



HAL
open science

Radiosensibilisation des tumeurs digestives par des molécules bioactives de l'alimentation

Samuel Amintas

► **To cite this version:**

Samuel Amintas. Radiosensibilisation des tumeurs digestives par des molécules bioactives de l'alimentation. Biologie cellulaire. Université de Bordeaux, 2022. Français. NNT : 2022BORD0198 . tel-03917540

HAL Id: tel-03917540

<https://theses.hal.science/tel-03917540>

Submitted on 2 Jan 2023

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

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

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

École doctorale Sciences de la Vie et de la Santé
Biologie Cellulaire et Physiopathologie

Par Samuel Amintas

**Radiosensibilisation des tumeurs digestives par des
molécules bioactives de l'alimentation**

Sous la direction de : Sandrine Dabernat

Soutenue le jeudi 23 Juin 2022

Membres du Jury :

Mme JAVERZAT, Sophie	PR	Université de Bordeaux	Présidente
Mme CARRIER, Alice	DR	Université d'Aix-Marseille	Rapporteur
Mr DELMAS, Dominique	PR	Université de Bourgogne	Rapporteur
Mr ROSSIGNOL, Rodrigue	DR	Université de Bordeaux	Examineur
Mr SUPIOT, Stéphane	PUPH	Université de Nantes	Examineur
Mme DABERNAT, Sandrine	PUPH	Université de Bordeaux	Directrice

Liste des abréviations

5-FU : 5-fluoro-uracile

AMP : Adénosine monophosphate

AMPK : Protéine kinase activée par l'AMP

ATC : Aspartate carbamoyltransférase

BFC : Bioactive Food Component / Molécule bioactive issue de l'alimentation

CA19-9 : Antigène carcinoembryonnaire 19-9

CART : Chimeric Antigen Receptor Modified T Cells

CIMP : CpG island methylator phenotype

CPS : Carbamoyl phosphate synthétase

CPS1 : Carbamoyl phosphate synthase 1

CRC : Cancer colorectal

CTPS : CTP synthase

DHO : Dihydroorotate

DHODH : Dihydroorotate déshydrogénase

DL50 : Dose létale 50

DMEM : Dulbecco's Modified Eagles Medium

EGFR : Récepteur du facteur de croissance épidermique

EMT : Transition épithélio-mésenchymateuse

FAP : Polypose adénomateuse familiale

GM-CSF : Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor

GVAX : Cellules pancréatiques allogéniques sécrétantes de GM-CSF

HNF1 α : Facteur hépatique nucléaire 1 alpha

HNPCC : Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer / Cancer colorectal héréditaire sans polypose

HR : Hazard Ratio

IC : Intervalle de confiance

IC50 : Concentration inhibitrice 50

IP : Intra-péritonéal

JPS : Juvenile polyposis syndrome / Syndrome de polypose juvénile

LAM : leucémie aiguë myéloïde

LKB1 : Liver Kinase B1

LLC : Leucémie lymphoïde chronique

MAPK : Mitogen-activated protein kinases

MMR : MisMatch Repair

MSI : Microsatellite instability / instabilité microsatellitaire
MSS : Microsatellite stability / stabilité microsatellitaire
NFS : Numération formule sanguine
NHEJ : Non homologous End Joining
NMPI : Néoplasmes mucineux papillaires intraductaux
NSCLC : Cancer du poumon non à petites cellules
PanIN : Néoplasies intraépithéliales pancréatiques
PARPi : Inhibiteur de PARP
PDAC : Pancreatic ductal adenocarcinoma / adénocarcinome canalaire du pancréas
PDX : Xénogreffes dérivées de patients
PFA : Paraformaldéhyde
PFAS : Phosphoribosyl formylglycinamide synthase
PIK3 : Phosphatidylinositol-3-kinase
PKC : Protéine kinase C
PKM2 : Pyruvate kinase musculaire 2
PRPP : Phosphoribosylpyrophosphate
R5P : Ribose-5-phosphate
RE : Réticulum endoplasmique
RI : Rayonnement ionisant
ROS : Espèces réactives de l'oxygène
RPIA : Ribose 5'-phosphate isomérase A
RPMI : Roswell Park Memorial Institute medium
S6K1 : S6 kinase 1
SCNA : somatic copy number alteration / Altération somatique du nombre de copies
SEP : Sclérose en plaques
SHH : Sonic HedgeHog
STK11 : Serine thréonine kinase 11
SVF : Sérum de veau foetal
UDP-GlcA : UDP-acide glucuronique
UGT : UDP-glucuronosyltransférase
UMP : Uridine monophosphate
UMPS : Uridine monophosphate synthase

Table des matières

Objectifs de la thèse.....	9
I - Introduction	11
I – A Le cancer colorectal	11
I – A - 1 Épidémiologie	11
I – A - 2 Caractéristiques biologiques.....	14
a – Origine et développement	14
b – Profil mutationnel	16
c – Instabilité microsatellitaire.....	18
d – Classification moléculaire.....	19
I – A - 3 Diagnostic	21
a - Présentation clinique	21
b - Endoscopie.....	21
c- Imagerie	21
d – Analyses pathologiques.....	22
e – Analyses biologiques	22
I – A - 4 Prise en charge et traitements	23
a - Traitement endoscopique	23
b - Chirurgie.....	23
c - Radiothérapie pour les cancers du rectum	24
d – Traitements systémiques	25
I – B L’adénocarcinome canalaire du pancréas	27
I – B - 1 Épidémiologie	27
I – B - 2 Caractéristiques biologiques.....	30
a – Origine et développement	30
b – Classifications moléculaires	32
I – B - 3 Diagnostic.....	33
a - Présentation clinique	33
b - Imagerie	33
c - Analyses biologiques	34
d - Stadification	34
I – B - 4 Prise en charge et traitements.....	37
a - Tumeurs résécables d’emblée ou borderline	37
b- Tumeurs localement avancées	38
c – Maladie métastatique	39

d – Nouvelles pistes thérapeutiques / thérapies ciblées	40
I – C Les substances bioactives issues de l'alimentation (BFCs) et leur intérêt en cancérologie digestive .	43
I - c - 1 BFCs et cancer colorectal : Article de revue	43
I - c - 2 BFCs et cancer du pancréas.....	59
a - Etudes <i>in vitro</i>	59
b - Etudes précliniques.....	61
c - Protocoles cliniques	62
I - C - 3 Radiosensibilisation des cancers pancréatiques et colorectaux par l'utilisation de BFCs	63
a - Bases physico-chimiques et biologiques de la radiothérapie	63
a – 1 Effets des rayonnements ionisants au niveau moléculaire	63
a – 2 Prise en charge et réparations des dommages à l'ADN.....	66
a – 3 Effets des rayonnements ionisants au niveau cellulaire.....	69
II Résultats :	72
II – 1 Radiosensibilisation de l'adénocarcinome pancréatique canalaire par les BFCs : Article original	72
II – 2 Radiosensibilisation du cancer du rectum par les BFCs : Etude en cours.....	83
II – 2 - A Introduction	83
II – 2 - B Matériels et Méthodes	84
II – 2 - B – 1 Matériels	84
a - Lignées cellulaires.....	84
b – Molécules bioactives	84
II – 2 - B – 2 Méthodes	84
a – Culture cellulaire.....	84
b - Irradiations	85
c - Test de cytotoxicité	85
d – Analyse du cycle cellulaire.....	85
e – Analyse de l'apoptose	86
f – Modèle murin préclinique avec xénogreffe sous-cutanée.....	86
g – Modèle murin préclinique avec xénogreffe orthotopique	87
h – Analyses statistiques	87
II – 2 - C Résultats & Discussion	88
II – 2 – C – 1 Cytotoxicité des traitements seuls	88
II – 2 – C – 2 Cytotoxicité des traitements combinés	90
a – Traitement combiné des BFCs	90
b – Cytotoxicité comparée des traitements entre cellules tumorales et non-tumorales	91
c – Radiosensibilisation par le 5-FU et les BFCs.....	92
II – 2 – C – 3 Effet des combinaisons de traitement sur le cycle cellulaire des cellules tumorales....	94

II – 2 – C – 4 Effet des combinaisons de traitement sur l’apoptose des cellules tumorales	96
II – 2 – C – 5 Etude comparée de la radiosensibilisation par le 5-fluorouracil et par les BFCs sur un modèle murin xénogreffé	97
II – 2 – C – 6 Développement d’un modèle murin orthotopique de cancer du rectum	102
II – 2 – D Conclusion intermédiaire.....	103
II – 3 Effet différentiel du resvératrol sur les cellules colorectales tumorales et non-tumorales et impact sur le métabolisme nucléotidique.	104
II – 3 – A Les UDP-glycosyltransférases.....	105
II – 3 – A – 1 Classification, structure et fonction.....	105
II – 3 – A – 2 Régulation de l’expression des UGT et distribution tissulaire	108
II – 3 – A – 3 Rôles physiologiques	113
II – 3 – A – 4 UGT et métabolisation du resvératrol.....	113
II – 3 – B impact du resvératrol sur le métabolisme nucléotidique tumoral	114
II – 3 – C Etude de l’effet différentiel du resvératrol sur les cellules colorectales tumorales et non-tumorales : Article original	118
II – 3 – D Discussion	155
III – Discussion et Perspectives générales	160
IV – Bibliographie	165

Table des Figures

Figure 1 : Taux d'incidence et de mortalité standardisés du cancer colorectal pour les 2 sexes en 2020, par 100 000 individus.	12
Figure 2 : Principaux facteurs de risques associés au cancer colorectal.....	14
Figure 3 : Modèle classique "adénome-carcinome-métastase" de développement du cancer colorectal.....	16
Figure 4 : Classification CMS et corrélation phénotypique.....	20
Figure 5 : Classes de médicaments utilisés chez les patients atteints de cancer colorectal métastatique.	26
Figure 6 : Incidence mondiale du cancer du pancréas.....	27
Figure 7 : Séquence oncogénique de l'adénocarcinome canalaire pancréatique – Modèle PanIN.	30
Figure 8 : Les 3 phases de la réaction de radiolyse de l'eau par les rayonnements ionisants. 65	
Figure 9 : Les différents types de dommages à l'ADN générés par les rayonnements ionisants.	66
Figure 10 : Les voies de réparation des cassures double-brin de l'ADN.....	68
Figure 11 : Cytotoxicité dose-réponse à 72h de la radiothérapie et des différents agents radiosensibilisants sur les lignées cellulaires colorectales HCT116, SW480, HT29 et NCM460.	89
Figure 12 : Effets cytotoxique du resvératrol et de la capsaïcine seuls ou en combinaison sur les lignées colorectales tumorales HCT116 et HT29.	90
Figure 13 : Cytotoxicité du 5-fluoro-uracile, du resvératrol seul ou en combinaison avec la capsaïcine sur les lignées colorectales HCT116 et NCM460.	91
Figure 14 : Effets radiosensibilisants comparés du 5-fluoro-uracile et du resvératrol seul ou en combinaison avec la capsaïcine sur les lignées colorectales HCT116, SW480, HT29 et NCM460.	93
Figure 15 : Impact sur le cycle cellulaire à 72h des traitements de radiothérapie associés ou non au 5-fluoro-uracile, au resvératrol seul ou à la combinaison resvératrol/capsaïcine sur la lignée HCT116.....	95

Figure 16 : Cinétique de l'effet pro-apoptotique des traitements de radiothérapie associés ou non au 5-fluoro-uracile, au resvératrol seul ou à la combinaison resvératrol/capsaïcine sur la lignée HCT116.....	96
Figure 17 : Stratégie expérimentale pour l'évaluation de l'effet radiosensibilisant des BFCs in-vivo.	98
Figure 18 : Effets radiosensibilisants in-vivo comparés du 5-fluoro-uracile et du resvératrol seul ou en combinaison avec la capsaïcine.	99
Figure 19 : Tolérance des animaux aux différents traitements.	101
Figure 20 : Suivi par bioluminescence de la croissance tumorale de greffes orthotopique de cellules colorectales tumorales HCT116 à J13 post greffe.....	102
Figure 21 : Dendrogramme décrivant les relations entre les séquences d'acides aminés primaires de toutes les UDP-glycosyltransférases (UGT) humaines.....	105
Figure 22 : Réaction de conjugaison catalysée par les UDP-glucuronosyltransférases (UGT).	106
Figure 23 : Modèle topologique hypothétique des UGT humaines.....	107
Figure 24 : Structures des gènes codants les enzymes UGT1 et de UGT2 humaines.	109
Figure 25 : Distribution tissulaire des différentes isoformes d'UGT au niveau digestif.	111
Figure 26 : Régulation de la synthèse des nucléotides par les oncogènes et les suppresseurs de tumeurs et impact potentiel du resvératrol.	116

Table des tableaux

Tableau 1 : Oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs les plus fréquemment mutés dans le cancer du pancréas.....	31
Tableau 2 : Classification TNM selon l’American Joint Committee on Cancer (AJCC).	35
Tableau 3 : Résectabilité des adénocarcinomes canaux pancréatiques selon la classification NCCN 2018.	36
Tableau 4: Etudes cliniques évaluant l’intérêt de traitements incluant une approche immunitaire pour la prise en charge du cancer du pancréas.	41

Objectifs de la thèse

L'incidence des cancers est en constante augmentation depuis de nombreuses années au niveau international [1]. Cette évolution est liée à l'augmentation et au vieillissement de la population ainsi qu'au développement des capacités de diagnostic et de dépistage, mais elle résulte également d'expositions accrues à des facteurs de risques comportementaux ou environnementaux. Parmi eux, la nutrition est maintenant largement reconnue comme un facteur influençant le risque oncogénique [2]. La consommation importante de viande est par exemple un facteur de risque avéré de développer un cancer [3]. Au contraire, une alimentation riche en fruits et légumes associée à une activité physique régulière constitue un facteur protecteur [4]. Dans ce contexte, le domaine d'étude des nutriments bioactifs de l'alimentation (BFCs, Bioactive Food Components) qui pourraient exercer un effet préventif ou thérapeutique vis-à-vis des cancers est en plein essor depuis plus d'une quinzaine d'années. Ces molécules sont nombreuses (de l'ordre de 25000) et plusieurs d'entre elles ont montré des actions anti-inflammatoires, antioxydantes et antiprolifératives, laissant espérer des applications potentielles pour la prévention ou le traitement des cancers [2].

Les objectifs de ce travail de thèse sont doubles. Une première partie a visé à explorer le potentiel radiosensibilisant de BFCs et d'identifier les mécanismes directement ou indirectement impliqués, dans des modèles de tumeurs pancréatique et colorectale. Basé sur des résultats obtenus par l'équipe montrant une chimiosensibilisation par des BFCs d'un modèle de tumeur du pancréas, un premier travail a évalué l'action combinée de BFCs pour la radiosensibilisation de l'adénocarcinome pancréatique. En effet, les BFCs étant capables d'induire la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) au sein des cellules tumorales, leur association aux radiations ionisantes pouvaient amplifier les dégâts générés et ainsi augmenter l'efficacité du traitement. Ce premier travail s'inscrivait dans le projet de thèse de la Professeure Véronique Vendrely et a donné lieu à la publication d'un article dont je suis deuxième auteur. La radiothérapie faisant partie de la prise en charge courante des cancers colorectaux, nous avons étendu cette approche à un modèle de tumeur colorectale. La phase *in vitro* de ce projet ainsi qu'une première phase d'expérimentation concluante sur un modèle

murin de xéno greffes sous-cutanées sont terminées. Une seconde phase d'expérimentation *in vivo* est en cours et met cette fois en jeu un modèle de greffe rectale orthotopique. Ce travail devrait faire prochainement l'objet d'une publication. En outre, nous avons rédigé un article de revue de la littérature, que je signe en 1^{er} auteur, qui montre la pertinence d'une application de la stratégie BFC dans les tumeurs colorectales.

La seconde partie de ce projet a visé à comprendre l'effet différentiel des BFCs qui atteignent les cellules tumorales et épargnent les cellules saines. L'équipe travaille depuis plusieurs années sur l'intérêt des BFCs en cancérologie et notamment du resvératrol, un polyphénol naturellement présent dans la vigne et le raisin. De manière intéressante, l'action cytotoxique du resvératrol était constamment supérieure sur les cellules tumorales en comparaison de cellules non-tumorales du même tissu, et cela quel que soit le modèle tumoral testé. Nous avons exploré diverses fonctions cellulaires, plus particulièrement la métabolisation du resvératrol et son impact métabolique dans des cellules tumorales et non-tumorales. Ce travail, réalisé en collaboration avec l'institut des Sciences de la Vigne et du Vin (ISVV) et la plateforme métabolomique de Bordeaux (SAM), aborde notamment des aspects pharmacogénétiques et métaboliques appliqués à l'oncologie. Il fait l'objet d'un article signé en 1^{er} auteur soumis dans *Cancer Letters*.

I - Introduction

I – A Le cancer colorectal

I – A - 1 Épidémiologie

Le cancer colorectal (CRC) représente environ 10% des diagnostics de cancer chaque année au niveau mondial [5,6]. C'est le troisième cancer le plus fréquent chez l'homme et le deuxième chez la femme. On dénombre plus de 1,9 million de nouveaux cas en 2020 [7,8]. Il représente la seconde cause de décès par cancer et son incidence et sa mortalité sont environ 25% plus faibles chez les femmes que chez les hommes. Ces taux varient également d'un point de vue géographique, les taux les plus élevés étant observés dans les pays les plus développés (**Figure 1**). Faisant partie intégrante du mode de vie occidental, l'obésité, la sédentarité, la consommation de viande rouge, l'alcool et le tabac sont considérés comme les facteurs de risque majeurs responsables de l'augmentation de l'incidence du CRC [9,7,10,6,8]. Les estimations prévoient une augmentation de son incidence à 2,5 millions de nouveaux cas par an d'ici 2035, notamment grâce aux progrès diagnostiques des pays en développement [7,5]. On observe cependant une tendance à la stabilisation dans certains pays développés, expliquée pour partie par la mise en place de programmes de dépistage nationaux. Il est également possible que les changements de mode de vie et de régime alimentaire puissent y contribuer [11].

De multiples facteurs sont impliqués dans le développement du CRC (**Figure 2**). Comme abordé précédemment, le mode de vie dit « occidental » favorise le développement du CRC. Il inclut généralement :

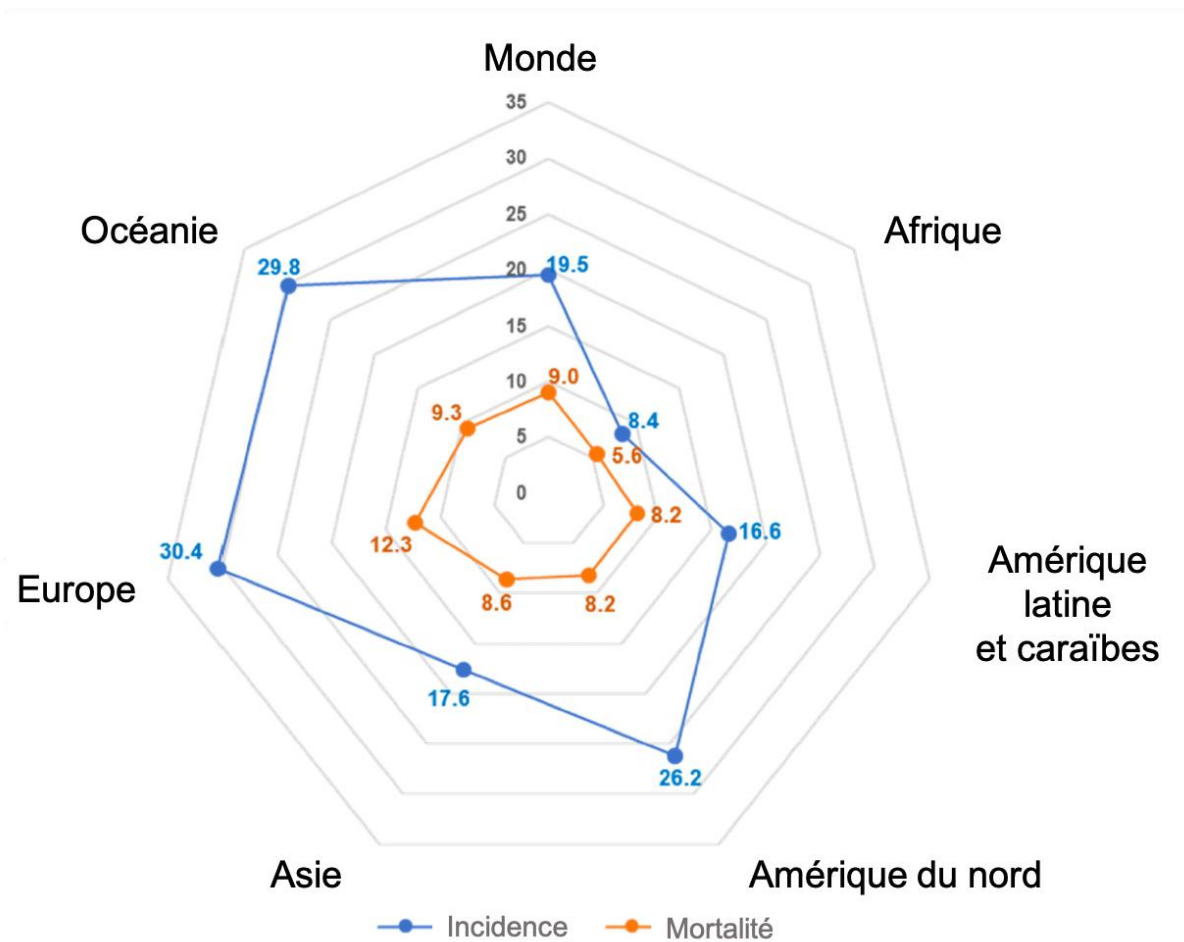


Figure 1 : Taux d'incidence et de mortalité standardisés du cancer colorectal pour les 2 sexes en 2020, par 100 000 individus. (Adapté d'après Sawicki & al., *Cancers*, 2021).

- L'inactivité physique : On estime un risque accru jusqu'à 50% de développer un CRC pour les personnes physiquement inactives en comparaison des personnes exerçant une activité physique régulière [12,13].
- Le tabac : Les fumeurs de cigarettes ont un risque 2 à 3 fois plus élevé de développer un CRC que les non-fumeurs. Ce risque augmente avec la dose et la durée d'exposition [14]. En outre, on considère que le tabagisme est responsable de 12% des décès par CRC [15].

- L'alcool : La consommation d'alcool est l'un des principaux facteurs contribuant au développement du CRC. On estime que la consommation de 2 à 3 verres d'alcool par jour augmente le risque de CRC d'environ 20%, tandis que la consommation de plus de trois verres augmente ce risque d'environ 40% [12,16]. Les personnes consommant plus de 4 verres par jour augmentent leur risque de développer un CRC jusqu'à 52% [17].
- Viande rouge : La consommation régulière de viande rouge et de viande transformée est un autre facteur de risque pour le développement du CRC [18,16]. Le risque de CRC peut augmenter d'environ 17% pour chaque portion de 100 grammes de viande et d'environ 18% pour chaque portion de 50 grammes de viande transformée consommée quotidiennement [19–21]
- Fibres, fruits et légumes : Une consommation élevée de fibres alimentaires constitue un facteur protecteur de développement du CRC. On estime qu'elle pourrait réduire de 50% le risque de développement du CRC [22]. Les résultats de plusieurs études ont également montré qu'une consommation élevée de fruits et légumes est liée à un risque jusqu'à 50% plus faible de développer un CRC [12,13,18]. Cependant, les conclusions des études épidémiologiques à ce sujet ne sont pas unanimes quant aux effets protecteurs des fibres sur le CRC et le mécanisme précis sous-jacent n'a pas été clairement établi. Malgré cela, il est recommandé de consommer au moins 20-30g de fibres par jour [15,18,23]. Les fruits et les légumes sont à privilégier car ils constituent d'excellentes sources de fibres mais également d'un grand nombre de composés bioactifs aux propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires, tels que les vitamines, les minéraux et les stérols végétaux.

Outre les facteurs liés au mode de vie, il a été démontré que les personnes ayant un antécédent de cancer, de polype du côlon, de maladie intestinale inflammatoire, de diabète sucré ou de cholécystectomie présentent un risque accru de développer un CRC. Le microbiote

intestinal, l'âge, le sexe, la race et le statut socio-économique sont également connus pour influencer le risque de CRC.

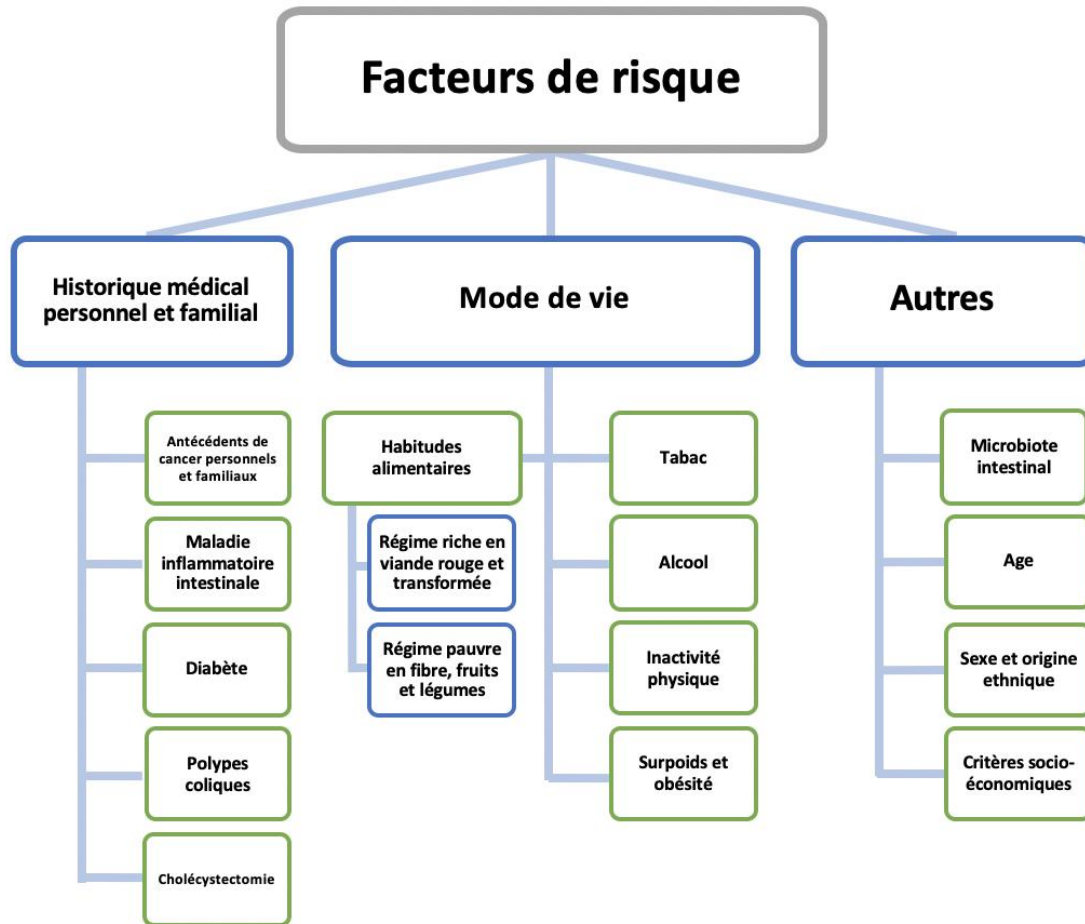


Figure 2 : Principaux facteurs de risques associés au cancer colorectal.
(Adapté d'après Sawicki & al., *Cancers*, 2021).

I – A - 2 Caractéristiques biologiques

a – Origine et développement

Trois grands types de CRC peuvent être distingués en fonction de leurs origines et caractéristiques moléculaires :

- Les formes sporadiques constituent un groupe de tumeurs dont le développement est indépendant de facteurs génétiques de prédisposition. Ces formes représentent la grande majorité des CRC (environ 70%) [24]. Le développement des formes sporadiques est basé sur un modèle d'instabilité chromosomique et implique la survenue successive d'altérations génétiques pro-oncogéniques (**Figure 3**), aboutissant à terme au développement de formes tumorales invasives et métastatiques.

- Les formes familiales, pour lesquelles aucune anomalie génétique associée n'a encore été identifiée, constituent environ 20% des cas. Le risque de développer ce type de tumeur est plus élevé lorsque des membres de la famille de premier degré ont développé un CRC sporadique. Ce risque familial résulte d'une susceptibilité héréditaire partielle [25].

- Les formes héréditaires avec deux variantes tumorales qui se distinguent selon la présence ou non de polypes adénomateux. On distingue d'une part la polypose adénomateuse familiale (FAP), associée à la présence de polypes intestinaux et à environ 1% des cas de CRC, et le syndrome héréditaire de CRC non associé à des polypes (Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer / HNPCC) ou syndrome de Lynch, comptant pour environ 5% des cas de CRC [26,27].
 - Les patients FAP présentent de multiples polypes digestifs qui, en l'absence de chirurgie préventive, peuvent évoluer vers un caractère malin à un âge moyen de 40 ans [28]. Des mutations inactivatrices constitutionnelles du gène *APC* sont à l'origine de cette pathologie [29]. Les mutations perte de fonction d'*APC* étant considérées comme un évènement oncogénique précoce voire initial, la présence de cette mutation au niveau germlinal accélère de manière majeure le processus d'oncogenèse colorectal.
 - Le syndrome HNPCC, aussi appelé syndrome de Lynch, associe, outre le développement de tumeurs colorectales à un âge jeune, une prédisposition à la survenue d'autres types de cancer [30]. Son développement, révélé par une

instabilité microsatellitaire (MSI), est associé à des mutations constitutionnelles d'un des 4 gènes codant pour les facteurs protéiques impliqués dans le processus MMR (*MLH1*, *PMS2*, *MSH2*, *MSH6*). La défaillance du système MMR aboutira à terme à l'accumulation de mutations ponctuelles dont certaines promouvront l'oncogenèse.

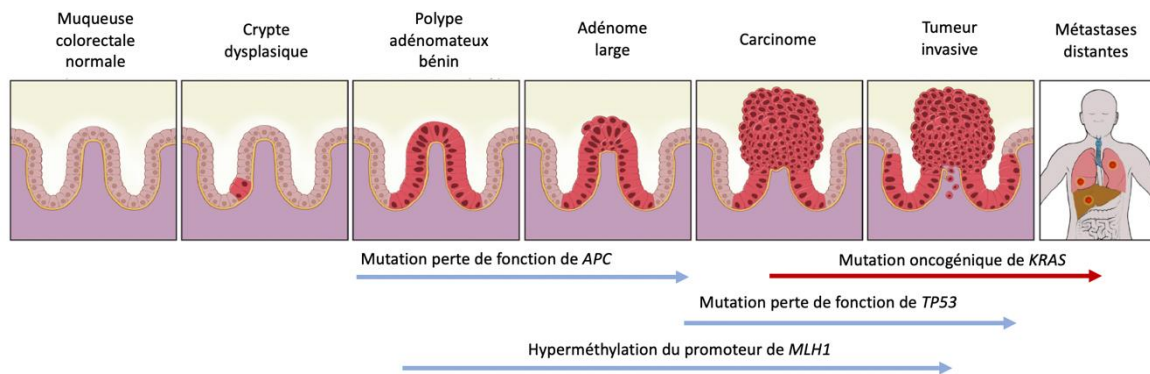


Figure 3 : Modèle classique "adénome-carcinome-métastase" de développement du cancer colorectal. (Adapté d'après Li & al., *Genes & Development*, 2021).

b – Profil mutationnel

Les caractéristiques génétiques et moléculaires du CRC sont donc étroitement liées à son type de développement. La majorité des tumeurs colorectales sporadiques (85%) présentent une instabilité génétique de type chromosomique, issue de l'apparition séquentielle de mutations oncogéniques combinant des mutations inactivatrices de gènes suppresseurs de tumeurs et des mutations activatrices d'oncogènes.

Les mutations perte de fonction de gènes suppresseurs de tumeurs concernent majoritairement les gènes *APC*, *TP53* et ceux de la voie TGF β . Les altérations du gène *APC* constituent les anomalies les plus fréquentes des CRC sporadiques (80%) [31–33]. *TP53* est muté dans 1 cas sur 2, fréquence similaire à ce qui est généralement observée dans les cancers. L'inactivation du gène *TP53* coïncide souvent avec la transformation maligne des adénomes [31,32], sans pour autant avoir de signification pronostique au niveau clinique [32].

La voie de signalisation TGF β a un rôle suppresseur de tumeur essentiel, notamment via une inhibition de la prolifération cellulaire et une induction de l'apoptose [34]. Des mutations des gènes codant pour les récepteurs au TGF β (*TGFBR1* et *TGFBR2*) ou pour les effecteurs d'aval SMAD (*SMAD2* et *SMAD4*) sont fréquemment retrouvées [32]. Les mutations de *TGFBR1* et *TGFBR2* sont associées à des tumeurs présentant une instabilité microsatellitaire [31,32]. La perte de fonction de *SMAD4* est quand t' à elle associée à la transformation maligne de la tumeur colorectale.

Les mutations oncogéniques sont trouvées principalement dans des gènes impliqués dans la voie de signalisation des Mitogen activated protein kinases (MAPK) et de la voie de la phosphatidylinositol 3-kinase (PIK3) [31,32,35]. Le récepteur à l'Epidermal Growth Factor (EGFR) est un facteur activateur initial de la voie des MAPK. Son activation déclenche une cascade intracellulaire de phosphorylation par l'intermédiaire d'effecteurs RAS et BRAF, amplifié via les MAPK, et aboutissant à une activation de la prolifération et de la survie cellulaire [32]. Une mutation activatrice de *KRAS* est identifiée dans environ 50 % des CRC sporadiques [35]. La concordance quasi-complète des statuts mutationnels de *KRAS* entre la tumeur primaire et les métastases laisse penser que ces mutations constituent un évènement précoce de la séquence oncogénique [35]. Le statut mutationnel *KRAS* des CRC métastatiques présente un intérêt thérapeutique puisqu'il prédit la résistance de la tumeur aux thérapies ciblées inhibitrices de l'EGFR et notamment au cetuximab [36]. Les mutations de *BRAF* sont également retrouvées à moindre fréquence dans environ 10% des cas de CRC [37]. Elles confèrent un pronostic clinique péjoratif ainsi qu'une résistance aux traitements par thérapie ciblée anti-EGFR [37–39]. Enfin, des mutations activatrices du gène *PIK3CA* sont présentes dans environ 15 à 20 % des CRC. L'activation de la voie PIK3 génère une augmentation de la synthèse de prostaglandine E2 et inhibe le phénomène d'apoptose [40]. Le statut mutationnel *PIK3CA* est également un marqueur thérapeutique, des thérapies ciblées anti-PIK3 étant actuellement en développement.

c – Instabilité microsatellitaire

L'instabilité de type microsatellitaire, liée à une déficience du système MMR, est retrouvée dans 15% des cas sporadiques mais également dans les tumeurs colorectales liées à un syndrome de Lynch. Les microsatellites sont des répétitions mononucléotidiques ou dinucléotidiques qui se trouvent dans tout le génome. Leur nature répétitive les rend vulnérables aux erreurs de réplication de l'ADN [32]. Le mécanisme de tumorigénèse lié à l'instabilité microsatellitaire implique l'inactivation des gènes du système MMR par mutation somatique ou méthylation aberrante du promoteur [32]. Cette perte de fonction du système MMR et l'incapacité qui en résulte pour la cellule de réparer les mésappariements dans les séquences répétitives de nucléotides aboutit à des modifications de taille des microsatellites [31]. De manière similaire, des mutations géniques de séquences répétées codantes peuvent survenir et présenter un caractère pro-oncogénique.

Les mutations germinales des gènes MMR sont responsables du syndrome de Lynch ou HNPCC, de transmission autosomique dominante et qui entraîne un risque accru de développer un CRC d'environ 80% [31,41]. La majorité des mutations sont présentes sur les gènes *MLH1* et *MSH2* et à une fréquence moindre sur les gènes *PMS2* et *MSH6* [41]. On observe alors une accélération de la séquence oncogénique du CRC avec un diagnostic médian effectué vers l'âge de 45 ans [31,27]. Le développement de tumeurs extra-coliques est également fréquent, en particulier de cancers de l'endomètre et de l'ovaire [33].

La méthylation aberrante de l'ADN constitue un autre mécanisme d'origine somatique d'extinction des gènes du système MMR [31]. L'hyperméthylation des promoteurs de gènes, contenant des îlots CpG, est connue sous le nom de phénotype de méthylation des îlots CpG (CIMP) [32]. On retrouve une instabilité microsatellitaire liée à une hyperméthylation du promoteur de *MLH1* dans environ 15% des cas de CRC d'origine sporadique [31].

d – Classification moléculaire

En 2014, sur la base de profils d'expression de gènes, 4 sous-types moléculaires consensus (CMS) de CRC ont été définis [42]. Les gènes ou voies de signalisation impliqués sont uniques à chaque sous-type. Les sous-types précisent le statut MSI, la présence de mutation *KRAS* ou *BRAF* ou encore la localisation anatomique de la tumeur. A noter que 20% des cas de CRC n'appartiennent à aucun sous-type. Cette classification CMS est actuellement explorée comme marqueur pronostique ou prédictif. La **figure 4** résume les 4 sous-types CMS ainsi que leurs principales caractéristiques.

- Groupe CMS-1 (MSI, Immun) : il représente 13 % des cas de CRC et se définit par des tumeurs MSI positives (MSI high) associées à une infiltration immune importante. Ces tumeurs présentent le plus souvent un phénotype CIMP élevé et sont mutées *BRAF*. Leur localisation anatomique est de préférence sur le colon droit. Elles présentent un bon pronostic en l'absence de métastase. Celui-ci est par contre mauvais si la tumeur est au stade métastatique.
- Groupe CMS-2 (Canonique) : compte pour environ 35 % des CRC. Les tumeurs sont classiquement sur le colon gauche et localisées. Elles ne présentent pas d'instabilité des microsatellites (MSS). On observe des taux de mutations somatiques élevés (SCNA high) avec une surexpression de l'EGFR. Des activations de la voie Wnt sont également fréquentes. Le pronostic est intermédiaire.
- Groupe CMS-3 (Métabolique) : ce groupe comprend 11 % des CRC. Les tumeurs sont de phénotype épithélial et MSS dans la majorité des cas. On retrouve une fréquence élevée des mutations *RAS*. La fréquence de mutations somatiques est faible (SCNA low). Le site anatomique est réparti de manière homogène entre le côlon droit et gauche. Leur pronostic est intermédiaire.

- Groupe CMS-4 (Mésenchymateux) : représente 20 % des CRC. Ce sous-type est caractérisé par de nombreuses altérations somatiques (SCNA high) et d'une activation des voies du TGFβ et de l'angiogénèse. Les tumeurs sont le plus souvent MSI et se situent préférentiellement sur le côlon gauche. Leur pronostic est mauvais en situation métastatique.

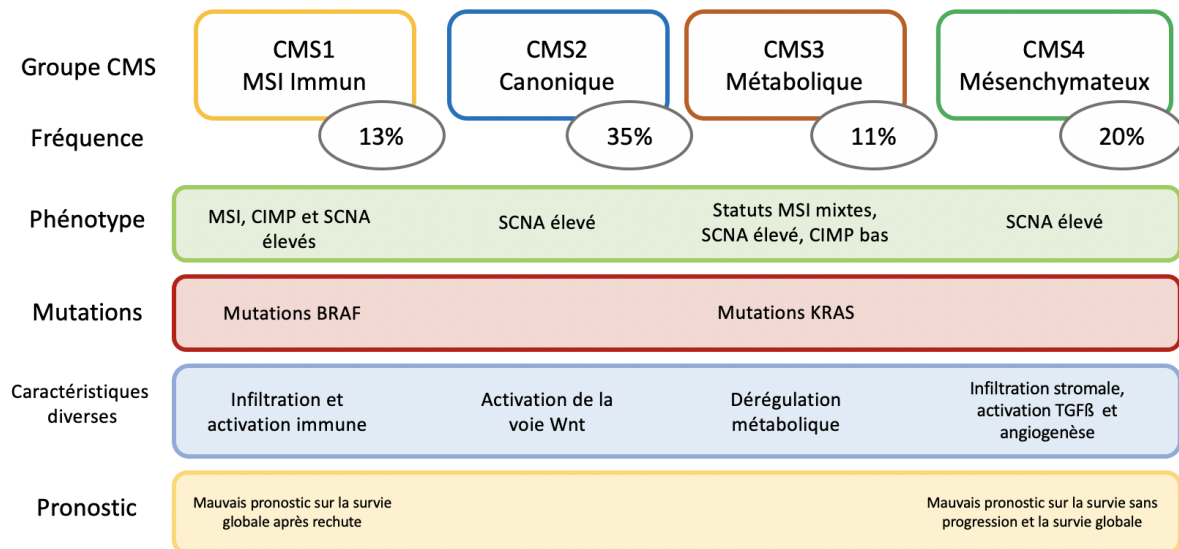


Figure 4 : Classification CMS et corrélation phénotypique.
(Adapté d'après Guinney & al., Nature Medecine, 2015).

I – A - 3 Diagnostic

a - Présentation clinique

Les patients atteints de CRC peuvent présenter un large éventail de signes cliniques et de symptômes tels qu'un saignement rectal, un changement dans les habitudes intestinales, une anémie ou encore des douleurs abdominales. Cependant, le CRC est dans la plupart des cas une maladie asymptomatique jusqu'à un stade avancé. Le saignement rectal en revanche est un symptôme courant, pouvant déjà être présent à des stades précoces bénins du développement du CRC.

Son apparition doit inciter à effectuer une coloscopie chez les personnes âgées de 45 ans ou plus. Chez les patients plus jeunes, des facteurs supplémentaires sont utilisés pour identifier les personnes présentant un risque plus élevé de développer un CRC. On peut citer par exemple des antécédents familiaux de CRC, une modification des habitudes intestinales ou encore une perte de poids inexplicée [43].

b - Endoscopie

La coloscopie est la méthode de choix pour le diagnostic du CRC. L'identification par coloscopie des lésions avancées est relativement simple, mais les cancers colorectaux précoces peuvent apparaître sous la forme de lésions peu distinctives. Pour être détectées, ces lésions nécessitent une inspection soigneuse et complète de la muqueuse et une préparation intestinale optimale.

c- Imagerie

Le coloscanner est utilisé comme méthode d'imagerie complémentaire pour le diagnostic des polypes et du CRC, par exemple en cas de coloscopie incomplète ou non contributive. Cependant, ces méthodes d'imagerie sont surtout utilisées pour établir la stadification tumorale de manière précise, au niveau locorégional et à distance. Dans le cas du cancer du

rectum, la stadification locorégionale est systématiquement réalisée par IRM et guide les décisions thérapeutiques [44].

La stadification locorégionale pour le cancer du côlon est devenue essentielle car le traitement néoadjuvant systémique peut permettre une réduction des tumeurs localement avancées. Les coloscanners sont couramment utilisés dans ce but, bien que leur précision soit limitée [45].

d – Analyses pathologiques

L'analyse histologique demeure la base de la classification pathologique (pTNM) du CRC et de la prise en charge qui en résulte. Outre la classification pTNM classique, le sous-type histologique et l'évaluation de l'invasion lymphatique, périneurale et veineuse, l'intérêt de nouveaux marqueurs tumoraux tels que la détermination du statut MMR et l'immunoscore est de plus en plus reconnu [46–48]. En particulier, le test MSI est à mettre en œuvre non seulement pour l'identification des cas de CRC liés à un syndrome de Lynch mais aussi dans le but d'adapter le traitement du patient. Les cas de CRC métastatiques MSI positifs peuvent par exemple bénéficier depuis récemment d'un traitement par immunothérapie en première ligne [46]. Ce test MSI est effectué en première intention par technique immunohistochimique et peut être confirmé par une analyse moléculaire [49].

e – Analyses biologiques

La réalisation d'une numération formule sanguine (NFS) et la quantification sérique de l'antigène carcinoembryonnaire (ACE) constituent les 2 examens biologiques recommandés lors du diagnostic de CRC [50]. Une concentration élevée d'ACE au diagnostic est associée à un pronostic défavorable, et l'absence de normalisation des concentrations dans la phase postopératoire peuvent indiquer une maladie résiduelle.

Les analyses moléculaires regroupent le test MSI et la détermination des statuts mutationnels des gènes *KRAS*, *NRAS* et *BRAF*. Outre leur caractère pronostique, la présence d'une mutation

activatrice d'un de ces 3 gènes empêchera la mise en place d'un traitement combiné d'une chimiothérapie et de la thérapie ciblée anti-EGFR (cetuximab) [51–53]. En absence de matériel tumoral exploitable, cette analyse peut également être réalisée sur l'ADN circulant grâce à une simple prise de sang [54].

I – A - 4 Prise en charge et traitements

a - Traitement endoscopique

La mise en place de programmes de dépistage nationaux a permis l'identification d'un plus grand nombre de tumeurs précoces. Lors du diagnostic, les polypes malins peuvent être réséqués par endoscopie, permettant ainsi une évaluation précise des caractéristiques pouvant faire évoquer un risque élevé de transformation maligne (profondeur de l'invasion de la sous-muqueuse, différenciation, invasion et bourgeonnement tumoral) ainsi qu'une analyse des marges profondes et latérales par le pathologiste. La décision d'une chirurgie adjuvante avec lymphadénectomie mésentérique sera prise en fonction de l'estimation du risque oncologique et du risque opératoire. Si une résection endoscopique est mise en œuvre, le choix de la technique de résection sera fait principalement en fonction de la taille tumorale, de l'aspect de la lésion à l'endoscopie et du degré d'envahissement superficiel de la sous-muqueuse [55,55,56]. Ce type d'acte nécessite des compétences techniques importantes et doit être réalisé dans des centres experts [57,58]. Plusieurs études ont suggéré que l'ablation endoscopique est à la fois plus sûre et moins coûteuse que la chirurgie [59,60].

b - Chirurgie

La chirurgie est la pierre angulaire du traitement du CRC à visée curative. La qualité de la résection est cruciale et peut être évaluée à l'aide de paramètres objectifs. La chirurgie du CRC a été optimisée par l'utilisation d'une dissection nette dans l'interface mésofasciale, selon le principe de l'excision mésocolique complète. Un sujet encore controversé est l'étendue de la lymphadénectomie, car aucune preuve ne démontre l'impact bénéfique d'une dissection

extensive par rapport à une dissection plus limitée sur le résultat oncologique alors que cela pourrait augmenter la morbidité [61]. La chirurgie par laparoscopie est devenue la technique standard pour le cancer du colon dans de nombreux pays du monde, avec des bénéfices à court terme prouvés. La chirurgie du cancer du rectum est plus difficile en raison de la faible accessibilité et de l'anatomie complexe du bassin. L'excision totale du mésorectum est l'approche oncologique standard du cancer du rectum, et l'étendue de la résection dépend en outre de l'implication du complexe sphinctérien et d'autres structures environnantes [62].

c - Radiothérapie pour les cancers du rectum

Contrairement à la radiothérapie postopératoire adjuvante, plusieurs essais historiques ont montré le bénéfice de la radiothérapie et de la radiochimiothérapie préopératoire dans la réduction du risque de récurrence locale des cancers du rectum [63]. La radiochimiothérapie est le traitement le plus utilisé, avec une dose de 45-50 gray en 25-28 fractions, associé à une fluoropyrimidine (5-fluoro-uracile (5-FU) ou capécitabine) faisant office de radiosensibilisant [64]. Des approches courte durée ou « short course » avec un faible fractionnement des doses sont également en développement [65]. Une réduction de la taille tumorale est obtenue chez la plupart des patients et une réponse complète pathologique survient chez au moins 15-20% d'entre eux [66]. L'intervalle entre le traitement et la chirurgie est encore sujet à débat, mais il est généralement de 8 à 10 semaines [67,68]. L'observation d'une réponse clinique complète après traitement néoadjuvant a initié des stratégies de préservation rectale avec omission d'une chirurgie radicale et mise en place soit d'une tumorectomie localisée, soit d'une absence de chirurgie associée à une surveillance étroite (stratégie dite "Watch-and-Wait") [69]. Ces stratégies permettent notamment un gain important de qualité de vie pour les malades et sont de plus en plus demandées par ces derniers. Malgré des inquiétudes initiales en termes de sécurité oncologique, les données soutiennent de telles stratégies chez des patients sélectionnés présentant une réponse clinique complète soutenue au traitement néoadjuvant [70]. Si, lors du programme de surveillance intensif combinant examen rectal, endoscopie et IRM, une récurrence est détectée à temps, une chirurgie de sauvetage est souvent réalisable mais au prix d'une importante morbidité [71].

d – Traitements systémiques

En tant que traitement adjuvant, la chimiothérapie à base de fluoropyrimidine améliore la survie dans les CRC réséqués de stade III et dans un sous-ensemble de CRC de stade II, à l'exclusion des tumeurs MSI positives [72,73]. Plusieurs études de référence ont établi l'addition de l'oxaliplatine à une fluoropyrimidine comme la nouvelle norme [74–76]. Le principal inconvénient de l'ajout de la chimiothérapie à l'oxaliplatine est le développement d'une neuropathie sensorielle cumulative. Une durée de 6 mois était classiquement adoptée pour la chimiothérapie adjuvante. Cependant, la collaboration IDEA, s'appuyant sur six essais cliniques randomisés de phase III, a montré que la réduction de la chimiothérapie adjuvante à 3 mois permettait une réduction de la toxicité sans baisse d'efficacité du traitement, au moins pour les CRC de stade III à faible risque [77].

Le traitement systémique du CRC métastatique est adapté grâce à des marqueurs prédictifs propres à chaque patient et à chaque tumeur. Le nombre croissant de médicaments efficaces contre le CRC a conduit à une amélioration substantielle de la survie globale. Décider si la thérapie sera curative ou palliative est crucial et dépend principalement de la charge tumorale. Certains patients peuvent par exemple présenter des métastases facilement résécables et bénéficier d'un traitement à visée curative. Par ailleurs, les patients présentant des métastases étendues peuvent être des candidats potentiels à un traitement local en attendant une réponse au traitement systémique. La réduction de la taille de ces tumeurs par des thérapies dites de conversion est de plus en plus utilisée [78]. Le traitement systémique du CRC métastatique comprend généralement une chimiothérapie de fond associée à une thérapie ciblée (**Figure 5**). Les combinaisons à base de fluoropyrimidines, d'oxaliplatine et d'irinotécan constituent la colonne vertébrale de la chimiothérapie dans la plupart des schémas de traitements. Une thérapie ciblée anti-VEGF ou anti-EGFR est ajoutée au régime de chimiothérapie en fonction de marqueurs spécifiques à la tumeur et au patient. A cela s'ajoutent les immunothérapies (pouvant bénéficier particulièrement aux tumeurs MSI positives), les thérapies ciblées anti-BRAF associées ou non à des inhibiteurs de MEK (pour les tumeurs mutées *BRAF*) et des thérapies palliatives comme le régorafénib (inhibiteur de

tyrosine kinases). Les patients atteints de CRC métastatique reçoivent généralement plusieurs lignes de traitement en fonction de la situation (**Figure 5**).

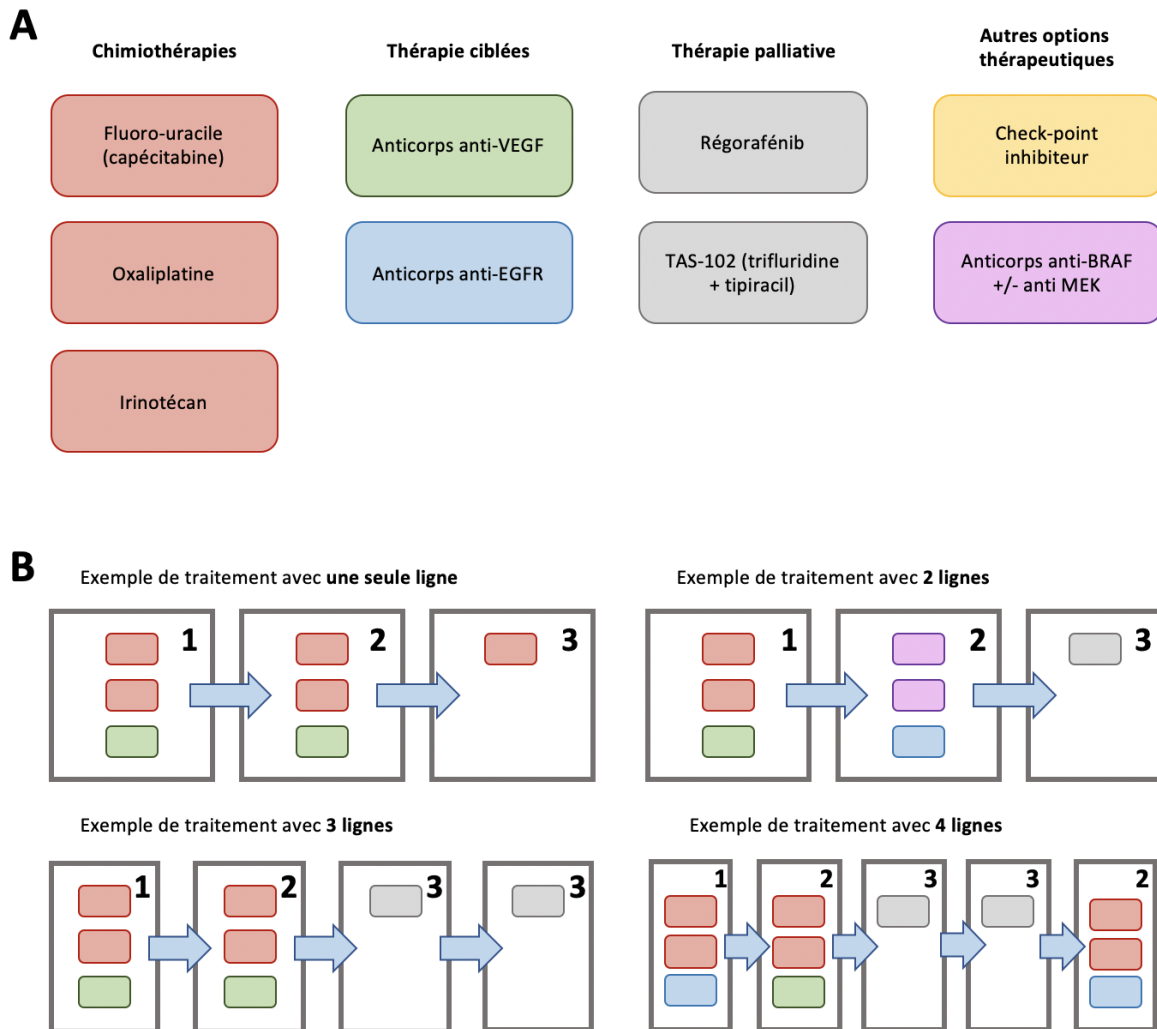


Figure 5 : Classes de médicaments utilisés chez les patients atteints de cancer colorectal métastatique. A, souvent utilisés en association (par exemple, deux ou trois médicaments de chimiothérapie associés à une thérapie ciblée). Les patients atteints d'un cancer colorectal métastatique sont souvent traités successivement par plusieurs schémas thérapeutiques B, en fonction des caractéristiques du patient et de la tumeur (par exemple le statut mutationnel ou le statut MSI). (Adapté d'après Dekker & al., Lancet, 2019).

I – B L'adénocarcinome canalaire du pancréas

I – B - 1 Épidémiologie

L'adénocarcinome canalaire pancréatique (PDAC) représente 90% de l'ensemble des tumeurs pancréatiques. C'est actuellement la 4^{ème} cause de décès par cancer en Europe et on estime qu'il passera en 3^{ème} position d'ici 2030, devant le cancer du sein [5]. Au niveau mondial, il représente la septième cause de décès par cancer chez les hommes et les femmes. Son incidence a doublé chez les hommes et triplé chez les femmes entre 1990 et 2017, avec une incidence 3 fois plus importante dans les pays ayant des indices sociodémographiques élevés [79] (**Figure 6**). La majorité des patients sont diagnostiqués à un âge médian de 71 ans et seulement 20 % des diagnostics sont posés avant l'âge de 60 ans [80,81]. Le pronostic du PDAC tous stades confondus est très sombre, avec une survie globale à 5 ans de l'ordre de 7% [82,83].

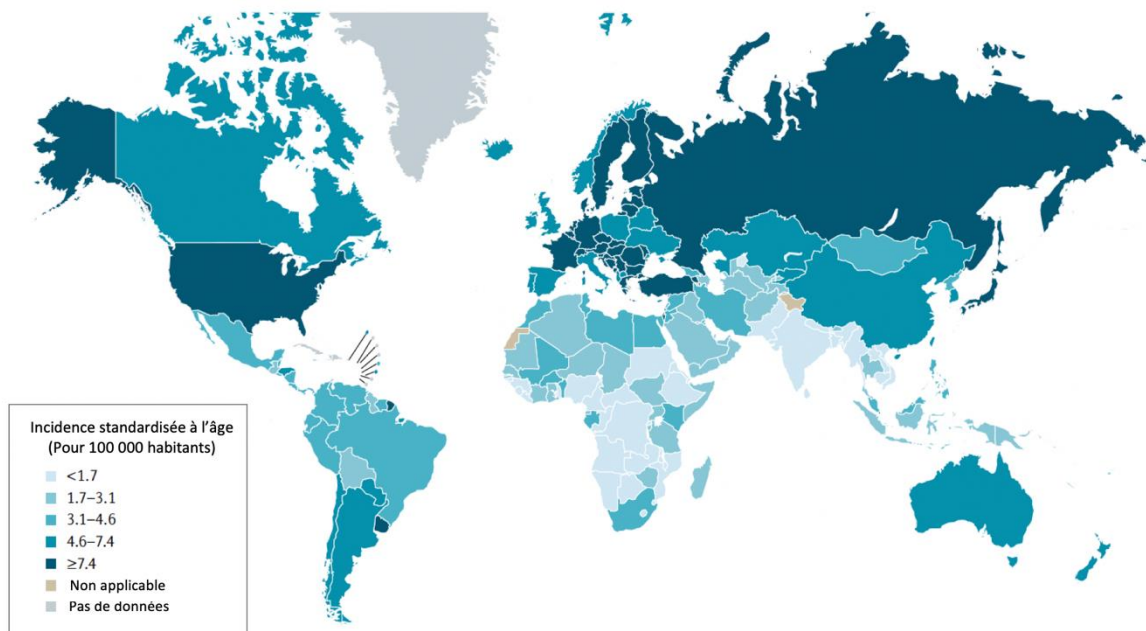


Figure 6 : Incidence mondiale du cancer du pancréas. Taux d'incidence standardisée à l'âge du cancer du pancréas à travers le monde en 2020. (Adapté d'après Klein, *Nature Reviews, Gastroenterology & Hepatology*, 2020).

Les facteurs de risque environnementaux et modifiables formellement identifiés et associés au développement du PDAC sont :

- L'obésité : Une vaste étude du National Institutes of Health a montré que les patients en surpoids ou obèses avaient une probabilité accrue de développer un PDAC par rapport aux patients ayant un IMC normal, avec des Hazard Ratios (HR) de 1.15 à 1.53 [84]. L'infiltration graisseuse du pancréas a également été corrélée au développement de néoplasies intraépithéliales pancréatiques (PanIN), précurseurs du développement du PDAC [85].
- Le diabète de type 2 : Le diabète est depuis longtemps corrélé au risque de développement du PDAC, bien que l'on pense que le PDAC soit également un facteur de risque pour le développement du diabète [86,87]. Environ 1 % des patients de plus de 50 ans déclarant un diabète le développent en raison d'un PDAC concomitant [88]. En parallèle, les patients avec un diagnostic de diabète de moins d'un an présentent un risque relatif de développer un PDAC multiplié par 5,4, alors que le risque est multiplié par 1,5 chez les patients souffrant de diabète chronique [88]. Ces données suggèrent que le diabète récent pourrait être un facteur de risque important et/ou un signe avant-coureur du cancer du pancréas.
- Le tabagisme : On estime que les fumeurs sont environ deux fois plus susceptibles de développer un PDAC que les non-fumeurs. Cependant, et contrairement à d'autres tumeurs malignes dont le développement est lié au tabagisme, aucune signature génétique spécifique n'a encore été identifiée pour le PDAC tabac-induit [89]. L'étude « European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition » (EPIC) a montré que les patients ayant un score élevé d'indice de mode de vie sain (qui comprend le tabagisme, la consommation d'alcool, l'activité physique, l'adiposité et le régime alimentaire) avaient une probabilité réduite de développer un PDAC, indépendamment du statut tabagique [90].

Outre ces facteurs environnementaux, on estime que 5 à 10 % de tous les cancers du pancréas sont attribuables à des facteurs de risque héréditaires [91]. Plusieurs syndromes familiaux prédisposant au développement de cancers du pancréas ont été identifiés. Le syndrome de Peutz-Jeghers, résultant d'une mutation dans le suppresseur de tumeur *STK11* (ou *LKB1*), entraîne un risque accru de 35% de développer un cancer du pancréas [92]. De même, le syndrome héréditaire du cancer du sein et des ovaires, le plus souvent attribué à des mutations des gènes *BRCA1* ou *BRCA2*, est associé à un risque accru de développer ce type de cancer. Bien que ce risque soit relativement faible chez les patients porteurs d'une mutation de *BRCA1* (risque relatif de 2,8 % contre 1,3 % dans la population générale), les mutations de *BRCA2* sont le facteur de risque héréditaire le plus courant pour le PDAC, avec un risque relatif de 3,5% pour le développement de la maladie [93,91]. Les patients atteints du syndrome de Lynch ont un risque approximativement 8,6 fois plus élevé de développer un cancer du pancréas à l'âge de 70 ans par rapport à la population générale. Les tumeurs pancréatiques résultantes présentent un phénotype MSI positif et répondent généralement aux immunothérapies [94,46]. Les mutations germinales de *CDKN2A* et des gènes impliqués dans la réponse aux dommages (*ATM*) et la réparation de l'ADN (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PALB2*) sont également associées à un risque accru de développer un PDAC [95,92]. Une étude portant sur 3 000 patients a montré que 5,2 % des patients atteints de PDAC et qui n'avaient pas d'antécédents familiaux de ce cancer présentaient au moins une altération génétique héréditaire connue prédisposant au cancer du pancréas, contre 7,9 % des patients ayant des antécédents familiaux positifs [96]. Cette découverte a conduit à la mise à jour des recommandations de l'American Society of Clinical Oncology et du National Comprehensive Cancer Network, qui préconisent d'envisager un test germlinal pour tous les patients chez qui un cancer du pancréas a été diagnostiqué [97,98].

I – B - 2 Caractéristiques biologiques

a – Origine et développement

La plupart des PDAC provient de lésions pré-néoplasiques appelées néoplasies intraépithéliales pancréatiques ou PanIN, qui progressent par étapes grâce à l'acquisition d'altérations génétiques successives (**Figure 7**).

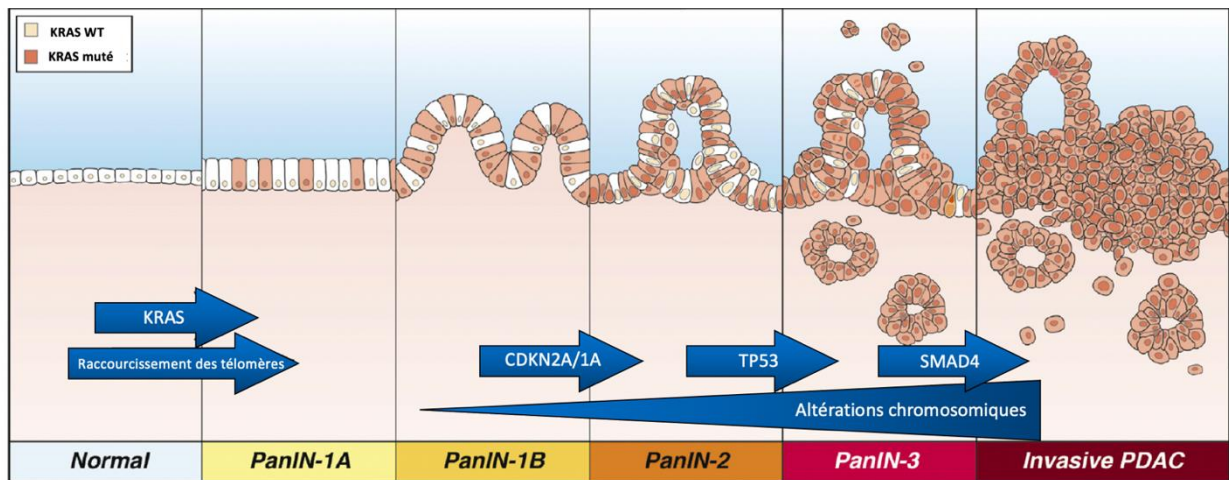


Figure 7 : Séquence oncogénique de l'adénocarcinome canalaire pancréatique – Modèle PanIN.

L'apparition de mutations activatrices de *KRAS*, majoritairement sur le codon 12, est un phénomène précoce et est régulièrement associée à un raccourcissement des télomères dans les PanIN de grade 1A. Des mutations successives des gènes *CDKN2A*, *CDKN1A*, *TP53* et *SMAD4*, associées à une instabilité chromosomique, permettent la progression des PanIN aux stades 2 et 3 pour aboutir au développement d'une tumeur pancréatique canalaire invasive (Adapté d'après Wood & al., Gastroenterology, 2019).

Une minorité de PDAC provient de néoplasmes kystiques tels que les néoplasmes mucineux papillaires intraductaux (NMPI) ; cependant, les NMPI peuvent être retrouvés co-localisés avec l'adénocarcinome et pourraient présenter une signature génétique distincte suggérant un développement divergent [99].

La séquence moléculaire de la progression oncogénique à partir de PanIN est largement décrite dans la littérature. Les PanIN de grade 1 et 2 sont caractérisées par des mutations ponctuelles activatrices dans l'oncogène *KRAS*, en particulier dans le codon 12, retrouvées

dans plus de 90 % des PDAC. En résulte une activation constitutive des voies RAF-MEK-ERK et PI3K-AKT-mTOR, associée à une progression du cycle cellulaire et une augmentation de la survie et de la motilité cellulaire. Le raccourcissement des télomères est également une caractéristique propre aux PanIN de grade 1, prédisposant probablement au développement de mutations par instabilité chromosomique [100]. Les PanIN de grade 2 sont associées à l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs *CDKN2A* et *CDKN1A*. Les PanIN de grade 3 et 4 présentent des mutations additionnelles du gène *TP53*, observées dans 50 à 70% des PDAC, ainsi que des mutations inactivatrices de *SMAD4*, observées dans 60 à 90% des cas [101]. Le **tableau 1** résume les caractéristiques des gènes les plus fréquemment mutés et impliqués dans l'oncogenèse pancréatique canalaire.

Tableau 1 : Oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs les plus fréquemment mutés dans le cancer du pancréas. (D'après Wood & al., Gastroenterology, 2019)

Gene	Mutation prevalence ^a	Gene type	Mutated neoplasms	Alteration type	Affected pathways	Related altered genes
<i>KRAS</i>	Common	Oncogene	PanIN, IPMN, PDAC	Missense mutation	MAPK signaling	<i>BRAF</i>
<i>CDKN2A</i>	Common	TSG	PanIN, IPMN, PDAC	Inactivating mutation/LOH, homozygous deletion	Cell cycle control	<i>FBXW7, RB1</i>
<i>TP53</i>	Common	TSG	PanIN, IPMN, PDAC	Missense mutation/LOH	DNA damage response	—
<i>SMAD4</i>	Common	TSG	PDAC	Inactivating mutation/LOH, homozygous deletion	TGF β signaling	<i>TGFBR2, ACVRRB1</i>
<i>GNAS</i>	Common	Oncogene	IPMN, PDAC	Missense mutation	G-protein signaling	—
<i>RNF43</i>	Common	TSG	IPMN, PDAC	Inactivating mutation/LOH	Ubiquitin signaling	—
<i>ARID1A</i>	Uncommon	TSG	PDAC	Inactivating mutation/LOH	Chromatin remodeling	<i>MLL3, ARID2, KDM6A</i>
<i>SLIT2</i>	Uncommon	TSG	PDAC	Mutation/LOH	Axon guidance	<i>ROBO2</i>
<i>BRCA2</i>	Uncommon	TSG	PDAC	Inactivating mutation/LOH ^b	DNA repair	<i>ATM, PALB2</i>
<i>MYC</i>	Uncommon	Oncogene	PDAC	Amplification	Transcriptional regulation	—
<i>ERBB2</i> ^c	Uncommon	Oncogene	PDAC	Amplification	EGF signaling	—

LOH, loss of heterozygosity; MAPK, mitogen-activated protein kinase; TSG, tumor suppressor gene.

^aCommon: >20% prevalence; uncommon: <10% prevalence.

^bGermline mutations also frequently occur.

^cAmplifications or fusions involving *RET*, *BRAF*, *ALK*, *ROS1*, and *NTRK* are rare (<1%) in PDAC but are therapeutically targetable.

b – Classifications moléculaires

Plusieurs classifications moléculaires du PDAC ont été successivement établies sur la base de signatures moléculaires distinctes.

- Une première étude a mis en évidence en 2011 trois sous-types moléculaires de la maladie, associés à des présentations et évolutions cliniques distinctes. Elle distinguait les sous-types classique, quasi-mésenchymateux et exocrine [102].
- D'autres travaux ont utilisé des échantillons micro-disséqués pour séparer le stroma et le pancréas normal de la tumeur pancréatique et ont identifié deux sous-types moléculaires : classique et un sous-ensemble de type basal [103].
- Un autre mode de catégorisation basé sur une analyse génomique de 456 spécimens de PDAC a abouti à un classement des tumeurs en quatre sous-types distincts : squameux, progéniteur pancréatique, immunogène et à différenciation aberrante endocrine-exocrine [104].

Des analyses croisées suggèrent que les sous-ensembles squameux, basal et quasi-mésenchymateux sont moléculairement similaires et représentent probablement le même sous-ensemble de tumeurs. Ces tumeurs étaient également similaires sur le plan clinique.

Enfin, une analyse moléculaire récente de 309 PDAC réséqués a confirmé la présence du sous-type progéniteurs pancréatiques et des sous-ensembles de type basal, squameux et quasi-mésenchymateux [105]. Cette étude a également caractérisé le microenvironnement tumoral et a identifié 3 sous-ensembles supplémentaires, notamment les sous-ensembles desmoplasique, classique immunitaire et activé par le stroma. Les implications de ces résultats sur le plan clinique sont encore préliminaires et des études supplémentaires sont nécessaires pour aboutir à une utilisation pratique de cette classification moléculaire.

I – B – 3 Diagnostic

a - Présentation clinique

Le PDAC est le plus souvent une maladie à faible symptomatologie avant d'atteindre un stade avancé. De plus, les quelques formes symptomatiques regroupent des signes cliniques peu spécifiques tels que douleurs épigastriques ou dorsales, des nausées, ballonnements, une plénitude abdominale ou encore un changement de la consistance des selles. Ces symptômes peuvent être souvent attribués à des pathologies bénignes, ce qui peut retarder le diagnostic [106,107]. Les symptômes cliniques les plus fréquents au diagnostic sont les douleurs abdominales (40-60%), un ictère (30%), un diabète récent (13-20%), une dyspepsie (~20%), les nausées ou les vomissements (~16%), les douleurs dorsales (~12%) et la perte de poids (~10%) [108]. La symptomatologie dépend également de la localisation de la tumeur dans le pancréas. Environ 60-70% des tumeurs pancréatiques se développent dans la tête du pancréas et peuvent fréquemment provoquer une obstruction biliaire, représentée cliniquement par un ictère indolore. Les tumeurs du corps pancréatique ont tendance à envahir les structures vasculaires locales, y compris les vaisseaux cœliaques, hépatiques et mésentériques supérieurs en plus de la veine porte. Il en résulte souvent une présentation avec douleurs dorsales. Enfin, les tumeurs de la queue du pancréas se développent souvent de manière asymptomatique et se présentent le plus souvent à un stade avancé lors du diagnostic.

b - Imagerie

La technique d'imagerie de référence pour un diagnostic du PDAC est l'angiographie par tomodensitométrie ou angioscanner. Il présente une sensibilité diagnostique d'au moins 90% [109,110]. Les tumeurs pancréatiques apparaissent généralement hypodenses par rapport au parenchyme pancréatique. L'IRM est une alternative permettant notamment une évaluation détaillée des voies biliaires et présentant une sensibilité plus élevée pour la détection des lésions hépatiques [111]. L'échographie endoscopique est fréquemment utilisée comme outil complémentaire pour identifier les ganglions lymphatiques régionaux et évaluer la relation des tumeurs avec les structures vasculaires voisines [112,113]. Associée à une aspiration à

l'aiguille fine, elle représente une approche sûre pour la confirmation histologique de la maladie, en particulier pour des patients présentant une maladie potentiellement résecable. Le TEP-scan n'est pas systématiquement indiqué dans l'évaluation diagnostique du PDAC, mais doit être envisagé chez les patients présentant un risque élevé de maladie métastatique occulte, notamment ceux présentant des taux d'antigène carcinoembryonnaire 19-9 (CA19-9) disproportionnés par rapport au stade tumoral suspecté.

c - Analyses biologiques

Le CA19-9 représente le biomarqueur sérique de référence associé au cancer du pancréas. Il présente une sensibilité de 79 à 81 % et une spécificité 82 à 90% pour le diagnostic de la maladie chez les patients symptomatiques [114]. Bien que non recommandé pour faire le diagnostic du cancer, sa mesure répétée est utilisée dans la surveillance de la réponse au traitement systémique dans des contextes néoadjuvants ou métastatiques et son résultat est souvent un reflet précoce de la réponse objectivée à l'imagerie [115–118]. Un CA19-9 préopératoire élevé peut également aider à identifier les patients pour lesquels l'obtention d'une chirurgie R0 (marges de résection histologiquement négatives) est moins probable et prédit également la survie post-résection à long terme [114,119]. Il est important de noter que le CA19-9 peut être élevé chez les patients présentant une obstruction biliaire ou une pancréatite [120]. D'autre part, les patients de groupe sanguin Lewis négatif, qui représentent environ 10% de la population, ne synthétisent pas de CA19-9 et peuvent présenter des dosages faussement négatifs [121]. Ces différents éléments soulignent les limites de l'utilisation ce marqueur dans la prise en charge du PDAC.

d - Stadification

La stadification histologique se fait à l'aide de la classification TNM de l'American Joint Committee on Cancer (AJCC, **Tableau 2**). Pour la stadification clinique, qui impactera la prise en charge et le choix des options thérapeutiques, la plupart des cliniciens utilisent un système de stadification à quatre niveaux basé sur la résectabilité de la tumeur : résecable, borderline

résécable, localement avancé et métastatique [122–124] (**Tableau 3**). La décision d'une prise en charge optimale des patients atteints d'une maladie localisée doit être prise avec une équipe multidisciplinaire de cliniciens expérimentés.

Tableau 2 : Classification TNM selon l'American Joint Committee on Cancer (AJCC).

TNM stage	Description
T-stage	
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumour <2 cm and limited to pancreas
T2	Tumour >2 cm and limited to pancreas
T3	Tumour extends beyond pancreas but no involvement of coeliac axis or SMA
T4	Tumour involves the coeliac axis or SMA
N-stage	
N0	Regional lymph nodes not involved
N1	Regional lymph nodes involved
M-stage	
M0	No distant metastases
M1	Distant metastases present

M, metastases; N, nodes; SMA, superior mesenteric artery; T, tumour.

Tableau 3 : Résectabilité des adénocarcinomes canaux pancréatiques selon la classification NCCN 2018.

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

I – B - 4 Prise en charge et traitements

a - Tumeurs résécables d'emblée ou borderline

Malgré des taux de rechute de l'ordre de 70%, la chirurgie reste le seul traitement qui offre un potentiel curatif [125,126]. Les tumeurs de la tête pancréatique sont généralement réséquées par une pancréaticoduodénectomie (chirurgie de Whipple) qui comprend la résection de la tête pancréatique, du duodénum, du jéjunum proximal, du canal biliaire commun, de la vésicule biliaire et d'un segment de l'estomac. Les approches laparoscopiques et assistées par robot ont des résultats comparables en termes de sécurité par rapport à la chirurgie traditionnelle [127,128]. Dans une étude incluant 322 patients, la pancréaticoduodénectomie laparoscopique a été associée à une perte de sang moindre, une durée d'hospitalisation réduite et une meilleure survie sans maladie par rapport à la chirurgie ouverte [129]. Il est également démontré que les établissements pratiquant un volume élevé de pancréaticoduodénectomies (>30/an) connaissent une mortalité postopératoire plus faible [130,131]. Les tumeurs localisées au corps ou à la queue du pancréas peuvent être traitées par une pancréatectomie distale, souvent associée à une splénectomie. Les résections vasculaires au moment de la résection de la tumeur sont fréquemment effectuées pour obtenir des marges chirurgicales négatives.

Le rôle du traitement systémique chez les patients présentant une maladie résécable ou à la limite de la résectabilité a été largement étudié.

- L'essai ESPAC-1 a mis en évidence un bénéfice d'une chimiothérapie adjuvante par 5-fluoro-uracile, associé à une amélioration de la survie globale [132,133].
- L'essai ESPAC-3 a confirmé l'efficacité de la gemcitabine adjuvante [134].
- L'étude ESPAC-4 a comparé une chimiothérapie adjuvante par gemcitabine associée ou non à la capécitabine [135]. Les résultats ont montré une augmentation de la survie globale médiane de 25,5 mois à 28 mois (HR 0,82 ; 95% CI 0,68-0,98 ; p=0,032) en faveur de la combinaison.

- L'essai PRODIGE-24 a comparé 6 mois de traitement adjuvant par 5-fluoro-uracile plus leucovorine, oxaliplatine et irinotécan (mFOLFIRINOX) à une monothérapie par gemcitabine [136]. Le traitement combiné augmentait la survie sans progression de 12,8 à 21,6 mois (HR 0,58 ; 0,46-0,73 ; $p < 0,001$) et la survie globale médiane de 35 à 54,4 mois (HR 0,64 ; 0,48-0,86 ; $p = 0,003$).

En conséquence, le mFOLFIRINOX adjuvant 6 mois est le traitement recommandé pour les patients ayant un bon statut de performance après résection d'un PDAC. La gemcitabine avec ou sans capécitabine reste une option thérapeutique pour les patients présentant des contre-indications au mFOLFIRINOX ou ceux dont l'état de performance est sous-optimal.

Malgré un niveau de preuve à renforcer pour soutenir son utilisation, de nombreux centres utilisent un traitement néoadjuvant chez les patients avec une maladie résécable et limite résécable. Les objectifs du traitement préopératoire comprennent l'exclusion des patients présentant une maladie rapidement progressive qui ne bénéficieraient probablement pas d'une intervention chirurgicale et l'augmentation des chances d'obtenir une résection R0. De multiples études ont montré la sécurité du traitement néoadjuvant [137]. L'étude PREOPANC-185 a comparé la radiochimiothérapie néoadjuvante par gemcitabine à la chirurgie d'emblée chez les patients atteints d'un PDAC résécable ou borderline. Aucune différence statistique n'a été observée en termes de survie sur la population globale mais la radiochimiothérapie néoadjuvante a été associée à un taux de résection R0 plus élevé et à une survie sans progression prolongée. Dans l'analyse de sous-groupes, une survie globale accrue a été mise en évidence pour les patients borderline ayant reçu le traitement néoadjuvant [138]. Plusieurs études sont actuellement menées pour comparer le traitement néoadjuvant avec une résection chirurgicale initiale suivie d'un traitement adjuvant.

b- Tumeurs localement avancées

Au moins un tiers des patients atteints d'un PDAC présentent une maladie localement avancée, généralement associée à une atteinte vasculaire étendue qui empêche une résection

chirurgicale. Le traitement comprend principalement une chimiothérapie systémique telle que la gemcitabine plus nab-paclitaxel ou FOLFIRINOX [139]. Bien qu'une minorité de patients présentant une très bonne réponse à la chimiothérapie puisse être éligible à une résection chirurgicale, la grande majorité présente une maladie incurable. L'étude LAPACT a évalué une chimiothérapie d'induction par gemcitabine plus nab-paclitaxel chez les patients atteints d'une maladie localement avancée, suivie pour les patients dont la maladie n'a pas progressé, de la poursuite de la chimiothérapie, de la radiochimiothérapie ou de la chirurgie, au choix de l'investigateur [140]. La durée médiane jusqu'à l'échec du traitement était de 9 mois (IC à 90 % : 7,3-10,1), avec une survie globale médiane de 18,8 mois (15-24). Une résection chirurgicale a été proposée à 17 des 107 patients inscrits (16%), avec un taux de résection R0 de 41%.

Cependant, le rôle de la radiochimiothérapie chez les patients atteints d'une maladie localement avancée est encore incertain, car les études ont donné des résultats mitigés [141,142]. L'essai LAP07 a conclu que la radiochimiothérapie ne prolongeait pas la survie des patients atteints d'une tumeur localement avancée après un traitement par chimiothérapie systémique (gemcitabine avec ou sans erlotinib), bien que les patients traités par radiochimiothérapie aient connu de meilleurs taux de contrôle local et une durée plus longue sans traitement [143]. Ces conclusions pourraient évoluer prochainement, en particulier dans le contexte des nouveaux schémas de chimiothérapie combinée et des techniques de radiothérapie améliorées telles que la radiothérapie stéréotaxique.

c – Maladie métastatique

Environ 50% des patients PDAC présentent des métastases au moment du diagnostic. La chimiothérapie systémique reste le principal traitement dans le but de pallier les symptômes liés à la tumeur et de prolonger la durée de vie. Le FOLFIRINOX a été comparé à l'ancien standard de traitement, la gemcitabine, dans un essai randomisé de phase III portant sur 342 patients atteints d'un PDAC métastatique non traité [144]. Le FOLFIRINOX a amélioré la survie globale médiane de 6,8 à 11,1 mois (HR 0,57 ; 95% IC 0,45-0,73 ; $p < 0,001$). Deux ans plus tard,

les résultats d'une autre étude de phase 3 de première ligne ont été publiés, comparant la gemcitabine plus nab-paclitaxel à la gemcitabine seule [145]. La survie globale médiane dans le bras de la double chimiothérapie était de 8,5 mois contre 6,7 mois dans le bras de monothérapie (HR 0,72 ; $p < 0,001$). Bien que le FOLFIRINOX et la gemcitabine plus nab-paclitaxel n'aient jamais été comparés dans un essai clinique, des analyses rétrospectives indiquent que les patients plus jeunes et en meilleure forme physique sont plus susceptibles de recevoir le FOLFIRINOX et tendent à avoir une meilleure survie globale que la gemcitabine plus nab-paclitaxel [146,147]. La monothérapie par gemcitabine reste une option pour les patients dont l'état de performance ou les comorbidités empêchent une chimiothérapie combinée. La seule thérapie de seconde ligne pour le PDAC métastatique qui a montré un avantage de survie dans une étude de phase 3 est l'association de fluorouracile plus leucovorine avec l'irinotecan nanoliposomal. Dans l'essai NAPOLI-1, on a constaté que les patients atteints de maladie métastatique qui avaient progressé après un traitement à base de gemcitabine avaient une survie médiane globale plus longue avec l'association fluorouracile plus leucovorine et irinotecan nanoliposomal qu'avec l'association fluorouracile plus leucovorine (61 mois contre 42 mois, HR 0,67 ; $p = 0,012$) [148].

d – Nouvelles pistes thérapeutiques / thérapies ciblées

Des mutations germinales ou somatiques des gènes *BRCA1* ou *BRCA2* sont présentes chez 5 à 9% des patients atteints de PDAC [149,150,104]. Les données sur le cancer du pancréas et de l'ovaire indiquent que la réponse aux inhibiteurs de PARP (PARPi) semble être meilleure chez les patients dont le gène *BRCA1* ou *BRCA2* est muté et qui présentent une sensibilité aux sels de platine [151,152]. Ces résultats ont conduit à l'étude POLO, évaluant le rôle de l'olaparib, un PARPi, en traitement d'entretien chez les patients porteurs de mutations germinales de *BRCA1* ou *BRCA2* qui ne progressaient pas après au moins 16 semaines de chimiothérapie de première ligne à base de platine [153]. Comparé au placebo, l'olaparib a amélioré la survie médiane sans progression de 3,8 à 7,4 mois (HR 0,53 ; $p = 0,004$). Aucune différence de survie globale entre les groupes n'a été constatée, bien que les données de survie ne soient pas arrivées à maturité au moment de la publication. Fin 2019, l'olaparib a été approuvé aux États-

Unis pour une utilisation dans cette indication – représentant alors la première thérapie ciblée basée sur les biomarqueurs approuvée pour le cancer du pancréas [154]. D’autres PARPi sont en cours d’évaluation dans des études cliniques de phase I et II.

Aucun traitement d’immunothérapie n’a pour le moment été approuvé sans la prise en charge du PDAC. Cependant, de nombreuses études cliniques sont en cours pour évaluer l’intérêt de plusieurs traitements incluant des approches immunologiques à divers stades de la maladie (**Tableau 4**). Outre les maintenant classiques inhibiteurs de checkpoint kinases (atezolizumab, pembrolizumab), des approches innovantes basées sur l’utilisation de virus oncolytiques ou de lymphocytes T chimériques sont également testées cliniquement.

Tableau 4 : Etudes cliniques évaluant l’intérêt de traitements incluant une approche immunitaire pour la prise en charge du cancer du pancréas (Liste non exhaustive).

Traitement	Stade tumoral	Phase	Objectif principal	Référence Clinicaltrial.gov
Vaccin antitumoral personnalisé plus atezolizumab suivi par FOLFIRINOX	Resectable	Phase I	Sureté	NCT04161755
Talimogene laherparepvec intratumoral	Localement avancé et métastatique	Phase I	MTD	NCT03086642
huCART-meso (CART) avec ou sans cyclophosphamide	Localement avancé et métastatique	Phase I	Sureté	NCT03323944
Transduction intratumorale de virus oncolytique et interleukine 12 plus chimiothérapie	Métastatique	Phase I	Sureté	NCT03281382
Lymphocytes T cytotoxiques spécifiques de la tumeur (antigène associé à la tumeur)	Résécable, localement avancé et métastatique	Phase I/II	Tolérance / sureté	NCT03192462

LOAd703 (adénovirus oncolytique) et gemcitabine plus nab-paclitaxel avec ou sans atezolizumab	Localement avancé et métastatique	Phase I/II	Dose toxique limite	NCT02705196
Radiochimiothérapie par capécitabine avec ou sans pembrolizumab	Résécable et borderline	Phase I/II	Dose toxique limite / Caractérisation des lymphocytes infiltrants	NCT02305186
FOLFIRINOX plus radiothérapie stéréotaxique néoadjuvant avec ou sans losartan et nivolumab	Résécable, borderline ou localement avancé	Phase II	Taux de résection R0	NCT03563248
GVAX néoadjuvant avec ou sans cyclophosphamide	Résécable	Phase II	Sureté / Caractéristiques des lymphocytes T	NCT00727441
Nivolumab et cabiralizumab plus radiothérapie stéréotaxique	Localement avancé	Phase II	Sureté / Taux de résection	NCT03599362
Anetumab ravtansine	Localement avancé et métastatique	Phase II	Taux de résection	NCT03023722
GVAX et cyclophosphamide plus radiothérapie stéréotaxique	Localement avancé	Phase II	Survie sans métastase	NCT02648282
GVAX et cyclophosphamide avec ou sans nivolumab plus urelumab (agoniste CD137)	Résécable	Phase II	Production d'IL17A par les agrégats lymphoïdes	NCT02451982
Chimiothérapie avec ou sans cabiralizumab et nivolumab	Localement avancé et métastatique	Phase II	Survie sans progression	NCT03336216
FOLFOX avec ou sans pegilodécakine	Métastatique	Phase III	Survie globale	NCT02923921

CART : Chimeric antigen receptor T

GVAX : Cellules pancréatiques allogéniques sécrétantes de GM-CSF.

I – C Les substances bioactives issues de l'alimentation (BFCs) et leur intérêt en cancérologie digestive

I - c - 1 BFCs et cancer colorectal : Article de revue

Bioactive food components for colorectal cancer prevention and treatment: A good match

Samuel Amintas^{a,b,c}, Charles Dupin^{a,b,d}, Julian Boutin^{a,b,e}, Pauline Beaumont^f, François Moreau-Gaudry^{a,b,e}, Aurélie Bedel^{a,b,e}, Stéphanie Krisa^f, Véronique Vendrely^{a,b,d} and Sandrine Dabernat^{a,b,e}

^aBordeaux University, Bordeaux, France; ^bINSERM U1312, BoRdeaux institute In onCology - BRIC, Bordeaux, France; ^cTumor Biology and Tumor Bank Laboratory, Bordeaux University Hospital, Bordeaux, France; ^dRadiotherapy Department, Bordeaux University Hospital, Bordeaux, France; ^eBiochemistry Laboratory, Bordeaux. University Hospital, Bordeaux, France; ^fUR Oenologie, INP, ISVV, Villenave d'Ornon, France

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) is the third most frequent cancer worldwide, accounts for about 10% of the total cancer cases, and ranks as the second cause of death by cancer. CRC is more prevalent in developed countries in close causal relation with occidental diets. Due to anatomy, the diet has a strong impact on CRC. High contents in meat are acknowledged risk factors whereas a diet rich in fruits and vegetables is an established CRC protective factor. Fruits and vegetables contain numerous Bioactive Food Components (BFCs), physiologically active food compounds, beneficial on health. Preventive and therapeutic benefits of BFCs in cancer have increasingly been reported over the past 20 years. BFCs show both chemopreventive and anti-tumor properties in CRC but more interestingly, abundant research describes BFCs as enhancers of conventional cancer treatments. Despite these promising results, their clinical transferability is slowed down by bioavailability interrogations and their poorly understood hormetic effect. In this review, we would like to reposition BFCs as well-fitted for applications in CRC. We provide a synthetic overview of trustworthy BFC applications in CRC, with a special highlight on combinatory approaches and conventional cancer treatment potentiation strategies.

KEYWORDS

Bioactive food; cancer prevention; combination cancer treatment; curcumin; natural compounds; resveratrol

Introduction

Colorectal cancer (CRC) is the third most frequent cancer worldwide, accounting for about 10% of the total cancer cases and ranks as the second cause of death by cancer. CRC is present especially in developed countries with about 60% of all CRC cases (Parkin et al. 2002). This high incidence was proven associated with occidental highly caloric diets (Ryan-Harshman and Aldoori 2007; Jin and Zhang 2020). Diet-linked CRC risk factors are multiple. Among them, important consumption of meat either red, processed, or cooked at high temperature (fried, broiled, or grilled) can increase the risk of developing CRC by up to 30 times (Imperial College London 2018). Conversely, regular physical activity and diets rich in fruits and vegetables are the main established CRC-specific protective factors (Imperial College London 2018).

Literature reports sufficient evidence to link obesity and higher risk of CRC, especially in men with low physical activity (Johnson and Lund 2007; Sawicki et al. 2021). The pathophysiological bases (Yang et al. 2022) include pro-oncogenic adipocyte metabolism (associated with lipid oxidation and energy storage) (Schwartz and Yehuda-Shnaidman 2014), low and chronic inflammation associated with pro-inflammatory cytokines secretion (Reilly

and Saltiel 2017) and, stimulation of colorectal cell proliferation by adipokines and hormones (such as insulin) (Chen et al. 2011; Chen et al. 2018). In this context, unhealthy food consumption is closely related to obesity, and increases the risk of CRC development.

The relationship between health and food regained intensive attention during the last 20 years to set the basis of numerous studies, first focusing on the cardiovascular impact and neurodegenerative diseases. The Mediterranean diet was early recognized as beneficial for health and nutrition (Altomare et al. 2013). Rich in fruits and vegetables, it prevents chronic cardiovascular diseases and several malignancies (reviewed in (Mentella et al. 2019; Widmer et al. 2015):). In parallel, the concept "French paradox" emerged, based on the observation that French people have a relatively low incidence of coronary heart diseases despite a rich diet, but including a moderate and regular consumption of red wine (Renaud and de Lorgeril 1992). Even if this theory was later refuted (Griswold et al. 2018), it triggered the identification of protective compounds in the wine and vine, and more broadly, in food.

The Bioactive Food Components (BFCs) are "physiologically active food compounds, derived from animal or plant sources, including compounds belonging to the food of a basic diet, for which a role has been shown to be healthy

CONTACT Samuel Amintas  samuel.amintas@u-bordeaux.fr; Sandrine Dabernat  sandrine.dabernat@u-bordeaux.fr

© 2022 The Author(s). Published with license by Taylor & Francis Group, LLC.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, and is not altered, transformed, or built upon in any way.

and the consumption of which is not harmful to health," according to the American Dietetic Association (Hasler et al. 2004). Noticeably, some BFCs have been long known in traditional medicines. For instance, *Curcuma longa*, with high content of curcumin, is widely used in India and China as a natural herbal remedy (reviewed in Hatcher et al. (2008)). Interestingly, most BFCs exhibit hormesis, characterized by opposite effects at low and high doses, because of their anti/pro-oxidative properties.

Preventive and therapeutic benefits of BFCs in cancer have increasingly been reported over the past two decades in particular with regards to CRC (Figure 1). Noticeably, BFCs showed both chemopreventive and anti-tumor properties in CRC (Yin et al. 2016; Ahmed et al. 2019) contributing to the general concept that a healthy way of life, including a balanced diet, is protective of CRC. Moreover, abundant literature describes BFCs as enhancers of conventional treatment efficiency in multiple cancers, suggesting a true biological relevance. Paradoxically, this profusion of information overflows important clues, hormesis adding confusion, which hinders their transfer to clinical applications. As our team gained expertise and improved comprehension of BFCs validity in cancer treatment, we would like to provide a synthetic overview of selected trustworthy applications in CRC deserving attention, with a special highlight on combinatory approaches.

Literature and clinical trial searching process

Systematic literature searches of articles published between 2000 and October 2021 were performed in the electronic PubMed database from the American National Institute of Health and the Google Scholar database. The searches were conducted using medical subject headings (MeSH: "colorectal cancer" or "colon cancer" or "rectal cancer" combined with "resveratrol" or "sulforaphane" or "quercetin" or curcumin" or "capsaicin") and free-text words and limited to articles

published in the English language in indexed and peer-reviewed journals.

A clinical trial search was performed using the clinicaltrials.gov website. To select international studies of interest, "colorectal cancer" was selected as the condition of interest, and either "resveratrol" or "sulforaphane" or "quercetin" or curcumin" or "capsaicin" keywords were used in the "other terms" section.

Main phytochemical BFC categories and compounds

As the "Bioactive Food Components" term brings together a wide range of molecules, originating from both plant and animal sources, it seems vain and counter-productive to provide an exhaustive list. We chose to focus on three major categories of BFCs carrying the most convincing level of evidence for utility in CRC prevention and treatment.

Polyphenols, the most studied bioactive food group in the field of cancerology, are present in most diets, at around 1 gram per day. They are mainly provided by fruits, vegetables, wine, tea, and chocolate (Manach et al. 2004). They contribute to the organoleptic properties of the leaves, fruits, and processed products such as wine or olive oil. Three main classes are studied in oncology: Phenolic acids, Flavonoids, and Stilbenes. Phenolic acids are phenolic compounds with one or more carboxylic acid groups, present for instance in coffee, red fruits, and onions. These include Curcumin, a derived BFC of the spice turmeric, with promising applications in oncology (Giordano and Tommonaro 2019). Flavonoids are found in onions and broccoli and are constituted by two benzene rings linked by a heterocycle. Among them, Quercetin showed recurrent beneficial anti-cancer effects (Rather and Bhagat 2020). Stilbenes are chemically close to flavonoids. They include resveratrol and its derived such as hydroxylated derivatives (piceatannol), dimerized derivatives (ϵ -viniferin and δ -viniferin), and other

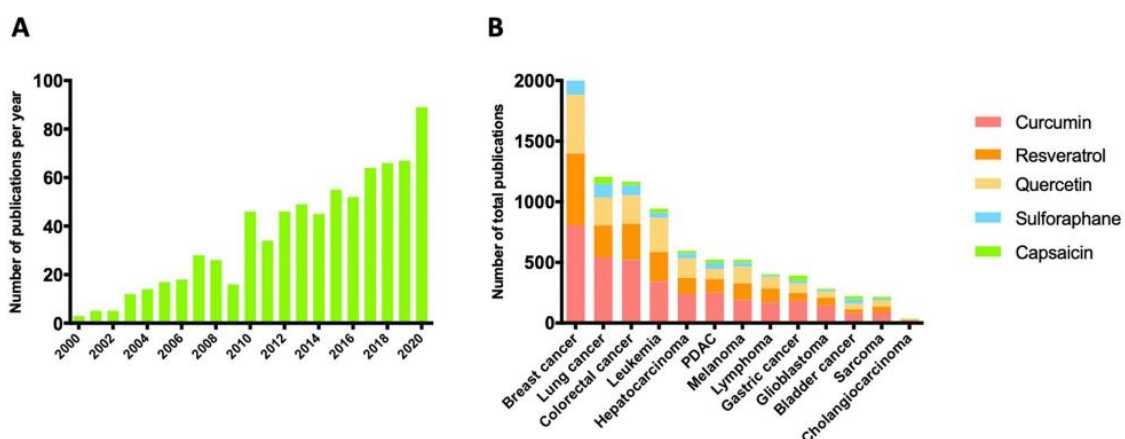


Figure 1. BFCs and cancers. (A) Number of reported publications per year in PubMed using the key words "cancer" and "bioactive food component" from January 2000 to December 2020. (B) Number of total reported publications in PubMed including key words "breast cancer" or "lung cancer" or "colorectal cancer" or "leukemia" or "hepatocarcinoma" or "melanoma" or "pancreatic ductal adenocarcinoma" (PDAC) or "lymphoma" or gastric cancer" or glioblastoma" or bladder cancer" or sarcoma" or "cholangiocarcinoma" and "curcumin" or "quercetin" or "resveratrol" or "capsaicin" or "sulforaphane" from January 2000 to December 2020.

oligomers (vitisin B) for example. They are present in some fruits like blackberries, peanuts, and more particularly in grapes and their derivative products such as red wine. The properties of resveratrol have been widely studied in cancer demonstrating both chemopreventive and anti-cancer activity (Vervandier-Fasseur and Latruffe 2019; Berretta et al. 2020).

Heterosides are glycosylated derivatives of terpenes, phenols, and, more rarely, alkaloids. Glucosinolates, present in cruciferous vegetables like cabbage and broccoli, are hydrolyzed into bioactive isothiocyanates, including sulforaphane, with antioxidant properties potentially relevant for the prevention of neurodegenerative diseases (Tarozzi et al. 2013) and cancers (Grabacka, Gawin, and Pierzchalska 2014).

Alkaloids are basic nitrogen compounds extracted from plants. They provide medicine like morphine or the vincristine and taxol chemotherapies. They also count BFCs such as quinine and caffeine. Capsaicin, naturally occurring in chili peppers, represents the most current edible alkaloid of interest in cancerology applications.

BFCs in colorectal cancer prevention

Prevention of CRC has important public health implications and the influence of the diet has now been documented for many years. Several risk factors have been highlighted such as important consumption of meat or chronic alcohol consumption (Imperial College London 2018). The lower CRC frequency in Mediterranean countries positioned the Mediterranean diet as chemopreventive (Reviewed in Farinetti et al. (2017)). Particularly rich in fruits and vegetables, this diet naturally contains many BFCs, especially polyphenols such as resveratrol and quercetin (Medina-Remón et al. 2017; Bagetta et al. 2020), conferring strong chemoprevention of CRC onset (Imperial College London 2018; Couto et al. 2011).

Anti-inflammatory properties

A wide range of BFCs is known to exert anti-inflammatory properties in many diseases and in particular cancer (Kim et al. 2009). Their activities take place at different levels of the inflammation process with for instance up-regulation of anti-inflammatory cytokines (Nguyen et al. 2006; Song et al. 2014) or downregulation of pro-inflammatory interleukin and enzyme synthesis, such as TNF-alpha and cyclooxygenase II (Manna, Mukhopadhyay, and Aggarwal 1950; Xagorari et al. 2001; Tong et al. 2005). Thus, BFCs can participate to maintain the balance between pro and anti-inflammatory mediators. They exhibit chemopreventive properties and could oppose CRC development by limiting chronic inflammation of intestine tissues (Arya, Kanthlal, and Linda 2020; Jantan et al. 2021). For instance, resveratrol and other dietary polyphenols downregulated inflammation-related enzymes and cytokines (Yin et al. 2016; Liang et al. 2001). The Association of curcumin and sulforaphane also exhibited a synergistic anti-inflammatory effect by induction of phase II antioxidant enzymes and down-regulation of pro-inflammatory cytokines like Tumor Necrosis Factor (TNF), nitric oxide (NO), or

Prostaglandin E₂ (PGE₂) (Cheung, Khor, and Kong 2009). In another study, colorectal inflammation levels in mice under a classic diet were compared to that of a diet enriched in 4 BFCs including curcumin. The BFC-enriched diet group showed significantly reduced number and size of solid lesions, decreased histological inflammation scores, lowered pro-inflammatory cytokine mRNA expression, decreased number of low-grade dysplasia and high-grade dysplasia areas, as compared to the classic diet group (Girardi et al. 2018), suggesting a systemic effect of the BFC-enriched diet. In a colitis mouse model, oral administration of microencapsulated quercetin, preventing its absorption by the small intestine, led to decreased intestinal neutrophil recruitment, as well as diminution of histological alterations and macroscopical damages (Guazelli et al. 2013). Reduction of Interleukin 33 (IL-33) and IL-10 production also contributed to the anti-inflammatory effect. Interestingly, these results were not observed with free quercetin. Thus, quercetin absorption (and potent metabolism) by enterocytes seemed to impede its anti-inflammatory properties in the colon. Thus, BFCs seem to be able to reverse the inflammatory imbalance of digestive tissues and contribute to the prevention of CRC development.

Genetic stability

In non-cancer cells, resveratrol and other related polyphenols contributed to stabilizing histones H2AX and reduced replication stress-associated DNA double-strand breaks (DSB), resulting in increased genome stability of mouse embryonic fibroblasts and the prevention of gene mutations in the p53 pathway (Matsuno et al. 2020). In the same way, curcumin prevented telomere shortening and limited micronucleus formation in a transgenic model of Alzheimer's disease (Thomas et al. 2009).

In CRC, mutant-APC mice fed with a curcumin-containing high-fat diet (HFD) displayed a significant reversion of HFD-induced polyps (Pettan-Brewer et al. 2011). Capsaicin was administrated to Wistar rats before and after treatment with 1,2-dimethylhydrazine (DMH), a DNA methylating agent known for its carcinogenesis properties (Caetano et al. 2018). The number and frequency of colorectal preneoplastic lesions were reduced in the capsaicin-treated group, suggesting that DMH genotoxicity was attenuated by capsaicin. In the same way, quercetin prevented DMH-induced colorectal inflammation and tumor development through the modulation of Wnt and nuclear factor erythroid-2-related factor 2 (NRF2) signaling pathways (Darband et al. 2020; Shree, Islam, and Sultana 2021). The chemopreventive role of a diet containing curcumin was also demonstrated in the healthy intestine. Mice receiving curcumin displayed fewer preneoplastic events, with reduced DNA damage in differentiated cells, possibly because DNA-damaged-Lgr5⁺ intestinal stem cells were more prone to apoptosis (Kim et al. 2019).

BFCs in colorectal cancer treatment

BFCs present direct antitumor properties on CRC, closely related to compound concentration and involving

multiple cellular mechanisms. While low concentrations of BFCs seem to contribute to tumor prevention through their anti-oxidative properties, direct anti-tumor effects call for high compound concentrations and oxidative stress.

Upregulation of reactive oxygen species

Reactive oxygen species (ROS) are major determinants of the cell redox homeostasis and BFCs are potent modulators of ROS generation. ROS upregulation was commonly responsible for the colorectal antitumoral properties of BFCs. For instance, resveratrol and curcumin are pro-apoptotic for colorectal tumor cell lines *in vitro* in a ROS-dependent manner (Juan et al. 2008; Blanquer-Rosselló et al. 2017; Wang et al. 2017; Sritharan and Sivalingam 2021). Quercetin-induced ROS and derivatives positively modulated endoplasmic reticulum (ER) stress, especially by calcium transfer from the endoplasmic reticulum to mitochondria triggering intrinsic apoptosis (Khan et al. 2016).

Other cell death pathways may contribute, such as autophagy which was enhanced by ROS upregulation in human colon cancer cells treated with resveratrol (Miki et al. 2012). Oxidative stress induced by the flavonoid apigenin resulted in p53-independent senescence through p16, retinoblastoma protein (pRb), and p21 modulation (Banerjee and Mandal 2015).

BFCs contribute to ROS increase by direct regulation of enzymes involved in oxidative stress response. Resveratrol inhibited catalase and superoxide dismutase (SOD), both involved in ROS scavenging (Santandreu et al. 2011). By contrast, quercetin enhanced cyclooxygenase 2 (COX-2) activity, resulting in ROS generation upregulation and cytotoxicity increase on colorectal tumor cell lines (Raja et al. 2017).

DNA damages generation

One of the most deleterious effects of ROS is their ability to induce DNA damages when present at high concentrations in the nucleus. This observation set the basis of studies aiming at evaluating BFC-induced DNA damages. For instance, resveratrol was reported to increase the phosphorylation of histone gamma-H2AX, a chromatin modification mark at double-strand breaks (DSB), needed to initiate DSB DNA repair (San Hipólito-Luengo et al. 2017). In the same way, curcumin markedly increased DNA damage as measured by alkaline comet assay (Lu, Cai, and Ding 2011). When possible, DNA damages are resolved to preserve genomic integrity. BFCs hinder DNA repair, leading to synergistic toxicity by the direct increase of DNA damages and concomitant DNA repair inhibition. Sulforaphane analogs increase phosphorylation of histone gamma-H2AX, inhibit homologous recombination (HR), and non-homologous end joining (NHEJ) repair activities, notably by affecting the HAT/HDAC balance and histone acetylation status (Okonkwo et al. 2018). This cytotoxic synergy was also reported in other digestive cancers (Vendrely et al. 2019).

Cell cycle arrest

Because of unresolved DNA damage accumulation and inhibition of DNA repair pathways, BFCs also affect the cell cycle. The majority of studies found a typical accumulation of cells in the G2/M phase (Adams et al. 2005; Cheah et al. 2018; Wu, Yi, et al. 2019; Jozkowiak et al. 2020). The p53 pathway activation in stress conditions played a major role in cell cycle arrest. Resveratrol upregulated the Su(var)3-9, Enhancer-of-zeste and Trithorax (SET) domain-containing lysine methyltransferase 7/9 (SET7/9) in colorectal cell lines, which stabilized p53 by mono-methylation at lysine 372 (Liu et al. 2019). A resveratrol analog up-regulated p53 and p21 with subsequent cell cycle arrest and apoptosis (Cheah et al. 2018), as did capsaicin (Jin et al. 2014). Interestingly, looking deeper into the TP53/ATM/ATR DNA damage response pathway, curcumin-induced G2/M cell cycle arrest was not reversed by caffeine, an inhibitor of the ATM/ATR proteins, suggesting that additional pathways may be modulated (Lu, Cai, and Ding 2011).

Invasion and metastasis inhibition

Inhibition of tumor cell dissemination takes a large part of the BFC literature. For instance, resveratrol strongly impacted the epithelial to mesenchymal transition (EMT) by interfering with AKT, Wnt, TNF- β , or TGF- β signaling pathways (Ji et al. 2013; Ji et al. 2015; Yuan et al. 2019; Buhrmann et al. 2019). Metastasis inhibition by resveratrol involved focal adhesion protein suppression (Buhrmann et al. 2017) and overexpression of the translation inhibitor RNA binding protein tristetruprolin (TTP) (Lee et al. 2018). Oxyresveratrol, a natural hydroxyl derivative of resveratrol, modulated EMT-related miRNAs, resulting in EMT inhibition and cell migration reduction (Lin et al. 2021). More recently, up-regulation of miR-200c and associated target EPM5, a DNA binding histone-like protein, was the effector of curcumin-related EMT downregulation (Wang, Cai, et al. 2020). Curcumin downregulated the transcription of oncogenic microRNA miR-21 to inhibit invasion and metastasis of HCT116 cells in a chicken-embryo-metastasis assay (Mudduluru et al. 2011). Likewise, the inhibition of the TGF- β pathway by quercetin compromised EMT resulting in invasion/metastasis inhibition (Feng et al. 2018). The antimetastatic effect of curcumin, quercetin and their derivatives were described in several studies (Kee et al. 2016; Li et al. 2018; Calibasi-Kocal et al. 2019).

The interest of combination for BFCs

Unlike the majority of the studies, only a few reported effects of molecules used in combination. This topic was reviewed recently for chemoprevention (Rizeq et al. 2020). BFCs share common antitumor effectors leading to ROS induction or apoptosis but the upstream sequences of events seemed compound-dependent. Thus, combining different BFCs may carry additive or synergistic activities. In

this way, combining curcumin with different BFCs enhanced global antitumor efficiency in different CRC models (Ravindranathan et al. 2018; Wu, Koh, et al. 2019). With resveratrol curcumin induced a greater impairment of epithelial growth factor receptor (EGFR) constitutive activation (Majumdar et al. 2009) and upregulation of several genes involved in apoptosis (Gavrilas et al. 2019). Similarly, four BFCs (Lycopene, Sulforaphane, Quercetin, and Curcumin) displayed additive proliferation inhibition while no toxic effect was observed for normal colon epithelial cells (Langner, Lemieszek, and Rzeski 2019). In a clinical setting, the combination treatment of quercetin and curcumin significantly decreased polyp number and size after 6 months of treatment of adenomatous polyposis coli (APC) patients (Cruz-Correa et al. 2006), with minimal adverse side effects and no routine biological parameters abnormalities.

BFCs as adjuvant agents for potentiation of conventional CRC treatments

BFCs may enhance the efficiency of conventional therapies, in numerous cancers (Lin et al. 2020). Combinations of BFCs were tested in CRC with chemotherapy, radiotherapy, or targeted therapies.

Chemotherapy

Colorectal cancer treatment includes surgery and chemotherapy (Recio-Boiles and Cancer 2020). Indications depend on the location, stage, histology, and patient's general condition. The common chemotherapies include 5FU, irinotecan, oxaliplatin, doxorubicin, and capecitabin, often combined for better efficiency. BFCs and chemotherapies target common tumor cell key functions (Figure 2). Improvement of chemotherapy antitumor activity by BFCs would greatly benefit patient management, especially if they do not carry systemic toxicity. This is particularly true for fragile patients for whom this strategy may allow to maintain disease control while reducing chemotherapy doses.

Several signaling pathways were regulated by BFCs with 5FU (Du et al. 2006; Marjaneh et al. 2018; Buhrmann et al. 2018; Chung et al. 2018; Zheng et al. 2021). For example, quercetin enhanced 5FU-induced apoptosis by overexpression of p53 in a CRC microsatellite instability (MSI) positive cell line. This was further supported by the fact the apoptosis enhancement disappeared in p53 deficient/knockdown CRC cell lines (Xavier et al. 2011). Up-regulation of cell-cell junction protein expression by resveratrol together with down-regulation of the NF- κ B pathway led to inhibition of EMT and chemosensitization to 5FU (Buhrmann et al. 2015). Ginkgetin, a flavone BFC mainly isolated from *Ginkgo*

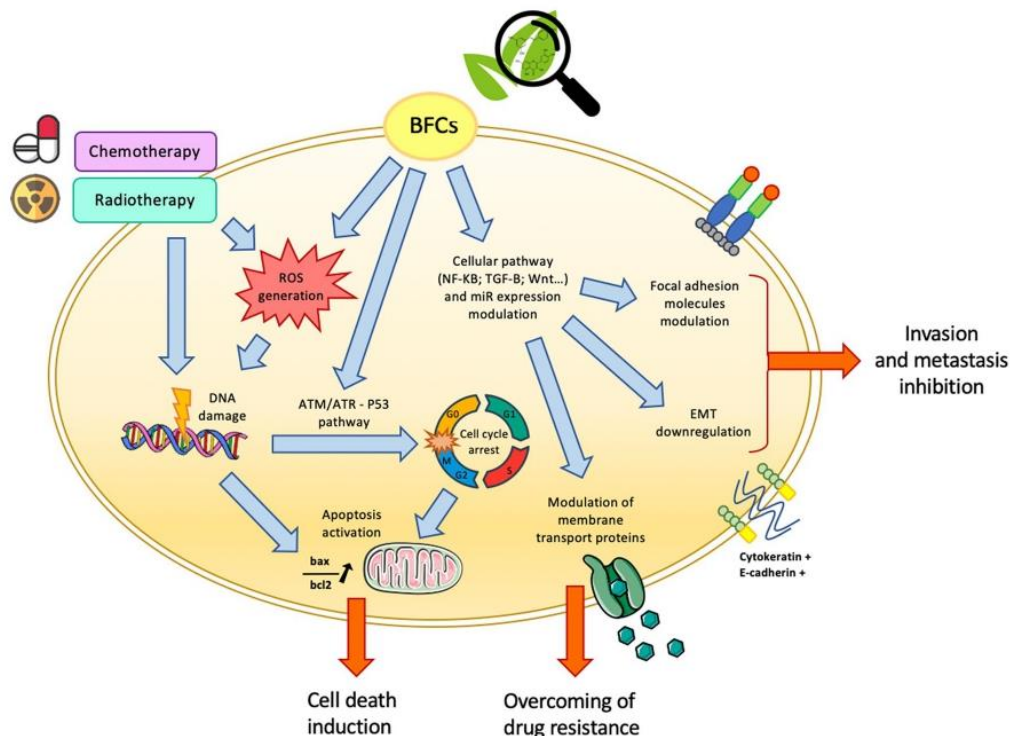


Figure 2. Bioactive food components (BFCs) as adjuvant agents for potentiation of conventional colorectal cancer (CRC) treatments. BFC and standard CRC treatments (chemotherapy/radiotherapy) target common tumor cell key functions. In particular, BFCs, as well as chemo and radiotherapy, induce oxidative stress associated with reactive oxygen species generation and DNA damages. BFCs are also able to modulate various signaling pathways resulting in, for instance, cellular cycle arrest, apoptosis induction and epithelial to mesenchymal transition (EMT) downregulation. Moreover, modulation of membrane transport proteins by BFCs can lead to reduce tumor drug resistance to standard chemotherapy treatments.

biloba, and resveratrol suppressed VEGF-induced endothelial cell proliferation, migration, and invasion (Hu et al. 2019). They exerted a synergistic anti-tumor activity with 5FU by decreasing microvessel density inside the tumors. Concomitantly, combination treatment synergistically relieved the 5FU-induced inflammatory response by suppressing the expression of COX-2 and inflammatory cytokines. Quercetin and ellagic acid decreased human CRC cell proliferation, involving DNA damage and cell cycle modulation, to increase 5FU cell sensitivity. Moreover, tumors harboring *BRAF* mutations may be more responsive to vine pruning residues (VPE) than *KRAS* mutated tumors, suggesting that BFCs' properties depend on CRC major oncogenic pathways (Jesus et al. 2020).

CRC oxaliplatin chemosensitization was reported mostly for curcumin and its derivatives. Recently, oxaliplatin and curcumin co-treatment not only increased chemotherapy efficiency but also abolished oxaliplatin resistance (Patel et al. 2008; Chen et al. 2017; Han et al. 2020). Sulforaphane sensitized colon cancer cells to oxaliplatin-induced cell growth inhibition by both intrinsic and extrinsic apoptosis and programmed necrosis (Kaminski et al. 2011). WZ26, a curcumin synthetic analog, combined with cisplatin significantly inhibited tumor growth while attenuating body weight loss observed with cisplatin treatment (Zhang et al. 2019).

As oxaliplatin, doxorubicin is known to reach limited efficacy in CRC due to multi-drug resistance. Resveratrol inhibited the P-glycoprotein efflux pump activity, a transmembrane protein responsible for the multiple drug resistance, leading to accumulation of doxorubicin in tumor cells. More interestingly, *MDR1* gene (coding for P-glycoprotein) expression remained stable under resveratrol treatment, suggesting direct ATPase inhibition (Khaleel et al. 2016). Quercetin enhanced the doxorubicin antitumor effect by downregulating the expression of the P-glycoprotein (Zhou et al. 2020). In a C26 colon carcinoma murine model, a PEGylated liposomal curcumin and doxorubicin combination demonstrated enhanced antitumor activity through suppressive effects of angiogenesis, inflammation, invasion, and resistance to apoptosis (Sesarman et al. 2019). Moreover, dysregulation of the Th1/Th2 cell axis in the tumor micro-environment favored the antineoplastic phenotype.

In CRC and other cancer types, cancer stem cells (CSCs) are classically responsible for treatment resistance. Therefore, the impact of BFCs on CSCs was investigated. Quercetin targeted C133⁺ CSCs of the HT-29 CRC cell line, especially by promoting cell cycle arrest and apoptosis (Atashpour et al. 2015). Similarly, curcumin significantly attenuated chemoresistance in an irinotecan-resistant LoVo CRC cell line (Su et al. 2018). A significant reduction of the expression levels of CSC-specific markers, associated with more apoptosis, occurred only in curcumin-treated tumor cells.

As mentioned before, CRC chemotherapy classically combines several molecules for more efficiency. Rather than testing combinations of BFCs and individual chemotherapies, the impact of curcumin was assessed in combination with FOLFOX, the association of 5FU, oxaliplatin, and folinic acid, commonly used for the treatment of CRC. A sequence treatment of FOLFOX followed by curcumin greatly reduced

survival of HCT116 and HT-29 CRC cells by particular targeting of FOLFOX-resistant cells through inhibition of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) and Insulin Growth Factor 1 receptor (IGF-1R) (Patel, Gupta, et al. 2010). At the clinical level, conventional chemotherapeutic regimens associated with curcumin emerges as a potential strategy to prevent chemoresistance of colon cancer cells, as exemplified by the randomized phase IIa clinical study (Howells et al. 2019), with the primary outcome assessing the safety of curcumin for patients receiving either FOLFOX or CUFOX (curcumin + FOLFOX). Similar adverse event profiles were observed in both arms, confirming curcumin safety. Importantly, overall survival (OS) was improved in the CUFOX arm (502 versus 200 days). However, these results deserve careful consideration and external validation because of the small cohort size (28 patients).

Radiotherapy

Although radiotherapy has limited indications for colon cancer, it is almost systematically used in the management of rectal cancer. Neoadjuvant treatments classically associate radiotherapy and chemotherapy to reduce tumor volume before surgical procedure. In addition to chemosensitization, some BFCs exhibit CRC radiosensitization, notably by oxidative stress-associated DNA damage generation (Figure 2). Modulation of CRC radiosensitivity by curcumin was evidenced in 2 mouse models (Kunnumakkara et al. 2008; Yang et al. 2018). Both studies reported enhancement of radiotherapy efficacy when combined with curcumin through NF- κ B pathway downregulation, apoptosis, angiogenesis, and DNA repair inhibition. Interestingly, curcumin also suppressed post-irradiation NF- κ B activation and associated pro-survival response in human CRC cell lines (Sandur et al. 2009). Radiosensitization by BFCs like quercetin and resveratrol were recently confirmed in several tumor types (Vendrey et al. 2019; Lin et al. 2012; Amini et al. 2020).

Precision medicine

With the late development of precision medicine, the management of CRC becomes tailor-made, according to the tumor and patient specificities. The role of precision medicine in the management of digestive cancers was detailed in a recent publication (Matsuoka and Yashiro 2020). Regorafenib, a tyrosine kinase inhibitor approved by Food and Drug Administration (FDA) for CRC treatment, the antitumoral effect was enhanced by curcumin in the *KRAS* mutant HCT116 cell line, through autophagy and apoptosis. Curcumin acted as a MEK inhibitor. Interestingly, the *KRAS* wild-type HT-29 CRC cell was not responsive, suggesting that *KRAS* status influenced the curcumin potentiating effect (Wu, Wu, et al. 2019). Combination treatment of curcumin and dasatinib reduced cell growth, invasion, and colonosphere formation accompanied by chemosensitization of the cancer stem cell subpopulation (Nautiyal et al. 2011). Similarly, resveratrol sensitized CRC tumor cells to the anti-EGFR cetuximab (Wang, Wang, et al. 2020).

The immunomodulatory properties of BFCs seemed beneficial in combination with checkpoint inhibitors (Deng et al. 2020). For example, combination treatment of curcumin and sildenafil increased anti-PD1 antibody efficiency in a CRC mouse model (Dent et al. 2020). Moreover, BFCs combination reduced tumor expression of PD-L1 and increased that of Class I human major histocompatibility complex (HMC). Resveratrol enhanced natural killer (NK) lymphocyte antitumor activity (Lee and Kim 2020; Lee, Shin, and Kim 2021), boosting the efficiency of checkpoint inhibitors (Chen and Musa 2021). These results also highlight the potentiality of BFCs as modulators of the tumor micro-environment (Nagaraju 2020).

Clinical trials

Few studies explored BFCs' benefits in clinical setup for CRC. Results are not available for most of the trials, yet (see Table 1). Briefly, 12 studies tested curcumin (6 Phase I, 5 Phase II, and one Phase III), 4 Phase I studies tested resveratrol and one study tested quercetin. Among all of these 17 studies, 13 included CRC patients, 2 included APC patients, 1 included patients with a moderate risk of CRC, and 1 study included healthy patients.

A phase II clinical trial, including 44 patients with 8 or more aberrant crypt foci (ACF) identified by colonoscopy, evaluated the preventive action of curcumin on the occurrence of colorectal neoplastic lesions. Patients were given an oral daily 2 or 4g treatment of curcumin for 1 month. A significant 40% reduction in ACF number was observed with the 4g dose ($p < 0.005$) but not with 2g (Carroll et al. 2011). Importantly, both doses were well tolerated. Curcumin impact on intestinal adenomas was tested in a cohort of patients with familial adenomatous polyposis (FAP) (Cruz-Correa et al. 2018). There was no difference in the mean number or size of lower intestinal tract adenomas between curcumin (3g/day for 12 weeks) and placebo. By contrast, significant FAP number and size decreased after 6 months with BFCs supplementation including quercetin (20mg 3 times/day) and curcumin (480mg 3 times/day) (Cruz-Correa et al. 2006). These contradictory results may be explained by the beneficial combinatory action of two BFCs and/or by a long-term effect with longer treatment.

Curcumin bioavailability and tolerability were studied in phase I trials (Sharma et al. 2001; Sharma et al. 2004; Garcea et al. 2005), finding no toxicity while biological effects were observed. Curcumin concentrations were measured in tumor and healthy tissues. As curcumin presents low bioavailability after oral administration, a liposomal form was recently developed and tested in a phase I study including metastatic CRC patients (Greil et al. 2018). The administration was carried out intravenously daily for 8 weeks. The authors considered the dose of 300mg/m² over 6h as the maximum tolerated dose. Over this dose, some patients presented hemolysis or hemoglobin drops. Levels of resveratrol and its Phase II metabolites were higher in the right-side colon compared to the left side, in direct relation with the anatomy portion after the ileum, suggesting that resveratrol is not

fully absorbed in the intestine or that a portion is released back into the colon (Patel, Brown, et al. 2010). Moreover, daily oral doses of resveratrol at 0.5g or 1g during 10 to 21 days were sufficient to obtain resveratrol and associated metabolites concentrations in the gastrointestinal tract to elicit anti-carcinogenic effects. Alternative administration routes have been developed and tested for enhanced resveratrol systemic availability. In a randomized phase, I trial, assessment of safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of micronized resveratrol was performed in CRC patients with hepatic metastases eligible for hepatectomy (Howells et al. 2011). Treatment was well tolerated and plasmatic levels of resveratrol were increased as compared to non-micronized formulations. Additionally, authors reported a 39% significant increase of the apoptosis biomarker caspase 3, in malignant hepatic tissues with resveratrol treatment compared with tissues from the placebo group.

The tolerability of chemotherapy in association with BFCs was also evaluated. In a randomized clinical study, 72 patients with metastatic CRC cancer received leucovorin, 5-fluorouracil, and oxaliplatin in combination with either MB-6, a botanical preparation containing grape seeds and curcumin extracts, or a placebo for 16 weeks (Chen et al. 2014). Patients' follow-up (70 weeks after treatment) revealed no significant difference in best overall response rate and OS between groups. However, patients in the MB-6 group exhibited a significant lower disease progression rate (0.0% vs 15.8%, $p = 0.026$). Moreover, no higher incidence of adverse events was observed in the MB-6 group compared to the placebo group. Curcumin was also tested in combination with FOLFOX in a phase I dose-escalation study (James et al. 2015). Authors reported curcumin to be a safe and tolerable adjunct to FOLFOX at doses up to 2g daily. Concordant results were recently combining FOLFOX with oral curcumin (2g daily) or placebo (Howells et al. 2019). Similar adverse event profiles were reported for both arms. More randomized trials considering OS and progression-free survival (PFS) as primary endpoints are needed to assess the antitumor benefit of BFCs in CRC.

Limits and future directions

Overall BFCs research is a worthy research domain because it holds promising chemopreventive or antitumor actions. However, attention should be given to their hormetic properties that could defeat their benefits. Indeed, enhancement of ROS production leading to antitumor effect was typically reported for high doses or concentrations of BFCs but low doses were cytoprotective. For instance, low concentrations of resveratrol (1 to 10µM) enhanced the proliferation of the HT-29 CRC cell line, while higher concentrations were cytotoxic (San Hipólito-Luengo et al. 2017). Similarly, low doses of capsaicin promoted metastasis of CRC cell lines in vitro and in a murine preclinical model by triggering ROS generation and activation of the Akt-mTOR pathway (Yang et al. 2013). Similarly, in combination with 5-FU, a high concentration of resveratrol (200µM) increased chemotherapy-triggered apoptosis of the HCT116 cell line

Table 1. Clinical trials interested in BFCs for chemoprevention and treatment of colorectal cancer.

Clinical trial title	Actual patients enrolment	Patient type	BFC	Administration way and doses	Main outcomes	Reference (ClinicalTrials.gov)
Phase I studies						
A Pilot, Feasibility Study of Curcumin in Combination With 5FU for Patients With 5FU-Resistant Metastatic Colon Cancer	13	Patient with metastatic colorectal cancer that is not response to standard 5FU based therapies.	curcumin	Induction by per os curcumin 500 mg twice a day for 2 weeks before 6 weeks of curcumin (same doses) and 5FU (3 cycles)	<ul style="list-style-type: none"> Determine the safety using curcumin in patients with metastatic colon cancer Overall Response 	NCT02724202
Curcumin in Preventing Colorectal Cancer in Patients Undergoing Colorectal Endoscopy or Colorectal Surgery	30	Patients with scheduled colorectal endoscopy or colorectal cancer surgery	curcumin	5 capsules daily for 14 days (dose not indicated) before colorectal endoscopy or colorectal cancer surgery	<ul style="list-style-type: none"> Concentration of curcumin in colorectal tissue after treatment 	NCT00973869
Curcumin Chemoprevention of Colorectal Neoplasia	40	Patients with diagnosed colorectal Cancer	curcumin	Per os 4g curcumin tablet daily \times 28 days before colorectal biopsy	<ul style="list-style-type: none"> Gene expression Ribonucleic acid (RNA) level Apoptosis 	NCT01333917
Effect of Curcumin on Dose Limiting Toxicity and Pharmacokinetics of Irinotecan in Patients with Solid Tumors	23	Patients with advanced Colorectal Cancer	curcumin	Per os Curcumin (1, 2, 3, or 4 g per day) for 4 days prior to irinotecan treatment	<ul style="list-style-type: none"> Maximum tolerated dose Pharmacokinetics of irinotecan 	NCT01859858
Phase I Clinical Trial Investigating the Ability of Plant Exosomes to Deliver Curcumin to Normal and Malignant Colon Tissue	7	Patients with diagnosed colorectal Cancer	curcumin	Per os curcumin 3,6g daily for 7 days or curcumin conjugated with plant exosomes daily for 7 days	<ul style="list-style-type: none"> Concentration of curcumin in normal and cancerous tissue Safety and tolerability of curcumin alone 	NCT01294072
A Phase I/IIa Study Combining Curcumin (Curcumin C3-Complex, Sabinsa) With Standard Care FOLFOX Chemotherapy in Patients with Inoperable Colorectal Cancer.	41	Patients with Inoperable Colorectal Cancer.	curcumin	Per os curcumin at increasing doses escalating to 2g during FOLFOX-based chemotherapy and continued for the duration of the chemotherapy course.	<ul style="list-style-type: none"> Completion of dose escalation over 2 cycles of therapy (Phase I) 	NCT01490996
A Phase 1, Double-Blind, Randomized Clinical Study to Assess the Safety, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of SRT501 (Resveratrol) in Subjects with Colorectal Cancer and Hepatic Metastases	9	Patients with colorectal cancer hepatic metastasis	Resveratrol	5g of oral SRT501 (or placebo) once daily for 14 days before surgical removal of hepatic metastases	<ul style="list-style-type: none"> Safety, tolerability and pharmacokinetic profile of SRT501 	NCT00920803
Phase I Repeat-Dose Study of Resveratrol in Colorectal Cancer Patients: Tolerability, Target Tissue Levels and Pharmacodynamics	20	Patients with diagnosed chirugically removable colorectal Cancer	Resveratrol	Oral administration 8 days before colectomy (dose and posology not given)	<ul style="list-style-type: none"> Pharmacodynamics of resveratrol Concentrations of biomarkers in tumoral and healthy colorectal tissue (Ki67 and COX-2 expression, M1G concentration) 	NCT00433576
Resveratrol for Patients with Colon Cancer	11	Patients with diagnosed colorectal Cancer and planned for surgical resection	Resveratrol	Resveratrol tablets at 20, 80, or 160 mg/day during 14 days before surgical resection	<ul style="list-style-type: none"> Test the hypothesis that resveratrol modulates Wnt signaling in vivo in colon cancer and normal colonic mucosa 	NCT00256334
Phase I Biomarker Study of Dietary Grape-Derived Low Dose Resveratrol for Colon Cancer Prevention	30	Healthy patients	Resveratrol and others polyphenols	Seedless fresh red grapes at 3 different doses: 1 lb/day, 2/3 lb/day, and 1/3 lb/day	<ul style="list-style-type: none"> Define the minimum dietary achievable amount of resveratrol-rich fresh red grapes which are effective in inhibiting Wnt signaling in human colonic mucosa. 	NCT00578396

Table 1. (Continued).

Clinical trial title	Actual patients enrolment	Patient type	BFC	Administration way and doses	Main outcomes	Reference (ClinicalTrials.gov)
Evaluate First Line Avastin/ FOLFIRI in Combination with Curcumin-containing Supplement in Colorectal Cancer Patients with Unresectable Metastasis	50	Colorectal Cancer Patients with Unresectable Metastasis	Phase II studies curcumin	Dietary supplement of nanostructured lipid curcumin particle 100 mg × 2 per os daily during Avastin/ FOLFIRI chemotherapy	• Progression free survival	NCT02439385
Phase II Double Blind Placebo-Controlled Trial of Curcuminoids' Effect on Cellular Proliferation, Apoptosis and COX-2 Expression in the Colorectal Mucosa of Subjects with Recently Resected Sporadic Adenomatous Polyps	56	Patients with diagnosis for colon/rectal polyp resection, polypectomy	curcumin	Per os encapsulated 4g curcumin or placebo daily for 4 months	• Cellular proliferation and apoptosis in the colonic mucosa • COX-2 expression and activity	NCT00118989
Curcumin for Treatment of Intestinal Adenomas in Familial Adenomatous Polyposis (FAP)	44	Patients with familial adenomatous polyposis	curcumin	Per os curcumin or placebo twice a day during 12 months	• Polyp Number • Polyp size • Number of participants with a decrease in polyp burden	NCT00641147
Efficacy of Wholistic Turmeric Supplementation on Polyp Number and Size in Patients with Familial Adenomatous Polyposis A Randomized, Double Blinded, Placebo Controlled Study	40	Patients with familial adenomatous polyposis	curcumin	Per os 2g curcumin or placebo twice a day during 6 months	• Polyp Number • Polyp size	NCT03061591
A Randomized Double Blinded Study of Curcumin with Pre-operative Capecitabine and Radiation Therapy Followed by Surgery for Rectal Cancer	45	Patient with T3,4 N0,1,2 or T2N1,2 adenocarcinoma of the rectum	curcumin	Per os curcumin twice a day during weeks 1–11 of capecitabine/ radiation treatment	• Pathologic complete response • Change in curcumin level in tumor tissue and serum	NCT00745134
Phase III studies						
Phase III Trial of Gemcitabine, Curcumin and Celebrex in Patients with Metastatic Colon Cancer	100	Locally advanced or metastatic colon cancer	curcumin	No information	• Tumor progression	NCT00295035
Other studies						
The Effect of Plant Phenolic Compounds on Human Colon Epithelial Cells	130	Patients at average risk or above average risk for development of colon cancer	curcumin, rutin and quercetin	Per os curcumin, rutin or quercetin, twice a day during 6 to 10 weeks	• Determine colonic epithelium response to plant phenolics short term treatment • Compare colonic mucosal response to plant phenolics with their response to sulindac	NCT00003365

Current (October 2021) clinical trials registered on ClinicalTrials.gov and combining key words "colorectal cancer" and "resveratrol" or "curcumin" or "quercetin" or "sulforaphane" or "capsaicin."

(Chan et al. 2008). By contrast, lower doses (25 or 50 μ M) inhibited the pro-apoptotic action of 5-FU, especially in p53 proficient cells. In the same way, sulforaphane annihilated resveratrol and capsaicin combined antitumor action in vivo (Vendrey et al. 2017). Sulforaphane inhibited T cell-mediated immune response, which may, in turn, interfere with checkpoint inhibitors' efficiency (Liang et al. 2019). Therefore, BFCs association with conventional cancer therapies requires a deep understanding of the positive or negative synergy of combinations (Roell, Reif, and Motsinger-Reif 2017; Fernando, Rupasinghe, and Hoskin 2019).

The recurrent concern about using BFCs in routine clinical practice is their challenged bioavailability. A large

majority of compounds present low absorption rates or are actively transformed into less potent metabolites by digestive tract tissues and liver upon oral administration (Figure 3). CRC may actually avoid this pitfall since non-metabolized oral-given BFCs can reach the tumors. More work, comparing the toxic effects of BFCs according to administration routes is however required.

To overcome bioavailability limits, researchers developed various galenic formulations of BFCs. Encapsulation into nanoparticles, either by physical, chemical, or physicochemical methods were frequently tested, as recently reviewed for polyphenols (Witika et al. 2021; Teng et al. 2021). The antitumor effect of curcumin on CRC cell lines was enhanced

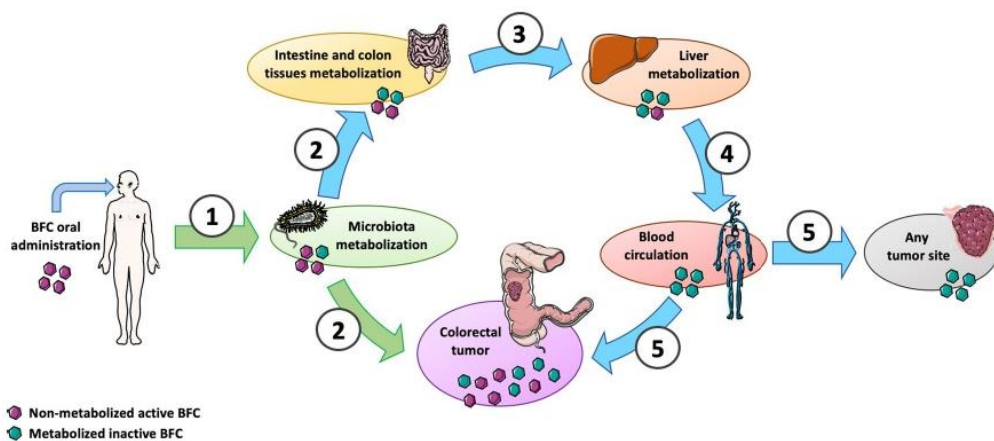


Figure 3. Colorectal tumor anatomy allows direct intake of unmetabolized active BFCs after oral administration with entero-hepatic metabolism cycle shunt. 1. After oral administration, a part of the BFCs is metabolized by microbiota; 2. BFCs and metabolites can be directly uptake by normal intestine and colon tissues but also by colorectal tumors; 3. Enterocytes metabolize a part of the BFCs and release BFCs and their metabolites into portal circulation to the liver; 4. After hepatic metabolism, BFC metabolites are released into the general blood circulation; 5. BFCs metabolites can reach either colorectal tumor or any other tumor site through blood circulation. Unlike distant tumor sites receiving only metabolized non-active BFCs (blue path), colorectal tumors are directly exposed to active non-metabolized BFCs (green path). This figure was made using Servier Medical Art support (<https://smart.servier.com>).

when encapsulated as Gemini surfactant nanoparticles (Ebrahimi et al. 2021) and nano encapsulated chrysin-curcumin combination showed a synergistic antitumor effect on the SW480 CRC cell line (Bagheri, Sanaat, and Zarghami 2018). This synergy was not observed with the free forms. Similarly, synthetic quercetin-caffeic-acid phenethyl ester co-loaded nanoparticles exhibited stronger anti-proliferative, anti-migration, and apoptotic properties than the free form of the combination (Colpan and Erdemir 2021). Recently, nanoparticles were used to combine curcumin with a silencer of the long non-coding (lnc) RNA colon cancer-associated transcript-1 (CCAT1) involved in CRC oncogenesis (Jia et al. 2021). The authors reported the synergistic anti-proliferative effect of the encapsulated combination better than drugs encapsulated individually. Thus, encapsulation can both enhance antitumor activity (by increasing bioavailability) as well as synergism of BFCs.

Excluding curcumin, for which several clinical studies have been carried out, BFC inclusion in clinical trials remains limited, and this is despite intense academic research. We believe that considering the high cost of clinical trials, the unpatented availability of BFCs is not attractive for pharmaceutical companies or private promoters. Patents may become possible with the development of new galenic forms or combination treatments. The time gap between basic research and clinical transfer is to deplore, especially for the patients, for whom the benefit may be important.

The toxicity of radiotherapy and chemotherapy is a major concern for oncologists and patients. Unlike standard treatments, BFCs do not induce major systemic toxicity, as shown by numerous phase I and II clinical trials. Surprisingly, very few studies explored this absence of toxicity on healthy cells compared to their tumor cell counterparts. Curcumin exerted a greater pro-apoptotic impact on hepatocarcinoma cell lines compared to healthy hepatocytes (Syng-Ai, Kumari, and Khar 2004), in close relation with intrinsic levels of the radical

scavenger Glutathione. Curcumin also differentially modulated morphologic and elastic properties of mammalian cancerous and normal epithelial cells with a selective negative impact on tumor cells (Saab et al. 2013). In the same way, resveratrol was pro-oxidative in human astrocytoma cells, but not in primary healthy astrocytes (Gran et al. 2021). Thus, some BFCs exert tumor-specific cytotoxicity while sparing surrounding healthy tissue. This interesting property reinforces the cause of using BFCs in cancer, as reviewed for resveratrol (Mortezaee et al. 2020). Moreover, in combination with conventional treatments, BFCs could help maintain tumor control for fragile or comorbid patients necessitating treatment de-escalation. For instance, the combination of resveratrol and capsaicin associated with a gemcitabine dose reduced by 1/3 rescued the full dose anti-tumor effect (Vendrey et al. 2017).

In conclusion, the mechanisms ruling BFCs chemoprotective and antitumor activities in CRC are still unclear, especially accounting for their systemic metabolism and tumor bioavailability. Another important aspect of their use will no doubtedly explore pharmaceutical and galenic developments to optimize their oral bioavailability. Despite this, the current state of knowledge positions BFCs as important players for preventing and treating CRC, particularly because they are part of most diets, and because they do not carry systemic toxicity. However, clinical studies are still needed to fully reveal their health potential.

Declaration of interest statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

Funding

This work was supported by SIRICBRIO (Bordeaux Recherche Intégrée en Oncologie).

References

- Adams, B. K., J. Cai, J. Armstrong, M. Herold, Y. J. Lu, A. Sun, J. P. Snyder, D. C. Liotta, D. P. Jones, and M. Shoji. 2005. EF24, a novel synthetic curcumin analog, induces apoptosis in cancer cells via a redox-dependent mechanism. *Anticancer Drugs* 16:263–75.
- Ahmed, K., S. F. Zaidi, Z.-G. Cui, D. Zhou, S. A. Saeed, and H. Inadera. 2019. Potential proapoptotic phytochemical agents for the treatment and prevention of colorectal cancer. *Oncology Letters* 18 (1):487–98.
- Altomare, R., F. Cacciabauda, G. Damiano, V. D. Palumbo, M. C. Gioviale, M. Bellavia, G. Tomasello, and A. I. Lo Monte. 2013. The Mediterranean diet: A history of health. *Iranian Journal of Public Health* 42 (5):449–57.
- American Dietetic Association. ADA – comments on defining bioactive food components *vdocuments .net*.
- Amini, P., S. J. Nodoooshan, M. Ashrafzadeh, S.-M. Eftekhari, T. Aryafar, L. Khalafi, A. E. Musa, S. R. Mahdavi, M. Najafi, and B. Farhood. 2020. Resveratrol induces apoptosis and attenuates proliferation of MCF-7 cells in combination with radiation and hyperthermia. *Current Molecular Medicine* 21:142–150.
- Arya, V. S., S. K. Kanthlal, and G. Linda. 2020. The role of dietary polyphenols in inflammatory bowel disease: A possible clue on the molecular mechanisms involved in the prevention of immune and inflammatory reactions. *Journal of Food Biochemistry* 44 (11):13369. doi: 10.1111/jfbc.13369.
- Atashpour, S., S. Fouladdel, T. K. Movahhed, E. Barzegar, M. H. Ghahremani, S. N. Ostad, and E. Azizi. 2015. Quercetin induces cell cycle arrest and apoptosis in CD133+ cancer stem cells of human colorectal HT29 cancer cell line and enhances anticancer effects of doxorubicin. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 18 (7):635–43.
- Bagetta, D., A. Maruca, A. Lupia, F. Mesiti, R. Catalano, I. Romeo, F. Moraca, F. A. Ambrosio, G. Costa, A. Artese, et al. 2020. Mediterranean products as promising source of multi-target agents in the treatment of metabolic syndrome. *European Journal of Medicinal Chemistry* 186:111903.
- Bagheri, R., Z. Sanaat, and N. Zarghami. 2018. Synergistic effect of free and nano-encapsulated chrysin-curcumin on inhibition of hTERT gene expression in SW480 colorectal cancer cell line. *Drug Research* 68 (6):335–43. doi: 10.1055/s-0043-121338.
- Banerjee, K., and M. Mandal. 2015. Oxidative stress triggered by naturally occurring flavone apigenin results in senescence and chemotherapeutic effect in human colorectal cancer cells. *Redox Biology* 5:153–62. doi: 10.1016/j.redox.2015.04.009.
- Berretta, M., A. Bignucolo, R. D. Francia, F. Comello, G. Facchini, M. Ceccarelli, R. V. Iaffaioli, V. Quagliariello, and N. Maurea. 2020. Resveratrol in cancer patients: From bench to bedside. *International Journal of Molecular Sciences* 21:2945.
- Blanquer-Rosselló, M. D. M., R. Hernández-López, P. Roca, J. Oliver, and A. Valle. 2017. Resveratrol induces mitochondrial respiration and apoptosis in SW620 colon cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta. General Subjects* 1861 (2):431–40. doi: 10.1016/j.bbagen.2016.10.009.
- Buhrmann, C., M. Yazdi, B. Popper, A. Kunnumakkara, B. Aggarwal, and M. Shakibaei. 2019. Induction of the epithelial-to-mesenchymal transition of human colorectal cancer by human TNF- β (lymphotoxin) and its reversal by resveratrol. *Nutrients* 11 (3):704. doi: 10.3390/nu11030704.
- Buhrmann, C., M. Yazdi, B. Popper, P. Shayan, A. Goel, B. Aggarwal, and M. Shakibaei. 2018. Resveratrol chemosensitizes TNF- β -induced survival of 5-FU-treated colorectal cancer cells. *Nutrients* 10 (7):888. doi: 10.3390/nu10070888.
- Buhrmann, C., P. Shayan, A. Goel, and M. Shakibaei. 2017. Resveratrol regulates colorectal cancer cell invasion by modulation of focal adhesion molecules. *Nutrients* 9 (10):1073. doi: 10.3390/nu9101073.
- Buhrmann, C., P. Shayan, P. Kraehe, B. Popper, A. Goel, and M. Shakibaei. 2015. Resveratrol induces chemosensitization to 5-fluorouracil through up-regulation of intercellular junctions, epithelial-to-mesenchymal transition and apoptosis in colorectal cancer. *Biochemical Pharmacology* 98 (1):51–68.
- Caetano, B. F. R., M. B. Tablas, N. E. F. Pereira, N. A. de Moura, R. F. Carvalho, M. A. M. Rodrigues, and L. F. Barbisan. 2018. Capsaicin reduces genotoxicity, colonic cell proliferation and preneoplastic lesions induced by 1,2-dimethylhydrazine in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* 338:93–102.
- Calibasi-Kocal, G., A. Pakdemirli, S. Bayrak, N. M. Ozupek, T. Sever, Y. Basbinar, H. Ellidokuz, and T. Yigitbasi. 2019. Curcumin effects on cell proliferation, angiogenesis and metastasis in colorectal cancer. *Journal of BUON* 24:1482–7.
- Carroll, R. E., R. V. Benya, D. K. Turgeon, S. Vareed, M. Neuman, L. Rodriguez, M. Kakarala, P. M. Carpenter, C. McLaren, F. L. Meyskens, et al. 2011. Phase IIa clinical trial of curcumin for the prevention of colorectal neoplasia. *Cancer Prevention Research* 4 (3):354–64. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-10-0098.
- Chan, J. Y., M. S. Phoo, M.-V. Clement, S. Pervaiz, and S. C. Lee. 2008. Resveratrol displays converse dose-related effects on 5-fluorouracil-evoked colon cancer cell apoptosis: The roles of caspase-6 and p53. *Cancer Biology & Therapy* 7 (8):1305–12. doi: 10.4161/cbt.7.8.6302.
- Cheah, F. K., K. H. Leong, N. F. Thomas, H. K. Chin, A. Ariffin, and K. Awang. 2018. Resveratrol analogue, (E)-N-(2-(4-methoxystyryl) phenyl) furan-2-carboxamide induces G2/M cell cycle arrest through the activation of p53-p21CIP1/WAF1 in human colorectal HCT116 cells. *Apoptosis* 23 (5-6):329–42. doi: 10.1007/s10495-018-1457-8.
- Chen, G.-P., Y. Zhang, Z.-Y. Xu, J.-F. Yu, and X. Wei. 2017. Curcumin combined with cis-platinum promote the apoptosis of human colorectal cancer HT29 cells and mechanism. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 10 (12):11496–505.
- Chen, J., A. Katsifis, C. Hu, and X.-F. Huang. 2011. Insulin decreases therapeutic efficacy in colon cancer cell line HT29 via the activation of the PI3K/Akt pathway. *Current Drug Discovery Technologies* 8 (2):119–25.
- Chen, L., and A. E. Musa. 2021. Boosting immune system against cancer by resveratrol. *Phytotherapy Research* 35 (10):5514–5526.
- Chen, W. T.-L., T.-S. Yang, H.-C. Chen, H.-H. Chen, H.-C. Chiang, T.-C. Lin, C.-H. Yeh, T.-W. Ke, J.-S. Chen, K.-H. Hsiao, et al. 2014. Effectiveness of a novel herbal agent MB-6 as a potential adjunct to 5-fluoracil-based chemotherapy in colorectal cancer. *Nutrition Research* 34 (7):585–94.
- Chen, X., H. Liang, Q. Song, X. Xu, and D. Cao. 2018. Insulin promotes progression of colon cancer by upregulation of ACAT1. *Lipids in Health and Disease* 17 (1):122. doi: 10.1186/s12944-018-0773-x.
- Cheung, K. L., T. O. Khor, and A.-N. Kong. 2009. Synergistic effect of combination of phenethyl isothiocyanate and sulforaphane or curcumin and sulforaphane in the inhibition of inflammation. *Pharmaceutical Research* 26 (1):224–31. doi: 10.1007/s11095-008-9734-9.
- Chung, S. S., P. Dutta, D. Austin, P. Wang, A. Awad, and J. V. Vadgama. 2018. Combination of resveratrol and 5-fluorouracil enhanced anti-telomerase activity and apoptosis by inhibiting STAT3 and Akt signaling pathways in human colorectal cancer cells. *Oncotarget* 9 (68):32943–57. doi: 10.18632/oncotarget.25993.
- Colpan, R. D., and A. Erdemir. 2021. Co-delivery of quercetin and caffeic-acid phenethyl ester by polymeric nanoparticles for improved antitumor efficacy in colon cancer cells. *Journal of Microencapsulation* 38 (6):381–93. doi: 10.1080/02652048.2021.1948623.
- Couto, E., P. Boffetta, P. Lagiou, P. Ferrari, G. Buckland, K. Overvad, C. C. Dahm, A. Tjønneland, A. Olsen, F. Clavel-Chapelon, et al. 2011. Mediterranean dietary pattern and cancer risk in the EPIC cohort. *British Journal of Cancer* 104 (9):1493–9. doi: 10.1038/bjc.2011.106.
- Cruz-Correa, M., D. A. Shoskes, P. Sanchez, R. Zhao, L. M. Hyland, S. D. Wexner, and F. M. Giardiello. 2006. Combination treatment with curcumin and quercetin of adenomas in familial adenomatous polyposis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 4:1035–8.
- Cruz-Correa, M., L. M. Hyland, J. H. Marrero, M. L. Zahurak, T. Murray-Stewart, R. A. Casero, E. A. Montgomery, C. Iacobuzio-Donahue, L. A. Brosens, G. J. Offerhaus, et al. 2018. Efficacy and safety of curcumin in treatment of intestinal adenomas in patients with familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology* 155 (3):668–73. doi: 10.1053/j.gastro.2018.05.031.

- Darband, S. G., S. Sadighparvar, B. Yousefi, M. Kaviani, F. Ghaderi-Pakdel, A. Mihanfar, Y. Rahimi, K. Mobaraki, and M. Majidinia. 2020. Quercetin attenuated oxidative DNA damage through NRF2 signaling pathway in rats with DMH induced colon carcinogenesis. *Life Sciences* 253:117584. doi: 10.1016/j.lfs.2020.117584.
- Deng, L.-J., M. Qi, N. Li, Y.-H. Lei, D.-M. Zhang, and J.-X. Chen. 2020. Natural products and their derivatives: Promising modulators of tumor immunotherapy. *Journal of Leukocyte Biology* 108 (2):493–508.
- Dent, P., L. Booth, J. L. Roberts, A. Poklepovic, and J. F. Hancock. 2020. (Curcumin + sildenafil) enhances the efficacy of 5FU and anti-PD1 therapies in vivo. *Journal of Cellular Physiology* 235 (10):6862–74.
- Du, B., L. Jiang, Q. Xia, and L. Zhong. 2006. Synergistic inhibitory effects of curcumin and 5-fluorouracil on the growth of the human colon cancer cell line HT-29. *Chemotherapy* 52 (1):23–8. doi: 10.1159/000090238.
- Ebrahimi, M., E. Babaei, F. Neri, and M. A. H. Feizi. 2021. Anti-proliferative and apoptotic effect of Gemini curcumin in p53-wild type and p53-mutant colorectal cancer cell lines. *International Journal of Pharmaceutics* 601:120592. doi: 10.1016/j.ijpharm.2021.120592.
- Farinetti, A., V. Zurlo, A. Manenti, F. Coppi, and A. V. Mattioli. 2017. Mediterranean diet and colorectal cancer: A systematic review. *Nutrition* 43–44:83–8. doi: 10.1016/j.nut.2017.06.008.
- Feng, J., D. Song, S. Jiang, XHui Yang, T. Ding, H. Zhang, J. Luo, J. Liao, and Q. Yin. 2018. Quercetin restrains TGF- β 1-induced epithelial–mesenchymal transition by inhibiting Twist1 and regulating E-cadherin expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 498 (1):132–8.
- Fernando, W., H. P. V. Rupasinghe, and D. W. Hoskin. 2019. Dietary phytochemicals with anti-oxidant and pro-oxidant activities: A double-edged sword in relation to adjuvant chemotherapy and radiotherapy? *Cancer Letters* 452:168–77. doi: 10.1016/j.canlet.2019.03.022.
- Garcea, G., D. P. Berry, D. J. L. Jones, R. Singh, A. R. Dennison, P. B. Farmer, R. A. Sharma, W. P. Steward, and A. J. Gescher. 2005. Consumption of the putative chemopreventive agent curcumin by cancer patients: Assessment of curcumin levels in the colorectum and their pharmacodynamic consequences. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 14:120–5.
- Gavrilas, L. I., D. Cruceriu, C. Ionescu, D. Miere, and O. Balacescu. 2019. Pro-apoptotic genes as new targets for single and combinatorial treatments with resveratrol and curcumin in colorectal cancer. *Food & Function* 10 (6):3717–26. doi: 10.1039/C9FO01014A.
- Giordano, A., and G. Tommonaro. 2019. Curcumin and cancer. *Nutrients* 11:2376. doi: 10.3390/nu1102376.
- Girardi, B., M. Principi, M. Pricci, F. Giorgio, A. Iannone, G. Losurdo, E. Terardi, A. Di Leo, and M. Barone. 2018. Chemoprevention of inflammation-related colorectal cancer by silymarin-, acetyl-11-keto-beta-boswellic acid-, curcumin- and maltodextrin-enriched dietetic formulation in animal model. *Carcinogenesis* 39 (10):1274–82. doi: 10.1093/carcin/bgy104.
- Grabacka, M. M., M. Gawin, and M. Pierzchalska. 2014. Phytochemical modulators of mitochondria: The search for chemopreventive agents and supportive therapeutics. *Pharmaceutics* 7:913–42.
- Gran, E. R., V. Lotocki, Q. Zhang, J. Antel, A. Kakkar, and D. Maysinger. 2021. Human astrocytes and astrocytoma respond differently to resveratrol. *Nanomedicine* 37:102441. doi: 10.1016/j.nano.2021.102441.
- Greil, R., S. Greil-Ressler, L. Weiss, C. Schönlieb, T. Magnes, B. Radl, G. T. Bolger, B. Vcelar, and P. P. Sordillo. 2018. A phase 1 dose-escalation study on the safety, tolerability and activity of liposomal curcumin (Lipocur™) in patients with locally advanced or metastatic cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 82 (4):695–706. doi: 10.1007/s00280-018-3654-0.
- Griswold, M. G., N. Fullman, C. Hawley, N. Arian, S. R. M. Zimsen, H. D. Tymeson, V. Venkateswaran, A. D. Tapp, M. H. Forouzanfar, J. S. Salama, et al. 2018. Alcohol use and burden for 195 countries and territories, 1990–2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet* 392 (10152):1015–35. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31310-2.
- Guazelli, C. F. S., V. Fattori, B. B. Colombo, S. R. Georgetti, F. T. M. C. Vicentini, R. Casagrande, M. M. Baracat, and W. A. Verri. 2013. Quercetin-loaded microcapsules ameliorate experimental colitis in mice by anti-inflammatory and antioxidant mechanisms. *Journal of Natural Products* 76 (2):200–8.
- Han, W., H. Yin, H. Ma, Y. Wang, D. Kong, and Z. Fan. 2020. Curcumin regulates ERCC1 expression and enhances oxaliplatin sensitivity in resistant colorectal cancer cells through its effects on miR-409-3p. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2020:8394574.
- Hatcher, H., R. Planalp, J. Cho, F. M. Torti, and S. V. Torti. 2008. Curcumin: From ancient medicine to current clinical trials. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65 (11):1631–52. doi: 10.1007/s00018-008-7452-4.
- Hasler, C. M., and A. C. Brown. 2009. Position of the American Dietetic Association: functional foods. *Journal of the American Dietetic Association* 109 (4):735–46. doi: 10.1016/j.jada.2009.02.023. PMID:19338113
- Howells, L. M., C. O. O. Iwuji, G. R. B. Irving, S. Barber, H. Walter, Z. Sidat, N. Griffin-Teal, R. Singh, N. Foreman, S. R. Patel, et al. 2019. Curcumin combined with FOLFOX chemotherapy is safe and tolerable in patients with metastatic colorectal cancer in a randomized phase IIa trial. *The Journal of Nutrition* 149 (7):1133–9. doi: 10.1093/jn/nxz029.
- Howells, L. M., D. P. Berry, P. J. Elliott, E. W. Jacobson, E. Hoffmann, B. Hegarty, K. Brown, W. P. Steward, and A. J. Gescher. 2011. Phase I randomized, double-blind pilot study of micronized resveratrol (SRT501) in patients with hepatic metastases—safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics. *Cancer Prevention Research* 4 (9):1419–25. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-11-0148.
- Hu, W.-H., G. K.-L. Chan, R. Duan, H.-Y. Wang, X.-P. Kong, T. T.-X. Dong, K. W.-K. Tsim. 2019. Synergy of ginkgetin and resveratrol in suppressing VEGF-induced angiogenesis: A therapy in treating colorectal cancer. *Cancers* 11:1828. doi: 10.3390/cancers11121828.
- Imperial College London. 2018. WCRF/AICR systematic literature review Continuous Update Project report: The associations between food nutrition and physical activity and the risk of colorectal cancer -Revised 2018.
- James, M. I., C. Iwuji, G. Irving, A. Karmokar, J. A. Higgins, N. Griffin-Teal, A. Thomas, P. Greaves, H. Cai, S. R. Patel, et al. 2015. Curcumin inhibits cancer stem cell phenotypes in ex vivo models of colorectal liver metastases, and is clinically safe and tolerable in combination with FOLFOX chemotherapy. *Cancer Letters* 364 (2):135–41. doi: 10.1016/j.canlet.2015.05.005.
- Jantan, I., M. A. Haque, L. Arshad, H. Harikrishnan, A. W. Septama, and Z.-A. Mohamed-Hussein. 2021. Dietary polyphenols suppress chronic inflammation by modulation of multiple inflammation-associated cell signaling pathways. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 93:108634.
- Jesus, M. S., A. C. Carvalho, J. A. Teixeira, L. Domingues, and C. Pereira-Wilson. 2020. Ohmic heating extract of vine pruning residue has anti-colorectal cancer activity and increases sensitivity to the chemotherapeutic drug 5-FU. *Foods Basel Foods* 9 (8):1102. doi: 10.3390/foods9081102.
- Ji, Q., X. Liu, X. Fu, L. Zhang, H. Sui, L. Zhou, J. Sun, J. Cai, J. Qin, J. Ren, et al. 2013. Resveratrol inhibits invasion and metastasis of colorectal cancer cells via MALAT1 mediated Wnt/ β -catenin signal pathway. *PLoS One* 8 (11):e78700. doi: 10.1371/journal.pone.0078700.
- Ji, Q., X. Liu, Z. Han, L. Zhou, H. Sui, L. Yan, H. Jiang, J. Ren, J. Cai, Q. Li, et al. 2015. Resveratrol suppresses epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer through TGF- β 1/Smads signaling pathway mediated Snail/E-cadherin expression. *BMC Cancer* 15:97. doi: 10.1186/s12885-015-1119-y.
- Jia, F., Y. Li, X. Deng, X. Wang, X. Cui, J. Lu, Z. Pan, and Y. Wu. 2021. Self-assembled fluorescent hybrid nanoparticles-mediated collaborative lncRNA CCAT1 silencing and curcumin delivery for synchronous colorectal cancer theranostics. *Journal of Nanobiotechnology* 19:238.

- Jin, H., and C. Zhang. 2020. High fat high calories diet (HFD) increase gut susceptibility to carcinogens by altering the gut microbial community. *Journal of Cancer* 11 (14):4091–8. doi: 10.7150/jca.43561.
- Jin, J., G. Lin, H. Huang, D. Xu, H. Yu, X. Ma, L. Zhu, D. Ma, and H. Jiang. 2014. Capsaicin mediates cell cycle arrest and apoptosis in human colon cancer cells via stabilizing and activating p53. *International Journal of Biological Sciences* 10(3):285–95.
- Johnson, I. T., and E. K. Lund. 2007. Review article: Nutrition, obesity and colorectal cancer. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 26 (2):161–81.
- Jozkowiak, M., P. Skupin-Mrugalska, A. Nowicki, S. Borys-Wojcik, M. Wierchowski, M. Kaczmarek, P. Ramlau, J. Jodynis-Liebert, and H. Piotrowska-Kempisty. 2020. The effect of 4 α -hydroxy-3,4,5-trimethoxystilbene, the metabolite of resveratrol analogue DMU-212, on growth, cell cycle and apoptosis in DLD-1 and LOVO colon cancer cell lines. *Nutrients* 12 (5):1327. doi: 10.3390/nu12051327.
- Juan, M. E., U. Wenzel, H. Daniel, and J. M. Planas. 2008. Resveratrol induces apoptosis through ROS-dependent mitochondria pathway in HT-29 human colorectal carcinoma cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (12):4813–8. doi: 10.1021/jf800175a.
- Kaminski, B. M., A. Weigert, B. Brüne, M. Schumacher, U. Wenzel, D. Steinhilber, J. Stein, and S. Ulrich. 2011. Sulforaphane potentiates oxaliplatin-induced cell growth inhibition in colorectal cancer cells via induction of different modes of cell death. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 67 (5):1167–78. doi: 10.1007/s00280-010-1413-y.
- Kee, J.-Y., Y.-H. Han, D.-S. Kim, J.-G. Mun, J. Park, M.-Y. Jeong, J.-Y. Um, and S.-H. Hong. 2016. Inhibitory effect of quercetin on colorectal lung metastasis through inducing apoptosis, and suppression of metastatic ability. *Phytomedicine* 23 (13):1680–90. doi: 10.1016/j.phymed.2016.09.011.
- Khaleel, S. A., A. M. Al-Abd, A. A. Ali, and A. B. Abdel-Naim. 2016. Didox and resveratrol sensitize colorectal cancer cells to doxorubicin via activating apoptosis and ameliorating P-glycoprotein activity. *Scientific Reports* 6:36855.
- Khan, I., S. Paul, R. Jakhar, M. Bhardwaj, J. Han, and S. C. Kang. 2016. Novel quercetin derivative TEF induces ER stress and mitochondria-mediated apoptosis in human colon cancer HCT-116 cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* 84:789–99. doi: 10.1016/j.biopha.2016.09.094.
- Kim, E., G. A. Wright, R. S. Zoh, B. S. Patil, G. K. Jayaprakasha, E. S. Callaway, I. Ivanov, N. D. Turner, and R. S. Chapkin. 2019. Establishment of a multicomponent dietary bioactive human equivalent dose to delete damaged Lgr5+ stem cells using a mouse colon tumor initiation model. *European Journal of Cancer Prevention* 28 (5):383–9. doi: 10.1097/CEJ.0000000000000465.
- Kim, Y. S., M. R. Young, G. Bobe, N. H. Colburn, and J. A. Milner. 2009. Bioactive food components, inflammatory targets, and cancer prevention. *Cancer Prevention Research* 2 (3):200–8. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-08-0141.
- Kunnumakkara, A. B., P. Diagaradjane, S. Guha, A. Deorukhkar, S. Shentu, B. B. Aggarwal, and S. Krishnan. 2008. Curcumin sensitizes human colorectal cancer xenografts in nude mice to γ -radiation by targeting nuclear factor- κ B-regulated gene products. *Clinical Cancer Research* 14 (7):2128–36. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4722.
- Langner, E., M. K. Lemieszek, and W. Rzeski. 2019. Lycopene, sulforaphane, quercetin, and curcumin applied together show improved antiproliferative potential in colon cancer cells in vitro. *Journal of Food Biochemistry* 43 (4):e12802. doi: 10.1111/jfbc.12802.
- Lee, S.-R., H. Jin, W.-T. Kim, W.-J. Kim, S. Z. Kim, S.-H. Leem, and S. M. Kim. 2018. Tristetraprolin activation by resveratrol inhibits the proliferation and metastasis of colorectal cancer cells. *International Journal of Oncology* 53 (3):1269–78.
- Lee, Y., H. Shin, and J. Kim. 2021. In vivo anti-cancer effects of resveratrol mediated by NK cell activation. *Journal of Innate Immunity* 13 (2):94–106. doi: 10.1159/000510315.
- Lee, Y.-J., and J. Kim. 2020. Resveratrol activates natural killer cells through Akt- and mTORC2-mediated c-Myb upregulation. *International Journal of Molecular Sciences* 21 (24):9575. doi: 10.3390/ijms21249575.
- Li, M., G. G.-L. Yue, S. K.-W. Tsui, K.-P. Fung, and C. B.-S. Lau. 2018. Turmeric extract, with absorbable curcumin, has potent anti-metastatic effect in vitro and in vivo. *Phytomedicine* 46:131–41.
- Liang, J., G. M. Hänsch, K. Hübner, and Y. Samstag. 2019. Sulforaphane as anticancer agent: A double-edged sword? Tricky balance between effects on tumor cells and immune cells. *Advances in Biological Regulation* 71:79–87.
- Liang, Y. C., S. H. Tsai, D. C. Tsai, S. Y. Lin-Shiau, and J. K. Lin. 2001. Suppression of inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma by flavonoids in mouse macrophages. *FEBS Letters* 496 (1):12–8. doi: 10.1016/S0014-5793(01)02393-6.
- Lin, C., Y. Yu, H.-g. Zhao, A. Yang, H. Yan, and Y. Cui. 2012. Combination of quercetin with radiotherapy enhances tumor radiosensitivity in vitro and in vivo. *Radiotherapy and Oncology* 104 (3):395–400. doi: 10.1016/j.radonc.2011.10.023.
- Lin, S.-R., C.-H. Chang, C.-F. Hsu, M.-J. Tsai, H. Cheng, M. K. Leong, P.-J. Sung, J.-C. Chen, and C.-F. Weng. 2020. Natural compounds as potential adjuvants to cancer therapy: Preclinical evidence. *British Journal of Pharmacology* 177 (6):1409–23.
- Lin, T.-A., W.-S. Lin, Y.-C. Chou, K. Nagabhusanam, C.-T. Ho, and M.-H. Pan. 2021. Oxyresveratrol inhibits human colon cancer cell migration through regulating epithelial-mesenchymal transition and microRNA. *Food & Function* 12 (20):9658–68. doi: 10.1039/d1fo01920a.
- Liu, Z., X. Wu, J. Lv, H. Sun, and F. Zhou. 2019. Resveratrol induces p53 in colorectal cancer through SET7/9. *Oncology Letters* 17 (4):3783–9.
- Lu, J.-J., Y.-J. Cai, and J. Ding. 2011. Curcumin induces DNA damage and caffeine-insensitive cell cycle arrest in colorectal carcinoma HCT116 cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* 354 (1-2):247–52.
- Majumdar, A. P. N., S. Banerjee, J. Nautiyal, B. B. Patel, V. Patel, J. Du, Y. Yu, A. A. Elliott, E. Levi, F. H. Sarkar, et al. 2009. Curcumin synergizes with resveratrol to inhibit colon cancer. *Nutrition and Cancer* 61 (4):544–53.
- Manach, C., A. Scalbert, C. Morand, C. Rémésy, and L. Jiménez. 2004. Polyphenols: Food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition* 79 (5):727–47.
- Manna, S. K., A. Mukhopadhyay, and B. B. Aggarwal. 1950. Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF- κ B, activator protein-1, and apoptosis: Potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. *Journal of Immunology* 164:6509–19.
- Marjaneh, R. M., F. Rahmani, S. M. Hassanian, N. Rezaei, M. Hashemzahi, A. Bahrami, F. Ariakia, H. Fuji, A. Sahebkar, A. Avan, et al. 2018. Phytosomal curcumin inhibits tumor growth in colitis-associated colorectal cancer. *Journal of Cellular Physiology* 233 (10):6785–98.
- Matsuno, Y., Y. Atsumi, M. Alauddin, M. M. Rana, H. Fujimori, M. Hyodo, A. Shimizu, T. Ikuta, H. Tani, and H. Torigoe. 2020. Resveratrol and its related polyphenols contribute to the maintenance of genome stability. *Scientific Reports* 10:5388.
- Matsuoka, T., and M. Yashiro. 2020. Precision medicine for gastrointestinal cancer: Recent progress and future perspective. *World Journal of Gastrointestinal Oncology* 12 (1):1–20.
- Medina-Remón, A., R. Casas, A. Tresserra-Rimbau, E. Ros, M. A. Martínez-González, M. Fitó, D. Corella, J. Salas-Salvadó, R. M. Lamuela-Raventós, R. Estruch, et al. 2017. Polyphenol intake from a Mediterranean diet decreases inflammatory biomarkers related to atherosclerosis: A substudy of the PREDIMED trial. *British Journal of Clinical Pharmacology* 83 (1):114–28. doi: 10.1111/bcp.12986.
- Mentella, M. C., F. Scaldaferrì, C. Ricci, A. Gasbarrini, and G. A. D. Miggiano. 2019. Cancer and Mediterranean diet: A review. *Nutrients* 11:2059. doi: 10.3390/nu11092059.
- Miki, H., N. Uehara, A. Kimura, T. Sasaki, T. Yuri, K. Yoshizawa, and A. Tsubura. 2012. Resveratrol induces apoptosis via ROS-triggered autophagy in human colon cancer cells. *International Journal of Oncology* 40 (4):1020–8.
- Mortezaee, K., M. Najafi, B. Farhood, A. Ahmadi, D. Shabeeb, and A. E. Musa. 2020. Resveratrol as an adjuvant for normal tissues pro-

- tection and tumor sensitization. *Current Cancer Drug Targets* 20 (2):130–45. doi: 10.2174/1568009619666191019143539.
- Mudduluru, G., J. N. George-William, S. Muppala, I. A. Asangani, R. Kumarswamy, L. D. Nelson, and H. Allgayer. 2011. Curcumin regulates miR-21 expression and inhibits invasion and metastasis in colorectal cancer. *Bioscience Reports* 31 (3):185–97. [Database] doi: 10.1042/BSR20100065.
- Nagaraju, G. P., ed. 2020. *Phytochemicals targeting tumor microenvironment in gastrointestinal cancers*. Springer International Publishing.
- Nautiyal, J., S. S. Kanwar, Y. Yu, and A. P. Majumdar. 2011. Combination of dasatinib and curcumin eliminates chemo-resistant colon cancer cells. *Journal of Molecular Signaling* 6 (7):7.
- Nguyen, K. A., Y. Cao, J. R. Chen, C. M. Townsend, and T. C. Ko. 2006. Dietary fiber enhances a tumor suppressor signaling pathway in the gut. *Annals of Surgery* 243 (5):619–27.
- Okonkwo, A., J. Mitra, G. S. Johnson, L. Li, W. M. Dashwood, M. L. Hegde, C. Yue, R. H. Dashwood, and P. Rajendran. 2018. Heterocyclic analogs of sulforaphane trigger DNA damage and impede DNA repair in colon cancer cells: Interplay of HATs and HDACs. *Molecular Nutrition & Food Research* 62 (18):e1800228. doi: 10.1002/mnfr.201800228.
- Parkin, D., S. Whelan, J. Ferlay, L. Teppo, and D. B. Thomas. 2022. *Cancer incidence in five continents*, Vol. VIII. IARC Scientific Publication No. 155.
- Patel, B. B., D. Gupta, A. A. Elliott, V. Sengupta, Y. Yu, and A. P. N. Majumdar. 2010. Curcumin targets FOLFOX-surviving colon cancer cells via inhibition of EGFRs and IGF-1R. *Anticancer Research* 30 (2):319–25.
- Patel, B. B., R. Sengupta, S. Qazi, H. Vachhani, Y. Yu, A. K. Rishi, and A. P. N. Majumdar. 2008. Curcumin enhances the effects of 5-fluorouracil and oxaliplatin in mediating growth inhibition of colon cancer cells by modulating EGFR and IGF-1R. *International Journal of Cancer* 122 (2):267–73. doi: 10.1002/ijc.23097.
- Patel, K. R., V. A. Brown, D. J. L. Jones, R. G. Britton, D. Hemingway, A. S. Miller, K. P. West, T. D. Booth, M. Perloff, J. A. Crowell, et al. 2010. Clinical pharmacology of resveratrol and its metabolites in colorectal cancer patients. *Cancer Research* 70 (19):7392–9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2027.
- Pettan-Brewer, C., J. Morton, R. Mangalindan, and W. Ladiges. 2011. Curcumin suppresses intestinal polyps in APC Min mice fed a high fat diet. *Pathobiology of Aging & Age Related Diseases* 1:7281.
- Raja, S. B., V. Rajendran, N. K. Kasinathan, A. P. S. Venkatabalasubramanian, M. R. Murali, H. Devaraj, and S. N. Devaraj. 2017. Differential cytotoxic activity of Quercetin on colon cancer cells depends on ROS generation through COX-2 expression. *Food and Chemical Toxicology* 106:92–106. doi: 10.1016/j.fct.2017.05.006.
- Rather, R. A., and M. Bhagat. 2020. Quercetin as an innovative therapeutic tool for cancer chemoprevention: Molecular mechanisms and implications in human health. *Cancer Medicine* 9 (24):9181–92. doi: 10.1002/cam4.1411.
- Ravindranathan, P., D. Pasham, U. Balaji, J. Cardenas, J. Gu, S. Toden, and A. Goel. 2018. A combination of curcumin and oligomeric proanthocyanidins offer superior anti-tumorigenic properties in colorectal cancer. *Scientific Reports* 8 (1):13869.
- Recio-Boiles, A., and C. B. Cancer. 2020. *Colon. StatPearls*. Treasure Island, FL: StatPearls Publishing.
- Reilly, S. M., and A. R. Saltiel. 2017. Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. *Nature Reviews. Endocrinology* 13 (11):633–43.
- Renaud, S., and M. de Lorgeril. 1992. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet* 339 (8808):1523–6. doi: 10.1016/0140-6736(92)91277-F.
- Rizeq, B., I. Gupta, J. Ilesanmi, M. AlSafran, M. M. Rahman, and A. Ouhit. 2020. The power of phytochemicals combination in cancer chemoprevention. *Journal of Cancer* 11 (15):4521–33. doi: 10.7150/jca.34374.
- Roell, K. R., D. M. Reif, and A. A. Motsinger-Reif. 2017. An introduction to terminology and methodology of chemical synergy-perspectives from across disciplines. *Frontiers in Pharmacology* 8:158.
- Ryan-Harshman, M., and W. Aldoori. 2007. Diet, and colorectal cancer. *Canadian Family Physician Medecin de Famille Canadien* 53 (11):1913–20.
- Saab, M.-B., N. Bec, M. Martin, E. Estephan, F. Cuisinier, C. Larroque, and C. Gergely. 2013. Differential effect of curcumin on the nano-mechanics of normal and cancerous Mammalian epithelial cells. *Cell Biochemistry and Biophysics* 65 (3):399–411.
- San Hipólito-Luengo, Á., A. Alcaide, M. Ramos-González, E. Cercas, S. Vallejo, A. Romero, E. Talero, C. F. Sánchez-Ferrer, V. Motilva, C. Peiró, et al. 2017. Dual effects of resveratrol on cell death and proliferation of colon cancer cells. *Nutrition and Cancer* 69 (7):1019–27.
- Sandur, S. K., A. Deorukhkar, M. K. Pandey, A. M. Pabón, S. Shentu, S. Guha, B. B. Aggarwal, and S. Krishnan. 2009. Curcumin modulates the radiosensitivity of colorectal cancer cells by suppressing constitutive and inducible NF- κ B activity. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 75 (2):534–42.
- Santandreu, F. M., A. Valle, J. Oliver, and P. Roca. 2011. Resveratrol potentiates the cytotoxic oxidative stress induced by chemotherapy in human colon cancer cells. *Cellular Physiology and Biochemistry* 28 (2):219–28. doi: 10.1159/000331733.
- Sawicki, T., M. Ruskowska, A. Danielewicz, E. Niedźwiedzka, T. Arłukowicz, and K. E. Przybyłowicz. 2021. A review of colorectal cancer in terms of epidemiology, risk factors, development, symptoms and diagnosis. *Cancers* 13 (9):2025. doi: 10.3390/cancers13092025.
- Schwartz, B., and E. Yehuda-Shnaidman. 2014. Putative role of adipose tissue in growth and metabolism of colon cancer cells. *Frontiers in Oncology* 4:164.
- Sesarman, A., L. Tefas, B. Sylvester, E. Licarete, V. Rauca, L. Luput, L. Patras, S. Porav, M. Banciu, A. Porfire, et al. 2019. Co-delivery of curcumin and doxorubicin in PEGylated liposomes favored the antineoplastic C26 murine colon carcinoma microenvironment. *Drug Delivery and Translational Research* 9 (1):260–72.
- Sharma, R. A., H. R. McLelland, K. A. Hill, C. R. Ireson, S. A. Euden, M. M. Manson, M. Pirmohamed, L. J. Marnett, A. J. Gescher, W. P. Steward, et al. 2001. Pharmacodynamic and pharmacokinetic study of oral curcuma extract in patients with colorectal cancer. *Clinical Cancer Research* 7 (7):1894–900.
- Sharma, R. A., S. A. Euden, S. L. Platton, D. N. Cooke, A. Shafayat, H. R. Hewitt, T. H. Marczylo, B. Morgan, D. Hemingway, S. M. Plummer, et al. 2004. Phase I clinical trial of oral curcumin: Biomarkers of systemic activity and compliance. *Clinical Cancer Research* 10 (20):6847–54. [Database] doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0744.
- Shree, A., J. Islam, and S. Sultana. 2021. Quercetin ameliorates reactive oxygen species generation, inflammation, mucus depletion, goblet disintegration, and tumor multiplicity in colon cancer: Probable role of adenomatous polyposis coli, β -catenin. *Phytotherapy Research* 35 (4):2171–84.
- Song, J., S. Y. Cheon, W. Jung, W. T. Lee, and J. E. Lee. 2014. Resveratrol induces the expression of interleukin-10 and brain-derived neurotrophic factor in BV2 microglia under hypoxia. *International Journal of Molecular Sciences* 15 (9):15512–29.
- Sritharan, S., and N. Sivalingam. 2021. Curcumin induced apoptosis is mediated through oxidative stress in mutated p53 and wild type p53 colon adenocarcinoma cell lines. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 35: e22616.
- Su, P., Y. Yang, G. Wang, X. Chen, and Y. Ju. 2018. Curcumin attenuates resistance to irinotecan via induction of apoptosis of cancer stem cells in chemoresistant colon cancer cells. *International Journal of Oncology* 53 (3):1343–53.
- Syng-Ai, C., A. L. Kumari, and A. Khar. 2004. Effect of curcumin on normal and tumor cells: Role of glutathione and bcl-2. *Molecular Cancer Therapeutics* 3 (9):1101–8.
- Tarozzi, A., C. Angeloni, M. Malaguti, F. Morroni, S. Hrelia, and P. Hrelia. 2013. Sulforaphane as a potential protective phytochemical against neurodegenerative diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2013:415078.

- Teng, H., Y. Zheng, H. Cao, Q. Huang, J. Xiao, and L. Chen. 2021. Enhancement of bioavailability and bioactivity of diet-derived flavonoids by application of nanotechnology: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–16. doi: 10.1080/10408398.2021.1947772.
- Thomas, P., Y.-J. Wang, J.-H. Zhong, S. Kosaraju, N. J. O'Callaghan, X.-F. Zhou, and M. Fenech. 2009. Grape seed polyphenols and curcumin reduce genomic instability events in a transgenic mouse model for Alzheimer's disease. *Mutation Research* 661 (1-2):25–34. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2008.10.016.
- Tong, X., L. Yin, S. Joshi, D. W. Rosenberg, and C. Giardina. 2005. Cyclooxygenase-2 regulation in colon cancer cells: Modulation of RNA polymerase II elongation by histone deacetylase inhibitors. *The Journal of Biological Chemistry* 280 (16):15503–9.
- Vendrey, V., E. Peuchant, E. Buscail, I. Moranvillier, B. Rousseau, A. Bedel, A. Brillac, H. de Verneuil, F. Moreau-Gaudry, S. Dabernat, et al. 2017. Resveratrol and capsaicin used together as food complements reduce tumor growth and rescue full efficiency of low dose gemcitabine in a pancreatic cancer model. *Cancer Letters* 390:91–102. doi: 10.1016/j.canlet.2017.01.002.
- Vendrey, V., S. Amintas, C. Noel, I. Moranvillier, I. Lamrissi, B. Rousseau, S. Coulibaly, A. Bedel, F. Moreau-Gaudry, E. Buscail, et al. 2019. Combination treatment of resveratrol and capsaicin radiosensitizes pancreatic tumor cells by unbalancing DNA repair response to radiotherapy towards cell death. *Cancer Letters* 451:1–10. doi: 10.1016/j.canlet.2019.02.038.
- Vervandier-Fasseur, D., and N. Latruffe. 2019. The potential use of resveratrol for cancer prevention. *Molecules* 24:4506.
- Wang, H., X. Cai, and L. Ma. 2020. Curcumin modifies epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer through regulation of miR-200c/EPM5. *Cancer Management and Research* 12:9405–15.
- Wang, J., L. Qi, L. Mei, and Z. Wu. 2017. Curcumin inhibits the proliferation and induces apoptosis in HT-29 cell lines through a reactive oxygen species (ROS)-dependent mechanism. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 30 (5):1671–7.
- Wang, Y., W. Wang, X. Wu, C. Li, Y. Huang, H. Zhou, and Y. Cui. 2020. Resveratrol sensitizes colorectal cancer cells to cetuximab by connexin 43 upregulation-induced Akt inhibition. *Frontiers in Oncology* 10:383. doi: 10.3389/fonc.2020.00383.
- Widmer, R. J., A. J. Flammer, L. O. Lerman, and A. Lerman. 2015. The Mediterranean diet, its components, and cardiovascular disease. *The American Journal of Medicine* 128 (3):229–38. doi: 10.1016/j.amjmed.2014.10.014.
- Witika, B. A., P. A. Makoni, S. K. Matafwali, L. L. Mweetwa, G. C. Shandele, and R. B. Walker. 2021. Enhancement of biological and pharmacological properties of an encapsulated polyphenol: Curcumin. *Molecules* 26 (14):4244. doi: 10.3390/molecules26144244.
- Wu, C.-S., S.-Y. Wu, H.-C. Chen, C.-A. Chu, H.-H. Tang, H.-S. Liu, Y.-R. Hong, C.-Y. F. Huang, G.-C. Huang, C.-L. Su, et al. 2019. Curcumin functions as a MEK inhibitor to induce a synthetic lethal effect on KRAS mutant colorectal cancer cells receiving targeted drug regorafenib. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 74:108227.
- Wu, J., J. Yi, Y. Wu, X. Chen, J. Zeng, J. Wu, and W. Peng. 2019. 3, 3'-dimethylquercetin inhibits the proliferation of human colon cancer RKO cells through inducing G2/M cell cycle arrest and apoptosis. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 19 (3):402–9. doi: 10.2174/1871520618666181106120718.
- Wu, X., G. Y. Koh, Y. Huang, J. W. Crott, R. T. Bronson, and J. B. Mason. 2019. The combination of curcumin and salsalate is superior to either agent alone in suppressing pro-cancerous molecular pathways and colorectal tumorigenesis in obese mice. *Molecular Nutrition & Food Research* 63 (8):e1801097. doi: 10.1002/mnfr.201801097.
- Xagorari, A., A. Papapetropoulos, A. Mauromatis, M. Economou, T. Fotsis, and C. Roussos. 2001. Luteolin inhibits an endotoxin-stimulated phosphorylation cascade and proinflammatory cytokine production in macrophages. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 296 (1):181–7.
- Xavier, C. P. R., C. F. Lima, M. Rohde, and C. Pereira-Wilson. 2011. Quercetin enhances 5-fluorouracil-induced apoptosis in MSI colorectal cancer cells through p53 modulation. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 68 (6):1449–57.
- Yang, G., J. Qiu, D. Wang, Y. Tao, Y. Song, H. Wang, J. Tang, X. Wang, Y. U. Sun, Z. Yang, et al. 2018. Traditional Chinese medicine curcumin sensitizes human colon cancer to radiation by altering the expression of DNA repair-related genes. *Anticancer Research* 38:131–6.
- Yang, H., G. G. L. Yue, P. C. Leung, C. K. Wong, and C. B. S. Lau. 2022. A review on the molecular mechanisms, the therapeutic treatment including the potential of herbs and natural products, and target prediction of obesity-associated colorectal cancer. *Pharmacological Research* 175:106031.
- Yang, J., T. Z. Li, G. H. Xu, B. B. Luo, Y. X. Chen, and T. Zhang. 2013. Low-concentration capsaicin promotes colorectal cancer metastasis by triggering ROS production and modulating Akt/mTOR and STAT-3 pathways. *Neoplasia* 60 (4):364–72. doi: 10.4149/neo_2013_048.
- Yin, T.-F., M. Wang, Y. Qing, Y.-M. Lin, and D. Wu. 2016. Research progress on chemopreventive effects of phytochemicals on colorectal cancer and their mechanisms. *World Journal of Gastroenterology* 22 (31):7058–68.
- Yuan, L., M. Zhou, D. Huang, et al. 2019. Resveratrol inhibits the invasion and metastasis of colon cancer through reversal of epithelial-mesenchymal transition via the AKT/GSK-3 β /Snail signaling pathway. *Molecular Medicine Reports* 20:2783–95.
- Zhang, T., P. Zheng, X. Shen, R. Shao, B. Wang, H. Shen, J. Zhang, Y. Xia, and P. Zou. 2019. Curcuminoid WZ26, a TrxR1 inhibitor, effectively inhibits colon cancer cell growth and enhances cisplatin-induced cell death through the induction of ROS. *Free Radical Biology & Medicine* 141:93–102.
- Zheng, X., X. Yang, J. Lin, F. Song, and Y. Shao. 2021. Low curcumin concentration enhances the anticancer effect of 5-fluorouracil against colorectal cancer. *Phytomedicine* 85:153547. doi: 10.1016/j.phymed.2021.153547.
- Zhou, Y., J. Zhang, K. Wang, W. Han, X. Wang, M. Gao, Z. Wang, Y. Sun, H. Yan, H. Zhang, et al. 2020. Quercetin overcomes colon cancer cells resistance to chemotherapy by inhibiting solute carrier family 1, member 5 transporter. *European Journal of Pharmacology* 881:173185.

I - c - 2 BFCs et cancer du pancréas

a - Etudes in vitro

Les propriétés antitumorales des BFCs et la plupart des mécanismes cellulaires associés sont communs à de nombreux cancers, y compris le PDAC. L'action pro-oxydante de divers BFCs a été mise en évidence dans plusieurs lignées tumorales pancréatiques [155,156]. On observe des niveaux de stress oxydant et de ROS importants dans les tumeurs pancréatiques [157]. Ces changements métaboliques sont exploités par la tumeur et vont participer à la progression tumorale [158]. Les BFCs, de par leur capacité à générer un important stress oxydant, pourraient surpasser les capacités de protection et de contrôle des cellules tumorales pancréatiques et induire la mort cellulaire. Un effet pro-apoptotique associé, avec déséquilibre du ratio Bax/Bcl2, a également été mis en évidence dans plusieurs lignées pancréatiques traitées par le resvératrol [159]. De manière intéressante, cette même étude mettait en évidence un effet plus prononcé du resvératrol sur les cellules cancéreuses en comparaison d'une lignée normale. La même observation a été faite par notre équipe suite au traitement de lignées pancréatiques tumorales ou non par du resvératrol, du sulforaphane ou de la capsaïcine [160].

Outre leur action cytotoxique et pro-apoptotique, les BFCs sont également capables d'interférer avec le processus d'invasion tumorale des cellules pancréatiques. La curcumine est capable d'inhiber le phénomène de transition épithéliomésenchymateuse (EMT) et les capacités migratoires de cellules tumorales pancréatiques. Cet effet passe notamment par l'inhibition des cellules pancréatiques étoilés du microenvironnement tumoral et la baisse de leur sécrétion d'IL-6 [161]. Le resvératrol est lui aussi capable d'inhiber le phénomène d'EMT de cellules BxPC-3 et PANC-1 via l'inhibition des voies PIK3-Akt et NF- κ B [162].

Un autre mécanisme antitumoral des BFCs décrit dans de multiples types tumoraux est l'atteinte spécifique des cellules souches cancéreuses (CSC) [163–165]. Selon la molécule étudiée et le type cancéreux, plusieurs mécanismes ont pu être identifiés. Le resvératrol impacte par exemple les propriétés souches des CSC et aboutit à une baisse de l'invasion tumorale, notamment en inhibant l'expression du facteur d'autophagie NAF-1 [166].

De nombreuses études mettent en avant les propriétés sensibilisantes des BFCs vis-à-vis des thérapies anticancéreuses conventionnelles du PDAC. Notre équipe a démontré qu'un traitement combiné par resvératrol, capsaïcine et gemcitabine à dose réduite présentait le même effet antitumoral que la pleine dose de gemcitabine seule [160]. Le resvératrol seul a également été décrit comme capable de sensibiliser les cellules tumorales pancréatiques à la gemcitabine, notamment via l'inhibition de NAF-1 suite à l'activation de la voie Nrf2 dépendante des ROS [167]. Cette observation a été reproduite dans un modèle murin de PDAC [168]. Dans une autre étude, la curcumine permettait une potentialisation de l'action pro-apoptotique de la gemcitabine et du docetaxel sur des lignées tumorales pancréatiques [169]. En parallèle, l'association de curcumine à la chimiothérapie aboutissait à une inhibition importante des phénomènes d'invasion et de migration cellulaire.

L'effet radiosensibilisant de la curcumine a été exploré récemment [170]. Les auteurs rapportent un effet radiosensibilisant de la curcumine sur la lignée radiorésistante PANC-1, absent de la lignée radiosensible MiaPaCa-2. L'effet radiosensibilisant des BFCs pourraient donc bénéficier aux tumeurs les plus radiorésistantes.

Si l'effet antitumoral et radiochimiosensibilisant des BFCs a maintenant été largement démontré, la biodisponibilité faible de ces molécules après administration orale reste un obstacle majeur à leur utilisation en pratique clinique [171]. De nombreuses études tendent donc à développer des formes galéniques nouvelles, permettant l'obtention de doses intratumorales actives [172]. En particulier, les approches d'incorporation ou de couplage à des nanoparticules semblent prometteuses pour le cancer pancréatique [173]. Dans une publication récente, les auteurs comparent l'effet antitumoral du resvératrol sous forme libre, nano-émulsionné, ou couplé à des billes d'or [174]. L'effet antiprolifératif des 3 formes a été confirmé par les auteurs avec un avantage pour la forme émulsionnée. Cependant, il est dommage que les biodisponibilités respectives du resvératrol pour les 3 formes n'aient été comparées. L'effet chimiosensibilisant de la curcumine sous forme liposomale pégylée PH-sensible a également été évalué sur un modèle tumoral pancréatique. Les auteurs rapportent des concentrations de gemcitabine intracellulaire augmentées ainsi qu'un effet antiprolifératif

synergique entre la curcumine et la chimiothérapie. Ces effets étaient plus importants pour la forme liposomale que pour la forme libre de la curcumine [175]. De plus, la forme liposomale réduisait la sensibilité de la curcumine au pH et augmentait ainsi sa stabilité. Enfin, la nanoencapsulation de curcumine et d'hydroxytyrosol à l'aide d'acide poly lactide-co-glycolide-co-polyacrylique permettait l'obtention d'effets apoptotiques et antiprolifératifs plus marqués sur la lignée pancréatique tumorale PANC-1, en comparaison de leur formes libres [176]. Le développement et la mise au point de ces nouvelles formes galéniques doit maintenant se poursuivre par des études de biodisponibilité chez l'animal puis l'homme, avant de pouvoir espérer une évaluation clinique de leur intérêt pour la prise en charge du PDAC.

b - Etudes précliniques

Plusieurs travaux ont permis de valider les effets antitumoraux et chimio ou radiosensibilisants des BFCs sur des modèles animaux de PDAC, y compris sur des modèles orthotopiques. Ainsi, un traitement oral par resvératrol, à différentes doses et pendant 6 semaines, permettait l'obtention d'une réduction de la croissance tumorale dose-dépendante dans un modèle de murin greffé orthotopiquement avec des cellules PANC-1 [177]. Ce phénomène était associé à une inhibition de la phosphorylation des protéines ERK, PI3K, AKT, FOXO1 et FOXO3a ainsi qu'à une activation de l'apoptose. Aucune toxicité du traitement n'a été mise en évidence. La quercétine est également capable de réduire la progression tumorale pancréatique. Un traitement oral par quercétine d'une durée de 1 mois a permis d'obtenir une réduction de la progression tumorale et métastatique de souris greffées en sous-cutané avec des cellules PANC-1 [178]. Les auteurs ont rapporté une inhibition importante de la voie Sonic Hedgehog (SHH) induite par le traitement et dépendante du facteur Gli2. Des formes galéniques nouvelles pour l'administration optimisée des BFCs ont également été testées *in vivo*. Une équipe américaine a administré à des souris transgéniques PDAC LSL-Kras G12D/+; Pdx-1 Cre/+, une formulation combinant de la curcumine, du sulforaphane et de l'aspirine, au sein de nanoparticules couvertes au chitosane, durant 20 semaines [179]. Un effet chimiopréventif du traitement était rapporté par les auteurs avec une réduction significative de l'incidence (83.4% ; $P < 0.01$) des PanIN pour les groupes traités, en comparaison du groupe

témoin. Là encore, aucune toxicité additionnelle du traitement n'était observée. En association à la gemcitabine, une formulation de curcumine sous forme de nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques permettait une potentialisation de l'effet antiprolifératif et anti-métastatique de la chimiothérapie dans un modèle murin orthotopique de PDAC [180].

Enfin, la possibilité pour les cellules tumorales pancréatiques de développer une résistance aux BFCs, comme cela est possible pour la chimiothérapie, a été exploré *in vitro* et *in vivo* [181]. Après une exposition de cellules de lignée BXPC-3 à des doses croissantes de gemcitabine, de sulforaphane et de quercétine pendant plus de 1 an, les clones survivants ont été isolés. Si les clones survivants à la gemcitabine présentaient une résistance complète lors d'une nouvelle exposition, les clones survivants à la quercétine avaient conservé leur sensibilité initiale. Les clones survivant au sulforaphane présentaient une sensibilité intermédiaire et un effet différentiel était observé à des doses élevées. A la différence de la chimiothérapie, l'exposition prolongée de la tumeur pancréatique aux BFCs ne semble donc pas engendrer de mécanisme de résistance majeur. Cette observation est cruciale dans l'optique de traitements prolongés des tumeurs par ce type de molécules.

c - Protocoles cliniques

A l'instar de nombreux autres cancers, très peu de protocoles cliniques testant l'effet des BFCs sur le cancer pancréatique ont été jusqu'ici mis en œuvre, en comparaison des très nombreuses études menées sur des modèles cellulaires ou murins. L'identification d'un effet antiprolifératif et pro-apoptotique synergique de la curcumine et du celecoxib [182] a notamment abouti à la mise en place d'une étude de Phase III, incluant des patients atteints de PDAC avancés ou métastatiques et combinant un traitement par gemcitabine, celecoxib et curcumine (NCT 00486460). Plus récemment, le potentiel effet chimiosensibilisant du sulforaphane a été évalué (NCT 01879878, [183]). Les quelques essais référencés n'ont pour le moment diffusé aucun résultat.

I - C - 3 Radiosensibilisation des cancers pancréatiques et colorectaux par l'utilisation de BFCs

Si beaucoup d'études s'intéressent aux effets chimiosensibilisants des BFCs [184], et en particulier pour les tumeurs de la sphère digestive [185–188], celles décrivant une radiosensibilisation sont nettement moins nombreuses. Le rationnel de cette approche se base d'une part sur la capacité des BFCs à générer un important stress oxydant et d'autre part sur les mécanismes cellulaires à la base de l'impact radiobiologique. En effet, les BFCs utilisées à des doses élevées peuvent induire des effets pro-oxydants, associés à une augmentation de la production intracellulaire de ROS. En parallèle, l'action antitumorale des rayonnements ionisants (RI) passe principalement par la génération de ROS, capables secondairement d'induire des dommages à l'ADN et aux macromolécules [189].

a - Bases physico-chimiques et biologiques de la radiothérapie

Les concepts de base de la radiobiologie comprennent les hypothèses de Bergonié et Tribondeau [190], qui ont démontré au début du 20^{ème} siècle que toutes les cellules immatures, indifférenciées et en division active étaient plus radiosensibles. Leur exposition à des RI provoque des lésions ou leur mort. Les cellules matures, différenciées et ne se divisant pas activement sont par contre plus radiorésistantes. Une cellule radiosensible sera plus encline à mourir après une exposition à un RI qu'une cellule radiorésistante [190]. Les effets biologiques des RI sur les cellules tumorales et saines ont d'abord lieu au niveau moléculaire et se répercutent par la suite au niveau cellulaire.

a – 1 Effets des rayonnements ionisants au niveau moléculaire

Les interactions des rayonnements avec les constituants cellulaires sont soit directes soit indirectes. Dans le cas d'une interaction directe, les macromolécules d'une cellule (protéines ou ADN) sont touchées par le rayonnement ionisant, ce qui va engendrer une ou plusieurs modifications chimiques, principalement par ionisation. Cependant, l'effet délétère des rayonnements sur les macromolécules passe principalement par des interactions indirectes

après radiolyse des molécules d'eau [191]. En effet, l'eau représentant le constituant majoritaire d'une cellule, l'exposition au rayonnement génère une quantité importante d'espèces réactives de l'oxygène ou radicalaires (**Figure 8**). Lors de la phase physique, c'est-à-dire immédiatement après l'interaction du rayonnement avec la matière, 2 réactions distinctes peuvent se produire : L'excitation et l'ionisation. L'excitation conduit à la formation d'une molécule d'eau excitée alors que l'ionisation génère une molécule d'eau ionisée et un électron. Lors des phases physico-chimique et chimique qui suivent, d'autres réactions ont lieu et aboutissent à la production d'un pool d'espèces réactives et radicalaires diverses. Les radicaux hydroxyles peuvent par exemple se recombinaison pour former du peroxyde d'hydrogène, composé oxydant très instable et capable de se combiner à divers composés organiques tels que les protéines, lipides et acides nucléiques

Les antioxydants, qui ont fait l'objet de nombreuses recherches et qui sont largement mis en avant par les industries alimentaires et cosmétiques, peuvent bloquer la recombinaison des hydroxyles en peroxyde d'hydrogène ou inactiver les ROS. C'est l'une des défenses de l'organisme vis-à-vis du stress oxydant généré par les RI mais également par d'autres facteurs extérieurs. Pour cette raison, les antioxydants font l'objet d'une grande attention en tant qu'agents chimiopréventifs [192].

Que l'effet soit direct ou non, les anomalies générées sur l'ADN comprennent des cassures simple ou double brin, la génération de sites abasiques et de bases modifiées ou encore des pontages ADN-protéine ou ADN-ADN (**Figure 9**) [193].

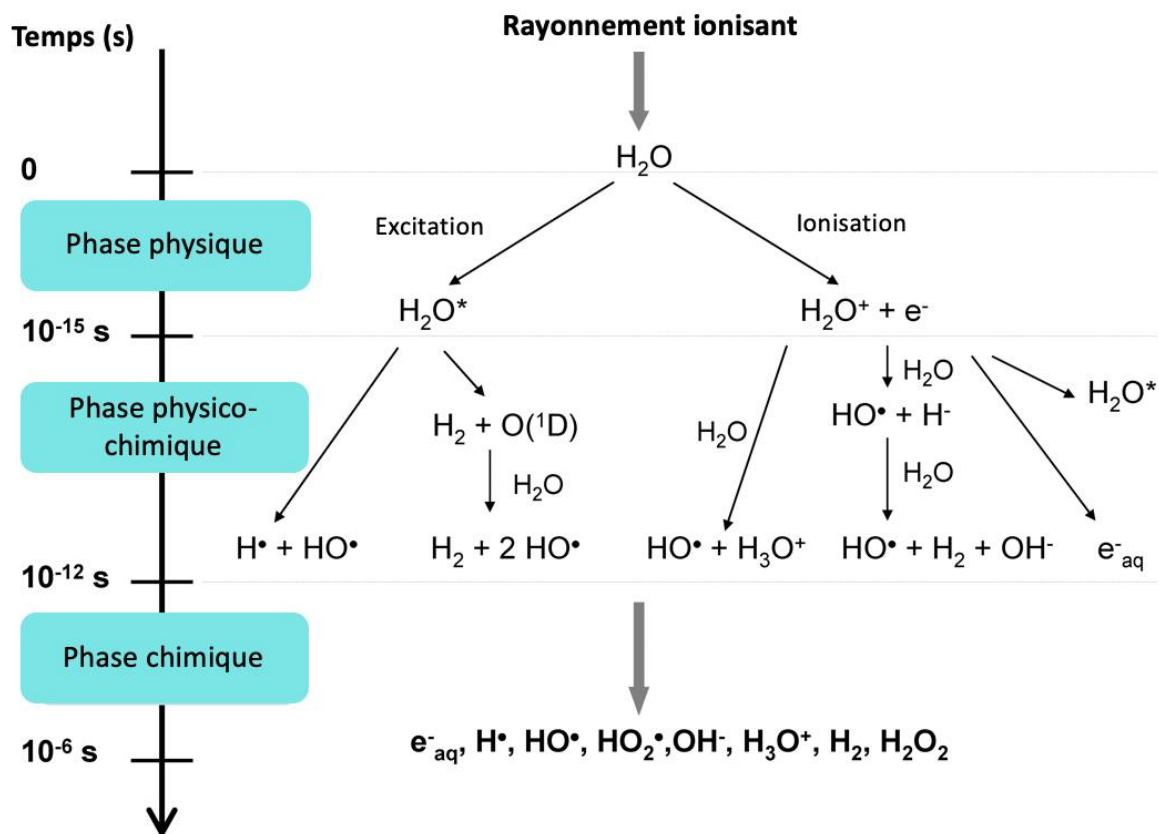


Figure 8 : Les 3 phases de la réaction de radiolyse de l'eau par les rayonnements ionisants. La phase physique, qui est atteinte environ 1 fs après l'interaction initiale entre la matière et le rayonnement ionisant, consiste en un dépôt d'énergie suivi de processus de relaxation rapides. Ceci conduit à la formation de molécules d'eau ionisées (H₂O⁺), de molécules d'eau excitées (H₂O*) et d'électrons (e⁻). Au cours du stade physico-chimique (10⁻¹⁵-10⁻¹² s), de nombreux processus se produisent aboutissant notamment à la génération de dihydrogène (H₂) et de radicale hydroxyle (OH•). Enfin, lors de la phase chimique (10⁻¹²-10⁻⁶ s) les espèces diffusent. Ils peuvent ainsi réagir les uns avec les autres (pour former du peroxyde d'hydrogène par exemple / H₂O₂) et avec les molécules environnantes. (Adapté d'après La Caër., Water, 2011).

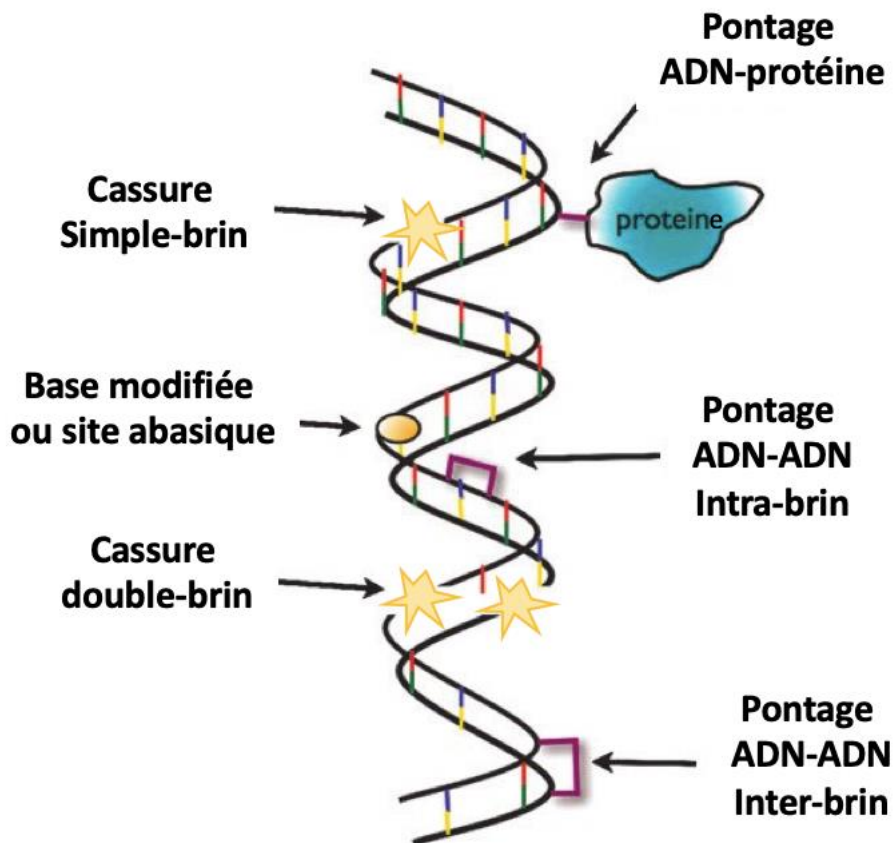


Figure 9 : Les différents types de dommages à l'ADN générés par les rayonnements ionisants. (Adapté d'après Kavanagh & al., *Antioxidants and Redox Signaling*, 2013).

a – 2 Prise en charge et réparations des dommages à l'ADN

Les dommages à l'ADN représentent le mécanisme d'action principal des RI sur les cellules tumorales. Pour survivre, la cellule devra mettre en œuvre divers mécanismes de réparation des dommages à l'ADN. L'irradiation induit l'activation de plusieurs voies de signalisation régulant l'expression génique et le cycle cellulaire afin de permettre entre la réparation des altérations de l'ADN.

Les cellules se divisant activement sont plus radiosensibles que celles qui ne se divisent pas. Le cycle cellulaire d'une cellule proliférant activement comprend 4 phases : la phase G1 au cours de laquelle la cellule se prépare à la réplication de l'ADN ; la phase S durant laquelle l'ADN le contenu en ADN est répliqué ; et la phase G2 au cours de laquelle la cellule se prépare à la mitose. La phase M ou mitose, au cours de laquelle la cellule se divise en deux ; La phase M, durant laquelle les chromosomes sont condensés et appariés dans une zone restreinte, est la phase où la cellule est la plus radiosensible. L'augmentation du volume chromatinien observé dans les cellules cancéreuses pourrait également expliquer leur radiosensibilité supérieure à celle des cellules normales [194].

Bien que générés à une fréquence faible en comparaison des autres types de dommages, les cassures double-brin représentent le dommage le plus délétère pour la cellule, notamment de par la complexité des mécanismes de réparation à mettre en œuvre pour sa correction. Deux mécanismes majeurs sont classiquement décrits : La jonction non homologue des extrémités ou « Non Homologous End Joining » (NHEJ) et la recombinaison homologue (**Figure 10**). Le NHEJ met en jeu un complexe DNA-PK, composé d'un l'hétérodimère Ku70/Ku80 et de d'une protéine DNA-PKcs. Ce complexe détecte la cassure double-brin et permet le recrutement d'une nucléase qui procède à la résection des extrémités simple-brin situées de part et d'autre de la brèche. Une ligase permet enfin la jonction des 2 brins. Lors de cette étape de résection, une perte d'information génétique peut se produire, rendant le mécanisme de réparation par NHEJ non-fidèle [195].

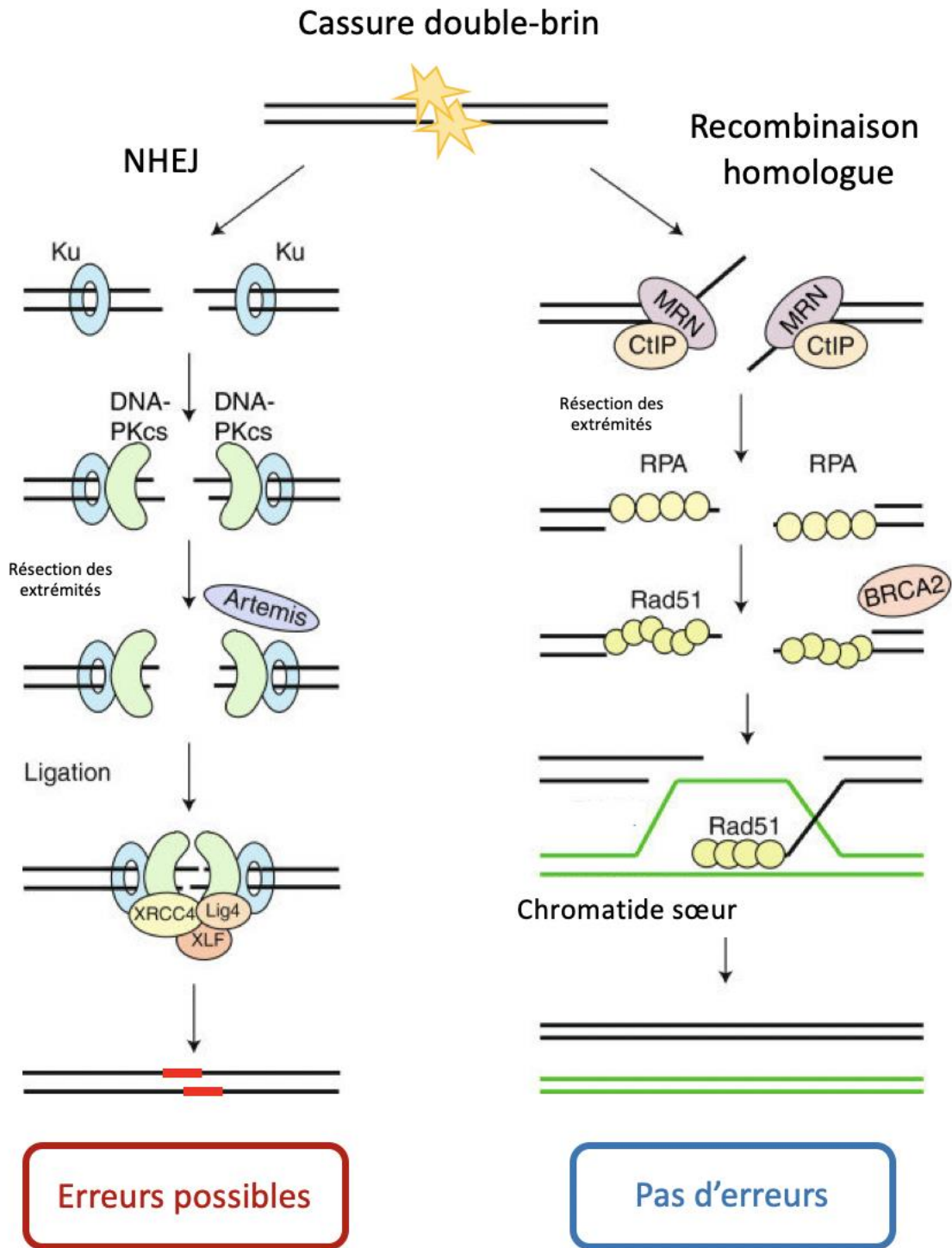


Figure 10 : Les voies de réparation des cassures double-brin de l'ADN. (Adapté d'après Brandsma & al., *Genome integrity*, 2012).

En revanche, la recombinaison homologue présente une complète fidélité puisqu'elle permet la synthèse à l'identique de la séquence d'ADN coupée. Pour ce faire, elle utilise comme modèle l'allèle intacte présent sur la chromatide sœur ou le chromosome homologue. La première étape de la recombinaison homologue implique le complexe MRN (Mre11-RAD50-NBS1). L'activité nucléase de Mre11 effectue la résection 5'-3' des extrémités de la cassure. Les protéines RPA et Rad52 viennent alors se fixer sur les extrémités 3' afin de les protéger des exonucléases. Sous le contrôle des facteurs BRCA1 et BRCA2, la protéine RAD51 est activée et va recruter les séquences homologues sur la chromatide sœur appariée. Enfin, les polymérases interviennent et synthétisent la séquence manquante en prenant comme matrice la séquence homologue intacte sur la chromatide sœur [196]. La phase du cycle cellulaire au moment de l'irradiation influe sur le type de mécanisme mis en jeu pour la réparation de l'ADN. En phase G1, c'est le phénomène NHEJ de va prédominer alors qu'en phase S et G2/M, la recombinaison homologue est favorisée du fait du rapprochement des chromosomes homologues [195].

a – 3 Effets des rayonnements ionisants au niveau cellulaire

Après une exposition aux rayonnements ionisants, les lésions cellulaires peuvent aboutir à 2 scénarios différents : un retard de la division cellulaire ou une mort cellulaire induite soit par mort interphasique, mettant en jeu le processus apoptotique, soit par un échec de reproduction immédiat ou après plusieurs divisions.

Dans le cas d'un retard de division, la division mitotique est retardée mais voit sa fréquence se normaliser dans les divisions suivantes. Ce phénomène est observé pour des doses supérieures à 0,5 Gy et jusqu'à environ 3 Gy. À plus de 3 Gy le taux de mitose ne se rétablit pas et la cellule meurt.

La mort cellulaire induite par les rayonnements implique 2 mécanismes distincts. Le premier est l'apoptose, également appelée mort cellulaire programmée [197]. L'apoptose sert de mécanisme de protection pour l'élimination des cellules fortement endommagées et donc

potentiellement mutées d'une population cellulaire irradiée. Les cellules subissant l'apoptose comme conséquence immédiate des dommages causés par les rayonnements meurent généralement en interphase dans les quelques heures qui suivent l'irradiation, sans mitose intermédiaire et indépendamment de celle-ci. Elles présentent des modifications morphologiques distinctes, notamment la perte de la structure nucléaire normale et la fragmentation de l'ADN. Les premières données suggéraient que l'apoptose radio-induite dépendait de l'activité fonctionnelle du gène p53, mais il est rapidement devenu évident que des voies indépendantes de p53 étaient également impliquées, comme celle médiée par la famille Bcl-2/BAX [198], qui convergent toutes vers l'activation des caspases [199]. Un modèle d'apoptose dépendante de p53 implique l'induction transcriptionnelle de gènes liés à l'oxydoréduction aboutissant à la formation de ROS et conduisant à la mort cellulaire par stress oxydatif [200]. Bien que les lésions à l'ADN jouent un rôle majeur dans le déclenchement de la réponse apoptotique [201,202], certaines études suggèrent un rôle des lésions membranaires et des voies de signalisation extranucléaires impliquant des tyrosine kinases [203].

Un autre mécanisme potentiel d'élimination des cellules fortement endommagées d'une population irradiée est l'induction d'un arrêt du cycle cellulaire irréversible en phase G1/S [204]. Cet arrêt est dépendant de p53 et d'ATM [205], puisqu'aucun arrêt ne se produit après irradiation de cellules homozygotes ATM^{-/-} [204], ni de cellules p53^{-/-} [205]. L'activation de la voie p53/p21 suite aux dommages causés par les RI dans certaines cellules tumorales humaines supprime également la progression des cellules en phase G1 vers la phase S et stimule la mort cellulaire apoptotique [206,207]. Au contraire, la surexpression de l'oncogène *c-MYC* permet d'atténuer cet effet [208]. L'absence d'arrêt en G1 pourrait être à l'origine de l'instabilité génétique observée dans les des cellules p53 déficientes ; Ainsi, des cellules présentant des altérations génétiques importantes progresseront dans le cycle cellulaire et continueront à proliférer plutôt que de s'arrêter en G1 et mourir.

Le deuxième mécanisme de destruction des cellules est l'échec de la reproduction induit par les rayonnements. À des doses suffisantes, les rayonnements peuvent inhiber la mitose et la

prolifération cellulaire. Ce phénomène peut se mettre en place immédiatement ou après plusieurs cycles de duplication. Ainsi, les effets des RI chez l'être humain se produisent principalement dans les tissus dont le taux de renouvellement cellulaire est élevé et qui sont caractérisés par une grande activité proliférative. Il s'agit notamment de tissus tels que la moelle hématopoïétique et les muqueuses digestives.

Hypothèse de travail :

Les BFCs et la radiothérapie partagent donc des mécanismes d'action communs notamment la génération de ROS et de stress oxydant. L'association de BFCs et de RI pourrait donc aboutir à une amplification de la génération de ROS et une action antitumorale majorée. La radiothérapie fait partie de l'arsenal thérapeutique pour la prise en charge des cancers du pancréas et du rectum. Dans ce contexte, nous avons exploré l'action radiosensibilisante d'une association de 2 BFCs sur ces 2 types tumoraux, pour lesquels nous possédons une expertise biologique et clinique.

II Résultats :

II – 1 Radiosensibilisation de l'adénocarcinome pancréatique canalaire par les BFCs : Article original



Original Articles

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



Véronique Vendrely^{a,b}, Samuel Amintas^{b,c}, Cécile Noel^c, Isabelle Moranvillier^{a,c},
Isabelle Lamrissi^{a,c}, Benoit Rousseau^c, Soulé Coulibaly^b, Aurélie Bedel^{a,b,c},
François Moreau-Gaudry^{a,b,c}, Etienne Buscail^{a,b,c}, Laurence Chiche^{a,b,c}, Geneviève Belleannée^b,
Charles Dupin^b, Sandrine Dabernat^{a,b,c,*}

^a INSERM U1035, Bordeaux, France

^b CHU de Bordeaux, Bordeaux, France

^c Université de Bordeaux, Bordeaux, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Resveratrol

Capsaicin

Radiotherapy

Pancreatic ductal adenocarcinoma

DNA repair

ABSTRACT

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

1. Introduction

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is associated with a poor prognosis, since the 5-year global survival rate remains under 10% [1]. Given an increased incidence over the last decades, PDAC is becoming a major public health issue and is projected to become the second cancer killer in 2030 [2]. This poor prognosis can be explained by the late diagnosis due to aspecific symptomatology but also by PDAC resistance towards conventional treatments as chemotherapy and radiotherapy [3]. Such innate and acquired resistances most probably come from the multiple genomic aberrations found in PDAC. Indeed, more than 60 different mutations and 10 dysfunctional pathways have been identified by large scale high-throughput analyses [4], conferring multiple survival options to the tumor cells. Initially based on knowledge of PDAC, studies have tested clinically or are still evaluating radiosensitizing compounds inhibiting key oncogenic cell pathways such as ras, raf,

EGFR and IGF1R or modulating immune environment, with conflicting results or toxic issues [5]. Thus, no specific radiosensitizers is currently admitted for PDAC, apart from 5-fluorouracil (5-FU) or gemcitabine, albeit with very limited success [6]. Exposure to ionizing radiations induces a variety of DNA lesions, of which DNA double-stranded breaks (DSB) are the most lethal, and, if left unrepaired, lead to genomic instability or cell death. This is why several pathways have been proposed to contribute to radioresistance, mostly involved in DNA repair [7]. Thus, it is very worthy to target DNA damage/repair pathways to increase RT-induced cell death. As conventional therapeutic approaches have been disappointing in PDAC, we looked for alternatives in the emerging field of BFCs. BFCs are physiologically active constituents in food or dietary supplements, including those that meet basic human nutrition needs, that have been demonstrated to have a role in health and to be safe for human consumption for intended food and dietary supplement uses (the American Dietetic Association). Among BFCs,

* Corresponding author. Université de Bordeaux, INSERM U1035, 146, rue Léo Saignat, 33076, Bordeaux Cedex, France.

E-mail address: sandrine.dabernat@u-bordeaux.fr (S. Dabernat).

<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.02.038>

Received 20 September 2018; Received in revised form 29 January 2019; Accepted 21 February 2019
0304-3835/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

Abbreviations		R	Resveratrol
PDAC	Pancreatic ductal adenocarcinoma	RT	Radiotherapy
BFCs	Bioactive Food Components or Compounds	DSBs	Double Stranded Breaks
ROS	Reactive Oxygen Species	5FU	5 Fluoro-Uracile
CSC	Cancer Stem Cell	ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
FOLFIRINOX	Association of Oxaliplatin, Irinotecan and 5 Fluorouracile	Chk	checkpoint kinase
IC50	Half maximal inhibitory concentration	EMT	Epithelial to Mesenchymal Transition
C	Capsaicin	ATR	ATM and Rad3-related
		Con	control treated with vehicle

resveratrol (a member of the stilbene family) and capsaicin (a vanilloid compound) had shown promising results on PDAC cell lines, by increasing Reactive Oxygen Species (ROS) production, and by potentiating chemo and/or radiotherapy [8]. We found that combination of resveratrol and capsaicin potentiated a reduced dose of gemcitabine, resulting in full effect recovery of high dose of gemcitabine, in a pre-clinical mouse model [9]. As BFCs, radiotherapy induces ROS production. Therefore, using several BFCs as an induction or a combination treatment with RT might overwhelm tumor cells in scavenging ROS, resulting in increased cell death. As we already showed that resveratrol and its analogues in combination with capsaicin increased chemotherapy toxicity, we ought to test whether this approach was valid for radiosensitization.

2. Materials and methods

2.1. Animals and cell lines

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

2.2. In vitro cell survival assay and cell irradiation

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

2.3. Protein extraction and western-blotting

Protein extracts from tumors of xenografted Capan-2 cells and western blotting were performed as already described [10]. The following primary antibodies were used: anti-Phospho-ATM, anti-Phospho- γ H2A.X, anti-Phospho-p53 (ser15), anti-Phospho-Chk1, anti-phospho-Chk2, anti-Bax, anti-Bcl2 (Cell Signaling).

2.4. ROS detection after irradiation

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

2.5. Xenografts of the Capan-2 cells

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

2.6. Histology and morphometric analysis

Tumors were collected, fixed in 10% normal buffered formalin, and sectioned (4 μ m sections) after paraffin embedding. Slides (10 slides per group) were stained with trichrome masson stain to highlight fibrosis (appearing green). on. Pictures were taken at $\times 100$ magnification, and percentages of fibers were evaluated by 2 distinct operators. Pictures were taken under an inverted Nikon Microscope (Eclipse Ti Nikon, Champigny sur Marne, France). They were treated the NIS-Elements Nikon software, connected with a video camera. Tumor necrosis and atypical nuclei were determined by a trained pathologist of Bordeaux University Hospital (GB) (10 slides per group). Cellularity was quantified on fluorescence images by counting the number of nuclei (stained with DAPI) per field ($n = 1566$, $n = 1853$, $n = 1577$, for CT, RT and RT + BFCs groups, respectively). KI67 stain was performed by immunohistochemistry with anti-KI67 primary antibody (Leica) and anti-mouse secondary antibody (Dako). Number of KI67-positive nuclei over total nuclei was counted on pictures (total cell number $n = 1746$, $n = 877$, $n = 1385$, for CT, RT and RT + BFCs groups, respectively).

2.7. Statistical analysis

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

3. Results

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

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

To determine whether irradiation and combination BFCs (resveratrol and capsaicin) could have additive effects, we determined the best combination concentration allowing further measurable radiotoxicity. We chose to work on one radiotherapy-sensitive cell line to (Capan-2) and one resistant cell line (PANC-1). BFC combination cytotoxicity using resveratrol and capsaicin inhibitory cytotoxic dose 50 (IC50) was too strong to see any additive effect of irradiation. We tested combination treatment at IC50/2 and IC50/4 and found that the best option was to treat the cells with BFCs at half of their IC50, leading to about 50% cell cytotoxicity ($p < 0.001$ as compared to control condition). Next, we treated the cells with BFCs (IC50/2), or BFCs alone (IC50) and radiotherapy (RT, 6Gy). For Capan-2 cells, we found that each BFC used alone could significantly sensitize cells to RT (Fig. 2, $p < 0.001$ when comparing RT alone to RT + R or C). Combination treatment, even at IC50/2 had a significant stronger effect ($p < 0.001$ when comparing BFCs and BFCs + RT). For the PANC-1 cell line, combination of BFCs without RT was toxic, however no radiosensitization was evidenced.

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

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

We previously demonstrated that combination treatment increased ROS production in Capan-2 cells [9]. As X-Rays irradiation induces the production of ROS, we hypothesized that combination treatment of BFCs and RT could exacerbate ROS production. We treated cells *in vitro* with BFCs and RT and ROS induction was quantified as percentage of fluorescent cells (Fig. 3). As expected, RT induced significant increase of ROS producing cells ($p < 0.01$, as compared to control condition) and BFCs further enhanced this effect ($p < 0.01$ as compared to RT alone). Importantly the same observations were made in two different pancreatic cell lines (Capan-2 and BxPC-3). Mean fluorescence

intensities were significantly increased after RT treatment, in the presence of BFCs, for Capan-2 cells (not shown). Thus, BFCs increased ROS production resulting from irradiation.

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

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

To further explore treatment impact on tumor progression, we analyzed histologic sections and performed morphometric analyses. Tumors treated by RT or RT + BFCs displayed increased fibrosis, significantly different from control tumors, suggesting that RT induced desmoplastic reaction (Fig. 5A a, e, i and d, h, l). Treated tumors also underwent significant enhanced necrotic reaction as compared to control group, suggesting that treatment was efficient (Fig. 5B). However, addition of BFCs did not modulate changes seen after RT treatment. Moreover, RT-treated group displayed more numerous atypical nuclei (66% of 12 slides) than RT + BFC or control groups (40% of 10 and 8 slides, respectively). Furthermore, cellularity diminished, especially in the RT + BFCs group, with nuclei displaying condensed chromatin as observed in apoptotic cells. KI67 staining, revealing cycling cells, showed that RT and RT + BFCs tumor groups had similar proportion of cells active in the cell cycle as compared to tumors treated with RT only showing a significant decreased in KI67-positive nuclei (Fig. 5A c, g and k).

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

3.4. BFCs modified molecular tumor response to RT treatment

X-Ray radiations induce diverse lesions in cells, involving radiolysis-derived ROS including DNA damages. To understand molecular

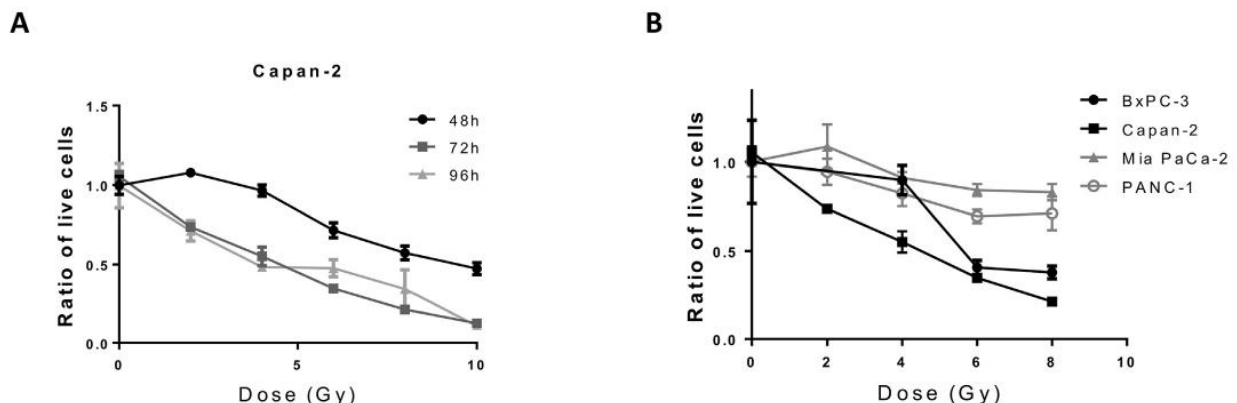


Fig. 1. Pancreatic cancer cells display different radiosensitivities.

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

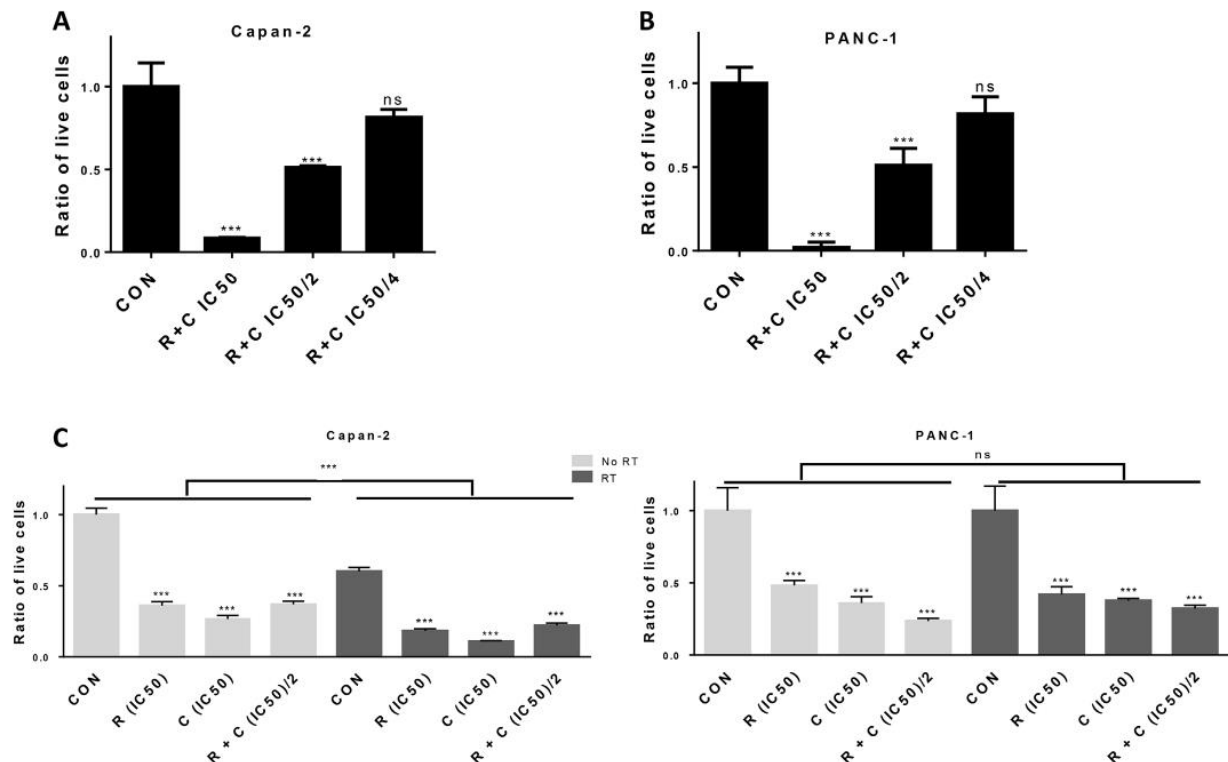


Fig. 2. Combination of resveratrol and capsaicin radiosensitizes radiosensitive but not radioresistant pancreatic tumor cells.

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

responses to RT of treated tumors, we performed western blotting of proteins extracts from CAPAN-2 xenografted tumors, focusing on proteins involved in double stranded break repair pathway. One of the earliest events recruits ataxia telangiectasia mutated (ATM) to the DNA break, which phosphorylates histone γ H2A.X at serine 139 (Fig. 6A) [13]. Control tumors displayed low levels of phospho-H2A.X, whereas RT treated tumors showed a massive increase as compared to control group (about 40-fold, $p < 0.01$, Fig. 6B). Surprisingly, addition of BFCs with RT strongly inhibited γ H2A.X phosphorylation ($p < 0.05$), keeping its level similar as that observed for control tumors. To investigate this unexpected result, we looked at ATM autophosphorylation (Ser1981), which is necessary for ATM kinase activity. BFC treatment diminished ATM phosphorylation as compared to RT alone (Fig. 6C, $p < 0.05$). Next, we looked at downstream effectors of the double-stranded break DNA repair pathway. Both checkpoint kinases (Chk), Chk1 and Chk2 were activated by phosphorylation after RT treatment, with or without BFCs, similarly (Fig. 6D). Phosphorylation of p53 (Ser15) was significantly increased in RT treated tumors with BFCs (Fig. 6E). Ratios of BAX/BCL2 proteins increased significantly only in RT + BFC tumors ($p < 0.05$, Fig. 6F).

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

Thus, these results suggest that BFC addition to RT opposes RT-

induced cell cycle arrest and precipitates cells in apoptotic death.

4. Discussion

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

Several BFCs radiosensitize tumor cells such as the polyphenols curcumin [18] and quercetin [19] or the sulfamide sulforaphane [20], for example. Considering our previous work on pancreatic tumor cell

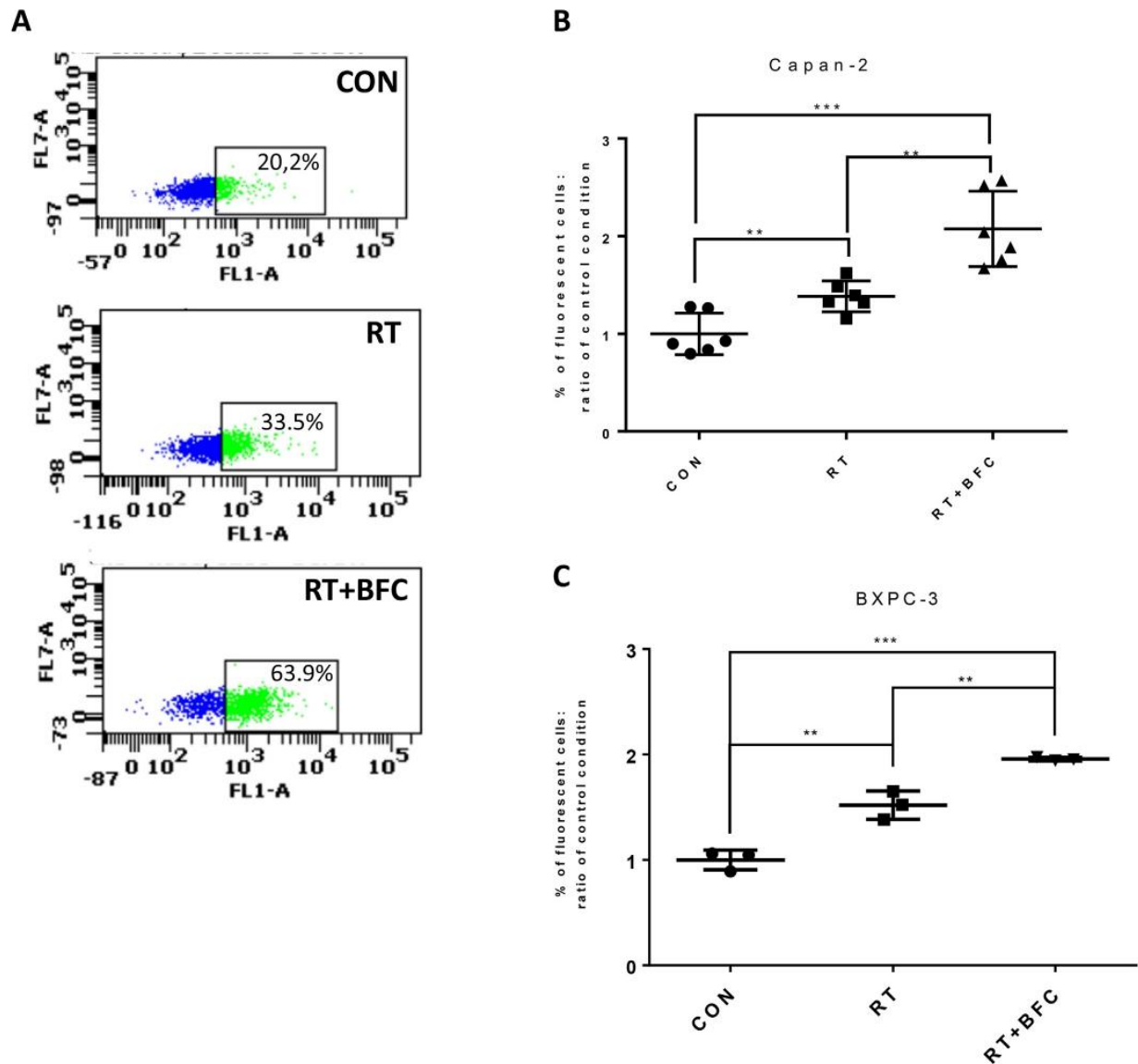


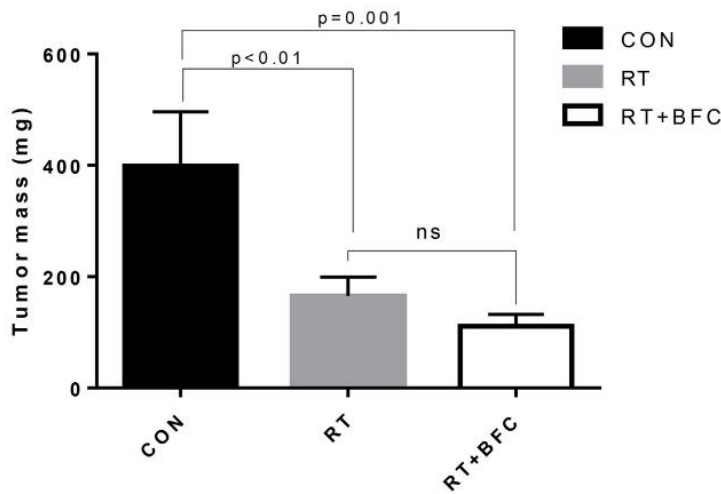
Fig. 3. BFC addition to radiotherapy enhances oxygen reactive species production.

Cells were incubated for 30 min at 37 °C with DCFH-DA, then treated with radiotherapy (RT), or combination treatment of BFCs (resveratrol and capsaicin) and RT or were treated with vehicle (CON). Percentages of fluorescent cells increase, marking the production of ROS was quantified by flow cytometry. A) Representative dot plots are shown for each condition, with % of fluorescent cells indicated in the positive window. B) Individual results of percentages of fluorescent cells were plotted and mean \pm SD are shown for each condition, for two different cell lines (Capan-2 and BCPC-3 cells). **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

chemosensitization by combination of capsaicin and resveratrol [9], we tested the same approach with radiotherapy. We found that ionizing radiations *in vitro* cytotoxicity was amplified by BFC addition, at two different doses (IC50 or IC50/2 for resveratrol or capsaicin) for the Capan-2 cell line. By contrast, PANC-1 cells, although sensitive to BFC treatment were resistant to radiotherapy. BFCs did not sensitize them to RT. This suggests that radioresistance relies on specific capacity of PANC-1 towards radiotherapy. Others have reported failure in radiosensitizing the PANC-1 cell line [21]. This resistance may depend on the expression level of the apoptosis inhibitor survivin [21,22]. Alternatively, as already mentioned above, PANC-1 cells may carry intrinsic radioresistance linked to their CSC-like phenotype, that could not be counteracted by BFC addition.

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

A



B

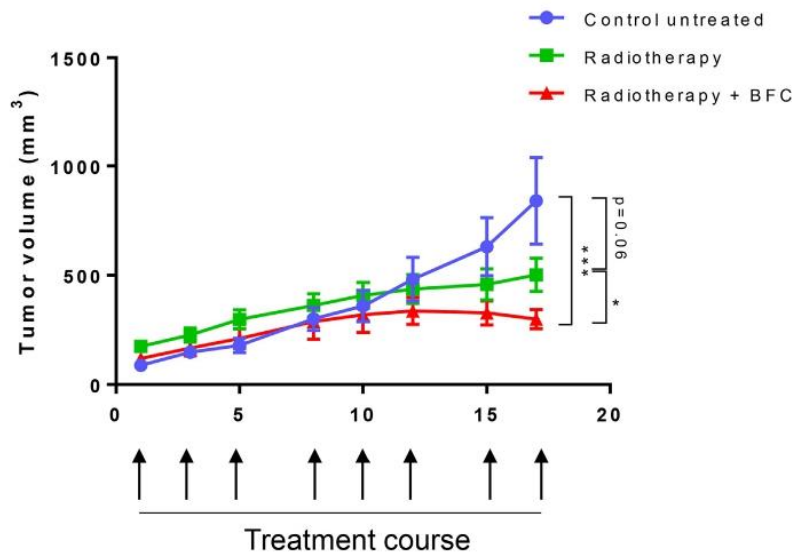


Fig. 4. BFC addition to radiotherapy modulates xenografted tumor RT response.

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

ROS-dependent radiosensitization of colon cancer cells by resveratrol [26].

We performed *in vivo* evaluation of the combination treatment RT + BFCs in a subcutaneous xenograft model, with BFC administration by gavage and a full body irradiation program. Tumor volume analysis confirmed significant radiosensitization by BFCs. We observed a trend of lower mean masses that could reach significance if the experiments were continued over a longer period. However, total body irradiation resulted in aplasia, which prevented further irradiations. Alternatively, similar tumor masses could still carry difference only visible at the microscopic level. To address this question, we analyzed sections of tumors within all the groups. We found that fibrotic reaction and necrosis were similarly increased in RT-treated groups, with or without BFCs, underlying efficiency of the treatments. This suggests that RT might be the main effector of tumor toxicity with a minimal modulation by BFCs. Moreover, we found a modest diminution of cellularity in the RT + BFCs treated group that could account for the observed loss of mass as compared to control.

As already reported by us and others, resveratrol or capsaicin treatment, as well as both combined induced high levels of apoptosis, involving several intracellular factors leading to unbalanced pro/anti-BCL2 members [9,27,28]. We found the same impact in the present study in tumor treated with RT + BFCs, further confirmed with decreased cellularity and chromatin compaction visualized on histological section. Interestingly, RT alone did not change significantly BAX/BCL2 ratio as compared to control tumors. In fact, RT treatment alone led to significant increase in BCL2 levels (Fig. 5, p < 0.01), and a trend to diminish BAX levels. Irradiated Mia PaCa-2 cells also changed their BAX to BCL2 balance in the same way [20], the control of BCL2 family member levels being known as a mechanism of RT resistance [29]. Our result suggests that addition of BFCs to irradiation counteracts this resistance mechanism.

The gene suppressor p53 is at the crossroad between apoptosis induction and cell cycle arrest for DNA repair (Fig. 5A). We found an increase in phospho-stabilization of p53 on ser15 (and also ser6 and ser9, not shown) in RT + BFC group. Checkpoint Kinases 1 and 2

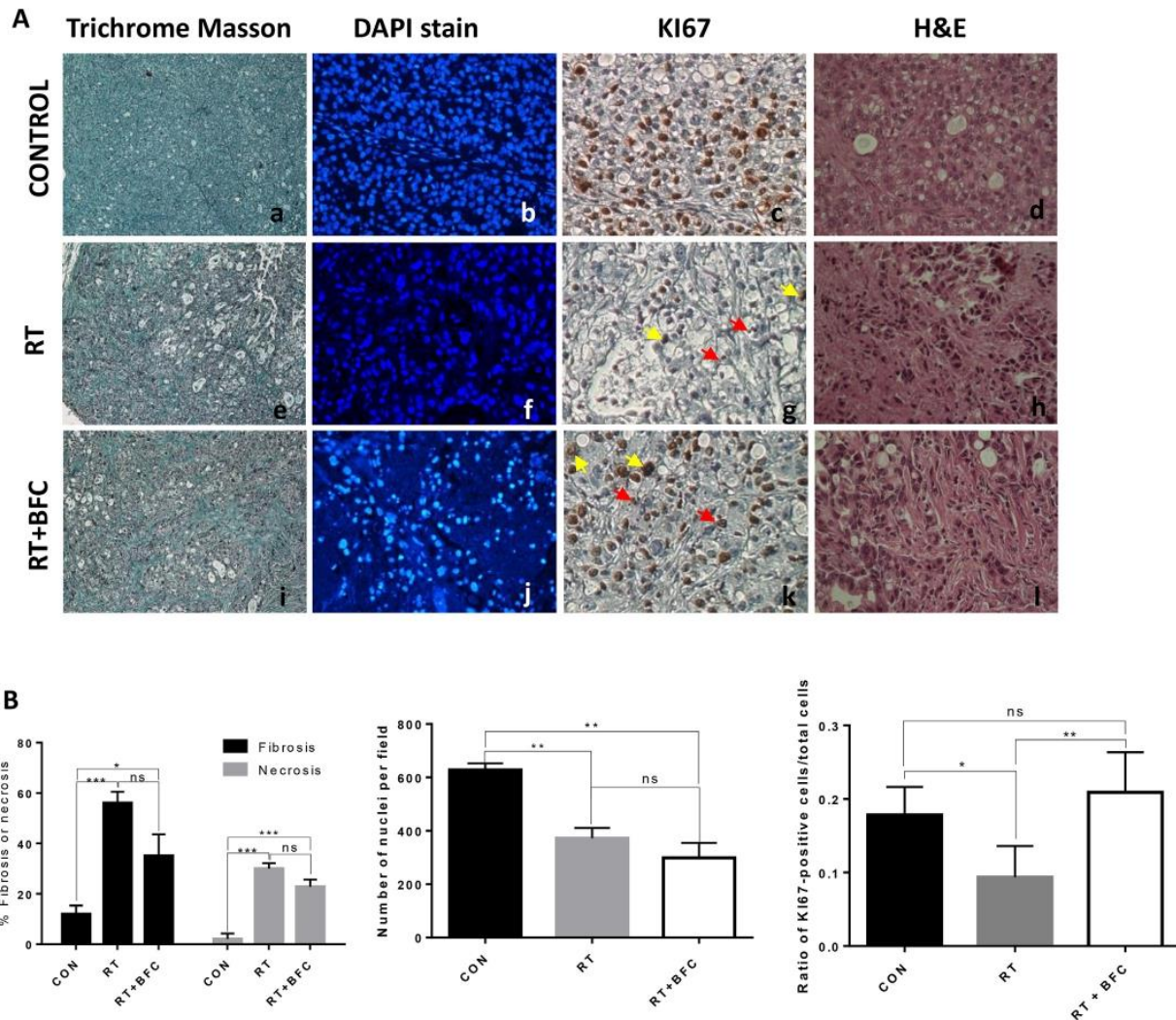


Fig. 5. BFC addition to radiotherapy keeps tumor cells cycling.

(A) Tumors were collected, fixed and embedded in paraffin. Sections were stained by Trichrome Masson (a, e, i), original magnification $\times 100$. DAPI and KI67 staining are shown for each condition (b, f, j and c, g, k respectively) original magnification $\times 200$ and $\times 400$, respectively. Hematoxylin and eosin (H&E) stain shows tumor structure (d, h, l) original magnification $\times 400$. Fibrosis is visualized by long green fibers in between the epithelial tumor clusters. (B) Mean \pm SEM tumor fibrosis and necrosis quantifications are displayed. Mean \pm SEM cellularity and KI67 positive nuclei are presented. Yellow arrows point atypical nuclei whereas red arrows show typical DNA-containing apoptotic vesicles. Fibrosis was evaluated by 2 distinct operators, as percentages of fibers in microscopic fields (10 slides per group). Tumor necrosis and atypical nuclei were determined by a trained pathologist of Bordeaux University Hospital (GB, 10 slides per group). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

observed activation probably resulted in p53 phosphorylation. When p53 is stabilized by phosphorylation, it first stops the cell cycle by CKI production. Interestingly, the proliferation marker KI67 was turned down in RT only treated tumors and was maintained as in controls in the presence of BFCs. To explain this combination of results we can hypothesize that RT induces cell cycle arrest, which might be counteracted by BFCs, precipitating tumor cells in unrepaired mitosis, and exacerbating intrinsic apoptosis. This effect was previously described for resveratrol treatment [30]. Moreover, capsaicin induced apoptosis in irradiated prostate cancer cells by opposing NF κ B survival signal, independently of cell cycle arrest [31].

Next, we searched for BFC impact on RT response in earlier stages of DNA damage response. Importantly, we found profound differences between control and treated groups, and more surprisingly between RT

alone and RT + BFCs groups. As the first hypothesis was that increased ROS might induce enhanced DSBs, we looked at γ H2.AX phosphorylation, which is one of the first steps of DSB DNA repair response [13], witnessing its beginning. Strikingly, and unexpectedly, γ H2.AX phosphorylation displayed a sharp increase after RT treatment, completely annihilated in the presence of BFCs. We found that this was probably due to inhibition of ATM activation, since ATM phosphorylation was no more detectable in the presence of BFCs. Resveratrol alone enhances IR-induced DNA-damage response signals, probably by ROS-related DSBs, leading to ATM activation and radiosensitization of prostate cancer cells [30] or in chronic treatment. Moreover, resveratrol alone can directly activate ATM [32]. In the same way, capsaicin is known to induce ROS production and thereby DNA damages [25], but no direct action has been described on ATM activation. Interestingly, combination of

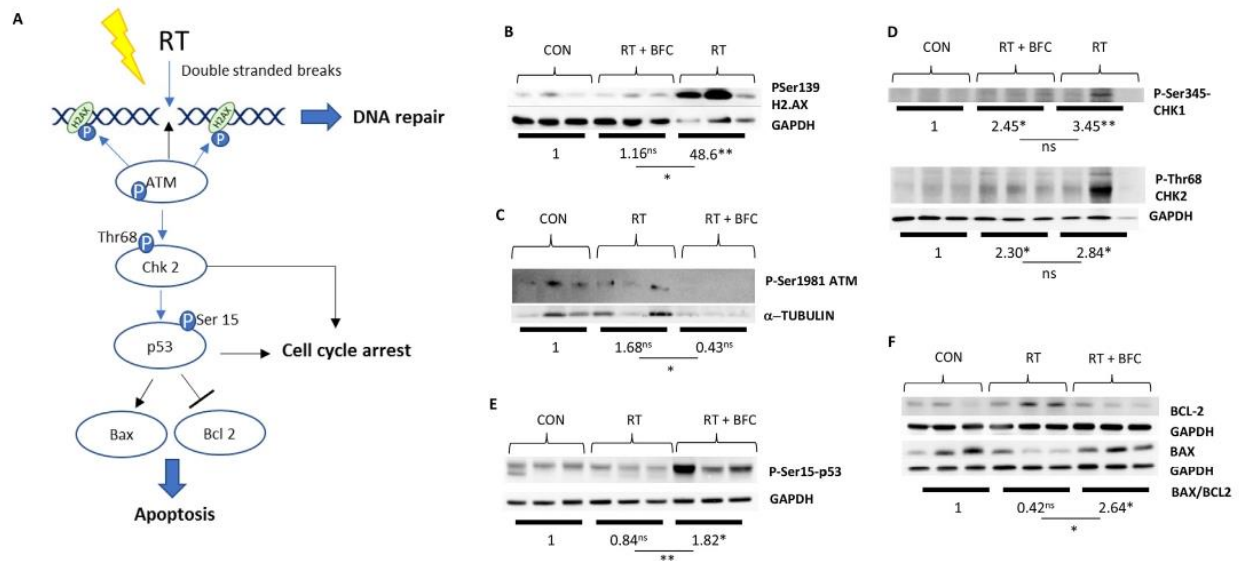


Fig. 6. BFC addition to radiotherapy results in striking inhibition of DSB repair pathway favoring cell death response in xenografted tumors.

(A) Molecular response to radiotherapy: exposure to ionizing radiations induces DNA double-stranded breaks (DSB), leading to DNA damage repair pathways activation with cell cycle arrest and eventually apoptosis induction. Western blotting was performed for at least 3 tumors from xenografted Capan-2 cells of each condition. Densitometry analysis are presented under each blot as a ratio of control condition. Statistical analysis was performed for each quantification: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns: not significant by a two-tailed Mann Whitney test. (B) Immunoblot with anti-phospho-ser139- γ H2.AX. (C) Immunoblot with anti-phospho-ser1981-ATM. (D) Immunoblot with anti-phospho-ser345-CHK1 and anti-phospho-Thr68-CHK2. (E) Immunoblot with anti-phospho-ser15-p53. (G) Immunoblot with anti-bcl2 and anti-bax. BFC: resveratrol + capsaicin, RT: radiotherapy, Con: control treated with vehicle.

resveratrol and capsaicin leads to strong ATM inhibition, as shown in the present study. This is in agreement with the inhibitory action of resveratrol on DNA repair expression members, including ATM in MCF7 cells by downregulating their expression [33]. Resveratrol also exerted global homologous repair and non-end joining DNA repair inhibition in an ATM-p53-dependent pathway [34]. In the same way, the other polyphenol curcumin inhibited ATM in irradiated tumor kidney cells [35]. Importantly, ATM-deficient pancreatic tumor cells were more susceptible to ionizing radiation than ATM-proficient cells [36]. All these data concur with the present results. So, in light of our data and published results, we hypothesize that, in one hand, additive ROS production by RT and BFCs induce ROS-related DSBs. Normal RT-related ATM-dependent DNA repair pathway is inhibited by BFCs, including DNA lesions recognition by ATM and cell cycle arrest. In the other hand, p53-related apoptosis induction is maintained and majored by cell cycle maintenance (Fig. 7).

Despite ATM inhibition, we found increased phosphorylation of the downstream checkpoint kinases CHK1 and CHK2. According to what is known in the cascade of events induced by RT, and as summarized in Fig. 7, it is possible that ATR (ATM and Rad3-related) and DNA-PKc activities are maintained in the presence of BFCs and trigger p53-dependant apoptotic response. This is further supported by the fact that ATM is the major actor of γ H2.AX phosphorylation, ATR and DNA-PKc carrying only limited activity [13]. These points need further validation.

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

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

Funding sources

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

Author's contributions

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

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

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

IM: design, collection and assembly of data.

IL: collection and assembly of data.

BR: design, collection of data.

SC: radiotherapy dose and course validation, collection of data.

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

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

EB: financial support, final approval of the manuscript.

GB: analysis of data.

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

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

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

Acknowledgements

The authors would like to thank Katia Obama and Isabelle Lamy for administrative assistance and fund management, and the staff of

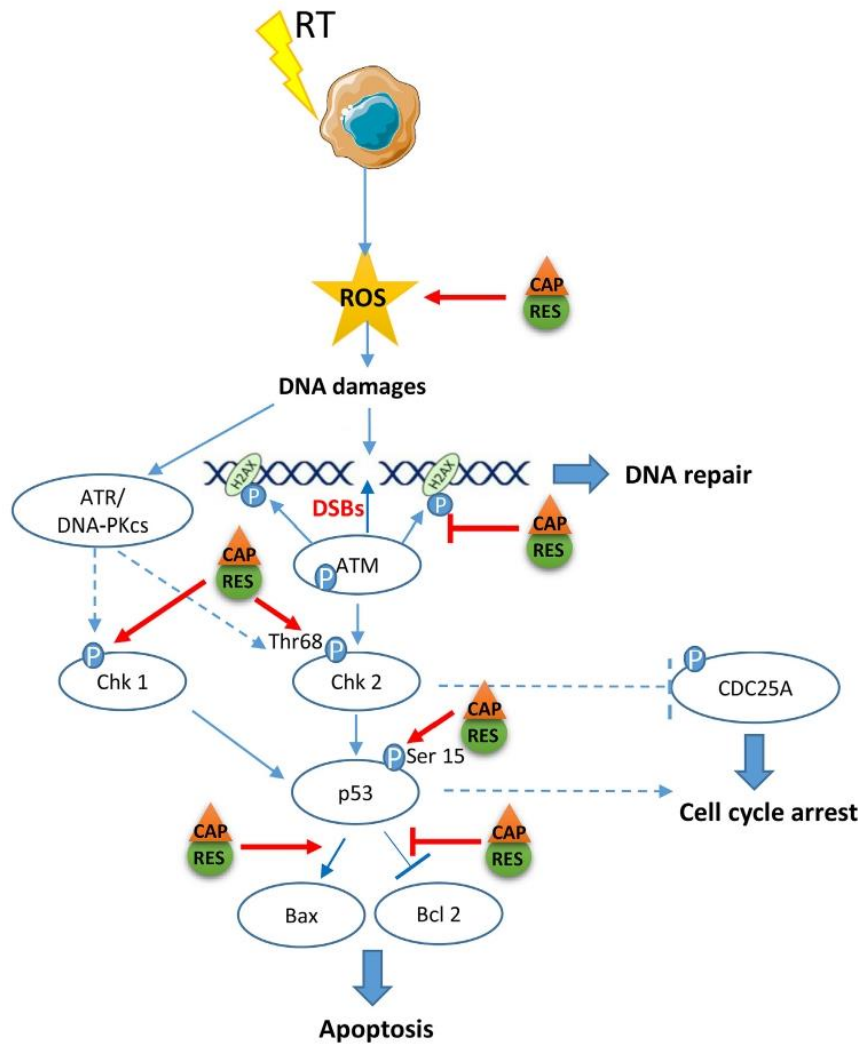


Fig. 7. Working model of molecular modulation of radiotherapy response by combination treatment of resveratrol and capsaicin.

Proposed actions exerted by combination of resveratrol and capsaicin in RT treated xenografted pancreatic tumors according to known DNA damages pathways. Steps modulated by resveratrol and capsaicin together are identified by REV in a green circle and CAP in an orange triangle, respectively. Steps characterized with dashed lines have not been explored in the present study. Cell scheme was downloaded from Servier Medical Art, licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Generic License. <http://smart.servier.com/>. Red arrows delineate induction and red lines with bar end symbolize inhibition. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

University of Bordeaux animal facility, in particular Julien Izotte for technical assistance.

References

[1] A. Cowppli-Bony, Z. Uhry, L. Remontet, N. Voirin, A.-V. Guizard, B. Trétarre, et al., Survival of solid cancer patients in France, 1989–2013: a population-based study, *Eur. J. Cancer Prev.* 26 (6) (nov 2017) 461–468.
 [2] L. Rahib, B.D. Smith, R. Aizenberg, A.B. Rosenzweig, J.M. Fleshman, L.M. Matrisian, Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States, *Cancer Res.* 74 (11) (1 juin 2014) 2913–2921.
 [3] B.M. Kim, Y. Hong, S. Lee, P. Liu, J.H. Lim, Y.H. Lee, et al., Therapeutic implications for overcoming radiation resistance in cancer therapy, *Int. J. Mol. Sci.* 16 (11) (2014) 26880–26913.
 [4] N. Waddell, M. Pajic, A.-M. Patch, D.K. Chang, K.S. Kassahn, P. Bailey, et al., Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer, *Nature* 518 (7540) (2015) 495–501.
 [5] P. Seshacharyulu, M.J. Baine, J.J. Soucek, M. Menning, S. Kaur, Y. Yan, et al., Biological determinants of radioresistance and their remediation in pancreatic cancer, *Biochim Biophys Acta BBA - Rev. Canc.* 1868 (1) (août 2017) 69–92.
 [6] C.-P. Zhu, J. Shi, Y.-X. Chen, W.-F. Xie, Y. Lin, Gemcitabine in the chemoradiotherapy for locally advanced pancreatic cancer: a meta-analysis, *Radiother. Oncol.* 99 (2) (mai 2011) 108–113.
 [7] S. Chand, K. O'Hayer, F.F. Blanco, J.M. Winter, J.R. Brody, The landscape of pancreatic cancer therapeutic resistance mechanisms, *Int. J. Biol. Sci.* 12 (3) (2016) 273–282.

[8] S.R. Boreddy, S.K. Srivastava, Pancreatic cancer chemoprevention by phytochemicals, *Cancer Lett.* 334 (1) (2013) 86–94.
 [9] V. Vendrely, E. Peuchant, E. Buscail, I. Moranvillier, B. Rousseau, A. Bedel, et al., Resveratrol and capsaicin used together as food complements reduce tumor growth and rescue full efficiency of low dose gemcitabine in a pancreatic cancer model, *Cancer Lett.* (2017) [cité 13 janv 2017]; Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304383517300174>.
 [10] M. Lafitte, I. Moranvillier, S. Garcia, E. Peuchant, J. Iovanna, B. Rousseau, et al., FGFR3 has tumor suppressor properties in cells with epithelial phenotype, *Mol. Canc.* 12 (1) (2013) 1.
 [11] Z. Wang, S. Desmoulin, S. Banerjee, D. Kong, Y. Li, R.L. Deraniyagala, et al., A comprehensive in vitro characterization of pancreatic ductal carcinoma cell line biological behavior and its correlation with the structural and genetic profile, *Mol. Anal. Inhib. Eff. N-Acetyl-Cysteine Prolif Invasiveness Pancreat. Canc. Cells* 445 (3) (2004) 236–247.
 [12] M.H. Lloyd, S.E. Wolfensohn, Practical use of distress scoring systems in the application of humane endpoints, *Hum. Endpoints Anim. Exp.* (1999) Disponible sur http://la1.org.uk/uploads/editor/HEP_Lloyd.pdf.
 [13] S. Burma, B.P. Chen, M. Murphy, A. Kurimasa, D.J. Chen, ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks, *J. Biol. Chem.* 276 (45) (9 nov 2001) 42462–42467.
 [14] E.L. Deer, J. González-Hernández, J.D. Coursen, J.E. Shea, J. Ngatia, C.L. Scaife, et al., Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines, *Pancreas* 39 (4) (mai 2010) 425–435.
 [15] P. Agarwal, F.M. Lutful Kabir, P. DeInnocentes, R. Curtis, Tumor suppressor gene p16/INK4A/CDKN2A and its role in cell cycle exit, differentiation, and determination of cell fate, in: Y. Cheng, éditeur (Eds.), *Tumor Suppressor Genes [Internet]*, InTech, 2012[cité 4 sept 2018]. Disponible sur <http://www.intechopen.com/books/tumor-suppressor-genes/tumor-suppressor-gene-p16-ink4a-cdkn2a-and-its->

- role-in-cell-cycle-exit-differentiation-and-determina.
- [16] E.S. Knudsen, J.Y.J. Wang, Targeting the RB-pathway in cancer therapy, *Clin. Canc. Res.* 16 (4) (15 févr 2010) 1094–1099.
- [17] L. Wang, P. Li, W. Hu, Y. Xia, C. Hu, L. Liu, et al., CD44+CD24+ subset of PANC-1 cells exhibits radiation resistance via decreased levels of reactive oxygen species, *Oncol Lett.* 14 (2) (août 2017) 1341–1346.
- [18] N. Sebastião, A. Montoro, D. Hervás, G. Pantelias, V.I. Hatzi, J.M. Soriano, et al., Curcumin and trans-resveratrol exert cell cycle-dependent radioprotective or radiosensitizing effects as elucidated by the PCC and G2-assay, *Mutat. Res.* 766–767 (2014) 49–55.
- [19] T. Lagerweij, L. Hiddingh, D. Biesmans, M.H.W. Crommentuijn, J. Cloos, X.-N. Li, et al., A chemical screen for medulloblastoma identifies quercetin as a putative radiosensitizer, *Oncotarget* (14 juin 2016) [cité 13 sept 2018];7(24). Disponible sur <http://www.oncotarget.com/fulltext/7980>.
- [20] N. Kubota, Benzyl isothiocyanate sensitizes human pancreatic cancer cells to radiation by inducing apoptosis, *Int. J. Mol. Med.* (10 août 2011) [cité 3 sept 2018]; Disponible sur <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijmm.2011.770> page 16.
- [21] N.R. Galloway, J.R. Aspe, C. Sellers, N.R. Wall, Enhanced antitumor effect of combined gemcitabine and proton radiation in the treatment of pancreatic cancer, *Pancreas* vol. 38, (7) (oct 2009) 782–790.
- [22] K. Asanuma, D. Kobayashi, D. Furuya, N. Tsuji, A. Yagihashi, N. Watanabe, A role for survivin in radioresistance of pancreatic cancer cells, *Jpn. J. Canc. Res.* 93 (9) (sept 2002) 1057–1062.
- [23] E.H. Heiss, Y.D.C. Schilder, V.M. Dirsch, Chronic treatment with resveratrol induces redox stress- and ataxia telangiectasia-mutated (ATM)-dependent senescence in p53-positive cancer cells, *J. Biol. Chem.* 282 (37) (14 sept 2007) 26759–26766.
- [24] L. Xie, G.-H. Xiang, T. Tang, Y. Tang, L.-Y. Zhao, D. Liu, et al., Capsaicin and dihydrocapsaicin induce apoptosis in human glioma cells via ROS and Ca²⁺-mediated mitochondrial pathway, *Mol. Med. Rep.* 14 (5) (nov 2016) 4198–4208.
- [25] K. Yang, J. Pyo, G.-Y. Kim, R. Yu, I. Han, S. Ju, et al., Capsaicin induces apoptosis by generating reactive oxygen species and disrupting mitochondrial transmembrane potential in human colon cancer cell lines, *Cell. Mol. Biol. Lett.* 14 (3) (1 janv 2009) [cité 4 sept 2018]; Disponible sur <http://www.degruyter.com/view/j/cmb.2009.14.issue-3/s11658-009-0016-2/s11658-009-0016-2.xml>.
- [26] J.-K. Tak, J.-H. Lee, J.-W. Park, Resveratrol and piperine enhance radiosensitivity of tumor cells, *BMB Rep.* 45 (4) (30 avr 2012) 242–246.
- [27] M.Y. Kim, L.J. Trudel, G.N. Wogan, 10, Apoptosis Induced by Capsaicin and Resveratrol in Colon Carcinoma Cells Requires Nitric Oxide Production and Caspase Activation vol. 29, (2009), pp. 3733–3740.
- [28] T. Liu, G. Wang, H. Tao, Z. Yang, Y. Wang, Z. Meng, et al., Capsaicin mediates caspases activation and induces apoptosis through P38 and JNK MAPK pathways in human renal carcinoma, *BMC Canc.* 16 (1) (2016) 790.
- [29] S. Thomas, B.A. Quinn, S.K. Das, R. Dash, L. Emdad, S. Dasgupta, et al., Targeting the Bcl-2 family for cancer therapy, *Expert Opin. Ther. Targets* 17 (1) (janv 2013) 61–75.
- [30] A. Rashid, C. Liu, T. Sanli, E. Tsiani, G. Singh, R.G. Bristow, et al., Resveratrol enhances prostate cancer cell response to ionizing radiation. Modulation of the AMPK, Akt and mTOR pathways, *Radiat. Oncol.* 6 (1) (2011) 144.
- [31] N.A. Venier, A.J. Colquhoun, H. Sasaki, A. Kiss, L. Sugar, H. Adomat, et al., Capsaicin: a novel radio-sensitizing agent for prostate cancer: capsaicin as a Radio-Sensitizer, *Prostate* 75 (2) (févr 2015) 113–125.
- [32] J.-H. Lee, Z. Guo, L.R. Myler, S. Zheng, T.T. Paull, Direct activation of ATM by resveratrol under oxidizing conditions, *Hammond E, éditeur, PLoS One* 9 (6) (16 juin 2014) e97969.
- [33] I. Leon-Galicia, J. Diaz-Chavez, E. Garcia-Villa, L. Uribe-Figueroa, A. Hidalgo-Miranda, L.A. Herrera, et al., Resveratrol induces downregulation of DNA repair genes in MCF-7 human breast cancer cells, *Eur. J. Canc. Prev.* 22 (1) (janv 2013) 11–20.
- [34] S.A. Gatz, M. Keimling, C. Baumann, T. Dörk, K.-M. Debatin, S. Fulda, et al., Resveratrol modulates DNA double-strand break repair pathways in an ATM/ATR-p53- and Nbs1-dependent manner, *Carcinogenesis* 29 (3) (mars 2008) 519–527.
- [35] G. Li, Z. Wang, T. Chong, J. Yang, H. Li, H. Chen, Curcumin enhances the radiosensitivity of renal cancer cells by suppressing NF-κB signaling pathway, *Biomed. Pharmacother.* 94 (oct 2017) 974–981.
- [36] M. Ayars, J. Eshleman, M. Goggins, Susceptibility of ATM-deficient pancreatic cancer cells to radiation, *Cell Cycle* 16 (10) (19 mai 2017) 991–998.

II – 2 Radiosensibilisation du cancer du rectum par les BFCs : Etude en cours

II – 2 - A Introduction

La stratégie de prise en charge des cancers du rectum combine un traitement néoadjuvant total associant successivement une chimiothérapie par FOLFOX (oxaliplatine et 5-FU) et une radiochimiothérapie par 5-FU. Une opération chirurgicale, adaptée à la réponse au traitement néoadjuvant, est ensuite programmée. Elle consistera en une exérèse complète du mésorectum pour les mauvais répondeurs ou à une tumorectomie localisée pour les meilleurs répondeurs. Certains centres pratiquent également une stratégie dite de « Watch and Wait » pour les patients présentant une très bonne réponse, qui inclut uniquement un suivi rapproché, sans acte chirurgical. Ces approches préservatrices d'organe (tumorectomie ou surveillance rapprochée seule) sont de plus en plus répandues et permettent notamment une amélioration considérable de la qualité de vie du malade, sans pour autant présenter un caractère péjoratif en termes de survie ou de récurrence. Leur utilisation est par contre limitée aux patients bons répondeurs au traitement néoadjuvant et en particulier à la radiochimiothérapie. Afin de favoriser ces stratégies thérapeutiques préservatrices, il est donc nécessaire d'améliorer l'efficacité du traitement de radiochimiothérapie. D'autre part, de nombreux patients fragiles ne peuvent recevoir une radiochimiothérapie pleine dose. Pour ces patients, les chances de présenter une bonne réponse sont plus faibles et limitent donc les possibilités de stratégie préservatrice. Une piste de recherche consiste alors à identifier des agents radiosensibilisants efficaces et présentant des toxicités plus faibles que celle de la chimiothérapie par 5-FU. Dans ce contexte, les BFCs représentent une piste thérapeutique prometteuse, en particulier dans le CRC où des effets potentialisant de plusieurs thérapies conventionnelles ont déjà été rapportés [209]. Après avoir validé une approche radiosensibilisante par l'utilisation de BFC dans un modèle de cancer pancréatique, nous avons donc souhaité la transposer au traitement du cancer du rectum, en utilisant à la fois des modèles cellulaires et murins.

II – 2 - B Matériels et Méthodes

II – 2 - B – 1 Matériels

a - Lignées cellulaires

Les lignées tumorales colorectales humaines HCT116, SW480 et HT29, toutes les 3 de phénotype épithélial, ont été utilisées dans cette étude. Les lignées SW480 et HT29 sont de phénotype microsatellite stable (MSS) et la lignée HCT116 présente un phénotype instable (MSI). La lignée NCM460 est une lignée épithéliale digestive non tumorale, transformée par l'expression de hTERT.

b – Molécules bioactives

Le resvératrol et la capsaïcine utilisées pour les expérimentations *in-vitro* et *in-vivo* ont été obtenu sous forme de poudre (Sigma-Aldrich®). Elles ont été reconstituées dans de l'éthanol 100% avec une concentration de la solution mère de 200 mM.

II – 2 - B – 2 Méthodes

a – Culture cellulaire

Les cellules ont été cultivées au laboratoire dans une étude à 37°C et sous 5% de CO₂. Les lignées HCT116 et HT29 ont été cultivées dans un milieu DMEM (DMEM Gibco®) additionné de 10% de sérum de vœux fœtal (SVF). La lignée SW480 a été cultivée en milieu RPMI (RPMI 1640 Medium Gibco®) additionné de 10% de SVF. La lignée NCM460 a été cultivée en milieu M3base additionné de 10% de SVF (Incell®). Un mélange d'amphotéricine B (2,5 µg/ml) et de pénicilline (10000 U/ml) / streptomycine (10000 U/ml) a été ajouté à l'ensemble des milieux de culture pour prévenir des contaminations fongiques et bactériennes.

b - Irradiations

L'irradiation des plaques de culture cellulaire a été réalisée par un faisceau antérieur en photons X de 200kV produits par un irradiateur préclinique Xenx® situé au sein de l'animalerie B2 du site Talence de l'Université de Bordeaux. L'irradiation focalisée des tumeurs sous-cutanées des flancs des souris a été réalisée sur ce même irradiateur. Avant chaque irradiation de la souris, un contrôle de position a été effectué pour assurer la précision de la radiothérapie. Le traitement a été effectué avec 2 champs rectangulaires antéropostérieurs opposés focalisés sur la tumeur en photon de 200kV à un débit de 2,55Gy/minute.

c - Test de cytotoxicité

Les cellules ont étéensemencées (5000 cellules par puits) dans des plaques 96 puits. Le jour suivant, différentes doses de resvératrol, de capsaïcine, de 5-FU ou de leurs combinaisons avec ou sans irradiation ont été appliquées puis les cellules ont été maintenues en culture pendant 72 h. Le milieu de culture a ensuite été retiré et les cellules ont été lavées avec du PBS. Les cellules ont ensuite été colorées à l'aide d'une solution de cristal violet à 0,5% et laissées à température ambiante pendant 15 minutes. Après avoir retiré la solution de cristal violet, les puits ont été lavés trois fois avec du PBS afin d'éliminer l'excédent de colorant. Enfin, de l'acide acétique 33 % a été appliqué sur les cellules afin de libérer le colorant fixé aux cellules. La densité optique (DO) de chaque puit a ensuite été déterminée avec un lecteur de microplaques, à une longueur d'onde de 570 nm. La valeur moyenne de DO des puits contrôle a été soustraite à celles obtenues pour chaque condition. Les résultats sont exprimés en termes de survie cellulaire : $(DO \text{ traitée} / DO \text{ témoin}) * 100$.

d – Analyse du cycle cellulaire

Les cellules subconfluentes non synchronisées des différentes conditions ont été récoltées à l'aide de trypsine 0,25% (Invitrogen®) et lavées deux fois avec du PBS. Elles ont été fixées avec du paraformaldéhyde (PFA) 3,7% pendant 15 minutes à température ambiante et

perméabilisées avec du triton 0,5% pendant 15 autres minutes à 4°C. Après un lavage au PBS, elles ont été incubées avec de la RNase (1 mg/ml, Sigma Aldrich®) pendant une nuit à 37°C. Les cellules ont ensuite été lavées deux fois avec PBS et incubées avec une solution d'iodure de propidium (PI) (0,5 µg/ml, Sigma Aldrich®) pendant 15 min dans l'obscurité. Les échantillons ont été examinés sur un cytomètre en flux BD Accuri™ C6. Les données ont été analysées avec le logiciel BD Accuri™ C6 Plus (BD Biosciences®).

e – Analyse de l'apoptose

Les cellules des différentes conditions ont été récoltées à l'aide de trypsine 0,25% (Invitrogen®) et lavées deux fois avec du PBS. Les cellules ont ensuite été incubées avec une solution d'annexine V (0,5 µg/ml, Sigma Aldrich®) et d'iodure de propidium (PI) (10 µg/ml, Sigma Aldrich®) pendant 15 min à température ambiante et dans l'obscurité. Une solution Binding Buffer (Sigma Aldrich®) est ensuite ajoutée et l'acquisition des échantillons a été faite immédiatement sur un cytomètre en flux BD Accuri™ C6. Les données ont été analysées avec le logiciel BD Accuri™ C6 Plus (BD Biosciences®).

f – Modèle murin préclinique avec xénogreffe sous-cutanée

Pour évaluer *in vivo* l'effet radiosensibilisants des BFCs, des xénogreffes de cellules humaines colorectales tumorales HCT116 ont été réalisées chez 60 souris immunodéprimées RAGγ2C, âgées de 8 à 12 semaines. Ces souris sont dépourvues de lymphocytes B et T, comme décrit dans le « journal of Immunology » [210]. Des greffes sous-cutanées de cellules HCT116 dans 120µl de milieu DMEM sans sérum ont été réalisées au niveau des flancs de chaque animal. Une anesthésie à l'isoflurane a été utilisée pour la greffe. Après une phase initiale de croissance tumorale, les animaux ont été répartis en 5 groupes de traitement. Un groupe radiothérapie seule (RT) avec un schéma d'irradiation à 5Gy 1x/semaine sur 3 semaines. Le même schéma d'irradiation était associé à des injections régulières (3x/semaine) de 5-FU en intrapéritonéal (IP) à 15 mg/kg ou 30 mg/kg pour 2 autres groupes (RT+5-FU). Un groupe RT+R a reçu un schéma d'irradiation identique en association à des gavages réguliers (3x/semaine)

de resvératrol (50 mg/kg). Enfin, un groupe RT+BFC a reçu un schéma d'irradiation identique en association à des gavages réguliers (3x/semaine) de resvératrol (50 mg/kg) et de capsaïcine (5 mg/kg). La mesure de la taille de chaque tumeur a été réalisée 3x/semaines durant les 3 semaines de traitement. Afin d'évaluer la tolérance aux traitements, les animaux ont été pesés 3x/semaine tout au long de l'expérimentation et leur niveau de stress a été évalué selon le Lloyds' distress animal scoring system [211]. Avant chaque sacrifice, une numération formule sanguine (NFS) a également été réalisée. Les intestins et les tumeurs de l'ensemble des animaux ont été recueillis pour la réalisation d'analyses histologiques et moléculaires.

g – Modèle murin préclinique avec xénogreffe orthotopique

Dans le but d'évaluer la radiosensibilisation de la tumeur rectale par les BFCs sur un modèle s'approchant le plus possible du contexte clinique, un modèle murin préclinique de greffe orthotopique de cellules tumorales colorectales a été développé. Des cellules HCT116 ont été modifiées au laboratoire par transduction lentivirale afin de leur permettre d'exprimer l'enzyme luciférase. Elles ont ensuite été injectées dans la muqueuse rectale des animaux. La croissance tumorale et la tolérance des animaux a ensuite été évaluée par des mesures régulières en bioluminescence (2x/semaine) après injection IP de luciférine, et cela jusqu'à ce qu'un point limite soit atteint et que l'animal soit sacrifié.

h – Analyses statistiques

Le logiciel GraphPad® a été utilisé pour la réalisation des différentes analyses statistiques. Pour comparer les valeurs de plus de 2 conditions, un test ANOVA était réalisé. Si celui-ci était significatif, un test de Mann-Whitney ou un test t de Student était réalisé pour comparer les conditions 2 à 2. Le risque alpha était de 5% pour l'ensemble des tests effectués. Une différence était considérée si $P < 0.05$.

II – 2 - C Résultats & Discussion

II – 2 – C – 1 Cytotoxicité des traitements seuls

La sensibilité des lignées cellulaires aux différents traitements a été évaluée à l'aide de tests de cytotoxicité. Des gammes de concentrations croissantes de chaque molécule (5-FU, resvératrol (voir publication soumise) et capsaïcine) ont été testées sur l'ensemble des lignées. En parallèle, des gammes de dose d'irradiation croissante ont été appliquées aux lignées tumorales (HCT116, HT29 et SW480). Les concentrations inhibitrices 50 (IC50) de chaque molécule et les doses létales 50 (DL50) des RI ont été déterminées pour chaque lignée. Les résultats sont présentés dans la **figure 11**.

Les IC50 des cellules colorectales au 5-FU étaient comparables pour les lignées HCT116 et HT29 (5µM, **Figure 11A**). Les lignées SW480 et NCM460 étaient moins sensibles avec des IC50 4 fois plus importantes (20µM, **Figure 11A**). Les IC50 du resvératrol présentaient de plus grandes variabilités entre les lignées (**Figure 11B**). Les lignées tumorales SW480 et HCT116 étaient les plus sensibles avec des IC50 de 25 µM et 50 µM respectivement. Ces valeurs sont plus basses que pour les cellules pancréatiques de phénotype épithélial Capan-2 (IC50 = 75µM). La lignée HT29 présentait une sensibilité intermédiaire (IC50 = 75 µM) et la lignée non tumorale NCM460 étaient la moins sensible (IC50 = 125 µM). De plus, les IC50 des lignées HCT116 et HT29 sont proches de celle décrites dans la littérature [212,213].

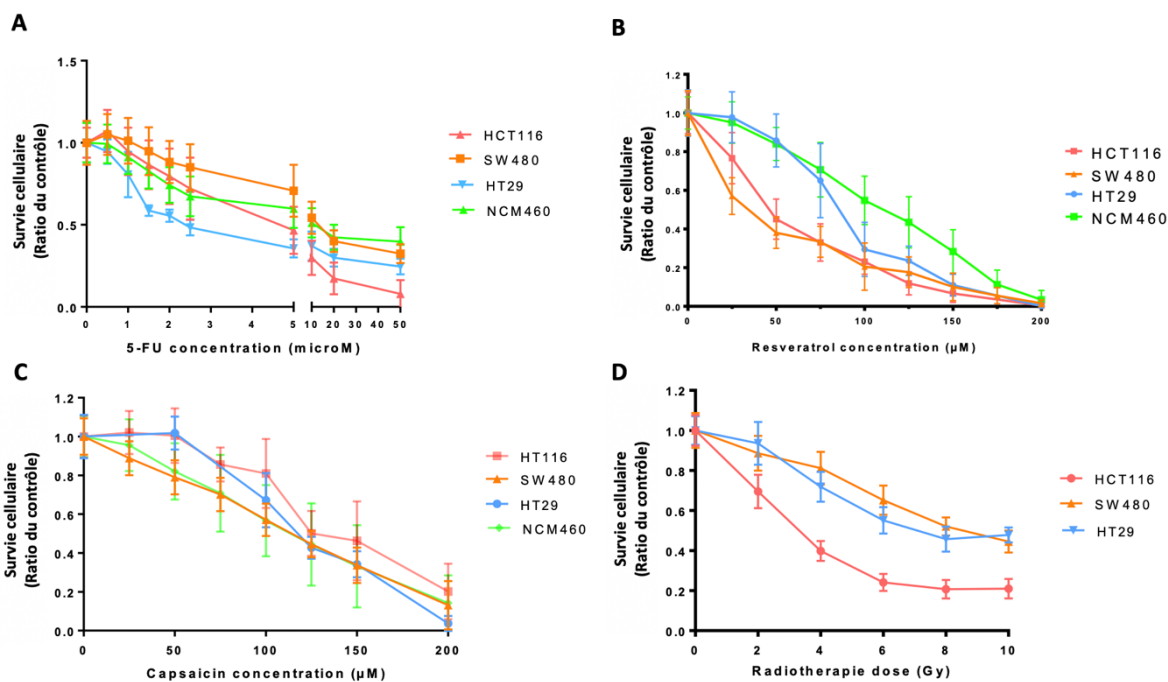


Figure 11: Cytotoxicité dose-réponse à 72h de la radiothérapie et des différents agents radiosensibilisants sur les lignées cellulaires colorectales HCT116, SW480, HT29 et NCM460. A. Courbes de survie des lignées à des doses croissantes de 5-fluoro-uracile. **B.** Courbes de survie des lignées à des doses croissantes de RI. **C.** Courbes de survie des lignées à des doses croissantes de resvératrol. **D.** Courbes de survie des lignées à des doses croissantes de capsaïcine. Résultats présentés en moyenne + écart-type. Chaque point est quadruplé. Les résultats sont issus de plus de 3 expériences indépendantes.

Contrairement au resvératrol, la sensibilité des lignées à la capsaïcine semblait constante avec une IC50 d'environ 125µM (**Figure 11C**). Cette valeur est également plus basse que celle des Capan-2 (IC50 = 200µM) et est comparable aux données de la littérature [214,215]. Les cellules tumorales pancréatiques Capan-2 semblent donc moins sensibles aux BFCs que les lignées tumorales colorectales. Enfin, la sensibilité des lignées tumorales aux RI a permis de mettre en évidence 2 groupes (**Figure 11D**). Un groupe radiosensible représenté par la lignée HCT116 (DL50 = 4Gy) et 1 groupe plus radiorésistant associant les HT29 et les SW480 (DL50 = 8Gy).

II – 2 – C – 2 Cytotoxicité des traitements combinés

a – Traitement combiné des BFCs

Notre équipe a mis en évidence cytotoxicité synergique du resvératrol et de la capsaïcine sur des lignées pancréatiques cancéreuses [160]. Ces mêmes expériences ont été reproduites avec les lignées tumorales colorectales HCT116 et HT29 (**Figure 12**).

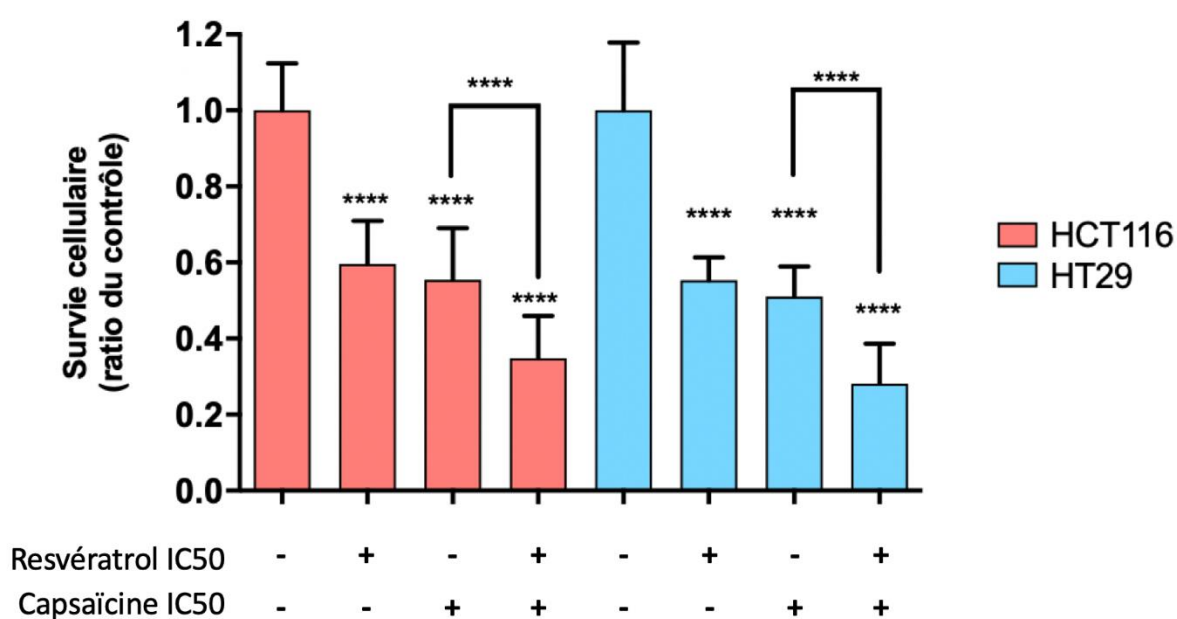


Figure 12 : Cytotoxicité du resvératrol et de la capsaïcine seuls ou en combinaison sur les lignées colorectales tumorales HCT116 et HT29. Résultats présentés en moyenne + écart-type. Chaque point est quadruplé. Les résultats sont issus de plus de 3 expériences indépendantes. IC50 resvératrol HCT116 = 50 μ M et HT29 = 75 μ M. IC50 capsaïcine HCT116 et HT29 = 125 μ M. **** : $p < 0.0001$.

La combinaison du resvératrol et de la capsaïcine à leurs IC50 respectives présentait une cytotoxicité significativement plus importante que les molécules seules pour les 2 lignées. Des tests supplémentaires à d'autres doses seraient nécessaires afin de confirmer cette observation afin de vérifier le caractère additif ou synergique de la combinaison.

b – Cytotoxicité comparée des traitements entre cellules tumorales et non-tumorales

L'approche radiosensibilisante par les BFCs s'inscrit dans une logique de diminution des toxicités liées à l'agent radiosensibilisant. Le 5-FU actuellement utilisé en pratique courante présente de nombreuses effets secondaires, en particulier digestifs et hématologiques [216]. Au contraire, les données de la littérature ne rapportent que très peu d'effets indésirables pour les BFCs y compris à des doses fortes potentiellement actives sur la tumeur. Il nous paraissait donc important de comparer l'impact des traitements radiosensibilisants sur les cellules tumorales (HCT116) et non tumorales (NCM460) (**Figure 13**).

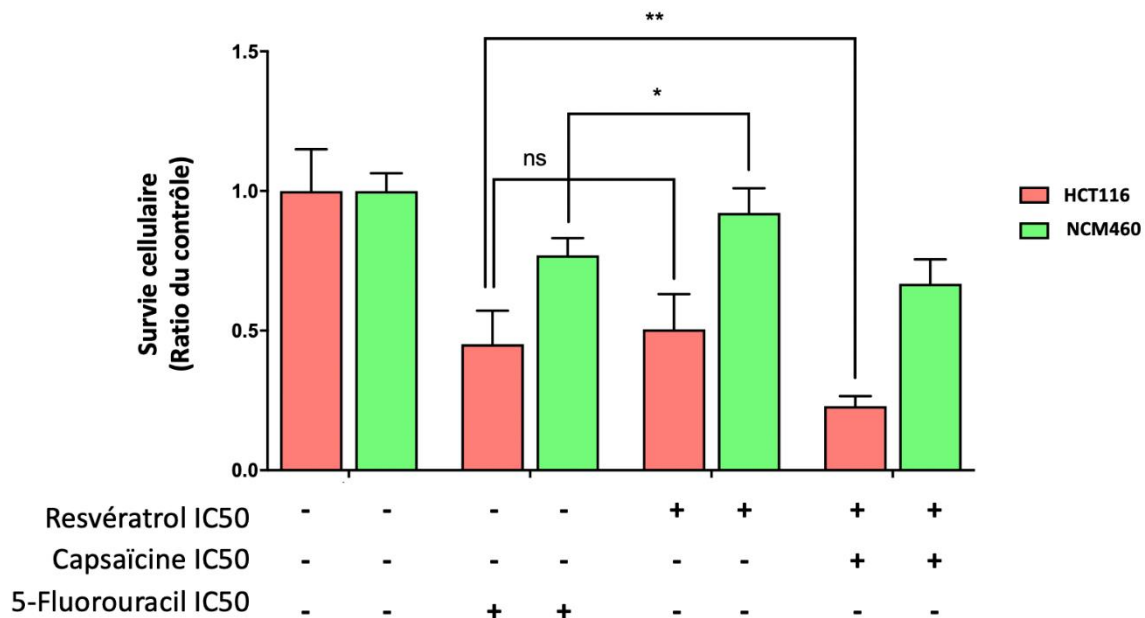


Figure 13 : Cytotoxicité du 5-fluoro-uracile, du resvératrol seul ou en combinaison avec la capsaïcine sur les lignées colorectales HCT116 et NCM460. Résultats présentés en moyenne + écart-type. Chaque point est quadruplé. Les résultats sont issus de 3 expériences indépendantes. IC50 5-fluoro-ruracil HCT116 = 5µM ; IC50 resvératrol HCT116 = 50µM ; IC50 capsaïcine HCT116 = 125µM. * : p<0.05 ; ** : p<0.01. ns : non-significatif.

Les 3 traitements présentaient systématiquement une cytotoxicité moindre sur la lignée non-tumorale NCM460 en comparaison de la lignée tumorale HCT116. Le taux de réplication plus faible de la lignée non-tumorale pourrait expliquer en partie cette observation, les chimiothérapies et autres agents cytotoxiques étant particulièrement actifs sur les cellules à

division rapide. De manière intéressante, la toxicité du 5-FU à l'IC50 (des HCT116) était significativement plus importante sur les cellules NCM460 que celui du resvératrol. L'effet de ces 2 molécules était par contre identique sur la lignée HCT116. Le resvératrol est donc plus sélectif que le 5-FU pour les cellules tumorales. Cela est à mettre en lien en partie avec sa métabolisation différentielle au sein des différentes lignées cellulaires, contrairement à celle du 5-FU (voir article 2). La combinaison resvératrol/capsaïcine était plus toxique que le 5-FU sur la lignée HCT116, avec des toxicités comparables vis-à-vis de la lignée NCM460. Malgré l'addition de capsaïcine, qui ne présente pas de cytotoxicité différentielle entre les lignées (**Figure 11 D**), la sélectivité du resveratrol pour les cellules tumorales semble donc conservée.

c – Radiosensibilisation par le 5-FU et les BFCs

Nous avons testé l'effet radiosensibilisant du resvératrol et de la combinaison resvératrol + capsaïcine sur les différentes lignées tumorales colorectales, comparé à celui de la chimiothérapie radiosensibilisante de référence par 5-FU. Pour cela nous avons réalisé des tests de cytotoxicité combinant l'irradiation et les différents traitements associés (**Figure 14**). Nous avons, en parallèle de chaque expérimentation, appliqué les mêmes traitements à la lignée NCM460, afin d'évaluer leur toxicité respective sur des cellules non-tumorales.

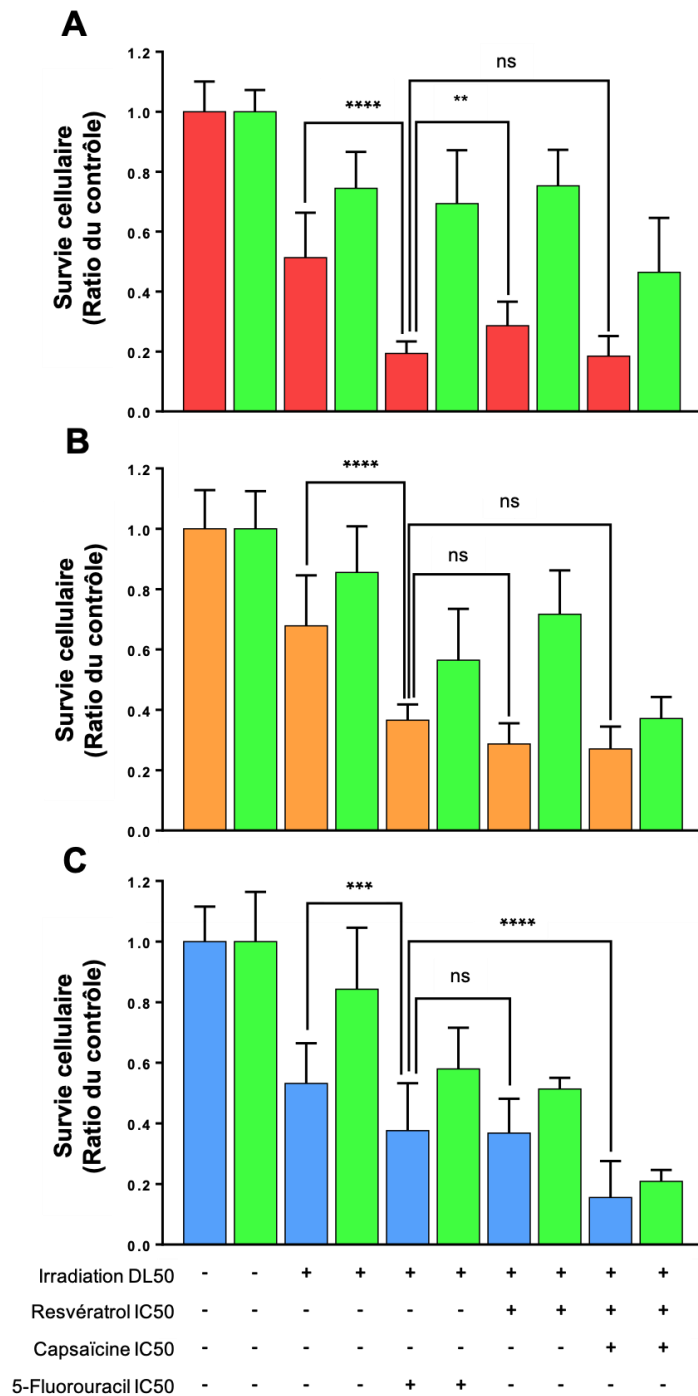


Figure 14 : Effets radiosensibilisants comparés du 5-fluoro-uracile et du resvératrol seul ou en combinaison avec la capsaïcine sur les lignées colorectales HCT116, SW480, HT29 et NCM460. A. Lignées HCT116 (rouge) / NCM460 (vert). **B.** Lignées SW480 (orange) / NCM460 (vert). **C.** Lignées HT29 (bleu) / NCM460 (vert). Résultats présentés en moyenne + écart-type. Chaque point est quadruplé. Les résultats sont issus de 3 expériences indépendantes. DL 50 HCT116 = 4Gy ; DL50 HT29 et SW480 = 8Gy ; IC50 5-fluoro-uracile HCT116 et HT29 = 5µM ; IC50 5-fluoro-uracile SW480 = 20µM. IC50 resvératrol HCT116 = 50µM ; IC50 resvératrol HT29 = 75µM ; IC50 resvératrol SW480 = 25µM ; IC50 capsaïcine HCT116, HT29 et SW480 = 125µM. ** : p<0.01 ; *** : p<0.001**** : p<0.0001. ns : non-significatif.

Comme sur notre modèle pancréatique, le resvératrol seul et la combinaison resvératrol + capsaïcine présentaient un effet radiosensibilisant sur les 3 lignées tumorales colorectales. Cependant, contrairement à ce qui a été observé pour les cellules Capan-2, la combinaison resvératrol + capsaïcine ne permet pas d'obtenir une meilleure radiosensibilisation que le resveratrol seul (**Figure 14A**). C'est également le cas pour la lignée SW480 (**Figure 14B**). Le traitement combiné des BFCs permet par contre une nette amélioration de la cytotoxicité pour la lignée HT29 (**Figure 14C**). L'action additive ou synergique des 2 BFCs sur les lignées colorectales pourrait expliquer ces différences. Le resvératrol seul comme sa combinaison avec la capsaïcine permettaient une radiosensibilisation aussi efficace que celle du 5-FU pour les lignées HCT116 et SW480 (**Figure 14A-B**). L'effet radiosensibilisant de la combinaison de BFCs était significativement supérieur à celui du 5-FU pour la lignée HT29 (**Figure 14C**).

Le resvératrol seul et sa combinaison à la capsaïcine permettent donc de radiosensibiliser l'ensemble des lignées colorectales tumorales. La combinaison de BFCs présente un effet radiosensibilisant équivalent voire supérieur à celui du le 5-FU sur l'ensemble des lignées. De manière intéressante, la cytotoxicité des traitements était toujours moindre pour la lignée non-tumorale NCM460 en comparaison des lignées tumorales. Cependant, aucun effet radioprotecteur des BFCs sur cette lignée non-tumorale n'a été mis en évidence, les toxicités de la RT associée au resveratrol ou à la combinaison de BFCs étant comparables ou supérieurs à ceux de la RT seule.

II – 2 – C – 3 Effet des combinaisons de traitement sur le cycle cellulaire des cellules tumorales

L'impact des RI sur le cycle cellulaire des cellules HCT116 est bien décrit dans la littérature. Il consiste principalement en une accumulation des cellules en phase G2/M du cycle [217]. Nous avons caractérisé l'action combinée de la radiothérapie et des BFCs sur le cycle cellulaire des cellules tumorales HCT116 (**Figure 15**).

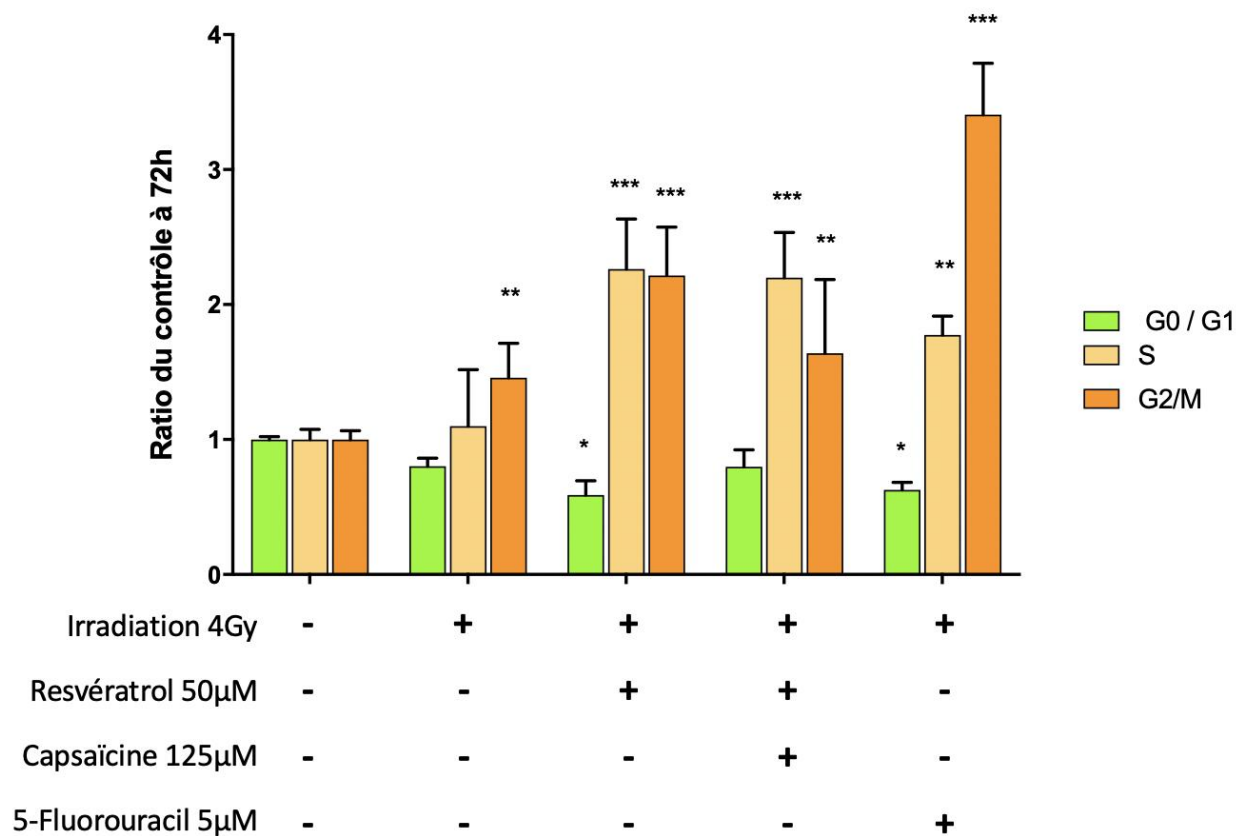


Figure 15 : Impact sur le cycle cellulaire à 72h des traitements de radiothérapie associés ou non au 5-fluoro-uracile, au resvératrol seul ou à la combinaison resvératrol/capsaïcine sur la lignée HCT116. Résultats présentés en moyenne + écart-type. Les résultats sont issus de 3 expériences indépendantes. * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$.

Comme attendu, l'irradiation seule des cellules entraînait une accumulation significative en phase G2/M. L'association du resvératrol à l'irradiation intensifiait ce phénomène avec une plus forte accumulation des cellules en phases S et G2/M, de manière équilibrée. Un phénomène identique était observé avec la combinaison resvératrol + capsaïcine. L'association radiothérapie/5-FU entraînait une accumulation massive des cellules majoritairement en phase G2/M et plus faiblement en phase S. Cette observation est comparable à celles faites pour d'autres agents radiosensibilisants comme la gemcitabine ou le célécoxib [218,219]. Malgré des propriétés radiosensibilisantes similaires, les BFCs semblent donc présenter un effet sur le cycle cellulaire distinct de celui observé avec la chimiothérapie par 5-FU qui mène à une accumulation plus marquée des cellules en phase G2/M. Cependant, nous avons évalué cette distribution cellulaire uniquement après 72h

d'exposition, délai identique à celui choisi pour les tests de cytotoxicité. Il serait intéressant de réaliser une cinétique plus précise en incluant des points à 24h et 48h mais également de tester d'autres lignées cellulaires tumorales.

II – 2 – C – 4 Effet des combinaisons de traitement sur l'apoptose des cellules tumorales

L'association des BFCs à la radiothérapie entraîne une augmentation de la mort cellulaire par apoptose par rapport à l'irradiation seule pour la lignée tumorale pancréatique Capan-2. Ce phénomène a également été décrit par notre équipe et d'autres chercheurs lors de la chimiosensibilisation de nombreux modèles tumoraux par le resvératrol ou des combinaisons de BFCs [220,160,221]. Nous avons quantifié l'apoptose de la lignée HCT116 à différents

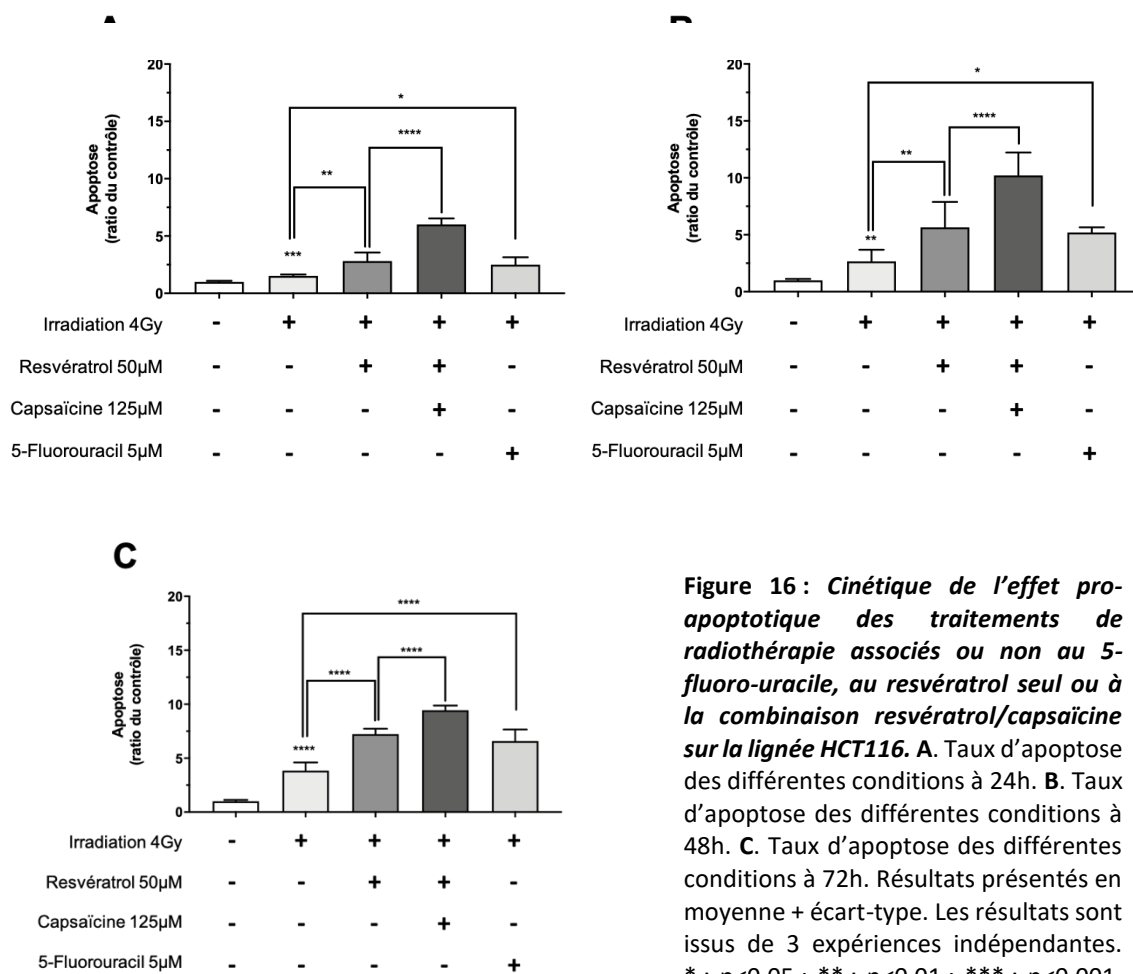


Figure 16 : Cinétique de l'effet pro-apoptotique des traitements de radiothérapie associés ou non au 5-fluoro-uracile, au resvératrol seul ou à la combinaison resvératrol/capsaïcine sur la lignée HCT116. A. Taux d'apoptose des différentes conditions à 24h. **B.** Taux d'apoptose des différentes conditions à 48h. **C.** Taux d'apoptose des différentes conditions à 72h. Résultats présentés en moyenne + écart-type. Les résultats sont issus de 3 expériences indépendantes. * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$. **** : $p < 0.0001$

temps, après une irradiation combinée à des traitements par les différents agents radiosensibilisants (**Figure 16**).

Pour l'ensemble des 3 traitements radiosensibilisants et sur les 3 temps analysés, une augmentation globale des proportions de cellules apoptotiques était observée, en comparaison de celles obtenues pour la condition irradiation seule. Les taux d'apoptose augmentaient de manière importante sur la période 24-48h (**Figure 16A-B**) et augmentaient peu voire stagnaient sur les dernières 24h (48-72h, **Figure 16B-C**). Le pic d'action pro-apoptotique des différents traitements semble donc proche de 48h. De plus, contrairement aux résultats des tests de cytotoxicité, la combinaison resvératrol/capsaïcine entraînait à 72h une augmentation significativement plus importante de l'apoptose, en comparaison des traitements par resvératrol seul ou 5-FU, qui présentaient des résultats comparables. Il n'y a donc pas une corrélation directe pour la lignée HCT116 entre l'apoptose et la cytotoxicité du traitement à 72h, qui est comparable entre les différents traitements. Un effet radiosensibilisant supérieur de la combinaison des BFCs ayant été observé pour la lignée HT29 par rapport aux traitements simples, il serait intéressant de voir si celui-ci est directement corrélé aux taux d'apoptose.

II – 2 – C – 5 Etude comparée de la radiosensibilisation par le 5-fluorouracil et par les BFCs sur un modèle murin xéno greffé

Nous avons pu valider *in-vitro* l'effet radiosensibilisant du resvératrol et de sa combinaison à la capsaïcine sur différents modèles. Nous avons donc poursuivi notre démonstration dans un modèle murin de tumeur colorectale. Des cellules HCT116 ont été greffées en sous-cutané sur les flancs de souris immunodéprimées RAG γ 2C. Après une phase initiale de prise tumorale (J0 à J20), les souris ont ensuite été traitées sur une période de 3 semaines (J20-J41) par des irradiations focalisées (1x/semaine) seules ou associées à l'administration d'agents radiosensibilisants (**Figure 17**).

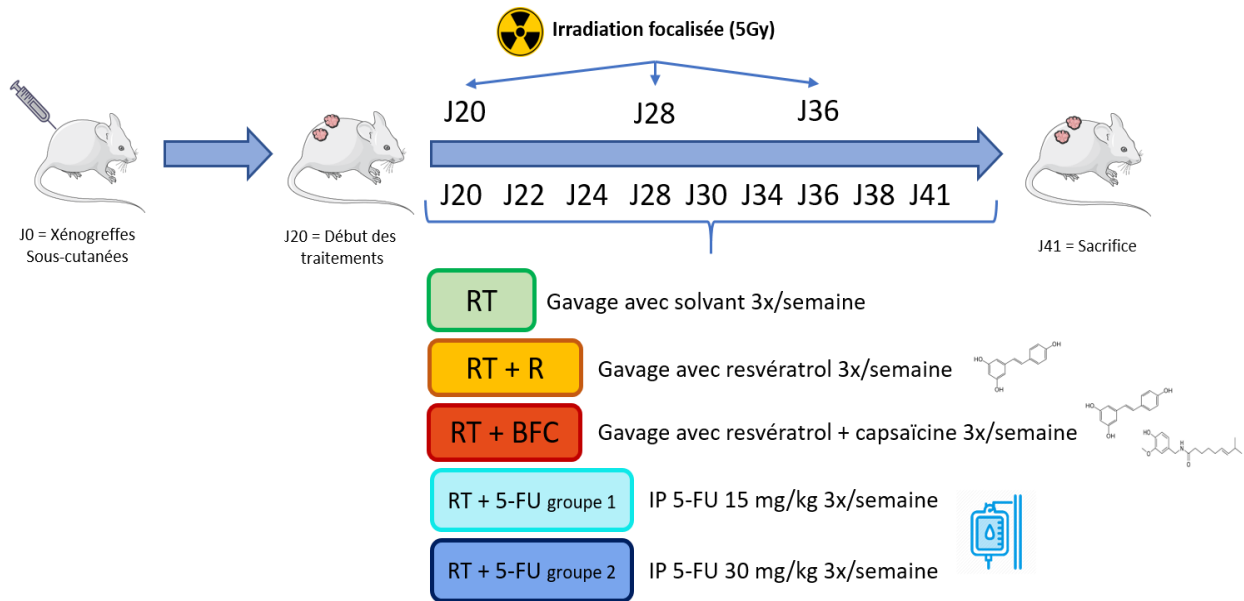


Figure 17 : Stratégie expérimentale pour l'évaluation de l'effet radiosensibilisant des BFCs in-vivo.

Le 5-FU a été administré à 2 doses différentes en intrapéritonéal (IP) 3x/semaine alors que les BFCs ont été administrées par gavage avec la même fréquence. Le groupe témoin (irradiation seule) recevait en gavage du solvant seul à la même fréquence. Afin de valider l'effet antitumoral de la radiothérapie, 2 souris n'ont reçu ni irradiation ni traitement radiosensibilisant. La croissance tumorale a été mesurée et les ratios de croissance ont été calculés tout au long de la période de traitement jusqu'à J41 post-greffe (**Figure 18A-B**). En parallèle, un suivi du poids des souris a été réalisé sur la même période afin d'évaluer la tolérance aux traitements (**Figure 19A-B**).

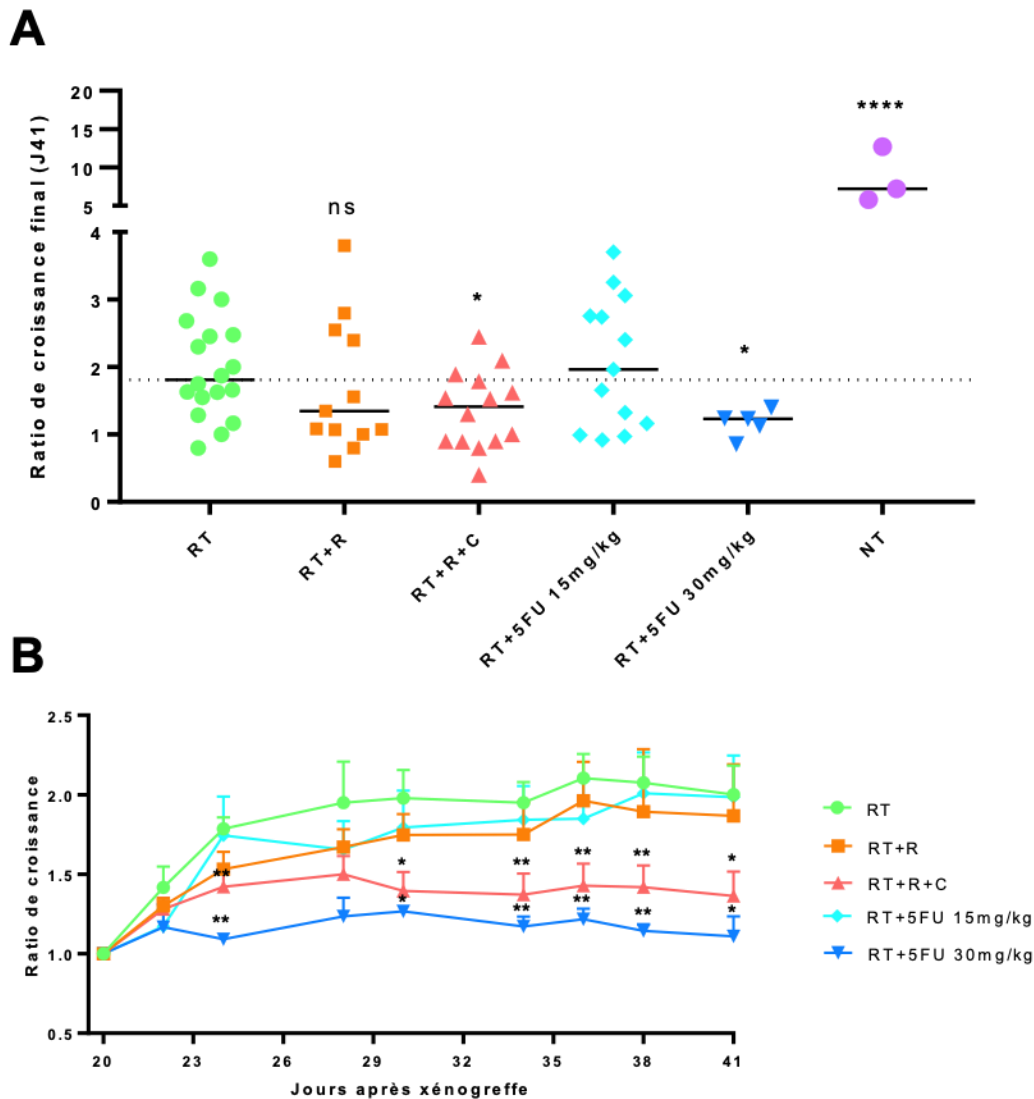


Figure 18 : Effets radiosensibilisants in-vivo comparés du 5-fluoro-uracile et du resvératrol seul ou en combinaison avec la capsïcaine. A. Ratio de croissance tumoraux finaux à J41 des différents groupes de traitement. Les traits pleins représentent les médianes des ratios. Le trait pointillé représente la médiane des ratios du groupe RT. **B.** Suivi longitudinal de la moyenne des ratios de croissance tumoraux pour les différents groupes de traitement. Résultats présentés en moyenne + SEM. RT : radiothérapie seule ; RT+R : radiothérapie + resvératrol ; RT+R+C : radiothérapie + resvératrol + capsïcaine ; RT+5FU : radiothérapie + 5-fluoro-uracile. * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; **** : $p < 0.0001$. ns : non-significatif.

Les ratios de croissance des tumeurs des 2 souris non traitées étaient entre 5 et 7 fois supérieurs à la médiane de ceux obtenus pour les tumeurs simplement irradiées. Ce résultat valide l'efficacité antitumorale des irradiations focalisées (**Figure 18 A**) obtenues à partir de l'irradiateur XenX®. Concernant les traitements radiosensibilisants associés, ni le resvératrol

seul, ni le 5-FU à une dose de 15mg/kg n'ont permis d'obtenir un effet significatif en termes de croissance tumorale entre J20 et J41 (**Figure 18A-B**). Le traitement par resvératrol/capsaïcine ainsi que celui par une dose doublée de 5-FU (30mg/kg) permettaient un meilleur contrôle tumoral avec des ratios de croissance finaux significativement inférieurs à ceux du groupe avec irradiation seule (**Figure 18A**). L'absence d'effet du 5-FU à 15mg/kg est probablement en lien avec une dose trop faible, un doublement de cette dose permettant d'obtenir une radiosensibilisation. Concernant le resvératrol seul, on peut faire l'hypothèse que sa métabolisation intestinale et hépatique aboutisse à une inhibition de son action radiosensibilisante *in vivo* (voir partie suivante). Nous n'avons d'ailleurs pas mis en évidence d'effet antitumoral du resvératrol seul ou de la capsaïcine seule administrés par voie orale sur un modèle murin pancréatique [160]. L'effet observé avec la combinaison de BFCs est donc potentiellement lié à une synergie du resvératrol et de la capsaïcine *in vivo*. Afin de valider cela il sera nécessaire d'intégrer un bras de traitement par capsaïcine seule dans les prochaines expériences.

Le suivi du poids des animaux n'a pas mis en évidence une toxicité significativement plus importante des traitements combinés en comparaison de celle des rayonnements seuls. Cependant, on observait pour les souris traitées par la dose élevée de 5-FU une baisse significative de poids d'environ 10% du poids initial avant sacrifice (**Figure 19A-B**). A noter que dans ce même groupe, 3 souris sont mortes avant la fin de l'expérimentation et 2 d'entre elles présentaient une anémie à la NFS. Le traitement par 5-FU à dose élevée est donc efficace sur le contrôle tumoral, au prix d'une toxicité importante. Aucune toxicité additionnelle n'a par contre été observée pour les autres groupes et en particulier les souris traitées par l'association resvératrol/capsaïcine. Cette combinaison de BFCs semble donc constituer une stratégie thérapeutique radiosensibilisante efficace *in vivo* et moins toxique que la chimiothérapie pour les tumeurs colorectales.

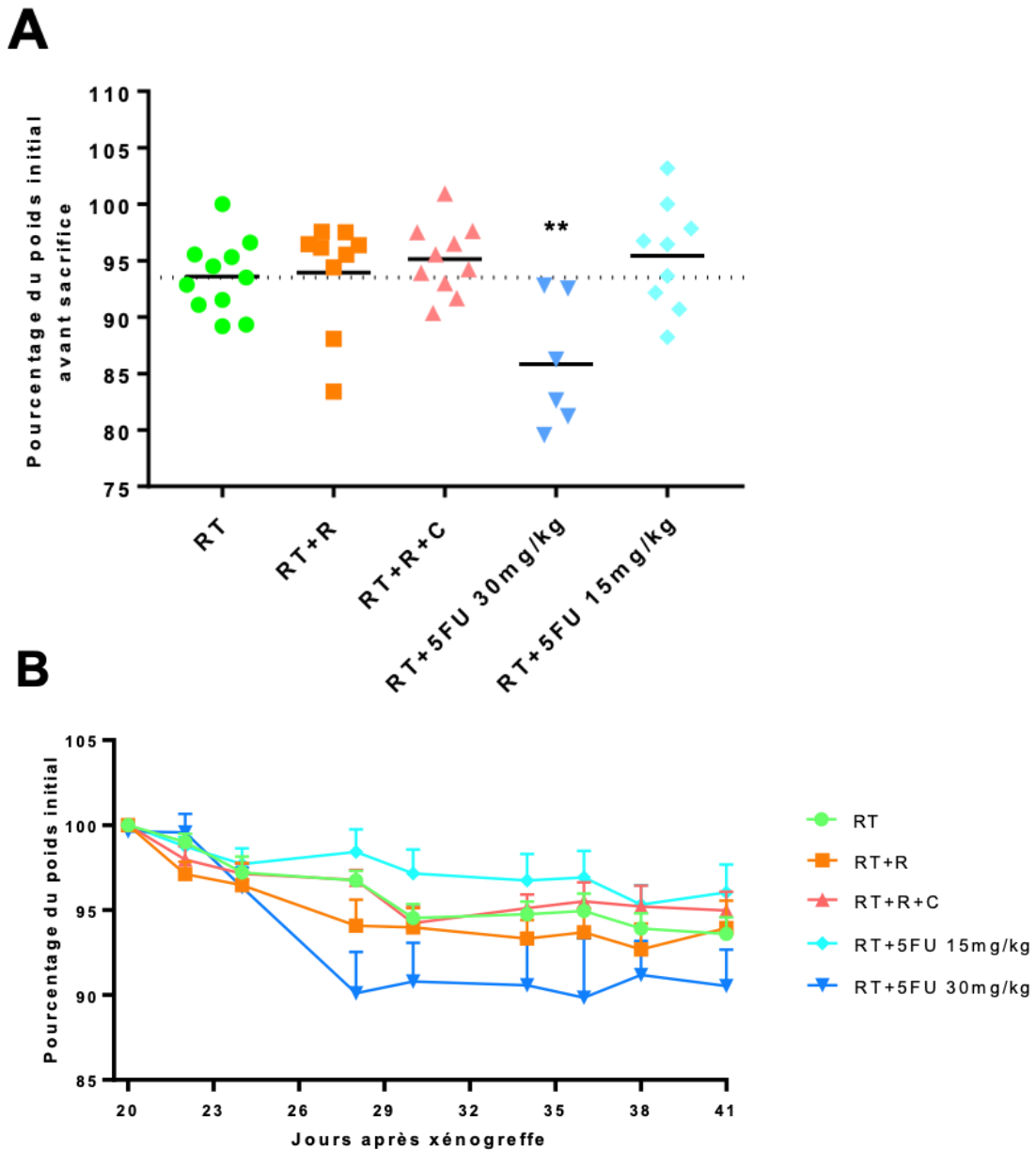


Figure 19 : Tolérance des animaux aux différents traitements. **A.** Poids des animaux avant sacrifice, exprimé en pourcentage du poids initial, pour des différents groupes de traitement. **B.** Suivi longitudinal du poids des animaux, exprimé en pourcentage du poids initial, pour les différents groupes de traitement. Résultats présentés en moyenne + SEM. RT : radiothérapie seule ; RT+R : radiothérapie + resvératrol ; RT+R+C : radiothérapie + resvératrol + capsaïcine ; RT+5FU : radiothérapie + 5-fluorouracile. ** : $p < 0.01$.

La cytotoxicité sélective du resvératrol pour la tumeur colorectale en fait une molécule de choix pour le développement de stratégies radiosensibilisantes. Nous n'avons pas établi formellement cet effet *in vivo* en utilisant une voie d'administration orale. Comme discuté précédemment, il est probable qu'une dose très faible et non-radiosensibilisante de resvératrol actif atteigne les tumeurs sous-cutanées après une administration orale. Afin de vérifier cette hypothèse, nous développons actuellement un modèle murin de greffe orthotopique intrarectale. Ce modèle nous permettra de tester l'action radiosensibilisante du resvératrol, sans capsaïcine, après administration par voie intrarectale. Cette voie d'administration permettra une absorption directe par la tumeur d'une majeure partie de la dose de resvératrol et évitera une métabolisation préalable. Après avoir modifié la lignée HCT116 pour permettre l'expression de l'enzyme luciférase, nous avons injecté différentes quantités de cellules dans la muqueuse rectale de souris RAG γ 2C. Le suivi de croissance tumorale a ensuite été réalisé par bioluminescence sur une période de 4 semaines. Un exemple d'image obtenue au cours de ce suivi (J13) est présenté en **figure 20**.

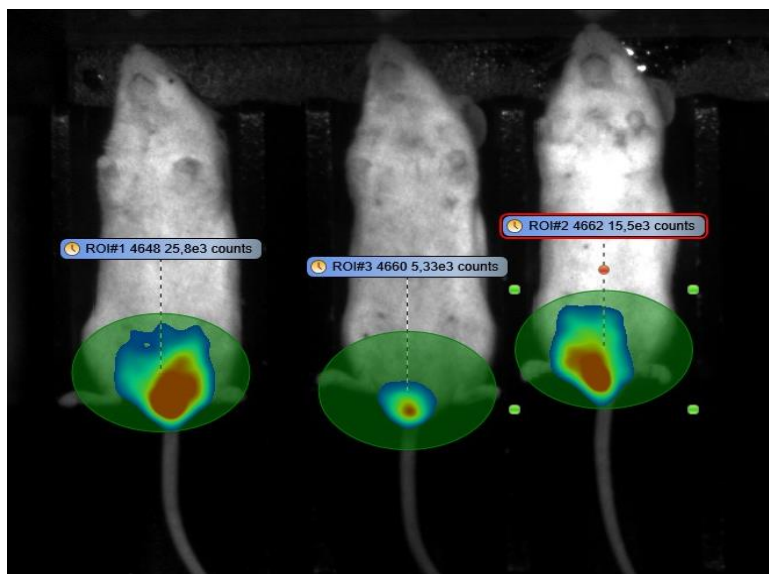


Figure 20 : *Suivi par bioluminescence de la croissance tumorale de greffes orthotopiques de cellules colorectales tumorales HCT116 à J13 post greffe.* La lignée HCT116 a été modifiée afin d'exprimer l'enzyme luciférase. La visualisation des tumeurs par bioluminescence se fait quelques minutes après injection de luciférine. La taille tumorale est proportionnelle à la quantité de bioluminescence détectée.

Nos résultats mettent en évidence les propriétés radiosensibilisantes du resvératrol et de sa combinaison à la capsaïcine sur des modèles de tumeurs colorectales. Le resvératrol et sa combinaison à la capsaïcine induisent un blocage du cycle cellulaire et une stimulation de l'apoptose.

L'effet radiosensibilisant des BFCs et en particulier de l'association resvératrol/capsaïcine a été confirmé à l'aide d'un modèle murin préclinique. Comme dans le modèle pancréatique, nous n'avons pas observé d'effets secondaires systémiques délétères, contrairement au 5-FU qui permettait une radiosensibilisation efficace des tumeurs mais au prix d'importants effets indésirables. La combinaison resvératrol/capsaïcine a donc été radiosensibilisante dans les 2 modèles tumoraux pancréatiques et colorectaux, renforçant ainsi la robustesse de cette approche innovante.

De façon intéressante, et sur les 2 modèles étudiés, nous avons observé une cytotoxicité majorée du resvératrol sur les cellules tumorales en comparaison des cellules non tumorales. De nombreuses études décrivent des effets cytotoxiques et antiprolifératifs des BFCs, et du resveratrol en particulier, plus marqués sur les cellules tumorales en comparaison des cellules apparentées saines. Paradoxalement, si cette caractéristique représente l'un des éléments clé mis en avant pour démontrer l'intérêt des BFCs en oncologie, un nombre très réduit d'études ont cherché à comprendre et identifier les mécanismes cellulaires sous-jacents. Plusieurs pistes sont alors envisageables :

- Le ciblage par les BFCs de voies de signalisation essentielles à la progression tumorale suractivées dans les cellules tumorales par rapport aux cellules saines.
- Un(e) meilleur(e) régulation/contrôle du stress oxydant généré par les BFCs par les cellules saines en comparaison des cellules tumorales.
- Une diminution de l'entrée des BFCs ou une augmentation de leur efflux au niveau des cellules saines par rapport aux cellules tumorales.

- Une métabolisation/inactivation supérieure des BFCs par les cellules saines en comparaison des cellules tumorales. C'est cette dernière hypothèse de métabolisation différentielle que nous avons choisi de vérifier pour le resvératrol.

D'autres part, nous avons observé une accumulation des cellules tumorales en phase S du cycle cellulaire suite à l'exposition au resvératrol, potentiellement liée à une inhibition de la réplication de l'ADN. Cette synthèse d'acide nucléique est en lien étroit avec le métabolisme nucléotidique. Plusieurs travaux décrivent le resvératrol comme capable d'inhiber, le plus souvent indirectement, des enzymes impliquées dans la régulation du métabolisme des nucléotides [222,223]. Malgré cela, peu de travaux ont exploré l'impact direct du resveratrol sur la balance nucléotidique, en particulier dans des modèles tumoraux. Nous avons donc exploré l'impact du resvératrol sur le métabolisme nucléotidique, à la fois sur les cellules tumorales et non-tumorales colorectales.

II – 3 Effet différentiel du resvératrol sur les cellules colorectales tumorales et non-tumorales et impact sur le métabolisme nucléotidique.

Le resveratrol, comme de nombreux autres polyphénols, est majoritairement métabolisé par les UDP-GlycosylTransférases (UGT) et les sulfo-transférases qui permettent respectivement sa glucuronoconjugaison et sa sulfoconjugaison. Les dérivés glucuronidés et sulfoconjugués du resvératrol sont plus hydrophiles et vont être efflués dans le milieu extracellulaire via des transporteurs transmembranaires. Devenus hydrophiles, ces composés ne pourront pénétrer dans les cellules passivement, à la différence du resvératrol. Les enzymes de conjugaison, et en particulier les UGT1A, représentent donc un moyen potentiel de contrer les effets cytotoxiques du resvératrol et d'autres polyphénols. Dans ce contexte, nous avons étudié la métabolisation du resvératrol par les UGT1A par les cellules tumorales et non-tumorales colorectales.

II – 3 – A Les UDP-glycosyltransférases

II – 3 – A – 1 Classification, structure et fonction

Les glycosyltransférases humaines représentent une superfamille de protéines qui catalysent l'addition de résidus de sucre d'un co-substrat donneur de nucléotide-sucre à un groupe fonctionnel (généralement un groupe hydroxyle, carboxyle, amine ou sulfhydryle) de petits produits chimiques lipophiles (généralement inférieurs à 1,5 kDa). Les glycosyltransférases les mieux caractérisées sont les UDP-glucuronosyltransférases (UGT) des sous-familles UGT1 et UGT2 (**Figure 21**). L'UDP-glucuronate ou UDP-acide glucuronique (UDP-GlcA) est le cosubstrat majoritaire et préféré des enzymes UGT1 et UGT2, et la réaction de conjugaison catalysée est donc appelée glucuronidation (**Figure 22**).

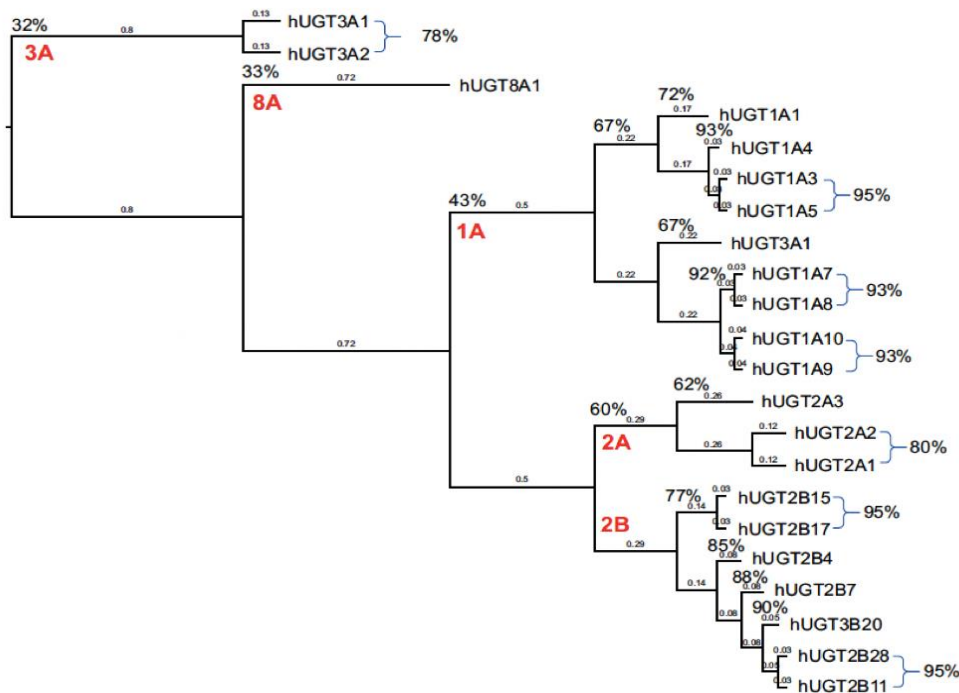


Figure 21 : Dendrogramme décrivant les relations entre les séquences d'acides aminés primaires de toutes les UDP-glycosyltransférases (UGT) humaines. Les longueurs des branches sont indiquées ainsi que le pourcentage d'homologie pour chaque branche principale (Adaptée d'après Meech & al., Physiology Reviews, 2017).

L'attaque nucléophile du co-substrat UDP-GlcA par le groupe fonctionnel polaire du substrat permet le transfert du GlcA du co-substrat au substrat. Les produits finaux de ces réactions sont le métabolite glucuronidé et l'UDP.

Les principaux glucuronides formés chez l'homme sont liés à l'oxygène et à l'azote. Les métabolites glucuronidés voient leur hydrosolubilité augmentée par rapport à la molécule parentale, ce qui facilite leur élimination dans la bile et l'urine. Dans la plupart des cas, les métabolites glucuronidés ont une activité biologique réduite ou nulle par rapport aux composés parentaux

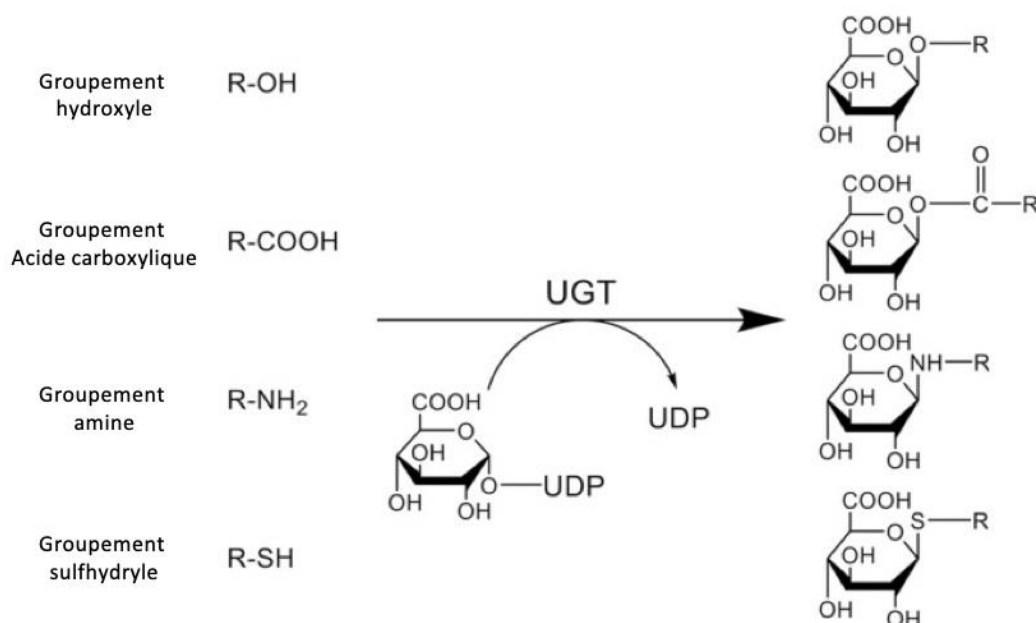


Figure 22 : Réaction de conjugaison catalysée par les UDP-glucuronosyltransférases (UGT). Les UGT catalysent le transfert de l'acide glucuronique de l'UDP-glucuronique vers un atome d'oxygène, d'azote ou de soufre de leurs substrats. R : substrat. (Adaptée d'après Fujiwara & al., *Frontiers in Pharmacology*, 2016).

Les UGT sont des enzymes principalement membranaires qui se localisent principalement dans le réticulum endoplasmique (RE), où la réaction de glucuronidation (ou glucurono-conjugaison) a lieu sur la face luminale. Certaines UGT peuvent également résider au niveau de la membrane périnucléaire [224]. Les UGT partagent une organisation structurale similaire comprenant un domaine conservé N-terminal de liaison au co-substrat, une région transmembranaire et un domaine cytosolique C-terminal variable selon les isoformes (**Figure 23**) [225,226]. En raison des difficultés de cristallisation, très peu de données structurales sont disponibles pour les UGT humaines liées à la membrane. On dispose quasi uniquement de modèles structuraux prédits *in silico*.

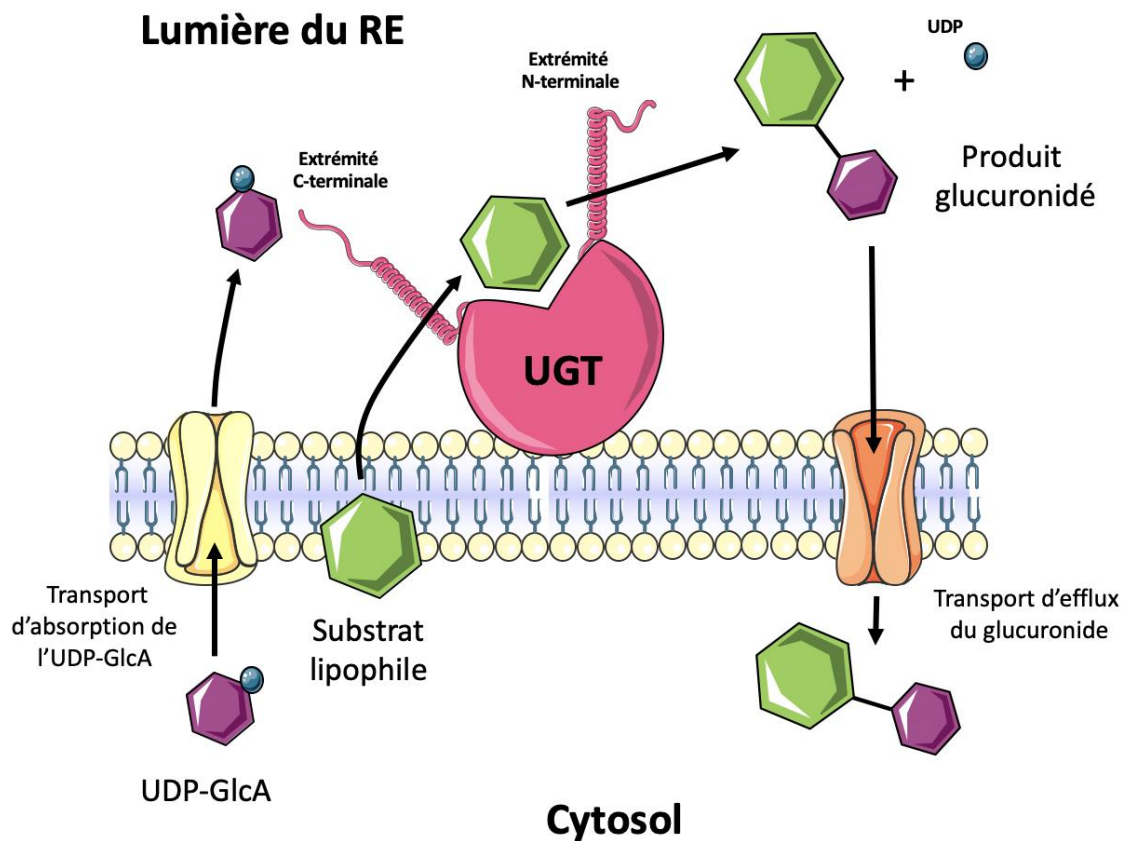


Figure 23 : Modèle topologique hypothétique des UGT humaines. Le site actif de l'enzyme est localisé dans la partie luminale du réticulum endoplasmique (RE). Un transporteur UDP-GlcA facilite le transfert du co-substrat à travers la membrane du RE. (Réalisée avec l'aide de Servier Medical Art ; www.smart.servier.com).

L'activité de glucuronidation des UGT n'implique qu'une seule molécule d'enzyme. Cependant, des interactions UGT-UGT existent et peuvent moduler le niveau d'activité de ces enzymes. Les premières données décrivant l'oligomérisation des UGT de mammifères a été rapportée par 1981 [227]. Un complexe d'UGT a également été mis en évidence dans des microsomes de foie de rat [228]. D'autres équipes ont montré que les UGT de mammifères, y compris les UGT humaines, formaient des homo- et des hétéro-oligomères tels que des dimères, trimères et tétramères. L'interaction directe entre l'UGT1A9 et l'UGT1A4 a par exemple été mise en évidence [229]. Les auteurs ont transfecté dans des cellules d'insecte le gène *UGT1A4* sauvage et/ou un gène *UGT1A9* mutant aboutissant à la génération d'une protéine UGT1A9 tronquée au niveau du domaine C-terminal et présentant une activité de glucuronidation réduite. De manière intéressante, l'activité de glucuronidation de l'UGT1A9 mutante était augmentée dans les cellules co-transfectées en comparaison des cellules exprimant uniquement l'*UGT1A9* mutant. Les niveaux de glucuronidation des substrats testés étaient même comparables à ceux observés avec l'*UGT1A9* sauvage. De plus, l'absence de structure C-terminale ne semblait pas nécessaire à l'oligomérisation des 2 UGT, suggérant plutôt une implication de la région N-terminale. Ainsi, des interactions UGT-UGT homo ou hétéro-oligomériques peuvent moduler les taux catalytiques de glucuronidation ainsi que l'affinité des substrats envers les UGT.

II – 3 – A – 2 Régulation de l'expression des UGT et distribution tissulaire

Un gène unique *UGT1* code pour l'ensemble des enzymes UGT1A1,3,4,5,6,7,8,9 et 10. Il est situé sur le locus 37.1 du bras long du chromosome 2. Chaque UGT1A est codée par l'un des 9 exons 1 alternatifs et par 4 exons communs (exons 2, 3, 4 et 5) (**Figure 24**). L'exon 1 code pour la partie N-terminal de liaison au co-substrat de la protéine. Il existe 2 exons 5a et 5b qui codent pour des isoformes plus ou moins longues des UGT1A dites i1 (longue ; exon 5a et i2 (courte ; exon 5b) [230]. Les formes courtes présentent généralement des activités enzymatiques plus faibles. Les gènes *UGT2* humains, dont *UGT2A* et *UGT2B*, sont situés sur le locus chromosomique 4q13.2. UGT2A1 et UGT2A2 sont générés par le partage d'un l'exon 1 unique et des exons 2 à 6 communs, de la même manière que les protéines UGT1A. Un gène

unique code pour l'UGT2A3. Les protéines de la famille UGT2B, UGT2B4, UGT2B7, UGT2B10, UGT2B11, UGT2B15, UGT2B17 et UGT2B28, sont codées par des gènes uniques présent au sein d'un cluster (**Figure 24**). En plus des exons canoniques des gènes UGT décrits ci-dessus, des exons cryptiques ont été identifiés pour presque tous les gènes UGT individuels [231]. Des travaux récents ont montré que les exons canoniques et cryptiques de chaque gène UGT individuel peuvent subir un épissage alternatif, aboutissant à la génération de transcrits et de protéines différents [232,233].

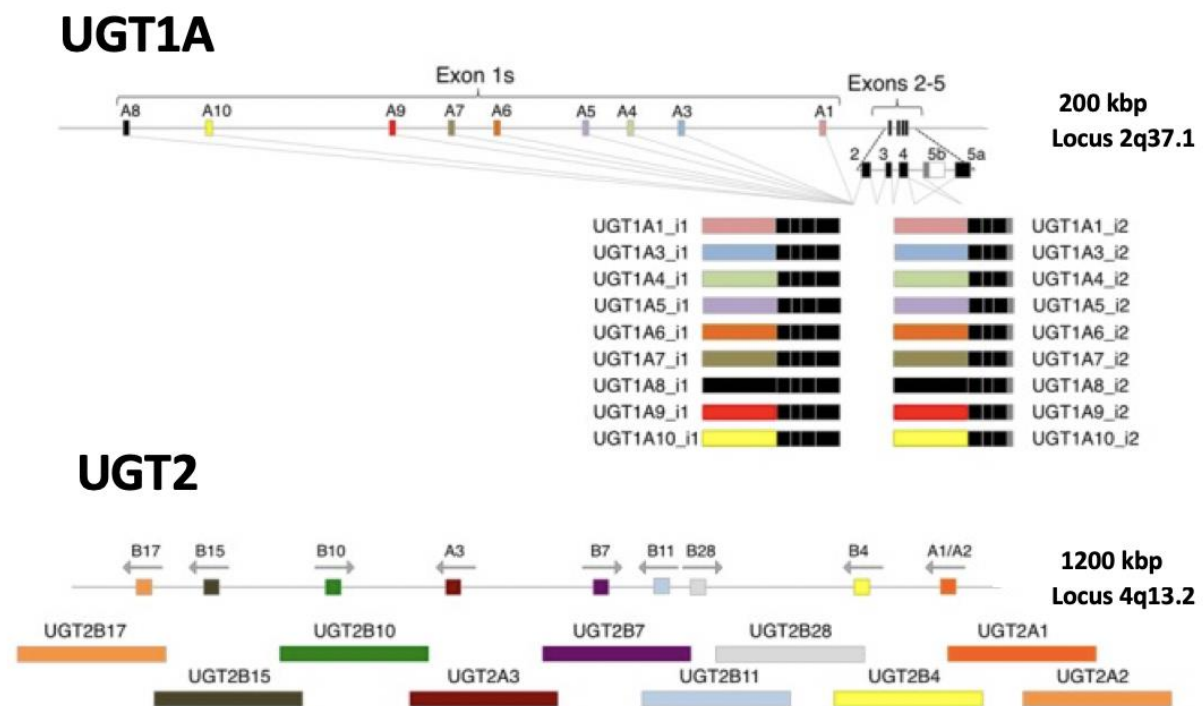


Figure 24 : Structures des gènes codants les enzymes UGT1 et de UGT2 humaines. Le gène *UGT1* contient plusieurs exons 1 alternatifs et un groupe d'exons commun (exons 2, 3, 4, 5a et 5b). Les UGT1A_i2 générés avec l'exon 5b sont plus courtes que celles générés avec l'exon 5a (UGT1A_i1). De la même manière, les UGT2A1 et UGT2A2 sont générées par le partage d'un exon 1 unique et d'exons 2 à 6 communs. L'UGT2A3 et la famille des UGT2B sont codées par un gène unique pour chaque enzyme. (Adaptée d'après Fujiwara & al., *Frontiers in Pharmacology*, 2016).

Chaque UGT possède une région promotrice unique en amont de l'exon 1 ainsi que des régions régulatrices distales, pouvant agir en tant qu'activateur ou répresseur de l'expression [234]. Le promoteur et les régions distales présentent des sites de liaison pour les facteurs de transcription modulant l'expression constitutive et tissus-spécifique des UGT ainsi que leur expression induite (ou dans certains cas leur répression) en réponse à des signaux spécifiques. L'expression inductible permet aux UGT de répondre à la demande cellulaire et tissulaire de détoxification et de maintien homéostatique des niveaux de molécules de signalisation endobiotiques.

De nombreux polymorphismes sont présents au sein des gènes *UGT*. Ils sont répartis au niveau des promoteurs, des régions distales activatrices ou encore au sein des exons. Selon leur nature, ils peuvent influencer l'activité enzymatiques des protéines associées. Par exemple, un polymorphisme du promoteur du gène *UGT1A4* est responsable d'une activité diminuée de glucuronidation hépatique de l'anastrazole, un inhibiteur de l'aromatase utilisé dans le traitement des cancers du sein [235].

Bien que la plupart des UGT soient exprimées de manière prééminente dans les principaux organes de détoxification (foie et rein), beaucoup d'entre elles sont exprimées à des niveaux variables dans le tractus gastro-intestinal (**Figure 25**), la peau, les muqueuses et dans les organes sensibles aux stéroïdes tels que le sein et la prostate. En outre, alors que certaines UGT sont largement exprimées, d'autres présentent une spécificité tissulaire restreinte. L'expression tissulaire spécifique des UGT est fortement régulée par diverses voies de signalisation et facteurs de transcription, et pourrait être liée aux métabolites substrats qu'elles conjuguent [236,237]. Un ensemble de facteurs de transcription tissus-spécifiques contrôlent l'expression basale ou constitutive des gènes UGT.

L'activité des UGT contribue à réguler l'activité de nombreuses molécules lipophiles endogènes, y compris des ligands de facteurs de transcription tels que la superfamille des récepteurs nucléaires. Ces facteurs de transcription dépendants des ligands régulent l'expression inductible de nombreux gènes UGT, incluant ceux codant pour les isoformes

impliquées dans leur métabolisme. Les UGT jouent un rôle central dans la détoxification et la clairance d'un large éventail de produits chimiques exogènes, y compris les carcinogènes, les toxines, les constituants alimentaires et les médicaments thérapeutiques [238,239]. Outre la régulation des UGT par des composés endogènes, de nombreux produits chimiques exogènes, dont les médicaments, peuvent moduler l'expression des gènes *UGT*, en particulier les gènes codant pour les isoformes participant à leur détoxification.

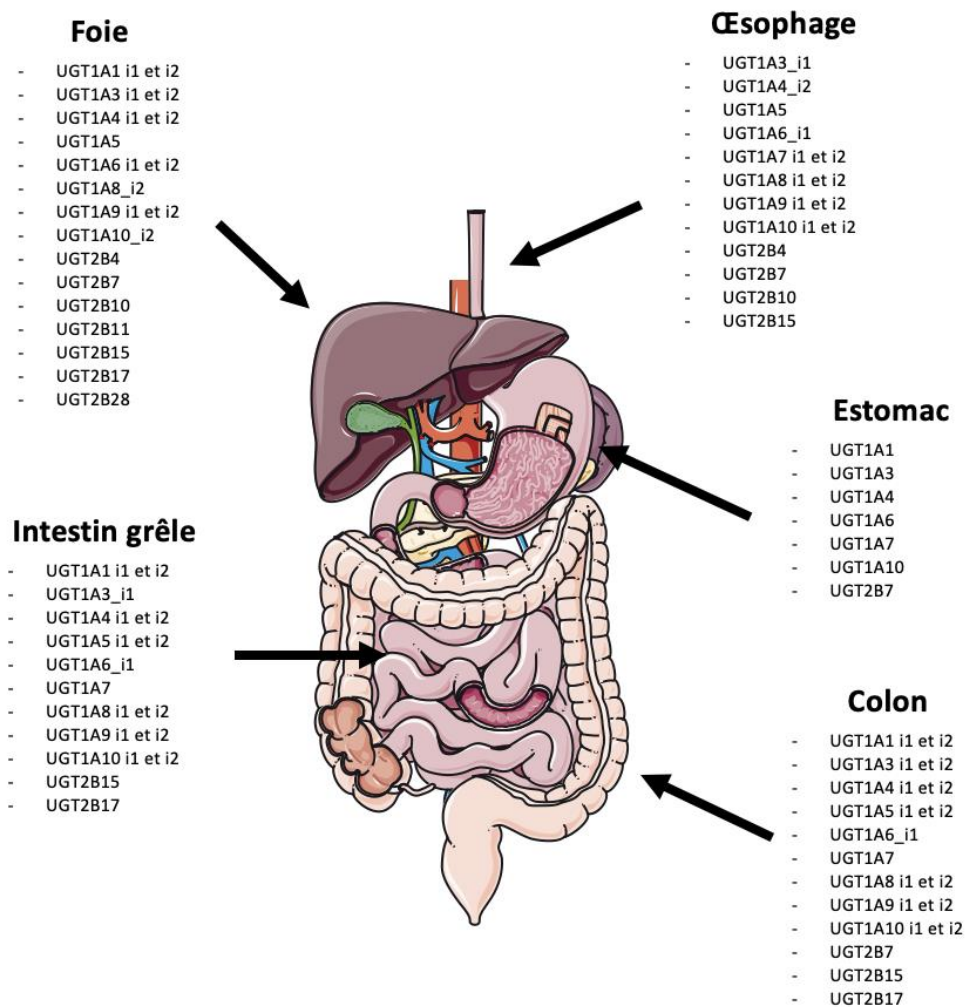


Figure 25 : Distribution tissulaire des différentes isoformes d'UGT au niveau digestif. (Réalisée avec l'aide de Servier Medical Art ; www.smart.servier.com).

De nombreuses études ont montré que le niveau de base et l'induction/répression dynamique des gènes UGT sont régulés à plusieurs niveaux. Des modifications épigénétiques telles que la méthylation des promoteurs ou la modification des histones [240–243], permettent de moduler l'expression des UGT. Par exemple, l'hyperméthylation des promoteurs de l'UGT1A1 et de l'UGT1A10 est associée à l'absence d'expression de l'UGT1A1 au niveau rénal et de l'UGT1A10 au niveau hépatique. En revanche, leurs promoteurs sont hypométhylés dans les organes où elles sont exprimées. L'hyperméthylation du promoteur de l'UGT1A1 et la perte consécutive de l'expression de l'UGT1A1 ont également été montrés dans des cellules tumorales colorectales [241].

L'activation et la répression par divers facteurs de transcription agissant sur des éléments régulateurs de gènes situés dans les régions promotrices et régulatrices distales des UGT est une autre voie de régulation d'expression [244]. Le facteur hépatique nucléaire 1 alpha (HNF1 α) joue un rôle majeur dans la régulation de l'expression des UGT au niveau hépatique. Tous les gènes UGT1 et UGT2 sont régulés à des degrés divers par HNF1 [244]. Les sites de liaison de HNF1 α ont été identifiés majoritairement dans les promoteurs proximaux des gènes *UGT*. La régulation transcriptionnelle médiée par HNF1 α peut être modulée par d'autres facteurs de transcription. HNF1 joue un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes *UGT* dans le tractus gastro-intestinal, comme le montrent une étude sur les gènes *UGT1A8*, *UGT1A9* et *UGT1A10* [245]. HNF1 se lie aux promoteurs proximaux de ces 3 gènes pour augmenter leur transcription. Cette activation est augmentée par la liaison adjacente du facteur Cdx2, un facteur de transcription spécifique intestinal. *UGT1A7*, qui n'est exprimé que dans le tractus gastro-intestinal supérieur où Cdx2 est absent, ne contient pas de site de liaison à Cdx2.

Enfin, des modifications post-traductionnelles des protéines UGT, en particulier des réactions de phosphorylation, sont à l'origine de modulation de l'activité catalytique des UGT [246–249]. Une diminution rapide de l'activité de glucuroconjugaison de la bilirubine par les UGT a été mise en évidence suite à l'exposition de cellules en culture à la curcumine et à la calphostine C, 2 molécules connues pour inhiber de la protéine kinase C (PKC) [246]. Cette observation suggérait un rôle de la PKC dans l'activité des UGT. Sur 11 UGT étudiées, les

auteurs ont identifié 4 à 5 sites potentiels de phosphorylation par PKC. En utilisant du phosphate marqué, les auteurs ont montré une baisse de la phosphorylation de ces sites suite à une exposition à la calphostine C. Cette observation était associée à une baisse de l'activité de glucuronidation.

II – 3 – A – 3 Rôles physiologiques

Comme évoqué précédemment, les UGT ont des fonctions essentielles de détoxification et de clairance en régulant le métabolisme, la bioactivité et la biodisponibilité des composés pharmacologiques, alimentaires et environnementaux. Les UGT représentent avec les cytochromes les enzymes principales de métabolisation et d'inactivation des thérapeutiques médicamenteuses. Les 19 isoformes UGT1 et UGT2 modulent l'efficacité pharmacologique d'environ 55% des médicaments les plus prescrits [250]. Les UGT hépatiques les plus actives pour le métabolisme des médicaments sont les isoformes 1A1, 1A3, 1A4, 1A6, 1A9 et 2B7. Ces mêmes enzymes sont également impliquées dans la métabolisation de substrats moléculaires endogènes tels que la bilirubine [251], les acides biliaires [252], ou encore les hormones stéroïdes [253]. Outre ces 3 grandes classes de composés endogènes, les UGT sont également impliquées dans le métabolisme des hormones thyroïdiennes [254], des vitamines liposolubles [255], ou encore de certains neurotransmetteurs comme la sérotonine [256,257].

II – 3 – A – 4 UGT et métabolisation du resvératrol

Le resvératrol est majoritairement glucuronoconjugué en resvératrol-3-Oglucuronide (R3OG) et resvératrol-4'-Oglucuronide (R4OG) par les UGT1A1, 1A9 et 1A10 [258,259], même si d'autres isoformes présentent des activités plus faibles. En conséquence, c'est l'UGT1A10 qui est principalement impliquée dans la glucuronoconjugaison du resvératrol au niveau intestinal tandis que les UGT1A1 et 1A9 réalisent cette conjugaison au niveau hépatique. L'UGT1A1 et l'UGT1A9 produisent principalement du R3OG et du R4OG respectivement [258]. De manière intéressante, plusieurs études rapportent une capacité de glucuronoconjugaison plus importante par les microsomes intestinaux en comparaison des microsomes hépatiques

[258,259]. L'intestin représentant le premier tissu exposé au resvératrol après une administration orale, il doit logiquement pouvoir le métaboliser rapidement avant son passage par diffusion passive dans la circulation systémique. Une étude enzymatique utilisant des microsomes intestinaux et hépatiques a montré des profils de cinétique de formation des glucuronides différents selon les enzymes. Le profil cinétique pour la formation du R3OG présentait une inhibition par le substrat pour les trois isoformes 1A1, 1A9 et 1A10, alors que celui du R4OG différait et présentait une inhibition par le substrat pour les UGT1A1 et UGT1A10 et une cinétique de Hill (signant une affinité plus forte de l'enzyme pour son substrat lorsque la concentration de celui-ci augmente) pour UGT1A9 [259]. La structure chimique tridimensionnelle du resvératrol influence également sa métabolisation. Des vitesses de glucuronoconjugaison différentes étaient mises en évidence pour les 2 diastéréoisomères trans-resvératrol (forme majoritaire) et cis-resveratrol (forme minoritaire et instable), avec un avantage pour la forme cis [260]. Étonnamment, l'activité de glucuronoconjugaison hépatique était systématiquement supérieure pour les microsomes de femmes en comparaison des microsomes masculins [261]. Il existe donc une influence du sexe sur l'activité des UGT1A pour la métabolisation du resvératrol.

II – 3 – B impact du resvératrol sur le métabolisme nucléotidique tumoral

Les nucléotides sont nécessaires à une grande variété de processus biologiques. Bien qu'il existe des voies de recyclage et que les cellules puissent absorber des nucléotides exogènes [262–264], les nucléotides peuvent être synthétisés *de novo*, principalement à partir du glucose, de la glutamine et du CO₂. Une stimulation de cette synthèse est nécessaire par exemple pour permettre la réplication de l'ADN et la production d'ARN permettant *in fine* la synthèse protéique. L'ensemble de ces processus est régulé à de multiples niveaux, en lien étroit avec les différents stades du cycle cellulaire, et il en est donc de même pour la synthèse des précurseurs nucléotidiques.

Dans le contexte tumoral, les altérations oncogéniques d'oncogènes et/ou de gènes suppresseurs de tumeurs participent activement à la régulation du métabolisme et en

particulier de celui des nucléotides. Le concept historique mettant en avant l'« effet Warburg » (observation selon laquelle la plupart des cellules cancéreuses produisent de l'énergie grâce à un fort taux de glycolyse suivie d'une fermentation du pyruvate en acide lactique) pour expliquer le métabolisme pathologique des tumeurs a été progressivement nuancé, voire réfuté, notamment grâce aux avancées majeures dans les domaines de la génétique tumorale et de l'échappement immunitaire. Un nombre croissant d'études a démontré que les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs sont des facteurs régulateurs clés dans la synthèse *de novo* des nucléotides et que les altérations de ces gènes activent le métabolisme tumoral via des voies de signalisation spécifiques (**Figure 26**), indépendamment de l'addiction au métabolisme glucidique. Par exemple, l'activation du facteur mTORC1 consécutive à une inactivation de la sirtuine 3 (SIRT3) induisait une augmentation significative du transfert de la glutamine vers la voie du métabolisme des nucléotides dans un modèle de tumeur mammaire [265]. La voie de signalisation PI3K-Akt-PTEN-mTORC1 permet la phosphorylation, par l'intermédiaire de la protéine ribosomale S6 kinase 1 (S6K1), de la serine 1859 du complexe CAD. L'oligomérisation du complexe est ainsi augmentée, facilitant l'action concertée des 3 domaines enzymatiques [266,267], et stimulant la synthèse *de novo* des pyrimidines [268,269].

Très peu d'études ont recherché l'impact du resvératrol sur le métabolisme des nucléotides des cellules tumorales. De manière intéressante, le resvératrol est un inhibiteur direct du facteur mTOR et de la voie PI3K-Akt, elle-même très souvent suractivée dans les tumeurs colorectales [270–273]. Cette inhibition pourrait induire une baisse de la synthèse des pyrimidines (**Figure 26**). Dans un modèle de PDAC, l'oncogène muté *KRAS* permettait d'activer l'expression de l'oncogène *MYC* via la voie des MAP kinases (MAPK), augmentant ainsi l'activité transcriptionnelle de la ribose 5'-phosphate isomérase A (RPIA), enzyme essentielle de la voie non-oxydative des pentoses phosphates génératrice de PRPP [274]. La mutation oncogénique de *KRAS* aboutissait donc à une activation de la synthèse *de novo* des purines et pyrimidines et maintenait des niveaux élevés de nucléotides dans les cellules tumorales. L'oncogène c-Myc est également capable de réguler le niveau d'expression du complexe CAD en se liant à la séquence palindromique hautement conservée de la boîte E en aval du site

transcriptionnel du promoteur de CAD [275,276]. c-Myc est également impliqué dans la régulation de la transcription des enzymes UMPS et CTP synthase (CTPS) [277].

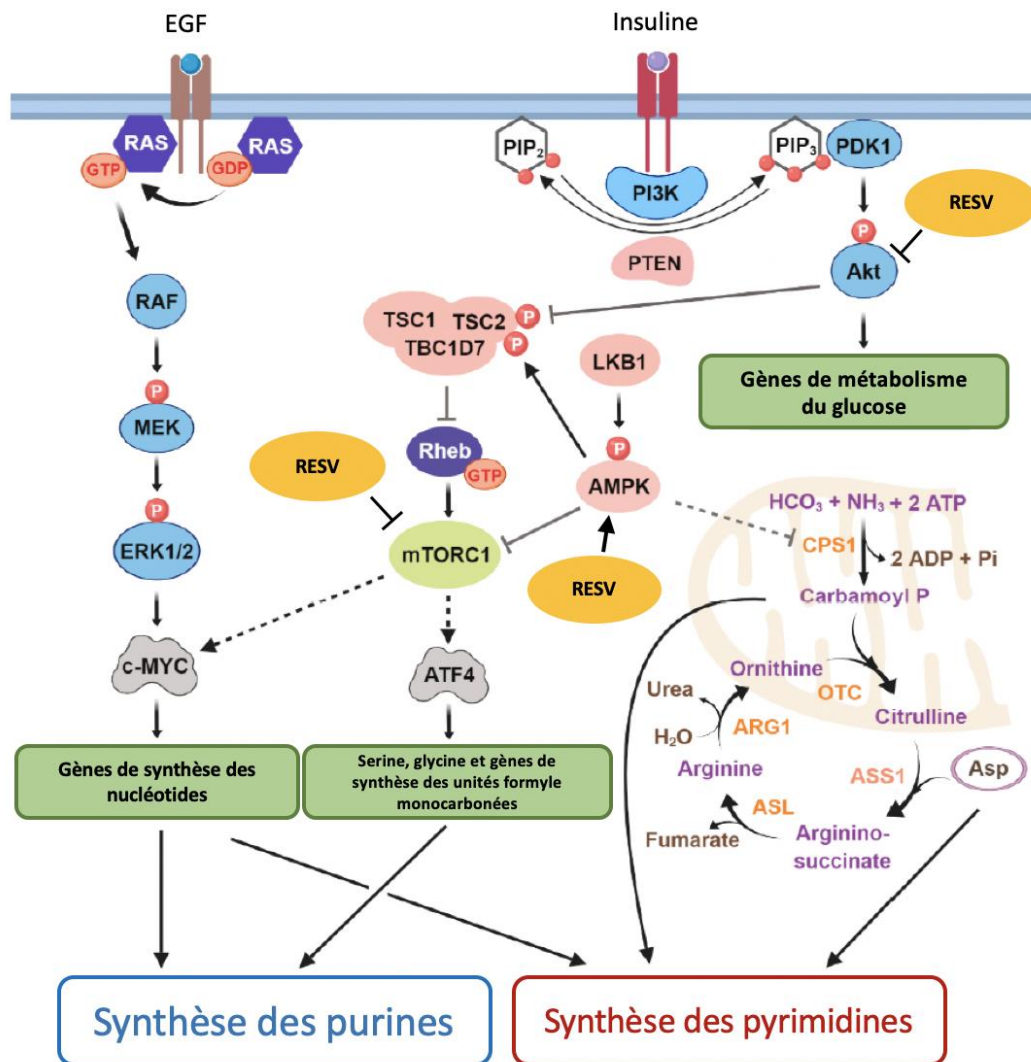


Figure 26 : Régulation de la synthèse des nucléotides par les oncogènes et les suppresseurs de tumeurs et impact potentiel du resvératrol. La signalisation des facteurs de croissance et des oncogènes active le métabolisme des nucléotides pour fournir le matériel essentiel à la prolifération cellulaire. La signalisation en aval de PI3K/Akt augmente l'absorption du glucose et la glycolyse. Le facteur de transcription MYC, activé en aval de RAS, stimule la synthèse de novo des purines et des pyrimidines. En plus de l'activation de MYC, mTORC1 augmente les niveaux d'ATF4 et la synthèse de la sérine, de la glycine et des unités formyle monocarbonées contribuant à la synthèse des purines. La perte de LKB1 et l'activation oncogénique de K-RAS entraînent une augmentation de CPS1, une enzyme du cycle de l'urée qui produit un intermédiaire carbamoyl phosphate alimentant la synthèse de novo des pyrimidines. EGF : Epidermal Growth Factor ; CPS1 : Carbamoyl phosphate synthétase 1 ; OTC : Ornithine transcarbamoylase ; ASS1 : Argininosuccinate synthétase 1 ; ASL : Argininosuccinate lyase ; ARG1 : Arginase 1 ; ASP : Aspartate ; RESV : Resveratrol. Adapté d'après Villa & al. *Cancers* 2019.

D'autre part, l'inhibition de la DHODH entraîne une diminution de la transcription et de la stabilité de c-MYC dans la leucémie aiguë myéloïde (LAM) et le mélanome [278,279]. L'inhibition combinée de l'oncogène *BRAF*^{V600E} et de la DHODH permettait d'ailleurs une réduction de la croissance tumorale des tumeurs mélaniques [279]. Ces études soulignent les interactions complexes entre les différentes signalisations oncogéniques, la respiration mitochondriale et la régulation du métabolisme tumoral des pyrimidines [280–282,277]. Des altérations des gènes suppresseurs de tumeurs peuvent également aboutir à une dérégulation du métabolisme nucléotidique des cancers. Des mutations du gène *TP53* aboutissent par exemple à la synthèse d'une protéine modifiée capable de se fixer au niveau du promoteur de nombreux gènes activateurs de la synthèse des nucléotides et d'augmenter leur expression [283]. La Liver Kinase B1 (LKB1) ou serine thréonine kinase 11 (STK11) active la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK), une enzyme clé de la régulation énergétique. L'AMPK régule négativement l'activité de la carbamoyl phosphate synthase 1 (CPS1), une enzyme clé du cycle de l'urée qui produit le carbamoyl phosphate, un intermédiaire indispensable pour la synthèse *de novo* des pyrimidines. Dans certaines tumeurs pulmonaires, l'inactivation de LKB1 associée à l'activation oncogénique concomitante de *KRAS* entraînent une augmentation de l'activité de CPS1 et une augmentation de la synthèse des pyrimidines [284]. Le resvératrol est un activateur de l'AMPK [285]. Il pourrait donc par ce biais inhiber indirectement CPS1 et la synthèse nucléotidique (**Figure 26**).

Le resvératrol pourrait donc représenter un modulateur négatif du métabolisme tumoral des nucléotides. D'un point de vue plus large, la compréhension approfondie du rôle des oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs dans la régulation du métabolisme tumoral des nucléotides pourrait à terme permettre le développement de traitements antimétaboliques ciblés et adaptés au profils métaboliques et génétiques des tumeurs.

II – 3 – C Etude de l'effet différentiel du resvératrol sur les cellules colorectales tumorales et non-tumorales : Article original

Differential UGT1A enzymatic arsenal explains the specific cytotoxicity of resveratrol towards tumor colorectal cells

Samuel Amintas^{1,2,3}, Pauline Beaumont^{1,7}, Charles Dupin^{1,2,4}, Isabelle Moranvillier^{1,2}, Isabelle Lamrissi^{1,2}, Elie Patel^{1,2}, Benjamin Fernandez^{1,2,6}, Julian Boutin^{1,2,5}, Tristan Richard^{1,2,7}, Stéphanie Krisa^{1,2,7}, François Moreau-Gaudry^{1,2,5}, Aurélie Bedel^{1,2,5}, David Cappellen^{1,2,3}, Benoît Pinson^{1,8,9}, Véronique Vendrely^{1,2,4} & Sandrine Dabernat^{1,2,5,&}.

1. Bordeaux University, France.

2. INSERM U1312, BoRdeaux institute In onCology - BRIC, BioGo team, 33000 Bordeaux, France.

3 Bordeaux. University Hospital, Tumor Biology and Tumor Bank Laboratory, France.

4. Bordeaux University Hospital, Radiotherapy department, France

5 Bordeaux. University Hospital, Biochemistry Laboratory, France.

6 Bordeaux. University Hospital, Digestive surgery department, France.

7. UR Oenologie, EA 4577, USC 1366 INRAE, INP, ISVV, Villenave d'Ornon, France

8 UMR 5095, CNRS, Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires, 33077 Bordeaux, France

9- Service Analyses Métabolique, TBMcore - Université Bordeaux - CNRS UAR 3427 - INSERM US005

&Corresponding author:

Université de Bordeaux

INSERM U1312

146, Rue Léo Saignat

33076 Bordeaux Cedex

Email : sandrine.dabernat@u-bordeaux.fr

Running title: UGT1A expression and resveratrol cytotoxicity in colorectal tumor and non-tumor cells

Abstract

Introduction: Resveratrol (R) belongs to the Bioactive Food Component (BFC) family. It seems admitted that its cytotoxic action impacts tumor cells and spares healthy cells, but the published proofs remain rare. We hypothesized that cells may differentially metabolize resveratrol and lead to different systemic impacts. **Methods:** Resveratrol metabolism was evaluated by ultra-high-performance liquid chromatography (UHPLC) coupled with diode array detection (DAD), and correlated with the expression of Uridyl-diphosphate-GlucuronosylTransferase 1A (*UGT1A*) genes. The expression of *UGT1A* genes in human colorectal tissues was studied with RNAseq databases. Functional validation of *UGT1A* enzymes implication in resveratrol sensitivity of colorectal cells established by *UGT1A* expression modulation. The impact of resveratrol treatment on nucleotide metabolism was also assessed. **Results:** Resveratrol was more cytotoxic in cells with downregulation of UGTs, i.e. tumor cells. Conversely, overexpression of the *UGT1A10* gene in an initial resveratrol-sensitive tumor cell line increased the metabolism accompanied by decreased cytotoxicity. Resveratrol affected intestinal sensitive tumor cell homeostasis with a cell-volume increase, cell-cycle modulation, and decreased uridylate nucleotide levels, resulting in a global reduction of transcription and translation. This impact on global cell activity was restricted to tumor cells. **Conclusion:** This study increases resveratrol general knowledge and explains how resveratrol antitumor action can spare non-tumor cells. It also paves the way to select colorectal tumors eligible for resveratrol treatment potentiation without additional toxicity to healthy digestive tissues.

Keywords: Colorectal cancer, resveratrol, *UGT1A*, drug metabolism, tumor-specific cytotoxicity

Acknowledgments

We would like to thank the Vect'UB vectorology platform team for the design and production of lentivectors, Johanna Ceschin, from Bordeaux Metabolomic Analysis Service (SAM) for technical assistance and Sandrine Hamon for administrative assistance.

Funding sources

This work was supported by SIRIC-BRIO (Bordeaux Recherche Intégrée en Oncologie).

Declaration of interest statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

Abbreviations

AEC: Adenylic Energy Charge

AMPK: AMP-activated protein kinase

BFC: Bioactive Food Component

CMS: Consensus molecular subtype

CRC: Colorectal cancer

DAD: Diode Array Detection

DMEM: Dulbecco's Minimal Essential Medium

OD: Optical Density

PKC: Protein Kinase C

R3OG: Resveratrol-3-O-glucuronide

R4OG: Resveratrol-4'-O-glucuronide

ROS: Reactive Oxygen Species

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

UGT: Uridyl-diphosphate-GlucuronosylTransferase

UHPLC: Ultra-high-performance liquid chromatography

Introduction

Colorectal cancer (CRC) is the third most frequent cancer in the world, accounting for about 10% of the total cancer cases [1]. CRC treatment, combining surgical resection, chemotherapy, and radiotherapy, depending on the tumor stage [2], results in variable efficiencies and toxicities. Despite the improvement of surgical and therapeutic strategies, numerous patients relapse, with numbers varying from 17 to 25%, depending on the treatment regimen and the stage [3,4]. Thus, innovative approaches are still needed to potentiate the chemo and radiotherapy efficiencies in CRC, while keeping low systemic toxicity [5–7]. Bioactive food components' antitumor properties seem particularly relevant to CRC [8]. According to the American Dietetic Association, BFCs are "physiologically active food compounds, derived from animal or plant sources, including compounds belonging to the food of a basic diet, for which a role has been shown to be healthy and the consumption of which is not harmful to health" [9]. Preventive and therapeutic benefits of BFCs in cancer have been increasingly reported over the past two decades. Among BFCs, the stilbenoid resveratrol provided promising results in CRC models. On one hand, resveratrol potentiated conventional chemotherapy by increasing Reactive Oxygen Species (ROS) production and promoting cell cycle arrest and apoptosis [10–12]. This observation does not belong to CRC only since we and others demonstrated chemotherapy and radiotherapy potentiation in other cancers with or without association with another BFC [13–17]. Thus, the anti-cancer effect of resveratrol has been largely described and reviewed [18–20]. On the other hand, numerous studies have described the benefits of resveratrol in physiological processes and non-cancer diseases.

It is commonly accepted that resveratrol may impact tumor cells while sparing the surrounding healthy tissues. This interesting hypothesis is supported by a few publications that explored tumor cells compared to the corresponding non-tumor cell response to resveratrol. For example, we observed pancreatic tumor-specific toxicity of resveratrol while the pancreatic epithelial non-tumor cells seemed insensitive [14], although we did not further describe the molecular basis of the differential response. In the same way, the pro-oxidative cytotoxic action of resveratrol was specific to astrocytoma cancer cells as compared to healthy astrocytes, related to their different glutathione levels and oxidative stress amplitude [21]. In fact, it is supposed that cell response is dependent on its specificities, as exemplified by the

particular endoplasmic-reticulum/mitochondria coupling in epithelial-endothelial hybrid tumor cells leading to a reduced ATP, not observed in normal endothelial cells [22]. Remarkably, a systematic analysis of more than 20 tumor and non-tumor cells showed a hormetic effect of resveratrol, with beneficial activity at low concentrations turning into adverse impact at high concentrations [23]. This biphasic behavior was observed for many other BFCs [24,25] and could contribute to their differential effect on the tumor and non-tumor cells. Multiple downstream targets were reported involved in tumor cell death or healthy cell improvement, but none of them seemed to be directly regulated by resveratrol, and the first-step mechanisms remain elusive.

Thus, it seems admitted that resveratrol specifically targets tumor cells, but published proofs are actually scarce. To fill up this gap in resveratrol general knowledge, using the CRC model, we investigated how resveratrol antitumor action could be tumor-specific, leading to treatment potentiation without additional toxicity for healthy digestive tissues.

Material and Methods

Colorectal cell lines and drugs

HT29, HCT116, SW480, MICC12, and CT26 cells were obtained from the ATCC (Teddington, United Kingdom). NCM460 cells were obtained from Incell (San Antonio, Texas, USA). HT29, HCT116, SW480, and MICC12 cells were maintained in Dulbecco's minimal essential medium (DMEM, Invitrogen, Saint Aubin, France) with 10% Fetal Calf Serum (FCS, Invitrogen) and 1/100 Penicillin/Streptomycin (Invitrogen). CT26 cells were maintained in Roswell Park Memorial Institute (RPMI, Invitrogen) with 10% FCS with Penicillin/Streptomycin 1/100 (Invitrogen). NCM460 cells were maintained in M3BaseF medium (Incell) with 10% FCS and 1/100 Penicillin/Streptomycin. Resveratrol (R), Resveratrol-4'-O-glucuronide (R4'OG) were from Sigma Aldrich.

Survival assay

Cells were plated at $5 \cdot 10^3$ cells per well in 96-well plates. The day after, different doses of R or R4-OG were applied and cells were kept in culture for 72 h. The medium culture was removed and cells were washed with 1X PBS. Cells were then stained with 100 μ L 0.5% crystal violet and allowed to incubate at room temperature for 15 min. After removing the crystal

violet solution, wells were washed three times with 1X PBS to remove unbound dye. Finally, all wells were filled with 100 μ L acetic acid (33%) to release the dye from the cells. The optical density (OD) of stained adherent cells was determined with an absorbance microplate reader at a wavelength of 570 nm. To correct background staining, the OD values of the control wells were averaged and subtracted from the mean OD value obtained for each condition. Results are expressed as cell survival: (OD treated/OD control)*100. Each measure was performed at least in quadruplets. Each experiment was repeated at least three times separately for each condition and the average values were calculated with standard deviation (SD).

Gene expression analysis

Total RNA was isolated using the Direct-zol[®] kit (Zymo Research, California) and treated by DNase according to the manufacturer's instructions. cDNAs were synthesized using a Reverse transcriptase cDNA synthesis kit (Roche Applied Science, Meylan, France). Gene expression levels were determined by reverse transcription/real-time quantitative PCR (qRT-PCR), using the Promega GoTaq[®] qPCR kit (Promega, Wisconsin) and the comparative MNE (Mean Normalized Expression) method [26]. The primers used for qRT-PCR analyses are listed *in Tables 1 and 2*. To normalize the qRT-PCR data, we used the primers for the Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) housekeeping gene. Melting curves showed that primers amplified only the specific fragments.

Methylation assay

Cells were plated at $15 \cdot 10^4$ cells per well in 12-well plates. The day after, cells were treated with 5-azacytidine (1 mM) for 24 hours and with 5-azacytidine (1 mM) + trichostatin A (500 μ M) for the next 24 hours. Cells were harvested with trypsin 0.25% and collected in a microtube. RNA extraction and RT-qPCR expression analysis were performed.

UGT1A expression modulation

UGT1A downregulation was carried out using shRNA technology using the following sequences: shRNA 601 (shRNA *UGT1A10-1*) 5'-CCGGGCAACTGGAAAGATCACTGAA-3', shRNA 602 (shRNA *UGT1A10-2*) 5'-GCACAGGCAC AAAGTATATTT-3' and shRNA 603 (shRNA pan-*UGT1A*) 5'-GGATCAATGGTCTCAGAAATT-3', shRNA scramble (control), cloned in lentivirus expressing puromycin resistance, produced by the Bordeaux University vectorology platform (Vect'UB). Cell lines were transduced at a multiplicity of infection of 5, followed by a 5-days

puromycin selection step (1 μ M). UGT1A10 overexpression vector was designed using the full coding sequence of the *UGT1A10* gene [27] cloned in a lentivirus with puromycin resistance gene (Vect'UB). A vector with the same viral backbone and including green fluorescent protein (GFP) and puromycin resistance gene was used as control. Cell lines were transduced with lentivectors at a multiplicity of infection of 10 and puromycin selection.

Resveratrol metabolites quantification in cell medium

Cells were plated at 15×10^4 cells per well in 12-well plates (2×10^5 cells per well for shRNA modified cells). The day after, cells were treated with resveratrol at 50 μ M for 3, 6, 12, and 24 hours. At each time point, the medium was removed, centrifuged for 20 min (20,000 g, 4 °C), and immediately frozen at -80°C before UHPLC analysis. Quantification of R and resveratrol-glucuronides medium-concentrations were performed by ultra-high-performance liquid chromatography (Agilent 1290 Series) coupled with UV-VIS diode array detector (DAD) and mass spectrometer. Two microliters were injected into an Agilent SB-C18 column (1.8 μ m, 2.1 \times 100 mm). Samples were eluted with solvent A (H₂O 0.1% formic acid) and solvent B (acetonitrile 0.1% formic acid) by the following gradient program: 0–1.7 min, 10% B; 1.7–3.4 min, 10–20% B; 3.4–5.1 min, 20–30% B; 5.1–7.8 min, 30% B; 7.8–8.5 min, 30–35% B; 8.5–11.9 min, 35–60% B; 11.9–15.3 min, 60–100% B; 15.3–17 min, 100% B; 17–17.3 min, 100–10% B. The flow rate was set to 0.4 mL/min. The quantifications were carried out by integration of the peaks at the absorbance of 320 nm and using appropriate calibration curves. The cell media alone were also analyzed to eliminate any potential matrix effect.

Metabolomic assay:

Cells were plated at 5×10^5 cells per well in 6-well plates and were treated the day after with resveratrol at 50 μ M for 24 hours. Metabolite extraction by ethanol boiling method on subconfluent cells ($<10^5$ cells/cm²) and metabolites separation by high-pressure ionic chromatography on an ICS 3000 chromatography station (Dionex) were respectively described in [28,29]. Sample normalization was done based on cell number and cell volume both determined with a Multisizer® IV particle counter (Beckman Coulter, CA). AXP and UXP content corresponds to the sum of ATP + ADP + AMP and UTP + UDP + UMP contents, respectively. Adenylate energy charge was defined as $AEC = (ATP + \frac{1}{2} ADP)/AXP$ [30]. AXP, UXP, and AEC were calculated with each nucleotide pure content given in nmol/sample

(inferred from standard curves using nucleotides pure compounds). Each experiment was repeated at least three times separately for each condition and the average values were calculated with SD.

Cell cycle analysis

Non-synchronized subconfluent cells were harvested with trypsin 0.25% and washed twice with 1X PBS. Cells were fixed with paraformaldehyde (PFA) 3,7% for 15 minutes and permeabilized with triton 0.5% for 15 minutes at room temperature. Cells were washed twice with 1X PBS and incubated with RNase (100 µg/mL, Sigma-Aldrich) overnight at 37°C. Cells were washed twice with 1X PBS + 5% BSA and incubated with propidium iodide (PI) solution (4 µg/mL, Sigma-Aldrich) for 15 min in the dark. The samples were examined on a BD Accuri™ C6 flow cytometer and data were analyzed with BD Accuri™ C6 Plus software (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France).

Transcription rate assay

Cells were plated at $15 \cdot 10^4$ cells per well in 12-well plates. The day after, cells were treated with resveratrol at 50 µM for 24 hours. For each condition, cells of 1 well were harvested with trypsin 0.25% and collected in a microtube. DNA and RNA extractions were performed using respectively QIAamp® DNA isolation kit (Qiagen, Germany) and Direct-zol® RNA isolation kit (Zymo Research, California). DNA and RNA concentrations were measured with Nanodrop® one/one spectrophotometer (ThermoFisher). Transcription quantification was determined using the ratio of RNA concentration to DNA concentration for each condition.

Translation rate assay

Cells were plated at $1 \cdot 10^5$ cells per well in 6-well plates. The day after, cells were treated with resveratrol at 50µM for 24, 48, and 72 hours. At each time point, 10 µg/mL puromycin was added to the culture medium for 10 minutes. Immediately after, cells were washed with cold 1X PBS, and frozen at -80°C in RIPA buffer. Protein extraction was performed using RIPA buffer and protein extracts were processed for western blotting. Membranes were incubated with the anti-puromycin antibody (Clone 12D10, Sigma Aldrich ref MABE343). Rabbit anti-GAPDH antibody (Cell Signaling Technologies, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) was used to normalize the loading of the samples. Anti-puromycin antibody was detected with specific anti-mouse-IgG-HRP (Cell Signaling Technologies). Proteins were visualized using the ECL

detection system (Amersham Pharmacia Biotech, Orsay, France). Quantification by densitometry was performed with the ImageJ software.

RNAseq Databases analysis

RNAseq raw data files from studies GEOD-50760 and GEOD-76987 were obtained with Expression Atlas / EMBL-EBI (<https://www.ebi.ac.uk/gxa/home>). Raw RNAseq counts for *UGT1A8* and *UGT1A10* genes were normalized using the « median of ratios » normalization method [31]. Log2 fold changes of UGT1A enzyme genes were directly obtained from Expression Atlas / EMBL-EBI analysis.

Survival analysis

Overall survival Kaplan-Meier curves of COAD (colorectal cancer) and READ (rectal cancer) TCGA databases patients according to the expression of UGT1A1, UGT1A7, UGT1A8, or UGT1A10 enzymes were obtained directly with GEPIA survival analysis (<http://gepia.cancer-pku.cn>). Group cut-offs used median expression value and high and low cut-offs were equal to 50%. UGT1A expression correlation analysis in healthy and tumor samples of COAD and READ databases was performed directly using the GEPIA correlation analysis tool.

Statistical analysis

Statistical tests were performed using the Graph-Pad Prism software (v6.04). Results are expressed as mean \pm SD, analyzed by unpaired, bilateral Student's t-tests. $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Resveratrol differential toxicity is related to colorectal cell line metabolism capacity

To assess tumor and non-tumor cell line sensitivity to resveratrol, HCT116, HT29, SW480, NCM460, CT26, and MICC12 cells were treated with increasing doses of resveratrol (**Figure 1A**). The non-tumor cells NCM460 presented the highest IC_{50} (Inhibitory concentration 50) value ($IC_{50}=125\mu M$), which was 2.4 and 4.8-fold higher than that of HCT116 ($50\mu M$) and SW480 ($25\mu M$) tumor cells, respectively. HT29 IC_{50} ($IC_{50}=80\mu M$) was 1.6 to 3.2-fold higher than that of HCT116 and SW480. Similar results were obtained for the mouse tumor colorectal

cell line CT26, with a 5-fold higher sensitivity to resveratrol compared to the non-tumor mouse intestinal cells MICC12 (**Supplemental figure 1A**).

Resveratrol passively crosses the cell plasma membrane to reach the cytosol where it can be metabolized into sulfo- and/or glucuroconjugates with metabolic enzymes, followed by an efflux of the metabolites in the extracellular compartment [32,18]. To assess resveratrol metabolism in tumor and non-tumor colorectal cells, we performed a time course quantification of resveratrol and its metabolites in the culture medium after resveratrol exposure (**Figure 1B**). The resveratrol-sensitive tumor cells HCT116 and SW480 did not present any resveratrol metabolism after 24 h, as no resveratrol glucuroconjugates were detected, and resveratrol medium concentrations remained unchanged. By contrast, the HT29 cells metabolized half of the initial resveratrol into glucuroconjugates after 24 h, with a large proportion of the resveratrol-4'-O-glucuronide (R4OG) compared to resveratrol-3-O-glucuronide (R3OG). The non-tumor NCM460 intestinal cells, performed complete metabolism of resveratrol after 24 h, with 85% R4OG and only 15% of R3OG. Mouse CT26 tumor cells produced half the amounts of R4OG as compared to the non-tumor MICC12 intestinal cells (**Supplemental figure 1C**).

These results suggest that cell potential to metabolize resveratrol parallels their resistance to resveratrol, so tempted that resveratrol-derived metabolites are non-toxic. *To test this hypothesis, we determined whether R4OG was cytotoxic.* Dose-response experiments showed no cytotoxic effect for all the tested mouse or human cell lines (**Figure 1C, supplemental figure 1B**).

Resveratrol is preferentially metabolized by *glucuronidation* by the UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) 1A (UGT1A) [32]. As the intestinal cell lines displayed distinct capacities to metabolize resveratrol, we determined the mRNA levels of *UGT1A1*, *1A6*, *1A8*, *1A9*, and *1A10* genes. None of the cell lines expressed *UGT1A1*, *1A6*, and *1A9* (data not shown). HT29 and NCM460 cells but not HCT116 and SW480 cells exhibited expression of *UGT1A8* and *UGT1A10* mRNAs, (**Figure 1D and 1E**). In the same way, the mouse *MICC12* cells expressed *UGT1A1*, *1A6*, and *1A10* transcripts while the tumor *CT26* cells expressed only the *UGT1A6* transcript (**Supplemental figure 1D**). The β -glucuronidase enzyme (encoded by the *GUSB* gene) reverses glucuronidation. HCT116 and HT29 were the only human cells expressing

GUSB transcripts (**Figure 1F**), while both the murine *CT26* and *MICC12* cells expressed β -glucuronidase enzyme transcripts (**Supplemental figure 1D**).

Taken together, these data suggest that resveratrol resistance was observed in cells armed with UGTs, especially UGT1A8 and UGT1A10, able to resveratrol glucuronidation rather than cells, expressing *GUSB* and able to revert resveratrol metabolization. This is supported by the fact that R4OG was not toxic, even in the *GUSB*-positive cells.

The expression of UGT1A genes is downregulated in human colorectal tumors.

We found in intestinal tumor and non-tumor cell lines that resveratrol resistance appeared linked to the expression of UGTs. To evaluate whether this observation was relevant to colorectal cancers, we looked at the expression of *UGT1A* genes in RNAseq databases providing gene expression profiles of cancer and matched healthy tissues. We observed strong expression of *UGT1A8* and *UGT1A10* in the cell lines resistant to resveratrol. According to protein sequence homology, the UGTs enzyme family is divided into 5 subfamilies sharing expression regulation mechanisms. For instance, UGT1A7, 1A8, 1A9, and 1A10 constitute an independent sub-group, with structural and expression regulation similarities [33]. Using the GEOD-76987 dataset of colorectal primary tumor tissues and normal mucosa tissues [34], we found a systematic decrease in the expression of *UGT1A1*, *1A7*, *1A8*, and *1A10* (**Figure 2A-C**). Focusing on the expression levels of *UGT1A8* and *UGT1A10* genes, we observed a significant downregulation in colorectal primary tumors compared to healthy digestive tissues (**Figure 2B** and **2C**). Similar observations were made using the GEOD-50760 dataset obtained from colorectal primary tumor tissues with matching colorectal tumor hepatic metastasis and normal mucosa tissues [35] (**Figure 2D-F**). In this dataset, we observed that hepatic metastasis had even stronger repression of *UGT1A8* and *UGT1A10* genes.

Next, we used the GEPIA platform gene correlation analysis tool and found that the expressions of *UGT1A8* and *UGT1A10* are closely correlated in healthy colorectal samples (**Figure 2G**, $r = 0.95$). By contrast, this correlation was lost in tumor samples (**Figure 2H**, $r = 0.63$), suggesting a disruption of the expression regulation mechanisms. No correlation was found for *UGT1A1* or *UGT1A7* with *UGT1A8* or *UGT1A10* (**Supplemental figure 2A-H**).

Epigenetic marks, like promoter hypermethylation, have been previously involved in *UGT1A* gene downregulation [36,37]. We tested if demethylation could switch back on the expression *UGT1A8* and *UGT1A10* in HCT116 cells. *SFRP1* and *SFRP2* genes were used as positive controls as both these genes are known to be downregulated in colorectal tumors by promoter hypermethylation [38]. While demethylation did turn on the expression of the *SFRP1* and *SFRP2* genes, *UGT1A8* and *1A10* genes were still off (**Figure 2I**). Thus, the downregulation of *UGT1A8* and *UGT1A10* genes seemed independent of DNA methylation status.

Last, we examined whether *UGT1A* gene expression was prognostic using the GEPIA platform (<http://gepia.cancer-pku.cn>). Kaplan-Meier overall survival curves according to *UGT1A* gene expression showed that low levels of *UGT1A8* and *UGT1A10* were negative prognostic markers for patient survival (**Figure 2L** and **2M**). These results did not apply to *UGT1A1*, *UGT1A7* (**Figure 2J** and **2K**), or other *UGT1A* genes (data not shown).

These results show that *UGT1A8* and *UGT1A10* genes might be clinically relevant to colorectal cancer, especially regarding response to polyphenols such as resveratrol but also for prognosis assessment.

Functional impact of UGT1A expression modulation on non-tumor and tumor cell resveratrol toxicity

There is a known link between *UGT1A* enzymes and colorectal cell sensitivity to drugs [39]. To provide more insight into the relationship between *UGT1A* expression and resveratrol cell sensitivity, the expression of *UGT1A* enzymes was modulated. First, we designed 2 different shRNA to downregulate the expression of all the *UGT1A* enzymes (sh *pan-UGT1A*) or the *UGT1A10* enzyme only (sh *UGT1A10*). *UGT1A10* gene was found expressed both in non-tumor mouse and human cell lines. Moreover, this isoform is strongly present in colorectal healthy tissues and resveratrol is a known target of this enzyme [40]. shRNA impact on the *UGT1A8* (sh *pan-UGT1A*) and *UGT1A10* (Sh *pan-UGT1A* and sh *UGT1A10*) expression was verified by RT-qPCR as compared to scrambled control (**Figure 3A** and **3B**). The downregulation of pan-*UGT1A* or *UGT1A10* increased resveratrol sensitivity in HT29 cells, similar to that observed for the sensitive tumor cells HCT116 (IC₅₀=50μM; Figure 3C). Moreover, the resveratrol metabolism capacity of HT29 with *UGT1A* downregulation was decreased by 7 to 8 folds.

Interestingly, the downregulation of *UGT1A10* resulted in a diminution of the resveratrol metabolism by about 50% and up to 35% with *pan-UGT1A* repression (**Figure 3D**). Moreover, while R4OG and R3OG were detected in similar quantities after *UGT1A10* repression, R3OG was almost absent with global *UGT1A* downregulation. These results suggest that the *UGT1A10* enzyme may be the major enzyme responsible for resveratrol metabolism, mainly into R4OG. Importantly, *UGT1A10* downregulation in the NCM460 non-tumor cells (**Supplemental figure 3A**) led to cell sensitization to resveratrol, lowering the IC₅₀ by about 2-fold (**Supplemental figure 3B**).

Next, we wondered whether the overexpression of *UGT1A10* could confer resistance to resveratrol. HCT116 cells expressed *UGT1A10* when transduced with a lentiviral vector bearing the *UGT1A10* gene coding sequence (**Figure 4A**). The expression of the *UGT1A10* gene in HCT116 diminished about twice their sensitivity to resveratrol (**Figure 4B**). Moreover, *UGT1A10* expression allowed resveratrol metabolism (**Figure 4C**).

These data show that sensitivity to resveratrol depends on the capacity of the cells to perform glucuronidation by *UGT1A* enzymes. Moreover, we found a significant correlation between resveratrol IC₅₀ and metabolism capacity ($r=0.76$, $p=0.017$, **Supplemental figure 3C**).

Resveratrol impacts differentially non-tumor and tumor cells on global cell homeostasis

During the viability assays with resveratrol, we observed that treated tumor cells HCT116 appeared bigger than non-treated cells (**Supplemental Ffigure 4A and 4B**). We determined that the cell volume of resveratrol-treated tumor cells was 1.7-fold bigger as compared to untreated cells (**Figure 5A**). Importantly, this observation was not observed for treated non-tumor-treated cells. Cell size is dependent on the balance between cell growth, which corresponds to an increase in volume, and cell division kinetics, which is defined by total cell cycle length. We hypothesized that resveratrol may disturb the tumor cell cycle, whereas non-tumor cells would not be affected. To test this, we analyzed the distribution of asynchronous cells in the phases of the cell cycle. As expected and as already published, resveratrol (50 μ M) induced a significant accumulation of tumor HCT116 cells in the S and G2/M phases (**Figure 5B**). Resveratrol also affected the cell cycle of the NCM460 cells, although to a lesser extent,

which was surprising according to its little impact in the initial cell viability tests and the maintained cell size (**Figure 1A**). Resveratrol IC₅₀s were determined after 72h of treatment. Resveratrol may induce a cell cycle arrest in normal cells, which then recover from this initial effect, after full glucuronidation. Thus, we compared the initial impact of resveratrol (50 μM) on cell viability in all 4 tumor and non-tumor cell lines treated for 24 h and found a similar moderate decrease, which may account for cell cycle arrest (**Supplemental figure 4C**). Nevertheless, resveratrol-induced cell cycle arrest may not be the only global consequence on tumor cells, which by contrast to non-tumor cells, displayed cell volume increase.

Recent data show that cell growth and division can be uncoupled downstream of nucleotide imbalances [41]. Moreover, resveratrol inhibits mTORC1 and promotes AMPK activity, both actions leading to indirect pyrimidine synthesis inhibition [42–44]. We hypothesized that resveratrol could differentially impact nucleotide concentrations of tumor cells and non-tumor cells, especially pyrimidines. Levels of purine nucleotides (ATP / ADP / AMP / GTP / GDP) and pyrimidine nucleotides (CTP / CDP / UTP / UDP / UMP / Uridine diphosphate N-acetylglucosamine (UDP-NAG)) were measured in HCT116 and NCM460 cells after 24 h of resveratrol exposure (50 μM). Adenylic nucleotide metabolism was higher in NCM460 compared to HCT116, as shown by the increase in AXP content (AXP = ATP + ADP + AMP) contents (**Supplemental figure 4D** and **4G**). By contrast, Adenylic Energy Charge remained constant after resveratrol exposure, thus excluding an energetic alteration as responsible for the cancer cells proliferation arrest (**Supplemental figure 4H**). GTP, GDP, and CDP nucleotide levels were similar in both cell lines and were not changed after resveratrol treatment (**Supplemental figure 4I-K**). By contrast, although basic levels were roughly similar in tumor and non-tumor cells, we observed a significant decrease in all the tested pyrimidine monophosphate and triphosphate nucleotide contents in resveratrol-treated tumor cells but not non-tumor cells. Indeed, UTP, UMP, and CTP levels decreased in HCT116 resveratrol treated cells (**Figure 5C-E**, **Supplemental figure 4K**). UDP levels were not impacted by the treatment (**Figure 5D**), but UDP being the less abundant uridylylate nucleotide in HCT116 cells, its stability under resveratrol treatment cannot be sufficient to prevent the general decrease of uridylic nucleotides (see UXP **Figure 5F**).

Altogether, these results show that resveratrol treatment affects pyrimidine nucleotide abundance specifically in tumor cells.

Pyrimidine nucleotides and especially uridylate nucleotides are major metabolites of transcription. Lower levels of UMP/UTP may result in transcription inhibition [45,46]. To assess global transcription, we quantified the RNA/DNA ratios in tumor (HCT116) and non-tumor (NCM460) cells, treated or not for 24 h with resveratrol (50 μ M). RNA/DNA ratios dropped in HCT116 treated cells but not in NCM460 cells (**Figure 5G**).

A general slowdown of transcription may result in diminished global translation [47]. We used a puromycine pulse-chase staining to observe that resveratrol treatment resulted in the decrease of translation in HCT116 cells after 48 and 72 h (**Figures 5H**). Translation in NCM460 cells was not affected even after 72 h of resveratrol exposure (**Figure 5I**). Our results suggest that resveratrol impacts specifically the whole transcription-translation process of colorectal tumor cells while sparing non-tumor cells.

Discussion

Numerous studies, including ours, showed resveratrol toxicity in tumor cells and its differential impact on non-tumor cells, but the mechanistic demonstration of this difference remains unclear. This work highlights the role of UGT1As in the response to resveratrol. We also showed a resveratrol systemic cell impact driven by diminished transcription and translation rates.

Dietary resveratrol passively crosses the plasma membrane of enterocytes to be metabolized into sulfoconjugates and glucuronconjugates by metabolic enzymes. These conjugates are released into the bloodstream and the conjugation can be reversed in target tissues. In addition, metabolites may undergo enterohepatic recirculation enabling new absorption in the intestine. In the intestine, metabolized forms can be unconjugated by the microbiota [48], and reenter the enterocytes for a new metabolization/circulation cycle. Thus, the intestine is more exposed to the native form of resveratrol, which may optimize the impact on colorectal tumors. The enterohepatic cycle of resveratrol is of particular interest in colorectal cancer application since the resveratrol-4'-O-glucuronide metabolite has no cytotoxic activity, as confirmed in this study, which may also be true for the 3-O-glucuronide and 3-O-sulfate.

Moreover, their production soon after resveratrol absorption limits its bioavailability to distant tissues.

Our work revealed that UGT1A expression status was closely linked to resveratrol sensitivity in cell line models since metabolization activity was correlated to sensitivity. UGT1A expression seemed correlated to cell differentiation. Indeed, the HCT116 and SW480 cell lines form undifferentiated tumors and belong to the CRC consensus molecular subtype 4, CMS4, [49,50], whereas the HT29 cell line forms well-differentiated tumors resembling grade I carcinomas (CMS3, [50]). Of note, the fold difference in the expression of a few genes, including UGT1A1, was the highest in colon-like cell lines, such as HT29. This suggests that loss of differentiation during cancer progression is accompanied by loss of *UGT1A* expression. This hypothesis is supported by our *in-silico* analysis finding a systematic decrease in the expression of UGT1A1, 1A7, 1A8, and 1A10 in tumor colon tissues. Metastasis showed further downregulation, confirming the relationship between UGT1A loss and cancer aggressiveness. This assumption is also in agreement with our finding that low levels of UGT1A8 and UGT1A10 were negative prognostic markers for patient survival. Moreover, downregulation of UGT1A expression in colorectal and other digestive cancer tissues has been described in the literature [51,52]. *UGT1A1* expression is tightly regulated by promoter methylation [36,53] and *UGT1A8* and *UGT1A10* are expressed from distinct promoters [37]. We showed here that global demethylation of the HCT116 cell line did not turn on UGT1A8 and UGT1A10 genes. Thus, it is probable that UGT1A downregulation is more a consequence of cell dedifferentiation during cancer progression, due to the loss of the transcriptional program, rather than a selective loss of function. This hypothesis agrees with the high correlation of expression of both genes in normal tissues (**Figure 2G**), which is uncoupled in cancer tissues (**Figure 2H**). This hypothesis is further supported by Delmas & al. who showed that daily resveratrol treatment failed to impact subcutaneous tumor growth of a well-differentiated colorectal rat tumor cell line while a growth delay was observed on a human undifferentiated CRC cell line-derived tumor [54]. It would be very interesting to assess *UGT1A* expression in both CRC tumor cell lines. Further exploration is needed, especially regarding tumor response to treatments that are metabolized by UGT1As. Indeed, UGTs may be involved in the intrinsic drug resistance in CRC. Resistance to irinotecan-derived SN38 metabolized by UGT1A1/UGT1A6 and ganetespib

conjugated by UGT1A1 [39] might be more active with inhibition of UGTs [55]. This agrees with the resistance to resveratrol reversion by *UGT1A* downregulation in HT29 and NCM460 cells observed in the present study. Thus, CRC tumor *UGT1A* expression profiling could be predictive of intrinsic resveratrol sensitivity. In this context, undifferentiated *UGT1A*-negative aggressive CRC tumors could be preferred resveratrol targets. Moreover, as resveratrol could compete with other drugs for UGT1A metabolism [55,56], it could participate to enhance the efficiency of antineoplastic therapeutics, by competing for inactivation. The treatment combining resveratrol with for example irinotecan may lead to improved CRC chemotherapy response. UGT enzymes are activated by phosphorylation, mainly performed by the protein kinase C (PKC) [57,58]. Thus, combining resveratrol with PKC inhibitors, such as curcumin, another well-studied polyphenol, could potentially enhance the resveratrol CRC anti-tumor effect by decreasing its metabolism.

Our study aimed at understanding the differences in resveratrol responses between non-tumor and tumor cells. Besides the impaired capacity to metabolize the compound, tumor cells displayed a profound decrease in all the tested monophosphate and triphosphate pyrimidine nucleotide contents after resveratrol treatment, while these contents were unchanged in non-tumor cells. We further found that this drop affected tumor cell transcription and translation, probably in close relation with the cytotoxic effect of resveratrol. We did not have access to deoxyribonucleotides values. It is possible that they were depleted too as resveratrol is known to inhibit ribonucleotide reductase [59] and to induce replicative stress [60], leading to dNTP pool decrease and cell accumulation in the S phase [61]. Very few studies have focused on resveratrol's impact on NTP metabolism [62], especially in cancer tissues [63], even if indirect pyrimidine synthesis negative imbalance could be achieved through mTORC inhibition and AMPK activation [42–44]. A recent *in silico* docking analysis describes resveratrol as a potential inhibitor of multiple enzymes involved in nucleotide metabolism, especially RNA polymerases [64]. Thus, resveratrol-induced downregulation of pyrimidine nucleotides may not be the unique cause of the observed cancer cell transduction rate inhibition. The disruption of pyrimidine nucleotide balance could impact the translation in tumor cells. The mTOR pathway is a key activator of translation [65] with oncogenic mutations leading to increased translation rates [66,67]. Resveratrol has been

widely described as an inhibitor of the Akt pathway and a direct inhibitor of mTOR [42,68], especially in CRC tumor cells [44]. In addition to the modulation of translation activators, the transcription rate inhibition could enhance translation decrease in HCT116 cells. It is well demonstrated that resveratrol does interfere with the activities of multiple cellular pathways and alters the behavior of many proteins. In this context, the “one-drug-one-target” concept does not apply. However, resveratrol affects the overall homeostasis of tumor cells in multiple ways and many of which are yet to be elucidated. Our current understanding of resveratrol’s differential impact on tumor and non-tumor intestinal cells is schematically represented in **Figure 6**.

In conclusion, we understand for the first time that systemic colorectal tumor-specific cytotoxicity of resveratrol is directly linked to cell glucuronidation capacity. This strengthens its prospects for use in CRC as a conventional treatment sensitizer agent. From a broader perspective, as for resveratrol, UGT enzymes play a key role in the tumor response to numerous antineoplastic drugs. Thus, tumor UGT expression profiling represents a potential predictive marker for drug sensitivity assessment and *UGT1A* expression modulation could represent a promising therapeutic strategy.

Bibliography

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* 2021 ; 71 : 209–249.
2. Colorectal cancer London : National Institute for Health and Care Excellence (NICE), 2021 : p.
3. Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA, *et al.* Colorectal cancer. *The Lancet* 2019 ; 394 : 1467–1480.
4. Schellenberg AE, Moravan V, Christian F. A competing risk analysis of colorectal cancer recurrence after curative surgery. *BMC Gastroenterol.* 2022 ; 22 : 95.
5. Wan J, Zhu J, Li G, *et al.* Radiosensitization of Human Colorectal Cancer Cells by MLN4924: An Inhibitor of NEDD8-Activating Enzyme. *Technol. Cancer Res. Treat.* 2016 ; 15 : 527–534.
6. Xiao B, Viennois E, Chen Q, *et al.* Silencing of Intestinal Glycoprotein CD98 by Orally Targeted Nanoparticles Enhances Chemosensitization of Colon Cancer. *ACS Nano* 2018 ; 12 : 5253–5265.
7. Habiba K, Aziz K, Sanders K, *et al.* Enhancing Colorectal Cancer Radiation Therapy Efficacy using Silver Nanoprisms Decorated with Graphene as Radiosensitizers. *Sci. Rep.* 2019 ; 9 : 17120.
8. Amintas S, Dupin C, Boutin J, *et al.* Bioactive food components for colorectal cancer prevention and treatment: A good match. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2022 ; 0 : 1–15.
9. Hasler CM, Brown AC, American Dietetic Association. Position of the American Dietetic Association: functional foods. *J. Am. Diet. Assoc.* 2009 ; 109 : 735–746.
10. Buhmann C, Shayan P, Kraeche P, *et al.* Resveratrol induces chemosensitization to 5-fluorouracil through up-regulation of intercellular junctions, Epithelial-to-mesenchymal transition and apoptosis in colorectal cancer. *Biochem. Pharmacol.* 2015 ; 98 : 51–68.
11. Khaleel SA, Al-Abd AM, Ali AA, *et al.* Didox and resveratrol sensitize colorectal cancer cells to doxorubicin via activating apoptosis and ameliorating P-glycoprotein activity. *Sci. Rep.* 2016 ; 6 : 36855.
12. Blanquer-Rosselló MDM, Hernández-López R, Roca P, *et al.* Resveratrol induces mitochondrial respiration and apoptosis in SW620 colon cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 2017 ; 1861 : 431–440.
13. Lin C, Yu Y, Zhao H-G, *et al.* Combination of quercetin with radiotherapy enhances tumor radiosensitivity in vitro and in vivo. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* 2012 ; 104 : 395–400.
14. Vendrely V, Peuchant E, Buscail E, *et al.* Resveratrol and capsaicin used together as food complements reduce tumor growth and rescue full efficiency of low dose gemcitabine in a pancreatic cancer model. *Cancer Lett.* 2017 ; 390 : 91–102.
15. Vendrely V, Amintas S, Noel C, *et al.* Combination treatment of resveratrol and capsaicin radiosensitizes pancreatic tumor cells by unbalancing DNA repair response to radiotherapy towards cell death. *Cancer Lett.* 2019 ; 451 : 1–10.
16. Cocetta V, Quagliariello V, Fiorica F, *et al.* Resveratrol as Chemosensitizer Agent: State of Art and

Future Perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* 2021 ; 22 : 2049.

17. Farghadani R, Naidu R. Curcumin as an Enhancer of Therapeutic Efficiency of Chemotherapy Drugs in Breast Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2022 ; 23 : 2144.
18. Delmas D, Aires V, Limagne E, *et al.* Transport, stability, and biological activity of resveratrol. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2011 ; 1215 : 48–59.
19. Aires V, Delmas D. Common pathways in health benefit properties of RSV in cardiovascular diseases, cancers and degenerative pathologies. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2015 ; 16 : 219–244.
20. Rauf A, Imran M, Butt MS, *et al.* Resveratrol as an anti-cancer agent: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2018 ; 58 : 1428–1447.
21. Gran ER, Lotocki V, Zhang Q, *et al.* Human astrocytes and astrocytoma respond differently to resveratrol. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 2021 ; 102441.
22. Madreiter-Sokolowski CT, Gottschalk B, Parichatikanond W, *et al.* Resveratrol Specifically Kills Cancer Cells by a Devastating Increase in the Ca²⁺ Coupling Between the Greatly Tethered Endoplasmic Reticulum and Mitochondria. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 2016 ; 39 : 1404–1420.
23. Calabrese EJ, Mattson MP, Calabrese V. Resveratrol commonly displays hormesis: Occurrence and biomedical significance. *Hum. Exp. Toxicol.* 2010 ; 29 : 980–1015.
24. Wätjen W, Michels G, Steffan B, *et al.* Low concentrations of flavonoids are protective in rat H4IIE cells whereas high concentrations cause DNA damage and apoptosis. *J. Nutr.* 2005 ; 135 : 525–531.
25. Bao Y, Wang W, Zhou Z, *et al.* Benefits and Risks of the Hormetic Effects of Dietary Isothiocyanates on Cancer Prevention. *PLOS ONE* 2014 ; 9 : e114764.
26. Lo YM, Chan LY, Chan AT, *et al.* Quantitative and temporal correlation between circulating cell-free Epstein-Barr virus DNA and tumor recurrence in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res.* 1999 ; 59 : 5452–5455.
27. Cunningham F, Allen JE, Allen J, *et al.* Ensembl 2022. *Nucleic Acids Res.* 2022 ; 50 : D988–D995.
28. Patel MS, Nemeria NS, Furey W, *et al.* The pyruvate dehydrogenase complexes: structure-based function and regulation. *J. Biol. Chem.* 2014 ; 289 : 16615–16623.
29. Ceballos-Picot I, Le Dantec A, Brassier A, *et al.* New biomarkers for early diagnosis of Lesch-Nyhan disease revealed by metabolic analysis on a large cohort of patients. *Orphanet J. Rare Dis.* 2015 ; 10 : 7.
30. Atkinson DE, Walton GM. Adenosine Triphosphate Conservation in Metabolic Regulation: RAT LIVER CITRATE CLEAVAGE ENZYME. *J. Biol. Chem.* 1967 ; 242 : 3239–3241.
31. Anders S, Huber W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol.* 2010 ; 11 : R106.
32. Wenzel E, Somoza V. Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol. *Mol. Nutr. Food Res.* 2005 ; 49 : 472–81.
33. Meech R, Hu DG, McKinnon RA, *et al.* The UDP-Glycosyltransferase (UGT) Superfamily: New Members, New Functions, and Novel Paradigms. *Physiol. Rev.* 2019 ; 99 : 1153–1222.

34. Kanth P, Bronner MP, Boucher KM, *et al.* Gene Signature in Sessile Serrated Polyps Identifies Colon Cancer Subtype. *Cancer Prev. Res. Phila. Pa* 2016 ; 9 : 456–465.
35. Kim S-K, Kim S-Y, Kim J-H, *et al.* A nineteen gene-based risk score classifier predicts prognosis of colorectal cancer patients. *Mol. Oncol.* 2014 ; 8 : 1653–1666.
36. Bélanger A-S, Tojcic J, Harvey M, *et al.* Regulation of UGT1A1 and HNF1 transcription factor gene expression by DNA methylation in colon cancer cells. *BMC Mol. Biol.* 2010 ; 11 : 9.
37. Hu DG, Meech R, McKinnon RA, *et al.* Transcriptional regulation of human UDP-glucuronosyltransferase genes. *Drug Metab. Rev.* 2014 ; 46 : 421–458.
38. Pehlivan S, Artac M, Sever T, *et al.* Gene methylation of SFRP2, P16, DAPK1, HIC1, and MGMT and KRAS mutations in sporadic colorectal cancer. *Cancer Genet. Cytogenet.* 2010 ; 201 : 128–132.
39. Landmann H, Proia DA, He S, *et al.* UDP glucuronosyltransferase 1A expression levels determine the response of colorectal cancer cells to the heat shock protein 90 inhibitor ganetespib. *Cell Death Dis.* 2014 ; 5 : e1411.
40. Iwuchukwu OF, Nagar S. Resveratrol (trans-resveratrol, 3,5,4'-trihydroxy-trans-stilbene) glucuronidation exhibits atypical enzyme kinetics in various protein sources. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 2008 ; 36 : 322–330.
41. Nucleotide imbalance decouples cell growth from cell proliferation | bioRxiv n.d. ;.
42. Liu M, Wilk SA, Wang A, *et al.* Resveratrol inhibits mTOR signaling by promoting the interaction between mTOR and DEPTOR. *J. Biol. Chem.* 2010 ; 285 : 36387–36394.
43. Lin J-N, Lin VC-H, Rau K-M, *et al.* Resveratrol Modulates Tumor Cell Proliferation and Protein Translation via SIRT1-Dependent AMPK Activation. *J. Agric. Food Chem.* 2010 ; 58 : 1584–1592.
44. Park D, Jeong H, Lee MN, *et al.* Resveratrol induces autophagy by directly inhibiting mTOR through ATP competition. *Sci. Rep.* 2016 ; 6 : 21772.
45. Huang M, Ji Y, Itahana K, *et al.* Guanine nucleotide depletion inhibits pre-ribosomal RNA synthesis and causes nucleolar disruption. *Leuk. Res.* 2008 ; 32 : 131–141.
46. Lafita-Navarro MC, Venkateswaran N, Kilgore JA, *et al.* Inhibition of the de novo pyrimidine biosynthesis pathway limits ribosomal RNA transcription causing nucleolar stress in glioblastoma cells. *PLoS Genet.* 2020 ; 16 : e1009117.
47. Slobodin B, Han R, Calderone V, *et al.* Transcription Impacts the Efficiency of mRNA Translation via Co-transcriptional N6-adenosine Methylation. *Cell* 2017 ; 169 : 326-337.e12.
48. Marier J-F, Vachon P, Gritsas A, *et al.* Metabolism and disposition of resveratrol in rats: extent of absorption, glucuronidation, and enterohepatic recirculation evidenced by a linked-rat model. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2002 ; 302 : 369–373.
49. Kai K, Nagano O, Sugihara E, *et al.* Maintenance of HCT116 colon cancer cell line conforms to a stochastic model but not a cancer stem cell model. *Cancer Sci.* 2009 ; 100 : 2275–2282.
50. Berg KCG, Eide PW, Eilertsen IA, *et al.* Multi-omics of 34 colorectal cancer cell lines - a resource for biomedical studies. *Mol. Cancer* 2017 ; 16 : 116.

51. Strassburg CP, Manns MP, Tukey RH. Differential down-regulation of the UDP-glucuronosyltransferase 1A locus is an early event in human liver and biliary cancer. *Cancer Res.* 1997 ; 57 : 2979–2985.
52. Giuliani L, Ciotti M, Stoppacciaro A, *et al.* UDP-glucuronosyltransferases 1A expression in human urinary bladder and colon cancer by immunohistochemistry. *Oncol. Rep.* 2005 ; 13 : 185–191.
53. Yasar U, Greenblatt DJ, Guillemette C, *et al.* Evidence for regulation of UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A1 protein expression and activity via DNA methylation in healthy human livers. *J. Pharm. Pharmacol.* 2013 ; 65 : 874–883.
54. Colin DJ, Limagne E, Ragot K, *et al.* The role of reactive oxygen species and subsequent DNA-damage response in the emergence of resistance towards resveratrol in colon cancer models. *Cell Death Dis.* 2014 ; 5 : e1533.
55. Cummings J, Ethell BT, Jardine L, *et al.* Glucuronidation as a mechanism of intrinsic drug resistance in human colon cancer: reversal of resistance by food additives. *Cancer Res.* 2003 ; 63 : 8443–8450.
56. Brill SS, Furimsky AM, Ho MN, *et al.* Glucuronidation of trans-resveratrol by human liver and intestinal microsomes and UGT isoforms. *J. Pharm. Pharmacol.* 2006 ; 58 : 469–479.
57. Basu NK, Kole L, Owens IS. Evidence for phosphorylation requirement for human bilirubin UDP-glucuronosyltransferase (UGT1A1) activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003 ; 303 : 98–104.
58. Volak LP, Court MH. Role for protein kinase C delta in the functional activity of human UGT1A6: implications for drug-drug interactions between PKC inhibitors and UGT1A6. *Xenobiotica Fate Foreign Compd. Biol. Syst.* 2010 ; 40 : 306–318.
59. Fontecave M, Lepoivre M, Elleingand E, *et al.* Resveratrol, a remarkable inhibitor of ribonucleotide reductase. *FEBS Lett.* 1998 ; 421 : 277–279.
60. Benslimane Y, Bertomeu T, Coulombe-Huntington J, *et al.* Genome-Wide Screens Reveal that Resveratrol Induces Replicative Stress in Human Cells. *Mol. Cell* 2020 ; 79 : 846-856.e8.
61. Delmas D, Solary E, Latruffe N. Resveratrol, a Phytochemical Inducer of Multiple Cell Death Pathways: Apoptosis, Autophagy and Mitotic Catastrophe. *Curr. Med. Chem.* n.d. ; 18 : 1100–1121.
62. Schmatz R, Schetinger MRC, Spanevello RM, *et al.* Effects of resveratrol on nucleotide degrading enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci.* 2009 ; 84 : 345–350.
63. Li Z, Chen Q-Q, Lam CWK, *et al.* Investigation into perturbed nucleoside metabolism and cell cycle for elucidating the cytotoxicity effect of resveratrol on human lung adenocarcinoma epithelial cells. *Chin. J. Nat. Med.* 2019 ; 17 : 608–615.
64. Wu Y, Hsieh T-C, Wu JM, *et al.* Elucidating the Inhibitory Effect of Resveratrol and Its Structural Analogs on Selected Nucleotide-Related Enzymes. *Biomolecules* 2020 ; 10 : E1223.
65. Nandagopal N, Roux PP. Regulation of global and specific mRNA translation by the mTOR signaling pathway. *Translation* 2015 ; 3 : e983402.
66. Averous J, Proud CG. When translation meets transformation: the mTOR story. *Oncogene* 2006 ; 25 : 6423–6435.

67. Hsieh AC, Truitt ML, Ruggero D. Oncogenic AKTivation of translation as a therapeutic target. *Br. J. Cancer* 2011 ; 105 : 329–336.
68. Jiang H, Shang X, Wu H, *et al.* Resveratrol downregulates PI3K/Akt/mTOR signaling pathways in human U251 glioma cells. *J. Exp. Ther. Oncol.* 2009 ; 8 : 25–33.

Table 1 – Human RT-qPCR primers

<i>UGT1A1-human-forward</i>	<i>CATGCTGGGAAGATACTGTTGA</i>
<i>UGT1A1-human-reverse</i>	<i>CGCATGATGTTCTCCTTGTA ACTT</i>
<i>UGT1A6-human-forward</i>	<i>TTTGGGGCATGGTTGTAGGT</i>
<i>UGT1A6-human-reverse</i>	<i>CGCATGATGTTCTCCTTGTA ACTT</i>
<i>UGT1A8-human-forward</i>	<i>GGTCTTCGCCAGGGGAATAGG</i>
<i>UGT1A8-human-reverse</i>	<i>GTTTCGCAAGATTGATGGTC</i>
<i>UGT1A9-human-forward</i>	<i>CCACTGGTTCACCATGAGGT</i>
<i>UGT1A9-human-reverse</i>	<i>CGCATGATGTTCTCCTTGTA ACTT</i>
<i>UGT1A10-human-forward</i>	<i>CCTCTTTCCTATGTCCCAATGA</i>
<i>UGT1A10-human-reverse</i>	<i>CCTTAGTCTCCATGCGCTTTCG</i>
<i>GUSB-human-forward</i>	<i>AGTGGTGCGTAGGGACAAGAA</i>
<i>GUSB-human-reverse</i>	<i>TGAGCGATCACCATCTTCAAGT</i>
<i>GAPDH-human-forward</i>	<i>GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG</i>
<i>GAPDH-human-reverse</i>	<i>ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA</i>

Table 2 – Mouse RT-qPCR primers

<i>UGT1A1-mouse-forward</i>	<i>CCAGCAGAAGGGGCACGAAGTTG</i>
<i>UGT1A1-mouse-reverse</i>	<i>TGACCACGCGCAGCAGAAAAGAAT</i>
<i>UGT1A2-mouse-forward</i>	<i>TGCCCCCTCGAGGAATCTCAGG</i>
<i>UGT1A2-mouse-reverse</i>	<i>CTCCCGCACAAACATCCCTCATG</i>
<i>UGT1A6-mouse-forward</i>	<i>CTGGCTGATGGTGGCTGACTG</i>
<i>UGT1A6-mouse-reverse</i>	<i>ACTGAGGCCCAAAGCACTAGGAA</i>
<i>UGT1A9-mouse-forward</i>	<i>CAGAGGGCATGAGGTTGTGGTA</i>
<i>UGT1A9-mouse-reverse</i>	<i>TCCTGCAGTGTGAAAATGTTAGTT</i>
<i>UGT1A10-mouse-forward</i>	<i>AACTGTCTCCAGGGGAAGCC</i>
<i>UGT1A10-mouse-reverse</i>	<i>TTCGATGGTCTAGTTCCGGTG</i>
<i>GUSB-mouse-forward</i>	<i>ATTGGCTGGGTGTGGTATGAA</i>
<i>GUSB-mouse-reverse</i>	<i>GGACCAGCTTGCTAATGTCAG</i>
<i>GAPDH-mouse-forward</i>	<i>CATCACTGCCACCCAGAAGACTG</i>
<i>GAPDH-mouse-reverse</i>	<i>ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTTCAG</i>

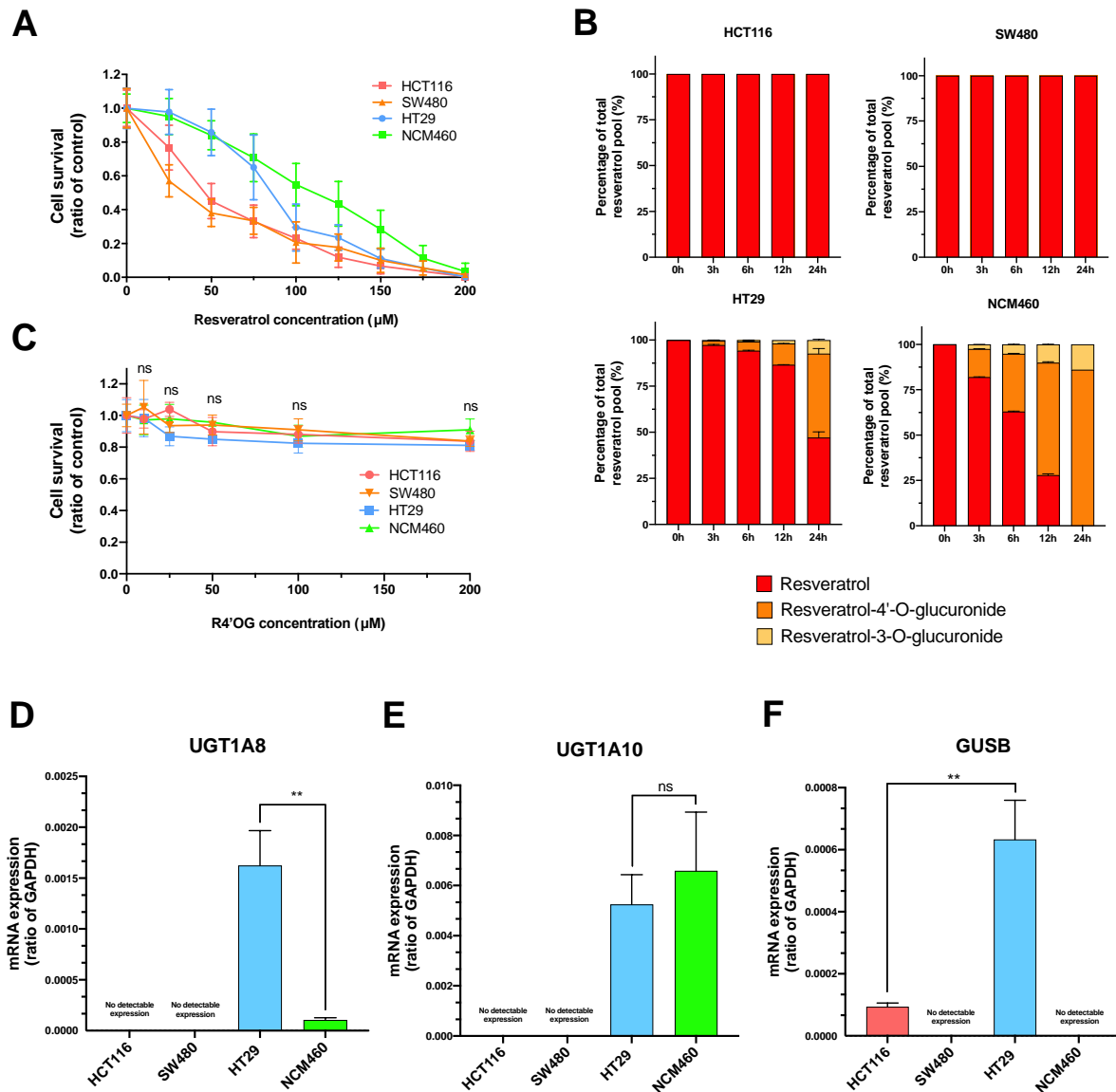


Figure 1: Human tumor and non-tumor colorectal cell lines resveratrol sensitivity is related to metabolization capacity and expression of UGT1A enzymes genes. Dose-response experiments were carried out for resveratrol (A) and resveratrol-4'-O-glucuronide (C), by treatment human colorectal cancer cell lines (HCT116, SW480, HT29). Transformed NCM460 human intestinal cell line was used as healthy human non-tumor cells. Resveratrol and its glucuronide derivatives resveratrol-4'-O-glucuronide and resveratrol-3-O-glucuronide were quantified in cell culture media after 0, 3, 6, 12 and 24 h incubation with the different cell lines (B). Expression of *UGT1A8* (D), *UGT1A10* (E) and *GUSB* (F) transcripts were assessed in the different cell lines by RT-qPCR, using *GAPDH* transcripts as a normalization reference. Results are expressed with mean \pm SD. **: $p < 0.01$; ns: non-significant.

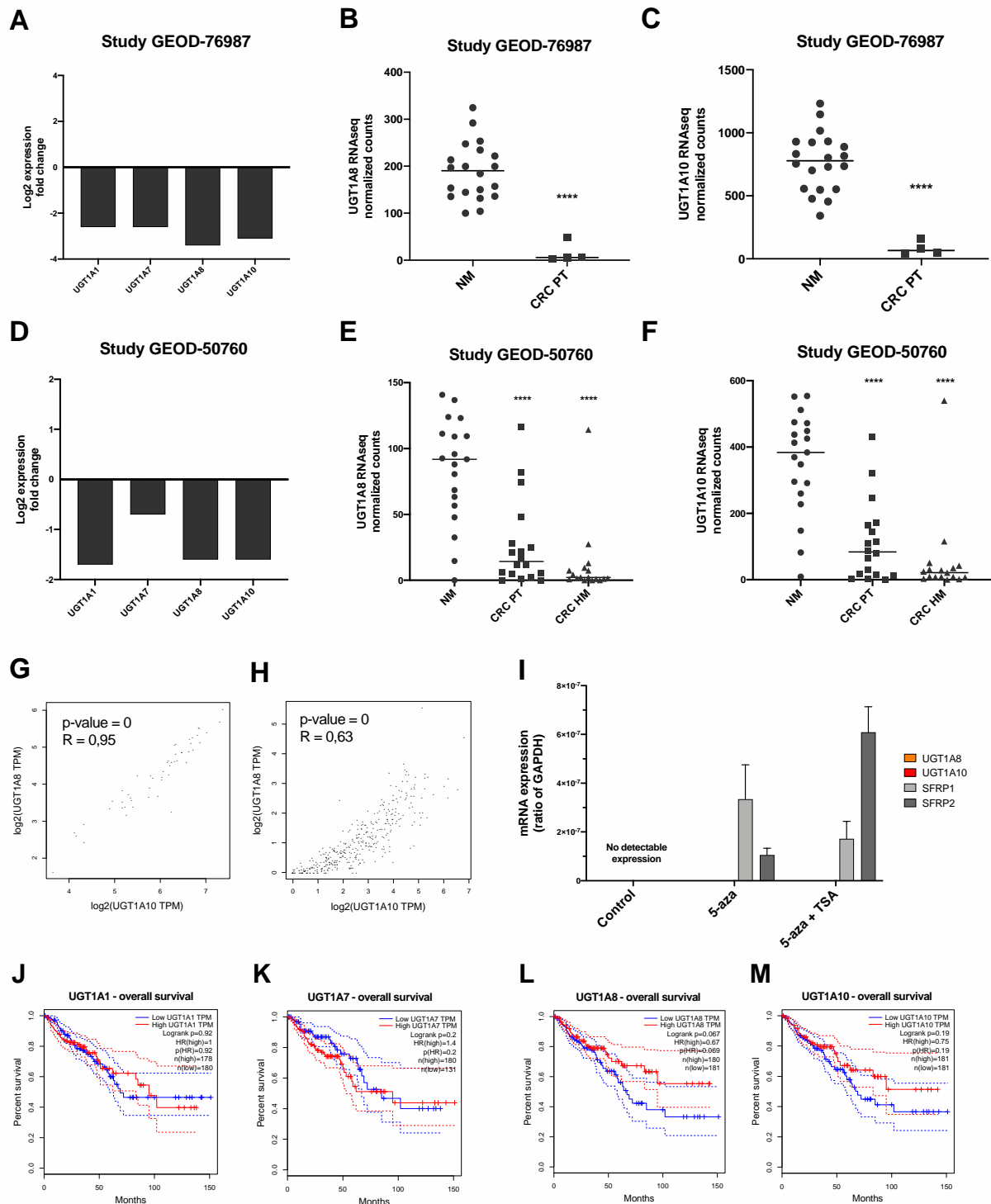


Figure 2: *UGT1A8* and *UGT1A10* are downregulated in colorectal tumor tissues. Log2 fold change of *UGT1A1/A7/A8/A10* expression between colorectal tumor and healthy digestive tissues in GEOD-76987 (A) and GEOD-50760 (D) datasets. RNAseq normalized counts for *UGT1A8* (B) and *UGT1A10* (C) in normal colorectal mucosa and primary colorectal tumor of the GEOD-50760 dataset. RNAseq normalized counts for *UGT1A8* (E) and *UGT1A10* (F) in normal colorectal mucosa, primary colorectal tumor and hepatic metastases of the GEOD-50760 dataset. Pearson correlation analysis between *UGT1A8* and *UGT1A10* expressions in healthy colorectal tissues (G) and colorectal cancers (H). Expression of *UGT1A8*, *UGT1A10*, *SFRP1* and *SFRP2* genes in HCT116 cells after demethylation treatment with 5-azacytidine and trichostatin A (I). Overall survival of the COAD (colorectal

cancer) and the READ (rectal cancer) TCGA databases patients, depending on the tumor expression of *UGT1A1* (J), *UGT1A7* (K), *UGT1A8* (L) and *UGT1A10* (M). Results are expressed with mean +/- SD. **** : $p < 0.0001$.

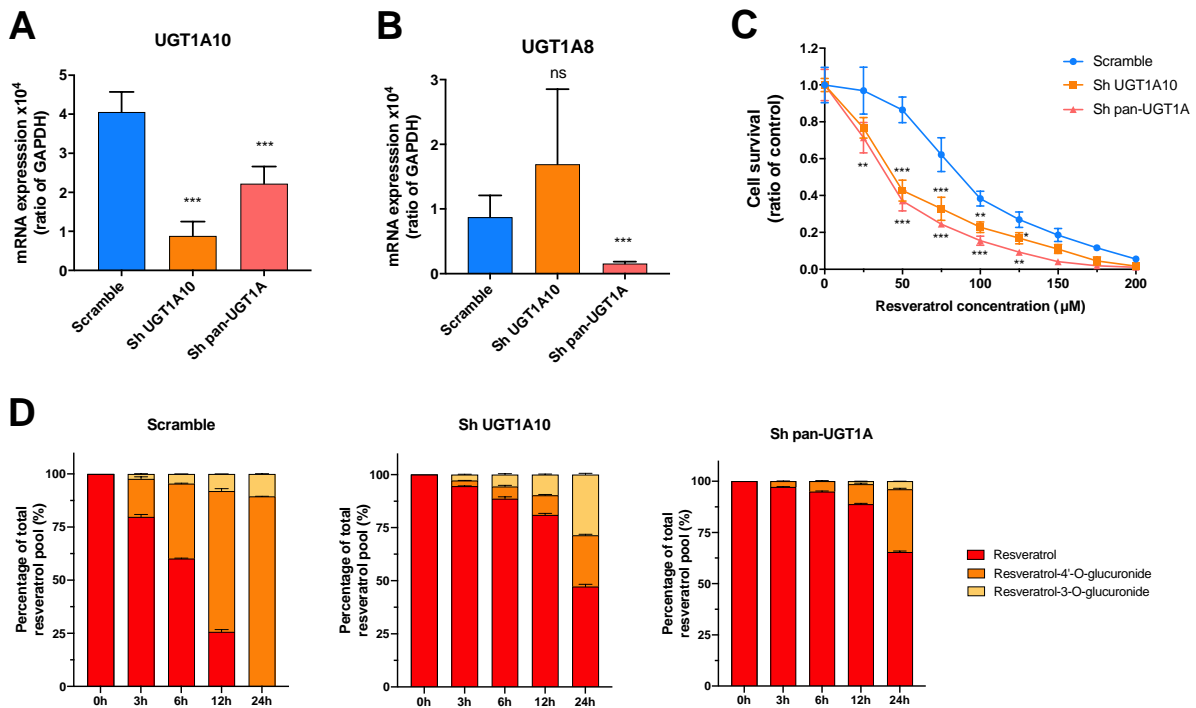


Figure 3: Downregulation of *UGT1A* gene expression impacts colorectal cell lines resveratrol metabolism capacities and sensitivity. Expression of the *UGT1A8* (A) and *UGT1A10* (B) genes was assessed in different shRNA transduced HT29 cells by RT-qPCR, using *GAPDH* transcripts for normalization. Resveratrol dose-response experiments were carried out after shRNA transductions in HT29 cells (C). Resveratrol and its glucuronide derivatives resveratrol-4'-O-glucuronide and resveratrol-3-O-glucuronide were quantified in cell culture media after 0, 3, 6, 12 and 24 h incubation with the different shRNA-transduced HT29 cells (D). Results are expressed with mean +/- SD. *** : $p < 0.001$; **** : $p < 0.0001$; ns : non-significant.

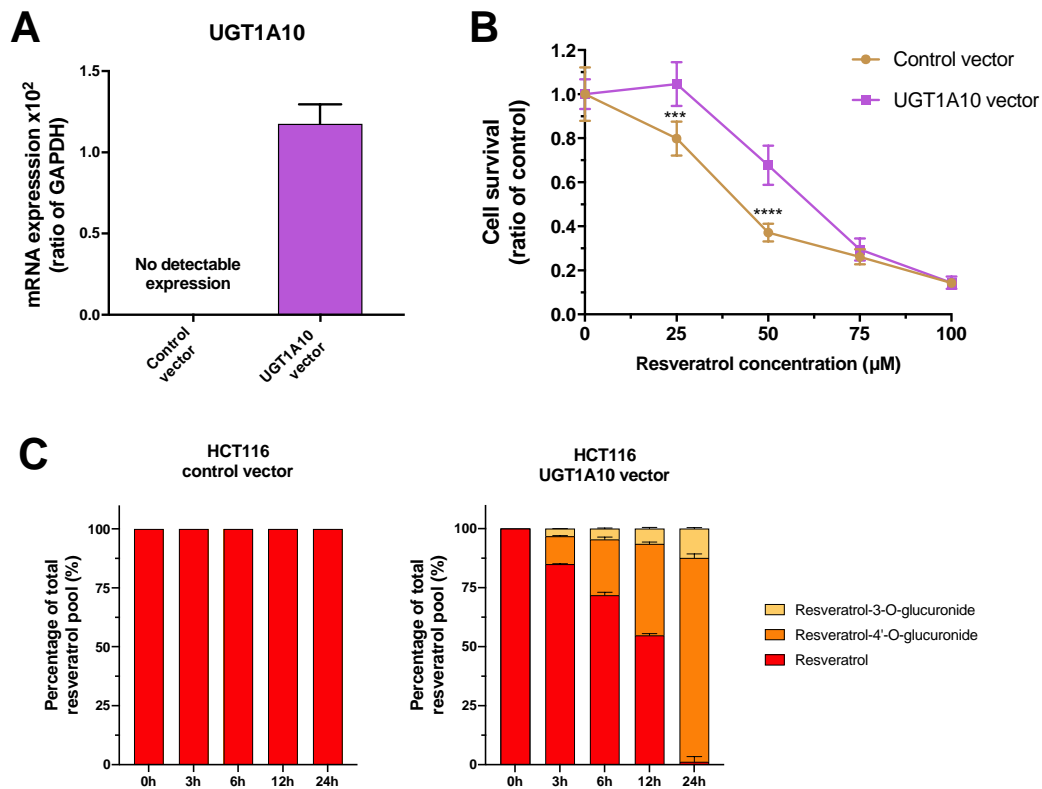


Figure 4: Uptregulation of UGT1A gene expression impacts colorectal cell line sensitivity to resveratrol and resveratrol metabolism. Expression of *UGT1A10* was assessed in HCT116 cells transduced with *UGT1A10* expression vector and control vector by RT-qPCR, using *GAPDH* transcripts for normalization (A). Resveratrol dose-response experiments were carried out after transductions of HCT116 cells with *UGT1A10* expression and control vectors (B). Resveratrol and its glucuronide derivatives resveratrol-4'-O-glucuronide and resveratrol-3-O-glucuronide were quantified in cell culture media after 0, 3, 6, 12 and 24 h incubation with HCT116 cells transduced with *UGT1A10* expression vector and control vector (C). Results are expressed with mean \pm SD. ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$; **** : $p < 0.0001$.

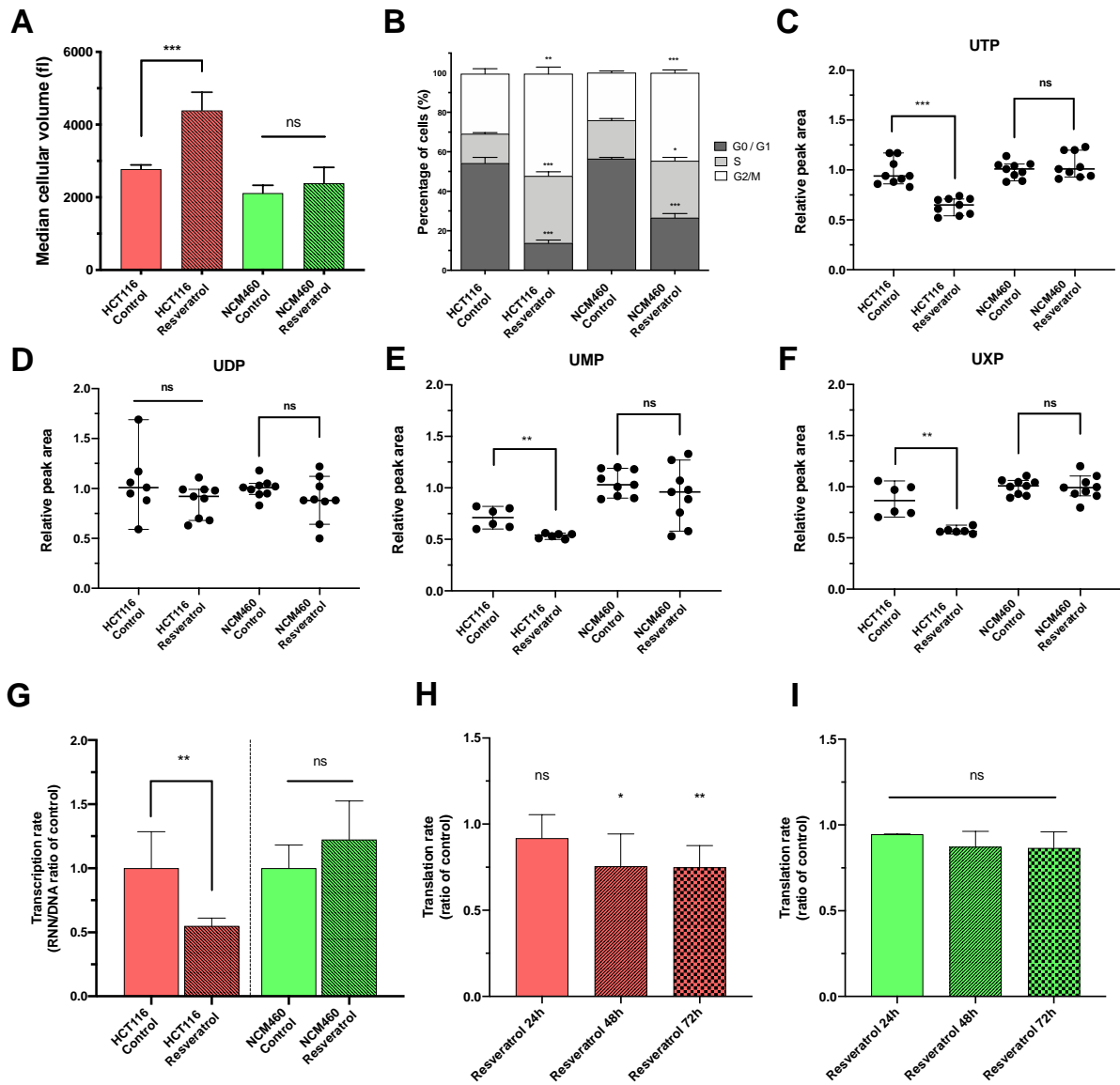


Figure 5: Resveratrol differentially impacts tumor and non-tumor cell homeostasis. Cell-volume change of HCT116 and NCM460 cells after 24 h of 50 μ M resveratrol exposure (A). Cell-cycle analysis of HCT116 and NCM460 cells after 24 h of 50 μ M resveratrol exposure (B). Relative content (untreated NCM460 value was used as the reference) for UTP (C), UDP (D), UMP (E) and UXP (F) nucleotides in HCT116 and NCM460 cells after 24 h 50 μ M resveratrol exposure. RNA/DNA ratio of HCT116 and NCM460 cells after 24 h 50 μ M resveratrol exposure (G). Results are expressed as ratio of untreated cells for each cell line. Translation rate of HCT116 (I) and NCM460 (J) cells after 24 h, 48 h and 72 h of 50 μ M resveratrol exposure assessed by total-protein puromycin incorporation western-blot. Results are expressed with mean \pm SD. * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$; ns : non-significant.

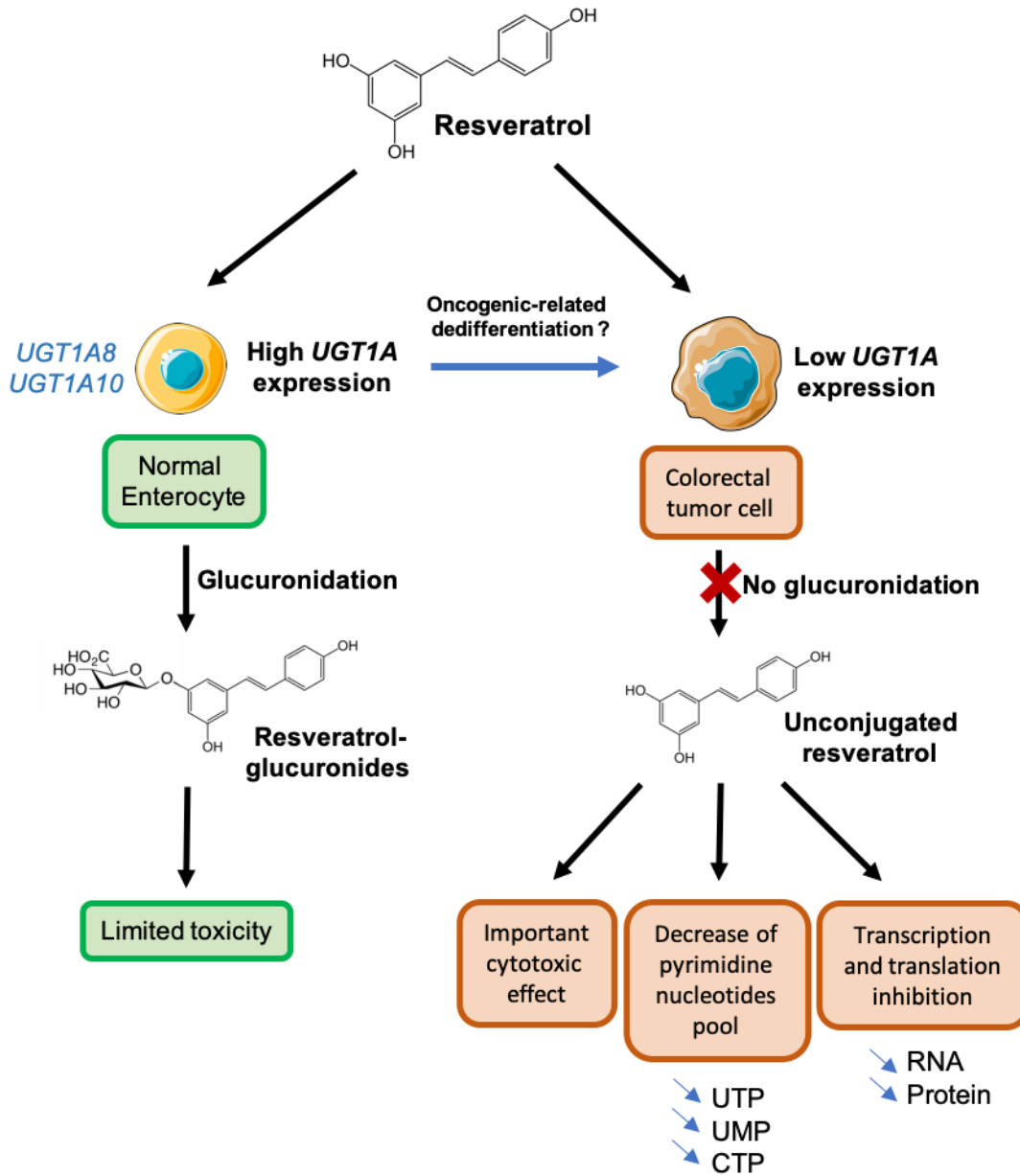
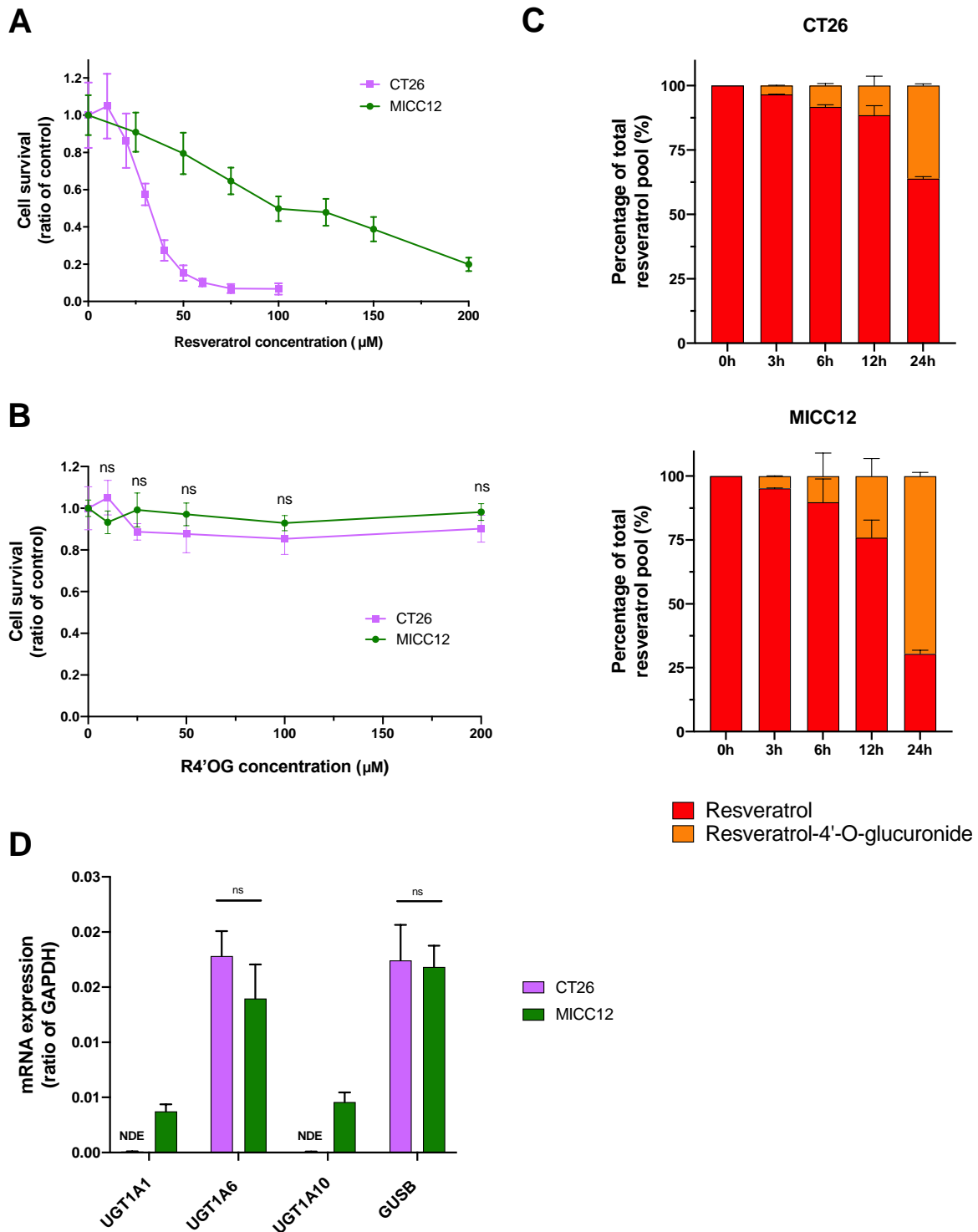
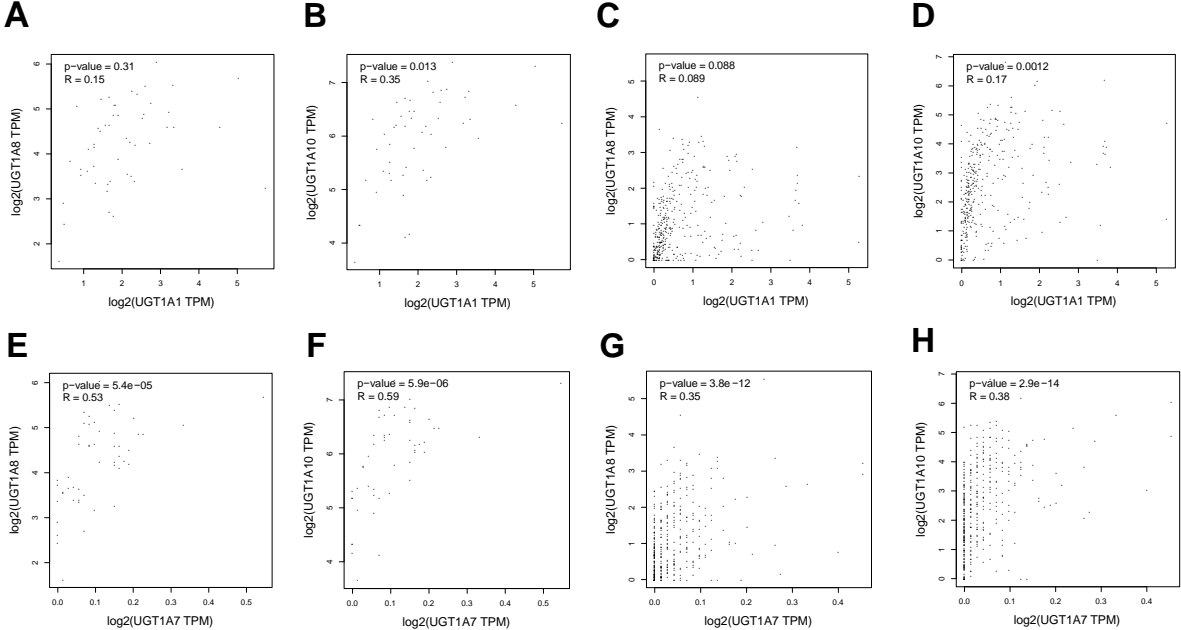


Figure 6: Working hypothesis of resveratrol differential impact on intestinal tumor and non-tumor cells. Non-tumor cells intestinal cells are harnessed with detoxification enzymes, leading to xenobiotics conjugation to soluble forms promoting their inactivation and elimination. UGT1A-depleted dedifferentiated tumor cells lose their detoxification ability and become vulnerable to xenobiotics. Resveratrol then unbalances pyrimidine nucleotides leading to a global reduction in RNA and protein synthesis.

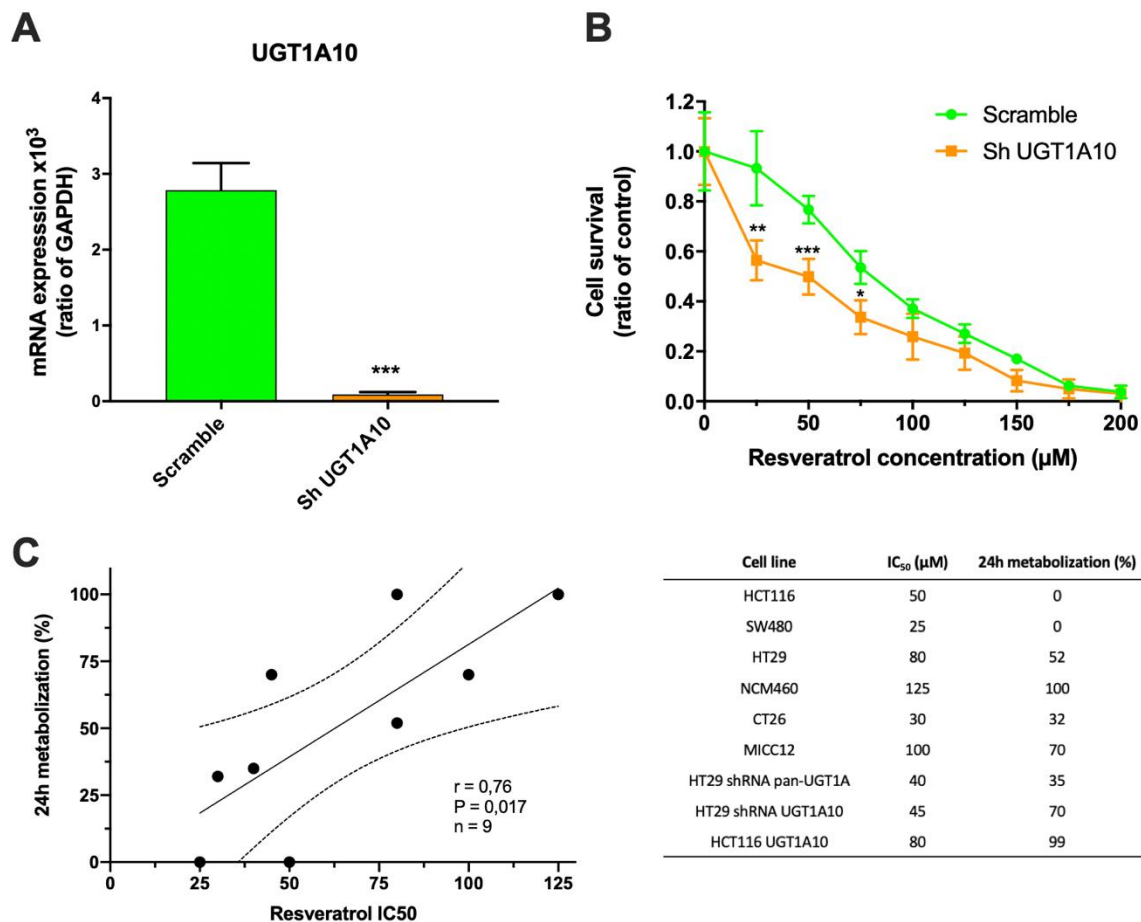


Supplemental figure 1: Mice tumor and non-tumor colorectal cell lines resveratrol sensitivity is related to metabolism capacity and expression of *UGT1A* enzymes genes. Dose-response experiments were carried out for resveratrol (A) and resveratrol-4'-O-glucuronide (B), by treatment of mice colorectal cancer cell line CT26. Transformed MICC12 mice intestinal cell line was used as healthy non-tumor cells. Resveratrol and its glucuronide derivatives resveratrol-4'-O-glucuronide were quantified in cell culture media after 0, 3, 6, 12 and 24 h incubation with the different cell lines (C). Expression of *UGT1A1*, *UGT1A6*, *UGT1A10* and *GUSB* (D) genes were assessed in the different cell lines by RT-qPCR, using GAPDH gene as a

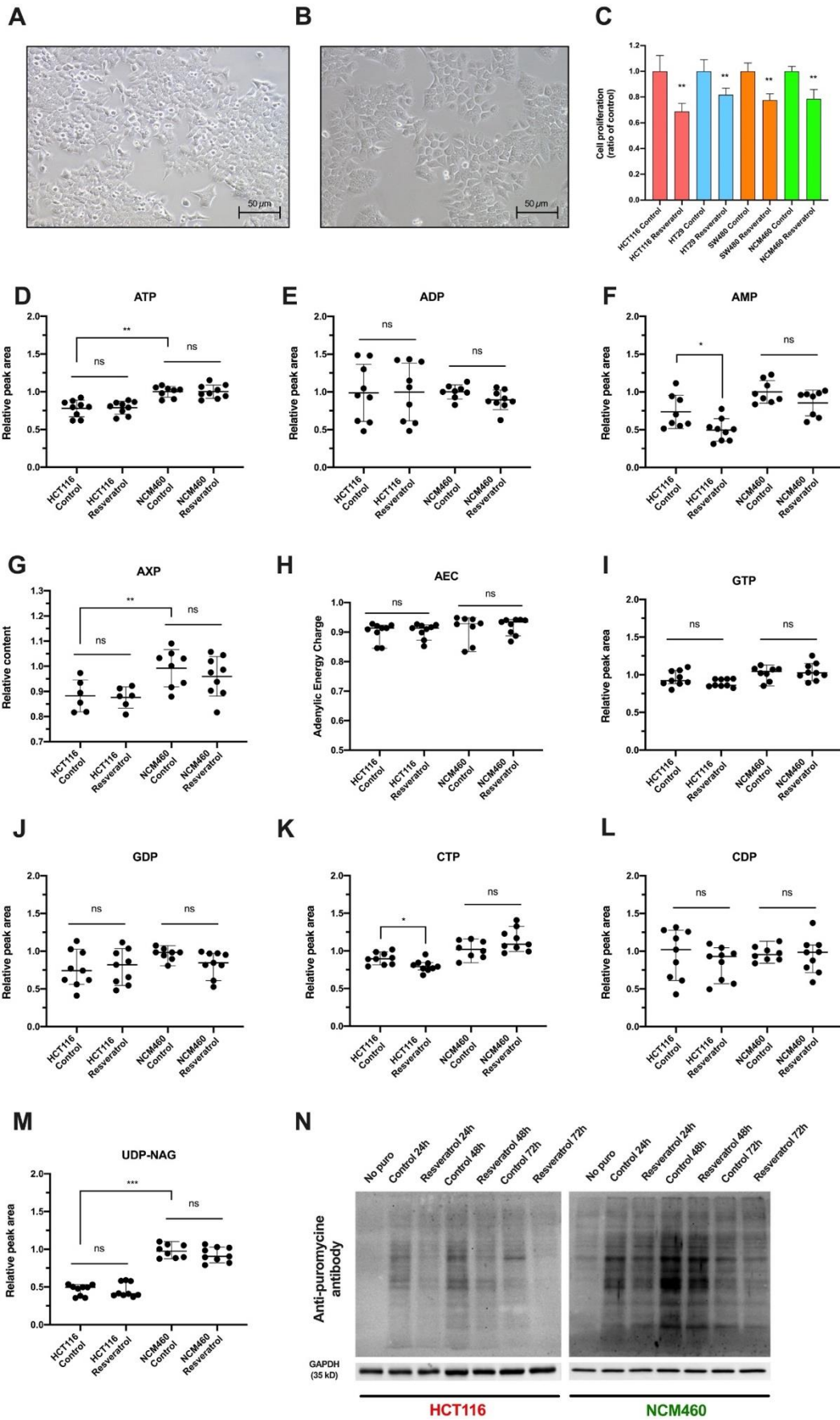
reference for normalization. Results are expressed with mean +/- SD. **: p<0.01 ; ns : non-significant. NDE: Non-detectable expression.



Supplemental figure 2: Pearson correlation analysis between *UGT1A1* and *UGT1A8* (A) or *UGT1A10* (B) expressions in healthy colorectal tissues. Pearson correlation analysis between *UGT1A1* and *UGT1A8* (C) or *UGT1A10* (D) expressions in colorectal cancers. Pearson correlation analysis between *UGT1A7* and *UGT1A8* (E) or *UGT1A10* (F) expressions in healthy colorectal tissues. Pearson correlation analysis between *UGT1A7* and *UGT1A8* (G) or *UGT1A10* (H) expressions in colorectal cancers.



Supplemental figure 3: Expression of UGT1A10 gene was assessed in shRNA scramble and UGT1A10 transduced NCM460 cells by RT-qPCR, using *GAPDH* gene as a reference for normalization (A). Dose-response experiments were carried out for resveratrol by treatment shRNA scramble and UGT1A10 transduced NCM460 cells (B). Scatter plot of Pearson's coefficient analysis between cell lines resveratrol IC₅₀ and their percentage of resveratrol metabolization at 24 h. Corresponding numerical values are presented in the associated table (C). Results are expressed with mean \pm SD. * : $p < 0.05$; ** ; $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$



Supplemental figure 4: Optical microscopic observations of HCT116 cells treated (**B**) or not (**A**) with 50 μ M resveratrol for 24 h. Survival experiments for SW480, HCT116, HT29 and NCM460 cells after 24 h of 50 μ M resveratrol treatment (**C**). Relative peak area (untreated NCM460 value was used as the reference) for ATP (**D**), ADP (**E**), AMP (**F**), GTP (**I**), GDP (**J**), CTP (**K**), CDP (**L**) and UDP-NAG (**M**) nucleotides levels and relative AXP content (**G**) in HCT116 and NCM460 cells after 24 h 50 μ M resveratrol exposure. Adenylic charge of HCT116 and NCM460 cells after 24 h 50 μ M resveratrol exposure (**H**). Translation rate of HCT116 and NCM460 cells after 24h, 48h and 72h 50 μ M resveratrol exposure was assessed by total-protein puromycine incorporation revealed by western-blot (**N**) Results are expressed with mean +/- SD. * : p<0.05 ; ** : p<0.01 ; *** : p<0.001 ; ns : non-significant.

Author's contribution

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

PB: collection, analysis, assembly and interpretation of data

CD: collection, analysis, assembly and interpretation of data

IM: collection and assembly of data.

IL: collection and assembly of data.

EP: collection and assembly of data.

BF: collection and assembly of data.

JB: collection and assembly of data.

TR: collection and assembly of data.

SK: collection, analysis, assembly and interpretation of data, manuscript writing

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

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

DC: conception and interpretation of data

BP: conception, design, interpretation of data, manuscript writing.

VV: conception, interpretation of data, financial support, manuscript writing.

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

Notre travail met en évidence le rôle majeur des UGT dans la réponse au resvératrol des cellules tumorales et saines. D'un point de vue plus global, de nombreuses thérapeutiques anticancéreuses sont également concernées puisque métabolisées activement par des UGT. La contribution des réactions enzymatiques de glucuronidation à la résistance aux thérapies anticancéreuses a été reconnue pour la première fois il y a près de 30 ans [286]. Les auteurs mettaient en évidence un lien entre l'efflux élevé de daunorubicine, une chimiothérapie intercalant de l'ADN, sous forme de conjugué glucuronide et la résistance cellulaire à l'effet cytotoxique de cette drogue dans une lignée cellulaire leucémique. Les résultats de cette étude, ainsi que ceux d'autres études précoces sur le métabolite actif de l'irinotécan, le SN-38, et sur l'acide mycophénolique laissaient entendre que l'expression et l'activité intrinsèque des UGT influençait de manière significative la sensibilité et l'efficacité des médicaments [287,288]. Depuis ces travaux pionniers, la liste des médicaments anticancéreux impactés par la glucuronidation UGT-médiée s'est allongée et comprend la majorité des médicaments antinéoplasiques actuellement utilisés, toutes classes confondues, ainsi que de nombreux autres en cours de développement [250]. Ainsi, la glucuronidation par les UGT pourrait réduire considérablement l'activité de plusieurs agents thérapeutiques antinéoplasiques dont l'irinotécan, le sorafénib, le raloxifène et le tamoxifène [289–293].

La majeure partie des preuves initiales de l'influence des UGT sur les réponses aux drogues ont été établies sur des essais cellulaires. Par exemple, le SN-38, métabolite actif de l'irinotécan, est glucuronidé par plusieurs UGT1A [294], et les cellules cancéreuses de colon, poumon et sein présentant une résistance au SN-38 montrent également des niveaux d'expression élevés d'UGT1A associés à des concentrations élevées de SN-38-glucuronide dans le milieu de culture [288,295]. Parallèlement, des études pharmacogénétiques sur des patients atteints de CRC et traités par irinotécan ont établi des associations entre certains variants génétiques de l'UGT1A et la réponse clinique au traitement [250,296]. Le variant *UGT1A1*28* constitue par exemple un biomarqueur prédictif d'une toxicité systémique accrue de l'irinotécan, notamment avec la survenue de neutropénies sévères [289,296]. De

même, il a été signalé que l'efficacité de nouvelles stratégies thérapeutiques était modulée par l'expression des UGT. Le ganetespib et le luminespib sont des médicaments anticancéreux prometteurs ciblant la protéine de choc thermique HSP90, un chaperon moléculaire dépendant de l'ATP et essentiel au repliement d'un grand nombre de protéines, y compris plusieurs oncogènes [297]. Les principaux inhibiteurs de la HSP90 entrent en compétition pour la liaison de HSP90 à l'ATP et favorisent la dégradation protéasomique des protéines cibles non repliées. Une efficacité clinique du ganetespib et du luminespib est donc attendue pour de nombreux cancers, et ils sont actuellement testés dans plusieurs essais cliniques de phase II et III, seuls ou en association [298]. Cependant, dans une analyse transcriptomique comparée, des niveaux élevés d'UGT1A étaient parmi les différences majeures observées entre les lignées cellulaires de CRC et de vessie résistantes et sensibles aux inhibiteurs de HSP90 [299,300]. En outre, la surexpression de l'UGT1A10, isoforme abondamment exprimée dans le tractus gastro-intestinal, dans une lignée cellulaire sensible de CRC induisait une résistance aux inhibiteurs au ganetespib et au luminespib, tandis que l'inactivation de l'UGT1A dans les lignées cellulaires résistantes de CRC et de la vessie augmentait la sensibilité à ces drogues [299,300]. En revanche, l'ensemble des lignées cellulaires étaient sensibles à d'autres classes d'inhibiteurs de HSP90 qui ne sont pas des substrats des UGT. Bien que des études antérieures suggéraient que les tumeurs colorectales et vésicales présentaient une expression réduite des UGT1A en comparaison des tissus normaux [240,301,302], d'autres études ont indiqué qu'un sous-groupe significatif de tumeurs colorectales présentait des niveaux d'expression élevés [240,303]. Ces résultats suggèrent que l'utilisation des inhibiteurs de HSP90 dont le métabolisme est dépendant des UGT soient dépendante de l'analyse du profil d'expression des UGT. D'après les résultats d'un crible de sensibilité comparant des modèles de cellules cancéreuses exprimant faiblement ou fortement les UGT1A, ces enzymes pourraient être des déterminants importants de la réponse à plusieurs autres nouveaux composés antinéoplasiques déjà utilisés en clinique ou qui font actuellement l'objet d'essais cliniques [304].

Plusieurs études cliniques ont également mis en évidence le lien entre résistance primaire aux médicaments et l'expression des UGT. L'expression de l'UGT1A a par exemple été associée à

la réponse à l'erlotinib, un inhibiteur du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR), chez les patients atteints d'un cancer du poumon non à petites cellules (NSCLC) [305]. Les niveaux tumoraux initiaux d'ARNm de l'UGT1A6 étaient 6 fois plus élevés chez les patients non-répondeurs en comparaison des patients répondeurs. La glucuroconjugaison des métabolites oxydatifs de l'erlotinib est une voie documentée de son inactivation et de son élimination [306], ce qui laisse supposer que des taux élevés tumoraux d'UGT réduisent la sensibilité à l'erlotinib. Dans une autre étude, la résistance des patients atteints de LAM à la ribavirine et la cytarabine, 2 analogues nucléosidiques, a été attribuée à l'accumulation induite des enzymes UGT1A [307].

Une expression augmentée des UGT a été observée à plusieurs reprises après l'exposition de lignées cellulaires cancéreuses à des médicaments anticancéreux également substrats des UGT. Cette observation confirme le caractère inductible des résistances médicamenteuses UGT-médiées. L'UGT2B17 est la principale UGT exprimée dans les cellules B leucémiques de patients atteints de leucémie lymphoïde chronique (LLC), alors que toutes les autres UGT sont peu ou pas exprimées [308]. Dans une étude menée sur des patients atteints de LLC traités avec une fludarabine, un analogue purique, les auteurs montrent que les patients non-répondeurs pouvaient être distingués des répondeurs sur la base de l'expression induite de l'UGT2B17, observée quelques heures après le début du traitement.

Collectivement, ces exemples précliniques et cliniques soutiennent tous que l'expression basale et inductible des UGT des cellules cancéreuses est un déterminant majeur de la réponse aux thérapeutiques antitumorales.

Nous avons pu observer des différences d'expression des UGT entre les diverses lignées colorectales utilisées. D'autres part, les données moléculaires associées aux données cliniques de cohortes de malades mettent en évidence le caractère pronostique du niveau d'expression tumorale des UGT. On peut donc se demander si ces enzymes contribuent au processus de progression tumorale, notamment via leur capacité à réguler par le biais de la glucuronidation, la signalisation endogène affectant les voies oncogéniques. Le processus oncogénique par lui-

même perturbe radicalement l'expression intratumorale des UGT en comparaison des tissus normaux, [301,303,290,309,302]. L'expression des UGT peut être réprimée dans certains types tumoraux et augmentée dans d'autres types, indiquant divers schémas de régulation de l'expression des UGT dans les tumeurs [301,303,290,310,309,302]. Ces niveaux perturbés d'UGT sont compatibles avec des fonctions métaboliques altérées dans les tumeurs et suggèrent que les UGT pourraient influencer la progression tumorale, indépendamment de l'exposition aux molécules thérapeutiques. Notamment, les résultats d'études récentes analysant les perturbations métaboliques présentes dans le transcriptome et le métabolome de plusieurs types de tumeurs, indiquait que les gènes et les métabolites pour lesquels les niveaux sont les plus perturbés appartenaient à la voie d'interconversion des pentoses et des glucuronates en incluant tous les gènes [311,312]. Ces observations soutiennent le concept d'une voie UGT perturbée dans plusieurs types de cancers. Le modèle complexe de régulation de l'expression des UGT décrit précédemment implique la production de nombreuses isoformes alternatives présentant de nouvelles séquences « in-frame » et exprimées de manière différentielle entre les tissus tumoraux et sains [231]. En outre, les paramètres cliniques, y compris le type de cancer, l'agressivité ou le stade contribuent tous à cette variabilité de l'expression des UGT. Ces facteurs, associés à la grande variabilité interindividuelle et aux différences ethniques qui caractérisent également l'expression tissulaire variable des UGT [250], suggèrent une régulation multifactorielle de l'expression des UGT lors du processus oncogénique, qui, à son tour, influence de manière significative non seulement la réponse aux thérapeutiques, mais aussi la progression tumorale. Étant donné que l'activité d'un certain nombre d'UGT détermine l'exposition à des molécules de signalisation endogènes de type hormonal, telles que les stéroïdes sexuels, les meilleurs exemples de l'influence des UGT sur la progression tumorale proviennent de cancers en lien étroit avec le système endocrinien. Le cancer de la prostate est un parfait exemple. Comme décrit précédemment, les UGT2B17 et 2B28 sont les enzymes impliqués dans l'inactivation des hormones stéroïdiennes au niveau prostatique. La délétion germinale de l'UGT2B17 est associée à un risque accru de cancer de la prostate [313]. De plus, les délétions germinales de l'UGT2B17 et de l'UGT2B28 sont toutes deux associées à une récurrence post-prostatectomie chez des hommes traités pour un cancer de la prostate localisé [314]. Ces délétions

héréditaires influencent également les taux circulants de stéroïdes sexuels chez les hommes atteints de cancer de la prostate et sont des marqueurs prédictifs indépendants des résultats de la prise en charge. En effet, la perte ou l'inhibition de la voie d'inactivation des androgènes par l'UGT augmente l'exposition aux androgènes locaux et renforce l'activation du récepteur des androgènes en favorisant la prolifération des cellules cancéreuses [314].

L'interaction des UGT avec d'autres enzymes métaboliques, telles que celles impliquées dans le catabolisme des acides gras ou encore la pyruvate kinase musculaire 2 (PKM2), une enzyme régulatrice de la glycolyse impliquée dans l'oncogénèse [315], sont un autre moyen par lequel elles pourraient influencer diverses voies métaboliques impliquées dans la biologie du cancer [316,317]. Dans la tumeur colorectale par exemple, une interaction entre la PKM2 et les isoformes UGT1A_{i2} (courtes) a été mise en évidence [316]. Une inactivation des isoformes i2 stimulait la glycolyse anaérobie ou « effet Warburg », associée à une accumulation du lactate. Une analyse métabolomique montrait des perturbations des niveaux de plusieurs métabolites, incluant de nombreux intermédiaires dérivés des voies de la glycolyse et du cycle de Krebs. Ces changements métaboliques étaient associés à une capacité migratoire augmentée des cellules tumorales. La diminution de l'expression des *UGT1A_{i2}* observée dans les tumeurs colorectales pourraient donc impacter le métabolisme énergétique des cellules tumorales et favoriser la dissémination tumorale.

Enfin, étant donné que les UGT conjuguent une multitude d'autres métabolites impliqués dans la croissance et la mort des cellules cancéreuses, notamment les acides biliaires ou l'acide rétinoïque, on peut imaginer que les UGT influencent le processus tumoral en régulant la concentration locale de métabolites pro- et anti-oncogéniques.

III – Discussion et Perspectives générales

L'intérêt des BFCs en cancérologie n'a cessé de croître depuis maintenant une vingtaine d'années [318,319]. En particulier, de nombreuses études ont établi l'intérêt des BFCs comme agents sensibilisants aux thérapeutiques anticancéreuses conventionnelles de chimiothérapie et radiothérapie. Une action chimiosensibilisante de l'association resvératrol/capsaïcine ayant également été mise en évidence par l'équipe dans un modèle pancréatique [160], nous nous sommes demandé si cette même combinaison pouvait radiosensibiliser les tumeurs digestives. En effet, les propriétés pro-oxydantes des BFCs (à des concentrations élevées) aboutissent à la génération massive de ROS au sein des cellules tumorales. L'effet biologique des rayonnements ionisants étant basé principalement sur la génération de ROS par radiolyse de l'eau, l'association de BFCs et de la radiothérapie pourrait aboutir à une génération accrue de ROS et à un effet antitumoral majoré du traitement. Nos résultats confirment cette hypothèse à la fois *in vitro* et *in vivo*, sur des modèles pancréatiques et colorectaux.

Cependant, malgré l'action radiosensibilisante observée *in vitro*, le resvératrol seul n'a pas permis de radiosensibilisation efficace des tumeurs sur notre modèle murin préclinique. Cela avait d'ailleurs été également le cas sur le modèle pancréatique puisque l'administration seule de resvératrol par voie orale n'avait pas permis d'observer une réduction des volumes tumoraux [160]. A la lumière des résultats de l'étude de la métabolisation du resvératrol par les cellules colorectales tumorales et non-tumorales, il est probable que la voie d'administration orale aboutisse à une métabolisation et une inactivation quasi-complète de la molécule, empêchant ainsi son action radiosensibilisante. Dans le but d'éviter ce phénomène, une administration la plus directe possible à la tumeur pourrait être envisagée. Pour cela, nous développons actuellement un modèle de greffe orthotopique de tumeur rectale. Ce modèle permettra de valider l'action radiosensibilisante des BFCs sur un modèle plus proche du contexte clinique que le modèle sous-cutané. Nous pourrions également tester l'effet radiosensibilisant du resvératrol après administration rectale. Cette voie d'administration pourrait permettre une absorption massive par la tumeur de resvératrol non

métabolisé. A terme, l'utilisation de xénogreffes dérivées de patients (PDX) permettra encore de documenter la pertinence du modèle. La maîtrise de ces nouveaux modèles précliniques pourrait également permettre de tester d'autres agents radiosensibilisants potentiels de la tumeur rectale. Si nos résultats sur ces nouveaux modèles confirment l'effet radiosensibilisant des BFCs, l'étape suivante sera la mise en place d'un protocole de recherche clinique incorporant ces molécules dans la prise en charge des malades présentant une tumeur rectale.

Une majorité des patients traités pour un cancer du rectum reçoit un traitement néoadjuvant par radiochimiothérapie. Dans une optique d'améliorer les taux de réponses complètes à ce traitement et le pronostic associé, l'utilisation des BFCs en tant que traitement sensibilisant associé à la radiochimiothérapie représente une piste thérapeutique séduisante. Notre équipe a mis en évidence un effet chimiosensibilisant du resveratrol et de la capsaïcine pour la gemcitabine, dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de PDAC [160]. Il semble donc également intéressant d'évaluer à terme la combinaison radiochimiothérapie par 5-FU et BFCs, dans une optique d'optimisation de la réponse et de réduction des toxicités. Des expérimentations préliminaires sur les lignées tumorales colorectales (non présentées dans ce manuscrit) permettaient également d'observer une chimiosensibilisation pour le 5-FU. De même, l'effet cytotoxique sur les lignées colorectales tumorales de l'association RT/5-FU/BFCs était supérieur à celui de l'association RT/5-FU. Il serait intéressant de confirmer ces observations dans un modèle préclinique.

Outre leur action radiosensibilisante, plusieurs BFCs dont le resvératrol sont décrites comme capables d'un effet radioprotecteur des tissus sains [320,321], et en particulier de la muqueuse intestinale [322,323]. Plusieurs hypothèses peuvent être faites quant à l'origine de ces observations. D'une part, de nombreuses BFCs présentent une action hormétique bénéfique à faible dose et délétère à des doses plus élevées [324–326]. Les effets radiosensibilisants ou radioprotecteurs seraient alors uniquement liés à la dose à laquelle les cellules ou les tissus sont exposés. Dans le cas des tissus digestifs et du resvératrol par exemple, il est possible qu'à une dose identique d'exposition, les tissus sains présentent des concentrations en resvératrol actif faibles et compatibles avec une radioprotection alors que

celles des tissus tumoraux sont plus élevés, générant une radiosensibilisation. Une autre explication serait que les tissus sains et tumoraux présentent des caractéristiques moléculaires différentes, aboutissant à des sensibilités différentielles. On peut par exemple penser à des niveaux d'expression variables des systèmes de régulation du stress-oxydant. En effet, des niveaux de ROS plus élevés, nécessaires au processus oncogénique, sont classiquement décrits pour les cellules tumorales en comparaison des cellules saines [327]. Ces niveaux sont finement régulés par les cellules tumorales afin de favoriser le processus tumoral sans pour autant être toxique. Dans ce contexte, l'exposition aux BFCs pourraient déstabiliser l'équilibre redox fragile mis en place par la cellule tumorale et aboutir à la mort cellulaire. Enfin, les caractéristiques du cycle cellulaire des cellules saines et tumorales pourraient également expliquer pour une part ce double effet. Il a été démontré pour certaines BFCs un effet radiosensibilisant sur des cellules cyclant rapidement et un effet radioprotecteur sur des cellules quiescentes [328]. Un parallèle peut être fait avec les traitements de chimiothérapie. De par leurs modes d'actions, ces drogues ciblent particulièrement les cellules tumorales à division rapide mais induisent également d'importantes toxicités sur les tissus digestifs et hématopoïétiques, qui se renouvellent rapidement.

De manière plus générale, de nombreuses BFCs semblent présenter une cytotoxicité plus marquée sur les tumeurs que sur les tissus sains [329–331]. Comme évoqué précédemment, il est probable que les cellules tumorales portent des caractéristiques moléculaires différentes des cellules saines contribuant à les sensibiliser à ces composés. Ceci est en accord avec le fait que le resvératrol a été plus toxique sur les cellules d'astrocytome que sur les astrocytes normaux [331]. Alors qu'il induisait une baisse des ROS associée à une augmentation des niveaux de glutathion chez les astrocytes, une augmentation importante des ROS et une baisse des niveaux de glutathion était observée pour les cellules d'astrocytome. D'une manière similaire, la curcumine présentait une action pro-apoptotique marquée sur des cellules tumorales hépatocytaires alors qu'aucune toxicité n'était observée aux mêmes doses sur des hépatocytes normaux [329]. Là encore, une capacité réduite des cellules tumorales à maintenir des niveaux bas de stress-oxydant, en particulier via le système du glutathion,

semblait impliquée. Nous avons mis en évidence dans un modèle colorectal, des capacités de métabolisation et d'inactivation différentes du resvératrol aboutissant à un effet cytotoxique quasi-spécifique des cellules tumorales. La tumeur colorectale constitue donc une cible de choix pour l'utilisation du resveratrol en tant qu'adjuvant thérapeutique. D'autant plus que son administration orale pourrait permettre une absorption directe par la tumeur de la forme non-métabolisée. Cette hypothèse est à confronter aux résultats d'une étude rapportant une très faible biodisponibilité du resveratrol au niveau colorectal, la majeure partie de la dose ayant probablement été absorbée et métabolisée en amont du tractus digestif [332,333]. Le développement de nouvelles formes galéniques du resvératrol est une piste d'amélioration de sa biodisponibilité et fait l'objet de multiples études [334]. Dans le cadre des tumeurs du bas et moyen rectum, une administration locale du resvératrol pourrait également être envisagée.

Nos résultats sur les modèles pancréatiques et colorectaux confortent l'utilisation des BFCs en tant qu'agents adjuvants des thérapies conventionnelles comme une piste thérapeutique robuste. Malgré de nombreuses études précliniques positives, très peu d'études cliniques incluant l'usage de BFCs pour la prise en charge des cancers ont pour l'heure été mises en œuvre. Cet écueil est probablement lié aux problèmes de biodisponibilité d'une majorité de ces composés mais également potentiellement à leur caractère non-brevetable. Des initiatives académiques sont d'ailleurs à l'origine de la plupart des études cliniques disponibles. On peut espérer que les efforts fournis pour le développement de nouvelles formes galéniques pourraient ébranler cet état de fait.

Nos observations mettant en évidence une inhibition de l'expression des UGT1A8 et 10 dans les tumeurs colorectales pourraient également servir au développement de thérapies ciblées pour le CRC. On peut par exemple imaginer la mise au point d'agents antinéoplasiques métabolisés par les UGT1A8 et 1A10 et capables de présenter un effet très ciblé sur la tumeur colorectale en épargnant les tissus sains. Une autre approche thérapeutique pourrait consister à combiner certaines chimiothérapies métabolisées par les UGTs avec la prise concomitante de BFCs métabolisées par les mêmes enzymes. On peut espérer ainsi, par un

effet de compétition entre les 2 molécules au niveau des UGTs, augmenter l'action de la chimiothérapie en diminuant son inactivation enzymatique. A noter cependant que le resvératrol pouvant également entrer en compétition avec la chimiothérapie au niveau des tissus sains, une toxicité digestive accrue pourrait être observée.

Il serait également intéressant de voir si ce phénomène de dérégulation de l'expression des UGT est observé pour d'autres types tumoraux. Dans ce contexte, les tumeurs hépatiques et rénales seraient de bonnes candidates puisque ces tissus expriment fortement plusieurs enzymes UGT1A.

Enfin, l'étude des mécanismes moléculaires responsables des dérégulations d'expression des UGT colorectales représente un domaine de recherche passionnant et encore peu étudié. Outre leur rôle bien connu de détoxification des xénobiotiques, les UGT émergent en tant que modulateurs métaboliques et acteurs à part entière du processus oncogénique. L'étude des interactions entre les UGT, le métabolisme tumoral et les voies de signalisation oncogéniques, en particulier dans le CRC, pourrait constituer la suite logique de ce travail.

IV – Bibliographie

1. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Fuchs, H.E.; Jemal, A. Cancer Statistics, 2022. *CA. Cancer J. Clin.* **2022**, *72*, 7–33, doi:10.3322/caac.21708.
2. Milner, J.A. Nutrition and Cancer: Essential Elements for a Roadmap. *Cancer Lett.* **2008**, *269*, 189–198, doi:10.1016/j.canlet.2008.05.030.
3. Genkinger, J.M.; Koushik, A. Meat Consumption and Cancer Risk. *PLoS Med.* **2007**, *4*, e345, doi:10.1371/journal.pmed.0040345.
4. Latino-Martel, P.; Cottet, V.; Druesne-Pecollo, N.; Pierre, F.H.F.; Touillaud, M.; Touvier, M.; Vasson, M.-P.; Deschasaux, M.; Le Merdy, J.; Barrandon, E.; et al. Alcoholic Beverages, Obesity, Physical Activity and Other Nutritional Factors, and Cancer Risk: A Review of the Evidence. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2016**, *99*, 308–323, doi:10.1016/j.critrevonc.2016.01.002.
5. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 209–249, doi:10.3322/caac.21660.
6. Wong, M.C.S.; Huang, J.; Lok, V.; Wang, J.; Fung, F.; Ding, H.; Zheng, Z.-J. Differences in Incidence and Mortality Trends of Colorectal Cancer Worldwide Based on Sex, Age, and Anatomic Location. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* **2021**, *19*, 955–966.e61, doi:10.1016/j.cgh.2020.02.026.
7. Arnold, M.; Sierra, M.S.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Patterns and Trends in Colorectal Cancer Incidence and Mortality. *Gut* **2017**, *66*, 683–691, doi:10.1136/gutjnl-2015-310912.
8. F, B.; M, C.; L, M.; M, P.; A, Z.; R, Z.; J, F. *Cancer Incidence in Five Continents Volume XI*; ISBN 978-92-832-2219-4.
9. Fidler, M.M.; Soerjomataram, I.; Bray, F. A Global View on Cancer Incidence and National Levels of the Human Development Index. *Int. J. Cancer* **2016**, *139*, 2436–2446, doi:10.1002/ijc.30382.
10. World Health Organization *World Health Statistics 2020: Monitoring Health for the SDGs, Sustainable Development Goals*; World Health Organization, 2020; ISBN 978-92-4-000510-5.
11. Ouakrim, D.A.; Pizot, C.; Boniol, M.; Malvezzi, M.; Boniol, M.; Negri, E.; Bota, M.; Jenkins, M.A.; Bleiberg, H.; Autier, P. Trends in Colorectal Cancer Mortality in Europe: Retrospective Analysis of the WHO Mortality Database. *BMJ* **2015**, *351*, h4970, doi:10.1136/bmj.h4970.
12. Street, W. Colorectal Cancer Facts & Figures 2020–2022. 48.
13. Gandomani, H.S.; Yousefi, S.M.; Aghajani, M.; Mohammadian-Hafshejani, A.; Tarazoj, A.A.; Pouyesh, V.; Salehiniya, H. Colorectal Cancer in the World: Incidence, Mortality and Risk Factors.

Biomed. Res. Ther. **2017**, *4*, 1656–1675, doi:10.15419/bmrat.v4i10.372.

14. Giovannucci, E. An Updated Review of the Epidemiological Evidence That Cigarette Smoking Increases Risk of Colorectal Cancer. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* **2001**, *10*, 725–731.
15. Thélin, C.; Sikka, S. *Epidemiology of Colorectal Cancer — Incidence, Lifetime Risk Factors Statistics and Temporal Trends*; IntechOpen, 2015; ISBN 978-953-51-2225-8.
16. Rawla, P.; Sunkara, T.; Barsouk, A. Epidemiology of Colorectal Cancer: Incidence, Mortality, Survival, and Risk Factors. *Przegląd Gastroenterol.* **2019**, *14*, 89–103, doi:10.5114/pg.2018.81072.
17. Sawicki, T.; Ruszkowska, M.; Danielewicz, A.; Niedźwiedzka, E.; Arłukowicz, T.; Przybyłowicz, K.E. A Review of Colorectal Cancer in Terms of Epidemiology, Risk Factors, Development, Symptoms and Diagnosis. *Cancers* **2021**, *13*, 2025, doi:10.3390/cancers13092025.
18. World Cancer Research International Fund Systematic Literature Review Continuous Update Project Report: Diet, Nutrition, Physical Activity and Colorectal Cancer - Revised 2018. **2018**, 111.
19. Chan, D.S.M.; Lau, R.; Aune, D.; Vieira, R.; Greenwood, D.C.; Kampman, E.; Norat, T. Red and Processed Meat and Colorectal Cancer Incidence: Meta-Analysis of Prospective Studies. *PloS One* **2011**, *6*, e20456, doi:10.1371/journal.pone.0020456.
20. Aykan, N.F. Red Meat and Colorectal Cancer. *Oncol. Rev.* **2015**, *9*, 288, doi:10.4081/oncol.2015.288.
21. Aran, V.; Victorino, A.P.; Thuler, L.C.; Ferreira, C.G. Colorectal Cancer: Epidemiology, Disease Mechanisms and Interventions to Reduce Onset and Mortality. *Clin. Colorectal Cancer* **2016**, *15*, 195–203, doi:10.1016/j.clcc.2016.02.008.
22. Amersi, F.; Agustin, M.; Ko, C.Y. Colorectal Cancer: Epidemiology, Risk Factors, and Health Services. *Clin. Colon Rectal Surg.* **2005**, *18*, 133–140, doi:10.1055/s-2005-916274.
23. Murphy, N.; Moreno, V.; Hughes, D.J.; Vodicka, L.; Vodicka, P.; Aglago, E.K.; Gunter, M.J.; Jenab, M. Lifestyle and Dietary Environmental Factors in Colorectal Cancer Susceptibility. *Mol. Aspects Med.* **2019**, *69*, 2–9, doi:10.1016/j.mam.2019.06.005.
24. Watson, A.J.M.; Collins, P.D. Colon Cancer: A Civilization Disorder. *Dig. Dis. Basel Switz.* **2011**, *29*, 222–228, doi:10.1159/000323926.
25. Lin, O.S. Colorectal Cancer Screening in Patients at Moderately Increased Risk Due to Family History. *World J. Gastrointest. Oncol.* **2012**, *4*, 125–130, doi:10.4251/wjgo.v4.i6.125.
26. Ligtenberg, M.J.L.; Kuiper, R.P.; Chan, T.L.; Goossens, M.; Hebeda, K.M.; Voorendt, M.; Lee, T.Y.H.; Bodmer, D.; Hoenselaar, E.; Hendriks-Cornelissen, S.J.B.; et al. Heritable Somatic Methylation and Inactivation of MSH2 in Families with Lynch Syndrome Due to Deletion of the 3' Exons of TACSTD1. *Nat. Genet.* **2009**, *41*, 112–117, doi:10.1038/ng.283.
27. Kastrinos, F.; Syngal, S. Inherited Colorectal Cancer Syndromes. *Cancer J. Sudbury Mass* **2011**,

- 17, 405–415, doi:10.1097/PPO.0b013e318237e408.
28. de Campos, F.G.C.M.; Nicácio De Freitas, I.; Imperiale, A.R.; Seid, V.E.; Perez, R.O.; Nahas, S.C.; Ceconello, I. [Colorectal cancer in familial adenomatous polyposis: Are there clinical predictive factors?]. *Cirurgia Espanola* **2010**, *88*, 390–397, doi:10.1016/j.ciresp.2010.05.013.
29. Talseth-Palmer, B.A. The Genetic Basis of Colonic Adenomatous Polyposis Syndromes. *Hered. Cancer Clin. Pract.* **2017**, *15*, 5, doi:10.1186/s13053-017-0065-x.
30. Sehgal, R.; Sheahan, K.; O’Connell, P.R.; Hanly, A.M.; Martin, S.T.; Winter, D.C. Lynch Syndrome: An Updated Review. *Genes* **2014**, *5*, 497–507, doi:10.3390/genes5030497.
31. Markowitz, S.D.; Bertagnolli, M.M. Molecular Origins of Cancer: Molecular Basis of Colorectal Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *361*, 2449–2460, doi:10.1056/NEJMra0804588.
32. Pritchard, C.C.; Grady, W.M. Colorectal Cancer Molecular Biology Moves into Clinical Practice. *Gut* **2011**, *60*, 116–129, doi:10.1136/gut.2009.206250.
33. Al-Sohaily, S.; Biankin, A.; Leong, R.; Kohonen-Corish, M.; Warusavitarne, J. Molecular Pathways in Colorectal Cancer. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2012**, *27*, 1423–1431, doi:10.1111/j.1440-1746.2012.07200.x.
34. Pardali, K.; Moustakas, A. Actions of TGF-Beta as Tumor Suppressor and pro-Metastatic Factor in Human Cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1775*, 21–62, doi:10.1016/j.bbcan.2006.06.004.
35. Ogino, S.; Chan, A.T.; Fuchs, C.S.; Giovannucci, E. Molecular Pathological Epidemiology of Colorectal Neoplasia: An Emerging Transdisciplinary and Interdisciplinary Field. *Gut* **2011**, *60*, 397–411, doi:10.1136/gut.2010.217182.
36. Van Cutsem, E.; Köhne, C.-H.; Hitre, E.; Zaluski, J.; Chang Chien, C.-R.; Makhson, A.; D’Haens, G.; Pintér, T.; Lim, R.; Bodoky, G.; et al. Cetuximab and Chemotherapy as Initial Treatment for Metastatic Colorectal Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *360*, 1408–1417, doi:10.1056/NEJMoa0805019.
37. Nakayama, I.; Hirota, T.; Shinozaki, E. BRAF Mutation in Colorectal Cancers: From Prognostic Marker to Targetable Mutation. *Cancers* **2020**, *12*, 3236, doi:10.3390/cancers12113236.
38. Wild-Type BRAF Is Required for Response to Panitumumab or Cetuximab in Metastatic Colorectal Cancer | Journal of Clinical Oncology Available online: <https://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2008.18.0786> (accessed on 22 March 2022).
39. Loupakis, F.; Ruzzo, A.; Cremolini, C.; Vincenzi, B.; Salvatore, L.; Santini, D.; Masi, G.; Stasi, I.; Canestrari, E.; Rulli, E.; et al. KRAS Codon 61, 146 and BRAF Mutations Predict Resistance to Cetuximab plus Irinotecan in KRAS Codon 12 and 13 Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer. *Br. J. Cancer* **2009**, *101*, 715–721, doi:10.1038/sj.bjc.6605177.
40. Liao, X.; Lochhead, P.; Nishihara, R.; Morikawa, T.; Kuchiba, A.; Yamauchi, M.; Imamura, Y.; Qian, Z.R.; Baba, Y.; Shima, K.; et al. Aspirin Use, Tumor PIK3CA Mutation, and Colorectal-Cancer

Survival. *N. Engl. J. Med.* **2012**, *367*, 1596–1606, doi:10.1056/NEJMoa1207756.

41. Woods, M.O.; Younghusband, H.B.; Parfrey, P.S.; Gallinger, S.; McLaughlin, J.; Dicks, E.; Stuckless, S.; Pollett, A.; Bapat, B.; Mrkonjic, M.; et al. The Genetic Basis of Colorectal Cancer in a Population-Based Incident Cohort with a High Rate of Familial Disease. *Gut* **2010**, *59*, 1369–1377, doi:10.1136/gut.2010.208462.

42. Guinney, J.; Dienstmann, R.; Wang, X.; de Reyniès, A.; Schlicker, A.; Soneson, C.; Marisa, L.; Roepman, P.; Nyamundanda, G.; Angelino, P.; et al. The Consensus Molecular Subtypes of Colorectal Cancer. *Nat. Med.* **2015**, *21*, 1350–1356, doi:10.1038/nm.3967.

43. Fijten, G.H.; Starmans, R.; Muris, J.W.; Schouten, H.J.; Blijham, G.H.; Knottnerus, J.A. Predictive Value of Signs and Symptoms for Colorectal Cancer in Patients with Rectal Bleeding in General Practice. *Fam. Pract.* **1995**, *12*, 279–286, doi:10.1093/fampra/12.3.279.

44. Beets-Tan, R.G.H.; Lambregts, D.M.J.; Maas, M.; Bipat, S.; Barbaro, B.; Curvo-Semedo, L.; Fenlon, H.M.; Gollub, M.J.; Gourtsoyianni, S.; Halligan, S.; et al. Magnetic Resonance Imaging for Clinical Management of Rectal Cancer: Updated Recommendations from the 2016 European Society of Gastrointestinal and Abdominal Radiology (ESGAR) Consensus Meeting. *Eur. Radiol.* **2018**, *28*, 1465–1475, doi:10.1007/s00330-017-5026-2.

45. Nerad, E.; Lahaye, M.J.; Maas, M.; Nelemans, P.; Bakers, F.C.H.; Beets, G.L.; Beets-Tan, R.G.H. Diagnostic Accuracy of CT for Local Staging of Colon Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *AJR Am. J. Roentgenol.* **2016**, *207*, 984–995, doi:10.2214/AJR.15.15785.

46. Le, D.T.; Durham, J.N.; Smith, K.N.; Wang, H.; Bartlett, B.R.; Aulakh, L.K.; Lu, S.; Kemberling, H.; Wilt, C.; Lubner, B.S.; et al. Mismatch Repair Deficiency Predicts Response of Solid Tumors to PD-1 Blockade. *Science* **2017**, *357*, 409–413, doi:10.1126/science.aan6733.

47. Benson, A.B.; Venook, A.P.; Al-Hawary, M.M.; Cederquist, L.; Chen, Y.-J.; Ciombor, K.K.; Cohen, S.; Cooper, H.S.; Deming, D.; Engstrom, P.F.; et al. NCCN Guidelines Insights: Colon Cancer, Version 2.2018. *J. Natl. Compr. Cancer Netw. JNCCN* **2018**, *16*, 359–369, doi:10.6004/jnccn.2018.0021.

48. Pagès, F.; Mlecnik, B.; Marliot, F.; Bindea, G.; Ou, F.-S.; Bifulco, C.; Lugli, A.; Zlobec, I.; Rau, T.T.; Berger, M.D.; et al. International Validation of the Consensus Immunoscore for the Classification of Colon Cancer: A Prognostic and Accuracy Study. *The Lancet* **2018**, *391*, 2128–2139, doi:10.1016/S0140-6736(18)30789-X.

49. Li, K.; Luo, H.; Huang, L.; Luo, H.; Zhu, X. Microsatellite Instability: A Review of What the Oncologist Should Know. *Cancer Cell Int.* **2020**, *20*, 16, doi:10.1186/s12935-019-1091-8.

50. Labianca, R.; Nordlinger, B.; Beretta, G.D.; Mosconi, S.; Mandalà, M.; Cervantes, A.; Arnold, D.; ESMO Guidelines Working Group Early Colon Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **2013**, *24 Suppl 6*, vi64–

72, doi:10.1093/annonc/mdt354.

51. Douillard, J.-Y.; Oliner, K.S.; Siena, S.; Tabernero, J.; Burkes, R.; Barugel, M.; Humblet, Y.; Bodoky, G.; Cunningham, D.; Jassem, J.; et al. Panitumumab-FOLFOX4 Treatment and RAS Mutations in Colorectal Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2013**, *369*, 1023–1034, doi:10.1056/NEJMoa1305275.
52. Taieb, J.; Le Malicot, K.; Shi, Q.; Penault-Llorca, F.; Bouché, O.; Tabernero, J.; Mini, E.; Goldberg, R.M.; Folprecht, G.; Luc Van Laethem, J.; et al. Prognostic Value of BRAF and KRAS Mutations in MSI and MSS Stage III Colon Cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **2017**, *109*, doi:10.1093/jnci/djw272.
53. Schirripa, M.; Cohen, S.A.; Battaglin, F.; Lenz, H.-J. Biomarker-Driven and Molecular Targeted Therapies for Colorectal Cancers. *Semin. Oncol.* **2018**, *45*, 124–132, doi:10.1053/j.seminoncol.2017.06.003.
54. Bi, F.; Wang, Q.; Dong, Q.; Wang, Y.; Zhang, L.; Zhang, J. Circulating Tumor DNA in Colorectal Cancer: Opportunities and Challenges. *Am. J. Transl. Res.* **2020**, *12*, 1044–1055.
55. Hayashi, N.; Tanaka, S.; Hewett, D.G.; Kaltenbach, T.R.; Sano, Y.; Ponchon, T.; Saunders, B.P.; Rex, D.K.; Soetikno, R.M. Endoscopic Prediction of Deep Submucosal Invasive Carcinoma: Validation of the Narrow-Band Imaging International Colorectal Endoscopic (NICE) Classification. *Gastrointest. Endosc.* **2013**, *78*, 625–632, doi:10.1016/j.gie.2013.04.185.
56. Backes, Y.; Schwartz, M.P.; Ter Borg, F.; Wolfhagen, F.H.J.; Groen, J.N.; de Vos Tot Nederveen Cappel, W.H.; van Bergeijk, J.; Geesing, J.M.J.; Spanier, B.W.M.; Didden, P.; et al. Multicentre Prospective Evaluation of Real-Time Optical Diagnosis of T1 Colorectal Cancer in Large Non-Pedunculated Colorectal Polyps Using Narrow Band Imaging (the OPTICAL Study). *Gut* **2019**, *68*, 271–279, doi:10.1136/gutjnl-2017-314723.
57. Bhurwal, A.; Bartel, M.J.; Heckman, M.G.; Diehl, N.N.; Raimondo, M.; Wallace, M.B.; Woodward, T.A. Endoscopic Mucosal Resection: Learning Curve for Large Nonpolypoid Colorectal Neoplasia. *Gastrointest. Endosc.* **2016**, *84*, 959-968.e7, doi:10.1016/j.gie.2016.04.020.
58. Ferlitsch, M.; Moss, A.; Hassan, C.; Bhandari, P.; Dumonceau, J.-M.; Paspatis, G.; Jover, R.; Langner, C.; Bronzwaer, M.; Nalankilli, K.; et al. Colorectal Polypectomy and Endoscopic Mucosal Resection (EMR): European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Clinical Guideline. *Endoscopy* **2017**, *49*, 270–297, doi:10.1055/s-0043-102569.
59. Ahlenstiel, G.; Hourigan, L.F.; Brown, G.; Zanati, S.; Williams, S.J.; Singh, R.; Moss, A.; Sonson, R.; Bourke, M.J.; Australian Colonic Endoscopic Mucosal Resection (ACE) Study Group Actual Endoscopic versus Predicted Surgical Mortality for Treatment of Advanced Mucosal Neoplasia of the Colon. *Gastrointest. Endosc.* **2014**, *80*, 668–676, doi:10.1016/j.gie.2014.04.015.
60. Jayanna, M.; Burgess, N.G.; Singh, R.; Hourigan, L.F.; Brown, G.J.; Zanati, S.A.; Moss, A.; Lim, J.; Sonson, R.; Williams, S.J.; et al. Cost Analysis of Endoscopic Mucosal Resection vs Surgery

for Large Laterally Spreading Colorectal Lesions. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* **2016**, *14*, 271-278.e1-2, doi:10.1016/j.cgh.2015.08.037.

61. Emmanuel, A.; Haji, A. Complete Mesocolic Excision and Extended (D3) Lymphadenectomy for Colonic Cancer: Is It Worth That Extra Effort? A Review of the Literature. *Int. J. Colorectal Dis.* **2016**, *31*, 797–804, doi:10.1007/s00384-016-2502-0.

62. Longchamp, G.; Meyer, J.; Abbassi, Z.; Sleiman, M.; Toso, C.; Ris, F.; Buchs, N.C. Current Surgical Strategies for the Treatment of Rectal Adenocarcinoma and the Risk of Local Recurrence. *Dig. Dis.* **2021**, *39*, 325–333, doi:10.1159/000511959.

63. What Has Preoperative Radio(Chemo) Therapy Brought to Localized Rectal Cancer Patients in Terms of Perioperative and Long-Term Outcomes over the Past Decades? A Systematic Review and Meta-Analysis Based on - Recherche Google Available online: [https://www.google.com/search?q=What+has+preoperative+radio\(chemo\)+therapy+brought+to+localized+rectal+cancer+patients+in+terms+of+perioperative+and+long-term+outcomes+over+the+past+decades%3F+A+systematic+review+and+meta-analysis+based+on&rlz=1C5CHFA_enFR759FR759&oq=What+has+preoperative+radio\(chemo\)+the+rapy+brought+to+localized+rectal+cancer+patients+in+terms+of+perioperative+and+long-term+outcomes+over+the+past+decades%3F+A+systematic+review+and+meta-analysis+based+on&aqs=chrome..69i57.876j0j4&sourceid=chrome&ie=UTF-8](https://www.google.com/search?q=What+has+preoperative+radio(chemo)+therapy+brought+to+localized+rectal+cancer+patients+in+terms+of+perioperative+and+long-term+outcomes+over+the+past+decades%3F+A+systematic+review+and+meta-analysis+based+on&rlz=1C5CHFA_enFR759FR759&oq=What+has+preoperative+radio(chemo)+the+rapy+brought+to+localized+rectal+cancer+patients+in+terms+of+perioperative+and+long-term+outcomes+over+the+past+decades%3F+A+systematic+review+and+meta-analysis+based+on&aqs=chrome..69i57.876j0j4&sourceid=chrome&ie=UTF-8) (accessed on 23 March 2022).

64. Glynne-Jones, R.; Wyrwicz, L.; Tiret, E.; Brown, G.; Rödel, C.; Cervantes, A.; Arnold, D.; ESMO Guidelines Committee Rectal Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **2017**, *28*, iv22–iv40, doi:10.1093/annonc/mdx224.

65. Bahadoer, R.R.; Dijkstra, E.A.; van Etten, B.; Marijnen, C.A.M.; Putter, H.; Kranenbarg, E.M.-K.; Roodvoets, A.G.H.; Nagtegaal, I.D.; Beets-Tan, R.G.H.; Blomqvist, L.K.; et al. Short-Course Radiotherapy Followed by Chemotherapy before Total Mesorectal Excision (TME) versus Preoperative Chemoradiotherapy, TME, and Optional Adjuvant Chemotherapy in Locally Advanced Rectal Cancer (RAPIDO): A Randomised, Open-Label, Phase 3 Trial. *Lancet Oncol.* **2021**, *22*, 29–42, doi:10.1016/S1470-2045(20)30555-6.

66. Martin, S.T.; Heneghan, H.M.; Winter, D.C. Systematic Review and Meta-Analysis of Outcomes Following Pathological Complete Response to Neoadjuvant Chemoradiotherapy for Rectal Cancer. *Br. J. Surg.* **2012**, *99*, 918–928, doi:10.1002/bjs.8702.

67. Lefevre, J.H.; Mineur, L.; Kotti, S.; Rullier, E.; Rouanet, P.; de Chaisemartin, C.; Meunier, B.; Mehrdad, J.; Cotte, E.; Desrame, J.; et al. Effect of Interval (7 or 11 Weeks) Between Neoadjuvant Radiochemotherapy and Surgery on Complete Pathologic Response in Rectal Cancer: A Multicenter,

- Randomized, Controlled Trial (GRECCAR-6). *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2016**, *34*, 3773–3780, doi:10.1200/JCO.2016.67.6049.
68. Du, D.; Su, Z.; Wang, D.; Liu, W.; Wei, Z. Optimal Interval to Surgery After Neoadjuvant Chemoradiotherapy in Rectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clin. Colorectal Cancer* **2018**, *17*, 13–24, doi:10.1016/j.clcc.2017.10.012.
69. Pozo, M.E.; Fang, S.H. Watch and Wait Approach to Rectal Cancer: A Review. *World J. Gastrointest. Surg.* **2015**, *7*, 306–312, doi:10.4240/wjgs.v7.i11.306.
70. Valk, M.J.M. van der; Hilling, D.E.; Bastiaannet, E.; Kranenbarg, E.M.-K.; Beets, G.L.; Figueiredo, N.L.; Habr-Gama, A.; Perez, R.O.; Renehan, A.G.; Velde, C.J.H. van de; et al. Long-Term Outcomes of Clinical Complete Responders after Neoadjuvant Treatment for Rectal Cancer in the International Watch & Wait Database (IWWD): An International Multicentre Registry Study. *The Lancet* **2018**, *391*, 2537–2545, doi:10.1016/S0140-6736(18)31078-X.
71. Rullier, E.; Rouanet, P.; Tuech, J.-J.; Valverde, A.; Lelong, B.; Rivoire, M.; Faucheron, J.-L.; Jafari, M.; Portier, G.; Meunier, B.; et al. Organ Preservation for Rectal Cancer (GRECCAR 2): A Prospective, Randomised, Open-Label, Multicentre, Phase 3 Trial. *Lancet Lond. Engl.* **2017**, *390*, 469–479, doi:10.1016/S0140-6736(17)31056-5.
72. Roth, A.D.; Tejpar, S.; Delorenzi, M.; Yan, P.; Fiocca, R.; Klingbiel, D.; Dietrich, D.; Biesmans, B.; Bodoky, G.; Barone, C.; et al. Prognostic Role of KRAS and BRAF in Stage II and III Resected Colon Cancer: Results of the Translational Study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 Trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2010**, *28*, 466–474, doi:10.1200/JCO.2009.23.3452.
73. Meyers, B.M.; Cosby, R.; Queresby, F.; Jonker, D. Adjuvant Chemotherapy for Stage II and III Colon Cancer Following Complete Resection: A Cancer Care Ontario Systematic Review. *Clin. Oncol. R. Coll. Radiol. G. B.* **2017**, *29*, 459–465, doi:10.1016/j.clon.2017.03.001.
74. Kuebler, J.P.; Wieand, H.S.; O’Connell, M.J.; Smith, R.E.; Colangelo, L.H.; Yothers, G.; Petrelli, N.J.; Findlay, M.P.; Seay, T.E.; Atkins, J.N.; et al. Oxaliplatin Combined with Weekly Bolus Fluorouracil and Leucovorin as Surgical Adjuvant Chemotherapy for Stage II and III Colon Cancer: Results from NSABP C-07. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2007**, *25*, 2198–2204, doi:10.1200/JCO.2006.08.2974.
75. Yothers, G.; O’Connell, M.J.; Allegra, C.J.; Kuebler, J.P.; Colangelo, L.H.; Petrelli, N.J.; Wolmark, N. Oxaliplatin As Adjuvant Therapy for Colon Cancer: Updated Results of NSABP C-07 Trial, Including Survival and Subset Analyses. *J. Clin. Oncol.* **2011**, *29*, 3768–3774, doi:10.1200/JCO.2011.36.4539.
76. Haller, D.G.; Tabernero, J.; Maroun, J.; de Braud, F.; Price, T.; Van Cutsem, E.; Hill, M.; Gilberg, F.; Rittweger, K.; Schmoll, H.-J. Capecitabine plus Oxaliplatin Compared with Fluorouracil and Folinic Acid as Adjuvant Therapy for Stage III Colon Cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin.*

Oncol. **2011**, *29*, 1465–1471, doi:10.1200/JCO.2010.33.6297.

77. Grothey, A.; Sobrero, A.F.; Shields, A.F.; Yoshino, T.; Paul, J.; Taieb, J.; Souglakos, J.; Shi, Q.; Kerr, R.; Labianca, R.; et al. Duration of Adjuvant Chemotherapy for Stage III Colon Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *378*, 1177–1188, doi:10.1056/NEJMoa1713709.

78. Falcone, A.; Ricci, S.; Brunetti, I.; Pfanner, E.; Allegrini, G.; Barbara, C.; Crinò, L.; Benedetti, G.; Evangelista, W.; Fanchini, L.; et al. Phase III Trial of Infusional Fluorouracil, Leucovorin, Oxaliplatin, and Irinotecan (FOLFOXIRI) Compared with Infusional Fluorouracil, Leucovorin, and Irinotecan (FOLFIRI) as First-Line Treatment for Metastatic Colorectal Cancer: The Gruppo Oncologico Nord Ovest. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2007**, *25*, 1670–1676, doi:10.1200/JCO.2006.09.0928.

79. GBD 2017 Pancreatic Cancer Collaborators The Global, Regional, and National Burden of Pancreatic Cancer and Its Attributable Risk Factors in 195 Countries and Territories, 1990-2017: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* **2019**, *4*, 934–947, doi:10.1016/S2468-1253(19)30347-4.

80. Raimondi, S.; Maisonneuve, P.; Löhr, J.-M.; Lowenfels, A.B. Early Onset Pancreatic Cancer: Evidence of a Major Role for Smoking and Genetic Factors. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* **2007**, *16*, 1894–1897, doi:10.1158/1055-9965.EPI-07-0341.

81. Rr, M.; P, M.; Wr, B.; Gm, P.; D, L.; Ha, R.; H, Y.; Et, F.; B, L.; C, B.; et al. Risk Factors for Early-Onset and Very-Early-Onset Pancreatic Adenocarcinoma: A Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (PanC4) Analysis. *Pancreas* **2016**, *45*, doi:10.1097/MPA.0000000000000392.

82. Jemal, A.; Siegel, R.; Ward, E.; Murray, T.; Xu, J.; Smigal, C.; Thun, M.J. Cancer Statistics, 2006. *CA. Cancer J. Clin.* **2006**, *56*, 106–130, doi:10.3322/canjclin.56.2.106.

83. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Jemal, A. Cancer Statistics, 2020. *CA. Cancer J. Clin.* **2020**, *70*, 7–30, doi:10.3322/caac.21590.

84. Stolzenberg-Solomon, R.Z.; Schairer, C.; Moore, S.; Hollenbeck, A.; Silverman, D.T. Lifetime Adiposity and Risk of Pancreatic Cancer in the NIH-AARP Diet and Health Study Cohort. *Am. J. Clin. Nutr.* **2013**, *98*, 1057–1065, doi:10.3945/ajcn.113.058123.

85. Rebours, V.; Gaujoux, S.; d'Assignies, G.; Sauvanet, A.; Ruzniewski, P.; Lévy, P.; Paradis, V.; Bedossa, P.; Couvelard, A. Obesity and Fatty Pancreatic Infiltration Are Risk Factors for Pancreatic Precancerous Lesions (PanIN). *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2015**, *21*, 3522–3528, doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-2385.

86. Everhart, J.; Wright, D. Diabetes Mellitus as a Risk Factor for Pancreatic Cancer. A Meta-Analysis. *JAMA* **1995**, *273*, 1605–1609.

87. Andersen, D.K.; Korc, M.; Petersen, G.M.; Eibl, G.; Li, D.; Rickels, M.R.; Chari, S.T.;

- Abbruzzese, J.L. Diabetes, Pancreatogenic Diabetes, and Pancreatic Cancer. *Diabetes* **2017**, *66*, 1103–1110, doi:10.2337/db16-1477.
88. Pereira, S.P.; Oldfield, L.; Ney, A.; Hart, P.A.; Keane, M.G.; Pandol, S.J.; Li, D.; Greenhalf, W.; Jeon, C.Y.; Koay, E.J.; et al. Early Detection of Pancreatic Cancer. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* **2020**, *5*, 698–710, doi:10.1016/S2468-1253(19)30416-9.
89. Blackford, A.; Parmigiani, G.; Kensler, T.W.; Wolfgang, C.; Jones, S.; Zhang, X.; Parsons, D.W.; Lin, J.C.-H.; Leary, R.J.; Eshleman, J.R.; et al. Genetic Mutations Associated with Cigarette Smoking in Pancreatic Cancer. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 3681–3688, doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-0015.
90. Naudin, S.; Viallon, V.; Hashim, D.; Freisling, H.; Jenab, M.; Weiderpass, E.; Perrier, F.; McKenzie, F.; Bueno-de-Mesquita, H.B.; Olsen, A.; et al. Healthy Lifestyle and the Risk of Pancreatic Cancer in the EPIC Study. *Eur. J. Epidemiol.* **2020**, *35*, 975–986, doi:10.1007/s10654-019-00559-6.
91. Solomon, S.; Das, S.; Brand, R.; Whitcomb, D.C. Inherited Pancreatic Cancer Syndromes. *Cancer J. Sudbury Mass* **2012**, *18*, 485–491, doi:10.1097/PPO.0b013e318278c4a6.
92. Benzel, J.; Fendrich, V. Familial Pancreatic Cancer. *Oncol. Res. Treat.* **2018**, *41*, 611–618, doi:10.1159/000493473.
93. Brose, M.S.; Rebbeck, T.R.; Calzone, K.A.; Stopfer, J.E.; Nathanson, K.L.; Weber, B.L. Cancer Risk Estimates for BRCA1 Mutation Carriers Identified in a Risk Evaluation Program. *J. Natl. Cancer Inst.* **2002**, *94*, 1365–1372, doi:10.1093/jnci/94.18.1365.
94. Kastrinos, F.; Mukherjee, B.; Tayob, N.; Wang, F.; Sparr, J.; Raymond, V.M.; Bandipalliam, P.; Stoffel, E.M.; Gruber, S.B.; Syngal, S. Risk of Pancreatic Cancer in Families with Lynch Syndrome. *JAMA* **2009**, *302*, 1790–1795, doi:10.1001/jama.2009.1529.
95. Vasen, H.F.; Gruis, N.A.; Frants, R.R.; van Der Velden, P.A.; Hille, E.T.; Bergman, W. Risk of Developing Pancreatic Cancer in Families with Familial Atypical Multiple Mole Melanoma Associated with a Specific 19 Deletion of P16 (P16-Leiden). *Int. J. Cancer* **2000**, *87*, 809–811.
96. Bang, Y.-J.; Ruiz, E.Y.; Van Cutsem, E.; Lee, K.-W.; Wyrwicz, L.; Schenker, M.; Alsina, M.; Ryu, M.-H.; Chung, H.-C.; Evesque, L.; et al. Phase III, Randomised Trial of Avelumab versus Physician’s Choice of Chemotherapy as Third-Line Treatment of Patients with Advanced Gastric or Gastro-Oesophageal Junction Cancer: Primary Analysis of JAVELIN Gastric 300. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **2018**, *29*, 2052–2060, doi:10.1093/annonc/mdy264.
97. Tempero, M.A. NCCN Guidelines Updates: Pancreatic Cancer. *J. Natl. Compr. Cancer Netw. JNCCN* **2019**, *17*, 603–605, doi:10.6004/jnccn.2019.5007.
98. Stoffel, E.M.; McKernin, S.E.; Brand, R.; Canto, M.; Goggins, M.; Moravek, C.; Nagarajan, A.; Petersen, G.M.; Simeone, D.M.; Yurgelun, M.; et al. Evaluating Susceptibility to Pancreatic Cancer: ASCO Provisional Clinical Opinion. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2019**, *37*, 153–164,

doi:10.1200/JCO.18.01489.

99. Scarpa, A.; Real, F.X.; Luchini, C. Genetic Unrelatedness of Co-Occurring Pancreatic Adenocarcinomas and IPMNs Challenges Current Views of Clinical Management. *Gut* **2018**, *67*, 1561–1563, doi:10.1136/gutjnl-2018-316151.
100. van Heek, N.T.; Meeker, A.K.; Kern, S.E.; Yeo, C.J.; Lillemoe, K.D.; Cameron, J.L.; Offerhaus, G.J.A.; Hicks, J.L.; Wilentz, R.E.; Goggins, M.G.; et al. Telomere Shortening Is Nearly Universal in Pancreatic Intraepithelial Neoplasia. *Am. J. Pathol.* **2002**, *161*, 1541–1547, doi:10.1016/S0002-9440(10)64432-X.
101. Guo, J.; Xie, K.; Zheng, S. Molecular Biomarkers of Pancreatic Intraepithelial Neoplasia and Their Implications in Early Diagnosis and Therapeutic Intervention of Pancreatic Cancer. *Int. J. Biol. Sci.* **2016**, *12*, 292–301, doi:10.7150/ijbs.14995.
102. Collisson, E.A.; Sadanandam, A.; Olson, P.; Gibb, W.J.; Truitt, M.; Gu, S.; Cooc, J.; Weinkle, J.; Kim, G.E.; Jakkula, L.; et al. Subtypes of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Their Differing Responses to Therapy. *Nat. Med.* **2011**, *17*, 500–503, doi:10.1038/nm.2344.
103. Moffitt, R.A.; Marayati, R.; Flate, E.L.; Volmar, K.E.; Loeza, S.G.H.; Hoadley, K.A.; Rashid, N.U.; Williams, L.A.; Eaton, S.C.; Chung, A.H.; et al. Virtual Microdissection Identifies Distinct Tumor- and Stroma-Specific Subtypes of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Nat. Genet.* **2015**, *47*, 1168–1178, doi:10.1038/ng.3398.
104. Bailey, P.; Chang, D.K.; Nones, K.; Johns, A.L.; Patch, A.-M.; Gingras, M.-C.; Miller, D.K.; Christ, A.N.; Bruxner, T.J.C.; Quinn, M.C.; et al. Genomic Analyses Identify Molecular Subtypes of Pancreatic Cancer. *Nature* **2016**, *531*, 47–52, doi:10.1038/nature16965.
105. Puleo, F.; Nicolle, R.; Blum, Y.; Cros, J.; Marisa, L.; Demetter, P.; Quertinmont, E.; Svrcek, M.; Elarouci, N.; Iovanna, J.; et al. Stratification of Pancreatic Ductal Adenocarcinomas Based on Tumor and Microenvironment Features. *Gastroenterology* **2018**, *155*, 1999-2013.e3, doi:10.1053/j.gastro.2018.08.033.
106. Macdonald, S.; Macleod, U.; Campbell, N.C.; Weller, D.; Mitchell, E. Systematic Review of Factors Influencing Patient and Practitioner Delay in Diagnosis of Upper Gastrointestinal Cancer. *Br. J. Cancer* **2006**, *94*, 1272–1280, doi:10.1038/sj.bjc.6603089.
107. Walter, F.M.; Mills, K.; Mendonça, S.C.; Abel, G.A.; Basu, B.; Carroll, N.; Ballard, S.; Lancaster, J.; Hamilton, W.; Rubin, G.P.; et al. Symptoms and Patient Factors Associated with Diagnostic Intervals for Pancreatic Cancer (SYMPTOM Pancreatic Study): A Prospective Cohort Study. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* **2016**, *1*, 298–306, doi:10.1016/S2468-1253(16)30079-6.
108. Schmidt-Hansen, M.; Berendse, S.; Hamilton, W. Symptoms of Pancreatic Cancer in Primary Care: A Systematic Review. *Pancreas* **2016**, *45*, 814–818, doi:10.1097/MPA.0000000000000527.
109. Valls, C.; Andía, E.; Sanchez, A.; Fabregat, J.; Pozuelo, O.; Quintero, J.C.; Serrano, T.; Garcia-

Borobia, F.; Jorba, R. Dual-Phase Helical CT of Pancreatic Adenocarcinoma: Assessment of Resectability before Surgery. *AJR Am. J. Roentgenol.* **2002**, *178*, 821–826, doi:10.2214/ajr.178.4.1780821.

110. Al-Hawary, M.M.; Francis, I.R.; Chari, S.T.; Fishman, E.K.; Hough, D.M.; Lu, D.S.; Macari, M.; Megibow, A.J.; Miller, F.H.; Morteale, K.J.; et al. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Radiology Reporting Template: Consensus Statement of the Society of Abdominal Radiology and the American Pancreatic Association. *Radiology* **2014**, *270*, 248–260, doi:10.1148/radiol.13131184.

111. Vachiranubhap, B.; Kim, Y.H.; Balci, N.C.; Semelka, R.C. Magnetic Resonance Imaging of Adenocarcinoma of the Pancreas. *Top. Magn. Reson. Imaging TMRI* **2009**, *20*, 3–9, doi:10.1097/RMR.0b013e3181b48392.

112. DeWitt, J.; Devereaux, B.; Chriswell, M.; McGreevy, K.; Howard, T.; Imperiale, T.F.; Ciaccia, D.; Lane, K.A.; Maglinte, D.; Kopecky, K.; et al. Comparison of Endoscopic Ultrasonography and Multidetector Computed Tomography for Detecting and Staging Pancreatic Cancer. *Ann. Intern. Med.* **2004**, *141*, 753–763, doi:10.7326/0003-4819-141-10-200411160-00006.

113. Puli, S.R.; Singh, S.; Hagedorn, C.H.; Reddy, J.; Olyae, M. Diagnostic Accuracy of EUS for Vascular Invasion in Pancreatic and Periampullary Cancers: A Meta-Analysis and Systematic Review. *Gastrointest. Endosc.* **2007**, *65*, 788–797, doi:10.1016/j.gie.2006.08.028.

114. Ballehaninna, U.K.; Chamberlain, R.S. The Clinical Utility of Serum CA 19-9 in the Diagnosis, Prognosis and Management of Pancreatic Adenocarcinoma: An Evidence Based Appraisal. *J. Gastrointest. Oncol.* **2012**, *3*, 105–119, doi:10.3978/j.issn.2078-6891.2011.021.

115. Wong, D.; Ko, A.H.; Hwang, J.; Venook, A.P.; Bergsland, E.K.; Tempero, M.A. Serum CA19-9 Decline Compared to Radiographic Response as a Surrogate for Clinical Outcomes in Patients with Metastatic Pancreatic Cancer Receiving Chemotherapy. *Pancreas* **2008**, *37*, 269–274, doi:10.1097/MPA.0b013e31816d8185.

116. Bauer, T.M.; El-Rayes, B.F.; Li, X.; Hammad, N.; Philip, P.A.; Shields, A.F.; Zalupski, M.M.; Bekaii-Saab, T. Carbohydrate Antigen 19-9 Is a Prognostic and Predictive Biomarker in Patients with Advanced Pancreatic Cancer Who Receive Gemcitabine-Containing Chemotherapy: A Pooled Analysis of 6 Prospective Trials. *Cancer* **2013**, *119*, 285–292, doi:10.1002/cncr.27734.

117. Pelzer, U.; Hilbig, A.; Sinn, M.; Stieler, J.; Bahra, M.; Dörken, B.; Riess, H. Value of Carbohydrate Antigen 19-9 in Predicting Response and Therapy Control in Patients with Metastatic Pancreatic Cancer Undergoing First-Line Therapy. *Front. Oncol.* **2013**, *3*, 155, doi:10.3389/fonc.2013.00155.

118. Tzeng, C.-W.D.; Balachandran, A.; Ahmad, M.; Lee, J.E.; Krishnan, S.; Wang, H.; Crane, C.H.; Wolff, R.A.; Varadhachary, G.R.; Pisters, P.W.T.; et al. Serum Carbohydrate Antigen 19-9 Represents a Marker of Response to Neoadjuvant Therapy in Patients with Borderline Resectable Pancreatic

Cancer. *HPB* **2014**, *16*, 430–438, doi:10.1111/hpb.12154.

119. Hartwig, W.; Strobel, O.; Hinz, U.; Fritz, S.; Hackert, T.; Roth, C.; Büchler, M.W.; Werner, J. CA19-9 in Potentially Resectable Pancreatic Cancer: Perspective to Adjust Surgical and Perioperative Therapy. *Ann. Surg. Oncol.* **2013**, *20*, 2188–2196, doi:10.1245/s10434-012-2809-1.

120. Mann, D.V.; Edwards, R.; Ho, S.; Lau, W.Y.; Glazer, G. Elevated Tumour Marker CA19-9: Clinical Interpretation and Influence of Obstructive Jaundice. *Eur. J. Surg. Oncol. J. Eur. Soc. Surg. Oncol. Br. Assoc. Surg. Oncol.* **2000**, *26*, 474–479, doi:10.1053/ejso.1999.0925.

121. Parra-Robert, M.; Santos, V.M.; Canis, S.M.; Pla, X.F.; Fradera, J.M.A.; Porto, R.M. Relationship Between CA 19.9 and the Lewis Phenotype: Options to Improve Diagnostic Efficiency. *Anticancer Res.* **2018**, *38*, 5883–5888, doi:10.21873/anticancer.12931.

122. Varadhachary, G.R.; Tamm, E.P.; Abbruzzese, J.L.; Xiong, H.Q.; Crane, C.H.; Wang, H.; Lee, J.E.; Pisters, P.W.T.; Evans, D.B.; Wolff, R.A. Borderline Resectable Pancreatic Cancer: Definitions, Management, and Role of Preoperative Therapy. *Ann. Surg. Oncol.* **2006**, *13*, 1035–1046, doi:10.1245/ASO.2006.08.011.

123. Abrams, R.A.; Lowy, A.M.; O'Reilly, E.M.; Wolff, R.A.; Picozzi, V.J.; Pisters, P.W.T. Combined Modality Treatment of Resectable and Borderline Resectable Pancreas Cancer: Expert Consensus Statement. *Ann. Surg. Oncol.* **2009**, *16*, 1751–1756, doi:10.1245/s10434-009-0413-9.

124. Bockhorn, M.; Uzunoglu, F.G.; Adham, M.; Imrie, C.; Milicevic, M.; Sandberg, A.A.; Asbun, H.J.; Bassi, C.; Büchler, M.; Charnley, R.M.; et al. Borderline Resectable Pancreatic Cancer: A Consensus Statement by the International Study Group of Pancreatic Surgery (ISGPS). *Surgery* **2014**, *155*, 977–988, doi:10.1016/j.surg.2014.02.001.

125. Millikan, K.W.; Deziel, D.J.; Silverstein, J.C.; Kanjo, T.M.; Christein, J.D.; Doolas, A.; Prinz, R.A. Prognostic Factors Associated with Resectable Adenocarcinoma of the Head of the Pancreas. *Am. Surg.* **1999**, *65*, 618–623; discussion 623-624.

126. Okasha, H.; Elkholly, S.; El-Sayed, R.; Wifi, M.-N.; El-Nady, M.; El-Nabawi, W.; El-Dayem, W.A.; Radwan, M.I.; Farag, A.; El-sherif, Y.; et al. Real Time Endoscopic Ultrasound Elastography and Strain Ratio in the Diagnosis of Solid Pancreatic Lesions. *World J. Gastroenterol.* **2017**, *23*, 5962–5968, doi:10.3748/wjg.v23.i32.5962.

127. Palanivelu, C.; Jani, K.; Senthilnathan, P.; Parthasarathi, R.; Rajapandian, S.; Madhankumar, M.V. Laparoscopic Pancreaticoduodenectomy: Technique and Outcomes. *J. Am. Coll. Surg.* **2007**, *205*, 222–230, doi:10.1016/j.jamcollsurg.2007.04.004.

128. Kendrick, M.L.; Cusati, D. Total Laparoscopic Pancreaticoduodenectomy: Feasibility and Outcome in an Early Experience. *Arch. Surg. Chic. Ill 1960* **2010**, *145*, 19–23, doi:10.1001/archsurg.2009.243.

129. Croome, K.P.; Farnell, M.B.; Que, F.G.; Reid-Lombardo, K.M.; Truty, M.J.; Nagorney, D.M.;

Kendrick, M.L. Total Laparoscopic Pancreaticoduodenectomy for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Oncologic Advantages over Open Approaches? *Ann. Surg.* **2014**, *260*, 633–638; discussion 638-640, doi:10.1097/SLA.0000000000000937.

130. Ho, V.; Heslin, M.J. Effect of Hospital Volume and Experience on In-Hospital Mortality for Pancreaticoduodenectomy. *Ann. Surg.* **2003**, *237*, 509–514, doi:10.1097/01.SLA.0000059981.13160.97.

131. Hata, T.; Motoi, F.; Ishida, M.; Naitoh, T.; Katayose, Y.; Egawa, S.; Unno, M. Effect of Hospital Volume on Surgical Outcomes After Pancreaticoduodenectomy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Ann. Surg.* **2016**, *263*, 664–672, doi:10.1097/SLA.0000000000001437.

132. Neoptolemos, J.P.; Dunn, J.A.; Stocken, D.D.; Almond, J.; Link, K.; Beger, H.; Bassi, C.; Falconi, M.; Pederzoli, P.; Dervenis, C.; et al. Adjuvant Chemoradiotherapy and Chemotherapy in Resectable Pancreatic Cancer: A Randomised Controlled Trial. *Lancet Lond. Engl.* **2001**, *358*, 1576–1585, doi:10.1016/s0140-6736(01)06651-x.

133. Oettle, H.; Post, S.; Neuhaus, P.; Gellert, K.; Langrehr, J.; Ridwelski, K.; Schramm, H.; Fahlke, J.; Zuelke, C.; Burkart, C.; et al. Adjuvant Chemotherapy with Gemcitabine vs Observation in Patients Undergoing Curative-Intent Resection of Pancreatic Cancer: A Randomized Controlled Trial. *JAMA* **2007**, *297*, 267–277, doi:10.1001/jama.297.3.267.

134. Neoptolemos, J.P.; Stocken, D.D.; Bassi, C.; Ghaneh, P.; Cunningham, D.; Goldstein, D.; Padbury, R.; Moore, M.J.; Gallinger, S.; Mariette, C.; et al. Adjuvant Chemotherapy With Fluorouracil Plus Folinic Acid vs Gemcitabine Following Pancreatic Cancer Resection: A Randomized Controlled Trial. *JAMA* **2010**, *304*, 1073–1081, doi:10.1001/jama.2010.1275.

135. Neoptolemos, J.P.; Palmer, D.H.; Ghaneh, P.; Psarelli, E.E.; Valle, J.W.; Halloran, C.M.; Faluyi, O.; O'Reilly, D.A.; Cunningham, D.; Wadsley, J.; et al. Comparison of Adjuvant Gemcitabine and Capecitabine with Gemcitabine Monotherapy in Patients with Resected Pancreatic Cancer (ESPAC-4): A Multicentre, Open-Label, Randomised, Phase 3 Trial. *The Lancet* **2017**, *389*, 1011–1024, doi:10.1016/S0140-6736(16)32409-6.

136. Conroy, T.; Hammel, P.; Hebbar, M.; Ben Abdelghani, M.; Wei, A.C.; Raoul, J.-L.; Choné, L.; Francois, E.; Artru, P.; Biagi, J.J.; et al. FOLFIRINOX or Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *379*, 2395–2406, doi:10.1056/NEJMoa1809775.

137. Katz, M.H.G.; Shi, Q.; Ahmad, S.A.; Herman, J.M.; Marsh, R. de W.; Collisson, E.; Schwartz, L.; Frankel, W.; Martin, R.; Conway, W.; et al. Preoperative Modified FOLFIRINOX Treatment Followed by Capecitabine-Based Chemoradiation for Borderline Resectable Pancreatic Cancer: Alliance for Clinical Trials in Oncology Trial A021101. *JAMA Surg.* **2016**, *151*, e161137, doi:10.1001/jamasurg.2016.1137.

138. Versteijne, E.; Suker, M.; Groothuis, K.; Akkermans-Vogelaar, J.M.; Besselink, M.G.; Bonsing,

- B.A.; Buijsen, J.; Busch, O.R.; Creemers, G.-J.M.; van Dam, R.M.; et al. Preoperative Chemoradiotherapy Versus Immediate Surgery for Resectable and Borderline Resectable Pancreatic Cancer: Results of the Dutch Randomized Phase III PREOPANC Trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2020**, *38*, 1763–1773, doi:10.1200/JCO.19.02274.
139. Marthey, L.; Sa-Cunha, A.; Blanc, J.F.; Gauthier, M.; Cueff, A.; Francois, E.; Trouilloud, I.; Malka, D.; Bachet, J.B.; Coriat, R.; et al. FOLFIRINOX for Locally Advanced Pancreatic Adenocarcinoma: Results of an AGEO Multicenter Prospective Observational Cohort. *Ann. Surg. Oncol.* **2015**, *22*, 295–301, doi:10.1245/s10434-014-3898-9.
140. Philip, P.A.; Lacy, J.; Portales, F.; Sobrero, A.; Pazo-Cid, R.; Manzano Mozo, J.L.; Kim, E.J.; Dowden, S.; Zakari, A.; Borg, C.; et al. Nab-Paclitaxel plus Gemcitabine in Patients with Locally Advanced Pancreatic Cancer (LAPACT): A Multicentre, Open-Label Phase 2 Study. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* **2020**, *5*, 285–294, doi:10.1016/S2468-1253(19)30327-9.
141. Chauffert, B.; Mornex, F.; Bonnetain, F.; Rougier, P.; Mariette, C.; Bouché, O.; Bosset, J.F.; Aparicio, T.; Mineur, L.; Azzedine, A.; et al. Phase III Trial Comparing Intensive Induction Chemoradiotherapy (60 Gy, Infusional 5-FU and Intermittent Cisplatin) Followed by Maintenance Gemcitabine with Gemcitabine Alone for Locally Advanced Unresectable Pancreatic Cancer. Definitive Results of the 2000-01 FFCD/SFRO Study. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **2008**, *19*, 1592–1599, doi:10.1093/annonc/mdn281.
142. Loehrer, P.J.; Feng, Y.; Cardenes, H.; Wagner, L.; Brell, J.M.; Cella, D.; Flynn, P.; Ramanathan, R.K.; Crane, C.H.; Alberts, S.R.; et al. Gemcitabine Alone versus Gemcitabine plus Radiotherapy in Patients with Locally Advanced Pancreatic Cancer: An Eastern Cooperative Oncology Group Trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2011**, *29*, 4105–4112, doi:10.1200/JCO.2011.34.8904.
143. Hammel, P.; Huguet, F.; van Laethem, J.-L.; Goldstein, D.; Glimelius, B.; Artru, P.; Borbath, I.; Bouché, O.; Shannon, J.; André, T.; et al. Effect of Chemoradiotherapy vs Chemotherapy on Survival in Patients With Locally Advanced Pancreatic Cancer Controlled After 4 Months of Gemcitabine With or Without Erlotinib: The LAP07 Randomized Clinical Trial. *JAMA* **2016**, *315*, 1844–1853, doi:10.1001/jama.2016.4324.
144. Conroy, T.; Desseigne, F.; Ychou, M.; Bouché, O.; Guimbaud, R.; Bécouarn, Y.; Adenis, A.; Raoul, J.-L.; Gourgou-Bourgade, S.; de la Fouchardière, C.; et al. FOLFIRINOX versus Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2011**, *364*, 1817–1825, doi:10.1056/NEJMoa1011923.
145. Von Hoff, D.D.; Ervin, T.; Arena, F.P.; Chiorean, E.G.; Infante, J.; Moore, M.; Seay, T.; Tjulandin, S.A.; Ma, W.W.; Saleh, M.N.; et al. Increased Survival in Pancreatic Cancer with Nab-Paclitaxel plus Gemcitabine. *N. Engl. J. Med.* **2013**, *369*, 1691–1703, doi:10.1056/NEJMoa1304369.
146. Wang, Y.; Camateros, P.; Cheung, W.Y. A Real-World Comparison of FOLFIRINOX,

Gemcitabine Plus Nab-Paclitaxel, and Gemcitabine in Advanced Pancreatic Cancers. *J. Gastrointest. Cancer* **2019**, *50*, 62–68, doi:10.1007/s12029-017-0028-5.

147. Chan, K.K.W.; Guo, H.; Cheng, S.; Beca, J.M.; Redmond-Misner, R.; Isaranuwachai, W.; Qiao, L.; Earle, C.; Berry, S.R.; Biagi, J.J.; et al. Real-World Outcomes of FOLFIRINOX vs Gemcitabine and Nab-Paclitaxel in Advanced Pancreatic Cancer: A Population-Based Propensity Score-Weighted Analysis. *Cancer Med.* **2020**, *9*, 160–169, doi:10.1002/cam4.2705.

148. Wang-Gillam, A.; Li, C.-P.; Bodoky, G.; Dean, A.; Shan, Y.-S.; Jameson, G.; Macarulla, T.; Lee, K.-H.; Cunningham, D.; Blanc, J.F.; et al. Nanoliposomal Irinotecan with Fluorouracil and Folinic Acid in Metastatic Pancreatic Cancer after Previous Gemcitabine-Based Therapy (NAPOLI-1): A Global, Randomised, Open-Label, Phase 3 Trial. *Lancet Lond. Engl.* **2016**, *387*, 545–557, doi:10.1016/S0140-6736(15)00986-1.

149. Waddell, N.; Pajic, M.; Patch, A.-M.; Chang, D.K.; Kassahn, K.S.; Bailey, P.; Johns, A.L.; Miller, D.; Nones, K.; Quek, K.; et al. Whole Genomes Redefine the Mutational Landscape of Pancreatic Cancer. *Nature* **2015**, *518*, 495–501, doi:10.1038/nature14169.

150. Holter, S.; Borgida, A.; Dodd, A.; Grant, R.; Semotiuk, K.; Hedley, D.; Dhani, N.; Narod, S.; Akbari, M.; Moore, M.; et al. Germline BRCA Mutations in a Large Clinic-Based Cohort of Patients With Pancreatic Adenocarcinoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2015**, *33*, 3124–3129, doi:10.1200/JCO.2014.59.7401.

151. Domchek, S.M.; Aghajanian, C.; Shapira-Frommer, R.; Schmutzler, R.K.; Audeh, M.W.; Friedlander, M.; Balmaña, J.; Mitchell, G.; Fried, G.; Stemmer, S.M.; et al. Efficacy and Safety of Olaparib Monotherapy in Germline BRCA1/2 Mutation Carriers with Advanced Ovarian Cancer and Three or More Lines of Prior Therapy. *Gynecol. Oncol.* **2016**, *140*, 199–203, doi:10.1016/j.ygyno.2015.12.020.

152. Shroff, R.T.; Hendifar, A.; McWilliams, R.R.; Geva, R.; Epelbaum, R.; Rolfe, L.; Goble, S.; Lin, K.K.; Biankin, A.V.; Giordano, H.; et al. Rucaparib Monotherapy in Patients With Pancreatic Cancer and a Known Deleterious BRCA Mutation. *JCO Precis. Oncol.* **2018**, *2018*, doi:10.1200/PO.17.00316.

153. Golan, T.; Hammel, P.; Reni, M.; Van Cutsem, E.; Macarulla, T.; Hall, M.J.; Park, J.-O.; Hochhauser, D.; Arnold, D.; Oh, D.-Y.; et al. Maintenance Olaparib for Germline BRCA-Mutated Metastatic Pancreatic Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2019**, *381*, 317–327, doi:10.1056/NEJMoa1903387.

154. Research, C. for D.E. and FDA Approves Olaparib for GBRCAM Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma. *FDA* **2019**.

155. Skrzypski, M.; Sassek, M.; Abdelmessih, S.; Mergler, S.; Grötzinger, C.; Metzke, D.; Wojciechowicz, T.; Nowak, K.W.; Strowski, M.Z. Capsaicin Induces Cytotoxicity in Pancreatic Neuroendocrine Tumor Cells via Mitochondrial Action. *Cell. Signal.* **2014**, *26*, 41–48,

doi:10.1016/j.cellsig.2013.09.014.

156. Wang, Q.; Luo, Y.; Liu, D.; Wang, X.; Ye, X.; Li, N.; Zhang, Y.; Song, J. RESVERATROL EXERTS AN ANTIPROLIFERATIVE EFFECT IN PANCREATIC CANCER CELLS BY INDUCING MITOCHONDRIAL-MEDIATED APOPTOSIS. *Acta Pol. Pharm. - Drug Res.* **2021**, *77*, 871–879, doi:10.32383/appdr/130296.
157. Abdel Hadi, N.; Reyes-Castellanos, G.; Carrier, A. Targeting Redox Metabolism in Pancreatic Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1534, doi:10.3390/ijms22041534.
158. Cheung, E.C.; DeNicola, G.M.; Nixon, C.; Blyth, K.; Labuschagne, C.F.; Tuveson, D.A.; Vousden, K.H. Dynamic ROS Control by TIGAR Regulates the Initiation and Progression of Pancreatic Cancer. *Cancer Cell* **2020**, *37*, 168-182.e4, doi:10.1016/j.ccell.2019.12.012.
159. Ratajczak, K.; Glatzel-Plucińska, N.; Ratajczak-Wielgomas, K.; Nowińska, K.; Borska, S. Effect of Resveratrol Treatment on Human Pancreatic Cancer Cells through Alterations of Bcl-2 Family Members. *Mol. Basel Switz.* **2021**, *26*, 6560, doi:10.3390/molecules26216560.
160. Vendrely, V.; Peuchant, E.; Buscail, E.; Moranvillier, I.; Rousseau, B.; Bedel, A.; Brillac, A.; de Verneuil, H.; Moreau-Gaudry, F.; Dabernat, S. Resveratrol and Capsaicin Used Together as Food Complements Reduce Tumor Growth and Rescue Full Efficiency of Low Dose Gemcitabine in a Pancreatic Cancer Model. *Cancer Lett.* **2017**, *390*, 91–102, doi:10.1016/j.canlet.2017.01.002.
161. Li, W.; Sun, L.; Lei, J.; Wu, Z.; Ma, Q.; Wang, Z. Curcumin Inhibits Pancreatic Cancer Cell Invasion and EMT by Interfering with Tumor-stromal Crosstalk under Hypoxic Conditions via the IL-6/ERK/NF- κ B Axis. *Oncol. Rep.* **2020**, *44*, 382–392, doi:10.3892/or.2020.7600.
162. Li, W.; Ma, J.; Ma, Q.; Li, B.; Han, L.; Liu, J.; Xu, Q.; Duan, W.; Yu, S.; Wang, F.; et al. Resveratrol Inhibits the Epithelial-Mesenchymal Transition of Pancreatic Cancer Cells Via Suppression of the PI-3K/Akt/NF-KB Pathway. *Curr. Med. Chem.* **2013**, *20*, 4185–4194.
163. Pandey, P.R.; Okuda, H.; Watabe, M.; Pai, S.K.; Liu, W.; Kobayashi, A.; Xing, F.; Fukuda, K.; Hirota, S.; Sugai, T.; et al. Resveratrol Suppresses Growth of Cancer Stem-like Cells by Inhibiting Fatty Acid Synthase. *Breast Cancer Res. Treat.* **2011**, *130*, 387–398, doi:10.1007/s10549-010-1300-6.
164. Wang, J.; Wang, C.; Bu, G. Curcumin Inhibits the Growth of Liver Cancer Stem Cells through the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Protein Kinase B/Mammalian Target of Rapamycin Signaling Pathway. *Exp. Ther. Med.* **2018**, *15*, 3650–3658, doi:10.3892/etm.2018.5805.
165. Peng, L.; Jiang, D. Resveratrol Eliminates Cancer Stem Cells of Osteosarcoma by STAT3 Pathway Inhibition. *PloS One* **2018**, *13*, e0205918, doi:10.1371/journal.pone.0205918.
166. Qin, T.; Cheng, L.; Xiao, Y.; Qian, W.; Li, J.; Wu, Z.; Wang, Z.; Xu, Q.; Duan, W.; Wong, L.; et al. NAF-1 Inhibition by Resveratrol Suppresses Cancer Stem Cell-Like Properties and the Invasion of Pancreatic Cancer. *Front. Oncol.* **2020**, *10*, 1038, doi:10.3389/fonc.2020.01038.
167. Cheng, L.; Yan, B.; Chen, K.; Jiang, Z.; Zhou, C.; Cao, J.; Qian, W.; Li, J.; Sun, L.; Ma, J.; et

al. Resveratrol-Induced Downregulation of NAF-1 Enhances the Sensitivity of Pancreatic Cancer Cells to Gemcitabine via the ROS/Nrf2 Signaling Pathways. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2018**, *2018*, 9482018, doi:10.1155/2018/9482018.

168. Xiao, Y.; Qin, T.; Sun, L.; Qian, W.; Li, J.; Duan, W.; Lei, J.; Wang, Z.; Ma, J.; Li, X.; et al. Resveratrol Ameliorates the Malignant Progression of Pancreatic Cancer by Inhibiting Hypoxia-Induced Pancreatic Stellate Cell Activation. *Cell Transplant.* **2020**, *29*, 963689720929987, doi:10.1177/0963689720929987.

169. Liu, P.; Ying, Q.; Liu, H.; Yu, S.-Q.; Bu, L.-P.; Shao, L.; Li, X.-Y. Curcumin Enhances Anti-cancer Efficacy of Either Gemcitabine or Docetaxel on Pancreatic Cancer Cells. *Oncol. Rep.* **2020**, *44*, 1393–1402, doi:10.3892/or.2020.7713.

170. Schwarz, K.; Dobiasch, S.; Nguyen, L.; Schilling, D.; Combs, S.E. Modification of Radiosensitivity by Curcumin in Human Pancreatic Cancer Cell Lines. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 3815, doi:10.1038/s41598-020-60765-1.

171. Rein, M.J.; Renouf, M.; Cruz-Hernandez, C.; Actis-Goretta, L.; Thakkar, S.K.; da Silva Pinto, M. Bioavailability of Bioactive Food Compounds: A Challenging Journey to Bioefficacy. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2013**, *75*, 588–602, doi:10.1111/j.1365-2125.2012.04425.x.

172. Alemzadeh, I.; Hajiabbas, M.; Pakzad, H.; Dehkordi, S.; Vossoughi, A. Encapsulation of Food Components and Bioactive Ingredients and Targeted Release. *Int. J. Eng.* **2020**, *33*, doi:10.5829/IJE.2020.33.01A.01.

173. Mousa, D.S.; El-Far, A.H.; Saddiq, A.A.; Sudha, T.; Mousa, S.A. Nanoformulated Bioactive Compounds Derived from Different Natural Products Combat Pancreatic Cancer Cell Proliferation. *Int. J. Nanomedicine* **2020**, *15*, 2259–2268, doi:10.2147/IJN.S238256.

174. Inbaraj, B.S.; Hua, L.-H.; Chen, B.-H. Comparative Study on Inhibition of Pancreatic Cancer Cells by Resveratrol Gold Nanoparticles and a Resveratrol Nanoemulsion Prepared from Grape Skin. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 1871, doi:10.3390/pharmaceutics13111871.

175. Xu, H.; Li, Y.; Paxton, J.W.; Wu, Z. Co-Delivery Using PH-Sensitive Liposomes to Pancreatic Cancer Cells: The Effects of Curcumin on Cellular Concentration and Pharmacokinetics of Gemcitabine. *Pharm. Res.* **2021**, *38*, 1209–1219, doi:10.1007/s11095-021-03072-2.

176. Jadid, M.F.S.; Shademan, B.; Chavoshi, R.; Seyyedsani, N.; Aghaei, E.; Taheri, E.; Goleij, P.; Hajazimian, S.; Karamad, V.; Behroozi, J.; et al. Enhanced Anticancer Potency of Hydroxytyrosol and Curcumin by PLGA-PAA Nano-Encapsulation on PANC-1 Pancreatic Cancer Cell Line. *Environ. Toxicol.* **2021**, *36*, 1043–1051, doi:10.1002/tox.23103.

177. Roy, S.K.; Chen, Q.; Fu, J.; Shankar, S.; Srivastava, R.K. Resveratrol Inhibits Growth of Orthotopic Pancreatic Tumors through Activation of FOXO Transcription Factors. *PLoS One* **2011**, *6*, e25166, doi:10.1371/journal.pone.0025166.

178. Guo, Y.; Tong, Y.; Zhu, H.; Xiao, Y.; Guo, H.; Shang, L.; Zheng, W.; Ma, S.; Liu, X.; Bai, Y. Quercetin Suppresses Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Progression via Inhibition of SHH and TGF- β /Smad Signaling Pathways. *Cell Biol. Toxicol.* **2021**, *37*, 479–496, doi:10.1007/s10565-020-09562-0.
179. Thakkar, A.; Desai, P.; Chenreddy, S.; Modi, J.; Thio, A.; Khamas, W.; Ann, D.; Wang, J.; Prabhu, S. Novel Nano-Drug Combination Therapeutic Regimen Demonstrates Significant Efficacy in the Transgenic Mouse Model of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Am. J. Cancer Res.* **2018**, *8*, 2005–2019.
180. Khan, S.; Setua, S.; Kumari, S.; Dan, N.; Massey, A.; Hafeez, B.B.; Yallapu, M.M.; Stiles, Z.E.; Alabkaa, A.; Yue, J.; et al. Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles of Curcumin Enhance Gemcitabine Therapeutic Response in Pancreatic Cancer. *Biomaterials* **2019**, *208*, 83–97, doi:10.1016/j.biomaterials.2019.04.005.
181. Fan, P.; Zhang, Y.; Liu, L.; Zhao, Z.; Yin, Y.; Xiao, X.; Bauer, N.; Gladkich, J.; Mattern, J.; Gao, C.; et al. Continuous Exposure of Pancreatic Cancer Cells to Dietary Bioactive Agents Does Not Induce Drug Resistance Unlike Chemotherapy. *Cell Death Dis.* **2016**, *7*, e2246, doi:10.1038/cddis.2016.157.
182. Lev-Ari, S.; Zinger, H.; Kazanov, D.; Yona, D.; Ben-Yosef, R.; Starr, A.; Figer, A.; Arber, N. Curcumin Synergistically Potentiates the Growth Inhibitory and Pro-Apoptotic Effects of Celecoxib in Pancreatic Adenocarcinoma Cells. *Biomed. Pharmacother. Biomedicine Pharmacother.* **2005**, *59 Suppl 2*, S276-280, doi:10.1016/s0753-3322(05)80045-9.
183. Lozanovski, V.J.; Houben, P.; Hinz, U.; Hackert, T.; Herr, I.; Schemmer, P. Pilot Study Evaluating Broccoli Sprouts in Advanced Pancreatic Cancer (POUDER Trial) - Study Protocol for a Randomized Controlled Trial. *Trials* **2014**, *15*, 204, doi:10.1186/1745-6215-15-204.
184. Khatoon, E.; Banik, K.; Harsha, C.; Sailo, B.L.; Thakur, K.K.; Khwairakpam, A.D.; Vikkurthi, R.; Devi, T.B.; Gupta, S.C.; Kunnumakkara, A.B. Phytochemicals in Cancer Cell Chemosensitization: Current Knowledge and Future Perspectives. *Semin. Cancer Biol.* **2022**, *80*, 306–339, doi:10.1016/j.semcancer.2020.06.014.
185. Buhrmann, C.; Shayan, P.; Kraehe, P.; Popper, B.; Goel, A.; Shakibaei, M. Resveratrol Induces Chemosensitization to 5-Fluorouracil through up-Regulation of Intercellular Junctions, Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Apoptosis in Colorectal Cancer. *Biochem. Pharmacol.* **2015**, *98*, 51–68, doi:10.1016/j.bcp.2015.08.105.
186. Yoshida, K.; Toden, S.; Ravindranathan, P.; Han, H.; Goel, A. Curcumin Sensitizes Pancreatic Cancer Cells to Gemcitabine by Attenuating PRC2 Subunit EZH2, and the LncRNA PVT1 Expression. *Carcinogenesis* **2017**, *38*, 1036–1046, doi:10.1093/carcin/bgx065.
187. Buhrmann, C.; Yazdi, M.; Popper, B.; Shayan, P.; Goel, A.; Aggarwal, B.B.; Shakibaei, M. Resveratrol Chemosensitizes TNF- β -Induced Survival of 5-FU-Treated Colorectal Cancer Cells.

Nutrients **2018**, *10*, 888, doi:10.3390/nu10070888.

188. Zhou, C.; Qian, W.; Ma, J.; Cheng, L.; Jiang, Z.; Yan, B.; Li, J.; Duan, W.; Sun, L.; Cao, J.; et al. Resveratrol Enhances the Chemotherapeutic Response and Reverses the Stemness Induced by Gemcitabine in Pancreatic Cancer Cells via Targeting SREBP1. *Cell Prolif.* **2019**, *52*, e12514, doi:10.1111/cpr.12514.

189. Bolus, N.E. Basic Review of Radiation Biology and Terminology. *J. Nucl. Med. Technol.* **2001**, *29*, 67–73; test 76–77.

190. Vogin, G.; Foray, N. The Law of Bergonié and Tribondeau: A Nice Formula for a First Approximation. *Int. J. Radiat. Biol.* **2013**, *89*, 2–8, doi:10.3109/09553002.2012.717732.

191. Le Caër, S. Water Radiolysis: Influence of Oxide Surfaces on H₂ Production under Ionizing Radiation. *Water* **2011**, *3*, 235–253, doi:10.3390/w3010235.

192. Ladas, E.J.; Jacobson, J.S.; Kennedy, D.D.; Teel, K.; Fleischauer, A.; Kelly, K.M. Antioxidants and Cancer Therapy: A Systematic Review. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2004**, *22*, 517–528, doi:10.1200/JCO.2004.03.086.

193. Lomax, M.E.; Folkes, L.K.; O'Neill, P. Biological Consequences of Radiation-Induced DNA Damage: Relevance to Radiotherapy. *Clin. Oncol. R. Coll. Radiol. G. B.* **2013**, *25*, 578–585, doi:10.1016/j.clon.2013.06.007.

194. Chapman, J.D.; Stobbe, C.C.; Gales, T.; Das, I.J.; Zellmer, D.L.; Biade, S.; Matsumoto, Y. Condensed Chromatin and Cell Inactivation by Single-Hit Kinetics. *Radiat. Res.* **1999**, *151*, 433–441.

195. O'Driscoll, M.; Jeggo, P.A. The Role of Double-Strand Break Repair - Insights from Human Genetics. *Nat. Rev. Genet.* **2006**, *7*, 45–54, doi:10.1038/nrg1746.

196. Sancar, A.; Lindsey-Boltz, L.A.; Unsal-Kagmaz, K.; Linn, S. Molecular Mechanisms of Mammalian DNA Repair and the DNA Damage Checkpoints. *Annu. Rev. Biochem.* **2004**, *73*, 39–85, doi:10.1146/annurev.biochem.73.011303.073723.

197. Kaplan, H.S. Cellular Effects of Ionizing Radiation. *Bull. N. Y. Acad. Med.* **1960**, *36*, 649–661.

198. Adams, J.M.; Cory, S. The Bcl-2 Protein Family: Arbiters of Cell Survival. *Science* **1998**, *281*, 1322–1326, doi:10.1126/science.281.5381.1322.

199. Thornberry, N.A.; Lazebnik, Y. Caspases: Enemies Within. *Science* **1998**, *281*, 1312–1316, doi:10.1126/science.281.5381.1312.

200. Polyak, K.; Xia, Y.; Zweier, J.L.; Kinzler, K.W.; Vogelstein, B. A Model for P53-Induced Apoptosis. *Nature* **1997**, *389*, 300–305, doi:10.1038/38525.

201. Radford, I.R. DNA Lesion Complexity and Induction of Apoptosis by Ionizing Radiation. *Int. J. Radiat. Biol.* **2002**, *78*, 457–466, doi:10.1080/09553000110120337.

202. Woo, R.A.; Jack, M.T.; Xu, Y.; Burma, S.; Chen, D.J.; Lee, P.W.K. DNA Damage-Induced Apoptosis Requires the DNA-Dependent Protein Kinase, and Is Mediated by the Latent Population of

- P53. *EMBO J.* **2002**, *21*, 3000–3008, doi:10.1093/emboj/cdf307.
203. Agbele, A.T.; Fasoro, O.J.; Fabamise, O.M.; Oluyide, O.O.; Idolor, O.R.; Bamise, E.A. Protection Against Ionizing Radiation-Induced Normal Tissue Damage by Resveratrol: A Systematic Review. *Eurasian J. Med.* **2020**, *52*, 298–303, doi:10.5152/eurasianjmed.2020.20143.
204. Little, J.B.; Nagasawa, H. Effect of Confluent Holding on Potentially Lethal Damage Repair, Cell Cycle Progression, and Chromosomal Aberrations in Human Normal and Ataxia-Telangiectasia Fibroblasts. *Radiat. Res.* **1985**, *101*, 81–93.
205. Little, J.B. Changing Views of Cellular Radiosensitivity. *Radiat. Res.* **1994**, *140*, 299–311, doi:10.2307/3579106.
206. Kuerbitz, S.J.; Plunkett, B.S.; Walsh, W.V.; Kastan, M.B. Wild-Type P53 Is a Cell Cycle Checkpoint Determinant Following Irradiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, *89*, 7491–7495.
207. Li, C.Y.; Nagasawa, H.; Dahlberg, W.K.; Little, J.B. Diminished Capacity for P53 in Mediating a Radiation-Induced G1 Arrest in Established Human Tumor Cell Lines. *Oncogene* **1995**, *11*, 1885–1892.
208. Sheen, J.-H.; Dickson, R.B. Overexpression of C-Myc Alters G1/S Arrest Following Ionizing Radiation. *Mol. Cell. Biol.* **2002**, *22*, 1819–1833, doi:10.1128/MCB.22.6.1819-1833.2002.
209. Amintas, S.; Dupin, C.; Boutin, J.; Beaumont, P.; Moreau-Gaudry, F.; Bedel, A.; Krisa, S.; Vendrely, V.; Dabernat, S. Bioactive Food Components for Colorectal Cancer Prevention and Treatment: A Good Match. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2022**, *0*, 1–15, doi:10.1080/10408398.2022.2036095.
210. Colucci, F.; Soudais, C.; Rosmaraki, E.; Vanes, L.; Tybulewicz, V.L.; Di Santo, J.P. Dissecting NK Cell Development Using a Novel Alymphoid Mouse Model: Investigating the Role of the c-Abl Proto-Oncogene in Murine NK Cell Differentiation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **1999**, *162*, 2761–2765.
211. Smith, H. Humane Endpoints in Animal Experiments for Biomedical Research. *Aust. Vet. J.* **2000**, *78*, 482–482, doi:10.1111/j.1751-0813.2000.tb11867.x.
212. Juan, M.E.; Wenzel, U.; Daniel, H.; Planas, J.M. Resveratrol Induces Apoptosis through ROS-Dependent Mitochondria Pathway in HT-29 Human Colorectal Carcinoma Cells. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 4813–4818, doi:10.1021/jf800175a.
213. Karimi Dermani, F.; Saidijam, M.; Amini, R.; Mahdavinezhad, A.; Heydari, K.; Najafi, R. Resveratrol Inhibits Proliferation, Invasion, and Epithelial-Mesenchymal Transition by Increasing MiR-200c Expression in HCT-116 Colorectal Cancer Cells. *J. Cell. Biochem.* **2017**, *118*, 1547–1555, doi:10.1002/jcb.25816.
214. Kim, Y.M.; Hwang, J.-T.; Kwak, D.W.; Lee, Y.K.; Park, O.J. Involvement of AMPK Signaling Cascade in Capsaicin-Induced Apoptosis of HT-29 Colon Cancer Cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2007**,

1095, 496–503, doi:10.1196/annals.1397.053.

215. Jin, J.; Lin, G.; Huang, H.; Xu, D.; Yu, H.; Ma, X.; Zhu, L.; Ma, D.; Jiang, H. Capsaicin Mediates Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Human Colon Cancer Cells via Stabilizing and Activating P53. *Int. J. Biol. Sci.* **2014**, *10*, 285–295, doi:10.7150/ijbs.7730.
216. Macdonald, J.S. Toxicity of 5-Fluorouracil. *Oncol. Williston Park N* **1999**, *13*, 33–34.
217. HALACLI, S.O.; CANPINAR, H.; CIMEN, E.; SUNGUROGLU, A. Effects of Gamma Irradiation on Cell Cycle, Apoptosis and Telomerase Activity in P53 Wild-Type and Deficient HCT116 Colon Cancer Cell Lines. *Oncol. Lett.* **2013**, *6*, 807–810, doi:10.3892/ol.2013.1441.
218. Robinson, B.W.; Im, M.M.; Ljungman, M.; Praz, F.; Shewach, D.S. Enhanced Radiosensitization with Gemcitabine in Mismatch Repair-Deficient HCT116 Cells. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 6935–6941.
219. Xu, X.-T.; Hu, W.-T.; Zhou, J.-Y.; Tu, Y. Celecoxib Enhances the Radiosensitivity of HCT116 Cells in a COX-2 Independent Manner by up-Regulating BCCIP. *Am. J. Transl. Res.* **2017**, *9*, 1088–1100.
220. Khaleel, S.A.; Al-Abd, A.M.; Ali, A.A.; Abdel-Naim, A.B. Didox and Resveratrol Sensitize Colorectal Cancer Cells to Doxorubicin via Activating Apoptosis and Ameliorating P-Glycoprotein Activity. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 36855, doi:10.1038/srep36855.
221. Jie, K.Y.; Wei, C.L.; Min, Z.; Ping, G.J.; Ying, W.; Dan, Z.; Sen, Z. Resveratrol Enhances Chemosensitivity of Renal Cell Carcinoma to Paclitaxel. *Front. Biosci. Landmark Ed.* **2019**, *24*, 1452–1461, doi:10.2741/4790.
222. Fontecave, M.; Lepoivre, M.; Elleingand, E.; Gerez, C.; Guittet, O. Resveratrol, a Remarkable Inhibitor of Ribonucleotide Reductase. *FEBS Lett.* **1998**, *421*, 277–279, doi:10.1016/s0014-5793(97)01572-x.
223. Wu, Y.; Hsieh, T.-C.; Wu, J.M.; Wang, X.; Christopher, J.S.; Pham, A.H.; Swaby, J.D.-L.; Lou, L.; Xie, Z.-R. Elucidating the Inhibitory Effect of Resveratrol and Its Structural Analogs on Selected Nucleotide-Related Enzymes. *Biomolecules* **2020**, *10*, E1223, doi:10.3390/biom10091223.
224. Lévesque, E.; Turgeon, D.; Carrier, J.S.; Montminy, V.; Beaulieu, M.; Bélanger, A. Isolation and Characterization of the UGT2B28 CDNA Encoding a Novel Human Steroid Conjugating UDP-Glucuronosyltransferase. *Biochemistry* **2001**, *40*, 3869–3881, doi:10.1021/bi002607y.
225. Radomska-Pandya, A.; Ouzzine, M.; Fournel-Gigleux, S.; Magdalou, J. Structure of UDP-Glucuronosyltransferases in Membranes. In *Methods in Enzymology; Phase II Conjugation Enzymes and Transport Systems*; Academic Press, 2005; Vol. 400, pp. 116–147.
226. Fujiwara, R.; Yokoi, T.; Nakajima, M. Structure and Protein–Protein Interactions of Human UDP-Glucuronosyltransferases. *Front. Pharmacol.* **2016**, *7*, 388, doi:10.3389/fphar.2016.00388.
227. Tukey, R.H.; Tephly, T.R. Purification of Properties of Rabbit Liver Estrone and P-Nitrophenol

UDP-Glucuronyltransferases. *Arch. Biochem. Biophys.* **1981**, *209*, 565–578, doi:10.1016/0003-9861(81)90314-3.

228. Matern, H.; Matern, S.; Gerok, W. Isolation and Characterization of Rat Liver Microsomal UDP-Glucuronosyltransferase Activity toward Chenodeoxycholic Acid and Testosterone as a Single Form of Enzyme. *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 7422–7429.

229. Kurkela, M.; Hirvonen, J.; Kostianen, R.; Finel, M. The Interactions between the N-Terminal and C-Terminal Domains of the Human UDP-Glucuronosyltransferases Are Partly Isoform-Specific, and May Involve Both Monomers. *Biochem. Pharmacol.* **2004**, *68*, 2443–2450, doi:10.1016/j.bcp.2004.08.019.

230. Girard, H.; Lévesque, E.; Bellemare, J.; Journault, K.; Caillier, B.; Guillemette, C. Genetic Diversity at the UGT1 Locus Is Amplified by a Novel 3' Alternative Splicing Mechanism Leading to Nine Additional UGT1A Proteins That Act as Regulators of Glucuronidation Activity. *Pharmacogenet. Genomics* **2007**, *17*, 1077–1089, doi:10.1097/FPC.0b013e3282f1f118.

231. Tourancheau, A.; Margaillan, G.; Rouleau, M.; Gilbert, I.; Villeneuve, L.; Lévesque, E.; Droit, A.; Guillemette, C. Unravelling the Transcriptomic Landscape of the Major Phase II UDP-Glucuronosyltransferase Drug Metabolizing Pathway Using Targeted RNA Sequencing. *Pharmacogenomics J.* **2016**, *16*, 60–70, doi:10.1038/tpj.2015.20.

232. Hu, D.G.; Meech, R.; McKinnon, R.A.; Mackenzie, P.I. Transcriptional Regulation of Human UDP-Glucuronosyltransferase Genes. *Drug Metab. Rev.* **2014**, *46*, 421–458, doi:10.3109/03602532.2014.973037.

233. Rouleau, M.; Tourancheau, A.; Girard-Bock, C.; Villeneuve, L.; Vaucher, J.; Duperré, A.-M.; Audet-Delage, Y.; Gilbert, I.; Popa, I.; Droit, A.; et al. Divergent Expression and Metabolic Functions of Human Glucuronosyltransferases through Alternative Splicing. *Cell Rep.* **2016**, *17*, 114–124, doi:10.1016/j.celrep.2016.08.077.

234. Mackenzie, P.I.; Gregory, P.A.; Lewinsky, R.H.; Yasmin, S.N.; Height, T.; McKinnon, R.A.; Gardner-Stephen, D.A. Polymorphic Variations in the Expression of the Chemical Detoxifying UDP Glucuronosyltransferases. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2005**, *207*, 77–83, doi:10.1016/j.taap.2004.12.026.

235. Edavana, V.K.; Dhakal, I.B.; Williams, S.; Penney, R.; Boysen, G.; Yao-Borengasser, A.; Kadlubar, S. Potential Role of UGT1A4 Promoter SNPs in Anastrozole Pharmacogenomics. *Drug Metab. Dispos.* **2013**, *41*, 870–877, doi:10.1124/dmd.112.048157.

236. Tourancheau, A.; Rouleau, M.; Gouaque-Olarte, S.; Villeneuve, L.; Gilbert, I.; Droit, A.; Guillemette, C. Quantitative Profiling of the UGT Transcriptome in Human Drug-Metabolizing Tissues. *Pharmacogenomics J.* **2018**, *18*, 251–261, doi:10.1038/tpj.2017.5.

237. Meech, R.; Hu, D.G.; McKinnon, R.A.; Mubarakah, S.N.; Haines, A.Z.; Nair, P.C.; Rowland,

- A.; Mackenzie, P.I. The UDP-Glycosyltransferase (UGT) Superfamily: New Members, New Functions, and Novel Paradigms. *Physiol. Rev.* **2019**, *99*, 1153–1222, doi:10.1152/physrev.00058.2017.
238. Meech, R.; Miners, J.O.; Lewis, B.C.; Mackenzie, P.I. The Glycosidation of Xenobiotics and Endogenous Compounds: Versatility and Redundancy in the UDP Glycosyltransferase Superfamily. *Pharmacol. Ther.* **2012**, *134*, 200–218, doi:10.1016/j.pharmthera.2012.01.009.
239. Rowland, A.; Miners, J.O.; Mackenzie, P.I. The UDP-Glucuronosyltransferases: Their Role in Drug Metabolism and Detoxification. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2013**, *45*, 1121–1132, doi:10.1016/j.biocel.2013.02.019.
240. Gagnon, J.-F.; Bernard, O.; Villeneuve, L.; Têtu, B.; Guillemette, C. Irinotecan Inactivation Is Modulated by Epigenetic Silencing of UGT1A1 in Colon Cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2006**, *12*, 1850–1858, doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-2130.
241. Bélanger, A.-S.; Tojcic, J.; Harvey, M.; Guillemette, C. Regulation of UGT1A1 and HNF1 Transcription Factor Gene Expression by DNA Methylation in Colon Cancer Cells. *BMC Mol. Biol.* **2010**, *11*, 9, doi:10.1186/1471-2199-11-9.
242. Oda, S.; Fukami, T.; Yokoi, T.; Nakajima, M. Epigenetic Regulation Is a Crucial Factor in the Repression of UGT1A1 Expression in the Human Kidney. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* **2013**, *41*, 1738–1743, doi:10.1124/dmd.113.051201.
243. Yasar, U.; Greenblatt, D.J.; Guillemette, C.; Court, M.H. Evidence for Regulation of UDP-Glucuronosyltransferase (UGT) 1A1 Protein Expression and Activity via DNA Methylation in Healthy Human Livers. *J. Pharm. Pharmacol.* **2013**, *65*, 874–883, doi:10.1111/jphp.12053.
244. Mackenzie, P.I.; Hu, D.G.; Gardner-Stephen, D.A. The Regulation of UDP-Glucuronosyltransferase Genes by Tissue-Specific and Ligand-Activated Transcription Factors. *Drug Metab. Rev.* **2010**, *42*, 99–109, doi:10.3109/03602530903209544.
245. Gregory, P.A.; Lewinsky, R.H.; Gardner-Stephen, D.A.; Mackenzie, P.I. Coordinate Regulation of the Human UDP-Glucuronosyltransferase 1A8, 1A9, and 1A10 Genes by Hepatocyte Nuclear Factor 1alpha and the Caudal-Related Homeodomain Protein 2. *Mol. Pharmacol.* **2004**, *65*, 953–963, doi:10.1124/mol.65.4.953.
246. Basu, N.K.; Kole, L.; Owens, I.S. Evidence for Phosphorylation Requirement for Human Bilirubin UDP-Glucuronosyltransferase (UGT1A1) Activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *303*, 98–104, doi:10.1016/s0006-291x(03)00241-9.
247. Basu, N.K.; Kole, L.; Basu, M.; Chakraborty, K.; Mitra, P.S.; Owens, I.S. The Major Chemical-Detoxifying System of UDP-Glucuronosyltransferases Requires Regulated Phosphorylation Supported by Protein Kinase C. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 23048–23061, doi:10.1074/jbc.M800032200.
248. Mitra, P.S.; Basu, N.K.; Basu, M.; Chakraborty, S.; Saha, T.; Owens, I.S. Regulated Phosphorylation of a Major UDP-Glucuronosyltransferase Isozyme by Tyrosine Kinases Dictates

Endogenous Substrate Selection for Detoxification. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 1639–1648, doi:10.1074/jbc.M110.165126.

249. Chakraborty, S.K.; Basu, N.K.; Jana, S.; Basu, M.; Raychoudhuri, A.; Owens, I.S. Protein Kinase C α and Src Kinase Support Human Prostate-Distributed Dihydrotestosterone-Metabolizing UDP-Glucuronosyltransferase 2B15 Activity*. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 24387–24396, doi:10.1074/jbc.M111.335067.

250. Guillemette, C.; Lévesque, É.; Rouleau, M. Pharmacogenomics of Human Uridine Diphospho-Glucuronosyltransferases and Clinical Implications. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2014**, *96*, 324–339, doi:10.1038/clpt.2014.126.

251. Bosma, P.J.; Seppen, J.; Goldhoorn, B.; Bakker, C.; Oude Elferink, R.P.; Chowdhury, J.R.; Chowdhury, N.R.; Jansen, P.L. Bilirubin UDP-Glucuronosyltransferase 1 Is the Only Relevant Bilirubin Glucuronidating Isoform in Man. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 17960–17964.

252. Gall, W.E.; Zawada, G.; Mojarrabi, B.; Tephly, T.R.; Green, M.D.; Coffman, B.L.; Mackenzie, P.I.; Radomska-Pandya, A. Differential Glucuronidation of Bile Acids, Androgens and Estrogens by Human UGT1A3 and 2B7. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1999**, *70*, 101–108, doi:10.1016/s0960-0760(99)00088-6.

253. Caron, P.; Audet-Walsh, E.; Lépine, J.; Bélanger, A.; Guillemette, C. Profiling Endogenous Serum Estrogen and Estrogen-Glucuronides by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 10143–10148, doi:10.1021/ac9019126.

254. Hoermann, R.; Midgley, J.E.M.; Larisch, R.; Dietrich, J.W. Homeostatic Control of the Thyroid-Pituitary Axis: Perspectives for Diagnosis and Treatment. *Front. Endocrinol.* **2015**, *6*, 177, doi:10.3389/fendo.2015.00177.

255. Zile, M.H.; Inhorn, R.C.; DeLuca, H.F. Metabolites of All-Trans-Retinoic Acid in Bile: Identification of All-Trans- and 13-Cis-Retinoyl Glucuronides. *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 3537–3543.

256. King, C.D.; Rios, G.R.; Assouline, J.A.; Tephly, T.R. Expression of UDP-Glucuronosyltransferases (UGTs) 2B7 and 1A6 in the Human Brain and Identification of 5-Hydroxytryptamine as a Substrate. *Arch. Biochem. Biophys.* **1999**, *365*, 156–162, doi:10.1006/abbi.1999.1155.

257. Krishnaswamy, S.; Hao, Q.; Von Moltke, L.L.; Greenblatt, D.J.; Court, M.H. Evaluation of 5-Hydroxytryptophol and Other Endogenous Serotonin (5-Hydroxytryptamine) Analogs as Substrates for UDP-Glucuronosyltransferase 1A6. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* **2004**, *32*, 862–869, doi:10.1124/dmd.32.8.862.

258. Brill, S.S.; Furimsky, A.M.; Ho, M.N.; Furniss, M.J.; Li, Y.; Green, A.G.; Bradford, W.W.; Green, C.E.; Kapetanovic, I.M.; Iyer, L.V. Glucuronidation of Trans-Resveratrol by Human Liver and Intestinal Microsomes and UGT Isoforms. *J. Pharm. Pharmacol.* **2006**, *58*, 469–479,

doi:10.1211/jpp.58.4.0006.

259. Iwuchukwu, O.F.; Nagar, S. Resveratrol (Trans-Resveratrol, 3,5,4'-Trihydroxy-Trans-Stilbene) Glucuronidation Exhibits Atypical Enzyme Kinetics in Various Protein Sources. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* **2008**, *36*, 322–330, doi:10.1124/dmd.107.018788.
260. Aumont, V.; Krisa, S.; Battaglia, E.; Netter, P.; Richard, T.; Mérillon, J.M.; Magdalou, J.; Sabolovic, N. Regioselective and Stereospecific Glucuronidation of Trans- and Cis-Resveratrol in Human. *Arch. Biochem. Biophys.* **2001**, *393*, 281–289, doi:10.1006/abbi.2001.2496.
261. Dellinger, R.W.; Garcia, A.M.G.; Meyskens, F.L. Differences in the Glucuronidation of Resveratrol and Pterostilbene: Altered Enzyme Specificity and Potential Gender Differences. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **2014**, *29*, 112–119, doi:10.2133/dmpk.dmpk-13-rg-012.
262. Austin, W.R.; Armijo, A.L.; Campbell, D.O.; Singh, A.S.; Hsieh, T.; Nathanson, D.; Herschman, H.R.; Phelps, M.E.; Witte, O.N.; Czernin, J.; et al. Nucleoside Salvage Pathway Kinases Regulate Hematopoiesis by Linking Nucleotide Metabolism with Replication Stress. *J. Exp. Med.* **2012**, *209*, 2215–2228, doi:10.1084/jem.20121061.
263. Young, J.D.; Yao, S.Y.M.; Baldwin, J.M.; Cass, C.E.; Baldwin, S.A. The Human Concentrative and Equilibrative Nucleoside Transporter Families, SLC28 and SLC29. *Mol. Aspects Med.* **2013**, *34*, 529–547, doi:10.1016/j.mam.2012.05.007.
264. Ipata, P.L.; Balestri, F. The Functional Logic of Cytosolic 5'-Nucleotidases. *Curr. Med. Chem.* **2013**, *20*, 4205–4216, doi:10.2174/0929867311320340002.
265. Manfredi, G.; Yang, L.; Gajewski, C.D.; Mattiazzi, M. Measurements of ATP in Mammalian Cells. *Methods San Diego Calif* **2002**, *26*, 317–326, doi:10.1016/S1046-2023(02)00037-3.
266. Lee, L.; Kelly, R.E.; Pastra-Landis, S.C.; Evans, D.R. Oligomeric Structure of the Multifunctional Protein CAD That Initiates Pyrimidine Biosynthesis in Mammalian Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1985**, *82*, 6802–6806, doi:10.1073/pnas.82.20.6802.
267. Moreno-Morcillo, M.; Grande-García, A.; Ruiz-Ramos, A.; del Caño-Ochoa, F.; Boskovic, J.; Ramón-Maiques, S. Structural Insight into the Core of CAD, the Multifunctional Protein Leading De Novo Pyrimidine Biosynthesis. *Structure* **2017**, *25*, 912-923.e5, doi:10.1016/j.str.2017.04.012.
268. Ben-Sahra, I.; Howell, J.J.; Asara, J.M.; Manning, B.D. Stimulation of de Novo Pyrimidine Synthesis by Growth Signaling through MTOR and S6K1. *Science* **2013**, *339*, 1323–1328, doi:10.1126/science.1228792.
269. Robitaille, A.M.; Christen, S.; Shimobayashi, M.; Cornu, M.; Fava, L.L.; Moes, S.; Prescianotto-Baschong, C.; Sauer, U.; Jenoe, P.; Hall, M.N. Quantitative Phosphoproteomics Reveal MTORC1 Activates de Novo Pyrimidine Synthesis. *Science* **2013**, *339*, 1320–1323, doi:10.1126/science.1228771.
270. Jiang, H.; Shang, X.; Wu, H.; Gautam, S.C.; Al-Holou, S.; Li, C.; Kuo, J.; Zhang, L.; Chopp,

- M. Resveratrol Downregulates PI3K/Akt/MTOR Signaling Pathways in Human U251 Glioma Cells. *J. Exp. Ther. Oncol.* **2009**, *8*, 25–33.
271. Park, D.; Jeong, H.; Lee, M.N.; Koh, A.; Kwon, O.; Yang, Y.R.; Noh, J.; Suh, P.-G.; Park, H.; Ryu, S.H. Resveratrol Induces Autophagy by Directly Inhibiting MTOR through ATP Competition. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 21772, doi:10.1038/srep21772.
272. Li, D.; Wang, G.; Jin, G.; Yao, K.; Zhao, Z.; Bie, L.; Guo, Y.; Li, N.; Deng, W.; Chen, X.; et al. Resveratrol Suppresses Colon Cancer Growth by Targeting the AKT/STAT3 Signaling Pathway. *Int. J. Mol. Med.* **2019**, *43*, 630–640, doi:10.3892/ijmm.2018.3969.
273. Wang, Y.; Wang, W.; Wu, X.; Li, C.; Huang, Y.; Zhou, H.; Cui, Y. Resveratrol Sensitizes Colorectal Cancer Cells to Cetuximab by Connexin 43 Upregulation-Induced Akt Inhibition. *Front. Oncol.* **2020**, *10*, doi:10.3389/fonc.2020.00383.
274. Zong, W.-X.; Thompson, C.B. Necrotic Death as a Cell Fate. *Genes Dev.* **2006**, *20*, 1–15, doi:10.1101/gad.1376506.
275. Miltenberger, R.J.; Sukow, K.A.; Farnham, P.J. An E-Box-Mediated Increase in Cad Transcription at the G1/S-Phase Boundary Is Suppressed by Inhibitory c-Myc Mutants. *Mol. Cell. Biol.* **1995**, *15*, 2527–2535, doi:10.1128/MCB.15.5.2527.
276. Eberhardy, S.R.; Farnham, P.J. Myc Recruits P-TEFb to Mediate the Final Step in the Transcriptional Activation of the Cad Promoter. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 40156–40162, doi:10.1074/jbc.M207441200.
277. Satoh, K.; Yachida, S.; Sugimoto, M.; Oshima, M.; Nakagawa, T.; Akamoto, S.; Tabata, S.; Saitoh, K.; Kato, K.; Sato, S.; et al. Global Metabolic Reprogramming of Colorectal Cancer Occurs at Adenoma Stage and Is Induced by MYC. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2017**, *114*, E7697–E7706, doi:10.1073/pnas.1710366114.
278. Wu, D.; Wang, W.; Chen, W.; Lian, F.; Lang, L.; Huang, Y.; Xu, Y.; Zhang, N.; Chen, Y.; Liu, M.; et al. Pharmacological Inhibition of Dihydroorotate Dehydrogenase Induces Apoptosis and Differentiation in Acute Myeloid Leukemia Cells. *Haematologica* **2018**, *103*, 1472–1483, doi:10.3324/haematol.2018.188185.
279. White, R.M.; Cech, J.; Ratanasirinrawoot, S.; Lin, C.Y.; Rahl, P.B.; Burke, C.J.; Langdon, E.; Tomlinson, M.L.; Mosher, J.; Kaufman, C.; et al. DHODH Modulates Transcriptional Elongation in the Neural Crest and Melanoma. *Nature* **2011**, *471*, 518–522, doi:10.1038/nature09882.
280. Mac, S.M.; Farnham, P.J. CAD, a c-Myc Target Gene, Is Not Deregulated in Burkitt's Lymphoma Cell Lines. *Mol. Carcinog.* **2000**, *27*, 84–96.
281. Dang, C.V.; Le, A.; Gao, P. MYC-Induced Cancer Cell Energy Metabolism and Therapeutic Opportunities. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2009**, *15*, 6479–6483, doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0889.

282. Cunningham, J.T.; Moreno, M.V.; Lodi, A.; Ronen, S.M.; Ruggero, D. Protein and Nucleotide Biosynthesis Are Coupled by a Single Rate-Limiting Enzyme, PRPS2, to Drive Cancer. *Cell* **2014**, *157*, 1088–1103, doi:10.1016/j.cell.2014.03.052.
283. Dölle, C.; Skoge, R.H.; Vanlinden, M.R.; Ziegler, M. NAD Biosynthesis in Humans--Enzymes, Metabolites and Therapeutic Aspects. *Curr. Top. Med. Chem.* **2013**, *13*, 2907–2917, doi:10.2174/15680266113136660206.
284. Kim, J.; Hu, Z.; Cai, L.; Li, K.; Choi, E.; Faubert, B.; Bezwada, D.; Rodriguez-Canales, J.; Villalobos, P.; Lin, Y.-F.; et al. CPS1 Maintains Pyrimidine Pools and DNA Synthesis in KRAS/LKB1-Mutant Lung Cancer Cells. *Nature* **2017**, *546*, 168–172, doi:10.1038/nature22359.
285. Lin, J.-N.; Lin, V.C.-H.; Rau, K.-M.; Shieh, P.-C.; Kuo, D.-H.; Shieh, J.-C.; Chen, W.-J.; Tsai, S.-C.; Way, T.-D. Resveratrol Modulates Tumor Cell Proliferation and Protein Translation via SIRT1-Dependent AMPK Activation. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 1584–1592, doi:10.1021/jf9035782.
286. Gessner, T.; Vaughan, L.A.; Beehler, B.C.; Bartels, C.J.; Baker, R.M. Elevated Pentose Cycle and Glucuronyltransferase in Daunorubicin-Resistant P388 Cells. *Cancer Res.* **1990**, *50*, 3921–3927.
287. Franklin, T.J.; Jacobs, V.; Jones, G.; Plé, P.; Bruneau, P. Glucuronidation Associated with Intrinsic Resistance to Mycophenolic Acid in Human Colorectal Carcinoma Cells. *Cancer Res.* **1996**, *56*, 984–987.
288. Takahashi, T.; Fujiwara, Y.; Yamakido, M.; Katoh, O.; Watanabe, H.; Mackenzie, P.I. The Role of Glucuronidation in 7-Ethyl-10-Hydroxycamptothecin Resistance in Vitro. *Jpn. J. Cancer Res. Gann* **1997**, *88*, 1211–1217, doi:10.1111/j.1349-7006.1997.tb00351.x.
289. Innocenti, F.; Schilsky, R.L.; Ramírez, J.; Janisch, L.; Undevia, S.; House, L.K.; Das, S.; Wu, K.; Turcich, M.; Marsh, R.; et al. Dose-Finding and Pharmacokinetic Study to Optimize the Dosing of Irinotecan According to the UGT1A1 Genotype of Patients with Cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2014**, *32*, 2328–2334, doi:10.1200/JCO.2014.55.2307.
290. Ye, L.; Yang, X.; Guo, E.; Chen, W.; Lu, L.; Wang, Y.; Peng, X.; Yan, T.; Zhou, F.; Liu, Z. Sorafenib Metabolism Is Significantly Altered in the Liver Tumor Tissue of Hepatocellular Carcinoma Patient. *PLoS One* **2014**, *9*, e96664, doi:10.1371/journal.pone.0096664.
291. Romero-Lorca, A.; Novillo, A.; Gaibar, M.; Bandrés, F.; Fernández-Santander, A. Impacts of the Glucuronidase Genotypes UGT1A4, UGT2B7, UGT2B15 and UGT2B17 on Tamoxifen Metabolism in Breast Cancer Patients. *PLoS One* **2015**, *10*, e0132269, doi:10.1371/journal.pone.0132269.
292. Sutiman, N.; Lim, J.S.L.; Muerdter, T.E.; Singh, O.; Cheung, Y.B.; Ng, R.C.H.; Yap, Y.S.; Wong, N.S.; Ang, P.C.S.; Dent, R.; et al. Pharmacogenetics of UGT1A4, UGT2B7 and UGT2B15 and Their Influence on Tamoxifen Disposition in Asian Breast Cancer Patients. *Clin. Pharmacokinet.* **2016**, *55*, 1239–1250, doi:10.1007/s40262-016-0402-7.

293. Gammal, R.S.; Court, M.H.; Haidar, C.E.; Iwuchukwu, O.F.; Gaur, A.H.; Alvarellos, M.; Guillemette, C.; Lennox, J.L.; Whirl-Carrillo, M.; Brummel, S.S.; et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for UGT1A1 and Atazanavir Prescribing. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2016**, *99*, 363–369, doi:10.1002/cpt.269.
294. Gagné, J.-F.; Montminy, V.; Belanger, P.; Journault, K.; Gaucher, G.; Guillemette, C. Common Human UGT1A Polymorphisms and the Altered Metabolism of Irinotecan Active Metabolite 7-Ethyl-10-Hydroxycamptothecin (SN-38). *Mol. Pharmacol.* **2002**, *62*, 608–617, doi:10.1124/mol.62.3.608.
295. Cummings, J.; Boyd, G.; Ethell, B.T.; Macpherson, J.S.; Burchell, B.; Smyth, J.F.; Jodrell, D.I. Enhanced Clearance of Topoisomerase I Inhibitors from Human Colon Cancer Cells by Glucuronidation. *Biochem. Pharmacol.* **2002**, *63*, 607–613, doi:10.1016/S0006-2952(01)00812-7.
296. Campbell, J.M.; Stephenson, M.D.; Bateman, E.; Peters, M.D.J.; Keefe, D.M.; Bowen, J.M. Irinotecan-Induced Toxicity Pharmacogenetics: An Umbrella Review of Systematic Reviews and Meta-Analyses. *Pharmacogenomics J.* **2017**, *17*, 21–28, doi:10.1038/tpj.2016.58.
297. Miyata, Y.; Nakamoto, H.; Neckers, L. The Therapeutic Target Hsp90 and Cancer Hallmarks. *Curr. Pharm. Des.* **2013**, *19*, 347–365, doi:10.2174/138161213804143725.
298. Neckers, L.; Trepel, J.B. Stressing the Development of Small Molecules Targeting HSP90. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2014**, *20*, 275–277, doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-2571.
299. Acquaviva, J.; He, S.; Zhang, C.; Jimenez, J.-P.; Nagai, M.; Sang, J.; Sequeira, M.; Smith, D.L.; Ogawa, L.S.; Inoue, T.; et al. FGFR3 Translocations in Bladder Cancer: Differential Sensitivity to HSP90 Inhibition Based on Drug Metabolism. *Mol. Cancer Res. MCR* **2014**, *12*, 1042–1054, doi:10.1158/1541-7786.MCR-14-0004.
300. Landmann, H.; Proia, D.A.; He, S.; Ogawa, L.S.; Kramer, F.; Beißbarth, T.; Grade, M.; Gaedcke, J.; Ghadimi, M.; Moll, U.; et al. UDP Glucuronosyltransferase 1A Expression Levels Determine the Response of Colorectal Cancer Cells to the Heat Shock Protein 90 Inhibitor Ganetespib. *Cell Death Dis.* **2014**, *5*, e1411, doi:10.1038/cddis.2014.378.
301. Strassburg, C.P.; Manns, M.P.; Tukey, R.H. Differential Down-Regulation of the UDP-Glucuronosyltransferase 1A Locus Is an Early Event in Human Liver and Biliary Cancer. *Cancer Res.* **1997**, *57*, 2979–2985.
302. Expression of UDP-Glucuronosyltransferase 1A in Bladder Cancer: Association With Prognosis and Regulation by Estrogen. *Mol. Carcinog.* **2012**, *53*, doi:10.1002/mc.21978.
303. Bellemare, J.; Rouleau, M.; Harvey, M.; Popa, I.; Pelletier, G.; Têtu, B.; Guillemette, C. Immunohistochemical Expression of Conjugating UGT1A-Derived Isoforms in Normal and Tumoral Drug-Metabolizing Tissues in Humans. *J. Pathol.* **2011**, *223*, 425–435, doi:10.1002/path.2805.
304. Zahreddine, H.A.; Culjkovic-Kraljacic, B.; Gasiorek, J.; Duchaine, J.; Borden, K.L.B. GLI1-Inducible Glucuronidation Targets a Broad Spectrum of Drugs. *ACS Chem. Biol.* **2019**, *14*, 348–355,

doi:10.1021/acscchembio.8b01118.

305. López-Ayllón, B.D.; de Castro-Carpeño, J.; Rodríguez, C.; Pernía, O.; de Cáceres, I.I.; Belda-Iniesta, C.; Perona, R.; Sastre, L. Biomarkers of Erlotinib Response in Non-Small Cell Lung Cancer Tumors That Do Not Harbor the More Common Epidermal Growth Factor Receptor Mutations. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2015**, *8*, 2888–2898.
306. Ling, J.; Johnson, K.A.; Miao, Z.; Rakhit, A.; Pantze, M.P.; Hamilton, M.; Lum, B.L.; Prakash, C. Metabolism and Excretion of Erlotinib, a Small Molecule Inhibitor of Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase, in Healthy Male Volunteers. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* **2006**, *34*, 420–426, doi:10.1124/dmd.105.007765.
307. Zahreddine, H.A.; Culjkovic-Kraljaic, B.; Assouline, S.; Gendron, P.; Romeo, A.A.; Morris, S.J.; Cormack, G.; Jaquith, J.B.; Cerchietti, L.; Cocolakis, E.; et al. The Sonic Hedgehog Factor GLI1 Imparts Drug Resistance through Inducible Glucuronidation. *Nature* **2014**, *511*, 90–93, doi:10.1038/nature13283.
308. Allain, E.P.; Rouleau, M.; Le, T.; Vanura, K.; Villeneuve, L.; Caron, P.; Turcotte, V.; Lévesque, E.; Guillemette, C. Inactivation of Prostaglandin E2 as a Mechanism for UGT2B17-Mediated Adverse Effects in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Front. Oncol.* **2019**, *9*.
309. Belledant, A.; Hovington, H.; Garcia, L.; Caron, P.; Brisson, H.; Villeneuve, L.; Simonyan, D.; Têtu, B.; Fradet, Y.; Lacombe, L.; et al. The UGT2B28 Sex-Steroid Inactivation Pathway Is a Regulator of Steroidogenesis and Modifies the Risk of Prostate Cancer Progression. *Eur. Urol.* **2016**, *69*, 601–609, doi:10.1016/j.eururo.2015.06.054.
310. Yilmaz, L.; Borazan, E.; Aytakin, T.; Baskonus, I.; Aytakin, A.; Oztuzcu, S.; Bozdog, Z.; Balik, A. Increased UGT1A3 and UGT1A7 Expression Is Associated with Pancreatic Cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* **2015**, *16*, 1651–1655, doi:10.7314/apjcp.2015.16.4.1651.
311. Wikoff, W.R.; Grapov, D.; Fahrman, J.F.; DeFelice, B.; Rom, W.N.; Pass, H.I.; Kim, K.; Nguyen, U.; Taylor, S.L.; Gandara, D.R.; et al. Metabolomic Markers of Altered Nucleotide Metabolism in Early Stage Adenocarcinoma. *Cancer Prev. Res. Phila. Pa* **2015**, *8*, 410–418, doi:10.1158/1940-6207.CAPR-14-0329.
312. Rosario, S.R.; Long, M.D.; Affronti, H.C.; Rowsam, A.M.; Eng, K.H.; Smiraglia, D.J. Pan-Cancer Analysis of Transcriptional Metabolic Dysregulation Using The Cancer Genome Atlas. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 5330, doi:10.1038/s41467-018-07232-8.
313. Kpoghomou, M.-A.; Soatiana, J.E.; Kalembo, F.W.; Bishwajit, G.; Sheng, W. UGT2B17 Polymorphism and Risk of Prostate Cancer: A Meta-Analysis. *ISRN Oncol.* **2013**, *2013*, 465916, doi:10.1155/2013/465916.
314. Nadeau, G.; Bellemare, J.; Audet-Walsh, É.; Flageole, C.; Huang, S.-P.; Bao, B.-Y.; Douville, P.; Caron, P.; Fradet, Y.; Lacombe, L.; et al. Deletions of the Androgen-Metabolizing UGT2B Genes

Have an Effect on Circulating Steroid Levels and Biochemical Recurrence after Radical Prostatectomy in Localized Prostate Cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2011**, *96*, E1550-1557, doi:10.1210/jc.2011-1049.

315. Zahra, K.; Dey, T.; Ashish; Mishra, S.P.; Pandey, U. Pyruvate Kinase M2 and Cancer: The Role of PKM2 in Promoting Tumorigenesis. *Front. Oncol.* **2020**, *10*.

316. Audet-Delage, Y.; Rouleau, M.; Rouleau, M.; Roberge, J.; Miard, S.; Picard, F.; Têtu, B.; Guillemette, C. Cross-Talk between Alternatively Spliced UGT1A Isoforms and Colon Cancer Cell Metabolism. *Mol. Pharmacol.* **2017**, *91*, 167–177, doi:10.1124/mol.116.106161.

317. Rouleau, M.; Audet-Delage, Y.; Desjardins, S.; Rouleau, M.; Girard-Bock, C.; Guillemette, C. Endogenous Protein Interactome of Human UDP-Glucuronosyltransferases Exposed by Untargeted Proteomics. *Front. Pharmacol.* **2017**, *8*.

318. Aghajanpour, M.; Nazer, M.R.; Obeidavi, Z.; Akbari, M.; Ezati, P.; Kor, N.M. Functional Foods and Their Role in Cancer Prevention and Health Promotion: A Comprehensive Review. *Am. J. Cancer Res.* **2017**, *7*, 740–769.

319. Lachance, J.C.; Radhakrishnan, S.; Madiwale, G.; Guerrier, S.; Vanamala, J.K.P. Targeting Hallmarks of Cancer with a Food-System-Based Approach. *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif* **2020**, *69*, 110563, doi:10.1016/j.nut.2019.110563.

320. Dobrzyńska, M.M. Resveratrol as Promising Natural Radioprotector. A Review. *Rocz. Panstw. Zakl. Hig.* **2013**, *64*, 255–262.

321. Yi, J.; Zhu, J.; Zhao, C.; Kang, Q.; Zhang, X.; Suo, K.; Cao, N.; Hao, L.; Lu, J. Potential of Natural Products as Radioprotectors and Radiosensitizers: Opportunities and Challenges. *Food Funct.* **2021**, *12*, 5204–5218, doi:10.1039/D1FO00525A.

322. Zhang, H.; Yan, H.; Zhou, X.; Wang, H.; Yang, Y.; Zhang, J.; Wang, H. The Protective Effects of Resveratrol against Radiation-Induced Intestinal Injury. *BMC Complement. Altern. Med.* **2017**, *17*, 410, doi:10.1186/s12906-017-1915-9.

323. Qin, H.; Zhang, H.; Zhang, X.; Zhang, S.; Zhu, S.; Wang, H. Resveratrol Protects Intestinal Epithelial Cells against Radiation-Induced Damage by Promoting Autophagy and Inhibiting Apoptosis through SIRT1 Activation. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* **2021**, *62*, 574–581, doi:10.1093/jrr/rrab035.

324. Calabrese, E.J.; Mattson, M.P.; Calabrese, V. Resveratrol Commonly Displays Hormesis: Occurrence and Biomedical Significance. *Hum. Exp. Toxicol.* **2010**, *29*, 980–1015, doi:10.1177/0960327110383625.

325. Chirumbolo, S. Hormesis, Resveratrol and Plant-Derived Polyphenols: Some Comments. *Hum. Exp. Toxicol.* **2011**, *30*, 2027–2030, doi:10.1177/0960327111408153.

326. Bao, Y.; Wang, W.; Zhou, Z.; Sun, C. Benefits and Risks of the Hormetic Effects of Dietary Isothiocyanates on Cancer Prevention. *PLOS ONE* **2014**, *9*, e114764,

doi:10.1371/journal.pone.0114764.

327. Arfin, S.; Jha, N.K.; Jha, S.K.; Kesari, K.K.; Ruokolainen, J.; Roychoudhury, S.; Rathi, B.; Kumar, D. Oxidative Stress in Cancer Cell Metabolism. *Antioxidants* **2021**, *10*, 642, doi:10.3390/antiox10050642.
328. Sebastià, N.; Montoro, A.; Hervás, D.; Pantelias, G.; Hatzi, V.I.; Soriano, J.M.; Villaescusa, J.I.; Terzoudi, G.I. Curcumin and Trans-Resveratrol Exert Cell Cycle-Dependent Radioprotective or Radiosensitizing Effects as Elucidated by the PCC and G2-Assay. *Mutat. Res.* **2014**, *766–767*, 49–55, doi:10.1016/j.mrfmmm.2014.05.006.
329. Syng-Ai, C.; Kumari, A.L.; Khar, A. Effect of Curcumin on Normal and Tumor Cells: Role of Glutathione and Bcl-2. *Mol. Cancer Ther.* **2004**, *3*, 1101–1108.
330. Saab, M.-B.; Bec, N.; Martin, M.; Estephan, E.; Cuisinier, F.; Larroque, C.; Gergely, C. Differential Effect of Curcumin on the Nanomechanics of Normal and Cancerous Mammalian Epithelial Cells. *Cell Biochem. Biophys.* **2013**, *65*, 399–411, doi:10.1007/s12013-012-9443-1.
331. Gran, E.R.; Lotocki, V.; Zhang, Q.; Kakkar, A.; Maysinger, D. Human Astrocytes and Astrocytoma Respond Differently to Resveratrol. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **2021**, 102441, doi:10.1016/j.nano.2021.102441.
332. Patel, K.R.; Brown, V.A.; Jones, D.J.L.; Britton, R.G.; Hemingway, D.; Miller, A.S.; West, K.P.; Booth, T.D.; Perloff, M.; Crowell, J.A.; et al. Clinical Pharmacology of Resveratrol and Its Metabolites in Colorectal Cancer Patients. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 7392–7399, doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2027.
333. Brown, V.A.; Patel, K.R.; Viskaduraki, M.; Crowell, J.A.; Perloff, M.; Booth, T.D.; Vasilinin, G.; Sen, A.; Schinas, A.M.; Piccirilli, G.; et al. Repeat Dose Study of the Cancer Chemopreventive Agent Resveratrol in Healthy Volunteers: Safety, Pharmacokinetics and Effect on the Insulin-like Growth Factor Axis. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 9003–9011, doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2364.
334. Fang, Z.; Bhandari, B. Encapsulation of Polyphenols – a Review. *Trends Food Sci. Technol.* **2010**, *21*, 510–523, doi:10.1016/j.tifs.2010.08.003.

Titre : Radiosensibilisation des tumeurs digestives par des molécules bioactives de l'alimentation

Contexte : La radiothérapie (RT) est couramment utilisée pour la prise en charge des tumeurs digestives, notamment le cancer du rectum (RC) et l'adénocarcinome du canal pancréatique (PDAC), avec des indications distinctes. La RT est souvent associée à la chimiothérapie pour en augmenter l'efficacité, au prix d'une toxicité importante. La radiochimiothérapie ne peut donc être proposée aux patients les plus fragiles. Les composants bioactifs (BFC) d'origine naturelle, dont le resvératrol et la capsaïcine, peuvent potentialiser l'effet antitumoral des rayonnements ionisants. Cette radiosensibilisation peut être d'un grand intérêt si les tissus sains environnants sont épargnés. De plus, la combinaison de BFCs peut permettre l'obtention d'un effet antitumoral amélioré par rapport aux composés seuls. **Objectifs :** Ce travail a évalué la radiosensibilisation de modèles de PDAC et de RC par le resvératrol et la capsaïcine et a exploré les mécanismes impliqués dans leur action spécifique aux tumeurs, aux niveaux cellulaire et moléculaire. **Méthodes :** La survie cellulaire a été évaluée *in vitro* en présence de BFC sur différentes lignées cellulaires tumorales et non tumorales pancréatiques et colorectales. La métabolisation du resvératrol a été évaluée par spectrométrie de masse et corrélée avec l'expression des gènes codant les UDP-glucosyltransferases 1A (UGT1A) par RT-qPCR. L'expression des enzymes UGT1A dans les tissus colorectaux humains a été étudiée grâce aux bases de données RNAseq disponibles en ligne. La validation fonctionnelle de l'implication des enzymes *UGT1A* dans la sensibilité au resvératrol des cellules colorectales a été établie par modulation de l'expression des *UGT1A*. L'effet radiosensibilisant des BFCs a été évalué via l'exploration des processus d'apoptose et de leur impact sur le cycle cellulaire. Les voies moléculaires impliquées dans la radiosensibilisation ont été analysées par western blot. L'impact sur la génération de stress oxydant a été évalué par cytométrie de flux ou colorimétrie. L'analyse de radiosensibilisation *in vivo* a été testée sur des xénogreffes de cellules tumorales humaines sous-cutanées. **Résultats :** Le resvératrol (R) et la capsaïcine (C) présentaient un effet cytotoxique sur les cellules tumorales et cet effet était renforcé par leur combinaison. L'association des BFC et de la RT stimulaient la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) de manière majorée par rapport à la RT seule. Parallèlement, le cycle cellulaire était arrêté et l'apoptose induite. En outre, la résistance au resvératrol était liée à l'expression des gènes *UGT1A* dans les lignées cellulaires tumorales et non tumorales digestives. L'expression des gènes *UGT1A8* et *UGT1A10* était diminuée dans les tissus tumoraux colorectaux par rapport aux tissus digestifs sains correspondants. Cette baisse d'expression a été corrélée au pronostic des patients atteints de cancer colorectal. L'inhibition de l'expression du gène *UGT1A10* par shRNA dans une lignée cellulaire initialement peu sensible au resvératrol permettait de réduire la capacité de métabolisation du resvératrol et augmentait la toxicité du resvératrol. À l'inverse, la surexpression du gène *UGT1A10* dans une lignée cellulaire tumorale initialement sensible au resvératrol augmentait la métabolisation et s'accompagnait d'une diminution de la cytotoxicité. Le resvératrol affectait l'homéostasie des cellules tumorales intestinales sensibles avec une augmentation de la taille cellulaire, un ralentissement du cycle cellulaire et une diminution des niveaux de certains nucléotides pyrimidiques, aboutissant à une réduction globale des processus de transcription et de traduction. Cet impact sur l'activité cellulaire globale n'était pas observé sur les cellules non-tumorales. Le resvératrol et la capsaïcine radiosensibilisaient les tumeurs xénogreffées. Cet effet était associé à un arrêt du cycle cellulaire et à une augmentation de l'apoptose. De plus, un meilleur contrôle de la croissance tumorale était obtenu pour les souris irradiées et traitées avec la combinaison de BFCs par rapport aux souris recevant uniquement la radiothérapie. Enfin, le traitement par BFCs engendrait un déséquilibre de la voie de réparation de l'ADN radio-induite amplifiant le phénomène apoptotique dans le modèle murin de tumeur PDAC. **Conclusions :** Les BFCs représentent des agents radiosensibilisants des cellules tumorales digestives prometteurs. Le resvératrol présente une cytotoxicité spécifique aux tumeurs liée fonctionnellement avec l'expression des gènes *UGT1A* dans les cellules et les tissus tumoraux digestifs. De plus, les BFCs et en particulier le resvératrol affectent l'homéostasie globale des cellules tumorales, en altérant les fonctions cellulaires de base telles que la transcription, la traduction et les voies de réparation de l'ADN. La combinaison du resvératrol et de la capsaïcine radiosensibilise les tumeurs pancréatiques et colorectales dans des modèles précliniques murins. Ces travaux positionnent les BFCs comme des solutions alternatives pour la radiosensibilisation des tumeurs, sans effet secondaire systémique souvent observé avec la chimiothérapie conventionnelle.

Title: Radiosensitization of digestive tumors by bioactive food components **Background:** Radiotherapy (RT) is commonly used in the management of digestive tumors, including rectal cancer (RC) and pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), but with distinct indications. RT is often combined with chemotherapy to increase efficiency but at the cost of important toxicity, leaving out fragile patients. Naturally occurring bioactive food components (BFCs), including resveratrol and capsaicin, may potentiate the antitumor effect of ionizing radiation. This radiosensitization may be of great interest if surrounding healthy tissues are spared. Moreover, the combination of BFCs may provide an improved anti-tumor effect. **Objectives:** This work evaluated resveratrol and capsaicin radiosensitization of PDAC and RC models and explored mechanisms involved in their tumor-specific action, at the cellular and molecular levels. **Methods:** Cell survival was evaluated *in vitro* in the presence of BFCs on different pancreatic and colorectal tumor and non-tumor cell lines. Resveratrol metabolism was evaluated by mass spectrometry, and correlated with the expression of UDP-glucosyltransferases 1A (UGT1A) genes by RT-qPCR. The expression of *UGT1A* genes in human colorectal tissues was studied with RNAseq databases available online. Functional validation of *UGT1A* enzymes implication in resveratrol sensitivity of colorectal cells established by *UGT1A* expression modulation. Radiosensitization was assessed by apoptosis induction and cell cycle impact exploration. Molecular pathways involved in radiosensitization were analyzed by western blotting. Reactive oxygen species were quantified by flow cytometry or colorimetry. *In vivo* radiosensitization analysis was tested on subcutaneous human tumor cell xenografts. **Results:** Resveratrol (R) and capsaicin (C) were more cytotoxic toward tumor cells and this effect was enhanced in combination. ROS were enhanced with BFCs and RT as compared to RT. Concomitantly, cell cycle was arrested and apoptosis was induced. In addition, resveratrol resistance was related to the expression of UGTs in intestinal tumor and non-tumor cell lines. *UGT1A8* and *UGT1A10* gene expression were downregulated in CRC tumor tissues in comparison to matched healthy tissues. This down expression was correlated to the prognostic of CRC patients. Downregulation of *UGT1A10* gene expression by shRNA in an initial resveratrol resistant cell line reduced resveratrol metabolism capacity and increased resveratrol toxicity. Conversely, overexpression of the *UGT1A10* gene in an initial resveratrol sensitive tumor cell line increased the metabolism accompanied by decreased cytotoxicity. Resveratrol affected intestinal sensitive tumor cell homeostasis with a cell-size increase, cell-cycle modulation, and decreased uridylate nucleotide levels, resulting in a global reduction of transcription and translation. This impact on global cell activity was restricted to tumor cells. Xenografted tumors were radiosensitized by resveratrol and capsaicin associated with a cell cycle arrest and an increase in apoptosis. Moreover, a better tumor growth control was obtained for mice irradiated and treated with the BFCs combination compared to mice receiving radiotherapy only. Finally, the radiosensitization unbalanced the radio-induced DNA repair pathway to promote apoptosis in the PDAC tumor model. **Conclusions:** BFCs are potent radiosensitizers on digestive tumor cells. Resveratrol exhibits tumor-specific cytotoxicity with a functional relationship to UGT1A genes expression in digestive tumor cells and tissues. Moreover, BFCs and in particular resveratrol affect global tumor cell homeostasis, by impairing basic cell functions such as transcription, translation and DNA repair pathways. The combination of resveratrol and capsaicin radiosensitizes pancreatic and colorectal tumors in preclinical mouse models. This work positions BFCs as very potent alternative solutions for radiosensitization of tumors, without systemic side effect often observed with conventional chemotherapy.

BoRdeaux Institute in onCology - BRIC; INSERM U1312; BioGo Team
Université de Bordeaux site Carreire ; Bâtiment Recherche, 146 Rue Léo Saignat33076
Bordeaux CEDEX