⁺/Gr-1⁺ immortalized MDSC obtained from BALB/c.

EL4 thymoma cells and MSC-2 cells were cultured at 37 °C under 5% CO₂ in RPMI 1640 with 10% (v/v) heat inactivated fetal bovine serum (FBS) penicillin, streptomycin, amphotericin B antibiotic cocktail, all from Dutscher (Dutscher, Brumath, France). Cell lines were authenticated by examination of morphology and growth characteristics and confirmed to be mycoplasma free. MSC-2 cells were treated with fatty acids (20 to 60 μ M) bound to fatty acid free-bovine serum albumin (ratio 4:1) (BSA, Sigma-Aldrich) 3 hours prior to 5-FU treatment at 1 μ M.

Western-blotting analysis

Protein lysates of MSC-2 were obtained with RIPA lysis buffer containing phosphatase and protease inhibitor cocktail (P2850 and P8340, Sigma-Aldrich). Total protein lysates were resolved by SDS-PAGE and analysed by western-blotting with the following antibodies: anti-IL-1 β (R&D systems, AF-401), anti- β -actin (Sigma-Aldrich, A1978), HRP-conjugated anti-goat and anti-mouse (Cell Signaling Technology).

For supernatant precipitation, MSC-2 cells were treated in Opti-MEM I Reduced Serum Medium (ThermoFisher Scientific) for 24 hours. Briefly, one volume of culture supernatant was precipitated with one volume of methanol and $\frac{1}{4}$ volume of chloroform. The mixture was vortexed and centrifuged at 16000 g for 10 minutes. The aqueous methanol layer was removed from the top of samples. The proteins remained at the phase boundary between the aqueous methanol layer and the chloroform layer. Two volumes of methanol were added, and then the mixture was vortexed and centrifuged at 16000 g for 10 minutes. The supernatant was removed without disturbing the pellet, and the pellet was dried under nitrogen gas. To finish, pellet was dissolved in 2X loading buffer, incubated 5 minutes at room temperature and then 5 minutes at 100°C. Total proteins were resolved by SDS-PAGE and analysed by western-blotting.

Caspase-1 activity

To assess caspase-1 activity in MSC-2, the FAM-YVAD-FMK fluorescent probe from Immunochemistry Technologies (Bio-Rad, Marnes-la-coquette, France) was used according to the manufacturer's instructions and as previously described ⁴.

To assess caspase-1 activity in CD11b⁺ Gr-1⁺ MDSC, spleens were collected from treated tumor-bearing mice. Then, they were manually dissociated and red blood cells were lysed (NH₄Cl 0.83%, KHCO₃ 0.1%, EDTA 0.1 mM). Cells were saturated by using mouse FcR blocking reagent (Miltenyi Biotec, Paris, France), then Gr-1⁺ MDSC was first purified by

using phycoerythrin-cyanine 7-conjugated anti-Gr-1 (RB6-8C5, Ozyme, France) and anti-Cyanine 7 microbeads (Miltenyi Biotec). Cells were incubated with the FAM-YVAD-FMK fluorescent probe according to the manufacturer's instructions and then MDSC were discriminated by using allophycocyanine (APC)-conjugated anti-CD11b (REA592) from Miltenyi Biotec for 20 minutes at 4°C, dead cells were excluded using 7-AAD staining.

To assess caspase-1 activity in MDSC from 5-FU-treated colorectal cancer (CRC) patients, 100 µL of heparinized whole blood obtained before and 24 hours after 5-FU treatment were incubated with the FAM-YVAD-FMK fluorescent probe according to the manufacturer's instructions. Then cells were stained with lineage cocktail PE-Vio770-conjugated anti-CD3 (BW264/56), anti-56 (REA196), anti-19 (REA675), and anti-20 (REA780), PE-conjugated anti-CD33 (REA775), Viogreen-conjugated anti-CD15 (VIMC6), APC-Vio770-conjugated anti-CD14 (TÜK4), and APC-conjugated anti-HLA-DR (AC122) antibodies and viabilityTM 405/452 fixable dye (Miltenyi Biotec) to exclude dead cells for 20 minutes at room temperature. After surface staining, 2 mL of red blood cells lysis/fixation solution (BD) was added for 10 minutes, cells were centrifuged (450 g for 10 minutes) and then resuspended in flow cytometry staining buffer (eBioscience, Fisher scientific, France).

All events were acquired by a BD LSR-II flow cytometer with BD FACSDiva software (BD), and data were analysed using FlowJo software (Tree Star).

JNK phosphorylation staining

MDSC (CD11b⁺ Gr-1⁺) from tumor-bearing mice were purified and surface labelled as described above. Cells were fixed and permeabilized using BD Cytofix/Cytoperm buffer (BD), washed with BD Perm/Wash buffer according to manufacturer's recommendations and saturated with Perm/Wash solution containing 5% BSA. Primary antibody against p-JNK (G-9, Ozyme, France) was incubated 1 hour at 4°C, washed and incubated 45 minutes at 4°C with

Alexa488 antibody to mouse IgG (A-11001, Life Technologies). MDSC were washed and resuspended in flow cytometry staining buffer (eBioscience, Fisher scientific, France). JNK phosphorylation in MDSC was determined via Median of Fluorescence Intensity using FlowJo software (Tree Star).

ELISA

IL-1 β concentration in cell culture media and plasma was measured using Mouse IL-1 beta/IL-1F2 DuoSet ELISA Kit or Human IL-1 beta/IL-1F2 Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, France) according to manufacturer's instructions.

Proximity Ligation Assay

Cells were fixed with 4% paraformaldehyde at 4°C for 10 minutes and permeabilized using a 3% BSA, 0.2% Saponin (Sigma Aldrich) for 20 minutes. Samples were incubated overnight at 4°C with primary antibodies (anti-NLRP3, anti-Caspase-1, anti-cathepsin-B, anti- β -arrestin-2). Cells were incubated with the appropriate probes (anti-Rabbit PLUS, #DUO92002; anti-Goat MINUS, #DUO92006 or anti-Mouse MINUS, #DUO92004) for one hour at 37°C. Probes were then ligated for 30 minutes at 37°C, washed twice and amplified using the manufacturer's polymerase for 100 minutes at 37°C in the dark. Cover glasses were mounted with a drop of mounting medium containing DAPI (Invitrogen). Microscopy images were taken on an Axio Imager 2 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany) equipped with an Apotome.2 module (Carl Zeiss GmbH). Images were acquired using an AxioCam MRm monochrome CCD camera (Carl Zeiss GmbH) with filter sets 43 HE (Rhodamine/Alexa568) and 49 (DAPI).

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm SD or SEM. Statistical analyses were performed using Prism (GraphPad). Normal distribution of data was determined using the d'Agostino Pearson test and statistical significance was defined by Kruskal-Wallis with Dunn's post hoc test or one-way ANOVA with Tukey's post hoc test. Spearman correlation was calculated between two groups. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; ns, non-significant.

Acknowledgements

The authors would like to thank the lipidomic platform and flow cytometry platform facilities of Université de Bourgogne. The authors are supported by grants from the Ligue Nationale contre le Cancer (M.R., F.G., C.R., A.D.), the Institut National du Cancer (INCan°2012-14) (F.G.), (ANR-11-LABX-0021), the Ligue Régionale contre le Cancer Comité Grand-Est (M.R., A.D.), Groupe Lipides et Nutrition (M.R.).

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- 1 Berger H, Vegran F, Chikh M, Gilardi F, Ladoire S, Bugaut H *et al.* SOCS3 transactivation by PPARgamma prevents IL-17-driven cancer growth. *Cancer research* 2013; 73: 3578-3590.
- 2 Blondelle J, Pais de Barros JP, Pilot-Storck F, Tired L. Targeted Lipidomic Analysis of Myoblasts by GC-MS and LC-MS/MS. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* 2017; 1668: 39-60.
- 3 Bronte V, Brandau S, Chen SH, Colombo MP, Frey AB, Greten TF *et al.* Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nature communications* 2016; 7: 12150.
- 4 Bruchard M, Mignot G, Derangere V, Chalmin F, Chevriaux A, Vegran F *et al.* Chemotherapy-triggered cathepsin B release in myeloid-derived suppressor cells activates the Nlrp3 inflammasome and promotes tumor growth. *Nature medicine* 2013; 19: 57-64.
- 5 Calviello G, Di Nicuolo F, Gragnoli S, Piccioni E, Serini S, Maggiano N *et al.* n-3 PUFAs reduce VEGF expression in human colon cancer cells modulating the COX-2/PGE2 induced ERK-1 and -2 and HIF-1alpha induction pathway. *Carcinogenesis* 2004; 25: 2303-2310.
- 6 Calviello G, Di Nicuolo F, Serini S, Piccioni E, Boninsegna A, Maggiano N *et al.* Docosahexaenoic acid enhances the susceptibility of human colorectal cancer cells to 5-fluorouracil. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 2005; 55: 12-20.
- 7 Camargo Cde Q, Mocellin MC, Pastore Silva Jde A, Fabre ME, Nunes EA, Trindade EB. Fish oil supplementation during chemotherapy increases posterior time to tumor progression in colorectal cancer. *Nutrition and cancer* 2016; 68: 70-76.
- 8 Carmi Y, Dotan S, Rider P, Kaplanov I, White MR, Baron R *et al.* The role of IL-1beta in the early tumor cell-induced angiogenic response. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2013; 190: 3500-3509.
- 9 Cockbain AJ, Toogood GJ, Hull MA. Omega-3 polyunsaturated fatty acids for the treatment and prevention of colorectal cancer. *Gut* 2012; 61: 135-149.
- 10 Cotte AK, Aires V, Fredon M, Limagne E, Derangere V, Thibaudin M *et al.* Lysophosphatidylcholine acyltransferase 2-mediated lipid droplet production supports colorectal cancer chemoresistance. *Nature communications* 2018; 9: 322.
- 11 Daenen LG, Cirkel GA, Houthuijzen JM, Gerrits J, Oosterom I, Roodhart JM *et al.* Increased Plasma Levels of Chemoresistance-Inducing Fatty Acid 16:4(n-3) After Consumption of Fish and Fish Oil. *JAMA oncology* 2015; 1: 350-358.
- 12 Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer* 2015; 136: E359-386.

- 13 Fluckiger A, Dumont A, Derangere V, Rebe C, de Rosny C, Causse S *et al.* Inhibition of colon cancer growth by docosahexaenoic acid involves autocrine production of TNFalpha 2016; 35: 4611-4622.
- 14 Geelen A, Schouten JM, Kamphuis C, Stam BE, Burema J, Renkema JM *et al.* Fish consumption, n-3 fatty acids, and colorectal cancer: a meta-analysis of prospective cohort studies. *American journal of epidemiology* 2007; 166: 1116-1125.
- 15 Han YM, Park JM, Cha JY, Jeong M, Go EJ, Hahm KB. Endogenous conversion of omega-6 to omega-3 polyunsaturated fatty acids in fat-1 mice attenuated intestinal polyposis by either inhibiting COX-2/beta-catenin signaling or activating 15-PGDH/IL-18. *International journal of cancer* 2016; 138: 2247-2256.
- 16 Hara H, Tsuchiya K, Kawamura I, Fang R, Hernandez-Cuellar E, Shen Y *et al.* Phosphorylation of the adaptor ASC acts as a molecular switch that controls the formation of speck-like aggregates and inflammasome activity. *Nature immunology* 2013; 14: 1247-1255.
- 17 Isambert N, Hervieu A, Rebe C, Hennequin A, Borg C, Zanetta S *et al.* Fluorouracil and bevacizumab plus anakinra for patients with metastatic colorectal cancer refractory to standard therapies (IRAFU): a single-arm phase 2 study. *Oncoimmunology* 2018; 7: e1474319.
- 18 Jia Q, Lupton JR, Smith R, Weeks BR, Callaway E, Davidson LA *et al.* Reduced colitis-associated colon cancer in Fat-1 (n-3 fatty acid desaturase) transgenic mice. *Cancer research* 2008; 68: 3985-3991.
- 19 Jo EK, Kim JK, Shin DM, Sasakawa C. Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation. *Cellular & molecular immunology* 2016; 13: 148-159.
- 20 John S, Luben R, Shrestha SS, Welch A, Khaw KT, Hart AR. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids and the aetiology of ulcerative colitis: a UK prospective cohort study. *European journal of gastroenterology & hepatology* 2010; 22: 602-606.
- 21 Krelin Y, Voronov E, Dotan S, Elkabets M, Reich E, Fogel M *et al.* Interleukin-1beta-driven inflammation promotes the development and invasiveness of chemical carcinogen-induced tumors. *Cancer research* 2007; 67: 1062-1071.
- 22 Misawa T, Takahama M, Kozaki T, Lee H, Zou J, Saitoh T *et al.* Microtubule-driven spatial arrangement of mitochondria promotes activation of the NLRP3 inflammasome. *Nature immunology* 2013; 14: 454-460.
- 23 Miyata H, Yano M, Yasuda T, Yamasaki M, Murakami K, Makino T *et al.* Randomized study of the clinical effects of omega-3 fatty acid-containing enteral nutrition support during neoadjuvant chemotherapy on chemotherapy-related toxicity in patients with esophageal cancer. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif)* 2017; 33: 204-210.

- 24 Monteleone M, Stanley AC, Chen KW, Brown DL, Bezbradica JS, von Pein JB *et al.* Interleukin-1beta Maturation Triggers Its Relocation to the Plasma Membrane for Gasdermin-D-Dependent and -Independent Secretion. *Cell reports* 2018; 24: 1425-1433.
- 25 Oh DY, Talukdar S, Bae EJ, Imamura T, Morinaga H, Fan W *et al.* GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell* 2010; 142: 687-698.
- 26 Piccioli P, Rubartelli A. The secretion of IL-1beta and options for release. *Seminars in immunology* 2013; 25: 425-429.
- 27 Prenen H, Vecchione L, Van Cutsem E. Role of targeted agents in metastatic colorectal cancer. *Targeted oncology* 2013; 8: 83-96.
- 28 Rahman M, Selvarajan K, Hasan MR, Chan AP, Jin C, Kim J *et al.* Inhibition of COX-2 in colon cancer modulates tumor growth and MDR-1 expression to enhance tumor regression in therapy-refractory cancers in vivo. *Neoplasia (New York, NY)* 2012; 14: 624-633.
- 29 Rani I, Vaiphei K, Agnihotri N. Supplementation of fish oil augments efficacy and attenuates toxicity of 5-fluorouracil in 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride/dextran sulfate sodium-induced colon carcinogenesis. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 2014; 74: 309-322.
- 30 Roodhart JM, Daenen LG, Stigter EC, Prins HJ, Gerrits J, Houthuijzen JM *et al.* Mesenchymal stem cells induce resistance to chemotherapy through the release of platinum-induced fatty acids. *Cancer cell* 2011; 20: 370-383.
- 31 Song M, Zhang X, Meyerhardt JA, Giovannucci EL, Ogino S, Fuchs CS *et al.* Marine omega-3 polyunsaturated fatty acid intake and survival after colorectal cancer diagnosis. *Gut* 2017; 66: 1790-1796.
- 32 Song N, Liu ZS, Xue W, Bai ZF, Wang QY, Dai J *et al.* NLRP3 Phosphorylation Is an Essential Priming Event for Inflammasome Activation. *Molecular cell* 2017; 68: 185-197.e186.
- 33 Van Blarigan EL, Fuchs CS, Niedzwiecki D, Ye X, Zhang S, Song M *et al.* Marine omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid and Fish Intake after Colon Cancer Diagnosis and Survival: CALGB 89803 (Alliance). *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 2018; 27: 438-445.
- 34 Vincent J, Mignot G, Chalmin F, Ladoire S, Bruchard M, Chevriaux A *et al.* 5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity. *Cancer research* 2010; 70: 3052-3061.
- 35 Volpato M, Hull MA. Omega-3 polyunsaturated fatty acids as adjuvant therapy of colorectal cancer. *Cancer metastasis reviews* 2018; 37: 545-555.

- 36 Wang W, McLeod HL, Cassidy J, Collie-Duguid ES. Mechanisms of acquired chemoresistance to 5-fluorouracil and tomudex: thymidylate synthase dependent and independent networks. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 2007; 59: 839-845.
- 37 Wynter MP, Russell ST, Tisdale MJ. Effect of n-3 fatty acids on the antitumour effects of cytotoxic drugs. *In vivo (Athens, Greece)* 2004; 18: 543-547.
- 38 Yan Y, Jiang W, Spinetti T, Tardivel A, Castillo R, Bourquin C *et al.* Omega-3 fatty acids prevent inflammation and metabolic disorder through inhibition of NLRP3 inflammasome activation. *Immunity* 2013; 38: 1154-1163.
- 39 Yum HW, Na HK, Surh YJ. Anti-inflammatory effects of docosahexaenoic acid: Implications for its cancer chemopreventive potential. *Seminars in cancer biology* 2016; 40-41: 141-159.
- 40 Zitvogel L, Kepp O, Galluzzi L, Kroemer G. Inflammasomes in carcinogenesis and anticancer immune responses. *Nature immunology* 2012; 13: 343-351.

Figure Legends

Fig. 1

IL-1 β secretion is reduced by DHA in 5-FU-treated MDSC. **a** MSC-2 were treated by 5-FU (1 μ M) for 24 hours +/- DHA (20 to 60 μ M) and cell culture media were collected for analysis of IL-1 β concentration by ELISA. Error bars represent mean \pm SD from four independent experiments. **b** Analysis of IL-1 β secretion by ELISA in MSC-2 treated with 5-FU (1 μ M) for 24 hours +/- DHA, eicosapentaenoic (EPA), oleic (OA) and linoleic (LA) acids at 60 μ M. Error bars represent mean \pm SD from 3-6 independent experiments. **c** Determination of IL-1 β content in EL4 tumor-bearing mice 48 hours after treatment with 5-FU (50 mg/kg) fed control (ctr) or DHA-enriched diet. **d** Monitoring of tumor growth in mice fed a ctrl diet ($n=8$, black) or DHA-enriched diet ($n=9$, gray) and in mice treated with a single 5-FU injection (50 mg/kg; blue arrow) and fed a ctrl diet ($n=9$, purple) or DHA-enriched diet ($n=9$, red). Error bars represent mean \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; ns, non-significant.

Fig. 2

DHA treatment decreased 5-FU-induced JNK activation in MDSC. **a** Expression of phospho-JNK (p-JNK) and total JNK in MSC-2 treated with 5-FU (1 μ M) for indicated times. **b** Expression of phospho-JNK and total JNK in MSC-2 treated with 5-FU (1 μ M) for 12 hours +/- DHA and oleic acid (OA). **c** Phosphorylation of JNK was assessed by flow cytometry in MDSC (CD11b⁺ Gr1⁺) purified from spleen of EL4 tumor-bearing mice treated with 5-FU (50 mg/kg) for 24 hours fed control (ctr) or DHA-enriched diet. Error bars represent mean \pm SEM. **d** Analysis of IL-1 β secretion by ELISA in MSC-2 treated with 5-FU (1 μ M) +/- inhibitor of JNK (SP) for 24 hours. Error bars represent mean \pm SD

of three independent experiments. **e** Expression of mature IL-1 β in supernatant (SN) and cell lysates of MSC-2 treated as **(d)**. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; ns, non-significant.

Fig. 3

ROS scavengers inhibited JNK activation-dependent IL-1 β secretion in MDSC. **a** Expression of phospho-JNK and total JNK in 5-FU-treated MSC-2 and co-treated with bafilomycin A (Baf.), chloroquin (CQ), N-acetyl-cysteine (NAC), Tempol (Tpol) and inhibitor of pan-caspases (ZVAD) for 12 hours. **b** IL-1 β secretion by ELISA in MSC-2 treated with 5-FU (1 μ M) +/- anti-oxidants N-acetyl-cysteine (NAC) and Tempol (Tpol) for 24 hours. Error bars represent mean \pm SD from three independent experiments. Error bars represent mean \pm SD from three independent experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$; ns, non-significant.

Fig. 4

Repression of caspase-1 activity in 5-FU-treated MDSC mediated by DHA exposure. **a** Analysis of 5-FU-induced caspase-1 activity by FLICA in MSC-2 treated with 5-FU (1 μ M) for 12 hours +/- DHA (20 to 60 μ M) or oleic acid (OA). Error bars represent mean \pm SD from three independent experiments. **b** Measure of caspase-1 activity by FLICA in MDSC (CD11b⁺ Gr1⁺) purified from spleen of EL4 tumor-bearing mice treated with 5-FU (50 mg/kg) for 24 hours fed control (ctr) or DHA-enriched diet. Error bars represent mean \pm SEM. **c** Caspase-1 activity analysed by FLICA in 5-FU-treated MSC-2 for 12 hours +/- JNK inhibitor SP600125 (4 and 10 μ M). Error bars represent mean \pm SD from four independent experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; ns, non-significant.

Fig. 5

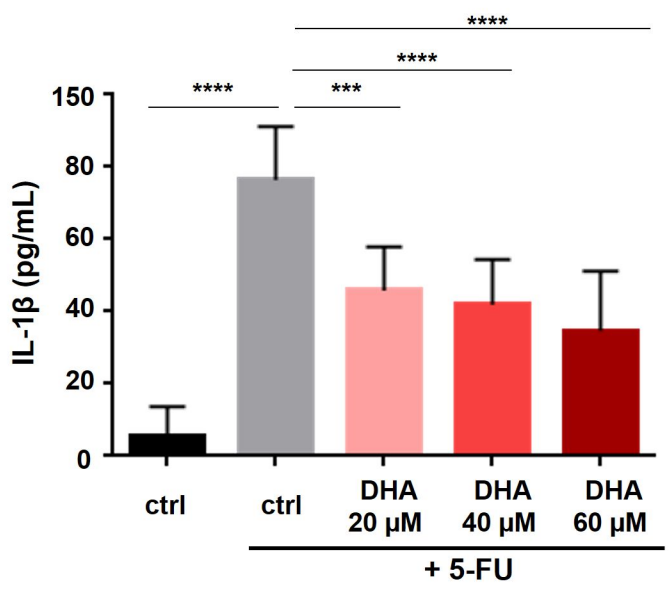
Inhibition of NLRP3 inflammasome assembly by DHA. **a-d** In situ Proximity Ligation Assay. MSC-2 were treated for 12 hours with 5-FU (1 μ M) +/- DHA (60 μ M). In one experiment, cells (80-100 cells) were analysed for a positive PLA signal (at least one red dot in a cell). Results are presented from three independent experiments. Error bars represent mean \pm SD. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; ns, non-significant.

Fig. 6

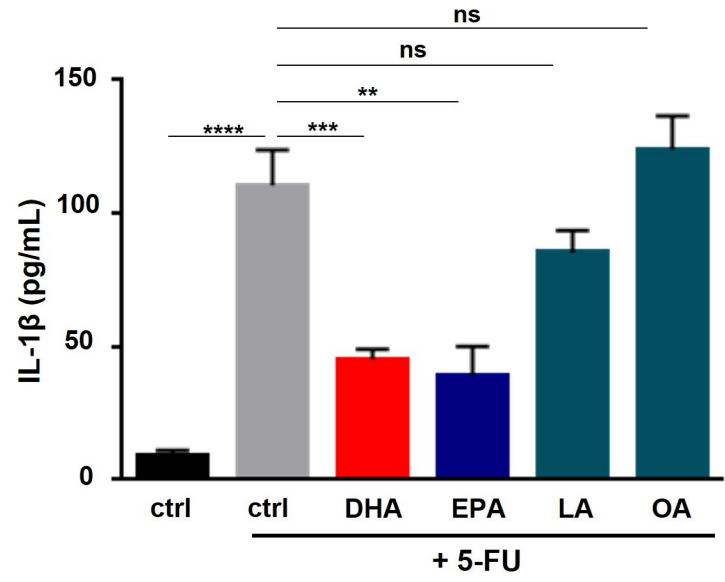
Correlation of plasma DHA and active caspase-1 or IL-1 β in 5-FU-treated patients. **a** Correlation between percentage of DHA before therapy and IL-1 β content change before (D0) and after (D1) 5-FU chemotherapy (n=26 patients). **b-c** Correlation between plasma DHA content before therapy and ratio of caspase-1 activity before (D0) and after (D1) 5-FU chemotherapy in HLA-DR $^-$ CD33 $^+$ CD14 $^+$ cells (**c**) or in HLA-DR $^-$ CD33 $^+$ CD15 $^+$ cells (**d**) (n=26 patients).

Figure 1

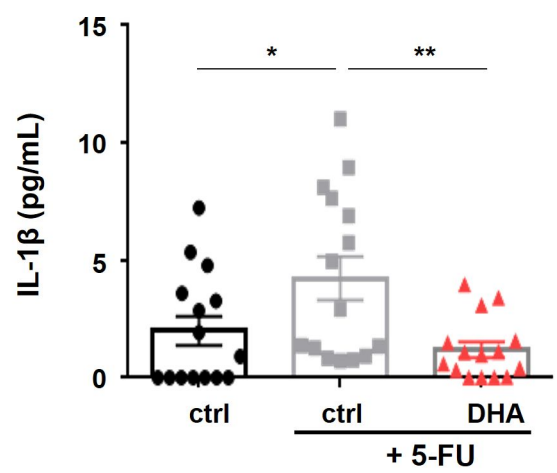
a



b



c



d

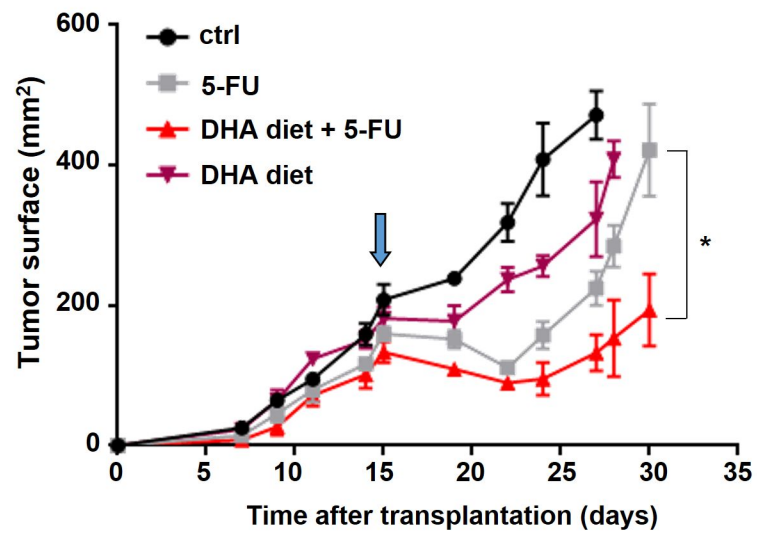
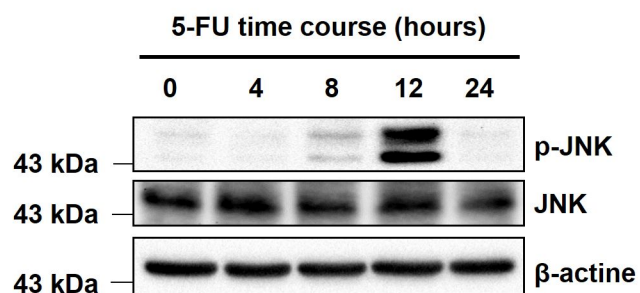
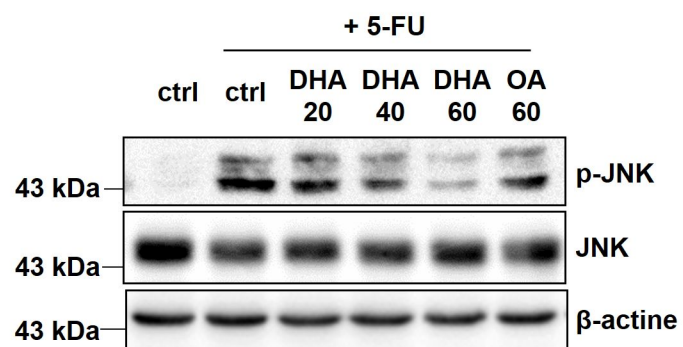


Figure 2

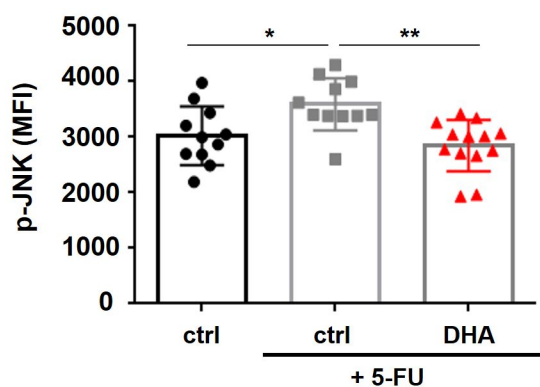
a



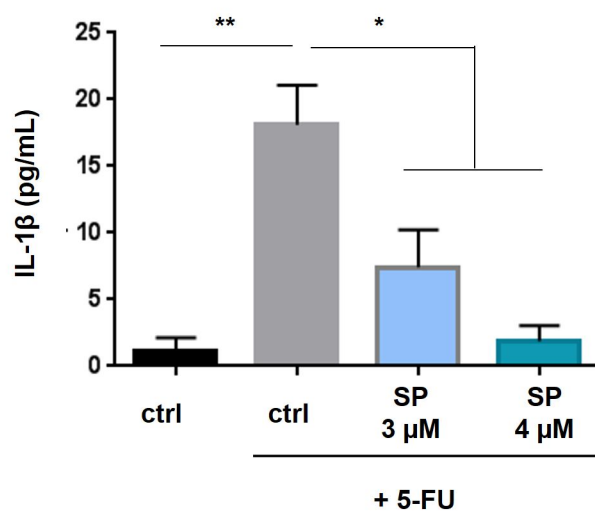
b



c



d



e

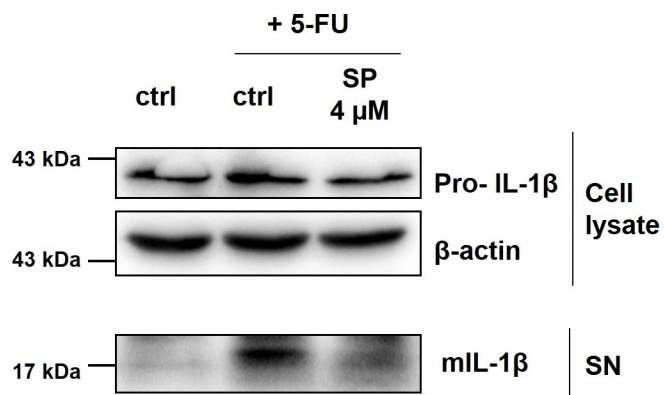
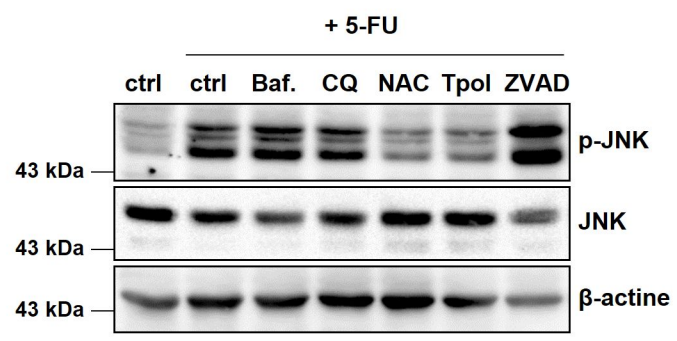


Figure 3

a



b

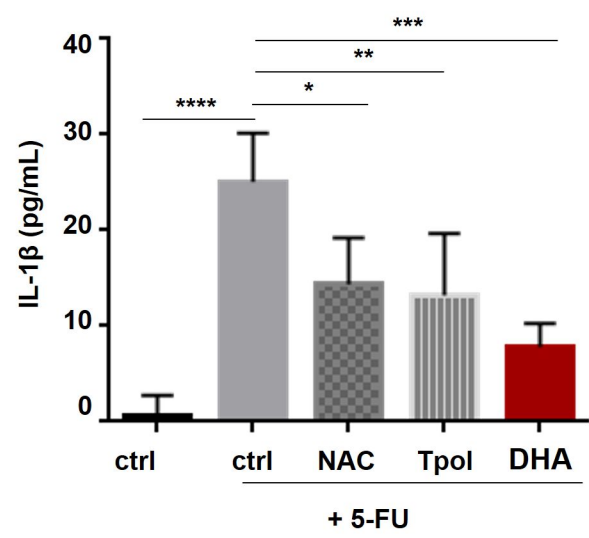


Figure 4

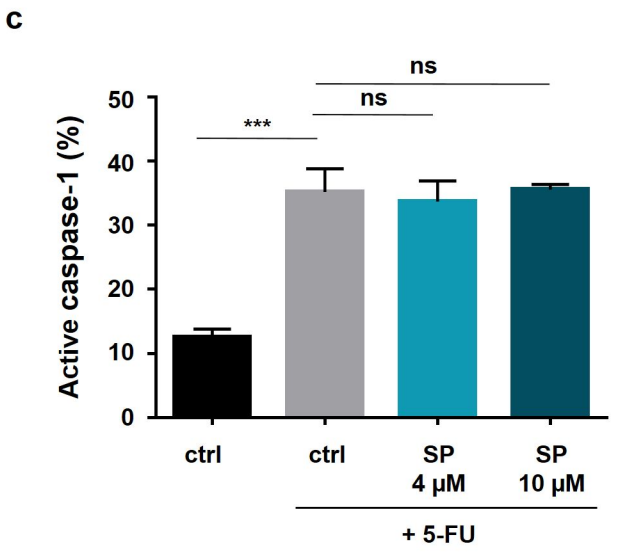
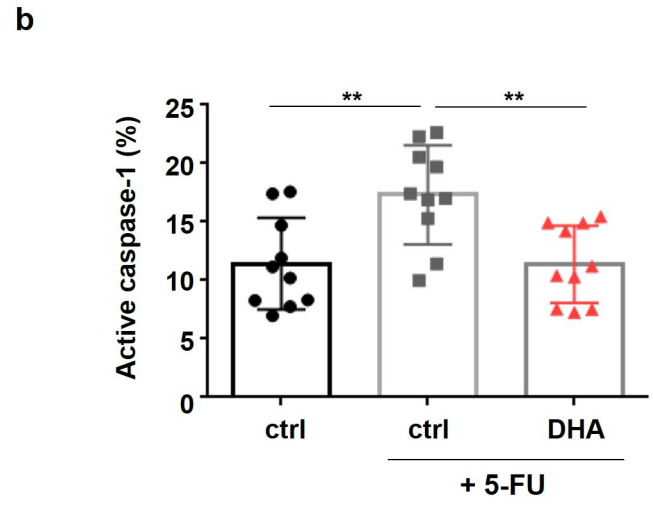
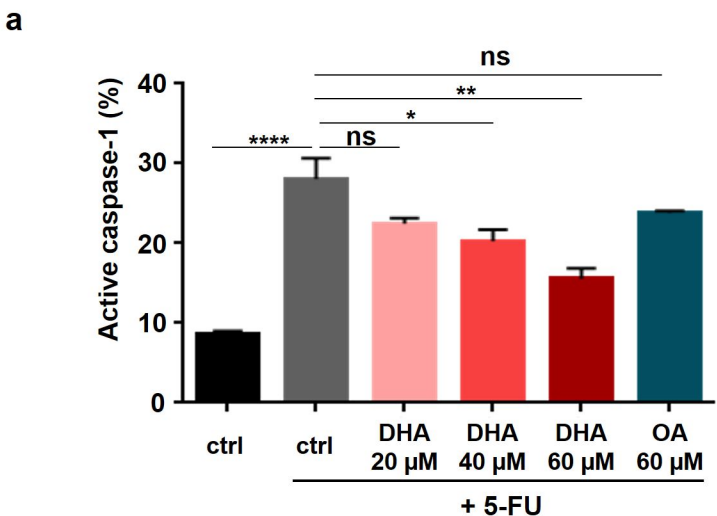
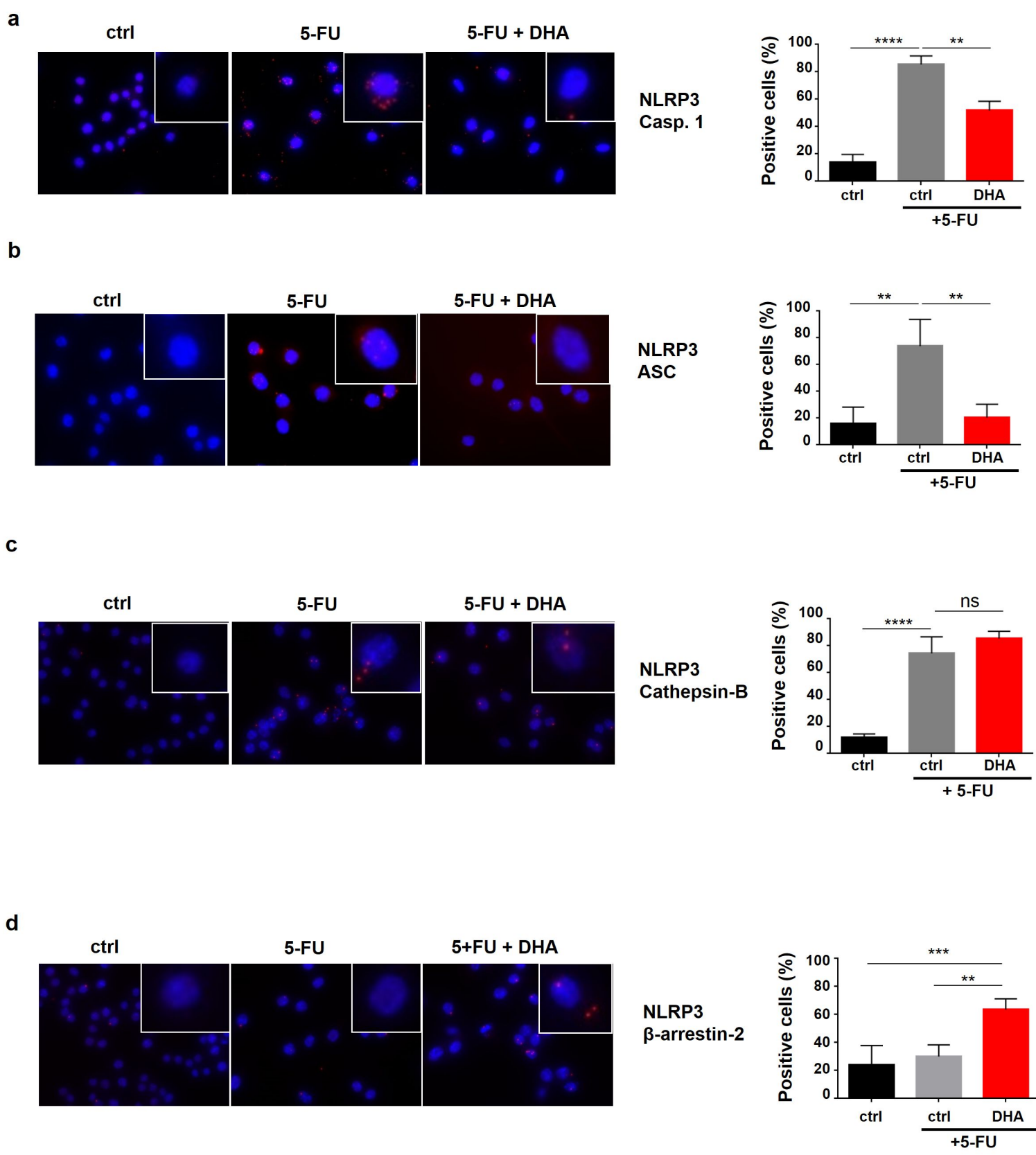
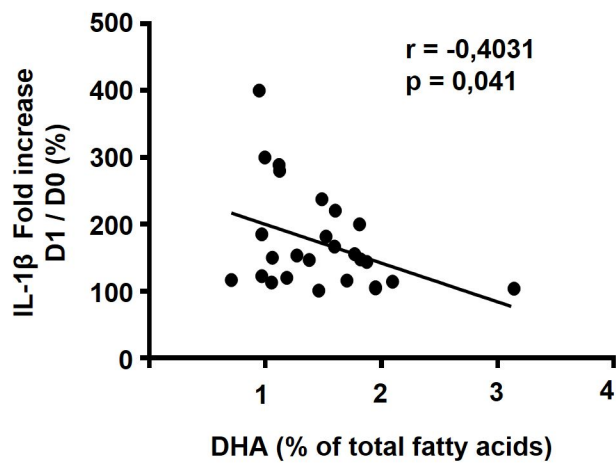


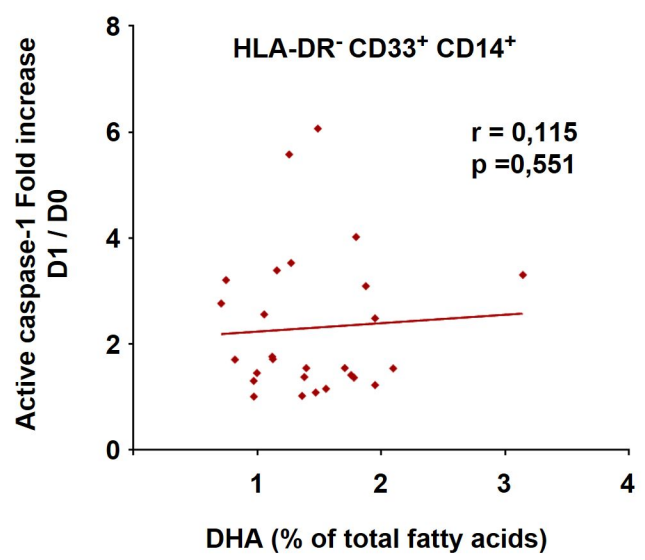
Figure 5



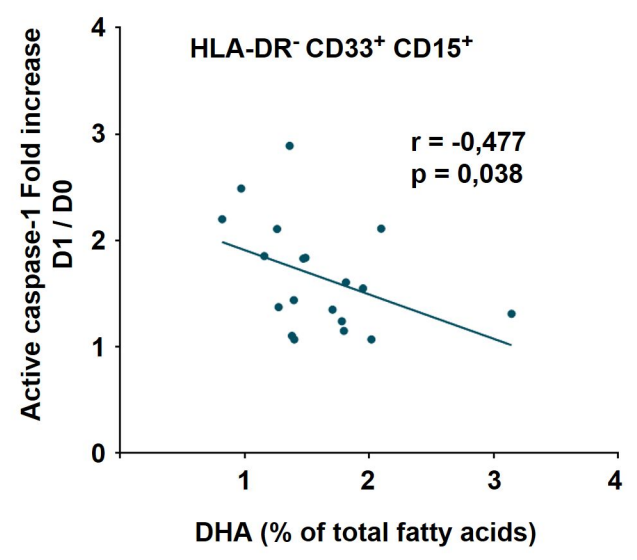
a



b



c



Docosahexaenoic acid improves 5-Fluorouracil anti-cancer action through the inhibition of NLRP3 inflammasome activity and JNK-dependent IL-1 β secretion in MDSC.

Supplemental Figure Legends

Fig. S1

a Analysis of IL-1 β mRNA expression in MSC-2 treated for 24 hours with 5-FU +/- DHA (60 μ M). Error bars represent mean \pm SD from three independent experiments. **b** Viability of MSC-2 treated for 12 and 24 hours with 5-FU +/- fatty acids was assessed by 7-AAD staining in flow cytometry. Error bars represent mean \pm SD from four independent experiments. **c** Viability of CD11b⁺ Gr1⁺ cells analysed by 7-AAD staining in flow cytometry. Cells were purified from spleen of EL4 tumor-bearing mice fed control (ctrl) or DHA diet and treated for 24 hours with 5-FU (50 mg/kg). Error bars represent mean \pm SD from four independent experiments. **d** EL4 tumor growth monitoring in mice control (ctrl) or treated by a single injection of 5-FU (blue arrow) and intra-peritoneal injections of vehicle (5-FU) or free DHA (5-FU + DHA). The injections of vehicle or free DHA were performed every two from days 12 (red arrow) to 30. * p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001; ns, non-significant.

Fig. S2

a Viability of MSC-2 treated by 5-FU (1 μ M) +/- SP60125 for 24 hours analysed by 7-AAD staining in flow cytometry. Error bars represent mean \pm SD from three independent experiments.

Fig. S3

a Expression of NLRP3 inflammasome components was analysed by western-blotting with antibodies raised against NLRP3, caspase-1, IL-1 β , ASC and cathepsin-B. MSC-2 protein lysates were collected 12h after treatment with 5-FU (1 μ M) +/- DHA (20 to 60 μ M) or oleic acid (OA).

Fig. S4

a Analysis of proximity between NLRP3 and caspase-1 or ASC has been performed by in situ Proximity Ligation Assay in MSC-2 treated with 5-FU +/- DHA for 12 hours. The mean of reds dots per cell nucleus was determined with ICY software. Error bars represent mean \pm SD from at least three independent experiments. **b** Lysosomal permeability has been evaluated in 5-FU-treated MSC-2 cells +/- DHA (60 μ M) and bafilomycin A1 (Baf) using LysoTracker Deep Red labelling. Error bars represent mean \pm SD from three independent experiments. **c-d** Analysis of proximity between NLRP3 and cathepsin-B (**c**), NLRP3 and β -arrestin-2 (**d**) has been performed by in situ Proximity Ligation Assay in MSC-2 treated with 5-FU +/- DHA for 12 hours. The mean of reds dots per cell nucleus was determined with ICY software. Error bars represent mean \pm SD from at least three independent experiments. * p < 0.05; ** p <0.01; *** p <0.001; **** p <0.0001; ns, non-significant.

Fig. S5

a Correlation between plasma DHA (% of total fatty acids) before therapy (D0) and IL-1 β content change before (D0) and after (D1) 5-FU-based chemotherapy (n=46 patients).

b-c Analysis of active caspase-1 by FLICA in HLA-DR⁻ CD33⁺ CD14⁺ cells (**b**) or in HLA-DR⁻ CD33⁺ CD15⁺ cells (**c**) from patients before (D0) and after (D1) 5-FU-based chemotherapy (n=46 patients). Panels in red (**b**) and blue (**c**) showed patients with increase

caspase-1 activity (D1/D0) in HLA-DR⁻ CD33⁺ CD14⁺ cells or in HLA-DR⁻ CD33⁺ CD15⁺ cells.

Supplemental Material and Methods

Tumor growth, free DHA injections and 5-FU treatment

Mice received two-daily intra-peritoneal injections of free DHA (30 µg / g body weight; Sigma-Aldrich) 6 days prior to a single intra-peritoneal injection of 5-FU at 50 mg per kg body weight (tumor size ~100 mm²). Injections of free DHA were performed from days 12 to 30. Tumor growth was monitored over the time and tumor surface was calculated according to the formula: length × width.

Western-blotting analysis

Protein lysates of MSC-2 were obtained with RIPA lysis buffer containing phosphatase and protease inhibitor cocktail (P2850 and P8340, Sigma-Aldrich). Total protein lysates were resolved by SDS-PAGE and analysed by western-blotting with the following antibodies: anti-NLRP3 (Adipogen Cryo-2), anti-ASC (Cell Signaling Technology, B2W8U), anti-Cathepsin B (Santa-Cruz S-12), anti-Caspase-1 (Adipogen, Casper-1), anti-IL-1β (R&D systems, AF-401), anti-p-JNK (Cell Signaling Technology, 98F2), anti-JNK (Cell Signaling Technology, 56G8), anti-β-actin (Sigma-Aldrich, A1978), HRP-conjugated anti-mouse, anti-goat and anti-rabbit (Cell Signaling Technology).

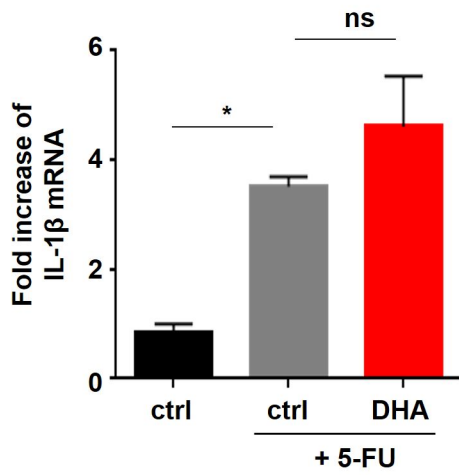
Lysotracker

At 4 and 6 hours of different treatments, adherent cells were labelled with the lysotracker DeepRed probes (Fisher) dissolved at 50 nM in cell culture medium for 30 minutes, cells were then collected and centrifuged for cytometry analysis.

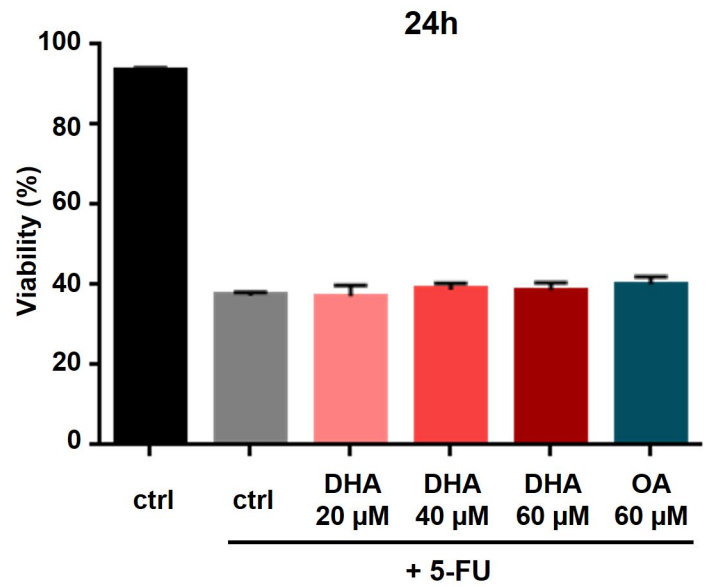
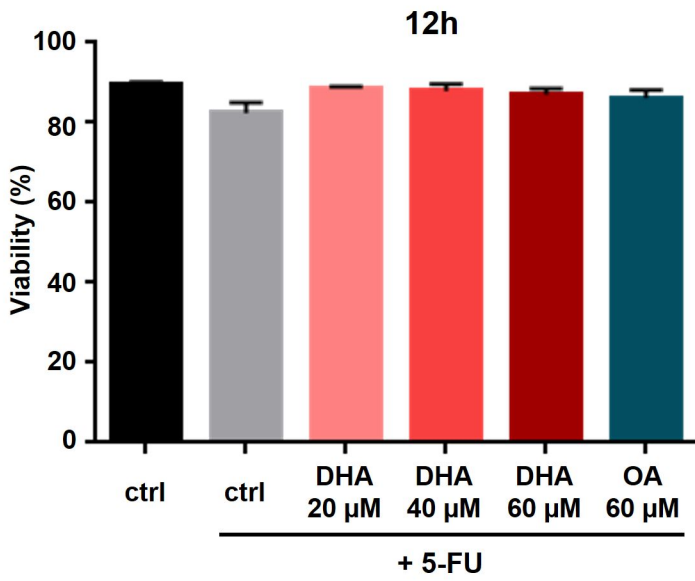
Reverse transcription and quantitative PCR

Total RNA was extracted with Trizol (Life Technologies) and reverse transcribed with M-MLV reverse transcriptase kit from Applied Biosystem (Life technologies). Real-time RT-qPCR was performed with SYBRTM Green PCR Master Mix from Applied Biosystem (Life technologies) using a StepOnePlusTM Real-Time PCR System (Applied Biosystems). The sequence of primers were : *β-actin* F : 5'-ATGGAGGGGAATACAGCCC-3', R : 5'-TTCTTTGCAGCTCCTTCGTT-3', 18S F : 5'-GTAACCCGTTGAACCCATT-3', R : 5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3', *IL-1β* F : 5'-GGTCAAAGGTTTGGAAGCAG-3', R : 5'-TGTGAAATGCCACCTTTTGA-3'. Expression was normalized to *β-actin* and 18S. Relative expression of RNA targets was determined using the comparative $\Delta\Delta C_t$ method.

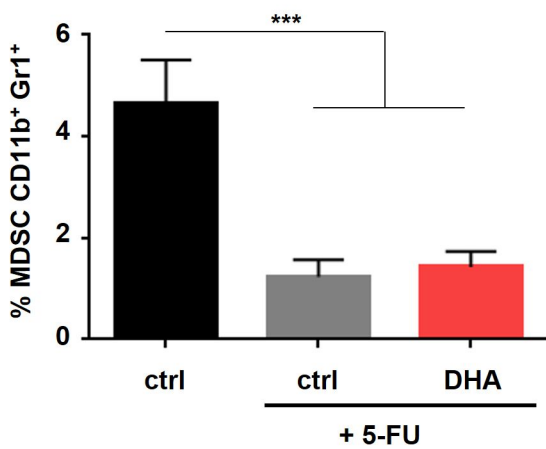
a



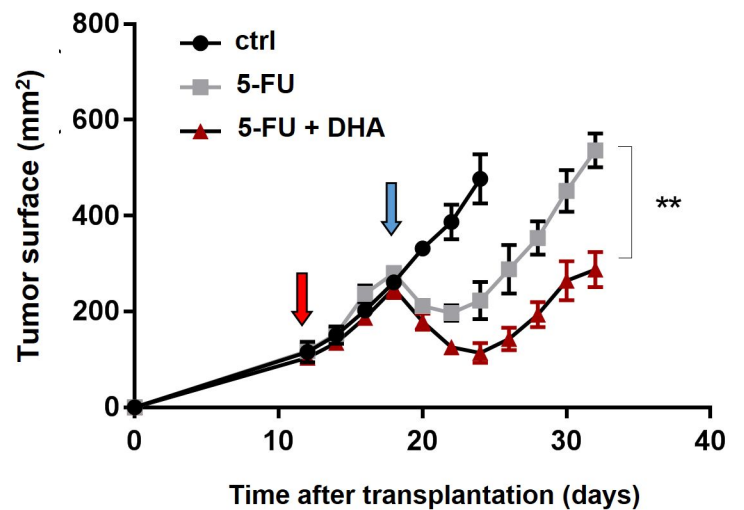
b



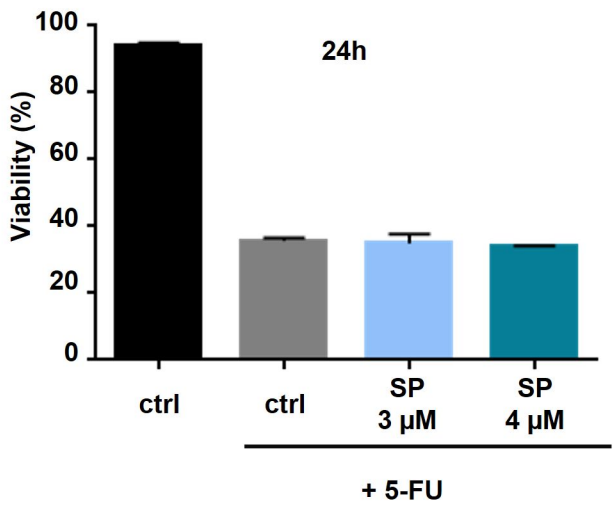
c

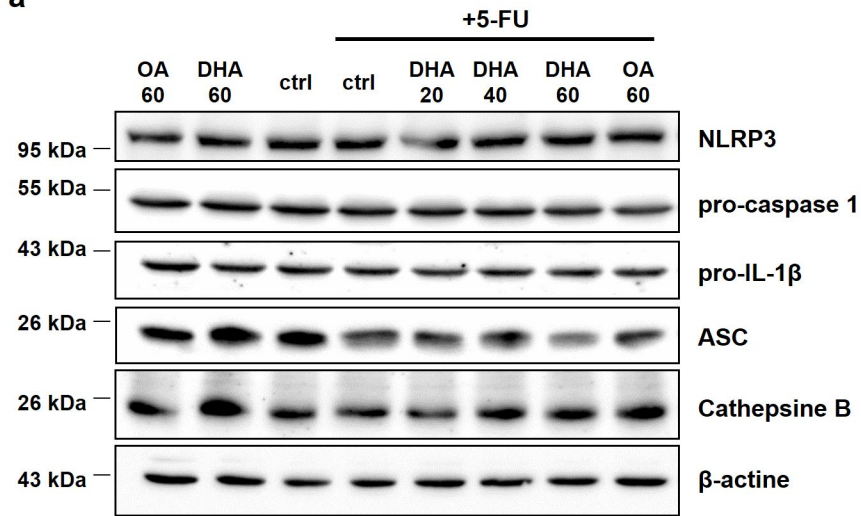


d

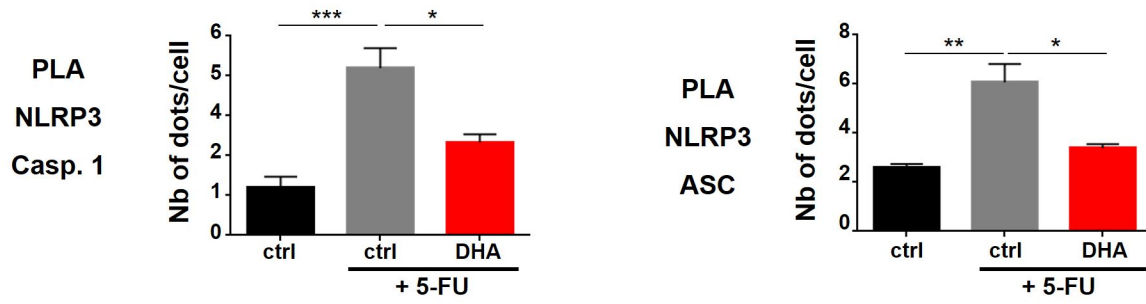


a

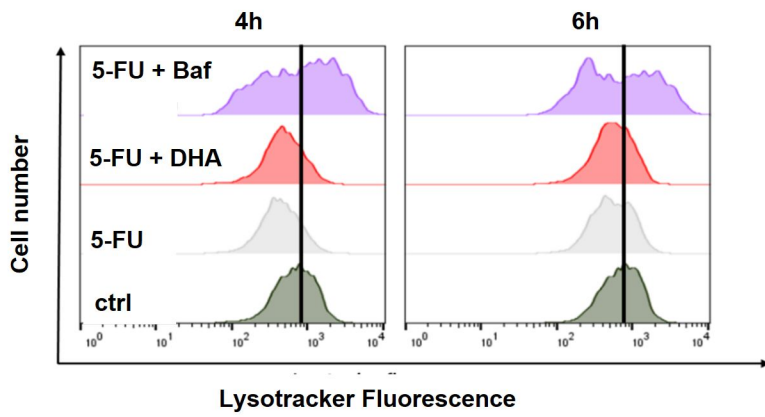


a

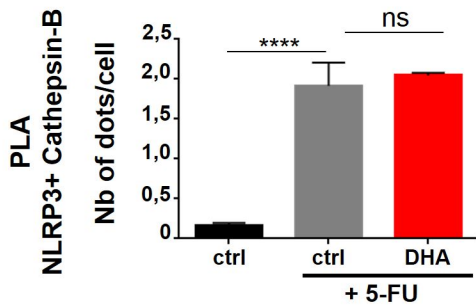
a



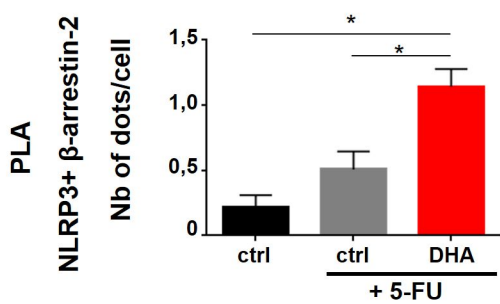
b



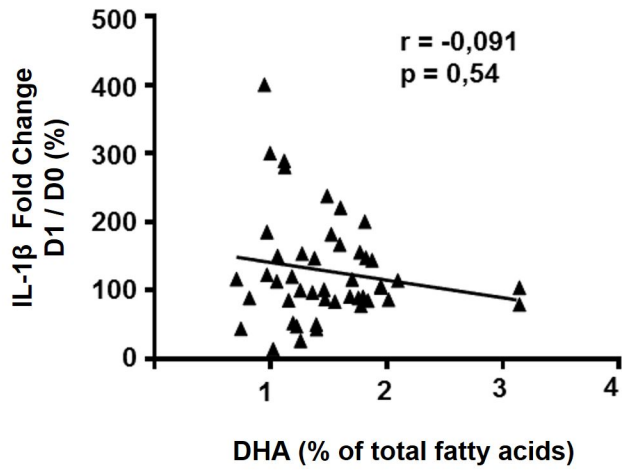
c



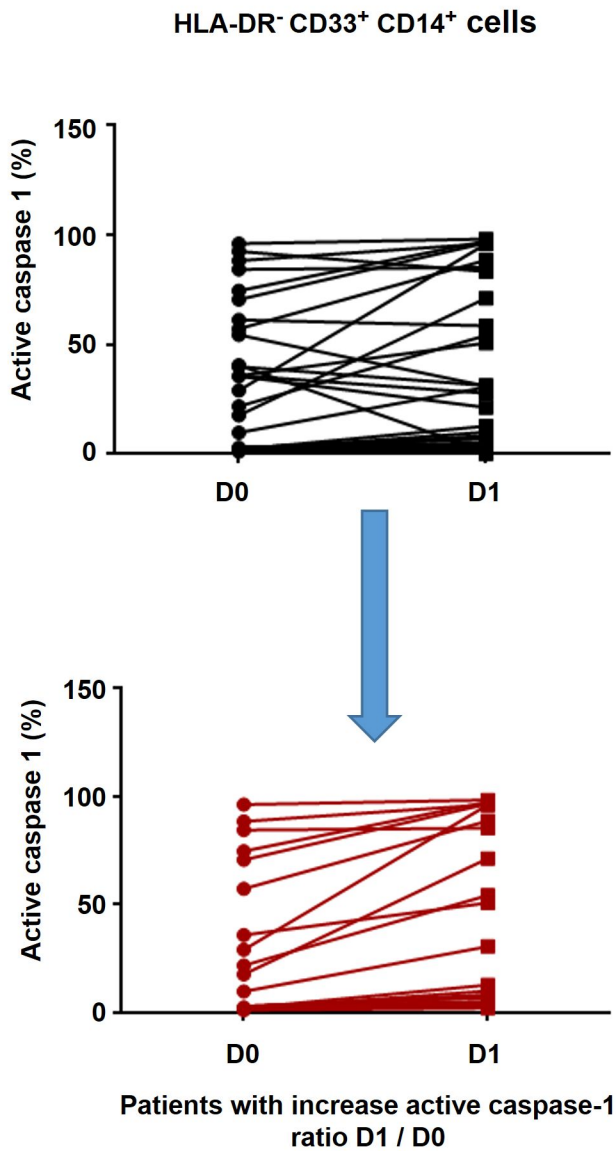
d



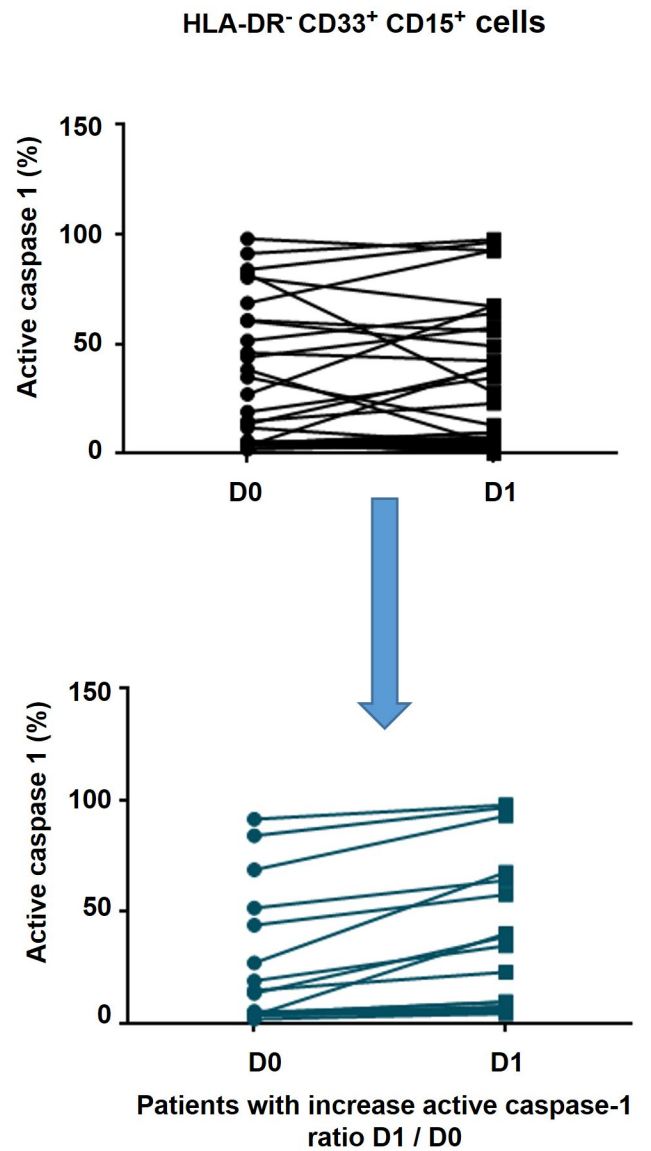
a



c



d



Discussion

L'ambivalence du 5-FU reste un problème majeur dans le traitement du cancer par l'établissement d'une résistance dépendante de la production de l'IL-1 β . Bien que l'administration du 5-FU provoque une régression tumorale par ses propriétés cytotoxiques contre les cellules cancéreuses mais aussi par la déplétion des cellules myéloïdes immunosuppressives MDSC (Vincent *et al.*, 2010b), le 5-FU installe un environnement propice à sa perte d'efficacité en activant l'inflammasome NLRP3 dans les MDSC libérant de l'IL-1 β . L'augmentation de l'IL-1 β limitera les propriétés anti-cancéreuses du 5-FU par sécrétion d'IL-17 *via* les Th17, aux propriétés pro-tumorales (Bruchard *et al.*, 2013). L'utilisation de cette chimiothérapie en association avec des acides gras polyinsaturés en n-3 semble être une stratégie prometteuse dans le traitement du cancer. Notre étude a démontré que le DHA a la capacité de diminuer la sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire IL-1 β par les MDSC permettant ainsi une action prolongée de la chimiothérapie.

I. Le DHA inhibe la formation et l'activité de l'inflammasome NLRP3

La formation et l'activation de l'inflammasome NLRP3 nécessitent une étape préalable de priming. L'exposition au 5-FU conduit à une augmentation de l'expression de l'ARNm IL-1 β dans les MSC2 et constitue ainsi un stock de substrat pour la caspase-1 active au sein de l'inflammasome NLRP3. Cette régulation pourrait être dépendante du facteur de transcription NF κ B (Bauernfeind *et al.*, 2009). Au contraire, le DHA a par différents mécanismes la capacité de réprimer l'activité NF κ B (Weldon *et al.* 2007). Or, notre étude montre que le DHA ne modifie pas le niveau d'expression de l'ARNm IL-1 β induit par 5-FU suggérant une régulation indépendante de NF κ B (figure S1a). Le priming régule également l'expression de l'ARNm *NLRP3* ou la stabilité de la protéine notamment par la dégradation protéasomale dépendante de l'ubiquitination (Bednash and Mallampalli, 2016). Nous avons observé que l'expression du gène *Nlrp3* n'est pas modifiée par un traitement 5-FU (non montré) ni le niveau protéique de NLRP3 (figure S3) excluant une régulation par d'éventuelles ubiquitine ligases impliquées dans la dégradation protéasomale de NLRP3. Au final, l'exposition au 5-FU ne semble pas activer l'étape de priming dans sa globalité mais ne concernerait que l'augmentation de l'expression de l'ARNm IL-1 β .

La maturation de la pro-forme de l'IL-1 β suite au traitement par le 5-FU dans les MDSC nécessite sa coupure par la caspase-1 (Bruchard *et al.*, 2013). Nous avons montré que le DHA était capable de s'opposer à l'activation de la caspase-1 induite par un traitement par le 5-FU dans notre modèle cellulaire de MDSC (MSC2) (figure 4a) ainsi que dans les MDSC spléniques issues de souris porteuses de tumeurs EL4 suivant un régime enrichi en DHA (figure 4b). Dans ces mêmes MSC2, il

a été observé que l'activation de l'inflammasome NLRP3 provenait de la fixation de la cathepsine B sur NLRP3 suite à une perméabilisation lysosomale (Bruchard *et al.*, 2013). Or, le DHA n'affecte ni la perméabilité lysosomale (figure S4b) ni l'interaction entre cathepsine B et NLRP3 (figure 5c). Nous pouvons supposer que le DHA puisse soit réguler l'activité de la cathepsine B soit agir par un élément répresseur de l'activité NLRP3 indépendamment de la cathepsine B. Ainsi, dans un modèle de macrophages, les AGPI n-3, DHA et EPA inhibent l'activation de l'inflammasome NLRP3 induite par le LPS ou la nigéricine. En se fixant aux récepteurs GPR40 et GPR120, les AGPI n-3 entraînent la liaison entre la protéine d'échafaudage β -arrestine 2 et NLRP3. Cette étude évalue l'activité caspase-1 sans définir la capacité de la β -arrestine 2 à modifier l'assemblage de l'inflammasome NLRP3. Dans ce travail de thèse, nous avons confirmé l'interaction entre NLRP3 et la β -arrestin 2 (figure 5d) ainsi que l'inhibition de l'activité caspase-1 par le DHA. De plus, nous avons établi que le traitement DHA diminuait la formation de l'inflammasome NLRP3, conférant probablement à la β -arrestine 2 cette propriété. Des résultats obtenus au laboratoire ont permis de montrer que le récepteur aux AGPI GPR40 n'était pas exprimé dans les cellules MSC2, excluant ce dernier de la signalisation de l'inflammasome NLRP3. En revanche, le récepteur GPR120 est retrouvé sur les MDSC et pourrait participer à l'inhibition de l'inflammasome NLRP3 dans les MDSC par le DHA. Il a été décrit l'importance de ce récepteur dans la régulation de la croissance tumorale par les AGPI n-3. Ainsi, l'implantation de tumeur du pancréas dans un modèle de souris déficientes pour GPR120 (GPR120 KO) abolit les effets anti-tumoraux d'une intervention nutritionnelle enrichie en AGPI n-3 et notamment, la réduction des marqueurs associés à un phénotype de macrophages M2 au niveau de la tumeur (Liang *et al.*, 2018). La perte d'interaction entre les composants de l'inflammasome NLRP3 constitue très vraisemblablement l'étape principale expliquant la diminution de l'activité caspase-1. La régulation de la formation de l'inflammasome peut être dépendante de protéines modulatrices comme la kinase Nek7 qui permet le recrutement et la formation des structures oligomériques de ASC appelées « ASC specks », indépendamment de son activité kinase (Dick *et al.* 2016, He *et al.* 2016b). Le DHA pourrait perturber la formation de l'inflammasome en régulant la fonction de cette protéine, comme par exemple en induisant une compétition de fixation entre Nek7 et la β -arrestine 2 sur NLRP3. De plus, un des évènements nécessaires à l'acquisition de la compétence de NLRP3 à former l'inflammasome est la phosphorylation de NLRP3 par JNK 1 (Song *et al.*, 2017b). Nous avons pu voir qu'un traitement par le 5-FU entraîne l'activation de JNK, traduit par sa phosphorylation dans les MSC2 dès 8 heures de traitement pour atteindre une activation

maximale à 12h (figure 2a). Néanmoins, nous n'avons pas été en mesure de montrer une inhibition de l'activité caspase-1 induite par le 5-FU par l'utilisation de l'inhibiteur JNK SP600125 (figure 4c). En revanche, l'inhibition de JNK s'oppose à l'induction de la sécrétion d'IL-1 β induite par le 5-FU (figure 2d et 2e) nous menant à penser que la régulation de JNK par le 5-FU intervient directement sur la sécrétion d'IL-1 β et non pas sur l'activation de l'inflammasome NLRP3.

II. Le DHA inhibe la sécrétion d'IL-1 β en régulant la voie JNK

Bruchard *et al.*, montrent qu'un traitement par le N-Acetyl-Cystéine, un piègeur de ROS, ne modifie pas la capacité du 5-FU à activer la caspase-1. Or, les ROS sont à l'origine de la phosphorylation de JNK et leur piégeage prévient l'activation de la voie JNK, ainsi que la sécrétion de l'IL-1 β (figures 3a et 3b). Cette donnée conforte l'observation d'une régulation de la sécrétion d'IL-1 β par JNK sans action sur la caspase-1. A l'image des piègeurs de ROS, le DHA est capable de s'opposer à l'activation de JNK induite par le 5-FU dans les MSC2 (figure 2b) et également dans les MDSC issues de souris porteuses de tumeurs (figure 2c). De la même manière que l'inhibiteur JNK, le DHA est capable de réduire la sécrétion d'IL-1 β induite par le 5-FU dans les MSC2 (figures 1a). Nous avons également constaté une inhibition du taux circulant d'IL-1 β dans la plasma des souris porteuses de tumeurs traitées au 5-FU et suivant un régime enrichi en DHA comparé aux souris suivant le régime contrôle (figure 1c). Le DHA semble donc avoir deux actions indépendantes sur la régulation de l'IL-1 β . D'une part la régulation de la formation et de l'activité de l'inflammasome NLRP3 et d'autre part, la régulation de la sécrétion de la forme mature de l'IL-1 β par la voie JNK. Nous sommes actuellement en train d'établir une lignée stable MSC2 surexprimant la forme mature d'IL-1 β couplée à une étiquette V5, afin d'évaluer spécifiquement la régulation de l'étape de sécrétion de l'IL-1 β par JNK et DHA, en aval d'une action de l'inflammasome NLRP3.

Bien que les mécanismes de régulation de l'activité de NLRP3 et de la sécrétion d'IL-1 β par le DHA semblent indépendants, nous pouvons supposer que la β -arrestine 2 puisse également intervenir au niveau de la régulation de JNK. En effet, dans notre modèle le DHA semble agir *via* des voies dépendantes de la β -arrestine 2. Or, la fixation de la β -arrestine 2 sur TAB1 permet l'inhibition de JNK par inhibition de TAK1 dans un modèle de macrophages stimulés au LPS (Oh *et al.*, 2010). Il sera donc intéressant d'approfondir de rôle de la β -arrestine 2 dans la régulation de la sécrétion de l'IL-1 β par le DHA.

Les mécanismes de régulation de la sécrétion de l'IL-1 β sont multiples et interviennent à différentes étapes notamment par l'induction de la mort (England *et al.*, 2014). Le 5-FU entraîne la sécrétion de l'IL-1 β mais également la mort par apoptose des MDSC (Bruchard *et al.*, 2013; Vincent *et al.*, 2010a). Le co-traitement 5-FU combiné soit au DHA soit au SP600125 ne modifie pas la mortalité des MSC2 induite par le 5-FU (figures S1b, S2a). Un régime enrichi en DHA ne modifie pas non plus la proportion de MDSC spléniques suite à l'injection de 5-FU (figure S1c). Cette observation nous permet d'exclure une régulation de la sécrétion par passage passif à travers la membrane plasmique altérée ou par modulation de la mort cellulaire. Nous avons également vu que le DHA n'agissait pas au niveau du priming de l'inflammasome NLRP3 et donc ne modifie pas l'expression de l'IL-1 β . L'équipe de K. Schroder a montré que la sécrétion de l'IL-1 β pouvait dépendre des domaines riches en PIP₂ de la membrane plasmique et indépendamment de la gasdermine D (Monteleone *et al.*, 2018). Les domaines riches en PIP₂ peuvent se retrouver au niveau des radeaux lipidiques, or, le DHA peut moduler la taille et la composition des ces radeaux lipidiques (Chapkin *et al.*, 2008) et dans un modèle de lymphocytes T CD4, l'enrichissement en DHA réduit de 50% la proportion de PIP₂ au sein des radeaux lipidiques (Hou *et al.*, 2012a). Par son incorporation aux phospholipides de la membrane plasmique, le DHA pourrait réguler la sécrétion d'IL-1 β .

La sécrétion de l'IL-1 β est le facteur clé de la reprise tumorale. Cependant, la littérature indique que l'action de l'IL-1 β semble être dépendante de sa concentration au niveau du site tumoral. En effet, Bruchard *et al.* décrivent une sécrétion de l'IL-1 β ayant un effet délétère sans capacité à activer les lymphocytes T CD8+ et conduisant à une reprise tumorale (Bruchard *et al.*, 2013). Tandis qu'une concentration plus élevée en IL-1 β serait seule capable d'activer les lymphocytes T CD8+ (Ghiringhelli *et al.*, 2009). La concentration en IL-1 β est donc un élément prépondérant du contrôle de la progression tumorale. A forte concentration, cette cytokine serait donc anti-tumorale et à une concentration moindre suite à une intervention chimiothérapeutique favoriserait la reprise tumorale. La libération d'IL-1 β par les MDSC favorise donc la polarisation des lymphocytes T CD4+ en Th17 qui de par leur sécrétion d'IL-17 induisent une néoangiogenèse au niveau du site tumoral. Dans notre modèle, s'opposer à l'action de l'IL-1 β renforce l'efficacité de la thérapie par le 5-FU en retardant la reprise tumorale. Nous avons pu montrer que la combinaison entre un régime enrichi en DHA ou l'injection intrapéritonéale de DHA libre et le 5-FU limite une reprise de la croissance tumorale comparée au 5-FU seul (figures 1d et S1d). Ces résultats sont en

cohérence avec d'autres études montrant également un effet synergique entre DHA et 5-FU (Rani *et al.*, 2017, 2017; Sebe *et al.*, 2016; Vasudevan *et al.*, 2014). Interférer avec la signalisation de l'IL-1 β et son rôle au niveau de l'inflammation, de la prolifération des cellules cancéreuses, du recrutement des cellules immunosuppressives s'avère être une stratégie réellement prometteuse pour contrer les effets ambivalents de la chimiothérapie 5-FU (de Mooij *et al.*, 2017). Ici, l'utilité adjuvante du DHA dans le traitement anti-cancéreux pourrait être double. En complément de la répression de la sécrétion de l'IL-1 β par les MDSC en interférant avec la production de Th17 pro-tumoraux, le DHA agirait directement sur ces lymphocytes CD4⁺ en prévenant leur différenciation en Th17 par la liaison de cet acide gras au récepteur nucléaire PPAR γ (Berger *et al.*, 2013b). Nous avons vu préalablement que la régulation de la sécrétion d'IL-1 β par le DHA est médiée par la régulation de JNK. Néanmoins, s'opposer à la sécrétion d'IL-1 β par l'utilisation de l'inhibiteur JNK combiné au 5-FU s'avère ne pas être une stratégie payante. Bien que l'inhibition de JNK entraîne une inhibition importante d'IL-1 β dans les MDSC, l'association *in vivo* entre le SP600125 et le 5-FU ne permet pas de contenir la croissance tumorale à la manière du DHA (figure 24, annexe 1). Des travaux précédents ont montré que l'utilisation de l'inhibiteur SP600125 pouvait abolir l'effet du 5-FU dans un modèle de croissance CT26. L'équipe de H. Liang explique que l'induction de la mort des cellules cancéreuses par le 5-FU est un mécanisme dépendant de JNK et de la caspase 3 et qu'en s'opposant à l'activation de JNK le 5-FU ne peut plus exercer son effet (Kim *et al.*, 2015; Masuda *et al.*, 2002; Volate *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2016b). De plus, l'action cytotoxique du 5-FU est dépendante des dommages à l'ADN qu'il provoque, à l'origine d'une mort par apoptose dépendante de P53 (Petak *et al.*, 2000). L'action cytotoxique du 5-FU sur les cellules cancéreuses P53 fonctionnelle induit l'activation de JNK qui est nécessaire à la mort. Une étude montre que l'inhibition de JNK augmente l'effet cytotoxique du 5-FU dans la lignée HCT116 déficiente pour P53 (Sui *et al.*, 2014). La lignée EL4 que nous utilisons pour nos modèles de croissance tumorale présente une protéine P53 fonctionnelle ainsi qu'une voie de signalisation P53 intacte (Guo *et al.*, 2017). La présence de P53 dans la lignée EL4 pourrait expliquer le manque d'efficacité de la combinaison entre 5-FU et SP600125 sur la croissance tumorale indépendamment d'une action sur les MDSC. Inhiber cette voie JNK réduirait donc les capacités cytotoxiques du 5-FU. Pour confirmer cela, il serait intéressant de comparer l'action du traitement 5-FU + SP600125 sur la viabilité de EL4 sauvages comparées à des EL4 présentant une extinction de la protéine P53 ou regarder l'effet d'un trio 5-FU, SP600125 et DHA sur la croissance tumorale EL4. En somme, l'utilisation du DHA pour améliorer la réponse à la chimiothérapie 5-FU paraît être

une alternative très prometteuse tout en considérant que l'inhibition de l'inflammasome NLRP3 et de la sécrétion d'IL-1 β par DHA ne permet pas une extinction complète de la production de l'IL-1 β et que cette inhibition devra être suffisante pour réduire la concentration en IL-1 β sous le seuil qui soutiendrait la récurrence tumorale.

III. Action adjuvante du DHA pour les chimiothérapies à base de 5-FU

Lors de ce projet de thèse, une étude de l'activité de la caspase-1 et de la teneur en IL-1 β chez des patients atteints d'un cancer colorectal métastatique traités par une chimiothérapie à base de 5-FU a été réalisée. Cette analyse a pu mettre en évidence que lendemain de la cure de chimiothérapie à base de 5-FU tous les patients ne présentent pas d'augmentation de l'activité caspase-1 au sein des MDSC (figures S5C et S5d). Néanmoins, lorsque nous nous focalisons sur les patients répondant par une augmentation de l'activité caspase-1, traduisant une réponse au 5-FU par les patients, nous avons montré une corrélation négative entre la teneur en DHA plasmatique des patients suivis et la réponse caspase-1 dans les MDSC HLADR \bar{C} D33 $^{+}$ CD15 $^{+}$ (figure 6c) correspondant aux PMN-MDSC et une absence de corrélation entre le DHA plasmatique et la réponse au sein des MDSC HLADR \bar{C} D33 $^{+}$ CD14 $^{+}$ (M-MDSC) (figure 6b). Les M-MDSC étant la population de MDSC la plus représentée au niveau intra-tumorale, ces résultats suggèrent que l'effet du DHA n'est pas optimum dans le contrôle de l'induction de l'inflammasome NLRP3 dans les MDSC par le 5-FU. Néanmoins, les patients suivis n'ont pas reçu de supplémentation directe en DHA. Nous pouvons supposer qu'un apport complémentaire en DHA pourrait élargir son efficacité aux M-MDSC. Cependant, nous avons également pu mettre en avant une corrélation négative entre cette teneur plasmatique en DHA et l'augmentation de la teneur en IL-1 β après traitement par le 5-FU (figure 6a). D'après ces résultats nous pourrions supposer que l'utilisation adjuvante de DHA pourrait améliorer les bénéfices d'une thérapie à base de 5-FU en déjouant son action ambivalente dépendante des MDSC. Bien qu'étant une molécule naturelle, l'utilisation du DHA dans les thérapies anti-cancéreuses n'est pas anodine. La dose, la formulation et la pureté du DHA influence la réponse des individus à une chimiothérapie à base de 5-FU (Lee *et al.*, 2017). Le DHA peut être apporté sous forme de triglycérides issus d'huile de poisson dont la pureté varie en fonction de l'origine. La concentration en DHA peut être augmentée par éthylation-réestérification, l'apport se fera sous forme d'ethyl-ester de DHA. Le DHA peut également être apporté sous forme libre après décrochage du glycérol. Ces deux derniers types d'apport nutritionnel permettent de mieux enrichir en DHA les individus et garantir un apport en

DHA de plus grande pureté (sans contaminants issus d'autres AG). La biodisponibilité sera plus importante pour les AG libres et les TG que les ethyl-esters. La majorité des huiles de poissons contiendrait de l'acide hexadeca-4,7,10,13-tetraenoïque (C16:4 n-3) induisant une chimiorésistance au traitement 5-FU notamment (Daenen *et al.*, 2015; Houthuijzen *et al.*, 2017; Roodhart *et al.*, 2011). L'utilisation de DHA ultrapurifié semble donc indispensable. Au laboratoire, nous avons pu comparer l'effet de la combinaison entre 5-FU et DHA sous forme d'huile de poisson enrichi en DHA à 80% (TG) ou par injection intra-péritonéale de DHA pur à 98% (libre). L'apport de DHA pur par voie intra-péritonéale semble retarder, de manière plus importante, la reprise tumorale induite par le 5-FU qu'un régime enrichi en DHA à partir d'huile de poisson (figures 1d et S1d).

L'étude clinique de phase II IRAFU, qui investiga l'utilisation d'une chimiothérapie à base de 5-FU combinée au bevacizumab (anti-VEG) et à un antagoniste des récepteurs à l'IL-1 β (anakinra), montre que cette association augmente la survie sans progression et la survie globale des patients atteints d'un cancer colorectal métastatique (Isambert *et al.*, 2018). Néanmoins, au cours de cette étude clinique, 78% des patients présentent une toxicité liée à la thérapie de grade 3 (neutropénie, diarrhée, hypertension artérielle et cholestase hépatique). Des études épidémiologiques et pré-cliniques ont montré que le DHA réduisait les effets secondaires associés aux chimiothérapies (Miyata *et al.*, 2017; Rani *et al.*, 2014; Van Blarigan *et al.*, 2018; Volpato and Hull, 2018; Wynter *et al.*, 2004). Ainsi, l'association 5-FU et DHA pourrait s'avérer moins délétère pour le patient. D'autres études montrent également un effet curatif directement associé aux oméga-3, qui permet d'inhiber la taille et le nombre de métastases hépatiques associées à un cancer colorectal (Cockbain *et al.*, 2012, 2014; West *et al.*, 2010). L'association adjuvante du DHA aux thérapies anticancéreuses à base de 5-FU pourrait alors contrôler le développement de la tumeur au site primaire ainsi que l'apparition de métastases facilitant la résection du cancer.

Conclusion et perspectives

Au cours de notre étude, nous nous sommes intéressés à la régulation de l'inflammasome NLRP3 et à la régulation de la sécrétion de l'IL-1 β induite par un traitement au 5-FU

- Nous avons pu confirmer une inhibition de l'activité de l'inflammasome NLRP3, traduit par une inhibition de l'activité caspase-1, par le DHA, de manière dépendante de la β -arrestine 2 mise en avant par Yan *et al.* (Yan *et al.*, 2013) (figure 23).
- Notre étude propose également que l'inhibition de l'activité de l'inflammasome NLRP3 est liée par une inhibition de sa formation. Nous prévoyons de générer une lignée stable MSC2 déficiente en β -arrestine 2 afin d'évaluer l'implication de cette protéine dans le contrôle de la formation l'inflammasome NLRP3.
- Cette étude met en avant un nouveau mécanisme de régulation de la sécrétion d'IL-1 β qui se trouve sous la dépendance de la voie JNK et au niveau duquel le DHA peut intervenir. L'utilisation de la lignée MSC2 exprimant la forme mature de l'IL-1 β couplée à une étiquette V5 nous permettra d'étayer les mécanismes de régulation de la sécrétion de l'IL-1 β (figure 23).
- La transposition des données obtenues *in vitro* à un modèle *in vivo*, nous a permis de confirmer que le DHA s'opposait à l'induction de l'activité caspase-1, de la sécrétion de l'IL-1 β , et de l'activation de JNK au sein des MDSC spléniques issues de souris porteuses de tumeurs et traitées par 5-FU. Nous avons pu voir que l'association DHA et 5-FU réduit la reprise tumorale suite à l'injection de 5-FU montrant un intérêt thérapeutique à associer ces deux molécules. Les résultats présentés ont été réalisés sur les MDSC CD11b+Gr1+ spléniques, représentant la population globale de MDSC. Afin de mieux comprendre le rôle des MDSC dans la résistance au 5-FU, il sera intéressant de regarder l'impact du 5-FU et du DHA spécifiquement sur chaque sous-population de MDSC et également de comparer ces résultats obtenus sur des MDSC provenant de rates aux MDSC localisées dans la tumeur.
- Grâce à l'analyse de l'activité caspase-1 et au dosage de l'IL-1 β chez des patients atteints d'un cancer colorectal métastatique, nous avons pu montrer que, sans intervention nutritionnelle préalable, la quantité de DHA des patients était négativement corrélée avec l'augmentation de l'activité caspase-1 et de la teneur en IL-1 β induite par la chimiothérapie à base de 5-FU. Il serait intéressant de corrélérer également la survie à long terme de ces patients avec leur réponse caspase-1 et leur teneur en DHA.

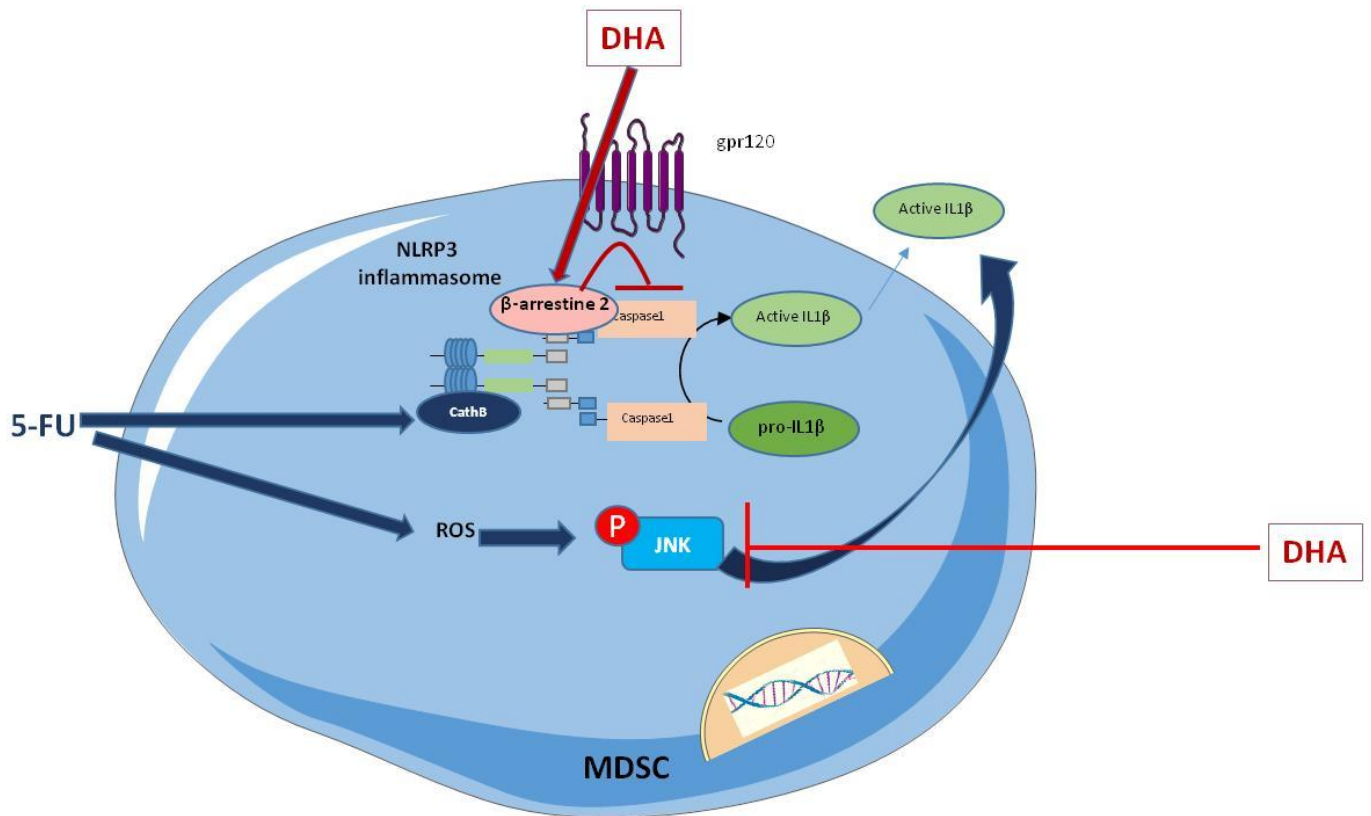


Figure 23 Schéma de conclusion : Mode d'action du DHA dans l'inhibition de la sécrétion d'IL-1β induite par le 5-FU au sein des MDSC

Matériels et méthodes

I. Lignées cellulaires

1. EL4

La lignée EL4 (ATCC® TIB-39™), provenant de l'American Type Culture Collection (ATCC) est une lignée issue de lymphome T induit par le 9,10-diméthyl-1,2-benzanthracène dans une souche C57Bl6 de souris. Cette lignée est cultivée en suspension dans un milieu complet RPMI (Roswell Park Memorial Institute) (Dominique Dutscher, Dutscher) supplémenté avec 10% (v/v) de sérum de veau fœtal (SVF) (PAN BIOTECH, Dutscher), pénicilline (100 U/mL), streptomycine (100 µg/mL), amphotéricine B (0.25 µg/mL) (PAN BIOTECH, Dutscher), sous atmosphère contrôlée à 5% de CO₂ et à 37°C. Les cellules sont passées lorsqu'elles atteignent 80% de confluence soit environ 3 fois par semaine.

1. MSC2

La lignée MSC2 est une lignée de MDSC spléniques de souris de la souche Balb/c, caractérisées par le marqueur Gr1+ immortalisées par Vincenzo Bronte (Universita di Verona, Verona Italy). Cette lignée est cultivée sur une surface adhérente dans un milieu complet RPMI supplémenté avec 10% (v/v) de sérum de veau fœtal (SVF), pénicilline (100 U/mL), streptomycine (100 µg/mL), fungizone (0.25 µg/mL) (PAN BIOTECH, Dutscher), sous atmosphère contrôlée à 5% de CO₂ et à 37°C. Les cellules sont passées à environ 80% de confluence soit trois fois par semaine, celles-ci sont préalablement lavées avec du milieu de Hank avec sels sans calcium ni magnésium avec bicarbonate de sodium (Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)) (Dominique Dutscher, Dutscher) puis décollées et individualisées avec de la trypsine-EDTA (Acide Ethylène Diamine Tétracétique) (Dominique Dutscher, Dutscher). L'action de la trypsine est ensuite arrêtée par ajout de milieu complet.

Avant d'être ajouté au milieu de culture, le SVF est décomplémenté par un chauffage à 56°C pendant 30 minutes. L'absence de mycoplasme dans les cultures cellulaires est régulièrement contrôlée en utilisant le kit de détection de mycoplasme fourni par Cambrex selon les indications du fabricant.

II. Traitement des cellules

1. Traitements par les acides gras

Les acides gras (AG) utilisés proviennent de chez Sigma Aldrich : acide oléique (OA), linoléique (LA), eicosapentaénoïque (EPA) et docosahexaénoïque (DHA). Les solutions de traitement d'AG à 1mM sont préparées à partir de solutions mères conservées à -20°C dans de l'éthanol (EPA, DHA) ou du chloroforme (OA, LA).

Le volume d'AG nécessaire est prélevé puis mis à sec sous azote dans un tube soviel® avant d'être repris avec un faible volume d'éthanol (1% du volume final de la solution à 1 mM). Puis, du milieu de culture préchauffé à 37°C et supplémenté avec la sérum albumine bovine dépourvue d'acides gras libres (BSA, Sigma Aldrich) à une concentration de 0.25 mM est ajouté afin d'obtenir un ratio BSA:AG égal à 1:4 (1 molécule de BSA pour 4 molécules d'AG). Les tubes sont fermés sous azote et agités énergiquement pour assurer la liaison des AG aux molécules de BSA. Les solutions d'AG concentrées sont ensuite filtrées (0.22µm) avant d'être utilisées pour traiter les cellules à une concentration finale de 20, 40 et 60 µM.

2. Autres réactifs

Le SP600125 (inhibiteur JNK), le N-acetyl-Cystéine (NAC), la chloroquine (CQ) proviennent de chez Sigma-Aldrich, la bafilomycine A1 de chez Enzo, et le 5-FU de chez ACCORD.

III. Etude de l'expression génique

1. Extraction des ARN totaux

Après retrait du milieu de culture et 2 lavages au PBS 1X, les cellules sont lysées grâce à une solution de TRIzol reagent® (Invitrogen, Thermofisher scientific). Cette solution contenant phénol et guanidine isothiocyanate permet de maintenir l'intégrité des ARN tout en dénaturant les protéines et les composés cellulaires lors de l'homogénéisation. Ensuite, 20% (v/v) de chloroforme sont ajoutés et les tubes sont vortexés, l'ajout de chloroforme va créer deux phases : une phase aqueuse supérieure contenant les ARN et une phase organique inférieure contenant l'ADN et les protéines. Après incubation pendant 3 minutes à température ambiante, les lysats sont centrifugés à 12000 g pendant 15 minutes à 4 °C. La phase aqueuse supérieure, est récupérée et les ARN sont précipités avec de l'isopropanol sur la nuit à -20°C. Après centrifugation à 12000 g

pendant 15 minutes à 4°C, 3 lavages du culot d'ARN avec de l'éthanol 75% froid sont réalisés de manière à éliminer toutes les impuretés et permettre une meilleure reprise des ARN par réhydratation progressive, puis les culots sont dilués dans de l'eau dépourvue de nucléases. La concentration en acides nucléiques est déterminée par mesure de l'absorbance à 260 nm (A260) (1 unité de DO à 260 nm correspondant à 40 µg/ml d'ARN) et mesure du rapport A260/A280 pour vérifier qu'il n'y ait pas de contamination protéique, sur un spectrophotomètre UV-1800 (Shimadzu).

2. Reverse Transcription des ARN messagers

La reverse transcription est réalisée grâce au kit M-MLV (Invitrogen®, ThermoFisher Scientific). Cette étape consiste à synthétiser des ADNc à partir de 300 ng ARNs totaux. Ces ARN sont d'abord mis en présence des amorces de séquences aléatoires et des deoxynucléotides (25mM). Une première étape de 5 minutes à 65°C permet l'hybridation des amorces. Après 5 minutes à 4°C, la reverse transcriptase est ajoutée aux échantillons, ainsi que son tampon, du Dithiothréitol (dT) et un inhibiteur de RNase (RNase OUT). Les échantillons sont ensuite placés 5 minutes à température ambiante. La transcription inverse a lieu à 42°C pendant une heure. L'enzyme est ensuite inactivée à 70°C pendant 15 minutes, puis les tubes sont refroidis à 4°C.

3. Réaction de polymérisation en chaîne quantitative en temps réel

La réaction de polymérisation en chaîne quantitative en temps réel (Real-Time quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)) est réalisée à partir de 4 µL d'ADNc dilués au 1/10^{ème} auxquels sont ajoutées les amorces sens et anti-sens (concentration finale de 300 nM) et le POWER SYBR Green Master MIX 2X (ThermoFischer). Les séquences des amorces utilisées sont détaillées dans le tableau 10.

Tableau 10 Séquences des amorces utilisées pour les RT-qPCR

	Sens	Anti-sens
<i>β-actine</i>	5'-ATGGAGGGGAATACAGCCC-3'	5'-TTCTTTCAGCTCCTTCGTT-3'
<i>18S</i>	5'-GTAACCCGTTGAACCCATT-3'	5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3'
<i>IL-1 β</i>	5'-GGTCAAAGGTTTGGAAAGCAG-3'	5'-TGTGAAATGCCACCTTTTGA-3'

Les réactions d'amplification sont effectuées avec l'appareil StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) selon le programme détaillé dans le tableau 11.

Tableau 11 Programme des cycles de RT-qPCR

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

L'expression des gènes d'intérêt est normalisée par rapport à l'expression des gènes de référence : β -actine et 18S ($\Delta CT = CT \text{ gène} - CT \text{ références}$) et leur expression relative est exprimée selon la formule : $2^{-\Delta\Delta CT}$ où $\Delta\Delta CT$ est la différence des ΔCT entre les échantillons traités et contrôles.

IV. Etude de l'expression protéique

1. Extraction des protéines totales

Les cellules sont lavées avec du PBS froid et lysées par du tampon RIPA froid (12 mM sodium deoxycholate, 50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1mM EDTA, (v/v)) contenant les cocktails d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases 0,4% (v/v) (P2850 Phosphatase Inhibitor Cocktail et P8340 Protease Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich), 1 mM DTT, 1 mM PMSF, après 10 passages à l'aiguille 26 gauges, incubation des protéines 15 minutes sur glace. Le surnageant est récupéré après centrifugation à 15 000 g durant 15 minutes à 4°C.

2. Précipitation des protéines du surnageant

Les cellules sont traitées pendant 24 heures dans de l'OptiMEM, réduit en sérum. Le surnageant de culture est centrifugé 5 minutes à 450 g afin d'éliminer les débris cellulaires. La précipitation du surnageant est réalisée selon la méthode de précipitation méthanol/chloroforme. Pour cela, un volume de surnageant (500 μ L) est précipité avec un volume de méthanol et $\frac{1}{4}$ de volume de

chloroforme, les échantillons sont ensuite vortexés puis centrifugés à 16 000 g 10 minutes à température ambiante. Les protéines forment un anneau blanc entre la phase méthanolique supérieure et la phase inférieure contenant le chloroforme. La phase aqueuse supérieure est retirée, puis deux volumes de méthanol sont ajoutés. Les échantillons sont vortexés puis centrifugés à 16 000 g pendant 10 minutes à température ambiante. Le surnageant est ensuite éliminé et les culots sont séchés sous azote. Les culots sont ensuite repris par 40 µL de tampon de charge dilués au demi, et enfin incubés 5 minutes à température ambiante puis 5 minutes à 100°C avant d'être analysés par western blot.

3. Western blot

La quantité de protéines est déterminée grâce au dosage Bicinchoninic acid Kit for Protein Determination (BCA1) (Pierce). Chaque échantillon est préparé pour le dépôt, en ajoutant à 50 µg de protéines, du Tampon de charge 1X + 2,5% (v/v) β-mercaptoéthanol ajouté extemporanément à la préparation des échantillons (Composition du Tampon de charge 5X : 10% (m/v) SDS (sodium dodecylsulfate), 50% (v/v) Glycérol, 300 mM Tris pH=6.8, 0.005% (m/v) Bleu de Bromophénol). Chaque échantillon est ensuite microcentrifugé et placé 5 minutes à 95°C. Les protéines sont séparées par électrophorèse en gel de poly-acrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE). Les gels de séparation sont préparés de la manière suivante : 370 mM Tris pH8.8, 0.1% (m/v) SDS, 8% à 15% (v/v) d'acrylamide 37.5/ bisacrylamide 1 (euromedex), 0.1% (m/v) Ammonium persulfate (APS) (euromedex) et 0,06% (v/v) Tétra méthyl éthylénédiamine (TEMED) (euromedex). Un gel de concentration est ensuite préparé contenant 125mM Tris pH6.8, 0.1% SDS, 3.7% (v/v) d'acrylamide 37.5/ bisacrylamide 1 (Euromedex), 0.1% APS, et 0,17% TEMED. Les conditions de migration dans le tampon (1,92 M glycine, 720 mM Tris-base et 1% (m/v) SDS) sont les suivantes : trois heures à 80 Volts. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose 0,2 µm (Amersham), pendant 1 heure à 100V à 4°C sous agitation dans du tampon de transfert (1,92 M glycine, 250 mM Tris-base, 20% (v/v) méthanol). La membrane est saturée dans une solution de Tris Buffer Saline Tween (TBST) 0,1% contenant 5% de BSA (m/v) ou 5% de lait écrémé pendant 1 heure, suivi d'une incubation d'une nuit à 4°C en présence des anticorps primaires dilués selon le tableau 12. Le lendemain, après 3 lavages de 10 minutes avec le TBST 0,1% la membrane est incubée 1 heure avec l'anticorps secondaire approprié à l'espèce (Cell Signalling Technology, Inc), couplé à la peroxydase de raifort. Pour finir, 3 lavages de 10 minutes avec le

TBST sont de nouveau réalisés, et enfin, la membrane est rincée une fois dans du TBS. Les protéines d'intérêt sont révélées par chimioluminescence. La solution de révélation, contenant un mélange volume à volume d'Oxidizing Reagent et de Enhanced Luminol Reagent (Clarity, Biorad), est ajoutée sur chaque membrane. Les protéines d'intérêt sont visualisées grâce à une station d'acquisition d'image (Chemi-Doc MP Imaging System, Biorad), les images sont traitées en utilisant le logiciel d'analyse d'image ImageLab.

Tableau 12 Liste des anticorps primaires utilisés en Western Blot

Anticorps	Fournisseur	Référence	Espèce	Saturation	Dilution
β -actine	Sigma-Aldrich	AC-15	Souris	TBST 5% BSA	1/2000 ^{ème}
ASC	Cell Signaling Technologies	B2W8U	Lapin	TBST 5% BSA	1/1000 ^{ème}
IL-1 β /IL-1F2	R&D	AF-401-NA	Chèvre	TBST 5% BSA	1 μ g/mL
NLRP3/NALP3	Adipogen	Cryo-2	Souris	TBST 5% BSA	1 μ g/mL
Caspase-1 (p20)	Adipogen	Casper-1	Souris	TBST 5% lait écrémé	1 μ g/mL
pJNK (T183/Y185)	Cell Signaling Technologies	98F2	Lapin	TBST 5% BSA	1/1000 ^{ème}
JNK	Cell Signaling Technologies	56G8	Lapin	TBST 5% BSA	1/1000 ^{ème}
Cathepsine B	Santa Cruz	S-12	Chèvre	TBST 5% BSA	1/400 ^{ème}

V. Proximity ligation assay

L'expérience de PLA (Proximity Ligation Assay) est réalisée avec le kit Duolink, Detection Reagents Orange (Sigma-Aldrich). Les cellules sontensemencées sur lamelles, une fois traitée par DHA 3h puis 5-FU pendant 18h, un lavage est effectué au PBS 1X et les cellules sont fixées avec la paraformaldéhyde 4% 10 minutes à 4°C. Une étape de perméabilisation/saturation est réalisée

dans une solution PBS 0.2% Saponine 3% BSA à température ambiante pendant 20 minutes. Les anticorps primaires sont dilués selon les indications du tableau 13 et incubés sur la nuit à 4°C, les 2 anticorps primaires choisis devront être de deux espèces différentes. Le lendemain, faire 3 lavages des lamelles au PBS 1X puis incuber les anticorps secondaires, reconnaissant l'un ou l'autre des anticorps primaires au 1/5^{ème} dans la solution PBS 3% BSA 0.2% Saponine, pendant 1h à 37°C. Chacun des anticorps secondaires a été couplé à une séquence de nucléotides complémentaires appelés, plus et minus, permettant leur hybridation dans le cas où les protéines sont proches. Effectuer 2 lavages avec le tampon A puis effectuer la ligation (dilution tampon au 1X – ligase à 25mU/μL), incuber 30 minutes à 37°C. Laver 2 fois les lamelles avec le tampon A et effectuer l'étape d'amplification (dilution tampon au 1X – polymérase à 125mU/μL), incuber 100 minutes à 37°C dans le noir. A la fin de l'incubation effectuer 2 lavages des lamelles avec le tampon B, laisser sous agitation rotative vingt minutes. Après un rinçage à l'eau dépourvue de nucléases, les lamelles sont délicatement séchées puis disposées sur du milieu de montage contenant du DAPI afin d'avoir un marquage du noyau cellulaire. Stocker les lamelles à 4°C dans l'obscurité. La lecture des lames est réalisée sur un microscope à fluorescence Axio Imager 2 (Carl Zeiss GmbH), équipé d'un Apotome 2 (Carl Zeiss GmbH). L'acquisition des images se fait par une caméra CCD monochrome (AxioCam MRm monochrome CCD) comportant les filtres 49 (DAPI) et 43HE (Rhodamine). La quantification de l'interaction protéique des marquages est analysée par le logiciel ICY.

Tableau 13 Liste des anticorps primaires utilisés en PLA

Anticorps primaires	Référence	Espèce	Dilution
ASC	Santa Cruz sc-N15	Lapin	1/100
Caspase-1	Adipogen Casper-1	Souris	1/500
NLRP3	Abcam Ab4207	Chèvre	1/200
Cathepsine B	Santa Cruz S-12	Chèvre	1/100
β-arrestine 2	Cell Signaling Technologies (3857)	Lapin	1/500
NLRP3	Adipogen Cryo-2	Souris	1/500

VI. Analyses par cytométrie en flux

1. Activité Caspase 1

Après ensemencement et traitement des cellules, l'activité caspase 1 est mesurée avec le kit FAM-YVAD-FMK Flica caspase 1 (Biorad). Le FLICA est dilué dans du milieu complet puis mis en contact sur les cellules 45 min à 37°C. Les cellules sont lavées 2 fois avec de l'Apoptosis Wash Buffer 1X. Puis un marquage 7AAD (7-amino-actinomycin D) est effectué permettant l'exclusion des cellules mortes. Les cellules sont analysées en cytométrie en flux sur le LSRII (Becton Dickinson) et le logiciel FlowJo est utilisé pour l'analyse des résultats.

2. LysoTracker

Après 4 et 6h de traitement par le 5-FU +/- DHA ou bafilomycine A, les cellules adhérentes sont incubées avec la sonde lysoTracker DeepRed (Invitrogen) diluée à 50 nM dans du milieu de culture pendant 30 minutes à 37°C 5% CO₂. Les cellules sont ensuite collectées et analysées en cytométrie en flux sur le LSRII (Becton Dickinson) et le logiciel FlowJo est utilisé pour l'analyse des résultats.

VII. ELISA IL1 β

Les MSC2 sont ensemencées puis pré-traitées 3h avec les acides gras polyinsaturés DHA et EPA n-3 ainsi que l'acide oléique (18 :1) n-9 et l'acide linoléique (C18 :2) n-6 à 20, 40 et 60 μ M, puis un traitement de chimiothérapie 5-FU (1 μ M) est effectué pendant 24h. Les surnageants de cellules sont récupérés à 24h de traitement de chimiothérapie. Après centrifugation, l'IL1- β active est dosée à l'aide du kit Mouse IL-1 beta/IL-1F2 DuoSet ELISA (R&D). Les anticorps de capture anti-IL-1 β à 4 μ g/mL dilués dans du PBS 1X filtré sont fixés à raison de 100 μ l par puits dans une plaque 96 puits (Maxi Sorp, Thermo Scientific) à température ambiante sur la nuit. Puis une étape de saturation est effectuée dans un tampon PBS 1X, 1% BSA dépourvue de protéase filtrée pendant 2 heures. Les échantillons et la gamme sont ensuite déposés en triplicat. La gamme est réalisée par dilution en cascade au 1/2 à partir d'une solution Standard, de 1 000 pg/mL, à 15,625 pg/mL. Puis l'anticorps de détection conjugué à de l'avidine à 500 ng/mL est déposé pendant 2 heures à température ambiante pour chaque échantillon. 100 μ l de streptavidine couplée à une Peroxydase de raifort diluée au 1/40 sont incubés pendant 20 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière. Enfin, l'ajout de 3,3', 5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB) à raison de 1/1, est réalisé et incubé à l'abri de la lumière pendant 30 minutes environ. Lorsque la gamme se colore, la réaction

est arrêtée par ajout de 50 µl par puits de solution STOP (2N H₂SO₄). La lecture de la plaque est réalisée à 450 nm et 540 nm sur un spectrophotomètre (TECAN).

VIII. Manipulations *in vivo*

Les souris sont élevées et maintenues selon les consignes du comité d'éthique de l'Université de Bourgogne (protocole numéro 8821). Après réception, les souris subissent une semaine d'acclimatation avant toutes expérimentations.

1. Croissance tumorale

Les tumeurs sont induites par une injection sous-cutanée de cellules cancéreuses EL4 à raison de 10⁶ cellules sur le flanc droit de souris C57bl/6 femelles de 7 à 9 semaines (Charles River Laboratories, France). Les EL4 sont centrifugées puis lavées 3 fois au PBS 1X stérile avant comptage puis injection.

Lorsque les tumeurs sont mesurables, les souris sont réparties de façon homogène en 2 groupes. L'un avec régime alimentaire isocalorique contrôle (huile de tournesol), et l'autre avec un régime enrichi à 3% en DHA (huile Polaris Omegavie TG 80% ou 90% DHA). Le lot contrôle sera divisé en deux, pour qu'un groupe reçoive une injection de chimiothérapie et l'autre non. La mise en régime précède de 15 jours l'injection intrapéritonéale de 5-FU, à raison de 50 mg/kg. La composition du régime est détaillée dans le tableau 14. Ce régime est préparé de façon quotidienne pour éviter l'oxydation des acides gras. Par la suite, la progression tumorale est évaluée par une mesure quotidienne du volume tumoral et la surface des tumeurs est calculée en multipliant la longueur par la largeur des tumeurs.

Tableau 14 Composition du régime alimentaire

Composés	Référence	g/100g de régime
Amidon	60366 SAFE	53.25
Caséine acide	63400 SAFE	10
Cellulose	64254 SAFE	20
Minéraux	PM205 SAFE	3
Vitamines	PV200	2
Sucre	Carrefour	11
L-Méthionine	Sigma-Aldrich	0.75
Lipides	Huile de tournesol Carrefour Ou Huile enrichi en DHA (Polaris Nutritional Lipids) (3%)	5

2. Activité caspase 1

48h après l'injection de 5-FU ou du contrôle PBS, les splénocytes totaux sont récupérés par broyage manuelle de la rate puis la lyse des globules rouges est effectuée avec un tampon de lyse (NH₄Cl 0.83%, KHCO₃ 0.1%). Les récepteurs aux fragments Fc des splénocytes sont saturés en utilisant le mix FcR blocking reagent (Miltenyi Biotec), 10 minutes à 4°C. Les cellules sont ensuite marquées avec un anticorps anti-GR1 couplé à la phycoérythrine-Cyanine 7 (PE-Cy7) (Biolegend), puis des billes magnétiques reconnaissant la Cy7 (Anti-Cy7 Microbeads Miltenyi Biotec) sont ajoutées, ainsi les microbilles viennent se coupler aux cellules GR1+. Un tri magnétique sur colonne (MS columns Miltenyi Biotec) permet d'effectuer un enrichissement en cellules GR1+. Un marquage de la caspase 1 active est ensuite réalisé grâce au kit FAM-YVAD-FMK Flica caspase 1 (Biorad) pendant 45 min à 37°C et 5% CO₂. Enfin, nous effectuons un marquage CD11b grâce à des anticorps couplés à l'allophycocyanine (APC) (miltenyi) ainsi qu'un marquage 7AAD (BD

Biosciences) pour exclure les cellules mortes. Les cellules sont analysées en cytométrie sur le Digital LSR2 (BD Biosciences) et les résultats sont analysés à l'aide du logiciel FlowJo.

3. Dosage IL-1 β

48h après l'injection de 5-FU ou du contrôle, le sang total est récupéré à l'aide de seringues héparinées. Le sang est ensuite centrifugé à 3000 g pendant 10 minutes à 4°C et l'IL-1 β est dosée dans le plasma à l'aide du kit Mouse IL-1 beta/IL-1F2 DuoSet ELISA (R&D) selon le protocole détaillé au-dessus.

4. Marquage p-JNK

24h après l'injection de 5-FU, les MDSC spléniques sont préparées et marquées CD11b Gr1 comme décrit dans la partie « activité caspase 1 ». Le marquage de surface est ensuite fixé et les cellules sont perméabilisées grâce au tampon BD Cytotfix/cytoperm buffer (BD). Les cellules sont ensuite lavées selon les recommandations du fournisseur en utilisant la solution BD Perm/Wash Buffer, puis saturées avec la même solution supplémentée avec 5% de BSA. L'anticorps primaire anti-p-JNK (G-9, Cell Signaling, 1/100^{ème}) est incubé 1 heure à 4°C, les cellules sont ensuite lavées puis marquées avec l'anticorps secondaire (anti-souris Alexa488, life technologies, 1/1000^{ème}). Après lavage, les cellules sont resuspendues dans le flow cytometry staining buffer (eBiosciences). La phosphorylation de JNK est déterminée par cytométrie et présentée en moyenne de fluorescence.

IX. Patients

Entre octobre 2016 et juillet 2018, nous avons collecté le sang de patients atteints d'un cancer colorectal métastatique (n=46) suivis au Centre Georges François Leclerc (Dijon, France). Les patients, diagnostiqués dans ce centre ont reçu un traitement à base de 5-FU (principalement une combinaison 5-FU+irinotecan ou 5-FU+oxaliplatine). Tous les patients ont donné leur consentement éclairé approuvé par le comité d'éthique local. Le prélèvement de sang est autorisé par l'autorisation française (n ° AC2014-2460). Aucun autre échantillon de sang que ceux requis pour les tests de routine n'a été prélevé. Le sang total des patients a été échantillonné avant (J0) et après un cycle de chimiothérapie sur des tubes héparinés (BD Biosciences) pour analyse.

1. Activité caspase 1 sur les MDSC circulantes

L'activité caspase 1 des MDSC de patients est mesurée sur les MDSC circulantes. Les cellules sanguines sont marquées avec le kit FAM-YVAD-FMK Flica caspase 1 (Biorad) pendant 45 min à 37°C et 5% CO₂. Après lavage des cellules un marquage des MDSC est effectué avec les anticorps suivant : lineage cocktail conjugué PE-Vio770 anti-CD3 (BW264/56), 56 (REA196), 19 (REA675), et 20 (REA780)), anti-CD33 conjugué PE (REA775), anti-CD15 Viogreen (VIMC6), anti-CD14 APC-Vio770 (TÜK4), et anti-HLA-DR APC (AC122) (Miltenyi Biotec) un marquage viabilityTM 405/452 fixable dye (Miltenyi Biotec) est réalisé pour l'exclusion des cellules mortes. Après 20 minutes d'incubation à l'abri de la lumière et à température ambiante les anticorps membranaires sont fixés et les globules rouges sont lysés pendant 10 minutes par ajout de 2 mL de la solution red blood cells lysis/fixation solution (BD). Les cellules sont ensuite centrifugées 15 minutes à 450 g, reprises dans du flow cytometry staining buffer et analysées en cytométrie en flux.

2. Analyse lipidomique

25 µL de plasma de patient sont mélangés à 25 µL d'un mix de standards internes contenant 1300 ng d'acide myristique d3, 5640 ng of d'acide palmitique d3, 4200 ng of d'acide stéarique d3, 3252 ng d'acide linoléique d4, 5.2 ng d'acide arachidonique d3, 2160 ng d'acide arachidonique d8, 54 ng d'acide behénique d3, 540 ng de DHA d5, 26 ng de lignocérique d4 and 20 ng of d'acide cerotique d4 dans l'éthanol. Ensuite, sont ajoutés 1 mL d'éthanol/BHT (50 mg/mL) et 60 µL de potasse (KOH) 10 M. Les tubes sont fermés sous Argon puis la réaction de saponification a lieu pendant minutes à 60°C. La potasse est ensuite neutralisée par ajout d'1 mL d'HCl (1,2 M). Les lipides sont ensuite extraits avec 2 mL d'hexane, forte agitation de 10 minutes et centrifugation de 10 minutes à 2 000 g. La phase organique supérieure est collectée et évaporée. L'extrait sec est repris avec 5 µL de Pentofluorobenzyl bromide (PFBB_r), 90µL d'acétonitrile et 5µl de N,N-diisopropylethylamine (DIPEA). La réaction de dérivation permettant la formation d'esters de pentafluorobenzyl se déroule à 37°C pendant 30 minutes. Puis, les dérivés pentafluorobenzyl- esters d'acides gras sont extraits avec 1 ml d'eau distillée et 2 ml d'hexane. Après évaporation de la phase organique, les esters sont repris dans l'hexane et injectés en chromatographie phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS).

X. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Prism (GraphPad). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm SD (expérimentations *in vitro*) ou \pm SEM (expérimentations *in vivo*). La distribution normale des données a été déterminée grâce au test d'Agostino Pearson et la différence significative de ces moyennes a été déterminée en utilisant les tests Kruskal-Wallis avec un test post hoc de Dunn ou ANOVA one-way avec un test post hoc de Tuckey. La corrélation de Spearman a été calculée entre deux groupes. Une valeur de $p < 0.05$ est considérée comme significative. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; ns, non-significatif.

*Références
bibliographiques*

- Afonina, I.S., Müller, C., Martin, S.J., and Beyaert, R. (2015). Proteolytic Processing of Interleukin-1 Family Cytokines: Variations on a Common Theme. *Immunity* 42, 991–1004.
- Agostinelli, E., and Seiler, N. (2006). Non-irradiation-derived reactive oxygen species (ROS) and cancer: therapeutic implications. *Amino Acids* 31, 341–355.
- Agostini, L., Martinon, F., Burns, K., McDermott, M.F., Hawkins, P.N., and Tschopp, J. (2004). NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity* 20, 319–325.
- Aguirre-Ghiso, J.A. (2007). Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat. Rev. Cancer* 7, 834–846.
- Aleksandrova, K., Jenab, M., Leitzmann, M., Bueno-de-Mesquita, B., Kaaks, R., Riboli, E., and Boeing, H. (2017). Mediating Factors of the Association between Physical Activity and Colon Cancer: Lessons from the EPIC Cohort. In *Das Gesundheitswesen*, (Georg Thieme Verlag KG), pp. V-279–279.
- Alexiou, P., Chatzopoulou, M., Pegklidou, K., and Demopoulos, V.J. (2010). RAGE: a multi-ligand receptor unveiling novel insights in health and disease. *Curr. Med. Chem.* 17, 2232–2252.
- Alizadeh, D., and Larmonier, N. (2014). Chemotherapeutic targeting of cancer-induced immunosuppressive cells. *Cancer Res.* 74, 2663–2668.
- Alizadeh, D., Trad, M., Hanke, N.T., Larmonier, C.B., Janikashvili, N., Bonnotte, B., Katsanis, E., and Larmonier, N. (2014). Doxorubicin Eliminates Myeloid-Derived Suppressor Cells and Enhances the Efficacy of Adoptive T Cell Transfer in Breast Cancer. *Cancer Res.* 74, 104–118.
- Allen, I.C., Scull, M.A., Moore, C.B., Holl, E.K., McElvania-TeKippe, E., Taxman, D.J., Guthrie, E.H., Pickles, R.J., and Ting, J.P.-Y. (2009). The NLRP3 inflammasome mediates in vivo innate immunity to influenza A virus through recognition of viral RNA. *Immunity* 30, 556–565.
- Allen, M.J., Fan, Y.-Y., Monk, J.M., Hou, T.Y., Barhoumi, R., McMurray, D.N., and Chapkin, R.S. (2014). n-3 PUFAs reduce T-helper 17 cell differentiation by decreasing responsiveness to interleukin-6 in isolated mouse splenic CD4⁺ T cells. *J. Nutr.* 144, 1306–1313.

- Almand, B., Clark, J.I., Nikitina, E., van Beynen, J., English, N.R., Knight, S.C., Carbone, D.P., and Gabrilovich, D.I. (2001). Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *166*, 678–689.
- André, T., Boni, C., Navarro, M., Tabernero, J., Hickish, T., Topham, C., Bonetti, A., Clingan, P., Bridgewater, J., Rivera, F., et al. (2009). Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *27*, 3109–3116.
- Arshad, A., Isherwood, J., Mann, C., Cooke, J., Pollard, C., Runau, F., Morgan, B., Steward, W., Metcalfe, M., and Dennison, A. (2017). Intravenous ω -3 Fatty Acids Plus Gemcitabine. *JPEN J. Parenter. Enteral Nutr.* *41*, 398–403.
- Atrekhany, K.-S.N., Nosenko, M.A., Gogoleva, V.S., Zvartsev, R.V., Qin, Z., Nedospasov, S.A., and Drutskaya, M.S. (2016). TNF Neutralization Results in the Delay of Transplantable Tumor Growth and Reduced MDSC Accumulation. *Front. Immunol.* *7*.
- Azrad, M., Turgeon, C., and Demark-Wahnefried, W. (2013). Current Evidence Linking Polyunsaturated Fatty Acids with Cancer Risk and Progression. *Front. Oncol.* *3*.
- Baranova, I.N., Kurlander, R., Bocharov, A.V., Vishnyakova, T.G., Chen, Z., Remaley, A.T., Csako, G., Patterson, A.P., and Eggerman, T.L. (2008). Role of human CD36 in bacterial recognition, phagocytosis, and pathogen-induced JNK-mediated signaling. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *181*, 7147–7156.
- Bauer, J.D., and Capra, S. (2005). Nutrition intervention improves outcomes in patients with cancer cachexia receiving chemotherapy--a pilot study. *Support. Care Cancer Off. J. Multinatl. Assoc. Support. Care Cancer* *13*, 270–274.
- Bauer, C., Duewell, P., Mayer, C., Lehr, H.A., Fitzgerald, K.A., Dauer, M., Tschopp, J., Endres, S., Latz, E., and Schnurr, M. (2010). Colitis induced in mice with dextran sulfate sodium (DSS) is mediated by the NLRP3 inflammasome. *Gut* *59*, 1192–1199.
- Bauernfeind, F.G., Horvath, G., Stutz, A., Alnemri, E.S., MacDonald, K., Speert, D., Fernandes-Alnemri, T., Wu, J., Monks, B.G., Fitzgerald, K.A., et al. (2009). Cutting Edge: NF- κ B Activating Pattern Recognition and Cytokine Receptors License NLRP3 Inflammasome Activation by Regulating NLRP3 Expression. *J. Immunol.* *183*, 787–791.

- Beck, C., Schreiber, K., Schreiber, H., and Rowley, D.A. (2003). C-kit⁺ FcR⁺ myelocytes are increased in cancer and prevent the proliferation of fully cytolytic T cells in the presence of immune serum. *Eur. J. Immunol.* *33*, 19–28.
- Bednash, J.S., and Mallampalli, R.K. (2016). Regulation of inflammasomes by ubiquitination. *Cell. Mol. Immunol.* *13*, 722–728.
- Belabed, L., Thadikaran, L., Dupertuis, Y.M., and Pichard, C. (2008). La combinaison de la chimiothérapie à l'acide eicosapentaénoïque (EPA) augmente l'apoptose de cellules humaines d'adénocarcinomes colorectaux HT-29. </data/revues/09850562/002200S1/124/>.
- Béliveau, R., and Gingras, D. (2007). Role of nutrition in preventing cancer. *Can. Fam. Physician* *53*, 1905–1911.
- Bennett, J.A., Rao, V.S., and Mitchell, M.S. (1978). Systemic bacillus Calmette-Guérin (BCG) activates natural suppressor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *75*, 5142–5144.
- Berger, H., Végran, F., Chikh, M., Gilardi, F., Ladoire, S., Bugaut, H., Mignot, G., Chalmin, F., Bruchard, M., Derangère, V., et al. (2013a). SOCS3 Transactivation by PPAR γ Prevents IL-17–Driven Cancer Growth. *Cancer Res.* *73*, 3578–3590.
- Berger, H., Végran, F., Chikh, M., Gilardi, F., Ladoire, S., Bugaut, H., Mignot, G., Chalmin, F., Bruchard, M., Derangère, V., et al. (2013b). SOCS3 transactivation by PPAR γ prevents IL-17-driven cancer growth. *Cancer Res.* *73*, 3578–3590.
- Bingham, S., and Riboli, E. (2004). Diet and cancer — the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Nat. Rev. Cancer* *4*, 206–215.
- Black, M., Barsoum, I.B., Truesdell, P., Cotechini, T., Macdonald-Goodfellow, S.K., Petroff, M., Siemens, D.R., Koti, M., Craig, A.W.B., and Graham, C.H. (2016). Activation of the PD-1/PD-L1 immune checkpoint confers tumor cell chemoresistance associated with increased metastasis. *Oncotarget* *7*, 10557–10567.
- Blank, C., and Mackensen, A. (2007). Contribution of the PD-L1/PD-1 pathway to T-cell exhaustion: an update on implications for chronic infections and tumor evasion. *Cancer Immunol. Immunother. CII* *56*, 739–745.

- Blonk, M.C., Bilo, H.J., Nauta, J.J., Popp-Snijders, C., Mulder, C., and Donker, A.J. (1990). Dose-response effects of fish-oil supplementation in healthy volunteers. *Am. J. Clin. Nutr.* *52*, 120–127.
- Bod, L., Lengagne, R., Wrobel, L., Ramspott, J.P., Kato, M., Avril, M.-F., Castellano, F., Molinier-Frenkel, V., and Prévost-Blondel, A. (2017). IL4-induced gene 1 promotes tumor growth by shaping the immune microenvironment in melanoma. *Oncotmunology* *6*, e1278331.
- Bonato, S.J.R., Oliveira, H.H.P., Nunes, E.A., Pequito, D., Iagher, F., Coelho, I., Naliwaiko, K., Kryczyk, M., Brito, G.A.P., Repka, J., et al. (2012). Fish oil supplementation improves neutrophil function during cancer chemotherapy. *Lipids* *47*, 383–389.
- Bose, A., Taylor, J.L., Alber, S., Watkins, S.C., Garcia, J.A., Rini, B.I., Ko, J.S., Cohen, P.A., Finke, J.H., and Storkus, W.J. (2011). Sunitinib facilitates the activation and recruitment of therapeutic anti-tumor immunity in concert with specific vaccination. *Int. J. Cancer* *129*, 2158–2170.
- Boshoff, C., and Weiss, R. (2002). Aids-related malignancies. *Nat. Rev. Cancer* *2*, 373–382.
- Boudreau, M.D., Sohn, K.H., Rhee, S.H., Lee, S.W., Hunt, J.D., and Hwang, D.H. (2001). Suppression of Tumor Cell Growth Both in Nude Mice and in Culture by n-3 Polyunsaturated Fatty Acids: Mediation through Cyclooxygenase-independent Pathways. *Cancer Res.* *61*, 1386–1391.
- Bougnoux, P., Germain, E., Chajès, V., Hubert, B., Lhuillery, C., Le Floch, O., Body, G., and Calais, G. (1999). Cytotoxic drugs efficacy correlates with adipose tissue docosahexaenoic acid level in locally advanced breast carcinoma. *Br. J. Cancer* *79*, 1765–1769.
- Bougnoux, P., Hajjaji, N., Ferrasson, M.N., Giraudeau, B., Couet, C., and Le Floch, O. (2009). Improving outcome of chemotherapy of metastatic breast cancer by docosahexaenoic acid: a phase II trial. *Br. J. Cancer* *101*, 1978–1985.
- Bourre, J.M., Piciotti, M., and Dumont, O. (1990). Delta 6 desaturase in brain and liver during development and aging. *Lipids* *25*, 354–356.
- Boyce, J.A. (2005). Eicosanoid mediators of mast cells: receptors, regulation of synthesis, and pathobiologic implications. *Chem. Immunol. Allergy* *87*, 59–79.
- Brabletz, T., Kalluri, R., Nieto, M.A., and Weinberg, R.A. (2018). EMT in cancer. *Nat. Rev. Cancer* *18*, 128–134.

- Bradbury, K.E., Appleby, P.N., and Key, T.J. (2014). Fruit, vegetable, and fiber intake in relation to cancer risk: findings from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Am. J. Clin. Nutr.* *100*, 394S-398S.
- Bretscher, P., and Cohn, M. (1970). A Theory of Self-Nonself Discrimination: Paralysis and induction involve the recognition of one and two determinants on an antigen, respectively. *Science* *169*, 1042–1049.
- Bronte, V., Kasic, T., Gri, G., Gallana, K., Borsellino, G., Marigo, I., Battistini, L., Iafrate, M., Prayer-Galetti, T., Pagano, F., et al. (2005). Boosting antitumor responses of T lymphocytes infiltrating human prostate cancers. *J. Exp. Med.* *201*, 1257–1268.
- Bronte, V., Brandau, S., Chen, S.-H., Colombo, M.P., Frey, A.B., Greten, T.F., Mandruzzato, S., Murray, P.J., Ochoa, A., Ostrand-Rosenberg, S., et al. (2016). Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nat. Commun.* *7*, 12150.
- Brough, D., and Rothwell, N.J. (2007). Caspase-1-dependent processing of pro-interleukin-1 β is cytosolic and precedes cell death. *J. Cell Sci.* *120*, 772–781.
- Brown, M.D., and Sacks, D.B. (2009). Protein scaffolds in MAP kinase signalling. *Cell. Signal.* *21*, 462–469.
- Broz, P., von Moltke, J., Jones, J.W., Vance, R.E., and Monack, D.M. (2010). Differential requirement for Caspase-1 autoproteolysis in pathogen-induced cell death and cytokine processing. *Cell Host Microbe* *8*, 471–483.
- Bruchard, M., Mignot, G., Derangère, V., Chalmin, F., Chevriaux, A., Végran, F., Boireau, W., Simon, B., Ryffel, B., Connat, J.L., et al. (2013). Chemotherapy-triggered cathepsin B release in myeloid-derived suppressor cells activates the Nlrp3 inflammasome and promotes tumor growth. *Nat. Med.* *19*, 57–64.
- Bruchard, M., Rebé, C., Derangère, V., Togbé, D., Ryffel, B., Boidot, R., Humblin, E., Hamman, A., Chalmin, F., Berger, H., et al. (2015). The receptor NLRP3 is a transcriptional regulator of TH2 differentiation. *Nat. Immunol.* *16*, 859–870.

- Bruggen, P. van der, Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., Plaen, E.D., Eynde, B.V. den, Knuth, A., and Boon, T. (1991). A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254, 1643–1647.
- van Bruggen, R., Köker, M.Y., Jansen, M., van Houdt, M., Roos, D., Kuijpers, T.W., and van den Berg, T.K. (2010). Human NLRP3 inflammasome activation is Nox1-4 independent. *Blood* 115, 5398–5400.
- Bruns, A.M., and Horvath, C.M. (2014). Antiviral RNA Recognition and Assembly by RLR Family Innate Immune Sensors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 25, 507–512.
- Brydges, S.D., Mueller, J.L., McGeough, M.D., Pena, C.A., Misaghi, A., Gandhi, C., Putnam, C.D., Boyle, D.L., Firestein, G.S., Horner, A.A., et al. (2009). Inflammasome-mediated disease animal models reveal roles for innate but not adaptive immunity. *Immunity* 30, 875–887.
- Buchanan, F.G., Wang, D., Bargiacchi, F., and DuBois, R.N. (2003). Prostaglandin E2 regulates cell migration via the intracellular activation of the epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* 278, 35451–35457.
- Bullock, M.D., Pickard, K., Mitter, R., Sayan, A.E., Primrose, J.N., Ivan, C., Calin, G.A., Thomas, G.J., Packham, G.K., and Mirnezami, A.H. (2015). Stratifying risk of recurrence in stage II colorectal cancer using deregulated stromal and epithelial microRNAs. *Oncotarget* 6, 7262–7279.
- Bunt, S.K., Yang, L., Sinha, P., Clements, V.K., Leips, J., and Ostrand-Rosenberg, S. (2007). Reduced Inflammation in the Tumor Microenvironment Delays the Accumulation of Myeloid-Derived Suppressor Cells and Limits Tumor Progression. *Cancer Res.* 67, 10019–10026.
- Bunt, S.K., Clements, V.K., Hanson, E.M., Sinha, P., and Ostrand-Rosenberg, S. (2009). Inflammation enhances myeloid-derived suppressor cell cross-talk by signaling through Toll-like receptor 4. *J. Leukoc. Biol.* 85, 996–1004.
- Burnet, F.M. (1970). The concept of immunological surveillance. *Prog. Exp. Tumor Res.* 13, 1–27.
- Burnet, M. (1957). Cancer; a biological approach. I. The processes of control. *Br. Med. J.* 1, 779–786.

- Burns, R.N., and Moniri, N.H. (2010). Agonism with the omega-3 fatty acids alpha-linolenic acid and docosahexaenoic acid mediates phosphorylation of both the short and long isoforms of the human GPR120 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 396, 1030–1035.
- Buyse, M., Zeleniuch-Jacquotte, A., and Chalmers, T.C. (1988). Adjuvant therapy of colorectal cancer. Why we still don't know. *JAMA* 259, 3571–3578.
- Cai, F., Sorg, O., Granci, V., Lecumberri, E., Miralbell, R., Dupertuis, Y.M., and Pichard, C. (2014). Interaction of ω -3 polyunsaturated fatty acids with radiation therapy in two different colorectal cancer cell lines. *Clin. Nutr. Edinb. Scotl.* 33, 164–170.
- Calder, P.C. (2005). Polyunsaturated fatty acids and inflammation. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 423–427.
- Calviello, G., Di Nicuolo, F., Gragnoli, S., Piccioni, E., Serini, S., Maggiano, N., Tringali, G., Navarra, P., Ranelletti, F.O., and Palozza, P. (2004). n-3 PUFAs reduce VEGF expression in human colon cancer cells modulating the COX-2/PGE2 induced ERK-1 and -2 and HIF-1 α induction pathway. *Carcinogenesis* 25, 2303–2310.
- Calviello, G., Resci, F., Serini, S., Piccioni, E., Toesca, A., Boninsegna, A., Monego, G., Ranelletti, F.O., and Palozza, P. (2007). Docosahexaenoic acid induces proteasome-dependent degradation of beta-catenin, down-regulation of survivin and apoptosis in human colorectal cancer cells not expressing COX-2. *Carcinogenesis* 28, 1202–1209.
- Camargo, C. de Q., Mocellin, M.C., Pastore Silva, J. de A., Fabre, M.E. de S., Nunes, E.A., and Trindade, E.B.S. de M. (2016). Fish oil supplementation during chemotherapy increases posterior time to tumor progression in colorectal cancer. *Nutr. Cancer* 68, 70–76.
- Campbell, S.E., Tandon, N.N., Woldegiorgis, G., Luiken, J.J.F.P., Glatz, J.F.C., and Bonen, A. (2004). A novel function for fatty acid translocase (FAT)/CD36: involvement in long chain fatty acid transfer into the mitochondria. *J. Biol. Chem.* 279, 36235–36241.
- Cancer Genome Atlas Network (2012). Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 487, 330–337.
- Carrillo, C., Cavia, M.D.M., and Alonso-Torre, S.R. (2012). Antitumor effect of oleic acid; mechanisms of action: a review. *Nutr. Hosp.* 27, 1860–1865.

- Cassel, S.L., Eisenbarth, S.C., Iyer, S.S., Sadler, J.J., Colegio, O.R., Tephly, L.A., Carter, A.B., Rothman, P.B., Flavell, R.A., and Sutterwala, F.S. (2008). The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 9035–9040.
- Castaño, Z., Juan, B.P.S., Spiegel, A., Pant, A., DeCristo, M.J., Laszewski, T., Ubellacker, J.M., Janssen, S.R., Dongre, A., Reinhardt, F., et al. (2018). IL-1 β inflammatory response driven by primary breast cancer prevents metastasis-initiating cell colonization. *Nat. Cell Biol.* *20*, 1084–1097.
- Chalmin, F., Ladoire, S., Mignot, G., Vincent, J., Bruchard, M., Remy-Martin, J.-P., Boireau, W., Rouleau, A., Simon, B., Lanneau, D., et al. (2010). Membrane-associated Hsp72 from tumor-derived exosomes mediates STAT3-dependent immunosuppressive function of mouse and human myeloid-derived suppressor cells. *J. Clin. Invest.* *120*, 457–471.
- Chang, A.L., Miska, J., Wainwright, D.A., Dey, M., Rivetta, C.V., Yu, D., Kanojia, D., Pituch, K.C., Qiao, J., Pytel, P., et al. (2016). CCL2 produced by the glioma microenvironment is essential for the recruitment of regulatory T cells and myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res.* *76*, 5671–5682.
- Chang, C.-Y., Lee, J., Kim, E.-Y., Park, H.-J., Kwon, C.-H., Joh, J.-W., and Kim, S.-J. (2007). Intratumoral delivery of IL-18 naked DNA induces T-cell activation and Th1 response in a mouse hepatic cancer model. *BMC Cancer* *7*, 87.
- Chang, W.L., Chapkin, R.S., and Lupton, J.R. (1998). Fish oil blocks azoxymethane-induced rat colon tumorigenesis by increasing cell differentiation and apoptosis rather than decreasing cell proliferation. *J. Nutr.* *128*, 491–497.
- Chapkin, R.S., Wang, N., Fan, Y.-Y., Lupton, J.R., and Prior, I.A. (2008). Docosahexaenoic Acid Alters the Size and Distribution of Cell Surface Microdomains. *Biochim. Biophys. Acta* *1778*, 466–471.
- Chapman, J.R., Webster, A.C., and Wong, G. (2013). *Cancer in the Transplant Recipient*. Cold Spring Harb. Perspect. Med. *3*.
- Chen, D.S., and Mellman, I. (2017). Elements of cancer immunity and the cancer–immune set point. *Nature* *541*, 321–330.

- Chen, J., Katsifis, A., Hu, C., and Huang, X.-F. (2011). Insulin decreases therapeutic efficacy in colon cancer cell line HT29 via the activation of the PI3K/Akt pathway. *Curr. Drug Discov. Technol.* *8*, 119–125.
- Chen, M.-F., Kuan, F.-C., Yen, T.-C., Lu, M.-S., Lin, P.-Y., Chung, Y.-H., Chen, W.-C., and Lee, K.-D. (2014a). IL-6-stimulated CD11b+CD14+HLA-DR- myeloid-derived suppressor cells, are associated with progression and poor prognosis in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Oncotarget* *5*, 8716–8728.
- Chen, Z., Zhang, Y., Jia, C., Wang, Y., Lai, P., Zhou, X., Wang, Y., Song, Q., Lin, J., Ren, Z., et al. (2014b). mTORC1/2 targeted by n-3 polyunsaturated fatty acids in the prevention of mammary tumorigenesis and tumor progression. *Oncogene* *33*, 4548–4557.
- Chu, J., Thomas, L.M., Watkins, S.C., Franchi, L., Núñez, G., and Salter, R.D. (2009). Cholesterol-dependent cytolysins induce rapid release of mature IL-1beta from murine macrophages in a NLRP3 inflammasome and cathepsin B-dependent manner. *J. Leukoc. Biol.* *86*, 1227–1238.
- Chun, E., Lavoie, S., Michaud, M., Gallini, C.A., Kim, J., Soucy, G., Odze, R., Glickman, J.N., and Garrett, W.S. (2015). CCL2 Promotes Colorectal Carcinogenesis by Enhancing Polymorphonuclear Myeloid-Derived Suppressor Cell Population and Function. *Cell Rep.* *12*, 244–257.
- Chung, H., Lee, Y.S., Mayoral, R., Oh, D.Y., Siu, J.T., Webster, N.J., Sears, D.D., Olefsky, J.M., and Ellies, L.G. (2015). Omega-3 fatty acids reduce obesity-induced tumor progression independent of GPR120 in a mouse model of postmenopausal breast cancer. *Oncogene* *34*, 3504–3513.
- Chung, Y., Chang, S.H., Martinez, G.J., Yang, X.O., Nurieva, R., Kang, H.S., Ma, L., Watowich, S.S., Jetten, A.M., Tian, Q., et al. (2009). Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. *Immunity* *30*, 576–587.
- Cockbain, A.J., Toogood, G.J., and Hull, M.A. (2012). Omega-3 polyunsaturated fatty acids for the treatment and prevention of colorectal cancer. *Gut* *61*, 135–149.
- Cockbain, A.J., Volpato, M., Race, A.D., Munarini, A., Fazio, C., Belluzzi, A., Loadman, P.M., Toogood, G.J., and Hull, M.A. (2014). Anticolorectal cancer activity of the omega-3 polyunsaturated fatty acid eicosapentaenoic acid. *Gut* *63*, 1760–1768.
- Coley, W.B. (1891). II. Contribution to the Knowledge of Sarcoma. *Ann. Surg.* *14*, 199–220.

- Coley, W.B. (1893). THE TREATMENT OF MALIGNANT TUMORS BY REPEATED INOCULATIONS OF ERYSIPELAS: WITH A REPORT OF TEN ORIGINAL CASES.1 - ProQuest.
- Compan, V., Baroja-Mazo, A., López-Castejón, G., Gomez, A.I., Martínez, C.M., Angosto, D., Montero, M.T., Herranz, A.S., Bazán, E., Reimers, D., et al. (2012). Cell volume regulation modulates NLRP3 inflammasome activation. *Immunity* 37, 487–500.
- Condamine, T., Kumar, V., Ramachandran, I.R., Youn, J.-I., Celis, E., Finnberg, N., El-Deiry, W.S., Winograd, R., Vonderheide, R.H., English, N.R., et al. (2014). ER stress regulates myeloid-derived suppressor cell fate through TRAIL-R-mediated apoptosis. *J. Clin. Invest.* 124, 2626–2639.
- Condamine, T., Mastio, J., and Gabilovich, D.I. (2015). Transcriptional regulation of myeloid-derived suppressor cells. *J. Leukoc. Biol.* 98, 913–922.
- Condamine, T., Dominguez, G.A., Youn, J.-I., Kossenkov, A.V., Mony, S., Alicea-Torres, K., Tcyganov, E., Hashimoto, A., Nefedova, Y., Lin, C., et al. (2016a). Lectin-type oxidized LDL receptor-1 distinguishes population of human polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells in cancer patients. *Sci. Immunol.* 1, aaf8943–aaf8943.
- Condamine, T., Dominguez, G.A., Youn, J.-I., Kossenkov, A.V., Mony, S., Alicea-Torres, K., Tcyganov, E., Hashimoto, A., Nefedova, Y., Lin, C., et al. (2016b). Lectin-type oxidized LDL receptor-1 distinguishes population of human polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells in cancer patients. *Sci. Immunol.* 1, aaf8943–aaf8943.
- Conos, S.A., Lawlor, K.E., Vaux, D.L., Vince, J.E., and Lindqvist, L.M. (2016). Cell death is not essential for caspase-1-mediated interleukin-1 β activation and secretion. *Cell Death Differ.* 23, 1827–1838.
- Cookson, B.T., and Brennan, M.A. (2001). Pro-inflammatory programmed cell death. *Trends Microbiol.* 9, 113–114.
- Cordoba-Rodriguez, R., Fang, H., Lankford, C.S., and Frucht, D.M. (2004). Anthrax lethal toxin rapidly activates caspase-1/ICE and induces extracellular release of interleukin (IL)-1 β and IL-18. *J. Biol. Chem.* 279, 20563–20566.
- Corridoni, D., Arseneau, K.O., Cifone, M.G., and Cominelli, F. (2014). The dual role of nod-like receptors in mucosal innate immunity and chronic intestinal inflammation. *Front. Immunol.* 5, 317.

- Cotte, A.K., Aires, V., Fredon, M., Limagne, E., Derangère, V., Thibaudin, M., Humblin, E., Scagliarini, A., de Barros, J.-P.P., Hillon, P., et al. (2018). Lysophosphatidylcholine acyltransferase 2-mediated lipid droplet production supports colorectal cancer chemoresistance. *Nat. Commun.* *9*, 322.
- Coussens, L.M., and Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature* *420*, 860–867.
- Couzin-Frankel, J. (2013). Cancer Immunotherapy. *Science* *342*, 1432–1433.
- Coviello, G., Tutino, V., Notarnicola, M., and Caruso, M.G. (2014). Erythrocyte membrane fatty acids profile in colorectal cancer patients: a preliminary study. *Anticancer Res.* *34*, 4775–4779.
- Crim, K.C., Sanders, L.M., Hong, M.Y., Taddeo, S.S., Turner, N.D., Chapkin, R.S., and Lupton, J.R. (2008). Upregulation of p21Waf1/Cip1 expression in vivo by butyrate administration can be chemoprotective or chemopromotive depending on the lipid component of the diet. *Carcinogenesis* *29*, 1415.
- Cruz, C.M., Rinna, A., Forman, H.J., Ventura, A.L.M., Persechini, P.M., and Ojcius, D.M. (2007). ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages. *J. Biol. Chem.* *282*, 2871–2879.
- Cui, J., Li, Y., Zhu, L., Liu, D., Songyang, Z., Wang, H.Y., and Wang, R.-F. (2012). NLRP4 negatively regulates type I interferon signaling by targeting the kinase TBK1 for degradation via the ubiquitin ligase DTX4. *Nat. Immunol.* *13*, 387–395.
- Cullen, S.P., Kearney, C.J., Clancy, D.M., and Martin, S.J. (2015). Diverse Activators of the NLRP3 Inflammasome Promote IL-1 β Secretion by Triggering Necrosis. *Cell Rep.* *11*, 1535–1548.
- Cunningham, M.P., Essapen, S., Thomas, H., Green, M., Lovell, D.P., Topham, C., Marks, C., and Modjtahedi, H. (2005). Coexpression, prognostic significance and predictive value of EGFR, EGFRvIII and phosphorylated EGFR in colorectal cancer. *Int. J. Oncol.* *27*, 317–325.
- Daenen, L.G.M., Cirkel, G.A., Houthuijzen, J.M., Gerrits, J., Oosterom, I., Roodhart, J.M.L., Tinteren, H. van, Ishihara, K., Huitema, A.D.R., Verhoeven-Duif, N.M., et al. (2015). Increased Plasma Levels of Chemoresistance-Inducing Fatty Acid 16:4(n-3) After Consumption of Fish and Fish Oil. *JAMA Oncol.* *1*, 350–358.

- Dardalhon, V., Anderson, A.C., Karman, J., Apetoh, L., Chandwaskar, R., Lee, D.H., Cornejo, M., Nishi, N., Yamauchi, A., Quintana, F.J., et al. (2010). Tim-3/galectin-9 pathway: regulation of Th1 immunity through promotion of CD11b+Ly-6G+ myeloid cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *185*, 1383–1392.
- Davidson, M.H., Johnson, J., Rooney, M.W., Kyle, M.L., and Kling, D.F. (2012). A novel omega-3 free fatty acid formulation has dramatically improved bioavailability during a low-fat diet compared with omega-3-acid ethyl esters: The ECLIPSE (Epanova® compared to Lovaza® in a pharmacokinetic single-dose evaluation) study. *J. Clin. Lipidol.* *6*, 573–584.
- D’Eliseo, D., Manzi, L., Merendino, N., and Velotti, F. (2012). Docosahexaenoic acid inhibits invasion of human RT112 urinary bladder and PT45 pancreatic carcinoma cells via down-modulation of granzyme B expression. *J. Nutr. Biochem.* *23*, 452–457.
- Deng, L., Liang, H., Burnette, B., Beckett, M., Darga, T., Weichselbaum, R.R., and Fu, Y.-X. (2014). Irradiation and anti-PD-L1 treatment synergistically promote antitumor immunity in mice. *J. Clin. Invest.* *124*, 687–695.
- Deschasaux, M., Huybrechts, I., Murphy, N., Julia, C., Hercberg, S., Srouf, B., Kesse-Guyot, E., Latino-Martel, P., Biessy, C., Casagrande, C., et al. (2018). Nutritional quality of food as represented by the FSAm-NPS nutrient profiling system underlying the Nutri-Score label and cancer risk in Europe: Results from the EPIC prospective cohort study. *PLOS Med.* *15*, e1002651.
- Diamond, C.E., Leong, K.W.K., Vacca, M., Rivers-Auty, J., Brough, D., and Mortellaro, A. (2017). Salmonella typhimurium-induced IL-1 release from primary human monocytes requires NLRP3 and can occur in the absence of pyroptosis. *Sci. Rep.* *7*.
- Dilek, N., Vuillefroy de Silly, R., Blanco, G., and Vanhove, B. (2012). Myeloid-derived suppressor cells: mechanisms of action and recent advances in their role in transplant tolerance. *Front. Immunol.* *3*.
- Dolcetti, L., Peranzoni, E., Ugel, S., Marigo, I., Fernandez Gomez, A., Mesa, C., Geilich, M., Winkels, G., Traggiai, E., Casati, A., et al. (2010). Hierarchy of immunosuppressive strength among myeloid-derived suppressor cell subsets is determined by GM-CSF. *Eur. J. Immunol.* *40*, 22–35.
- Doll, R., and Kinlen, L. (1970). Immunosurveillance and cancer: epidemiological evidence. *Br. Med. J.* *4*, 420–422.

- Dostert, C., Pétrilli, V., Van Bruggen, R., Steele, C., Mossman, B.T., and Tschopp, J. (2008). Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science* *320*, 674–677.
- Dostert, C., Guarda, G., Romero, J.F., Menu, P., Gross, O., Tardivel, A., Suva, M.-L., Stehle, J.-C., Kopf, M., Stamenkovic, I., et al. (2009). Malarial hemozoin is a Nalp3 inflammasome activating danger signal. *PLoS One* *4*, e6510.
- Dowds, T.A., Masumoto, J., Zhu, L., Inohara, N., and Núñez, G. (2004). Cryopyrin-induced interleukin 1beta secretion in monocytic cells: enhanced activity of disease-associated mutants and requirement for ASC. *J. Biol. Chem.* *279*, 21924–21928.
- Du, Q., Wang, Q., Fan, H., Wang, J., Liu, X., Wang, H., Wang, Y., and Hu, R. (2016). Dietary cholesterol promotes AOM-induced colorectal cancer through activating the NLRP3 inflammasome. *Biochem. Pharmacol.* *105*, 42–54.
- Du, R., Lu, K.V., Petritsch, C., Liu, P., Ganss, R., Passequé, E., Song, H., Vandenberg, S., Johnson, R.S., Werb, Z., et al. (2008). HIF1alpha induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion. *Cancer Cell* *13*, 206–220.
- Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* *3*, 991–998.
- Dunn, G.P., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2004). The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. *Immunity* *21*, 137–148.
- Dupaul-Chicoine, J., Arabzadeh, A., Dagenais, M., Douglas, T., Champagne, C., Morizot, A., Rodrigue-Gervais, I.G., Breton, V., Colpitts, S.L., Beauchemin, N., et al. (2015). The Nlrp3 Inflammasome Suppresses Colorectal Cancer Metastatic Growth in the Liver by Promoting Natural Killer Cell Tumoricidal Activity. *Immunity* *43*, 751–763.
- Duraiswamy, J., Freeman, G.J., and Coukos, G. (2013). Therapeutic PD-1 pathway blockade augments with other modalities of immunotherapy T-cell function to prevent immune decline in ovarian cancer. *Cancer Res.* *73*, 6900–6912.
- Duschinsky, R., Plevin, E., and Oberhansli, W. (1960). Synthesis of 5-fluoropyrimidine metabolites. *Acta - Unio Int. Contra Cancrum* *16*, 599–604.

- Dvorak, H.F. (1986). Tumors: Wounds That Do Not Heal. *N. Engl. J. Med.* *315*, 1650–1659.
- Ebadi, M., Field, C.J., Lehner, R., and Mazurak, V.C. (2017). Chemotherapy diminishes lipid storage capacity of adipose tissue in a preclinical model of colon cancer. *Lipids Health Dis.* *16*, 247.
- Ehrlich, P. (1909). Über den jetzigen Stand der Chemotherapie. *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* *42*, 17–47.
- Engelbrecht, A.-M., Toit-Kohn, J.-L. du, Ellis, B., Thomas, M., Nell, T., and Smith, R. (2008). Differential induction of apoptosis and inhibition of the PI3-kinase pathway by saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids in a colon cancer cell model. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* *13*, 1368–1377.
- England, H., Summersgill, H.R., Edye, M.E., Rothwell, N.J., and Brough, D. (2014). Release of IL-1 α or IL-1 β depends on mechanism of cell death. *J. Biol. Chem.* jbc.M114.557561.
- Eruslanov, E., Daurkin, I., Ortiz, J., Vieweg, J., and Kusmartsev, S. (2010). Pivotal Advance: Tumor-mediated induction of myeloid-derived suppressor cells and M2-polarized macrophages by altering intracellular PGE₂ catabolism in myeloid cells. *J. Leukoc. Biol.* *88*, 839–848.
- Evavold, C.L., Ruan, J., Tan, Y., Xia, S., Wu, H., and Kagan, J.C. (2018). The Pore-Forming Protein Gasdermin D Regulates Interleukin-1 Secretion from Living Macrophages. *Immunity* *48*, 35-44.e6.
- Fabbri, M., Paone, A., Calore, F., Galli, R., Gaudio, E., Santhanam, R., Lovat, F., Fadda, P., Mao, C., Nuovo, G.J., et al. (2012). MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, E2110–E2116.
- Feng, H., Gu, J., Gou, F., Huang, W., Gao, C., Chen, G., Long, Y., Zhou, X., Yang, M., Liu, S., et al. (2016). High Glucose and Lipopolysaccharide Prime NLRP3 Inflammasome via ROS/TXNIP Pathway in Mesangial Cells.
- Ferrari, D., Pizzirani, C., Adinolfi, E., Lemoli, R.M., Curti, A., Idzko, M., Panther, E., and Virgilio, F.D. (2006). The P2X7 Receptor: A Key Player in IL-1 Processing and Release. *J. Immunol.* *176*, 3877–3883.
- Ferwerda, G., Meyer-Wentrup, F., Kullberg, B.-J., Netea, M.G., and Adema, G.J. (2008). Dectin-1 synergizes with TLR2 and TLR4 for cytokine production in human primary monocytes and macrophages. *Cell. Microbiol.* *10*, 2058–2066.

- Filik, L., and Ozyilkan, O. (2003). Olive-oil consumption and cancer risk. *Eur. J. Clin. Nutr.* *57*, 191.
- Fink, S.L., and Cookson, B.T. (2006). Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. *Cell. Microbiol.* *8*, 1812–1825.
- Finocchiaro, C., Segre, O., Fadda, M., Monge, T., Scigliano, M., Schena, M., Tinivella, M., Tiozzo, E., Catalano, M.G., Pugliese, M., et al. (2012). Effect of n-3 fatty acids on patients with advanced lung cancer: a double-blind, placebo-controlled study. *Br. J. Nutr.* *108*, 327–333.
- Fluckiger, A., Dumont, A., Derangère, V., Rébé, C., de Rosny, C., Causse, S., Thomas, C., Apetoh, L., Hichami, A., Ghiringhelli, F., et al. (2016). Inhibition of colon cancer growth by docosahexaenoic acid involves autocrine production of TNF α . *Oncogene* *35*, 4611–4622.
- Folkman, J. (1971). Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. *N. Engl. J. Med.* *285*, 1182–1186.
- Franchi, L., Kanneganti, T.-D., Dubyak, G.R., and Núñez, G. (2007). Differential requirement of P2X7 receptor and intracellular K⁺ for caspase-1 activation induced by intracellular and extracellular bacteria. *J. Biol. Chem.* *282*, 18810–18818.
- Franchi, L., Eigenbrod, T., and Núñez, G. (2009). Cutting edge: TNF-alpha mediates sensitization to ATP and silica via the NLRP3 inflammasome in the absence of microbial stimulation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *183*, 792–796.
- Francoval, M., Etienne-Grimaldi, M.-C., Formento, J.-L., Benchimol, D., Bourgeon, A., Chazal, M., Letoublon, C., André, T., Gilly, N., Delpero, J.-R., et al. (2006). EGFR in colorectal cancer: more than a simple receptor. *Ann. Oncol.* *17*, 962–967.
- Fritz, J.H., Ferrero, R.L., Philpott, D.J., and Girardin, S.E. (2006). Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nat. Immunol.* *7*, 1250–1257.
- Fuchs, C.S., Marshall, J., Mitchell, E., Wierzbicki, R., Ganju, V., Jeffery, M., Schulz, J., Richards, D., Soufi-Mahjoubi, R., Wang, B., et al. (2007). Randomized, controlled trial of irinotecan plus infusional, bolus, or oral fluoropyrimidines in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: results from the BICC-C Study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *25*, 4779–4786.
- Fuentes, N.R., Kim, E., Fan, Y.-Y., and Chapkin, R.S. (2018). Omega-3 fatty acids, membrane remodeling and cancer prevention. *Mol. Aspects Med.*

- Fujita, M., Kohanbash, G., Fellows-Mayle, W., Hamilton, R.L., Komohara, Y., Decker, S.A., Ohlfest, J.R., and Okada, H. (2011). COX-2 blockade suppresses gliomagenesis by inhibiting myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res.* *71*, 2664–2674.
- Fukuda, H., Takiguchi, N., Koda, K., Oda, K., Seike, K., and Miyazaki, M. (2006). Thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase are related to histological effects of 5-fluorouracil and cisplatin neoadjuvant chemotherapy for primary gastric cancer patients. *Cancer Invest.* *24*, 235–241.
- Fukuno, N., Matsui, H., Kanda, Y., Suzuki, O., Matsumoto, K., Sasaki, K., Kobayashi, T., and Tamura, S. (2011). TGF- β -activated kinase 1 mediates mechanical stress-induced IL-6 expression in osteoblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *408*, 202–207.
- Fukushima, K., Yamasaki, E., Ishii, S., Tomimatsu, A., Takahashi, K., Hirane, M., Fukushima, N., Honoki, K., and Tsujiuchi, T. (2015). Different roles of GPR120 and GPR40 in the acquisition of malignant properties in pancreatic cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *465*, 512–515.
- Fukushima, K., Takahashi, K., Fukushima, N., Honoki, K., and Tsujiuchi, T. (2016). Different effects of GPR120 and GPR40 on cellular functions stimulated by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in melanoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *475*, 25–30.
- Gabrilovich, D.I., and Nagaraj, S. (2009). Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 162–174.
- Gabrilovich, D., Ishida, T., Oyama, T., Ran, S., Kravtsov, V., Nadaf, S., and Carbone, D.P. (1998). Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo. *Blood* *92*, 4150–4166.
- Gabrilovich, D.I., Chen, H.L., Girgis, K.R., Cunningham, H.T., Meny, G.M., Nadaf, S., Kavanaugh, D., and Carbone, D.P. (1996). Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat. Med.* *2*, 1096–1103.
- Gabrilovich, D.I., Velders, M.P., Sotomayor, E.M., and Kast, W.M. (2001). Mechanism of immune dysfunction in cancer mediated by immature Gr-1⁺ myeloid cells. *J. Immunol. Baltim. Md* *166*, 5398–5406.

- Gabrilovich, D.I., Bronte, V., Chen, S.-H., Colombo, M.P., Ochoa, A., Ostrand-Rosenberg, S., and Schreiber, H. (2007). The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res.* *67*, 425–426.
- Gabrilovich, D.I., Ostrand-Rosenberg, S., and Bronte, V. (2012). Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat. Rev. Immunol.* *12*, 253–268.
- Gastrointestinal Tumor Study Group (1984). Adjuvant therapy of colon cancer--results of a prospectively randomized trial. *N. Engl. J. Med.* *310*, 737–743.
- Gatault, S., Delbeke, M., Driss, V., Sarazin, A., Dendooven, A., Kahn, J.-E., Lefèvre, G., and Capron, M. (2015). IL-18 Is Involved in Eosinophil-Mediated Tumoricidal Activity against a Colon Carcinoma Cell Line by Upregulating LFA-1 and ICAM-1. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *195*, 2483–2492.
- Geelen, A., Schouten, J.M., Kamphuis, C., Stam, B.E., Burema, J., Renkema, J.M.S., Bakker, E.-J., van't Veer, P., and Kampman, E. (2007). Fish consumption, n-3 fatty acids, and colorectal cancer: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Am. J. Epidemiol.* *166*, 1116–1125.
- Geijtenbeek, T.B.H., and Gringhuis, S.I. (2009). Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 465–479.
- Gether, U. (2000). Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr. Rev.* *21*, 90–113.
- Ghayur, T., Banerjee, S., Hugunin, M., Butler, D., Herzog, L., Carter, A., Quintal, L., Sekut, L., Talanian, R., Paskind, M., et al. (1997). Caspase-1 processes IFN-gamma-inducing factor and regulates LPS-induced IFN-gamma production. *Nature* *386*, 619–623.
- Ghiringhelli, F., Apetoh, L., Tesniere, A., Aymeric, L., Ma, Y., Ortiz, C., Vermaelen, K., Panaretakis, T., Mignot, G., Ullrich, E., et al. (2009). Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors. *Nat. Med.* *15*, 1170–1178.
- Ghoreishi, Z., Esfahani, A., Djazayeri, A., Djalali, M., Golestan, B., Ayromlou, H., Hashemzade, S., Asghari Jafarabadi, M., Montazeri, V., Keshavarz, S.A., et al. (2012). Omega-3 fatty acids are protective against paclitaxel-induced peripheral neuropathy: a randomized double-blind placebo controlled trial. *BMC Cancer* *12*, 355.

- Goodman, L.S., and Wintrobe, M.M. (1946). Nitrogen mustard therapy; use of methyl-bis (beta-chloroethyl) amine hydrochloride and tris (beta-chloroethyl) amine hydrochloride for Hodgkin's disease, lymphosarcoma, leukemia and certain allied and miscellaneous disorders. *J. Am. Med. Assoc.* *132*, 126–132.
- Goodman, L.S., Wintrobe, M.M., Dameshek, W., Goodman, M.J., Gilman, A., and McLENNAN, M.T. (1946). NITROGEN MUSTARD THERAPY: Use of Methyl-Bis(Beta-Chloroethyl)amine Hydrochloride and Tris(Beta-Chloroethyl)amine Hydrochloride for Hodgkin's Disease, Lymphosarcoma, Leukemia and Certain Allied and Miscellaneous Disorders. *J. Am. Med. Assoc.* *132*, 126–132.
- Gopalakrishnan, V., Spencer, C.N., Nezi, L., Reuben, A., Andrews, M.C., Karpinets, T.V., Prieto, P.A., Vicente, D., Hoffman, K., Wei, S.C., et al. (2018). Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Science* *359*, 97–103.
- Greten, F.R., and Karin, M. (2004). The IKK/NF-kappaB activation pathway—a target for prevention and treatment of cancer. *Cancer Lett.* *206*, 193–199.
- Gros Lambert, M., and Py, B.F. (2018a). Spotlight on the NLRP3 inflammasome pathway. *J. Inflamm. Res.* *11*, 359–374.
- Gros Lambert, M., and Py, B.F. (2018b). [Regulation of the NLRP3 inflammasome]. *Med. Sci. MS* *34*, 47–53.
- Gross, O., Poeck, H., Bscheider, M., Dostert, C., Hanneschläger, N., Endres, S., Hartmann, G., Tardivel, A., Schweighoffer, E., Tybulewicz, V., et al. (2009). Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence. *Nature* *459*, 433–436.
- Gu, Y., Kuida, K., Tsutsui, H., Ku, G., Hsiao, K., Fleming, M.A., Hayashi, N., Higashino, K., Okamura, H., Nakanishi, K., et al. (1997). Activation of interferon-gamma inducing factor mediated by interleukin-1beta converting enzyme. *Science* *275*, 206–209.
- Guarda, G., Zenger, M., Yazdi, A.S., Schroder, K., Ferrero, I., Menu, P., Tardivel, A., Mattmann, C., and Tschopp, J. (2011). Differential expression of NLRP3 among hematopoietic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *186*, 2529–2534.

- Guey, B., Bodnar, M., Manié, S.N., Tardivel, A., and Petrilli, V. (2014). Caspase-1 autoproteolysis is differentially required for NLRP1b and NLRP3 inflammasome function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 17254–17259.
- Guo, C., Xie, S., Chi, Z., Zhang, J., Liu, Y., Zhang, L., Zheng, M., Zhang, X., Xia, D., Ke, Y., et al. (2016). Bile Acids Control Inflammation and Metabolic Disorder through Inhibition of NLRP3 Inflammasome. *Immunity* *45*, 944.
- Guo, G., Yu, M., Xiao, W., Celis, E., and Cui, Y. (2017). Local activation of p53 in the tumor microenvironment overcomes immune suppression and enhances antitumor immunity. *Cancer Res.* *77*, 2292–2305.
- Halle, A., Hornung, V., Petzold, G.C., Stewart, C.R., Monks, B.G., Reinheckel, T., Fitzgerald, K.A., Latz, E., Moore, K.J., and Golenbock, D.T. (2008). The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nat. Immunol.* *9*, 857–865.
- Han, S., Lear, T.B., Jerome, J.A., Rajbhandari, S., Snavely, C.A., Gulick, D.L., Gibson, K.F., Zou, C., Chen, B.B., and Mallampalli, R.K. (2015). Lipopolysaccharide Primes the NALP3 Inflammasome by Inhibiting Its Ubiquitination and Degradation Mediated by the SCFFBXL2 E3 Ligase. *J. Biol. Chem.* *290*, 18124–18133.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell* *100*, 57–70.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* *144*, 646–674.
- Hanson, E.M., Clements, V.K., Sinha, P., Ilkovitch, D., and Ostrand-Rosenberg, S. (2009). Myeloid-derived suppressor cells down-regulate L-selectin expression on CD4+ and CD8+ T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *183*, 937–944.
- Hart, K.M., Bak, S.P., Alonso, A., and Berwin, B. (2009). Phenotypic and Functional Delineation of Murine CX3CR1+ Monocyte-Derived Cells in Ovarian Cancer. *Neoplasia N. Y. N* *11*, 564–573.
- Hartwig, T., Montinaro, A., von Karstedt, S., Sevko, A., Surinova, S., Chakravarthy, A., Taraborrelli, L., Draber, P., Lafont, E., Arce Vargas, F., et al. (2017). The TRAIL-Induced Cancer Secretome Promotes a Tumor-Supportive Immune Microenvironment via CCR2. *Mol. Cell* *65*, 730-742.e5.

- Hashimoto, C., Hudson, K.L., and Anderson, K.V. (1988). The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 52, 269–279.
- Hashimoto, M., Tawaratsumida, K., Kariya, H., Kiyohara, A., Suda, Y., Krikae, F., Kirikae, T., and Götz, F. (2006). Not lipoteichoic acid but lipoproteins appear to be the dominant immunobiologically active compounds in *Staphylococcus aureus*. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 177, 3162–3169.
- Hauge, M., Vestmar, M.A., Husted, A.S., Ekberg, J.P., Wright, M.J., Di Salvo, J., Weinglass, A.B., Engelstoft, M.S., Madsen, A.N., Lückmann, M., et al. (2015). GPR40 (FFAR1) – Combined Gs and Gq signaling in vitro is associated with robust incretin secretagogue action ex vivo and in vivo. *Mol. Metab.* 4, 3–14.
- Hawcroft, G., Volpato, M., Marston, G., Ingram, N., Perry, S.L., Cockbain, A.J., Race, A.D., Munarini, A., Belluzzi, A., Loadman, P.M., et al. (2012). The omega-3 polyunsaturated fatty acid eicosapentaenoic acid inhibits mouse MC-26 colorectal cancer cell liver metastasis via inhibition of PGE2-dependent cell motility. *Br. J. Pharmacol.* 166, 1724–1737.
- Hayflick, L. (1965). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 37, 614–636.
- He, Y., Zeng, M.Y., Yang, D., Motro, B., and Núñez, G. (2016). NEK7 is an essential mediator of NLRP3 activation downstream of potassium efflux. *Nature* 530, 354–357.
- Heidelberger, C., Chaudhuri, N.K., Danneberg, P., Mooren, D., Griesbach, L., Duschinsky, R., Schnitzer, R.J., Plevin, E., and Scheiner, J. (1957). Fluorinated Pyrimidines, A New Class of Tumour-Inhibitory Compounds. *Nature* 179, 663–666.
- Hemminki, K., Li, X., Sundquist, J., and Sundquist, K. (2009). Cancer risks in Crohn disease patients. *Ann. Oncol.* 20, 574–580.
- Higgins, G.A., Amadeo, J.H., McElhinney, J., McCaughan, J.J., and Keehn, R.J. (1984). Efficacy of prolonged intermittent therapy with combined 5-fluorouracil and methyl-CCNU following resection for carcinoma of the large bowel. A Veterans Administration Surgical Oncology Group report. *Cancer* 53, 1–8.

- Hillier, K., Jewell, R., Dorrell, L., and Smith, C.L. (1991). Incorporation of fatty acids from fish oil and olive oil into colonic mucosal lipids and effects upon eicosanoid synthesis in inflammatory bowel disease. *Gut* 32, 1151–1155.
- Hirasawa, A., Tsumaya, K., Awaji, T., Katsuma, S., Adachi, T., Yamada, M., Sugimoto, Y., Miyazaki, S., and Tsujimoto, G. (2005). Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat. Med.* 11, 90–94.
- Hodge, A.M., Williamson, E.J., Bassett, J.K., MacInnis, R.J., Giles, G.G., and English, D.R. (2015). Dietary and biomarker estimates of fatty acids and risk of colorectal cancer. *Int. J. Cancer* 137, 1224–1234.
- Hoffman, H.M., Mueller, J.L., Broide, D.H., Wanderer, A.A., and Kolodner, R.D. (2001). Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle–Wells syndrome. *Nat. Genet.* 29, 301–305.
- Hofmanová, J., Straková, N., Vaculová, A.H., Tylichová, Z., Šafaříková, B., Skender, B., and Kozubík, A. (2014). Interaction of Dietary Fatty Acids with Tumour Necrosis Factor Family Cytokines during Colon Inflammation and Cancer.
- Holloway, G.P., Bezaire, V., Heigenhauser, G.J.F., Tandon, N.N., Glatz, J.F.C., Luiken, J.J.F.P., Bonen, A., and Spriet, L.L. (2006). Mitochondrial long chain fatty acid oxidation, fatty acid translocase/CD36 content and carnitine palmitoyltransferase I activity in human skeletal muscle during aerobic exercise. *J. Physiol.* 571, 201–210.
- Holloway, G.P., Jain, S.S., Bezaire, V., Han, X.X., Glatz, J.F.C., Luiken, J.J.F.P., Harper, M.-E., and Bonen, A. (2009). FAT/CD36-null mice reveal that mitochondrial FAT/CD36 is required to upregulate mitochondrial fatty acid oxidation in contracting muscle. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 297, R960-967.
- Hornung, V., Bauernfeind, F., Halle, A., Samstad, E.O., Kono, H., Rock, K.L., Fitzgerald, K.A., and Latz, E. (2008). Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat. Immunol.* 9, 847–856.
- Hossain, D.M.S., Pal, S.K., Moreira, D., Duttagupta, P., Zhang, Q., Won, H., Jones, J., D’Apuzzo, M., Forman, S., and Kortylewski, M. (2015). TLR9-Targeted STAT3 Silencing Abrogates

- Immunosuppressive Activity of Myeloid-Derived Suppressor Cells from Prostate Cancer Patients. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *21*, 3771–3782.
- Hossain, Z., Hosokawa, M., and Takahashi, K. (2008). Growth Inhibition and Induction of Apoptosis of Colon Cancer Cell Lines by Applying Marine Phospholipid. *Nutr. Cancer* *61*, 123–130.
- Hou, T.Y., Monk, J.M., Fan, Y.-Y., Barhoumi, R., Chen, Y.Q., Rivera, G.M., McMURRAY, D.N., and Chapkin, R.S. (2012a). n – 3 polyunsaturated fatty acids suppress phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-dependent actin remodelling during CD4+ T-cell activation. *Biochem. J.* *443*.
- Hou, Y., Moreau, F., and Chadee, K. (2012b). PPAR γ is an E3 ligase that induces the degradation of NF κ B/p65. *Nat. Commun.* *3*, 1300.
- Houthuijzen, J.M. (2016). For Better or Worse: FFAR1 and FFAR4 Signaling in Cancer and Diabetes. *Mol. Pharmacol.* *90*, 738–743.
- Houthuijzen, J.M., Oosterom, I., Hudson, B.D., Hirasawa, A., Daenen, L.G.M., McLean, C.M., Hansen, S.V.F., van Jaarsveld, M.T.M., Peeper, D.S., Jafari Sadatmand, S., et al. (2017). Fatty acid 16:4(n-3) stimulates a GPR120-induced signaling cascade in splenic macrophages to promote chemotherapy resistance. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *31*, 2195–2209.
- Hudziak, R.M., Lewis, G.D., Winget, M., Fendly, B.M., Shepard, H.M., and Ullrich, A. (1989). p185HER2 monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor. *Mol. Cell. Biol.* *9*, 1165–1172.
- Hull, M.A., Ko, S.C.W., and Hawcroft, G. (2004). Prostaglandin EP receptors: targets for treatment and prevention of colorectal cancer? *Mol. Cancer Ther.* *3*, 1031–1039.
- Humphries, F., Bergin, R., Jackson, R., Delagic, N., Wang, B., Yang, S., Dubois, A.V., Ingram, R.J., and Moynagh, P.N. (2018). The E3 ubiquitin ligase Pellino2 mediates priming of the NLRP3 inflammasome. *Nat. Commun.* *9*, 1560.
- Hwang, I.T., Chung, Y.M., Kim, J.J., Chung, J.S., Kim, B.S., Kim, H.J., Kim, J.S., and Yoo, Y.D. (2007). Drug resistance to 5-FU linked to reactive oxygen species modulator 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *359*, 304–310.

- Hwang, P.M., Bunz, F., Yu, J., Rago, C., Chan, T.A., Murphy, M.P., Kelso, G.F., Smith, R.A., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (2001). Ferredoxin reductase affects p53-dependent, 5-fluorouracil-induced apoptosis in colorectal cancer cells. *Nat. Med.* *7*, 1111–1117.
- Ilag, L., and Ilag, L.L. (2018). Are Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids the Link between the Immune System and the Microbiome towards Modulating Cancer? *Medicines* *5*, 102.
- Inohara, N., and Nuñez, G. (2001). The NOD: a signaling module that regulates apoptosis and host defense against pathogens. *Oncogene* *20*, 6473–6481.
- Irazú, C.E., González-Rodríguez, S., and Brenner, R.R. (1993). Delta 5 desaturase activity in rat kidney microsomes. *Mol. Cell. Biochem.* *129*, 31–37.
- Isambert, N., Hervieu, A., Rébé, C., Hennequin, A., Borg, C., Zanetta, S., Chevriaux, A., Richard, C., Derangère, V., Limagne, E., et al. (2018). Fluorouracil and bevacizumab plus anakinra for patients with metastatic colorectal cancer refractory to standard therapies (IRAFU): a single-arm phase 2 study. *Oncolimmunology* *0*, 1–6.
- Itoh, Y., Kawamata, Y., Harada, M., Kobayashi, M., Fujii, R., Fukusumi, S., Ogi, K., Hosoya, M., Tanaka, Y., Uejima, H., et al. (2003). Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. *Nature* *422*, 173–176.
- Iula, L., Keitelman, I.A., Sabbione, F., Fuentes, F., Guzman, M., Galletti, J.G., Gerber, P.P., Ostrowski, M., Geffner, J.R., Jancic, C.C., et al. (2018). Autophagy Mediates Interleukin-1 β Secretion in Human Neutrophils. *Front. Immunol.* *9*.
- Iwai, Y., Hamanishi, J., Chamoto, K., and Honjo, T. (2017). Cancer immunotherapies targeting the PD-1 signaling pathway. *J. Biomed. Sci.* *24*, 26.
- Iwamoto, S., Senzaki, H., Kiyozuka, Y., Ogura, E., Takada, H., Hioki, K., and Tsubura, A. (1998). Effects of fatty acids on liver metastasis of ACL-15 rat colon cancer cells. *Nutr. Cancer* *31*, 143–150.
- Iwasaki, A., and Medzhitov, R. (2010). Regulation of Adaptive Immunity by the Innate Immune System. *Science* *327*, 291–295.
- Jain, R.K., Duda, D.G., Clark, J.W., and Loeffler, J.S. (2006). Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* *3*, 24–40.

- Janeway, C.A. (1992). The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol. Today* *13*, 11–16.
- Janeway, C.A. (1993). How the Immune System Discriminates Infectious Nonself from Noninfectious Self. In *Host Defense Dysfunction in Trauma, Shock and Sepsis: Mechanisms and Therapeutic Approaches*, E. Faist, J.L. Meakins, and F.W. Schildberg, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 39–47.
- Jess, T., Rungoe, C., and Peyrin-Biroulet, L. (2012). Risk of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: a meta-analysis of population-based cohort studies. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* *10*, 639–645.
- Johnston, P.G., Lenz, H.J., Leichman, C.G., Danenberg, K.D., Allegra, C.J., Danenberg, P.V., and Leichman, L. (1995). Thymidylate synthase gene and protein expression correlate and are associated with response to 5-fluorouracil in human colorectal and gastric tumors. *Cancer Res.* *55*, 1407–1412.
- Jounai, N., Kobiyama, K., Shiina, M., Ogata, K., Ishii, K.J., and Takeshita, F. (2011). NLRP4 Negatively Regulates Autophagic Processes through an Association with Beclin1. *J. Immunol.* *186*, 1646–1655.
- Juliana, C., Fernandes-Alnemri, T., Kang, S., Farias, A., Qin, F., and Alnemri, E.S. (2012). Non-transcriptional priming and deubiquitination regulate NLRP3 inflammasome activation. *J. Biol. Chem.* *287*, 36617–36622.
- Kalinski, P. (2012). Regulation of immune responses by prostaglandin E2. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *188*, 21–28.
- Kanneganti, T.-D., Lamkanfi, M., and Núñez, G. (2007). Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease. *Immunity* *27*, 549–559.
- Kantor, E.D., Lampe, J.W., Peters, U., Vaughan, T.L., and White, E. (2014). Long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acid intake and risk of colorectal cancer. *Nutr. Cancer* *66*, 716–727.
- Kaplan, H.S. (1971). Role of Immunologic Disturbance in Human Oncogenesis: Some Facts and Fancies. *Br. J. Cancer* *25*, 620–634.
- Kawai, T., and Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* *11*, 373–384.

- Kawai, T., and Akira, S. (2011). Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. *Immunity* 34, 637–650.
- Kawashima, A., Karasawa, T., Tago, K., Kimura, H., Kamata, R., Usui-Kawanishi, F., Watanabe, S., Ohta, S., Funakoshi-Tago, M., Yanagisawa, K., et al. (2017). ARIH2 Ubiquitinates NLRP3 and Negatively Regulates NLRP3 Inflammasome Activation in Macrophages. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 199, 3614–3622.
- Kayagaki, N., Warming, S., Lamkanfi, M., Vande Walle, L., Louie, S., Dong, J., Newton, K., Qu, Y., Liu, J., Heldens, S., et al. (2011). Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature* 479, 117–121.
- Kayagaki, N., Stowe, I.B., Lee, B.L., O'Rourke, K., Anderson, K., Warming, S., Cuellar, T., Haley, B., Roose-Girma, M., Phung, Q.T., et al. (2015). Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. *Nature* 526, 666–671.
- Keestra-Gounder, A.M., and Tsolis, R.M. (2017). NOD1 and NOD2: Beyond Peptidoglycan Sensing. *Trends Immunol.* 38, 758–767.
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239–257.
- Key, T.J., Schatzkin, A., Willett, W.C., Allen, N.E., Spencer, E.A., and Travis, R.C. (2004). Diet, nutrition and the prevention of cancer. *Public Health Nutr.* 7, 187–200.
- Kim, J.B., Park, S.-Y., Kim, H.R., Ahn, Y.H., Jee, H.-G., Lee, J.-H., Yu, S.J., Lee, H.-S., Lee, M., Yoon, J.-H., et al. (2015). JNK signaling in hepatocarcinoma cells is associated with the side population upon treatment with anticancer drugs. *Mol. Med. Rep.* 11, 263–268.
- Kim, S., Bauernfeind, F., Ablasser, A., Hartmann, G., Fitzgerald, K.A., Latz, E., and Hornung, V. (2010). *Listeria monocytogenes* is sensed by the NLRP3 and AIM2 inflammasome. *Eur. J. Immunol.* 40, 1545–1551.
- Ko, J.S., Rayman, P., Ireland, J., Swaidani, S., Li, G., Bunting, K.D., Rini, B., Finke, J.H., and Cohen, P.A. (2010). Direct and Differential Suppression of Myeloid-Derived Suppressor Cell Subsets by Sunitinib Is Compartmentally Constrained. *Cancer Res.* 70, 3526–3536.

- Kodumudi, K.N., Woan, K., Gilvary, D.L., Sahakian, E., Wei, S., and Djeu, J.Y. (2010). A Novel Chemoimmunomodulating Property of Docetaxel: Suppression of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Tumor Bearers. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *16*.
- Kortylewski, M., Kujawski, M., Wang, T., Wei, S., Zhang, S., Pilon-Thomas, S., Niu, G., Kay, H., Mulé, J., Kerr, W.G., et al. (2005). Inhibiting Stat3 signaling in the hematopoietic system elicits multicomponent antitumor immunity. *Nat. Med.* *11*, 1314–1321.
- Kostura, M.J., Tocci, M.J., Limjuco, G., Chin, J., Cameron, P., Hillman, A.G., Chartrain, N.A., and Schmidt, J.A. (1989). Identification of a monocyte specific pre-interleukin 1 beta convertase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *86*, 5227–5231.
- Kovacs, S.B., and Miao, E.A. (2017). Gasdermins: Effectors of Pyroptosis. *Trends Cell Biol.* *27*, 673–684.
- Kowanetz, M., Wu, X., Lee, J., Tan, M., Hagenbeek, T., Qu, X., Yu, L., Ross, J., Korsisaari, N., Cao, T., et al. (2010). Granulocyte-colony stimulating factor promotes lung metastasis through mobilization of Ly6G+Ly6C+ granulocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 21248–21255.
- Krumbhaar, E.B., and Krumbhaar, H.D. (1919). The Blood and Bone Marrow in Yellow Cross Gas (Mustard Gas) Poisoning. *J. Med. Res.* *40*, 497-508.3.
- Kuda, O., Pietka, T.A., Demianova, Z., Kudova, E., Cvacka, J., Kopecky, J., and Abumrad, N.A. (2013). Sulfo-N-succinimidyl oleate (SSO) inhibits fatty acid uptake and signaling for intracellular calcium via binding CD36 lysine 164: SSO also inhibits oxidized low density lipoprotein uptake by macrophages. *J. Biol. Chem.* *288*, 15547–15555.
- Kujawski, M., Kortylewski, M., Lee, H., Herrmann, A., Kay, H., and Yu, H. (2008). Stat3 mediates myeloid cell-dependent tumor angiogenesis in mice. *J. Clin. Invest.* *118*, 3367–3377.
- Kumar, V., Patel, S., Tcyganov, E., and Gaborilovich, D.I. (2016). The nature of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *Trends Immunol.* *37*, 208–220.
- Kusmartsev, S., and Gaborilovich, D.I. (2005). STAT1 signaling regulates tumor-associated macrophage-mediated T cell deletion. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *174*, 4880–4891.

- Kusmartsev, S., Nefedova, Y., Yoder, D., and Gabrilovich, D.I. (2004). Antigen-specific inhibition of CD8+ T cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *172*, 989–999.
- Ladanyi, A., Mukherjee, A., Kenny, H.A., Johnson, A., Mitra, A.K., Sundaresan, S., Nieman, K.M., Pascual, G., Benitah, S.A., Montag, A., et al. (2018). Adipocyte-induced CD36 expression drives ovarian cancer progression and metastasis. *Oncogene* *37*, 2285–2301.
- Lathers, D.M.R., Clark, J.I., Achille, N.J., and Young, M.R.I. (2004). Phase 1B study to improve immune responses in head and neck cancer patients using escalating doses of 25-hydroxyvitamin D3. *Cancer Immunol. Immunother. CII* *53*, 422–430.
- Laudisi, F., Spreafico, R., Evrard, M., Hughes, T.R., Mandriani, B., Kandasamy, M., Morgan, B.P., Sivasankar, B., and Mortellaro, A. (2013). Cutting edge: the NLRP3 inflammasome links complement-mediated inflammation and IL-1 β release. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *191*, 1006–1010.
- Le, H.K., Graham, L., Cha, E., Morales, J.K., Manjili, M.H., and Bear, H.D. (2009). Gemcitabine directly inhibits myeloid derived suppressor cells in BALB/c mice bearing 4T1 mammary carcinoma and augments expansion of T cells from tumor-bearing mice. *Int. Immunopharmacol.* *9*, 900–909.
- Ledford, H. (2011). Melanoma drug wins US approval. *Nature* *471*, 561–561.
- Lee, J.Y., Sim, T.-B., Lee, J., and Na, H.-K. (2017). Chemopreventive and Chemotherapeutic Effects of Fish Oil derived Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Colon Carcinogenesis. *Clin. Nutr. Res.* *6*, 147–160.
- Lefrançois, E., and Cayrol, C. (2012). Mechanisms of IL-33 processing and secretion: differences and similarities between IL-1 family members. *Eur. Cytokine Netw.* *23*, 120–127.
- Legrand, P., Morise, A., and Kalonji, E. (2011). Update of French Nutritional Recommendations for Fatty Acids. *Healthy Agric. Healthy Nutr. Healthy People* *102*, 137–143.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.-M., and Hoffmann, J.A. (1996). The Dorsoventral Regulatory Gene *Cassette spätzle/Toll/cactus* Controls the Potent Antifungal Response in *Drosophila* Adults. *Cell* *86*, 973–983.

- Li, X., Yu, Y., and Funk, C.D. (2013). Cyclooxygenase-2 induction in macrophages is modulated by docosahexaenoic acid via interactions with free fatty acid receptor 4 (FFA4). *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 27, 4987–4997.
- Liang, P., Henning, S.M., Guan, J., Grogan, T., Elashoff, D., Olefsky, J.M., Cohen, P., and Aronson, W.J. (2018). Role of Host GPR120 in Mediating Dietary Omega-3 Fatty Acid Inhibition of Prostate Cancer. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.*
- Loo, Y.-M., and Gale, M. (2011). Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity* 34, 680–692.
- Lopez-Castejon, G., Luheshi, N.M., Compan, V., High, S., Whitehead, R.C., Flitsch, S.L., Kirov, A., Prudovsky, I., Swanton, E., and Brough, D. (2012). Deubiquitinases regulate the activity of caspase-1 and IL-1 β secretion via assembly of the inflammasome. *J. Biol. Chem.* jbc.M112.422238.
- Lotze, M.T., and Tracey, K.J. (2005). High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 331–342.
- Loupakis, F., Cremolini, C., Masi, G., Lonardi, S., Zagonel, V., Salvatore, L., Cortesi, E., Tomasello, G., Ronzoni, M., Spadi, R., et al. (2014). Initial therapy with FOLFOXIRI and bevacizumab for metastatic colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 371, 1609–1618.
- Lu, A., Magupalli, V.G., Ruan, J., Yin, Q., Atianand, M.K., Vos, M.R., Schröder, G.F., Fitzgerald, K.A., Wu, H., and Egelman, E.H. (2014). Unified polymerization mechanism for the assembly of ASC-dependent inflammasomes. *Cell* 156, 1193–1206.
- MacLean, C.H., Newberry, S.J., Mojica, W.A., Khanna, P., Issa, A.M., Suttorp, M.J., Lim, Y.-W., Traina, S.B., Hilton, L., Garland, R., et al. (2006). Effects of omega-3 fatty acids on cancer risk: a systematic review. *JAMA* 295, 403–415.
- Mailer, R.K.W., Joly, A.-L., Liu, S., Elias, S., Tegner, J., and Andersson, J. (2015). IL-1 β promotes Th17 differentiation by inducing alternative splicing of FOXP3. *Sci. Rep.* 5, 14674.
- Man, S.M., Karki, R., and Kanneganti, T.-D. (2016). DNA-sensing inflammasomes: regulation of bacterial host defense and the gut microbiota. *Pathog. Dis.* 74, ftw028.
- Mantovani, G., Macciò, A., Madeddu, C., Mura, L., Gramignano, G., Lusso, M.R., Massa, E., Mocci, M., and Serpe, R. (2003). Antioxidant agents are effective in inducing lymphocyte progression

through cell cycle in advanced cancer patients: assessment of the most important laboratory indexes of cachexia and oxidative stress. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* *81*, 664–673.

Mao, Y., Poschke, I., Wennerberg, E., Pico de Coaña, Y., Egyhazi Brage, S., Schultz, I., Hansson, J., Masucci, G., Lundqvist, A., and Kiessling, R. (2013). Melanoma-educated CD14⁺ cells acquire a myeloid-derived suppressor cell phenotype through COX-2-dependent mechanisms. *Cancer Res.* *73*, 3877–3887.

Mao, Y., Sarhan, D., Steven, A., Seliger, B., Kiessling, R., and Lundqvist, A. (2014). Inhibition of tumor-derived prostaglandin-e2 blocks the induction of myeloid-derived suppressor cells and recovers natural killer cell activity. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *20*, 4096–4106.

Mariathasan, S., Weiss, D.S., Newton, K., McBride, J., O'Rourke, K., Roose-Girma, M., Lee, W.P., Weinrauch, Y., Monack, D.M., and Dixit, V.M. (2006). Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* *440*, 228–232.

Marigo, I., Bosio, E., Solito, S., Mesa, C., Fernandez, A., Dolcetti, L., Ugel, S., Sonda, N., Biccato, S., Falisi, E., et al. (2010). Tumor-induced tolerance and immune suppression depend on the C/EBPbeta transcription factor. *Immunity* *32*, 790–802.

Marin-Acevedo, J.A., Soyano, A.E., Dholaria, B., Knutson, K.L., and Lou, Y. (2018). Cancer immunotherapy beyond immune checkpoint inhibitors. *J. Hematol. Oncol.* *11*, 8.

Martínez-Micaelo, N., González-Abuín, N., Pinent, M., Ardévol, A., and Blay, M. (2016). Dietary fatty acid composition is sensed by the NLRP3 inflammasome: omega-3 fatty acid (DHA) prevents NLRP3 activation in human macrophages. *Food Funct.* *7*, 3480–3487.

Martinon, F., Burns, K., and Tschopp, J. (2002). The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol. Cell* *10*, 417–426.

Martinon, F., Pétrilli, V., Mayor, A., Tardivel, A., and Tschopp, J. (2006). Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* *440*, 237–241.

Martinon, F., Mayor, A., and Tschopp, J. (2009). The inflammasomes: guardians of the body. *Annu. Rev. Immunol.* *27*, 229–265.

Masters, S.L., Dunne, A., Subramanian, S.L., Hull, R.L., Tannahill, G.M., Sharp, F.A., Becker, C., Franchi, L., Yoshihara, E., Chen, Z., et al. (2010). Activation of the NLRP3 inflammasome by islet

- amyloid polypeptide provides a mechanism for enhanced IL-1 β in type 2 diabetes. *Nat. Immunol.* **11**, 897–904.
- Masuda, M., Toh, S., Koike, K., Kuratomi, Y., Suzui, M., Deguchi, A., Komiyama, S., and Weinstein, I.B. (2002). The Roles of JNK1 and Stat3 in the Response of Head and Neck Cancer Cell Lines to Combined Treatment with All trans-retinoic Acid and 5-Fluorouracil. *Jpn. J. Cancer Res.* **93**, 329–339.
- Matson, V., Fessler, J., Bao, R., Chongsuwat, T., Zha, Y., Alegre, M.-L., Luke, J.J., and Gajewski, T.F. (2018). The commensal microbiome is associated with anti-PD-1 efficacy in metastatic melanoma patients. *Science* **359**, 104–108.
- Mattei, F., Schiavoni, G., Sestili, P., Spadaro, F., Fragale, A., Sistigu, A., Lucarini, V., Spada, M., Sanchez, M., Scala, S., et al. (2012). IRF-8 controls melanoma progression by regulating the cross talk between cancer and immune cells within the tumor microenvironment. *Neoplasia N. Y.* **14**, 1223–1235.
- Matzinger, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 991–1045.
- Maude, S.L., Laetsch, T.W., Buechner, J., Rives, S., Boyer, M., Bittencourt, H., Bader, P., Verneris, M.R., Stefanski, H.E., Myers, G.D., et al. (2018). Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **378**, 439–448.
- Mawalla, B., Yuan, X., Luo, X., and Chalya, P.L. (2018). Treatment outcome of anti-angiogenesis through VEGF-pathway in the management of gastric cancer: a systematic review of phase II and III clinical trials. *BMC Res. Notes* **11**, 21.
- May, P., and May, E. (1999). Rôles de P53 dans le cycle cellulaire, l'apoptose et le cancer. *Rev. Fr. Lab.* **1999**, 35–42.
- Mayer, K., Gokorsch, S., Fegbeutel, C., Hattar, K., Rosseau, S., Walmrath, D., Seeger, W., and Grimminger, F. (2003). Parenteral Nutrition with Fish Oil Modulates Cytokine Response in Patients with Sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **167**, 1321–1328.
- Medzhitov, R., and Janeway, C.A. (1997). Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* **91**, 295–298.

- van der Meij, B.S., Langius, J.A.E., Smit, E.F., Spreeuwenberg, M.D., von Blomberg, B.M.E., Heijboer, A.C., Paul, M.A., and van Leeuwen, P.A.M. (2010). Oral nutritional supplements containing (n-3) polyunsaturated fatty acids affect the nutritional status of patients with stage III non-small cell lung cancer during multimodality treatment. *J. Nutr.* *140*, 1774–1780.
- van der Meij, B.S., Langius, J. a. E., Spreeuwenberg, M.D., Sloomaker, S.M., Paul, M.A., Smit, E.F., and van Leeuwen, P. a. M. (2012). Oral nutritional supplements containing n-3 polyunsaturated fatty acids affect quality of life and functional status in lung cancer patients during multimodality treatment: an RCT. *Eur. J. Clin. Nutr.* *66*, 399–404.
- Menetrier-Caux, C., Montmain, G., Dieu, M.C., Bain, C., Favrot, M.C., Caux, C., and Blay, J.Y. (1998). Inhibition of the differentiation of dendritic cells from CD34(+) progenitors by tumor cells: role of interleukin-6 and macrophage colony-stimulating factor. *Blood* *92*, 4778–4791.
- Meng, G., Zhang, F., Fuss, I., Kitani, A., and Strober, W. (2009). A mutation in the *Nlrp3* gene causing inflammasome hyperactivation potentiates Th17 cell-dominant immune responses. *Immunity* *30*, 860–874.
- Messmer, M.N., Netherby, C.S., Banik, D., and Abrams, S.I. (2015). Tumor-induced myeloid dysfunction and its implications for cancer immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* *CII* *64*, 1–13.
- Meyer, C., Sevko, A., Ramacher, M., Bazhin, A.V., Falk, C.S., Osen, W., Borrello, I., Kato, M., Schadendorf, D., Baniyash, M., et al. (2011). Chronic inflammation promotes myeloid-derived suppressor cell activation blocking antitumor immunity in transgenic mouse melanoma model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 17111–17116.
- Meyer-Wentrup, F., Cambi, A., Joosten, B., Looman, M.W., Vries, I.J.M. de, Figdor, C.G., and Adema, G.J. (2009). DCIR is endocytosed into human dendritic cells and inhibits TLR8-mediated cytokine production. *J. Leukoc. Biol.* *85*, 518–525.
- Miao, E.A., Rajan, J.V., and Aderem, A. (2011). Caspase-1-induced pyroptotic cell death. *Immunol. Rev.* *243*, 206–214.
- Miller, W.E., and Lefkowitz, R.J. (2001). Expanding roles for beta-arrestins as scaffolds and adapters in GPCR signaling and trafficking. *Curr. Opin. Cell Biol.* *13*, 139–145.

- Minville-Walz, M., Pierre, A.-S., Pichon, L., Bellenger, S., Fèvre, C., Bellenger, J., Tessier, C., Narce, M., and Rialland, M. (2010). Inhibition of stearyl-CoA desaturase 1 expression induces CHOP-dependent cell death in human cancer cells. *PLoS One* 5, e14363.
- Mirza, N., Fishman, M., Fricke, I., Dunn, M., Neuger, A.M., Frost, T.J., Lush, R.M., Antonia, S., and Gabrilovich, D.I. (2006). All-trans-retinoic acid improves differentiation of myeloid cells and immune response in cancer patients. *Cancer Res.* 66, 9299–9307.
- Mitchell, J.A., Paul-Clark, M.J., Clarke, G.W., McMaster, S.K., and Cartwright, N. (2007). Critical role of toll-like receptors and nucleotide oligomerisation domain in the regulation of health and disease. *J. Endocrinol.* 193, 323–330.
- Mittal, D., Gubin, M.M., Schreiber, R.D., and Smyth, M.J. (2014). New insights into cancer immunoediting and its three component phases — elimination, equilibrium and escape. *Curr. Opin. Immunol.* 27, 16–25.
- Miyata, H., Yano, M., Yasuda, T., Yamasaki, M., Murakami, K., Makino, T., Nishiki, K., Sugimura, K., Motoori, M., Shiraishi, O., et al. (2017). Randomized study of the clinical effects of ω -3 fatty acid-containing enteral nutrition support during neoadjuvant chemotherapy on chemotherapy-related toxicity in patients with esophageal cancer. *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif* 33, 204–210.
- Mocellin, M.C., Pastore e Silva, J. de A., Camargo, C. de Q., Fabre, M.E. de S., Gevaerd, S., Naliwaiko, K., Moreno, Y.M.F., Nunes, E.A., and Trindade, E.B.S. de M. (2013). Fish oil decreases C-reactive protein/albumin ratio improving nutritional prognosis and plasma fatty acid profile in colorectal cancer patients. *Lipids* 48, 879–888.
- Molofsky, A.B., Nussbaum, J.C., Liang, H.-E., Van Dyken, S.J., Cheng, L.E., Mohapatra, A., Chawla, A., and Locksley, R.M. (2013). Innate lymphoid type 2 cells sustain visceral adipose tissue eosinophils and alternatively activated macrophages. *J. Exp. Med.* 210, 535–549.
- Monk, J.M., Hou, T.Y., Turk, H.F., McMurray, D.N., and Chapkin, R.S. (2013). n3 PUFAs reduce mouse CD4+ T-cell ex vivo polarization into Th17 cells. *J. Nutr.* 143, 1501–1508.
- Monteleone, M., Stow, J.L., and Schroder, K. (2015). Mechanisms of unconventional secretion of IL-1 family cytokines. *Cytokine* 74, 213–218.

- Monteleone, M., Stanley, A.C., Chen, K.W., Brown, D.L., Bezbradica, J.S., Pein, J.B. von, Holley, C.L., Boucher, D., Shakespear, M.R., Kapetanovic, R., et al. (2018). Interleukin-1 β Maturation Triggers Its Relocation to the Plasma Membrane for Gasdermin-D-Dependent and -Independent Secretion. *Cell Rep.* 24, 1425–1433.
- de Mooij, C.E.M., Netea, M.G., van der Velden, W.J.F.M., and Blijlevens, N.M.A. (2017). Targeting the interleukin-1 pathway in patients with hematological disorders. *Blood* 129, 3155–3164.
- Morales, J.K., Kmiecik, M., Knutson, K.L., Bear, H.D., and Manjili, M.H. (2010). GM-CSF is one of the main breast tumor-derived soluble factors involved in the differentiation of CD11b-Gr1- bone marrow progenitor cells into myeloid-derived suppressor cells. *Breast Cancer Res. Treat.* 123, 39–49.
- Mori, T.A., Burke, V., Puddey, I.B., Watts, G.F., O’Neal, D.N., Best, J.D., and Beilin, L.J. (2000). Purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids have differential effects on serum lipids and lipoproteins, LDL particle size, glucose, and insulin in mildly hyperlipidemic men. *Am. J. Clin. Nutr.* 71, 1085–1094.
- Morland, S.L., Martins, K.J.B., and Mazurak, V.C. (2016). n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation during cancer chemotherapy. *J. Nutr. Intermed. Metab.* 5, 107–116.
- Mosley, B., Urdal, D.L., Prickett, K.S., Larsen, A., Cosman, D., Conlon, P.J., Gillis, S., and Dower, S.K. (1987). The interleukin-1 receptor binds the human interleukin-1 alpha precursor but not the interleukin-1 beta precursor. *J. Biol. Chem.* 262, 2941–2944.
- Muñoz-Planillo, R., Franchi, L., Miller, L.S., and Núñez, G. (2009). A critical role for hemolysins and bacterial lipoproteins in *Staphylococcus aureus*-induced activation of the Nlrp3 inflammasome. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 183, 3942–3948.
- Muñoz-Planillo, R., Kuffa, P., Martínez-Colón, G., Smith, B.L., Rajendiran, T.M., and Núñez, G. (2013). K⁺ efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. *Immunity* 38, 1142–1153.
- Murdoch, C., Muthana, M., Coffelt, S.B., and Lewis, C.E. (2008). The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer* 8, 618–631.

- Murphy, R.A., Mourtzakis, M., Chu, Q.S.C., Baracos, V.E., Reiman, T., and Mazurak, V.C. (2011a). Nutritional intervention with fish oil provides a benefit over standard of care for weight and skeletal muscle mass in patients with nonsmall cell lung cancer receiving chemotherapy. *Cancer* *117*, 1775–1782.
- Murphy, R.A., Mourtzakis, M., Chu, Q.S.C., Baracos, V.E., Reiman, T., and Mazurak, V.C. (2011b). Supplementation with fish oil increases first-line chemotherapy efficacy in patients with advanced nonsmall cell lung cancer. *Cancer* *117*, 3774–3780.
- Nagaraj, S., Gupta, K., Pisarev, V., Kinarsky, L., Sherman, S., Kang, L., Herber, D., Schneck, J., and Gabrilovich, D.I. (2007). Altered recognition of antigen is a novel mechanism of CD8⁺ T cell tolerance in cancer. *Nat. Med.* *13*, 828–835.
- Nagaraj, S., Schrum, A.G., Cho, H.-I., Celis, E., and Gabrilovich, D.I. (2010a). Mechanism of T cell tolerance induced by myeloid-derived suppressor cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *184*, 3106–3116.
- Nagaraj, S., Youn, J.-I., Weber, H., Iclozan, C., Lu, L., Cotter, M.J., Meyer, C., Becerra, C.R., Fishman, M., Antonia, S., et al. (2010b). Anti-inflammatory triterpenoid blocks immune suppressive function of MDSCs and improves immune response in cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *16*, 1812–1823.
- Naik, E., and Dixit, V.M. (2011). Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production. *J. Exp. Med.* *208*, 417–420.
- Najjar, Y.G., and Finke, J.H. (2013). Clinical Perspectives on Targeting of Myeloid Derived Suppressor Cells in the Treatment of Cancer. *Front. Oncol.* *3*.
- Nakashima, C., Shingo, K., Fujiwara-Tani, R., Luo, Y., Kawahara, I., Goto, K., Sasaki, T., Fujii, K., Ohmori, H., and Kuniyasu, H. (2018). Expression of long-chain fatty acid receptor GPR40 is associated with cancer progression in colorectal cancer: A retrospective study. *Oncol. Lett.* *15*, 8641–8646.
- Nathan, C. (2002). Points of control in inflammation. *Nature* *420*, 846–852.

- Nefedova, Y., Huang, M., Kusmartsev, S., Bhattacharya, R., Cheng, P., Salup, R., Jove, R., and Gabrilovich, D. (2004). Hyperactivation of STAT3 is involved in abnormal differentiation of dendritic cells in cancer. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *172*, 464–474.
- Nefedova, Y., Nagaraj, S., Rosenbauer, A., Muro-Cacho, C., Sebti, S.M., and Gabrilovich, D.I. (2005). Regulation of dendritic cell differentiation and antitumor immune response in cancer by pharmacologic-selective inhibition of the janus-activated kinase 2/signal transducers and activators of transcription 3 pathway. *Cancer Res.* *65*, 9525–9535.
- Neven, B. (2008). Les pathologies auto-inflammatoires systémiques héréditaires associées à la cryopyrine (CAPS : cryopyrine associated periodic syndrome). *Médecine Thérapeutique Pédiatrie* *11*, 163–171.
- Notarnicola, M., Misciagna, G., Tutino, V., Chiloiro, M., Osella, A.R., Guerra, V., Bonfiglio, C., and Caruso, M.G. (2012). Increased serum levels of lipogenic enzymes in patients with severe liver steatosis. *Lipids Health Dis.* *11*, 145.
- Notarnicola, M., Lorusso, D., Tutino, V., De Nunzio, V., De Leonadis, G., Marangelli, G., Guerra, V., Veronese, N., Caruso, M.G., and Giannelli, G. (2018). Differential Tissue Fatty Acids Profiling between Colorectal Cancer Patients with and without Synchronous Metastasis. *Int. J. Mol. Sci.* *19*.
- Obermajer, N., Muthuswamy, R., Odunsi, K., Edwards, R.P., and Kalinski, P. (2011a). PGE(2)-induced CXCL12 production and CXCR4 expression controls the accumulation of human MDSCs in ovarian cancer environment. *Cancer Res.* *71*, 7463–7470.
- Obermajer, N., Muthuswamy, R., Odunsi, K., Edwards, R.P., and Kalinski, P. (2011b). PGE(2)-induced CXCL12 production and CXCR4 expression controls the accumulation of human MDSCs in ovarian cancer environment. *Cancer Res.* *71*, 7463–7470.
- Ochoa, A.C., Zea, A.H., Hernandez, C., and Rodriguez, P.C. (2007). Arginase, prostaglandins, and myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *13*, 721s-726s.
- Oh, D.Y., Talukdar, S., Bae, E.J., Imamura, T., Morinaga, H., Fan, W., Li, P., Lu, W.J., Watkins, S.M., and Olefsky, J.M. (2010). GPR120 is an Omega-3 Fatty Acid Receptor Mediating Potent Anti-Inflammatory and Insulin Sensitizing Effects. *Cell* *142*, 687–698.

- Okazaki, T., Ebihara, S., Asada, M., Kanda, A., Sasaki, H., and Yamaya, M. (2006). Granulocyte colony-stimulating factor promotes tumor angiogenesis via increasing circulating endothelial progenitor cells and Gr1+CD11b+ cells in cancer animal models. *Int. Immunol.* *18*, 1–9.
- Oraldi, M., Trombetta, A., Biasi, F., Canuto, R.A., Maggiora, M., and Muzio, G. (2009). Decreased Polyunsaturated Fatty Acid Content Contributes to Increased Survival in Human Colon Cancer.
- Ostrand-Rosenberg, S., and Sinha, P. (2009). Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *182*, 4499–4506.
- Ozao-Choy, J., Ma, G., Kao, J., Wang, G.X., Meseck, M., Sung, M., Schwartz, M., Divino, C.M., Pan, P.-Y., and Chen, S.-H. (2009). The novel role of tyrosine kinase inhibitor in the reversal of immune suppression and modulation of tumor microenvironment for immune-based cancer therapies. *Cancer Res.* *69*, 2514–2522.
- Pagès, F., Galon, J., Dieu-Nosjean, M.-C., Tartour, E., Sautès-Fridman, C., and Fridman, W.-H. (2010). Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene* *29*, 1093–1102.
- Pan, P.-Y., Ma, G., Weber, K.J., Ozao-Choy, J., Wang, G., Yin, B., Divino, C.M., and Chen, S.-H. (2010). Immune stimulatory receptor CD40 is required for T-cell suppression and T regulatory cell activation mediated by myeloid-derived suppressor cells in cancer. *Cancer Res.* *70*, 99–108.
- Panettiè, F.J., Goodman, P.J., Costanzi, J.J., Cruz, A.B., Vaitkevicius, V.K., McCracken, J.D., Brownlee, R.W., Laufman, L., Stephens, R.L., and Bonnet, J. (1988). Adjuvant therapy in large bowel adenocarcinoma: long-term results of a Southwest Oncology Group Study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *6*, 947–954.
- Pardoll, D.M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* *12*, 252–264.
- Pascual, G., Avgustinova, A., Mejetta, S., Martín, M., Castellanos, A., Attolini, C.S.-O., Berenguer, A., Prats, N., Toll, A., Hueto, J.A., et al. (2017). Targeting metastasis-initiating cells through the fatty acid receptor CD36. *Nature* *541*, 41–45.
- Patel, S.A.A., and Gooderham, N.J. (2015). IL6 Mediates Immune and Colorectal Cancer Cell Cross-talk via miR-21 and miR-29b. *Mol. Cancer Res. MCR* *13*, 1502–1508.

- Pavlova, N.N., and Thompson, C.B. (2016). The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab.* 23, 27–47.
- Pelegriin, P., and Surprenant, A. (2006). Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1 β release by the ATP-gated P2X7 receptor. *EMBO J.* 25, 5071–5082.
- Perregaux, D., and Gabel, C.A. (1994). Interleukin-1 beta maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity. *J. Biol. Chem.* 269, 15195–15203.
- Perregaux, D.G., McNiff, P., Laliberte, R., Conklyn, M., and Gabel, C.A. (2000). ATP acts as an agonist to promote stimulus-induced secretion of IL-1 beta and IL-18 in human blood. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 165, 4615–4623.
- Petak, I., Tillman, D.M., and Houghton, J.A. (2000). p53 Dependence of Fas Induction and Acute Apoptosis in Response to 5-Fluorouracil-Leucovorin in Human Colon Carcinoma Cell Lines. *Clin. Cancer Res.* 6, 4432–4441.
- Peters, J.M., Shah, Y.M., and Gonzalez, F.J. (2012). The role of peroxisome proliferator-activated receptors in carcinogenesis and chemoprevention. *Nat. Rev. Cancer* 12, 181–195.
- Petrek, J.A., Hudgins, L.C., Ho, M., Bajorunas, D.R., and Hirsch, J. (1997). Fatty acid composition of adipose tissue, an indication of dietary fatty acids, and breast cancer prognosis. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 15, 1377–1384.
- Petrilli, V. (2017). The multifaceted roles of inflammasome proteins in cancer. *Curr. Opin. Oncol.* 29, 35–40.
- Pétrilli, V., Papin, S., Dostert, C., Mayor, A., Martinon, F., and Tschopp, J. (2007). Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ.* 14, 1583–1589.
- Piccioli, P., and Rubartelli, A. (2013). The secretion of IL-1 β and options for release. *Semin. Immunol.* 25, 425–429.
- Plummer, M., de Martel, C., Vignat, J., Ferlay, J., Bray, F., and Franceschi, S. (2016). Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *Lancet Glob. Health* 4, e609–e616.

- Polz, J., Remke, A., Weber, S., Schmidt, D., Weber-Steffens, D., Pietryga-Krieger, A., Müller, N., Ritter, U., Mostböck, S., and Männel, D.N. (2014). Myeloid suppressor cells require membrane TNFR2 expression for suppressive activity. *Immun. Inflamm. Dis.* 2, 121–130.
- Ponsuksili, S., Brunner, R.M., Goldammer, T., Kühn, C., Walz, C., Chomdej, S., Tesfaye, D., Schellander, K., Wimmers, K., and Schwerin, M. (2006). Bovine NALP5, NALP8, and NALP9 genes: assignment to a QTL region and the expression in adult tissues, oocytes, and preimplantation embryos. *Biol. Reprod.* 74, 577–584.
- Poschke, I., Mougiakakos, D., and Kiessling, R. (2011). Camouflage and sabotage: tumor escape from the immune system. *Cancer Immunol. Immunother. CII* 60, 1161–1171.
- Prehn, R.T., and Lappé, M.A. (1971). An Immunostimulation Theory of Tumor Development. *Immunol. Rev.* 7, 26–54.
- Prenen, H., Vecchione, L., and Van Cutsem, E. (2013). Role of targeted agents in metastatic colorectal cancer. *Target. Oncol.* 8, 83–96.
- Pritchard, D.M., Watson, A.J., Potten, C.S., Jackman, A.L., and Hickman, J.A. (1997). Inhibition by uridine but not thymidine of p53-dependent intestinal apoptosis initiated by 5-fluorouracil: evidence for the involvement of RNA perturbation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 1795–1799.
- Psychogios, N., Hau, D.D., Peng, J., Guo, A.C., Mandal, R., Bouatra, S., Sinelnikov, I., Krishnamurthy, R., Eisner, R., Gautam, B., et al. (2011). The Human Serum Metabolome. *PLOS ONE* 6, e16957.
- Py, B.F., Kim, M.-S., Vakifahmetoglu-Norberg, H., and Yuan, J. (2013). Deubiquitination of NLRP3 by BRCC3 critically regulates inflammasome activity. *Mol. Cell* 49, 331–338.
- Py, B.F., Jin, M., Desai, B.N., Penumaka, A., Zhu, H., Kober, M., Dietrich, A., Lipinski, M.M., Henry, T., Clapham, D.E., et al. (2014). Caspase-11 controls interleukin-1 β release through degradation of TRPC1. *Cell Rep.* 6, 1122–1128.
- Qu, Y., Misaghi, S., Newton, K., Gilmour, L.L., Louie, S., Cupp, J.E., Dubyak, G.R., Hackos, D., and Dixit, V.M. (2011). Pannexin-1 Is Required for ATP Release during Apoptosis but Not for Inflammasome Activation. *J. Immunol.* 186, 6553–6561.

- Raber, P., Ochoa, A.C., and Rodríguez, P.C. (2012). Metabolism of L-Arginine by Myeloid-Derived Suppressor Cells in Cancer: Mechanisms of T cell suppression and Therapeutic Perspectives. *Immunol. Invest.* *41*, 614–634.
- Rachidi, S.M., Qin, T., Sun, S., Zheng, W.J., and Li, Z. (2013). Molecular profiling of multiple human cancers defines an inflammatory cancer-associated molecular pattern and uncovers KPNA2 as a uniform poor prognostic cancer marker. *PLoS One* *8*, e57911.
- Rani, I., Vaiphei, K., and Agnihotri, N. (2014). Supplementation of fish oil augments efficacy and attenuates toxicity of 5-fluorouracil in 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride/dextran sulfate sodium-induced colon carcinogenesis. *Cancer Chemother. Pharmacol.* *74*, 309–322.
- Rani, I., Sharma, B., Kumar, S., Kaur, S., and Agnihotri, N. (2017). Apoptosis mediated chemosensitization of tumor cells to 5-fluorouracil on supplementation of fish oil in experimental colon carcinoma. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* *39*, 1010428317695019.
- Read, J.A., Beale, P.J., Volker, D.H., Smith, N., Childs, A., and Clarke, S.J. (2007). Nutrition intervention using an eicosapentaenoic acid (EPA)-containing supplement in patients with advanced colorectal cancer. Effects on nutritional and inflammatory status: a phase II trial. *Support. Care Cancer Off. J. Multinat. Assoc. Support. Care Cancer* *15*, 301–307.
- Rébé, C., Végran, F., Berger, H., and Ghiringhelli, F. (2013). STAT3 activation: A key factor in tumor immunoescape. *JAK-STAT* *2*, e23010.
- Rébé, C., Derangère, V., and Ghiringhelli, F. (2015). Induction of pyroptosis in colon cancer cells by LXR β . *Mol. Cell. Oncol.* *2*, e970094.
- Robinson, W.A. (1965). GRANULOCYTOSIS IN NEOPLASIA* - Robinson - 1974 - *Annals of the New York Academy of Sciences* - Wiley Online Library.
- Rodrigues, J.C., Gonzalez, G.C., Zhang, L., Ibrahim, G., Kelly, J.J., Gustafson, M.P., Lin, Y., Dietz, A.B., Forsyth, P.A., Yong, V.W., et al. (2010). Normal human monocytes exposed to glioma cells acquire myeloid-derived suppressor cell-like properties. *Neuro-Oncol.* *12*, 351–365.
- Rodríguez, P.C., Zea, A.H., Culotta, K.S., Zabaleta, J., Ochoa, J.B., and Ochoa, A.C. (2002). Regulation of T cell receptor CD3zeta chain expression by L-arginine. *J. Biol. Chem.* *277*, 21123–21129.

- Rodriguez, P.C., Hernandez, C.P., Quiceno, D., Dubinett, S.M., Zabaleta, J., Ochoa, J.B., Gilbert, J., and Ochoa, A.C. (2005). Arginase I in myeloid suppressor cells is induced by COX-2 in lung carcinoma. *J. Exp. Med.* *202*, 931–939.
- Rodriguez, P.C., Quiceno, D.G., and Ochoa, A.C. (2007). L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression. *Blood* *109*, 1568–1573.
- Rogers, K.R., Kikawa, K.D., Mouradian, M., Hernandez, K., McKinnon, K.M., Ahwah, S.M., and Pardini, R.S. (2010). Docosahexaenoic acid alters epidermal growth factor receptor-related signaling by disrupting its lipid raft association. *Carcinogenesis* *31*, 1523–1530.
- Rogers, N.C., Slack, E.C., Edwards, A.D., Nolte, M.A., Schulz, O., Schweighoffer, E., Williams, D.L., Gordon, S., Tybulewicz, V.L., Brown, G.D., et al. (2005). Syk-Dependent Cytokine Induction by Dectin-1 Reveals a Novel Pattern Recognition Pathway for C Type Lectins. *Immunity* *22*, 507–517.
- Röhrig, F., and Schulze, A. (2016). The multifaceted roles of fatty acid synthesis in cancer. *Nat. Rev. Cancer* *16*, 732.
- Roodhart, J.M.L., Daenen, L.G.M., Stigter, E.C.A., Prins, H.-J., Gerrits, J., Houthuijzen, J.M., Gerritsen, M.G., Schipper, H.S., Backer, M.J.G., van Amersfoort, M., et al. (2011). Mesenchymal stem cells induce resistance to chemotherapy through the release of platinum-induced fatty acids. *Cancer Cell* *20*, 370–383.
- Routy, B., Chatelier, E.L., Derosa, L., Duong, C.P.M., Alou, M.T., Daillère, R., Fluckiger, A., Messaoudene, M., Rauber, C., Roberti, M.P., et al. (2018). Gut microbiome influences efficacy of PD-1–based immunotherapy against epithelial tumors. *Science* *359*, 91–97.
- Rubartelli, A., Cozzolino, F., Talio, M., and Sitia, R. (1990). A novel secretory pathway for interleukin-1 beta, a protein lacking a signal sequence. *EMBO J.* *9*, 1503–1510.
- Sade-Feldman, M., Kanterman, J., Ish-Shalom, E., Elnekave, M., Horwitz, E., and Baniyash, M. (2013). Tumor necrosis factor- α blocks differentiation and enhances suppressive activity of immature myeloid cells during chronic inflammation. *Immunity* *38*, 541–554.
- Salonga, D., Danenberg, K.D., Johnson, M., Metzger, R., Groshen, S., Tsao-Wei, D.D., Lenz, H.J., Leichman, C.G., Leichman, L., Diasio, R.B., et al. (2000). Colorectal tumors responding to 5-fluorouracil have low gene expression levels of dihydropyrimidine dehydrogenase, thymidylate

synthase, and thymidine phosphorylase. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *6*, 1322–1327.

Sánchez-Gundín, J., Fernández-Carballido, A.M., Martínez-Valdivieso, L., Barreda-Hernández, D., and Torres-Suárez, A.I. (2018). New Trends in the Therapeutic Approach to Metastatic Colorectal Cancer. *Int. J. Med. Sci.* *15*, 659–665.

Sánchez-Lara, K., Turcott, J.G., Juárez-Hernández, E., Nuñez-Valencia, C., Villanueva, G., Guevara, P., De la Torre-Vallejo, M., Mohar, A., and Arrieta, O. (2014). Effects of an oral nutritional supplement containing eicosapentaenoic acid on nutritional and clinical outcomes in patients with advanced non-small cell lung cancer: randomised trial. *Clin. Nutr. Edinb. Scotl.* *33*, 1017–1023.

Sanders, L.M., Henderson, C.E., Hong, M.Y., Barhoumi, R., Burghardt, R.C., Wang, N., Spinka, C.M., Carroll, R.J., Turner, N.D., Chapkin, R.S., et al. (2004). An increase in reactive oxygen species by dietary fish oil coupled with the attenuation of antioxidant defenses by dietary pectin enhances rat colonocyte apoptosis. *J. Nutr.* *134*, 3233–3238.

Santo, C.D., Serafini, P., Marigo, I., Dolcetti, L., Bolla, M., Soldato, P.D., Melani, C., Guiducci, C., Colombo, M.P., Iezzi, M., et al. (2005). Nitroaspirin corrects immune dysfunction in tumor-bearing hosts and promotes tumor eradication by cancer vaccination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *102*, 4185–4190.

Sargent, D., Sobrero, A., Grothey, A., O’Connell, M.J., Buyse, M., Andre, T., Zheng, Y., Green, E., Labianca, R., O’Callaghan, C., et al. (2009). Evidence for cure by adjuvant therapy in colon cancer: observations based on individual patient data from 20,898 patients on 18 randomized trials. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *27*, 872–877.

Sato, K., Yang, X., Yudate, T., Chung, J.-S., Wu, J., Luby-Phelps, K., Kimberly, R.P., Underhill, D., Cruz, P.D., and Ariizumi, K. (2006). Dectin-2 Is a Pattern Recognition Receptor for Fungi That Couples with the Fc Receptor γ Chain to Induce Innate Immune Responses. *J. Biol. Chem.* *281*, 38854–38866.

Sauer, H., Wartenberg, M., and Hescheler, J. (2001). Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* *11*, 173–186.

- Schmid-Burgk, J.L., Gaidt, M.M., Schmidt, T., Ebert, T.S., Bartok, E., and Hornung, V. (2015). Caspase-4 mediates non-canonical activation of the NLRP3 inflammasome in human myeloid cells. *Eur. J. Immunol.* *45*, 2911–2917.
- Schmid-Burgk, J.L., Chauhan, D., Schmidt, T., Ebert, T.S., Reinhardt, J., Endl, E., and Hornung, V. (2016). A Genome-wide CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) Screen Identifies NEK7 as an Essential Component of NLRP3 Inflammasome Activation. *J. Biol. Chem.* *291*, 103–109.
- Schmielau, J., and Finn, O.J. (2001). Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of t-cell function in advanced cancer patients. *Cancer Res.* *61*, 4756–4760.
- Schroder, K., and Tschopp, J. (2010). The inflammasomes. *Cell* *140*, 821–832.
- Schroder, K., Sagulenko, V., Zamoshnikova, A., Richards, A.A., Cridland, J.A., Irvine, K.M., Stacey, K.J., and Sweet, M.J. (2012). Acute lipopolysaccharide priming boosts inflammasome activation independently of inflammasome sensor induction. *Immunobiology* *217*, 1325–1329.
- Sebe, M., Tsutsumi, R., Yamaguchi, S., Horikawa, Y.T., Harada, N., Oyama, T., Kakuta, N., Tanaka, K., Tsutsumi, Y.M., Nakaya, Y., et al. (2016). The synergistic effects of omega-3 fatty acids against 5-fluorouracil-induced mucosal impairment in mice. *BMC Nutr.* *2*, 17.
- Serafini, P., Meckel, K., Kelso, M., Noonan, K., Califano, J., Koch, W., Dolcetti, L., Bronte, V., and Borrello, I. (2006). Phosphodiesterase-5 inhibition augments endogenous antitumor immunity by reducing myeloid-derived suppressor cell function. *J. Exp. Med.* *203*, 2691–2702.
- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P.E., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2001). IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* *410*, 1107–1111.
- Sharma, P., and Allison, J.P. (2015). The future of immune checkpoint therapy. *Science* *348*, 56–61.
- Sharp, F.A., Ruane, D., Claass, B., Creagh, E., Harris, J., Malyala, P., Singh, M., O’Hagan, D.T., Pétrilli, V., Tschopp, J., et al. (2009). Uptake of particulate vaccine adjuvants by dendritic cells activates the NALP3 inflammasome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 870–875.

- Sheedy, F.J., Grebe, A., Rayner, K.J., Kalantari, P., Ramkhelawon, B., Carpenter, S.B., Becker, C.E., Ediriweera, H.N., Mullick, A.E., Golenbock, D.T., et al. (2013). CD36 coordinates NLRP3 inflammasome activation by facilitating intracellular nucleation of soluble ligands into particulate ligands in sterile inflammation. *Nat. Immunol.* *14*, 812–820.
- Shen, D., Deng, C., and Zhang, M. (2007). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists inhibit the proliferation and invasion of human colon cancer cells. *Postgrad. Med. J.* *83*, 414–419.
- Shen, L., Yang, Y., Ou, T., Key, C.-C.C., Tong, S.H., Sequeira, R.C., Nelson, J.M., Nie, Y., Wang, Z., Boudyguina, E., et al. (2017). Dietary PUFAs attenuate NLRP3 inflammasome activation via enhancing macrophage autophagy. *J. Lipid Res.* jlr.M075879.
- Shi, H., Wang, Y., Li, X., Zhan, X., Tang, M., Fina, M., Su, L., Pratt, D., Bu, C.H., Hildebrand, S., et al. (2016). NLRP3 activation and mitosis are mutually exclusive events coordinated by NEK7, a new inflammasome component. *Nat. Immunol.* *17*, 250–258.
- Shi, J., Zhao, Y., Wang, K., Shi, X., Wang, Y., Huang, H., Zhuang, Y., Cai, T., Wang, F., and Shao, F. (2015). Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature* *526*, 660–665.
- Shi, Y., Evans, J.E., and Rock, K.L. (2003). Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* *425*, 516–521.
- Shojaei, F., and Ferrara, N. (2008). Refractoriness to antivasculature endothelial growth factor treatment: role of myeloid cells. *Cancer Res.* *68*, 5501–5504.
- Shojaei, F., Wu, X., Malik, A.K., Zhong, C., Baldwin, M.E., Schanz, S., Fuh, G., Gerber, H.-P., and Ferrara, N. (2007). Tumor refractoriness to anti-VEGF treatment is mediated by CD11b+Gr1+ myeloid cells. *Nat. Biotechnol.* *25*, 911–920.
- Sica, A., and Bronte, V. (2007). Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *J. Clin. Invest.* *117*, 1155–1166.
- Sieri, S., Agnoli, C., Pala, V., Grioni, S., Brighenti, F., Pellegrini, N., Masala, G., Palli, D., Mattiello, A., Panico, S., et al. (2017). Dietary glycemic index, glycemic load, and cancer risk: results from the EPIC-Italy study. *Sci. Rep.* *7*, 9757.

- Silva, J. de A.P., Trindade, E.B.S. de M., Fabre, M.E. de S., Menegotto, V.M., Gevaerd, S., Buss, Z. da S., and Frode, T.S. (2012). Fish oil supplement alters markers of inflammatory and nutritional status in colorectal cancer patients. *Nutr. Cancer* 64, 267–273.
- Silverstein, R.L., and Febbraio, M. (2009). CD36, a Scavenger Receptor Involved in Immunity, Metabolism, Angiogenesis, and Behavior. *Sci. Signal.* 2, re3.
- Simon, H.-U., Haj-Yehia, A., and Levi-Schaffer, F. (2000). Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis* 5, 415–418.
- Singer, P., Shapiro, H., Theilla, M., Anbar, R., Singer, J., and Cohen, J. (2008). Anti-inflammatory properties of omega-3 fatty acids in critical illness: novel mechanisms and an integrative perspective. *Intensive Care Med.* 34, 1580–1592.
- Sinha, P., Clements, V.K., Fulton, A.M., and Ostrand-Rosenberg, S. (2007). Prostaglandin E2 promotes tumor progression by inducing myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res.* 67, 4507–4513.
- Skender, B., Vaculová, A.H., Kozubík, A., Jelínková, I., Hofmanová, J., Slavík, J., Moyer, M.P., and Machala, M. (2014). DHA-mediated enhancement of TRAIL-induced apoptosis in colon cancer cells is associated with engagement of mitochondria and specific alterations in sphingolipid metabolism. *BBA - Mol. Cell Biol. Lipids.*
- Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A., and McGuire, W.L. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235, 177–182.
- Slamon, D.J., Godolphin, W., Jones, L.A., Holt, J.A., Wong, S.G., Keith, D.E., Levin, W.J., Stuart, S.G., Udove, J., Ullrich, A., et al. (1989). Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244, 707–712.
- Smith, D.P. (2012). Volatile pheromone signalling in *Drosophila*. *Physiol. Entomol.* 37.
- Solito, S., Marigo, I., Pinton, L., Damuzzo, V., Mandruzzato, S., and Bronte, V. (2014). Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity in human cancers. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1319, 47–65.

- Song, H., Liu, B., Huai, W., Yu, Z., Wang, W., Zhao, J., Han, L., Jiang, G., Zhang, L., Gao, C., et al. (2016). The E3 ubiquitin ligase TRIM31 attenuates NLRP3 inflammasome activation by promoting proteasomal degradation of NLRP3. *Nat. Commun.* *7*, 13727.
- Song, M., Nishihara, R., Wu, K., Qian, Z.R., Kim, S.A., Sukawa, Y., Mima, K., Inamura, K., Masuda, A., Yang, J., et al. (2015). Marine ω -3 polyunsaturated fatty acids and risk of colorectal cancer according to microsatellite instability. *J. Natl. Cancer Inst.* *107*.
- Song, M., Zhang, X., Meyerhardt, J.A., Giovannucci, E.L., Ogino, S., Fuchs, C.S., and Chan, A.T. (2017a). Marine ω -3 polyunsaturated fatty acid intake and survival after colorectal cancer diagnosis. *Gut* *66*, 1790–1796.
- Song, N., Liu, Z.-S., Xue, W., Bai, Z.-F., Wang, Q.-Y., Dai, J., Liu, X., Huang, Y.-J., Cai, H., Zhan, X.-Y., et al. (2017b). NLRP3 Phosphorylation Is an Essential Priming Event for Inflammasome Activation. *Mol. Cell* *68*, 185-197.e6.
- Song, X., Krelin, Y., Dvorkin, T., Bjorkdahl, O., Segal, S., Dinarello, C.A., Voronov, E., and Apte, R.N. (2005). CD11b+/Gr-1+ immature myeloid cells mediate suppression of T cells in mice bearing tumors of IL-1beta-secreting cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *175*, 8200–8208.
- Sorensen, L.S., Thorlacius-Ussing, O., Schmidt, E.B., Rasmussen, H.H., Lundbye-Christensen, S., Calder, P.C., and Lindorff-Larsen, K. (2014). Randomized clinical trial of perioperative omega-3 fatty acid supplements in elective colorectal cancer surgery. *Br. J. Surg.* *101*, 33–42.
- Soumaoro, L.T., Iida, S., Uetake, H., Ishiguro, M., Takagi, Y., Higuchi, T., Yasuno, M., Enomoto, M., and Sugihara, K. (2006). Expression of 5-lipoxygenase in human colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* *12*, 6355–6360.
- Spalinger, M.R., Lang, S., Gottier, C., Dai, X., Rawlings, D.J., Chan, A.C., Rogler, G., and Scharl, M. (2017). PTPN22 regulates NLRP3-mediated IL1B secretion in an autophagy-dependent manner. *Autophagy* *13*, 1590–1601.
- Spite, M., Clària, J., and Serhan, C.N. (2014). Resolvins, Specialized Pro-Resolving Lipid Mediators and their Potential Roles in Metabolic Diseases. *Cell Metab.* *19*, 21–36.

- Srivastava, M.K., Sinha, P., Clements, V.K., Rodriguez, P., and Ostrand-Rosenberg, S. (2010). Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine. *Cancer Res.* *70*, 68–77.
- Srivastava, M.K., Zhu, L., Harris-White, M., Kar, U.K., Kar, U., Huang, M., Johnson, M.F., Lee, J.M., Elashoff, D., Strieter, R., et al. (2012). Myeloid suppressor cell depletion augments antitumor activity in lung cancer. *PLoS One* *7*, e40677.
- Stewart, T.J., Liewehr, D.J., Steinberg, S.M., Greenelch, K.M., and Abrams, S.I. (2009). Modulating the expression of IFN regulatory factor 8 alters the protumorigenic behavior of CD11b+Gr-1+ myeloid cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *183*, 117–128.
- Stone, A.E.L., Wilkins, C., Green, R., and Gale, M.J. (2017). RLR-mediated immunity is unique and critical in the response to West Nile Virus. *J. Immunol.* *198*, 148.13-148.13.
- Stutman, O. (1976). Immunodepression and Malignancy. In *Advances in Cancer Research*, G. Klein, S. Weinhouse, and A. Haddow, eds. (Academic Press), pp. 261–422.
- Stutz, A., Horvath, G.L., Monks, B.G., and Latz, E. (2013). ASC speck formation as a readout for inflammasome activation. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *1040*, 91–101.
- Sui, X., Kong, N., Wang, X., Fang, Y., Hu, X., Xu, Y., Chen, W., Wang, K., Li, D., Jin, W., et al. (2014). JNK confers 5-fluorouracil resistance in p53-deficient and mutant p53-expressing colon cancer cells by inducing survival autophagy. *Sci. Rep.* *4*.
- Sun, H., Berquin, I.M., Owens, R.T., O’Flaherty, J.T., and Edwards, I.J. (2008). Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ -mediated up-regulation of syndecan-1 by n-3 fatty acids promotes apoptosis of human breast cancer cells. *Cancer Res.* *68*, 2912–2919.
- Sung, B., Ravindran, J., Prasad, S., Pandey, M.K., and Aggarwal, B.B. (2010). Gossypol Induces Death Receptor-5 through Activation of the ROS-ERK-CHOP Pathway and Sensitizes Colon Cancer Cells to TRAIL. *J. Biol. Chem.* *285*, 35418–35427.
- Suzuki, E., Kapoor, V., Jassar, A.S., Kaiser, L.R., and Albelda, S.M. (2005). Gemcitabine selectively eliminates splenic Gr-1+/CD11b+ myeloid suppressor cells in tumor-bearing animals and enhances antitumor immune activity. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *11*, 6713–6721.

- Szachowicz-Petelska, B., Dobrzynska, I., Sulkowski, S., and Figaszewski, Z. (2010). Characterization of the cell membrane during cancer transformation. *J. Environ. Biol.* *31*, 845–850.
- Szuster-Ciesielska, A., Hryciuk-Umer, E., Stepulak, A., Kupisz, K., and Kandefer-Szerszeń, M. (2004). Reactive oxygen species production by blood neutrophils of patients with laryngeal carcinoma and antioxidative enzyme activity in their blood. *Acta Oncol. Stockh. Swed.* *43*, 252–258.
- Tachibana, K., Yamasaki, D., Ishimoto, K., and Doi, T. (2008). The Role of PPARs in Cancer. *PPAR Res.* *2008*.
- Takeuchi, O., and Akira, S. (2010). Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* *140*, 805–820.
- Talmadge, J.E., and Gabrilovich, D.I. (2013). History of myeloid-derived suppressor cells. *Nat. Rev. Cancer* *13*, 739–752.
- Tanaka, T., Nakata, T., Oka, T., Ogawa, T., Okamoto, F., Kusaka, Y., Sohmiya, K., Shimamoto, K., and Itakura, K. (2001). Defect in human myocardial long-chain fatty acid uptake is caused by FAT/CD36 mutations. *J. Lipid Res.* *42*, 751–759.
- Tang, C.-H.A., Ranatunga, S., Kriss, C.L., Cubitt, C.L., Tao, J., Pinilla-Ibarz, J.A., Valle, J.R.D., and Hu, C.-C.A. (2014). Inhibition of ER stress-associated IRE-1/XBP-1 pathway reduces leukemic cell survival. *J. Clin. Invest.* *124*, 2585–2598.
- Tazoe, H., Otomo, Y., Kaji, I., Tanaka, R., Karaki, S.-I., and Kuwahara, A. (2008). Roles of short-chain fatty acids receptors, GPR41 and GPR43 on colonic functions. *J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Pol. Physiol. Soc.* *59 Suppl 2*, 251–262.
- Tcyganov, E., Mastio, J., Chen, E., and Gabrilovich, D.I. (2018). Plasticity of myeloid-derived suppressor cells in cancer. *Curr. Opin. Immunol.* *51*, 76–82.
- Terabe, M., Matsui, S., Park, J.-M., Mamura, M., Noben-Trauth, N., Donaldson, D.D., Chen, W., Wahl, S.M., Ledbetter, S., Pratt, B., et al. (2003). Transforming growth factor-beta production and myeloid cells are an effector mechanism through which CD1d-restricted T cells block cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunosurveillance: abrogation prevents tumor recurrence. *J. Exp. Med.* *198*, 1741–1752.

- Terme, M., Ullrich, E., Aymeric, L., Meinhardt, K., Desbois, M., Delahaye, N.F., Viaud, S., Ryffel, B., Yagita, H., Kaplanski, G., et al. (2011). IL-18 induces PD-1-dependent immunosuppression in cancer. *Cancer Res.* canres.0993.2011.
- Thevenot, P.T., Sierra, R.A., Raber, P.L., Al-Khami, A.A., Trillo-Tinoco, J., Zarreii, P., Ochoa, A.C., Cui, Y., Del Valle, L., and Rodriguez, P.C. (2014). The stress-response sensor chop regulates the function and accumulation of myeloid-derived suppressor cells in tumors. *Immunity* 41, 389–401.
- Tian, X., Pascal, G., and Monget, P. (2009). Evolution and functional divergence of NLRP genes in mammalian reproductive systems. *BMC Evol. Biol.* 9, 202.
- Toden, S., Okugawa, Y., Jascur, T., Wodarz, D., Komarova, N.L., Buhrmann, C., Shakibaei, M., Boland, C.R., and Goel, A. (2015). Curcumin mediates chemosensitization to 5-fluorouracil through miRNA-induced suppression of epithelial-to-mesenchymal transition in chemoresistant colorectal cancer. *Carcinogenesis* 36, 355–367.
- Toh, B., Wang, X., Keeble, J., Sim, W.J., Khoo, K., Wong, W.-C., Kato, M., Prevost-Blondel, A., Thiery, J.-P., and Abastado, J.-P. (2011). Mesenchymal Transition and Dissemination of Cancer Cells Is Driven by Myeloid-Derived Suppressor Cells Infiltrating the Primary Tumor. *PLOS Biol.* 9, e1001162.
- Toit-Kohn, J.L., Louw, L., and Engelbrecht, A.M. (2009). Docosahexaenoic acid induces apoptosis in colorectal carcinoma cells by modulating the PI3 kinase and p38 MAPK pathways. *J. Nutr. Biochem.* 20, 106–114.
- Topalian, S.L., Drake, C.G., and Pardoll, D.M. (2012). Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 24, 207–212.
- Trabal, J., Leyes, P., Forga, M., and Maurel, J. (2010). Potential usefulness of an EPA-enriched nutritional supplement on chemotherapy tolerability in cancer patients without overt malnutrition. *Nutr. Hosp.* 25, 736–740.
- Triantafilou, M., Gamper, F.G.J., Haston, R.M., Mouratis, M.A., Morath, S., Hartung, T., and Triantafilou, K. (2006). Membrane sorting of toll-like receptor (TLR)-2/6 and TLR2/1 heterodimers at the cell surface determines heterotypic associations with CD36 and intracellular targeting. *J. Biol. Chem.* 281, 31002–31011.

- Trichopoulou, A., Orfanos, P., Norat, T., Bueno-de-Mesquita, B., Ocké, M.C., Peeters, P.H., Schouw, Y.T. van der, Boeing, H., Hoffmann, K., Boffetta, P., et al. (2005). Modified Mediterranean diet and survival: EPIC-elderly prospective cohort study. *BMJ* *330*, 991.
- Tschopp, J., and Schroder, K. (2010). NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production? *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 210–215.
- Tu, S., Bhagat, G., Cui, G., Takaishi, S., Kurt-Jones, E.A., Rickman, B., Betz, K.S., Penz-Oesterreicher, M., Bjorkdahl, O., Fox, J.G., et al. (2008). Overexpression of interleukin-1beta induces gastric inflammation and cancer and mobilizes myeloid-derived suppressor cells in mice. *Cancer Cell* *14*, 408–419.
- Turk, H.F., and Chapkin, R.S. (2013). Membrane lipid raft organization is uniquely modified by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* *88*, 43–47.
- Ugel, S., Delpozzi, F., Desantis, G., Papalini, F., Simonato, F., Sonda, N., Zilio, S., and Bronte, V. (2009). Therapeutic targeting of myeloid-derived suppressor cells. *Curr. Opin. Pharmacol.* *9*, 470–481.
- Ulloa-Aguirre, A., Stanislaus, D., Janovick, J.A., and Conn, P.M. (1999). Structure-activity relationships of G protein-coupled receptors. *Arch. Med. Res.* *30*, 420–435.
- Umansky, V., and Sevko, A. (2012). Overcoming immunosuppression in the melanoma microenvironment induced by chronic inflammation. *Cancer Immunol. Immunother. CII* *61*, 275–282.
- Van Blarigan, E.L., Fuchs, C.S., Niedzwiecki, D., Zhang, S., Saltz, L.B., Mayer, R.J., Mowat, R.B., Whittom, R., Hantel, A., Benson, A., et al. (2018). Association of Survival With Adherence to the American Cancer Society Nutrition and Physical Activity Guidelines for Cancer Survivors After Colon Cancer Diagnosis: The CALGB 89803/Alliance Trial. *JAMA Oncol.* *4*, 783–790.
- Vanamala, J., Glagolenko, A., Yang, P., Carroll, R.J., Murphy, M.E., Newman, R.A., Ford, J.R., Braby, L.A., Chapkin, R.S., Turner, N.D., et al. (2008). Dietary fish oil and pectin enhance colonocyte apoptosis in part through suppression of PPARdelta/PGE2 and elevation of PGE3. *Carcinogenesis* *29*, 790–796.

- Varga, T., Czimmerer, Z., and Nagy, L. (2011). PPARs are a unique set of fatty acid regulated transcription factors controlling both lipid metabolism and inflammation. *Biochim. Biophys. Acta* 1812, 1007–1022.
- Vargas, A.J., and Thompson, P.A. (2012). Diet and nutrient factors in colorectal cancer risk. *Nutr. Clin. Pract. Off. Publ. Am. Soc. Parenter. Enter. Nutr.* 27, 613–623.
- Vasudevan, A., Yu, Y., Banerjee, S., Woods, J., Farhana, L., Rajendra, S.G., Patel, A., Dyson, G., Levi, E., Maddipati, K.R., et al. (2014). Omega-3 fatty acid is a potential preventive agent for recurrent colon cancer. *Cancer Prev. Res. Phila. Pa* 7, 1138–1148.
- Veglia, F., Perego, M., and Gabrilovich, D. (2018). Myeloid-derived suppressor cells coming of age. *Nat. Immunol.* 19, 108–119.
- Vesely, M.D., Kershaw, M.H., Schreiber, R.D., and Smyth, M.J. (2011). Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu. Rev. Immunol.* 29, 235–271.
- Vincent, J., Mignot, G., Chalmin, F., Ladoire, S., Bruchard, M., Chevriaux, A., Martin, F., Apetoh, L., Rébé, C., and Ghiringhelli, F. (2010a). 5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity. *Cancer Res.* 70, 3052–3061.
- Vincent, J., Mignot, G., Chalmin, F., Ladoire, S., Bruchard, M., Chevriaux, A., Martin, F., Apetoh, L., Rébé, C., and Ghiringhelli, F. (2010b). 5-Fluorouracil Selectively Kills Tumor-Associated Myeloid-Derived Suppressor Cells Resulting in Enhanced T Cell-Dependent Antitumor Immunity. *Cancer Res.* 70, 3052–3061.
- Violette, S., Poulain, L., Dussaux, E., Pepin, D., Faussat, A.-M., Chambaz, J., Lacorte, J.-M., Staedel, C., and Lesuffleur, T. (2002). Resistance of colon cancer cells to long-term 5-fluorouracil exposure is correlated to the relative level of Bcl-2 and Bcl-X(L) in addition to Bax and p53 status. *Int. J. Cancer* 98, 498–504.
- Visioli, F., Giordano, E., Nicod, N.M., and Dávalos, A. (2012). Molecular Targets of Omega 3 and Conjugated Linoleic Fatty Acids – “Micromanaging” Cellular Response. *Front. Physiol.* 3.
- Volate, S., Hudson, R., Wang, D., Muga, S., and Wargovich, M. (2009). TJ-41 Induces Apoptosis and Potentiates the Apoptotic Effects of 5-FU in Breast Cancer Cell Lines.

- Volpato, M., and Hull, M.A. (2018). Omega-3 polyunsaturated fatty acids as adjuvant therapy of colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 37, 545–555.
- Voronov, E., and Apte, R.N. (2015). IL-1 in Colon Inflammation, Colon Carcinogenesis and Invasiveness of Colon Cancer. *Cancer Microenviron.* 8, 187–200.
- Waight, J., and Abrams, S. (2011). Tumor-derived G-CSF promotes granulocytic MDSC development in vivo (66.34). *J. Immunol.* 186, 66.34-66.34.
- Waight, J.D., Netherby, C., Hensen, M.L., Miller, A., Hu, Q., Liu, S., Bogner, P.N., Farren, M.R., Lee, K.P., Liu, K., et al. (2013). Myeloid-derived suppressor cell development is regulated by a STAT/IRF-8 axis. *J. Clin. Invest.* 123, 4464–4478.
- Wang, D., and Dubois, R.N. (2010). The role of COX-2 in intestinal inflammation and colorectal cancer. *Oncogene* 29, 781–788.
- Wang, D., and DuBois, R.N. (2010). Eicosanoids and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 10, 181–193.
- Wang, H., Xing, Y., Mao, L., Luo, Y., Kang, L., and Meng, G. (2013). Pannexin-1 influences peritoneal cavity cell population but is not involved in NLRP3 inflammasome activation. *Protein Cell* 4, 259–265.
- Wang, H., Wang, Y., Du, Q., Lu, P., Fan, H., Lu, J., and Hu, R. (2016). Inflammasome-independent NLRP3 is required for epithelial-mesenchymal transition in colon cancer cells. *Exp. Cell Res.* 342, 184–192.
- Wang, J., Wu, X., Simonavicius, N., Tian, H., and Ling, L. (2006). Medium-chain fatty acids as ligands for orphan G protein-coupled receptor GPR84. *J. Biol. Chem.* 281, 34457–34464.
- Wannous, R., Bon, E., Mahéo, K., Goupille, C., Chamouton, J., Bougnoux, P., Roger, S., Besson, P., and Chevalier, S. (2013). PPAR β mRNA expression, reduced by n-3 PUFA diet in mammary tumor, controls breast cancer cell growth. *Biochim. Biophys. Acta* 1831, 1618–1625.
- Warburg, O. (1956). On the Origin of Cancer Cells. *Science* 123, 309–314.
- Waris, G., and Ahsan, H. (2006). Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *J. Carcinog.* 5, 14.

- Weinhouse, S. (1976). The Warburg hypothesis fifty years later. *Z. Krebsforsch. Klin. Onkol. Cancer Res. Clin. Oncol.* *87*, 115–126.
- West, N.J., Clark, S.K., Phillips, R.K.S., Hutchinson, J.M., Leicester, R.J., Belluzzi, A., and Hull, M.A. (2010). Eicosapentaenoic acid reduces rectal polyp number and size in familial adenomatous polyposis. *Gut* *59*, 918–925.
- Westerveld, G.H., Korver, C.M., van Pelt, A.M.M., Leschot, N.J., van der Veen, F., Repping, S., and Lombardi, M.P. (2006). Mutations in the testis-specific NALP14 gene in men suffering from spermatogenic failure. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *21*, 3178–3184.
- Weylandt, K.H., Chiu, C.-Y., Gomolka, B., Waechter, S.F., and Wiedenmann, B. (2012). Omega-3 fatty acids and their lipid mediators: towards an understanding of resolvin and protectin formation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* *97*, 73–82.
- Williams, C.D., Whitley, B.M., Hoyo, C., Grant, D.J., Iraggi, J.D., Newman, K.A., Gerber, L., Taylor, L.A., McKeever, M.G., and Freedland, S.J. (2011). A high ratio of dietary n-6/n-3 polyunsaturated fatty acids is associated with increased risk of prostate cancer. *Nutr. Res. N. Y. N* *31*, 1–8.
- Williams-Bey, Y., Boularan, C., Vural, A., Huang, N.-N., Hwang, I.-Y., Shan-Shi, C., and Kehrl, J.H. (2014). Omega-3 Free Fatty Acids Suppress Macrophage Inflammasome Activation by Inhibiting NF- κ B Activation and Enhancing Autophagy. *PLOS ONE* *9*, e97957.
- Wilson, P.M., Danenberg, P.V., Johnston, P.G., Lenz, H.-J., and Ladner, R.D. (2014). Standing the test of time: targeting thymidylate biosynthesis in cancer therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* *11*, 282–298.
- Witsch, E., Sela, M., and Yarden, Y. (2010). Roles for Growth Factors in Cancer Progression. *Physiol. Bethesda Md* *25*, 85–101.
- Wright, W.E., Pereira-Smith, O.M., and Shay, J.W. (1989). Reversible cellular senescence: implications for immortalization of normal human diploid fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* *9*, 3088–3092.
- Wu, L., Deng, Z., Peng, Y., Han, L., Liu, J., Wang, L., Li, B., Zhao, J., Jiao, S., and Wei, H. (2017). Ascites-derived IL-6 and IL-10 synergistically expand CD14+HLA-DR-/low myeloid-derived suppressor cells in ovarian cancer patients. *Oncotarget* *8*, 76843–76856.

- Wu, S., Feng, B., Li, K., Zhu, X., Liang, S., Liu, X., Han, S., Wang, B., Wu, K., Miao, D., et al. (2012). Fish consumption and colorectal cancer risk in humans: a systematic review and meta-analysis. *Am. J. Med.* *125*, 551-559.e5.
- Wu, Z.-Q., Han, X.-D., Wang, Y., Yuan, K.-L., Jin, Z.-M., Di, J.-Z., Yan, J., Pan, Y., Zhang, P., Huang, X.-Y., et al. (2011). Interleukin-1 receptor antagonist reduced apoptosis and attenuated intestinal mucositis in a 5-fluorouracil chemotherapy model in mice. *Cancer Chemother. Pharmacol.* *68*, 87–96.
- Wulffraat, N.M., and Woo, P. (2013). Canakinumab in pediatric rheumatic diseases. *Expert Opin. Biol. Ther.* *13*, 615–622.
- Wynter, M.P., Russell, S.T., and Tisdale, M.J. (2004). Effect of n-3 fatty acids on the antitumour effects of cytotoxic drugs. *Vivo Athens Greece* *18*, 543–547.
- Xie, H., and Chang, Y. (2016). Omega-3 polyunsaturated fatty acids in the prevention of postoperative complications in colorectal cancer: a meta-analysis. *OncoTargets Ther.* *9*, 7435–7443.
- Xiu, B., Lin, Y., Grote, D.M., Ziesmer, S.C., Gustafson, M.P., Maas, M.L., Zhang, Z., Dietz, A.B., Porrata, L.F., Novak, A.J., et al. (2015). IL-10 induces the development of immunosuppressive CD14⁺HLA-DR^{low/-} monocytes in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood Cancer J.* *5*, e328.
- Yamasaki, S., Matsumoto, M., Takeuchi, O., Matsuzawa, T., Ishikawa, E., Sakuma, M., Tateno, H., Uno, J., Hirabayashi, J., Mikami, Y., et al. (2009). C-type lectin Mincle is an activating receptor for pathogenic fungus, *Malassezia*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 1897–1902.
- Yan, Y., Jiang, W., Spinetti, T., Tardivel, A., Castillo, R., Bourquin, C., Guarda, G., Tian, Z., Tschopp, J., and Zhou, R. (2013). Omega-3 fatty acids prevent inflammation and metabolic disorder through inhibition of NLRP3 inflammasome activation. *Immunity* *38*, 1154–1163.
- Yan, Y., Jiang, W., Liu, L., Wang, X., Ding, C., Tian, Z., and Zhou, R. (2015). Dopamine controls systemic inflammation through inhibition of NLRP3 inflammasome. *Cell* *160*, 62–73.
- Yang, B., Ren, X.-L., Fu, Y.-Q., Gao, J.-L., and Li, D. (2014). Ratio of n-3/n-6 PUFAs and risk of breast cancer: a meta-analysis of 274135 adult females from 11 independent prospective studies. *BMC Cancer* *14*, 105.

- Yang, F., Hu, M., Lei, Q., Xia, Y., Zhu, Y., Song, X., Li, Y., Jie, H., Liu, C., Xiong, Y., et al. (2015). Nifuroxazide induces apoptosis and impairs pulmonary metastasis in breast cancer model. *Cell Death Dis.* *6*, e1701.
- Yang, L., DeBusk, L.M., Fukuda, K., Fingleton, B., Green-Jarvis, B., Shyr, Y., Matrisian, L.M., Carbone, D.P., and Lin, P.C. (2004). Expansion of myeloid immune suppressor Gr⁺CD11b⁺ cells in tumor-bearing host directly promotes tumor angiogenesis. *Cancer Cell* *6*, 409–421.
- Yao, L., Han, C., Song, K., Zhang, J., Lim, K., and Wu, T. (2015). Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Upregulate 15-PGDH Expression in Cholangiocarcinoma Cells by Inhibiting miR-26a/b Expression. *Cancer Res.*
- Yates, C.M., Calder, P.C., and Ed Rainger, G. (2014). Pharmacology and therapeutics of omega-3 polyunsaturated fatty acids in chronic inflammatory disease. *Pharmacol. Ther.* *141*, 272–282.
- Yazdi, A.S., Guarda, G., Riteau, N., Drexler, S.K., Tardivel, A., Couillin, I., and Tschopp, J. (2010). Nanoparticles activate the NLR pyrin domain containing 3 (Nlrp3) inflammasome and cause pulmonary inflammation through release of IL-1 α and IL-1 β . *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 19449–19454.
- Ye, T., Xiong, Y., Yan, Y., Xia, Y., Song, X., Liu, L., Li, D., Wang, N., Zhang, L., Zhu, Y., et al. (2014). The anthelmintic drug niclosamide induces apoptosis, impairs metastasis and reduces immunosuppressive cells in breast cancer model. *PLoS One* *9*, e85887.
- Yessoufou, A., Plé, A., Moutairou, K., Hichami, A., and Khan, N.A. (2009). Docosahexaenoic acid reduces suppressive and migratory functions of CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cells. *J. Lipid Res.* *50*, 2377–2388.
- Youn, J.-I., Collazo, M., Shalova, I.N., Biswas, S.K., and Gabrilovich, D.I. (2012). Characterization of the nature of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J. Leukoc. Biol.* *91*, 167–181.
- Youn, J.-I., Kumar, V., Collazo, M., Nefedova, Y., Condamine, T., Cheng, P., Villagra, A., Antonia, S., McCaffrey, J.C., Fishman, M., et al. (2013). Epigenetic silencing of retinoblastoma gene regulates pathologic differentiation of myeloid cells in cancer. *Nat. Immunol.* *14*, 211–220.

- Young, M.R., Newby, M., and Wepsic, H.T. (1987). Hematopoiesis and Suppressor Bone Marrow Cells in Mice Bearing Large Metastatic Lewis Lung Carcinoma Tumors. *Cancer Res.* *47*, 100–105.
- Young, M.R., Wright, M.A., Matthews, J.P., Malik, I., and Prechel, M. (1996). Suppression of T cell proliferation by tumor-induced granulocyte-macrophage progenitor cells producing transforming growth factor-beta and nitric oxide. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *156*, 1916–1922.
- Yu, J., Du, W., Yan, F., Wang, Y., Li, H., Cao, S., Yu, W., Shen, C., Liu, J., and Ren, X. (2013). Myeloid-derived suppressor cells suppress antitumor immune responses through IDO expression and correlate with lymph node metastasis in patients with breast cancer. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *190*, 3783–3797.
- Yuzyuk, T., Lozier, B., Schwarz, E.L., Viau, K., Kish-Trier, E., and De Biase, I. (2018). Intra-individual variability of long-chain fatty acids (C12-C24) in plasma and red blood cells. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* *135*, 30–38.
- Zaki, M.H., Boyd, K.L., Vogel, P., Kastan, M.B., Lamkanfi, M., and Kanneganti, T.-D. (2010a). The NLRP3 inflammasome protects against loss of epithelial integrity and mortality during experimental colitis. *Immunity* *32*, 379–391.
- Zaki, M.H., Vogel, P., Body-Malapel, M., Lamkanfi, M., and Kanneganti, T.-D. (2010b). IL-18 Production Downstream of the Nlrp3 Inflammasome Confers Protection against Colorectal Tumor Formation. *J. Immunol.* *185*, 4912–4920.
- Zand, H., Rahimipour, A., Salimi, S., and Shafiee, S.M. (2008). Docosahexaenoic acid sensitizes Ramos cells to Gamma-irradiation-induced apoptosis through involvement of PPAR-gamma activation and NF-kappaB suppression. *Mol. Cell. Biochem.* *317*, 113–120.
- Zanoni, I., Tan, Y., Di Gioia, M., Broggi, A., Ruan, J., Shi, J., Donado, C.A., Shao, F., Wu, H., Springstead, J.R., et al. (2016). An endogenous caspase-11 ligand elicits interleukin-1 release from living dendritic cells. *Science* *352*, 1232–1236.
- Zea, A.H., Rodriguez, P.C., Atkins, M.B., Hernandez, C., Signoretti, S., Zabaleta, J., McDermott, D., Quiceno, D., Youmans, A., O'Neill, A., et al. (2005). Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion. *Cancer Res.* *65*, 3044–3048.

- Zhang, F., and Du, G. (2012). Dysregulated lipid metabolism in cancer. *World J. Biol. Chem.* 3, 167–174.
- Zhang, K., Hu, Z., Qi, H., Shi, Z., Chang, Y., Yao, Q., Cui, H., Zheng, L., Han, Y., Han, X., et al. (2016a). G-protein-coupled receptors mediate ω -3 PUFAs-inhibited colorectal cancer by activating the Hippo pathway. *Oncotarget* 7, 58315–58330.
- Zhang, S., Zhong, M., Wang, C., Xu, Y., Gao, W.-Q., and Zhang, Y. (2018). CCL5-deficiency enhances intratumoral infiltration of CD8 + T cells in colorectal cancer. *Cell Death Dis.* 9, 766.
- Zhang, X., Chen, Y., Hao, L., Hou, A., Chen, X., Li, Y., Wang, R., Luo, P., Ruan, Z., Ou, J., et al. (2016b). Macrophages induce resistance to 5-fluorouracil chemotherapy in colorectal cancer through the release of putrescine. *Cancer Lett.* 381, 305–313.
- Zhang, Y., Talmon, G., and Wang, J. (2016c). MicroRNA-587 antagonizes 5-FU-induced apoptosis and confers drug resistance by regulating PPP2R1B expression in colorectal cancer. *Cell Death Dis.* 7, e2525.
- Zhao, X., Rong, L., Zhao, X., Li, X., Liu, X., Deng, J., Wu, H., Xu, X., Erben, U., Wu, P., et al. (2012). TNF signaling drives myeloid-derived suppressor cell accumulation. *J. Clin. Invest.* 122, 4094–4104.
- Zheng, J.-S., Hu, X.-J., Zhao, Y.-M., Yang, J., and Li, D. (2013). Intake of fish and marine n-3 polyunsaturated fatty acids and risk of breast cancer: meta-analysis of data from 21 independent prospective cohort studies. *BMJ* 346, f3706.
- Zhong, Z., Liang, S., Sanchez-Lopez, E., He, F., Shalpour, S., Lin, X., Wong, J., Ding, S., Seki, E., Schnabl, B., et al. (2018). New mitochondrial DNA synthesis enables NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 560, 198–203.
- Zhou, R., Yazdi, A.S., Menu, P., and Tschopp, J. (2011). A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 469, 221–225.
- Zhou, W., Han, W.F., Landree, L.E., Thupari, J.N., Pinn, M.L., Bililign, T., Kim, E.K., Vadlamudi, A., Medghalchi, S.M., El Meskini, R., et al. (2007). Fatty acid synthase inhibition activates AMP-activated protein kinase in SKOV3 human ovarian cancer cells. *Cancer Res.* 67, 2964–2971.
- Zhu, Y., Zhu, M., and Lance, P. (2012). IL1 β -mediated Stromal COX-2 signaling mediates proliferation and invasiveness of colonic epithelial cancer cells. *Exp. Cell Res.* 318, 2520–2530.

Zitvogel, L., Galluzzi, L., Smyth, M.J., and Kroemer, G. (2013). Mechanism of Action of Conventional and Targeted Anticancer Therapies: Reinstating Immunosurveillance. *Immunity* 39, 74–88.

Zou, S., Meng, X., Meng, Y., Liu, J., Liu, B., Zhang, S., Ding, W., Wu, J., and Zhou, J. (2015). Microarray analysis of anti-cancer effects of docosahexaenoic acid on human colon cancer model in nude mice. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 8, 5075–5084.

Annexes

Annexe 1

Tableau 15 Liste des AG nommés (famille, formule et abréviation)

Famille	Nom	Formule	Abréviation
AGS	Acide palmitique	C16:0	
	Acide stéarique	C18:0	
AGMI	Acide palmitoléique	C16:1 n-7	
	Acide oléique	C18:1 n-9	OA
AGPI n-6	Acide linoléique	C18:2 n-6	LA
	Acide γ -linoléique	C18:3 n-6	GLA
	Acide dihomogamma-linoléique	C20:3 n-6	DGLA
	Acide arachidonique	C20:4 n-6	AA
AGPI n-3	Acide α -linoléique	C16:3 n-3	ALA
	Acide hexadecatetraénoïque	C16:4 n-3	HDTA
	Acide stéaridonique	C18:4 n-3	SDA
	Acide eicosatétraénoïque	C20:4 n-3	
	Acide eicosapentaénoïque	C20:5 n-3	EPA
	Acide docosapentaénoïque	C22:5 n-3	DPA
	Acide docosahéxaénoïque	C22:6 n-3	DHA
	Acide tétracosapentaénoïque	C24:5 n-3	

Annexe 2

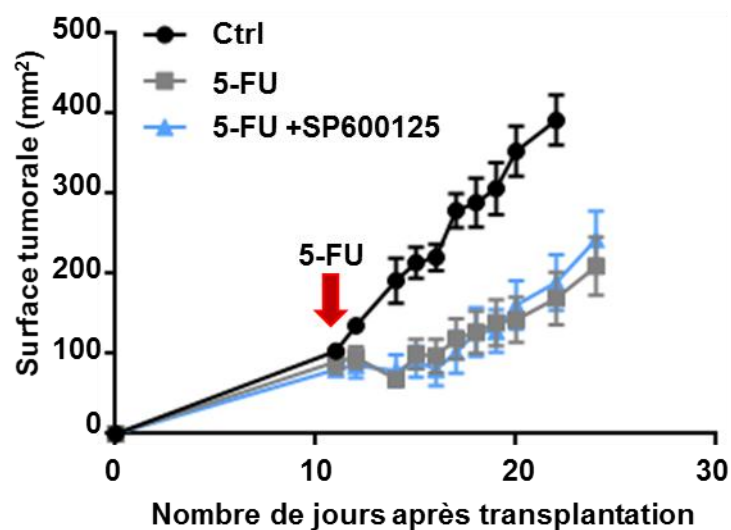


Figure 24 Croissance tumorale 5-FU+SP600125

Des souris C57Bl6 porteuses de tumeur EL4 ont été injectées avec le véhicule « Ctrl », « 5-FU » ou « 5-FU+SP600125 ». L'injection de 5-FU (50mg/kg) est réalisée au jour 12. Les injections de SP600125 (15mg/kg) sont réalisées à T0 (à partir de l'injection 5-FU), 12h, 24h, 36h, 48h puis une fois par jour. La croissance tumorale est exprimée par la surface de la tumeur (mm²) en fonction du temps (jour).

Annexe 3 :

Liste des publications et présentations issues des travaux de thèse

Publications:

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

Fluckiger A, Dumont A, Derangère V, Rébé C, De Rosny C, Causse S, Thomas C, Apetoh L, Hichami A, Ghiringhelli F, Rialland M. *Oncogene* 2016 Sep 1;35(35):4611-22

Phenolic Extract from Oleaster (*Olea europaea* var. *Sylvestris*) Leaves Reduces Colon Cancer Growth and Induces Caspase-dependent Apoptosis in Colon Cancer Cells via the Mitochondrial Apoptotic Pathway.

Zerious W, Nani A, Belarbi M, Dumont A, de Rosny C, Aboura I, Ghanemi F, Murtaza B, Patoli D, Thomas C, Apetoh L, Rébé C, Delmas D, Khan N, Ghiringhelli F, Rialland M, Hichami A. *PLoS One*. 2017 Apr 20;12(4):e0176574

Carob leaf polyphenols trigger intrinsic apoptotic pathway and induce cell cycle arrest in colon cancer cells.

Ghanemi F, Belarbi M, Fluckiger A, Nani A, **Dumont A**, De Rosny C, Aboura I, Khan A, Murtaza B, Benammar C, Lahfa B, Patoli D, Delmas D, Rébé C, Apétoh L, Khan N, Ghiringhelli F, Rialland M, Hichami A; Journal of Functional Foods. Volume 33, June 2017, Pages 112-121

Protective effects of polyphenol-rich infusions from carob (*Ceratonia siliqua*) leaves and cladodes of *Opuntia ficus-indica* against inflammation associated with diet-induced obesity and DSS-induced colitis in Swiss mice.

Aboura I, Nani A, Belarbi M, Murtaza B, Fluckiger A, **Dumont A**, Benammar C, Tounsi MS, Ghiringhelli F, Rialland M, Khan NA, Hichami A. Biomed Pharmacother. 2017 Dec 6. pii: S0753-3322(17)33735-6. doi: 10.1016/j.biopha.2017.11.125.

Nlrp3 Gene Expression in Circulating Leukocytes Declines During Healthy Aging.

Connat JL, **Dumont A**, Rialland M, Faivre B, Sorci G. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2018, Vol. 00, No. 00, 1–5

Présentations:

○ Communications affichées :

Rôle de PPARgamma dans la régulation des cellules myéloïdes immunosuppressives dans un contexte tumoral.

Dumont A., De Rosny C., Fluckiger A., Ghiringhelli F., Rialland M. *Communication affichée, Forum des Jeunes Chercheurs 2015, Dijon*

Could Omega-3 fatty acids overcome chemotherapy resistance?

Dumont A., De Rosny C., Ghiringhelli F., Rialland M. *Communication affichée, Forum des Jeunes Chercheurs 2017, Dijon*

○ Communication orale :

Docosahexaenoic acid controls 5-Fluorouracil-mediated NLRP3 inflammasome activation in myeloid-derived suppressor cells.

Adélie Dumont, Charlotte de Rosny, Hélène Berger, Aurélie Fluckiger, Jean-Paul Pais de Barros, Cédric Rébé, Charles Thomas, François Ghiringhelli and Mickaël Rialland. **13th Congress Of The International Society For The Study Of Fatty Acids And Lipids (ISSFAL) 27-31 May 2018, Las Vegas, Etats-Unis.**

L'action ambivalente de l'agent anti-cancéreux 5-Fluorouracil sur les cellules myéloïdes immunosuppressives sous contrôle de l'acide docosahéxaénoïque : Rôle de l'inflammasome NLRP3 et de la voie JNK dans la sécrétion de l'IL-1 β .

Mots clefs : DHA, 5-FU, MDSC, NLRP3, IL-1 β , JNK

Selon une étude précédente, une limitation à l'efficacité anticancéreuse du 5-Fluorouracile (5-FU) repose sur la sécrétion d'IL-1 β par des cellules myéloïdes immunosuppressives (MDSC). La libération d'IL-1 β mature provient de l'activation de NLRP3 induite par le 5-FU et de l'augmentation de l'activité de la caspase-1 dans les MDSC, qui favorise la reprise de la croissance tumorale chez des souris traitées avec 5-FU. L'acide docosahéxaénoïque (DHA) appartient à la famille des acides gras oméga-3 et possède des propriétés anticancéreuses et anti-inflammatoires qui pourraient améliorer la chimiothérapie à base de 5-FU. Dans ces travaux, nous démontrons que le DHA inhibe la sécrétion d'IL-1 β induite par le 5-FU dans une lignée cellulaire de MDSC (MSC-2). Chez des souris porteuses de tumeurs traitées par 5-FU, nous avons montré qu'un régime alimentaire enrichi en DHA réduit la concentration d'IL-1 β circulante et la récurrence tumorale après une injection de 5-FU. Le traitement par 5-FU conduit à l'activation de JNK dans les MDSC et l'inhibiteur de JNK SP600125 diminue la sécrétion d'IL-1 β . De plus, le DHA est capable de contrecarrer l'activation de JNK induite par 5-FU dans les MDSC, entraînant la chute de la libération de l'IL-1 β . De plus, nous avons montré que la supplémentation en DHA dans les MDSC exposées au 5-FU diminuait l'activité de la caspase-1 ainsi que la modification des interactions entre NLRP3 et la caspase-1, ASC ou β -arrestine-2. De manière inattendue, la régulation de l'activité de la caspase-1 par le DHA était indépendante de JNK, ce qui suggère que le DHA pourrait contrôler la sécrétion de l'IL-1 β par le biais de l'inflammasome NLRP3 et de la voie JNK. Enfin, nous avons trouvé une corrélation négative entre la teneur en DHA dans le plasma et l'induction du niveau d'IL-1 β ou de la caspase-1 dans le sang de patients traités par chimiothérapie à base de 5-FU.

L'ensemble de ces données fournissent de nouvelles informations sur la régulation de la sécrétion de l'IL-1 β par le DHA et son bénéfice potentiel dans la chimiothérapie à base de 5-FU.

The ambivalent action of the anti-cancer agent 5-Fluorouracil on myeloid derived suppressor cells under the control of docosahexaenoic acid: Role of the NLRP3 inflammasome and the JNK pathway in IL-1 β secretion

Keywords: DHA, 5-FU, MDSC, NLRP3, IL-1 β , JNK

A limitation to 5-Fluorouracil (5-FU) anti-cancer efficacy relies on the secretion of IL-1 β by myeloid-derived suppressor cells (MDSC) according to a previous pre-clinical report. The release of mature IL-1 β originates from 5-FU-mediated NLRP3 activation with increased caspase-1 activity in MDSC and sustains tumor growth recovery in 5-FU-treated mice. Docosahexaenoic acid (DHA) belongs to omega-3 fatty acid family and harbors both anti-cancer and anti-inflammatory properties which might could improve 5-FU chemotherapy. Here, we demonstrate that DHA inhibits 5-FU-induced IL-1 β secretion produced by a MDSC cell line (MSC-2). In tumor-bearing mice treated with 5-FU, we showed that a DHA-enriched diet reduces circulating IL-1 β concentration and tumor recurrence after 5-FU injection. 5-FU treatment led to JNK activation in MDSC and JNK inhibitor SP600125 decreased IL-1 β secretion. Moreover, DHA was able to counteract 5-FU-mediated JNK activation in MDSC leading to the drop of IL-1 β release. In addition, we showed that DHA supplementation in 5-FU-exposed MDSC decreases caspase-1 activity along with a modification of the interactions between NLRP3 and caspase-1, ASC or β -arrestin-2. Unexpectedly, the regulation of caspase-1 activity by DHA was independent of JNK which suggests that DHA could control IL-1 β secretion through both NLRP3 inflammasome and JNK pathway. Interestingly, we found a negative correlation between DHA content in plasma and the induction of circulating IL-1 β level or caspase-1 activity in patients treated with 5-FU-based chemotherapy.

Together, these data provide new insights on the regulation of IL-1 β secretion by DHA and its potential benefit in 5-FU-based chemotherapy.