THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Pathologie, Toxicologie, G®n®tique et Nutrition

Présentée et soutenue par :

Mme OCÉANE MARTIN

le jeudi 12 mars 2015

Titre :

PROMOTION DE LA CANCEROGENESE COLORECTALE PAR LE FER HEMINIQUE DES VIANDES: PREVENTION NUTRITIONNELLE, ROLE DU MICROBIOTE ET DE L'INFLAMMATION

Ecole doctorale :

Sciences Ecologiques, V®t®rinaires, Agronomiques et Bioing®nieries (SEVAB)

Unité de recherche :

ToxAlim

Directeur(s) de Thèse :

M. FABRICE PIERRE

M. DENIS CORPET

Rapporteurs :

Mme MARIE-PAULE VASSON, UNIVERSITE CLERMONT-FERRAND 1

M. STEFAAN DE SMET, UNIVERSITE DE GENT

Membre(s) du jury :

M. FRANCOIS BLACHIER, AGROPARISTECH, Pr®sident

M. DENIS CORPET, ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE, Membre

Mme VALERIE SCISLOWSKI, ADIV, Membre

L'humilité la plus sincère

pour un scientifique est

d'accepter que rien n'est impossible

Marc Levy

L'art d'enseigner n'est que l'art

d'éveiller la curiosité des jeunes âmes

pour la satisfaire ensuite

Anatole France

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury et tout particulièrement le Pr **Stefaan de Smet**, le Pr **Marie-Paule Vasson** et le Dr **François Blachier** de m'avoir fait l'honneur de juger mon travail de thèse. Je vous souhaite une bonne lecture !

Je remercie l'**ADIV** et notamment le Dr **Valérie Scislowski** de m'avoir permis de faire cette thèse et de mettre un pied dans le monde industriel, très différent de la recherche publique. Merci Valérie, d'avoir suivi mes travaux pendant ces trois ans. Je remercie également les membres de l'ADIV ayant participé au projet : **Adeline Laleuw** et **Marion Benet**.

Je remercie l'**équipe PPCA** de l'unité ToxAlim qui a été, pour moi, une véritable seconde famille pendant toute cette thèse.

- Merci à mes deux *pères* scientifiques : Le Dr **Pierre Fabrice** et le Pr **Corpet Denis**.
Fabrice, il est difficile de trouver les mots pour exprimer à quel point je te suis reconnaissante. Merci pour tes idées qui fusent toutes les 5 minutes, pour ta patience, pour ton écoute, de m'avoir fait confiance et grandir scientifiquement, pour tes conseils, pour ton humilité, pour ta joie de vivre et ton enthousiasme, pour nos fous-rire, bref pour le chef exceptionnel que tu es. Mon modèle d'excellence et de professionnalisme ;)
Denis, merci de m'avoir accueillie dans ton bureau pendant un an et demi, pour tes conseils, pour ton regard posé sur les choses, d'avoir essuyé mes larmes lorsque mes manips n'ont pas marché (Ah ces sacrés MDF !). Merci surtout de m'avoir donné le gout de l'enseignement, et bien avant ma thèse d'ailleurs !

- Merci à mes deux *mamans* : Mme **Nathalie Naud** et Mme **Taché Sylviane**
Nath, merci pour tes conseils, de m'avoir formée à vos techniques, pour les heures passées au microscope et sous la hotte et pour ton amitié.
Sylviane, merci pour ton œil avisé, pour tes questionnements jamais inutiles, pour ton aide dans les calculs qui m'embrouillent la tête et pour tes jolies fleurs déposées sur mon bureau.

- Je remercie mes *tantes* et *oncle* : le Dr **Laurence Huc**, le Dr **Cécile Héliès**, le Dr **Françoise Guéraud** et le Dr **Jacques Dupuy**
Laurence, merci de m'avoir donné le gout (oui oui ! J'ose le dire) de l'*in vitro*, merci pour tes conseils en tout genre et surtout ceux de jeune maman, pour ton sens de l'organisation, pour les verres partagés ensemble et pour les gouttes de sueur et les kilos que tu m'as fait perdre grâce à la bokwa et au body karaté. Merci simplement d'être toi !
Cécile, merci pour les moments passés ensemble, pour les fous rires, pour ta piscine et tes minouchats.
Françoise, merci pour tes conseils, pour avoir supporté (tout comme Jacques) que je vienne 10 fois par semaine (jour ?!) dans votre bureau pour voir Fabrice (même quand il n'est pas là :P), merci de m'avoir fait autant rigolé à la Wine and Cheese party, ça restera gravé à tout jamais dans mon esprit.
Jacques, merci pour tes yeux levés au ciel, pour nous avoir supporté en train de chanter (hurler ?!) Adèle durant un trajet en voiture et finalement merci de nous supporter tout court.

- A mes *frères* et *sœurs* : Julia (**Yuyu**), **Reggie**, **Sabine**, **Nadia** merci à tous pour votre présence dans les bons et les moins bons moments. *Yuyu*, merci pour le partage de bureau (et de bonbons) et pour nos rigolades.

- Merci à **Auréline**, **Charlotte** et **Andréa** les stagiaires que j'ai eu la chance d'encadrer et qui ont fait avancer mes travaux.

A vous tous, membres de PPCA, merci pour tout, merci de m'avoir permis de me sentir bien dans ce que je fais. Votre cohésion et la complémentarité de vos différentes expertises sont votre force ! Je vous quitte,

sincèrement, avec beaucoup de peine mais je garde l'espoir que nous pourrons collaborer ensemble dans le futur. Grâce à vous, de petite chenille de la recherche je suis devenue papillon, (presque) prête à m'envoler vers de nouvelles aventures scientifiques. Finalement le plus dur de la thèse aura été de vous quitter… Merci pour qui vous êtes et ce que vous faites !

Je remercie toutes les personnes avec qui j'ai pu **collaborer** et qui m'ont apporté des compétences que je n'aurais pas eues sans elles :

- Le Dr **Isabelle Raymond**, du service d'anatomie pathologie de l'ENVT, merci pour ta disponibilité, tes connaissances, j'ai bien peur que tu m'aies transmis le virus de l'histologie. Merci également aux techniciennes : Cécile Bleuart et Isabelle Pardo pour la préparation des échantillons.

- L'**équipe NGN** et notamment le Dr **Vassilia Théodoroux**, le Dr **Hélène Eutamène**, **Mathilde Lévèque** (reine des PCR), **Valérie Bezirard** (reine des western-blot), **Valérie Tondoreau** (pour le soin et le respect aux animaux, sa douceur), **Eric Gauthier** (pour les gavages). Merci à **Ambre** pour sa gentillesse !

- Le Dr **Elisa Boutet**, de l'**équipe GS**, merci de m'avoir fait partager ton expertise sur les comètes et pour ta gentillesse à toute épreuve. Nous formons vraiment une bonne équipe de manip !

- **Florence Blas-Y-Estrada**, merci d'avoir pris soin des animaux de mes manips et pour ton aide.

Je remercie les **enseignants** qui m'ont accordé leur confiance et qui m'ont permis de confirmer que l'enseignement est pour moi essentiel : Dr **Hélène Eutamène** (EI Purpan, Toulouse), Dr **Géraldine Cohen** (IUT Paul Sabatier, Auch), Dr **Gilles Etienne** (Université J.F. Champollion, Albi), Dr **Arnaud Bottin** (Université Paul Sabatier, Toulouse) et Dr **Benoit Van Der Rest** (ENSAT, Toulouse).

Je remercie bien évidemment ma **famille** et mes **amis** d'être là chaque jour. Spécial merci à mes parents que j'aime du plus profond de mon cœur. Merci à ma grand-mère et à ma belle-maman pour la relecture et la chasse aux fautes. Une pensée à toutes nos personnes disparues et surtout celles que nous avons perdues à cause du cancer.

Et enfin, je remercie **Guillaume**, merci d'être là et de me soutenir même si ce n'est pas toujours évident pour toi de comprendre l'investissement que demande mon travail. En route pour une nouvelle vie… A ma **Lenna**, certainement mon plus beau résultat de thèse, j'espère que tu trouveras ta voie et qu'elle t'épanouira autant que l'enseignement et la recherche pour moi et n'oublies jamais que quasiment rien n'est impossible dans la vie mais qu'il faut simplement s'en donner les moyens.

Résumé

Le cancer colorectal est un problème de santé publique majeur à travers le monde. Les données épidémiologiques mettent en avant une association positive entre consommation de viande rouge et risque de cancer colorectal. En 2007, le fond mondial de recherche contre le cancer (WCRF) et l'institut américain de recherche contre le cancer (AICR) ont établi deux recommandations fortes qui sont de limiter la consommation de viande rouge à 500 g par semaine et d'éviter la consommation de charcuterie. Cependant, la viande rouge possède des qualités nutritionnelles intéressantes. De plus, les recommandations alimentaires sont très peu suivies par les populations appartenant aux catégories socio-professionnelles inférieures, qui consomment le plus de produits à base de viande et sont donc les plus à risque. Deux mécanismes semblent expliquer l'effet promoteur de la viande : la peroxydation des acides gras alimentaires et la formation de composés *N*-nitrosés, ces deux réactions étant catalysées par le fer héminique provenant de la viande rouge. Dans ce contexte, le projet SécuriViande a été mis en place afin de développer de nouveaux moyens de production qui permettraient, à terme, de diminuer le risque de cancer colorectal en inhibant les deux réactions catalysées par l'hème. Cette thèse a permis de valider expérimentalement l'association épidémiologique en montrant que la consommation de viande rouge et de charcuteries modèles induit la promotion de la cancérogenèse colorectale dans deux modèles animaux : le rat initié à l'azoxyméthane et la souris *Min*. De plus, mariner la viande bovine avec un mélange aqueux de raisin-olive est efficace pour diminuer le nombre de lésions précancéreuses chez le rat initié et les biomarqueurs associés à la cancérogenèse hème-induite dans les deux modèles. Cette thèse a également permis de proposer de nouveaux mécanismes pouvant expliquer l'effet promoteur de l'hème. Ainsi, le microbiote intestinal participe à la lipoperoxydation induite par le fer héminique. De plus la consommation d'hème, *via* la production d'aldéhydes issus de la lipoperoxydation, induit une augmentation de la perméabilité, de l'inflammation et de la génotoxicité au niveau de la muqueuse intestinale. En conclusion, cette thèse apporte : (i) une validation expérimentale de l'effet promoteur de la consommation de viande rouge et de charcuterie fraîches, (ii) un mode de prévention par la marinade de la viande bovine avec des extraits d'un mélange d'antioxydants raisin-olive, (iii) la mise en évidence de l'implication du microbiote dans la lipoperoxydation hème-induite et (iv) une meilleure caractérisation des conséquences de la consommation de fer héminique sur la muqueuse intestinale, *via* la formation d'aldéhydes. A terme, ces résultats pourraient être utilisés afin de mettre sur le marché des produits à base de viande plus sains vis-à-vis du risque de cancer colorectal, sans modifier les habitudes des consommateurs et ainsi de diminuer l'incidence du cancer colorectal.

Abstract

Colorectal cancer is a real health issue worldwide. Epidemiological studies show positive association between red meat intake and colorectal cancer risk. In 2007, the World Cancer Research Fund (WCRF) and the American Institute for Cancer Research (AICR) made two strong recommendations: reduce fresh red meat intake less than 500 g per week and avoid cured meat. Nevertheless, red meat has nutritional interest and dietary recommendations are poorly followed by people in the lowest socio-professional category, who consume the most meat products and so who have the highest risk. Two mechanisms appear to explain promoting effect of meat: dietary fatty acids peroxidation and N-nitroso compounds formation, both reactions being catalyzed by heme iron from red meat. In this context, SécuriViande project was set up to develop new production ways which could lead to reduced colorectal cancer risk inhibiting the two reactions catalyzed by heme. This thesis has shown that fresh red meat and cured-meat intake induce colorectal carcinogenesis promotion in two animal models: azoxymethane induced-rats and *Min* mice. Marinate beef with an aqueous mixture of grape-olive is effective to reduce the number of precancer lesions in rats and biomarkers associated with heme-induced carcinogenesis in both models. This thesis also highlights new potential mechanisms of promoting effect of heme. Thus, microbiota is involved in heme-induced lipid peroxidation. Moreover, heme iron intake increases intestinal mucosa permeability, inflammation and genotoxicity, *via* aldehydes produced by lipoperoxidation. In conclusion, this thesis provides (i) an experimental validation of fresh red meat and cured meat promoting effect, (ii) a way to prevent this promoting effect by marinating beef with extracts of grape-olive antioxidants, (iii) the demonstration of microbiota involvement in heme-induced lipoperoxidation and (iv) a better characterization of heme iron intake consequences on intestinal mucosa *via* aldehydes formation. Ultimately, these findings could be used to market safer meat products, without changing consumer habits and so reduce colorectal cancer incidence.

Sommaire

Liste des abréviations ..... - 10 -

Liste des figures et des tableaux ..... - 11 -

Préambule ..... - 13 -

INTRODUCTION ..... - 13 -

I. Le cancer colorectal ..... - 15 -

1) Incidence et mortalité ..... - 15 -

2) Etiologie ..... - 16 -

3) Evolution histopathologique ..... - 19 -

4) Voies et mutations impliquées dans le cancer colorectal ..... - 23 -

5) Méthodes et modèles utilisés pour étudier le cancer colorectal ..... - 27 -

II. Cancer colorectal et consommation de produits à base de viande rouge ..... - 33 -

1) Le rapport du WCRF/AICR : de l'établissement du risque à la mise en place de recommandations nutritionnelles ..... - 33 -

2) Hypothèses mécanistiques ..... - 37 -

3) Le fer héminique ..... - 40 -

III. Arrêter de consommer de la viande ou agir ? ..... - 49 -

1) Bénéfice/Risque de la consommation de viande ..... - 50 -

2) Prévention de la cancérogenèse induite par le fer héminique ..... - 52 -

3) Changer le consommateur ou changer l'aliment ? ..... - 56 -

IV. Objectifs et enjeux de la thèse ..... - 57 -

1) Prévenir en prenant en compte les attentes sociétales ..... - 57 -

2) Comprendre en prenant en compte les partenaires de l'écosystème digestif ..... - 58 -

ETUDES ET RESULTATS ..... - 60 -

CHAPITRE 1 : Validation de l'effet promoteur des viandes et des charcuteries et recherche de prévention possible avec les filières ..... - 61 -

INTRODUCTION ..... - 61 -

PARTIE A : VIANDE ROUGE ..... - 63 -

I. Modulation du statut oxydatif des viandes rouges par différents traitements technologiques et effet sur les biomarqueurs précoces de la cancérogenèse chez le rat ..... - 63 -

1) Etude industrielle ..... - 63 -

2) Etude court-terme chez le rat ..... - 69 -

II. Etude de cancérogenèse chez le rat chimio-induit : stade des lésions précancéreuses ..... - 74 -

1) Protocole ..... - 74 -

2) Résultats ..... - 76 -

3) Conclusions ..... - 80 -

III. Etude de cancérogenèse chez la souris *Min* : stade tumoral ..... - 81 -
1) Protocole ..... - 81 -
2) Résultats ..... - 83 -
3) Conclusion ..... - 87 -
PARTIE B : CHARCUTERIE ..... - 89 -
I. Modulation du statut oxydatif des charcuteries par différents traitements technologiques et effet sur les biomarqueurs précoces de la cancérogenèse chez le rat ..... - 89 -
1) Etude industrielle ..... - 89 -
2) Etude court-terme chez le rat ..... - 90 -
II. Etude de cancérogenèse chez le rat chimio-induit : stade des lésions précancéreuses ..... - 98 -
1) Protocole ..... - 98 -
2) Résultats ..... - 100 -
3) Conclusion ..... - 104 -
III. Etude de cancérogenèse chez la souris *Min* : stade tumoral ..... - 105 -
1) Protocole ..... - 105 -
2) Résultats ..... - 107 -
3) Conclusions ..... - 113 -
CONCLUSION GENERALE ET DISCUSSION ..... - 115 -
I. Partie Viande rouge ..... - 115 -
1) Preuve expérimentale et mécanismes de l'effet promoteur de la viande rouge ..... - 115 -
2) Prévention de l'effet promoteur par la marinade de la viande ..... - 115 -
3) Effet de la cuisson de la viande ..... - 116 -
II. Partie Charcuterie ..... - 118 -
1) Preuve expérimentale et mécanismes de l'effet promoteur de la charcuterie ..... - 118 -
2) Prévention par l'ajout d'antioxydant ou par la diminution de la teneur en hème ..... - 120 -
3) Surmortalité observée chez la souris *Min* ..... - 122 -

CHAPITRE 2 : Le microbiote est-il impliqué dans la lipoperoxydation induite par le fer héminique ? . - 124 -
INTRODUCTION ..... - 124 -
ARTICLE 1 : Antibiotic Suppression of Intestinal Microbiota Reduces Heme-Induced Lipoperoxidation Associated with Colon Carcinogenesis in Rats ..... - 127 -
DISCUSSION ..... - 140 -

CHAPITRE 3 : L'hème est-il un agent pro-inflammatoire ? Module-t-il la perméabilité et la génotoxicité de la barrière intestinale ? ..... - 142 -
INTRODUCTION ..... - 142 -
ARTICLE 2 : Heme iron increases intestinal permeability, inflammation, genotoxicity and biomarkers associated with colorectal cancer in rats. ..... - 145 -
DISCUSSION ..... - 158 -
Résultats préliminaires *in vitro* ..... - 159 -

DISCUSSION ET PERSPECTIVES ..... **- 163 -**
I. Principaux résultats de la thèse ..... - 164 -
1) Validation de l'effet promoteur de produits à base de viande ..... - 164 -
2) Recherche de prévention par la modification des produits ..... - 165 -
3) Implication du microbiote dans la lipoperoxydation induite par le fer héminique ..... - 165 -
4) Effet fer héminique sur l'inflammation, la perméabilité et la génotoxicité intestinale ..... - 165 -
II. Critiques des méthodes et modèles utilisés ..... - 167 -
1) Stratégies d'étude suivies ..... - 167 -
2) Pondération des hypothèses de lipoperoxydation et de nitrosation hème-induite ..... - 169 -
3) Modèles utilisés ..... - 170 -
4) Biomarqueurs ..... - 173 -
III. Perspectives ..... - 174 -
1) Pour aller plus loin sur la validation de l'effet promoteur de l'hème ..... - 174 -
2) Pour aller plus loin dans les mécanismes pouvant expliquer l'effet promoteur de l'hème ..... - 178 -
3) Pour aller plus loin sur l'identification d'une stratégie de prévention efficace ..... - 182 -

ANNEXES ..... **- 185 -**
ANNEXE 1 : Analyses biochimiques des viandes de bœuf (etude industrielle) ..... - 1 86 -
ANNEXE 2 : Détail des techniques utilisées pendant la thèse ..... - 188 -
ANNEXE 3 : Résultats biomarqueurs étude court-terme (Viandes rouges) ..... - 192 -
ANNEXE 4 : Résultats biomarqueurs étude court-terme (Charcuteries) ..... - 193 -

COMMUNICATIONS, ENSEIGNEMENTS, FORMATION ..... **- 194 -**

REFERENCES ..... **- 198 -**

Liste des abréviations

ACF : Aberrant crypt foci (foyer de cryptes aberrantes)
AICR : American Institute for Cancer Research
AGPI : Acides gras polyinsaturés
AGCC : Acides gras à chaine courte
AHC : Amines Hétérocycliques
ANOVA : Analyse de Variance
AOM : Azoxyméthane
APC : Adenomatous Polyposis Coli
COX-2 : Cytochrome c oxidase subunit II
CRNH : Centre de Recherches en Nutrition Humaine
DiMeIQx : 2-amino-3,4,8-trimethylimidazo[4,5-f] quinoxaline
DCNO : Charcuterie cuite riche en hème, nitritée et oxydée
DHN-MA : 1,4-Dihydroxynonene Mercapturic Acid
DMH : Diméthylhydrazine
DSS : Dextran Sulfate Sodium
EPIC : European Prospective Investigation into Cancer and nutrition
FeNO : Fer nitrosylé
H_2O_2 : Peroxide d'hydrogène
HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
4-HNE : 4-hydroxynonenal
HNPCC : Hereditary Non Polyposis Colorectal cancer
HO : Hème Oxygénase
IC : Intervalle de Confiance
INCA : Institut National du Cancer
IQ : 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f] quinoline
MDA : Malondialdehyde
MDF : Mucin Depleted Foci (Foyer déplété en mucine)
MeIQx : 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline
Min : Multiple intestinal neoplasia
MMR : MisMatch Repair system
MSI : Instabilité microsatellitaire
MTT : Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide
NAT : N-acetyl transférase
PAF : Polypose Adénomateuse Familiale
Pirc : Polyposis in the rat colon
PhIP : 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine
RSNO : Nitrosothiol
SVF : Sérum de veau fœtal
TBARs : Thiobarbituric Acid Reactive Substances
TEER : Résistance trans-épithéliale
WCRF : World Cancer Research Fund

Liste des figures et des tableaux

Figure 1 : Incidence et mortalité du cancer colorectal chez l'homme et chez la femme ..... - 15 -
Figure 2 : Incidence et mortalité du cancer colorectal selon l'appartenance géographique ..... - 16 -
Figure 3 : Anatomie du côlon et du rectum ..... - 19 -
Figure 4 : Les différentes couches de la paroi du côlon-rectum ..... - 20 -
Figure 5 : Glande de Lieberkühn et turn over cellulaire ..... - 21 -
Figure 6 : Organisation macroscopique et composition microscopique des jonctions serrées intercellulaires ..... - 22 -
Figure 7 : Evolution histopathologique du cancer colorectal ..... - 23 -
Figure 8 : Voies initiatrices de la cancérogenèse colorectale ..... - 24 -
Figure 9 : Implication de la proteine APC dans la regulation du pool cellulaire de β-catenine ..... - 26 -
Figure 10 : Identification de MDF à 5 ou 11 cryptes déplétées en mucine ..... - 30 -
Figure 11 : Tumeur observée à la loupe ou en coupe retrouvée chez une souris *Min* ..... - 31 -
Figure 12 : Différence de structure du réseau d'actine entre les lignées cellulaires normales $Apc^{+/+}$ et précancéreuses $Apc^{Min/+}$. ..... - 32 -
Figure 13 : Méta-analyse des études de cohorte sur le lien entre viande rouge et risque de cancer colorectal (pour 100 g/j) ..... - 34 -
Figure 14 : Méta-analyse des études de cohorte sur le lien entre charcuteries et risque de cancer colorectal (pour 50 g/j) ..... - 35 -
Figure 15 : Structure de l'hème et de l'hème nitrosylé ..... - 40 -
Figure 16 : Absorption intestinale du fer héminique provenant des protéines de l'alimentation ..... - 44 -
Figure 17 : Mécanismes d'action pouvant expliquer l'effet promoteur du fer héminique ..... - 46 -
Figure 18 : Structure globale des études du chapitre 1 ..... - 62 -
Figure 19 : Pouvoir antioxydants des marinades testées (test DPPH) ..... - 65 -
Figure 20 : Protocoles de modulation des marinades et des modes de cuisson ..... - 66 -
Figure 21 : Protocole de modulation des modes de conditionnement et des niveaux de cuisson ..... - 67 -
Figure 22 : Carte factorielle représentant les échantillons séparés en 4 clusters ..... - 68 -
Figure 23 : Viandes de bœuf possedant differents profils d'oxydation et ayant ete choisies pour être testés chez le rat dans l'étude court-terme ..... - 69 -
Figure 24 : Taille et nombre des MDF dénombrés chez les rats chimio-induits nourris avec les régimes expérimentaux à base de viande rouge ..... - 77 -
Figure 25 : Teneur en hème, en TBARs des eaux fécales et DHN-MA urinaire retrouvés chez les rats nourris avec les régimes expérimentaux à base de viande rouge ..... - 78 -
Figure 26 : Cytotoxicité des eaux fécales des rats nourris avec les régimes expérimentaux à base de viande rouge sur la lignée cellulaire normale $Apc^{+/+}$ et la lignée précancéreuse $Apc^{Min/+}$ ..... - 79 -
Figure 27 : Suivi de la croissance des souris *Min* mâles et femelles nourries avec les régimes expérimentaux à base de viande rouge ..... - 83 -
Figure 28 : Nombre de tumeurs et surface tumorale des souris *Min* après 45 jours de régime expérimentaux à base de viande rouge ..... - 84 -
Figure 29 : Nombre de tumeurs coliques et incidence des souris *Min* après 45 jours de régimes expérimentaux à base de viande rouge ..... - 85 -
Figure 30 : Teneur en hème fécal, en TBARs fécaux et en DHN-MA urinaire des souris *Min* après 45 jours de régimes expérimentaux à base de viande rouge ..... - 86 -
Figure 31 : Cytotoxicité des eaux fécales sur les cellules précancéreuses $Apc^{Min/+}$ des eaux fécales des souris *Min* après 45 jours de régimes expérimentaux à base de viande rouge ..... - 87 -
Figure 32 : Nombre et taille des MDF dénombrés chez les rats chimio-induits nourris avec les régimes expérimentaux à base de charcuteries ..... - 101 -
Figure 33 : Teneur en hème fécal, en composés *N*-nitrosés fécaux, en TBARs fécaux et en DHN-MA urinaire retrouvés chez les rats chimio-induits nourris avec les régimes expérimentaux à base de charcuteries ..... - 102 -

Figure 34 : Cytotoxicité des eaux fécales des rats nourris avec les régimes expérimentaux à base de charcuteries sur la lignée cellulaire normale $Apc^{+/+}$ et la lignée précancéreuse $Apc^{Min/+}$ ..... - 103 -
Figure 35 : Suivi de la mortalité et de la croissance des souris *Min* mâles et femelles nourries avec les régimes expérimentaux à base de charcuteries ..... - 107 -
Figure 36 : Nombre de tumeurs intestinales et surface tumorale des souris *Min* nourries avec les régimes expérimentaux à base de charcuteries ..... - 109 -
Figure 37 : Nombre et incidence tumorale colique des souris *Min* nourries avec les régimes expérimentaux à base de charcuteries ..... - 110 -
Figure 38 : Teneur en hème fécal, en composés *N*-nitrosés fécaux, en TBARs fécaux et en DHN-MA urinaire des souris *Min* nourries avec les régimes expérimentaux à base de charcuteries ..... - 111 -
Figure 39 : Cytotoxicité des eaux fécales sur la lignée précancéreuse $Apc^{Min/+}$ pour les mâles et pour les femelles des souris *Min* nourries avec les régimes expérimentaux à base de charcuteries ..... - 112 -
Figure 40 : Mesure de la résistance trans-épithéliale des cellules $Apc^{+/+}$ exposées pendant 48h aux eaux fécales des rats soumis aux régimes expérimentaux CON et HEM ..... - 160 -
Figure 41 : Valeurs de génotoxicité obtenues sur les cellules $Apc^{+/+}$ exposées pendant 24h aux eaux fécales des rats soumis aux régimes expérimentaux CON et HEM ..... - 161 -
Figure 42 : Principaux résultats de la thèse ..... - 166 -

Tableau 1 : Facteurs augmentant ou diminuant le risque de cancer colorectal ..... - 18 -
Tableau 2 : Comparaison des principales caractéristiques de la cancérogenèse chez l'homme et dans les deux modèles animaux utilisés pendant la thèse. ..... - 31 -
Tableau 3 : Risque relatif et intervalle de confiance des méta-analyses publiées après la mise à jour du rapport du WCRF/AICR de 2010 ..... - 35 -
Tableau 4 : Teneur en fer héminique de viande et de charcuterie ..... - 42 -
Tableau 5 : Composés actifs et dosage des différentes marinades utilisées pour les viande rouge ..... - 64 -
Tableau 6 : Viandes de bœuf distribuees aux rats pendant 14 jours . ..... - 70 -
Tableau 7 : Code couleur utilisé pour la représentation des ratios de l'étude court-terme chez le rat ... - 71 -
Tableau 8 : Effet de la marinade raisin-olive de la viande rouge sur les biomarqueurs associés à la cancérogenèse colorectale hème induite ..... - 72 -
Tableau 9 : Effet de la cuisson de la viande rouge sur les biomarqueurs associés à la cancérogenèse colorectale hème induite ..... - 73 -
Tableau 10 : Effet du conditionnement sous atmosphère modifiée de la viande rouge sur les biomarqueurs associés à la cancérogenèse colorectale hème induite ..... - 73 -
Tableau 11 : Régimes expérimentaux à base de viande rouge distribués aux rats chimio-induits ..... - 75 -
Tableau 12 : Régimes expérimentaux à base de viande rouge distribués aux souris *Min* ..... - 81 -
Tableau 13 : Charcuteries distribuées aux rats pendant 14 jours ..... - 91 -
Tableau 14 : Code couleur utilisé pour la représentation des ratios de l'étude court-terme chez le rat - 92 -
Tableau 15 : Effet d'un muscle issu de l'épaule (blanc) à la place d'un muscle issu de la cuisse (rouge) sur les biomarqueurs associés à la cancérogenèse colorectale hème induite ..... - 94 -
Tableau 16 : Effet de l'ajout d'additif à la charcuterie sur les biomarqueurs associés à la cancérogenèse colorectale hème induite ..... - 94 -
Tableau 17 : Effet d'une charcuterie diminuée en nitrites sur les biomarqueurs associés à la cancérogenèse colorectale hème induite ..... - 95 -
Tableau 18 : Effet d'une charcuterie cuite à haute température sur les biomarqueurs associés à la cancérogenèse colorectale hème induite ..... - 96 -
Tableau 19 : Effet d'une charcuterie conservée en anaérobiose sur les biomarqueurs associés à la cancérogenèse colorectale hème induite ..... - 96 -
Tableau 20 : Charcuteries modèles distribuées aux rats chimio-induits ..... - 99 -
Tableau 21 : Charcuteries modèles distribuées aux souris *Min* ..... - 105 -

Préambule

Cette thèse a été financée par une bourse CIFRE supportée par l'ADIV, l'institut technique Agro-industriel des filières viandes. Ce financement a permis une interaction étroite entre l'équipe Prévention et Promotion de la Cancérogenèse par les Aliments (PPCA) de l'INRA ToxAlim et le pôle Nutrition et Santé de l'ADIV.

La partie études et résultats de ce manuscrit de thèse est divisée en trois chapitres :

- Le **Chapitre 1** regroupe les études du projet SécuriViande auxquelles j'ai participé et/ou pris en charge. SécuriViande est un projet ANR d'une durée de 3 ans (2011-2014) et a été prolongé de 9 mois sur l'année 2015. Il regroupe une dizaine de partenaires publiques et privés. La valorisation de ce travail sera effectuée à la fin du projet par des articles regroupant l'ensemble des résultats des différents partenaires, c'est pourquoi ce chapitre n'est pas présenté sous forme d'article dans ce manuscrit.

- Le **Chapitre 2** est constitué d'un article intitulé : *Antibiotic Suppression of Intestinal Microbiota Reduces Heme-Induced Lipoperoxidation Associated with Colon Carcinogenesis in Rats*. Cet article a été accepté dans Nutrition and Cancer: An International Journal en septembre 2014 et a été publié en janvier 2015 dans le volume 67.

- Le **Chapitre 3** est constitué d'un article intitulé : *Heme iron increases intestinal permeability, inflammation, genotoxicity and biomarkers associated with colorectal cancer in rats.* Il est destiné à être soumis dans une revue à comité de lecture dans le courant de l'année 2015. L'article est suivi de résultats *in vitro* préliminaires qui seront complétés et intégrés à l'article avant soumission.

Chaque chapitre est composé d'une introduction, d'une partie résultats (sous forme d'article ou non) et d'une discussion. Les perspectives soulevées par les travaux de la thèse sont regroupées dans la discussion générale.

INTRODUCTION

I. Le cancer colorectal

1) Incidence et mortalité

a. Données françaises

Avec 42 152 nouveaux cas estimés en 2012 dont 55 % survenant chez l'homme, le cancer colorectal se situe, tous sexes confondus, au 3ème rang des cancers les plus fréquents. Il s'agit donc d'un problème de santé publique majeur. Il représente près de 12 % de l'ensemble des cancers incidents tous sexes confondus. Chez l'homme, le cancer colorectal se place au 3ème rang (derrière celui de la prostate et du poumon) en termes d'incidence et au 2ème rang (derrière le cancer du poumon) en termes de mortalité. Chez la femme, il se situe au 2ème rang (derrière le cancer du sein) en termes d'incidence et au 3ème rang (derrière les cancers du sein et du poumon) en terme de mortalité **(INCA 2013)**.

b. Données mondiales

Le cancer colorectal est le 3ème cancer le plus répandu chez l'homme (746 000 cas ; 10,0% de l'ensemble des cancers) et le 2ème chez la femme (614 000 cas ; 9,2% de l'ensemble des cancers). Le taux de mortalité est de 50,1% chez l'homme et de 52,1% chez la femme **[Figure 1]**.

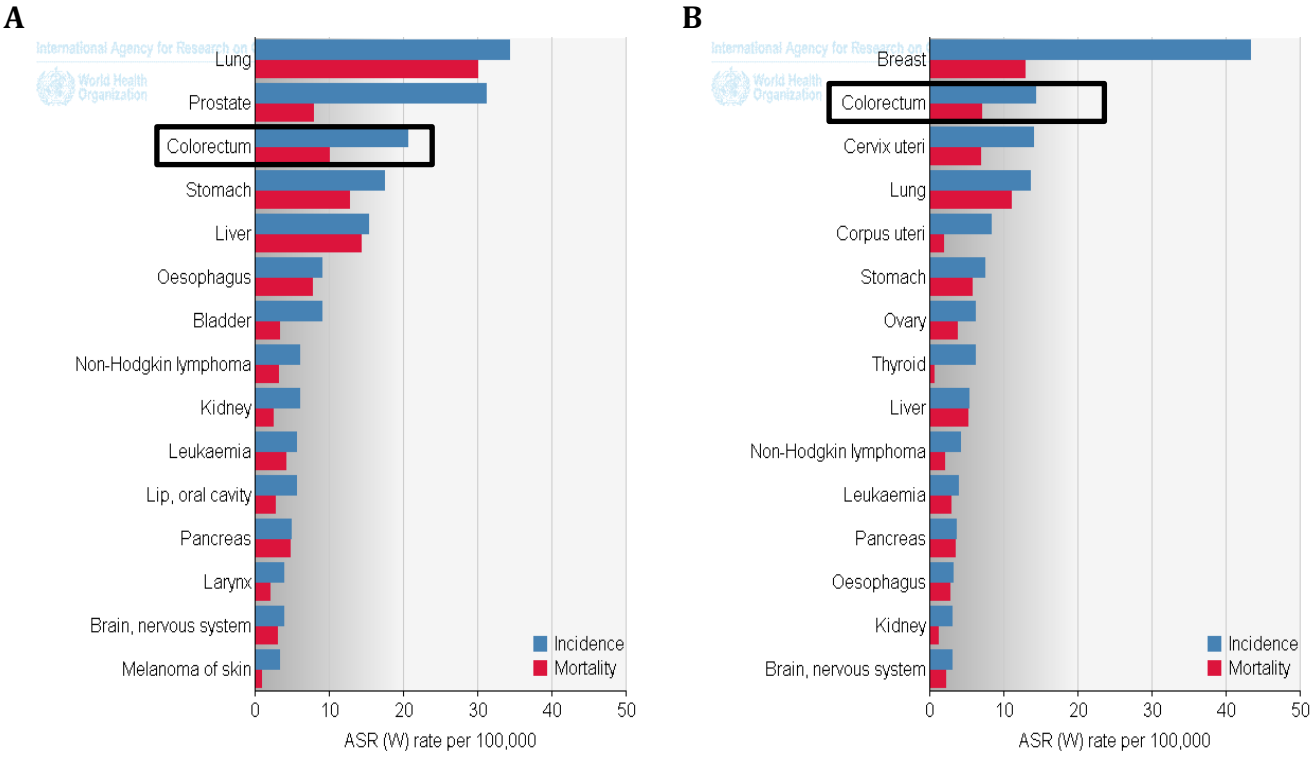

Figure 1 : Incidence et mortalité du cancer colorectal chez l'homme **(A)** et chez la femme **(B)**
Taux estimé pour 100 000 (standardisé sur l'âge)
(GLOBOCAN 2012)

Près de 55% des cas surviennent dans les régions du monde les plus développées. La répartition géographique de l'incidence varie peu entre les 2 sexes mais on observe un facteur 10 entre les pays les plus touchés par ce type de cancer (Australie/Nouvelle Zélande) et les pays où on en dénombre le moins (Afrique de l'Ouest) **[Figure 2]**.

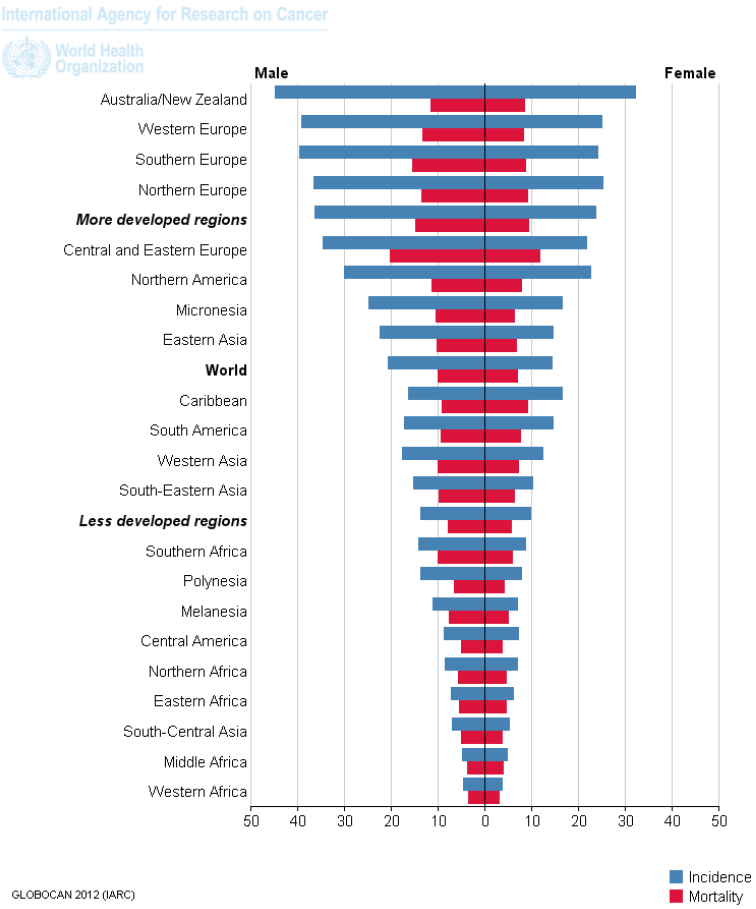

Figure 2 : Incidence et mortalité du cancer colorectal selon l'appartenance géographique
Taux estimé pour 100 000 (standardisé sur l'âge)
(GLOBOCAN 2012)

2) Etiologie

Environ 5% des cancers colorectaux sont des formes héréditaires dues à des mutations germinales (mutation sur l'ADN d'un gamète) tandis que 95% sont des cancers sporadiques dus à des mutations somatiques (qui ne touchent pas les cellules destinées à la reproduction) spontanées **(WCRF/AICR 2007)**. Ces cancers colorectaux sporadiques peuvent être modulés par un grand nombre de facteurs notamment le mode de vie et l'alimentation.

a. Prédisposition génétique

On distingue deux formes de cancers héréditaires : la Polypose Adénomateuse Familiale et le syndrome de Lynch.

✓ *Polypose Adénomateuse Familiale (PAF)*

Cette maladie est causée par une mutation du gène suppresseur de tumeur *Apc* (*Adenomatous polyposis coli*) sur le bras long du chromosome 5 **(Heinen 2010)**. Les personnes atteintes développent un nombre important d'adénomes précocement. Sans traitement, ces adénomes évoluent naturellement vers des adénocarcinomes avec un âge moyen d'apparition de 40 ans **(Weitz *et al.* 2005)**.

✓ *Le syndrome de Lynch*

Ce syndrome est causé par une mutation dans la famille de gènes impliqués dans le système de réparation des mésappariements de l'ADN (*MisMatch Repair, MMR*). Ces mutations entraînent des accumulations d'insertions/délétions qui peuvent être sur des gènes pro-oncogéniques ou suppresseurs de tumeurs et donc entrainer des effets délétères **(Boland and Goel 2010)**. Cette maladie se caractérise par des tumeurs colorectales précoces (avant 50 ans) mais aussi par des cancers de l'intestin grêle, de l'endomètre, de l'ovaire, des voies urinaires, de l'estomac et des voies biliaires **(Lynch *et al.* 2009)**.

b. Régime alimentaire et mode de vie

Le cancer colorectal est quatre fois plus répandu dans les pays à forts revenus **(WCRF/AICR 2007)**. Les études des populations émigrant d'une zone à faible incidence vers une zone à forte incidence révèlent qu'avec le temps, l'incidence du cancer colorectal chez les migrants devient comparable (voire supérieure) à celle des pays hôtes **(O'Keefe *et al.* 2007; Sharma and O'Keefe 2007)**. Ces études démontrent que les facteurs génétiques ne peuvent expliquer à eux seuls l'incidence du cancer colorectal. Les facteurs environnementaux, au sens large, ont donc une grande importance.

✓ *Les travaux du WCRF/AICR*

En 2007, le Fond Mondial de Recherche contre le Cancer (WCRF) et l'Institut Américain de Recherche contre le Cancer (AICR) ont publié une synthèse scientifique regroupant tous les résultats mondiaux publiés sur l'alimentation, l'activité physique et la prévention du cancer **(WCRF/AICR 2007)**. Les données sur le cancer colorectal de cette synthèse ont été mises à jour en 2011 **(WCRF/AICR 2011)**. Les experts du rapport ont ainsi jugé que la viande rouge, les

charcuteries, les boissons alcoolisées, l'obésité et la graisse abdominale augmentent de manière convaincante le risque de cancer colorectal tandis que l'activité physique et les aliments contenant des fibres alimentaires sont jugés comme diminuant le risque de cancer colorectal **[Tableau 1]**.

FOOD, NUTRITION, PHYSICAL ACTIVITY AND CANCERS OF THE COLON AND THE RECTUM 2011		
	DECREASES RISK	INCREASES RISK
Convincing	Physical activity[1,2] Foods containing dietary fibre[3]	Red meat[4,5] Processed meat[4,6] Alcoholic drinks (men)[7] Body fatness Abdominal fatness Adult attained height[8]
Probable	Garlic Milk[9] Calcium[10]	Alcoholic drinks (women)[7]
Limited - suggestive	Non-starchy vegetables Fruits Foods containing vitamin D[3,12]	Foods containing iron[3,4] Cheese[11] Foods containing animal fats[3] Foods containing sugars13
Limited - no conclusion	Fish; glycaemic index; folate; vitamin C; vitamin E; selenium; low fat; dietary pattern	

Tableau 1 : Facteurs augmentant ou diminuant le risque de cancer colorectal **(WCRF/AICR 2007- 2011)**

c. Inflammation chronique

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (maladie de Crohn et colite ulcéreuse) sont associées à un risque accru de cancer colorectal **(Triantafillidis *et al.* 2009)**. En effet, les patients affectés ont environ dix fois plus de risque de développer ce type de cancer **(Itzkowitz and Yio 2004; Terzic *et al.* 2010)**. Les cellules inflammatoires produisent des médiateurs, tels que des radicaux libres, des prostaglandines et des cytokines, qui participent aux différentes phases de la réaction inflammatoire. L'exposition chronique à ces médiateurs de l'inflammation engendre une augmentation de la prolifération cellulaire, une mutagenèse, une activation d'oncogènes et de l'angiogenèse **(Shacter and Weitzman 2002)**. Par ailleurs, les tissus enflammés constituent un environnement idéal pour la sélection et la croissance des cellules cancéreuses colorectales **(Beauchemin 2011)**. Chez le rat, la stimulation de l'inflammation intestinale par injection de dextrane sulphate de sodium (DSS) entraîne une promotion dose dépendante du nombre de lésions précancéreuses de type MDF (foyers déplétés en mucines). De plus, ces MDF présentent de forts niveaux de marqueurs d'inflammation, tels que la cyclo-oxygénase ou l'infiltration des macrophages **(Femia *et al.* 2009)**. Pris tous ensemble, ces résultats suggèrent que l'inflammation pourrait être impliquée dans la cancérogenèse colorectale. *Une introduction plus détaillée sur l'inflammation est présentée en début du chapitre 3 (p142).*

d. Microbiote

La densité microbienne de l'intestin grêle est de 10^4 à 10^7 cellules/gramme de contenu, celle du colon est de 10^{13} à 10^{14} **(Candela *et al.* 2014)**. Sachant que le cancer de l'intestin grêle est très rare alors que le cancer colorectal est un problème de santé publique important, il est légitime de se demander si le microbiote joue un rôle dans l'initiation et/ou la promotion du cancer colorectal **(Shanahan and O'Toole 2014)**. De plus, des différences de microbiote entre des patients atteints de cancer colorectal et des individus sains ont été observées **(Zhu *et al.* 2013)**. Le côlon possède de nombreuses bactéries qui ont des fonctions importantes pour notre métabolisme. Par exemple, elles sont impliquées dans la fermentation de glucides non digestibles qui permettent d'apporter des acides gras à chaine courte et de l'énergie aux cellules de la muqueuse colique **(Koropatkin *et al.* 2012)**. Cependant le colon contient également des bactéries qui peuvent induire des effets délétères. Certaines souches d'*E. coli* sont capable de synthétiser la colibactine, une toxine pouvant générer des dommages génotoxiques dans les cellules épithéliales coliques **(Nougayrede and Oswald 2011)**. Plusieurs études ont montré que des animaux modèles dont le microbiote était déplété (conditions germ-free) développaient moins de tumeurs que des animaux conventionnels **(Marteau *et al.* 2001; Engle *et al.* 2002)**. Ces données laissent à penser que le microbiote est impliqué dans la cancérogenèse colorectale. *Une introduction plus détaillée sur le microbiote est présentée en début du chapitre 2 (p124).*

3) Evolution histopathologique

a. Anatomie et rôle du colon-rectum

Le colon est la partie inférieure du tractus digestif : il s'étend du caecum au rectum. Il se divise en quatre parties : le colon ascendant (côté droit du corps), le colon transverse, le colon descendant (côté gauche du corps) et le colon sigmoïde qui est relié au rectum **[Figure 3]**.

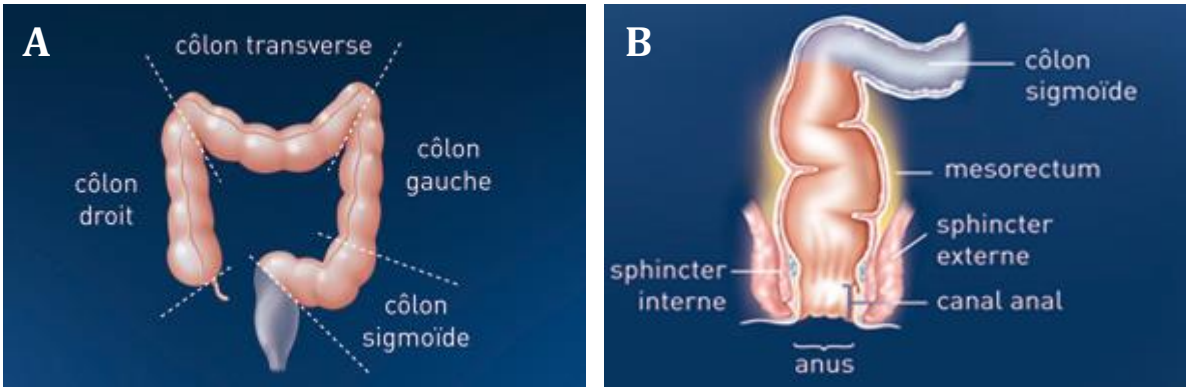

Figure 3 : Anatomie du côlon **(A)** et du rectum **(B)** **(INCA 2010)**

La fonction du côlon est triple : d'une part, la sécrétion de mucus, d'autre part la concentration des matières fécales par absorption de l'eau et des nutriments, et enfin il est le siège d'une activité microbienne permettant la synthèse de la vitamine K et d'acide folique. Le rectum quant à lui est principalement impliqué dans le stockage des matières fécales avant qu'elles soient expulsées par l'anus **(INCA 2010)**.

Dans les pays où l'incidence du cancer colorectal est élevée, environ 60% des cas se développent dans la partie distale (principalement au niveau du colon sigmoïde), tandis que dans les pays à faible incidence, la majeure partie des cas se développe dans la partie proximale **(Haenszel and Correa 1973)**.

b. Histologie du côlon-rectum

✓ *Le colon-rectum est composé d'un ensemble de couches*

Les parois du colon et du rectum, comme pour l'ensemble du système digestif, sont constituées de quatre tuniques : la muqueuse, couche la plus interne, la sous-muqueuse, la musculeuse et enfin la séreuse **[Figure 4]**.

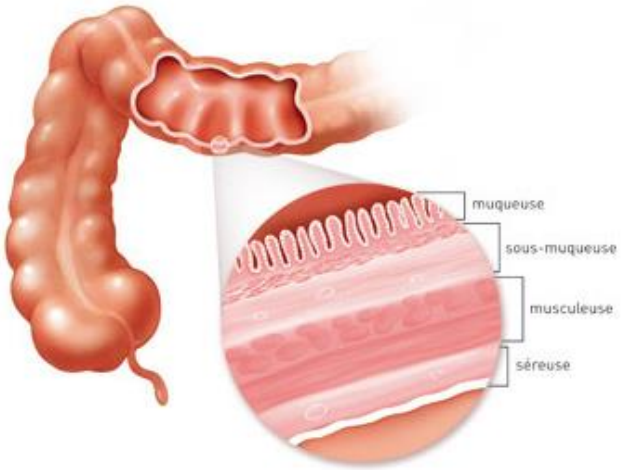

Figure 4 : Les différentes couches de la paroi du côlon-rectum
(INCA 2010)

✓ *La muqueuse intestinale est composée de glandes de Lieberkühn*

L'épithélium de la muqueuse colique présente des invaginations appelées glandes (ou cryptes) de Lieberkühn **[Figure 5]**. Au sein de ces glandes se trouvent plusieurs types cellulaires **(MacFarlane and Stover 2007)** :

- Les colonocytes sont les cellules les plus abondantes et ont comme fonction l'absorption de l'eau, des électrolytes et des produits alimentaires non digérés au niveau de l'intestin grêle.

- Les cellules caliciformes, également appelées cellules à mucus, produisent une grande quantité de mucines protégeant la surface de l'épithélium intestinal des pathogènes et permettant la lubrification des parois facilitant ainsi l'excrétion des selles.

- Les cellules souches sont peu nombreuses et se retrouvent principalement au fond des cryptes. Elles permettent le renouvellement cellulaire. Les fonds des cryptes étant remplis de mucus, la localisation des cellules souches semble être un moyen de les protéger contre la toxicité du contenu intestinal.

L'homéostasie de l'épithélium colique est basée sur un renouvellement rapide et constant de la monocouche épithéliale. A partir des cellules souches, les cellules vont proliférer et se différencier tout en remontant le long de la glande, puis vont être exfoliées en haut. On parle de *turnover* cellulaire. La durée du turnover cellulaire intestinal est de 2 à 7 jours **(Crosnier *et al.* 2006)**.

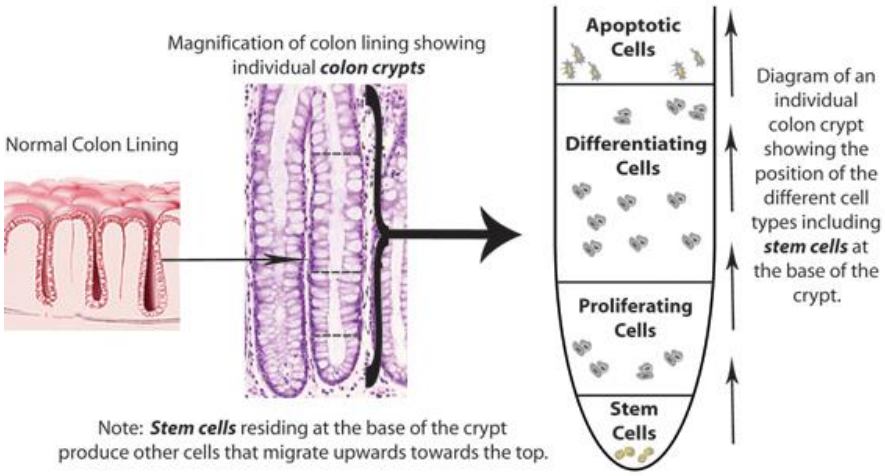

Figure 5 : Glande de Lieberkühn et turn over cellulaire
Hopkinscoloncancercenter.org

✓ *Les cellules de la muqueuse forment la barrière intestinale*

Les cellules de l'épithélium colique forment une barrière protectrice envers les pathogènes potentiels présents dans la lumière intestinale tout en laissant passer les solutés, les nutriments et les ions dans la muqueuse **(Guzman *et al.* 2013)**. Pour réaliser pleinement ce rôle de barrière, essentiel à une bonne santé, les cellules épithéliales interagissent fortement entre elles par

l'intermédiaire de plusieurs complexes de jonctions intercellulaires : les jonctions serrées, les jonctions intermédiaires, les desmosomes et les jonctions communicantes **[Figure 6 A]**.

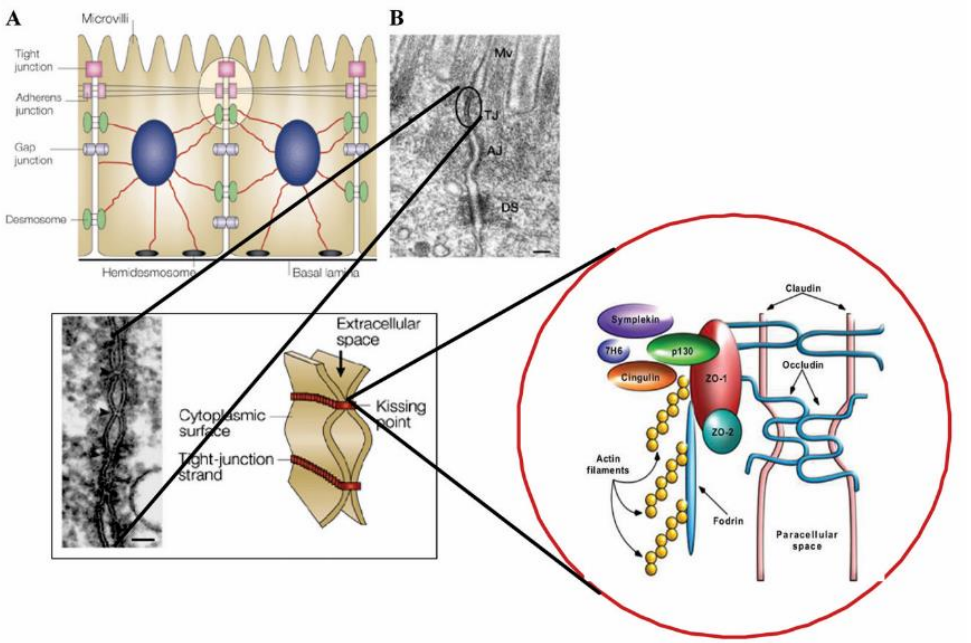

Figure 6 : Organisation macroscopique **(A)** et composition microscopique **(B)** des jonctions serrées intercellulaires
Visser *et al.* 2009

Les jonctions serrées jouent un rôle fondamental dans le maintien de la fonction de filtre sélectif de l'épithélium. Elles sont composées de protéines transmembranaires (occludine, claudines et JAM-A, *Junctionnal Adhesion Molecule*) auxquelles se fixent les protéines intracellulaires (ZO, *Zonula Occludens*), ces dernières assurant la liaison avec les protéines du cytosquelette **[Figure 6 B]**.

c. Du tissu sain au carcinome

Comme nous l'avons vu ci-dessus, l'épithélium colique se renouvelle constamment avec un équilibre régulé entre prolifération et différenciation cellulaire. Cependant, des défauts dans la régulation de la différenciation, de la prolifération et/ou de l'apoptose des cellules conduisent à l'accumulation d'anomalies pouvant aboutir à un cancer colorectal. Du tissu sain au carcinome, il existe différents stades **[Figure 7]** :

- Les lésions prénéoplasiques constituent la première anomalie décelable. Il en existe plusieurs types, les plus répandus étant les foyers de cryptes aberrantes (ACF) **(Pretlow *et al.* 1991)** et les foyers déplétés en mucine (MDF) **(Femia *et al.* 2004)**.

- Les adénomes sont des lésions néoplasiques qui peuvent aboutir à un carcinome. L'adénome plan, ou adénome non polypoïde, est une lésion érythémateuse de l'ordre du centimètre de diamètre, d'architecture tubuleuse, que l'on retrouve essentiellement entre le côlon proximal et le côlon distal avec une prédominance pour le colon transverse. A l'opposé des adénomes plans, les adénomes polypoïdes ou polypes peuvent mesurer 2 mm à plus de 60 mm et se localisent au niveau du rectum et du colon sigmoïde **(Torlakovic *et al.* 2003)**. Environ 5% des adénomes progressent vers un cancer, la durée moyenne étant de 10 ans **(Stryker *et al.* 1987)**.

- Les adénocarcinomes constituent la plupart des cancers colorectaux. Au début l'adénocarcinome est dit *in situ,* il se développe en superficie, d'abord intra-épithélial puis intramuqueux. Puis lorsque l'adénocarcinome dépasse la musculaire muqueuse on parle d'adénocarcinome infiltrant. Le carcinome s'étend ensuite progressivement en profondeur dans la paroi colique, dans la sous-muqueuse, dans la musculeuse, puis dans la sous-séreuse et la séreuse.

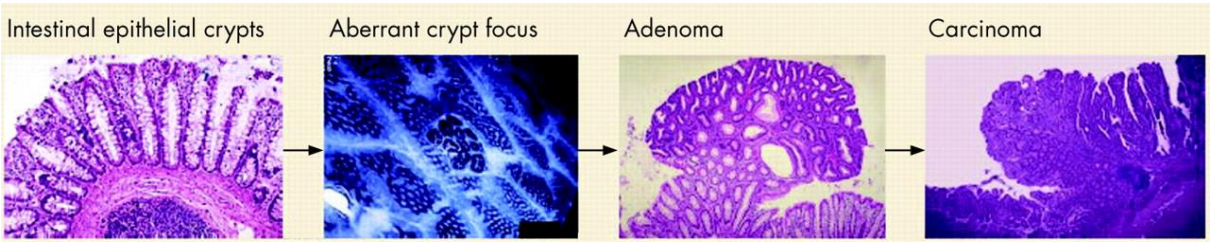

Figure 7 : Evolution histopathologique du cancer colorectal
PathologyOutlines.com

4) Voies et mutations impliquées dans le cancer colorectal

a. Voies initiatrices du cancer colorectal

Trois voies initiatrices de la cancérogenèse colorectale ont été mises en évidence **[Figure 8]** :

- L'instabilité chromosomique

L'instabilité chromosomique a été la première voie décrite **(Fearon and Vogelstein 1990)**. Elle caractérise la majorité des cancers de formes sporadiques et se retrouve dans tous les cas de polypose adénomateuse familiale (PAF) **(Fearon 2011)**. Quatre phases se distinguent de ce modèle : l'initiation - la promotion – la progression et l'invasion. Chaque phase est associée à une mutation ou à une délétion de gène : mutation d'*Apc* pour l'initiation, mutation de *K-ras* pour la promotion, délétion de *18q* et mutation de *TP57* pour la progression.

- L'instabilité microsatellitaire (MSI)

Ce deuxième type d'instabilité a été décrit initialement dans les tumeurs des patients atteints du syndrome de Lynch **(Gryfe *et al.* 1997)**. Il est lié à un défaut de réparation de l'ADN du à une mutation somatique des gènes *MMR*. Ces altérations mènent à un dysfonctionnement du cycle cellulaire et de l'apoptose avec inhibition des gènes *TGFβ RII* et *BAX*.

- L'hyperméthylation des ilots CPG (CIMP)

Dans 10 à 12% des cancers sporadiques suivant la voie MSI, les tumeurs peuvent se développer à partir d'adénomes festonnés sessiles. Cette voie a deux caractéristiques : la mutation précoce du gène *BRAF* et l'hyperméthylation des régions riches en dinucléotides cytosine et guanine, appelés îlots CpG (CpG island methylator phenotype, *CIMP*). Ces modifications de l'ADN peuvent inhiber l'expression de certains gènes suppresseurs de tumeurs comme le gène MLH1 **(Issa *et al.* 2005)**.

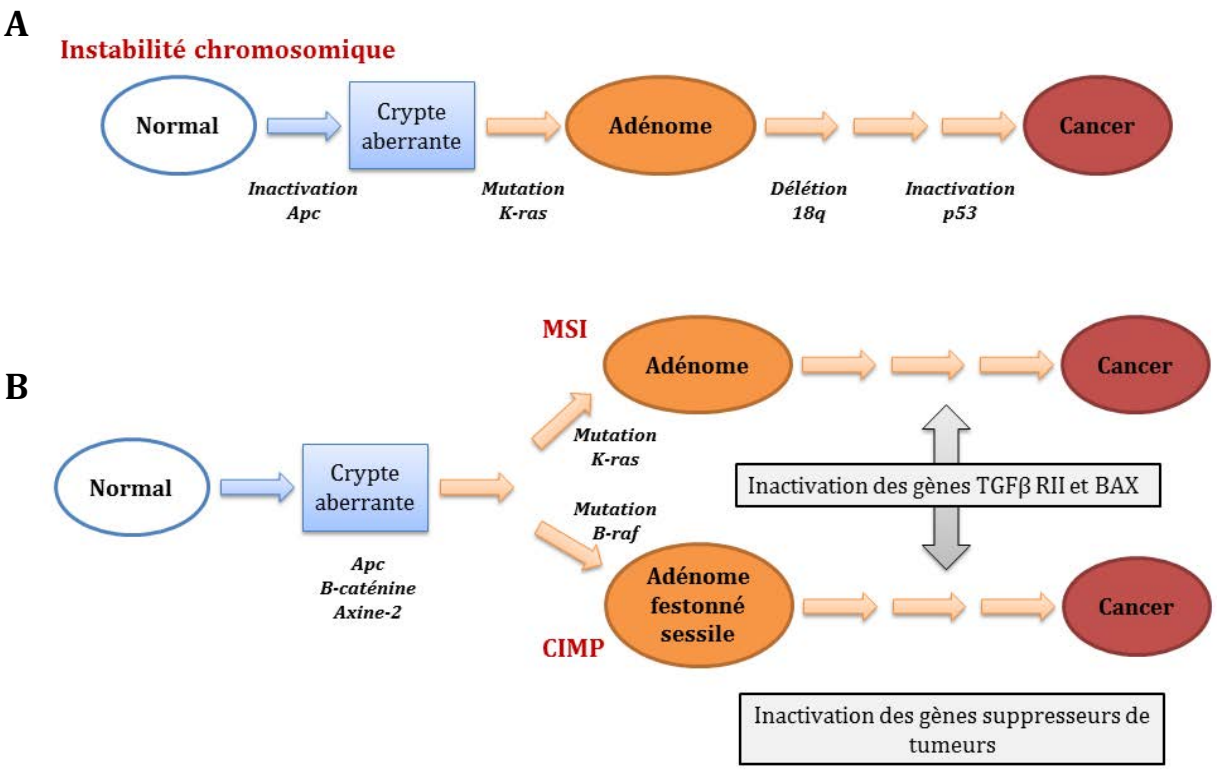

Figure 8 : Voies initiatrices de la cancérogenèse colorectale : instabilité chromosomique **(A)** et instabillité microsatellitaire **(B)**
D'après **Fearon 2011**

b. Mutations précoces impliquées dans la cancérogenèse colorectale

Les deux gènes les plus fréquemment mutés dans les stades précoce de la cancérogenèse colorectale sont le gène *Apc* (*Adenomatous polyposis coli*) et le gène *K-ras* (*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) **(Alrawi *et al.* 2006)**.

✓ *Le gène Adenomatous polyposis coli (Apc)*

La mutation du gène *Apc* est l'évènement le plus précoce de la cancérogenèse colorectale. L'inactivation de ce gène intervient dans 70 à 80 % des cancers sporadiques et dans 100 % des cas de cancers héréditaires de type PAF **(Fearon 2011)**.

Le gène *Apc* est un gène suppresseur de tumeurs localisé sur le chromosome 5q et qui code pour une protéine de 300 kDa. Cette protéine est impliquée dans de nombreuses voies moléculaires essentielles au bon fonctionnement de la cellule. Elle (i) régule la β-caténine et contrôle l'activation de nombreux gènes dont certains interviennent dans la prolifération cellulaire, (ii) maintien l'intégrité du cytosquelette de la cellule et (iii) joue un rôle dans l'instabilité chromosomique.

(i) APC est impliquée dans la régulation de la β-caténine *via* la voie Wnt

La fonction principale de la protéine APC est la régulation du pool de β-caténine cellulaire. La voie de signalisation Wnt a un rôle important dans l'homéostasie colique puisqu'elle intervient dans le contrôle du renouvellement cellulaire et de l'architecture des cryptes **(Burgess *et al.* 2011)**. Dans une cellule normale et non stimulée par un ligand Wnt, APC forme un complexe protéique avec l'axine, la GSK3β (glycogène synthase-3β) et la CK1α (caséine kinase 1α). Ce complexe phosphoryle la β-caténine ce qui induit son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome **[Figure 9, A]**.

Lorsqu'un ligand Wnt se fixe à son récepteur, la voie est activée ayant pour conséquence l'inhibition du complexe protéique APC/Axine/GSK3β/CK1α. Ainsi, le pool de β-caténine libre dans la cellule va augmenter et va pouvoir transloquer dans le noyau. La β-caténine va alors activer la transcription de gènes cibles normalement inhibés **[Figure 9, B]**.

Dans une cellule mutée pour *Apc*, la troncation de la protéine APC ne permet pas la formation du complexe de phosphorylation de la β-caténine. Le pool de β-caténine va donc augmenter sans pouvoir être régulé et va activer en permanence la transcription des gènes cibles tels que *c-myc*, impliqué dans la prolifération cellulaire, ou la cycline D1, impliqué dans le cycle cellulaire, et va ainsi favoriser la prolifération incontrôlée de la cellule **(Narayan and Roy 2003; Fearon 2011)**.

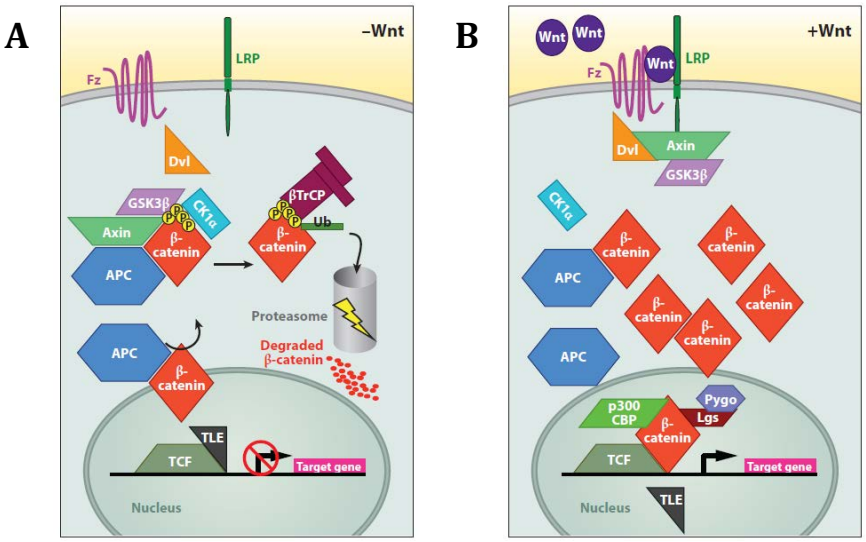

Figure 9 : Implication de la protéine APC dans la régulation du pool cellulaire de β-caténine lorsque la voie Wnt est inactive **(A)** ou active **(B)**
Fearon 2011

(ii) APC maintien l'intégrité du cytosquelette de la cellule

Comme nous l'avons vu précédemment, l'épithélium colique est en constant renouvellement. Le cytosquelette est impliqué dans les mécanismes de migration, de division et de différenciation des cellules nécessaire à l'homéostasie de cet épithélium. La protéine APC maintien l'intégrité du cytosquelette en régulant la stabilité des microtubules, la migration cellulaire, l'orientation des cellules et leur polarité. Lorsque le gène est muté et la protéine tronquée toutes ces fonctions sont perturbées **(Nathke 2004)**.

(iii) APC joue un rôle dans la stabilité chromosomique

Durant la mitose APC se localise d'une part au niveau des kinétochores (complexe de protéines qui s'assemble près des centromères des chromosomes mitotiques) où elle régule l'attachement correct des chromosomes au fuseau mitotique et participe ainsi à l'un des nombreux points de contrôle de la mitose : le SAC (Spindle Assembly Checkpoint). D'autre part, APC se localise au niveau des centrosomes (point de polymérisation des microtubules) essentiels à la formation de la plaque équatoriale et au déplacement polaire des chromosomes. La mutation du gène *Apc*, ne permettant pas une bonne ségrégation des chromosomes va aboutir à une aneuploïdie qui est une des caractéristiques des tumeurs avancées **(Rusan and Peifer 2008)**.

✓ *Le gène K-ras*

Les protéines Ras sont de petites GTPases jouant un rôle dans de nombreuses voies de signalisation de récepteur type tyrosine kinase **(Karnoub and Weinberg 2008)**. Les mutations de *K-ras* entrainent une activation constitutive des voies de signalisation qui favorisent la croissance, la survie, la progression tumorale, la formation de métastase et l'angiogenèse **(Downward 2003)**. Chez l'homme, la mutation du gène *K-ras* est retrouvée dans la majorité des ACF (foyers de cryptes aberrantes) hyperplasiques **(Alrawi *et al.* 2006)**.

5) Méthodes et modèles utilisés pour étudier le cancer colorectal

a. Analyse des données épidémiologiques sur le cancer

Les études épidémiologiques permettent d'évaluer l'impact des facteurs environnementaux sur la survenue d'une maladie, comme le cancer colorectal, au niveau des populations. Il en existe deux types : les études rétrospectives et les études prospectives.

Les **études rétrospectives** sont également appelées études cas-témoins. Des sujets malades (cas) et des sujets sains (témoins) sont sélectionnés et des questionnaires vont permettre de chercher, dans chaque catégorie et de manière rétrospective, la présence ou l'absence du facteur d'exposition étudié.

Les **études prospectives**, appelées également études de cohortes, semblent plus adaptées pour évaluer les risques. Les sujets sont sélectionnés en fonction de leur exposition au facteur étudié (exposés *vs* non exposés) et sont suivis pendant une période déterminée, souvent très longue, au bout de laquelle on dénombre les cas de maladie dans chaque catégorie. Ce type d'étude permet de calculer le risque relatif c'est à dire le rapport entre l'incidence dans le groupe exposé sur l'incidence dans le groupe non-exposé au facteur de risque testé. Ce risque relatif est un nombre sans unité compris entre 0 et l'infini. Plus il est éloigné de 1, plus l'association entre la survenue de la maladie et la présence du facteur étudié est forte **(Ancelle 2011)**.

Cependant, chaque étude va donner un risque relatif différent et parfois même contradictoire. C'est pourquoi les chercheurs utilisent un outil pour regrouper plusieurs études comparables et donner un résultat global : la méta-analyse. Ainsi, la méta-analyse semble être indispensable pour compiler les différents résultats des études épidémiologiques **(Cucherat *et al.* 1997)**. Ce sont ces approches qui sont suivies par le WCRF et l'AICR afin de mettre en avant une association entre un facteur de risque et un type de cancer. Une fois l'association faite, elle doit être vérifiée dans des études expérimentales.

b. Etudes expérimentales du lien entre alimentation et cancer

En plus d'avoir compilé toutes les études sur de très nombreux cancers et l'alimentation, le rapport du WCRF/AICR de 2007 a apporté une classification de robustesse des différentes études expérimentales **(WCRF/AICR 2007)**. Ainsi cette classification peut aider les chercheurs à réfléchir sur la pertinence des modèles utilisés vis-à-vis du risque chez l'homme. Ils ont ainsi catégorisé les études en 3 classes allant des études considérées comme les plus robustes vers celles considérées comme les moins robustes pour étudier le lien entre cancérogenèse et alimentation :

- **Classe 1 :** Les données *in vivo* provenant d'études chez des volontaires humains, provenant d'études chez des animaux modèles génétiquement modifiés (animaux KO ou transgéniques) ou provenant d'étude utilisant des rongeurs modèles de cancérogenèse afin d'étudier les processus de la cancérogenèse.
- **Classe 2 :** Les données *in vitro* provenant d'études utilisant des cellules humaines validées avec un animal modèle, provenant d'étude utilisant des cellules primaires humaines ou provenant d'étude utilisant des lignées cellulaires humaines.
- **Classe 3 :** Les données *in vitro* provenant d'études sur des cellules animales ou provenant de système d'étude mécanistique comme des enzymes ou des gènes isolés par exemple.

✓ *Stratégies de l'équipe PPCA*

L'équipe PPCA est très attentive à avoir une approche globale du sujet en mêlant expérimentations animales et cellulaires. Les modèles animaux utilisés sont en cohérence avec les attentes du WCRF/AICR et la compréhension des mécanismes se fait à l'aide de modèles cellulaires en adéquation avec les modèles *in vivo* utilisés. Les collaborations avec le Centre de Recherche en Nutrition Humaine (CNRH, Clermont-Ferrand) et avec l'Institut Gustave Roussy (Paris) nous permettent de travailler chez des volontaires sains et de vérifier au niveau épidémiologique les hypothèses générées par les études menées avec les modèles animaux et cellulaires.

Les premières études de cancérogenèse de l'équipe, sur des modèles animaux, ont permis de valider l'association positive observée par les données épidémiologiques mais, également, d'identifier des biomarqueurs fécaux et urinaires associés à la promotion de la cancérogenèse colorectale **(Pierre *et al.* 2003,2004,2006)**. L'identification de ces biomarqueurs permet de réaliser des études court-terme dans lesquelles de nombreux régimes (promoteurs ou protecteurs) sont testés. Les régimes les plus intéressants, en termes de stratégie de prévention par exemple, sont

sélectionnés afin d'évaluer leurs effets dans des études long-terme de cancérogenèse **(Santarelli *et al.* 2010 ; Pierre *et al.* 2013)**. D'autre part, nous réalisons une démarche de complexification progressive des régimes alimentaires. Lorsqu'une nouvelle hypothèse est à tester, nous travaillons, dans un premier temps, avec des régimes enrichis en molécules purifiées puis, si l'hypothèse est confirmée, nous mettons en place des expérimentations avec des viandes rouges et des charcuteries similaires à celles consommées chez l'homme *(ce qui est le cas dans le projet SécuriViande : Chapitre 1 de la thèse)*.

c. Modèles animaux utilisés pendant la thèse

Les études pour vérifier l'effet d'un aliment sur l'initiation de la cancérogenèse sont très longues (environ 2 ans) et peu réalisées en pratique **(Yang *et al.* 2008 ; Newmark *et al.* 2009)**. La plupart des études regardent l'effet d'un aliment sur la promotion de la cancérogenèse colorectale en initiant les animaux avec un cancérigène colique ou en utilisant des animaux génétiquement modifiés. Dans le cadre de ma thèse, j'ai travaillé sur deux modèles animaux me permettant de me placer à deux stades distinct de la cancérogenèse : le rat initié à l'azoxyméthane afin de regarder les lésions précancéreuses de type MDF et la souris *Min* me permettant d'être au stade tumoral.

✓ *Rats initiés à l'azoxyméthane (AOM)*

Les rats (Fisher 344 dans le cadre de ma thèse) reçoivent une injection intra-péritonéale afin d'induire l'apparition de lésions précancéreuses (en 100 jours) ou de tumeurs (minimum un an) **(Femia and Caderni 2008)**. L'AOM est métabolisé par le foie en methylazoxymethanol qui va former des ions methyl-carbonium CH_3^+, un électrophile qui provoque des mutations par mésappariements au niveau guanine - tyrosine de l'ADN. Les tumeurs induites par ce cancérigène ont beaucoup de caractéristiques histopathologiques communes avec les tumeurs humaines. La séquence de développement des lésions précancéreuses et des carcinomes est similaire et présente souvent une mutation sur le gène K-ras (30-60%). Cependant, ces tumeurs ne présentent que rarement une mutation sur le gène *Apc* malgré une accumulation de β-caténine cellulaire **(Corpet and Pierre 2005)**. Deux types de lésions précancéreuses se développent à la suite d'une injection d'AOM : les ACF (foyers de cryptes aberrantes) et les MDF (foyers déplétés en mucine).

Les **MDF** ont été découvert il y a une dizaine d'années **(Caderni *et al.* 2003)**. Ils se caractérisent, comme leur nom l'indique, par une production nulle ou restreinte de mucine, par des cryptes plus petites et par une distorsion de leur lumière **(Femia *et al.* 2004) [Figure 10]**. Bien que

beaucoup moins utilisés que les ACF, plusieurs arguments laissent à penser qu'ils prédisent mieux la cancérogenèse colique :

- 25 % des MDF présentent la mutation du gène *Apc* alors que les ACF ne présentent que rarement cette mutation **(Femia *et al.* 2007; Perse and Cerar 2011)**. Pour rappel, la mutation *Apc* est la plus fréquemment retrouvée chez l'homme.
- Les MDF sont beaucoup moins nombreux que les ACF dans le colon (environ 10 MDF pour plus de 100 ACF) ce qui est plus cohérent avec le nombre de tumeurs **(Femia *et al.* 2004)**.
- Contrairement aux MDF **(Caderni *et al.* 2003)**, les corrélations entre ACF et tumeurs ne sont pas toujours observées certainement dues à la forte hétérogénéité des ACF **(Magnuson *et al.* 1993; Zheng *et al.* 1999)**. Par exemple, l'acide colique augmente le nombre de tumeurs et le nombre de MDF mais diminue le nombre d'ACF **(Femia *et al.* 2004)**.
- Comme chez l'homme, on retrouve principalement des MDF et des tumeurs dans la partie distale du côlon alors que les ACF sont plus souvent retrouvés dans la partie médiane du côlon **(Suzui *et al.* 2013)**.

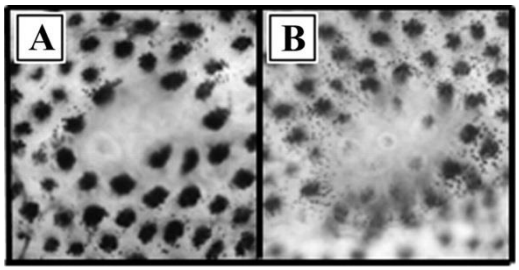

Figure 10 : Identification de MDF à 5 **(A)** ou 11 **(B)** cryptes déplétées en mucine après 100 jours de régime expérimental (grossissement x32 au microscope)
Pierre *et al.* 2004

✓ *Souris génétiquement mutées pour le gène Apc : Souris Min*

La souris *Min* (*Mutiple Intestinal Neoplasia*), mutée sur le gène *Apc*, est apparue en 1990 **(Moser *et al.* 1990)**. Ces souris de souche C57BL6/J développent spontanément de nombreuses tumeurs vers 10 semaines, principalement localisées au niveau de l'intestin grêle **(Su *et al.* 1992) [Figure 11]**. C'est une mutation germinale non-sens au niveau du codon 850 qui permet l'inactivation du gène *Apc*, ce qui est également retrouvé chez les patients atteints de FAP et dans de nombreux cancers sporadiques. A contrario, les souris *Min* ne semblent pas avoir de mutations sur les gènes *K-ras* et *p53* contrairement à ce qui est retrouvé chez l'homme **(Corpet and Pierre 2005)**.

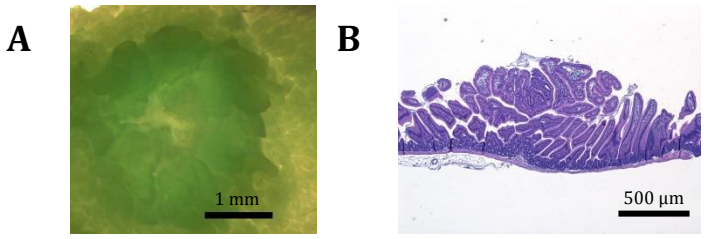

Figure 11 : Tumeur observée à la loupe **(A)** ou en coupe **(B)** retrouvée chez une souris *Min* après 45 jours de régime expérimental.

A : coloration au bleu de méthylène, grossissement x250 à la loupe.
B : coloration à l'hémalun-éosine, grossissement x40 au microscope.

✓ *Pertinence des modèles animaux utilisés*

Les caractéristiques principales de la cancérogenèse colorectale chez l'homme, le rat initié à l'AOM et la souris *Min* sont présentées dans le **Tableau 2**.

	Hommes (Cancer sporadique)	**Rat initié à l'AOM**	**Souris *Min***
Initiation de la cancérogenèse	Spontanée	Induite pas un cancérigène auquel l'homme n'est pas exposé	Mutation germinale
Mutation initiatrice principale	*Apc*	*K-ras*	*Apc*
Localisation principale des lésions/tumeurs	Colon-Rectum	Colon-Rectum	Intestin grêle
Durée de développement de la cancérogenèse	> 10 ans	MDF : 100 jours Tumeurs : 1 an	50 jours

Tableau 2 : Comparaison des principales caractéristiques de la cancérogenèse chez l'homme et dans les deux modèles animaux utilisés pendant la thèse.

Ce qui est comparable à la situation humaine est indiqué en vert, ce qui est différent en rouge.

Le **Tableau 2** montre bien qu'aucun des deux modèles utilisés n'est parfait pour mimer ce qui se passe dans la situation humaine d'où l'importance d'utiliser ces deux modèles de manière complémentaire. De plus, une étude de corrélation réalisée sur 179 études a permis de mettre en évidence une bonne homogénéité entre les résultats provenant de ces deux modèles animaux **(Corpet and Pierre 2003)**. Dans le même sens, une méta-analyse, regroupant l'effet de plusieurs agents protecteurs dans des études de récurrence d'adénome chez l'homme et dans des études

avec ces deux modèles animaux, a montré qu'ils prédisaient globalement assez bien la cancérogenèse humaine **(Corpet and Pierre 2005)**.

d. Modèles cellulaires utilisés pendant la thèse

Les lignées cellulaires couramment utilisées (HT-29, Caco-2, CMT93, …) sont issues de carcinomes et représentent donc un stade avancé de la cancérogenèse colorectale. Ainsi ces lignées ne correspondent pas aux stades de la pathologie abordés dans nos modèles animaux et notamment au début de la promotion. Afin de pallier ce manque, deux lignées cellulaires constituées de cellules de souris C57BL6 wild-type ($Apc^{+/+}$) et de souris *Min* mutées sur le gène *Apc* ($Apc^{Min/+}$) ont été établies **(Forest *et al.* 2003b)**. La caractérisation de la lignée cellulaire précancéreuse $Apc^{Min/+}$ a permis de mettre en évidence que, comme attendu, la mutation augmentait faiblement l'expression de β-caténine, désorganisait le réseau d'actine **[Figure 12]**, diminuait significativement la migration cellulaire et augmentait la capacité des cellules à former des clones en agar **(Forest *et al.* 2003a)**.

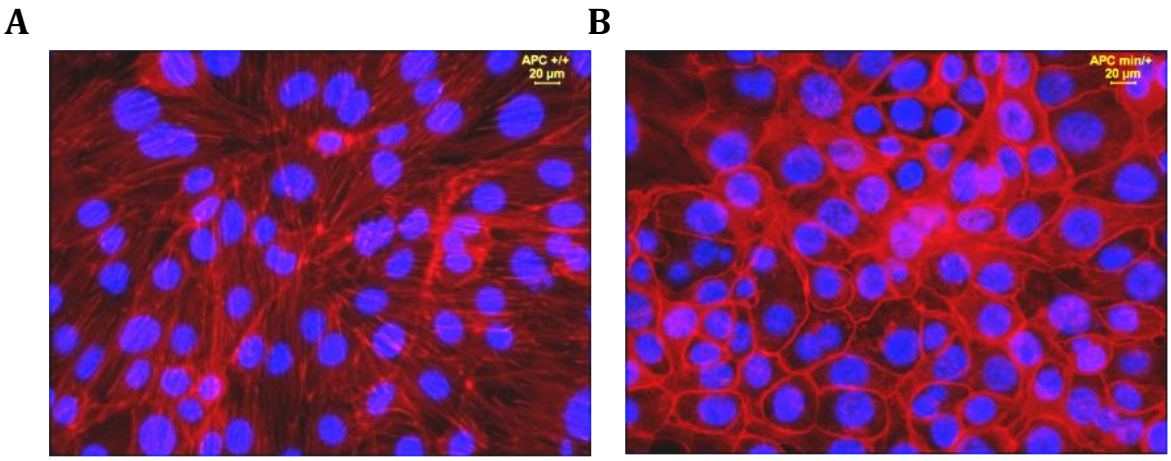

Figure 12 : Différence de structure du réseau d'actine entre les lignées cellulaires normale $Apc^{+/+}$ **(A)** et précancéreuse $Apc^{Min/+}$ **(B)**.

Marquage des noyaux en bleu par coloration au DAPI. En rouge, le réseau d'actine révélé avec un anticorps anti-phalloïdine par immunofluorescence **(Forest *et al.* 2003a)**

Les lignées cellulaires ainsi obtenues, en associant des cellules normales à des cellules précancéreuses, permettent de modéliser les stades précoces de la cancérogenèse colorectale et d'observer les conséquences de la mutation du gène *Apc*. Nous disposons ainsi d'un modèle cohérent avec nos modèles *in vivo* puisque cette mutation est présente au niveau de 25 % des MDF, de 33 % des tumeurs des rats initiés et dans toutes les tumeurs de la souris *Min* **(Moser *et al.* 1990 ; Femia *et al.* 2007 ; Perse and Cerar 2011)**.

Ainsi, tester un composé sur les deux lignées cellulaires permet de déterminer s'il est plutôt promoteur ou protecteur. En effet, la sélection des cellules précancéreuses au détriment des cellules normales est interprétée comme un effet promoteur. A l'inverse la sélection des cellules normales est interprétée comme protecteur.

Afin d'être cohérent avec les modèles *in vivo* utilisés, nous choisissons au début de notre protocole avec quelle lignée cellulaire nous allons travailler :

- Dans les études utilisant le rat initié, nous utiliserons les deux lignées cellulaires et nous nous nous intéresserons au différentiel entre ces deux lignées puisque dans le modèle *in vivo*, il y a coexistence de cellules normales et de cellules mutées pour *Apc*.
- Dans les études chez la souris *Min*, nous n'utilisons que les cellules $Apc^{Min/+}$ puisque chez cette souris toutes les cellules sont mutées pour *Apc*.
- Enfin, lorsque nous testons une nouvelle hypothèse dans des expérimentations court-terme chez le rat non initié, nous étudions les mécanismes en n'utilisant que la lignée cellulaire $Apc^{+/+}$ puisqu'*in vivo* les animaux n'ont que des cellules normales et pas de cellules mutées.

II. Cancer colorectal et consommation de produits à base de viande rouge

1) Le rapport du WCRF/AICR : de l'établissement du risque à la mise en place de recommandations nutritionnelles

a. Données épidémiologiques

Comme nous l'avons vu dans la section précédente, le WCRF/AICR a classé la consommation de viandes rouges et de charcuteries comme un facteur convainquant (le plus haut niveau de preuve) pour le risque de cancer colorectal. Dans les études épidémiologiques, les viandes de bœuf, de veau, de porc, d'agneau, de mouton et les abats sont considérées comme des viandes rouges. La charcuterie regroupe toutes les viandes ayant reçu une étape de conservation par des techniques de fumage, de salaison ou par ajouts d'agents préservateurs **(WCRF/AICR 2007)**. Dans le rapport de 2007, les méta-analyses d'études de cohorte pour les viandes rouges et les charcuteries ont donné des risques relatifs globaux significatifs : 1,29 [IC 95 % : 1,04-1,60] pour 100 g/jour de viandes rouges et 1,21 [IC 95% : 1,04-1,42] pour 50 g/jour de charcuterie. Soit

une augmentation de 29 % du risque de cancer colorectal pour 100 g de viande rouge consommés par jour et de 21 % pour 50 g de charcuterie par jour. Le risque global pour la consommation de produits à base de viande rouge est de 1,16 pour 100 g consommés par jour **(WCRF/AICR 2007)**.

Dans le cadre du Continuous Update Project (CUP) mené par le WCRF, la mise à jour de 2010 a permis d'ajouter de nouvelles études à la méta-analyse et d'affiner le risque. Il a été évalué à 1,17 [IC 95 % : 1,05-1,31] pour 100 g de viande rouge consommés par jour **(WCRF/AICR 2010) [Figure 13]**.

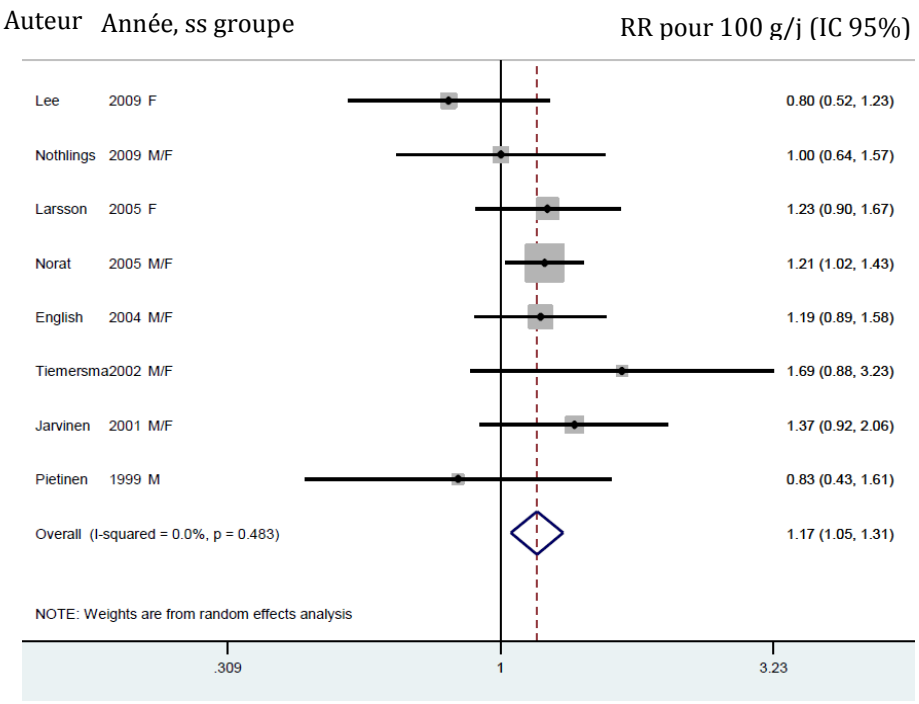

Figure 13 : Méta-analyse des études de cohorte sur le lien entre viande rouge et risque de cancer colorectal (pour 100 g/j)
WCRF/AICR, 2010

Pour les charcuteries le risque a été évalué à 1,18 [IC 95 % : 1,10-1,28] pour 50 g de charcuteries consommés par jour **[Figure 14]**.

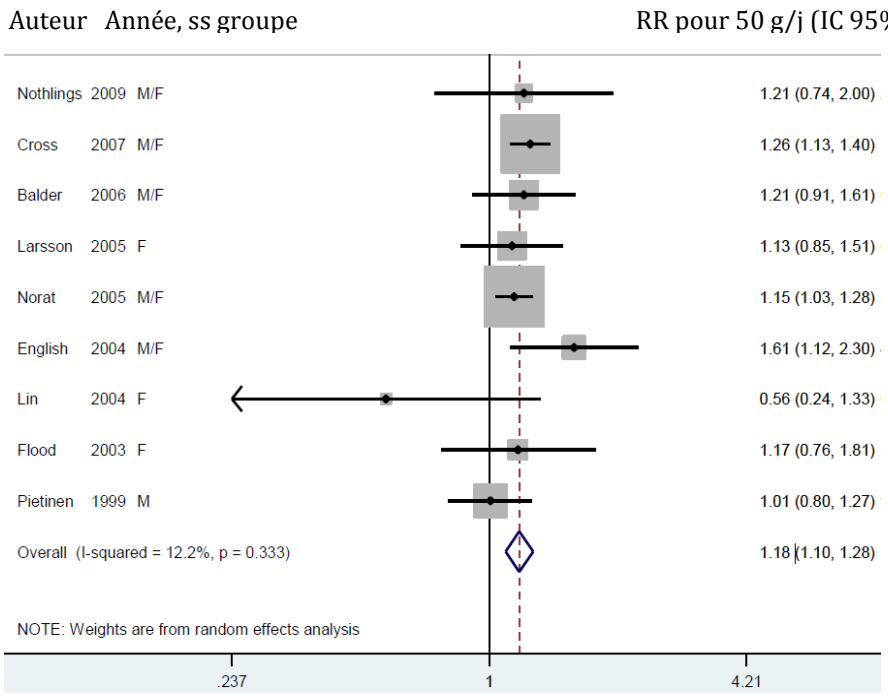

Figure 14 : Méta-analyse des études de cohorte sur le lien entre charcuteries et risque de cancer colorectal (pour 50 g/j)
WCRF/AICR, 2010

Depuis la dernière mise à jour, deux autres méta-analyses donnant les risques relatifs pour 100 g de viande rouge ou pour 50 g de charcuterie par semaine ont été publiées **[Tableau 3]**. Ces deux études confirment les associations significatives observées par le WCRF/AICR.

	Viande rouge	**Charcuteries**	**Etudes**
(Xu *et al.* 2013)	1,36 [1,17-1,58]	1,28 [1,03-1,60]	21 études cas-témoins 5 études prospectives
(Aune *et al.* 2013)	1,27 [1,16-1,40]	1,29 [1,10-1,53]	19 études cas-témoins 7 études prospectives

Tableau 3 : Risque relatif et intervalle de confiance des méta-analyses publiées après la mise à jour du rapport du WCRF/AICR de 2010

De manière intéressante, une étude de cohorte européenne EPIC (European Prospective Investigation into Cancer and nutrition) montre que les cas de cancer colorectaux présentant une mutation du gène *Apc* provenaient des personnes consommant le plus de viandes rouges et de charcuteries **(Gay *et al.* 2012)**.

b. Recommandations nutritionnelles

Les données épidémiologiques suggèrent que les deux tiers des cas de cancer du côlon pourraient être prévenus par une meilleure alimentation **(Cummings and Bingham 1998)**. Dans le même sens, une étude anglaise de 2011 estime que 54,4% des cancers colorectaux sont dus à des facteurs évitables : mode de vie et/ou facteurs environnementaux. Dans cette même étude, les auteurs estiment que 21.1% des cas de cancers colorectaux pourraient être dus à la consommation de viande rouge et de charcuterie **(Parkin 2011)**. Le WCRF estime, pour la population américaine, que le taux de cancer colorectaux liés à la consommation de produits à base de viande rouge est de 17% **(WCRF/AICR 2011)**. Dans ce cadre, et au vu des résultats des méta-analyses effectuées, les experts du WCRF/AICR ont émis une recommandation forte concernant la consommation de produits à base de viande rouge :

Limiter la consommation de viande rouge et éviter la consommation de charcuterie

Ainsi la consommation de viande rouge devrait se limiter à moins de 500 g par semaine au niveau individuel et à moins de 300 g au niveau de la population et la charcuterie devrait être complètement évincée de notre alimentation.

✓ *Niveau de consommation de produits à base de viande rouge de la population française*

En ce qui concerne la population française, en 2007, la consommation de viande (hors volaille, gibiers, abats) a été estimée à environ 370 g par semaine en moyenne tous sexes confondus avec 460 g consommés par les hommes et 285 g consommés par les femmes. La consommation de charcuterie a été estimée à 270 g par semaine en moyenne, tous sexes confondus avec 330 g consommé par les hommes et 215 g consommés par les femmes. Un quart de la population consomme plus de 500 g de viande rouge par semaine et plus de 50 g de charcuterie par jour **(PNNS 2009)**.

✓ *Niveau de consommation de produits à base de viande rouge de la population américaine*

En 2004, la consommation de viande (hors volaille) aux Etats-Unis était supérieure d'un facteur 1,3 par rapport à la consommation française. Elle a été estimée à 490 g par semaine en moyenne tous sexes confondus avec 610 g consommés par les hommes et 370 g consommés par les femmes. *A contrario*, la consommation de charcuteries est réduite d'un facteur 1,7 comparée à la consommation française, avec 160 g par semaine consommés en moyenne, tous sexes confondus (200 g par les hommes et 120 g par les femmes) **(Daniel *et al.* 2011)**.

2) Hypothèses mécanistiques

Grâce aux études épidémiologiques, il est de plus en plus évident qu'il existe une association entre consommation de produits à base de viande rouge et risque de cancer colorectal. Cependant les mécanismes exacts ne sont pas encore clairs. Plusieurs hypothèses ont été testées pour tenter d'expliquer ce lien et notamment l'impact des graisses, des protéines, des amines hétérocycliques ou des hydrocarbures aromatiques polycycliques formés pendant la cuisson, les composés *N*-nitrosés et le fer héminique. La viande étant une matrice complexe il est toutefois possible que l'effet observé provienne de l'effet de différents composants et non d'un seul.

a. Graisses animales

La méta-analyse d'Alexander *et al.*, regroupant 6 études de cohortes, n'a montré aucune association entre l'apport en graisse animale et le risque de cancer colorectal **(Alexander *et al.* 2009)**. De plus, d'autres études épidémiologiques non inclues dans la méta-analyse ne montrent pas d'effet **(Beresford *et al.* 2006; Sun *et al.* 2012; Zhong *et al.* 2013)**. Cependant, dans les modèles animaux de cancérogenèse les régimes gras augmentent le nombre de tumeurs **(Corpet 2011a)**. Cet effet est probablement dû à l'augmentation du risque d'obésité et d'insulino-résistance engendré par un régime riche en graisse qui a pour conséquence une augmentation de la prolifération cellulaire et une diminution de l'apoptose, conduisant ainsi à la promotion de la cancérogenèse colorectale chez les animaux **(Calle and Kaaks 2004)**.

b. Protéines animales

Dans sa méta-analyse, Alexander a également regardé le lien entre protéines d'origine animale et risque de cancer colorectal **(Alexander *et al.* 2009)**. Le risque relatif n'est pas significatif : 0,9 [IC 95% : 0,70-1,15]. Finalement, peu d'études ont les données nécessaires pour analyser le risque de cancer colorectal associé à la consommation de protéines animales. Hormis les études comprises dans la méta-analyse d'Alexander, une étude de cohorte n'a montré aucune association entre protéines animales et risque de CRC **(Goldbohm *et al.* 1994)** et deux études cas-témoins ont montré une protection de l'apport de protéines animales vis-à-vis du risque de CRC **(Williams *et al.* 2010; Sun *et al.* 2012)**. Les résultats chez les animaux sont également controversés, certaines études montrent un effet protecteur, d'autres un effet promoteur selon la quantité et la qualité des protéines utilisées **(McIntosh and Le Leu 2001)**.

c. Composés formés lors de la cuisson

La cuisson des viandes à hautes températures conduit à la formation d'amines hétérocycliques (AHC) et d'hydrocarbures polycycliques aromatiques (HAP).

Les AHC sont les produits de réaction entre la créatine ou la créatinine, des acides aminés et des sucres provenant des muscles de la viande lorsqu'elle est cuite à haute température. Les plus abondantes sont le PhIP (2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine) et le MeIQx (2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline) **(Jagerstad and Skog 1991)**. Au niveau épidémiologique des études montrent une association positive entre AHC et cancer colorectal **(Zheng and Lee 2009; Cross *et al.* 2010)** tandis que d'autres ne montrent pas d'effet **(Ollberding *et al.* 2012)** ou des effets contradictoires **(Abid *et al.* 2014)**.

Les HAP proviennent de la pyrolyse des acides gras de la viande lorsqu'elle est cuite directement au contact d'une flamme, comme lors de la cuisson au barbecue, par exemple. Le HAP le plus nocif est le BaP (benzo[a]pyrène) **(Phillips 1999)**. Peu d'études étudient séparément les AHC des HAP, la plupart des études sont réalisées à partir de questionnaires demandant les niveaux de cuisson généralement utilisés, et en l'absence de biomarqueurs d'exposition, il est difficile de conclure sur l'un ou l'autre des types de mutagènes. Récemment, l'étude d'Abid a montré que le BaP était associé aux adénomes colorectaux mais pas aux cancers colorectaux dans deux études de cohortes de grande envergure **(Abid *et al.* 2014)**. De même, l'étude de Tabatabei a montré une absence d'association entre BaP et risque de cancer colorectal **(Tabatabaei *et al.* 2010)**.

Ainsi, en l'absence de méta-analyses, il semble difficile de conclure sur les études épidémiologiques impliquant les AHC et les HAP notamment en raison des différences de résultats. Ces différences pourraient s'expliquer par le fait que certaines personnes seraient plus sensibles aux AHC et aux HAP que d'autres en raison de polymorphismes génétiques particuliers **(Wang *et al.* 2011; Gilsing *et al.* 2012)**. L'étude de Gilsing *et al* montre que le polymorphisme NAT1 (N-acétyl transferase 1) modifierait l'association entre l'apport de MeIQx et le risque d'adénomes colorectaux. Chez le singe et les rongeurs les AHC et HAP sont très cancérigènes cependant les doses utilisées sont 10 000 fois supérieures à celles retrouvées dans notre alimentation **(Sugimura *et al.* 2004; Ferguson 2010)**.

d. Composés *N*-nitrosés

Des nitrites et des nitrates sont ajoutés dans les charcuteries afin d'assurer la formation de la couleur rose, pour leur gout et surtout pour la sécurité sanitaire du produit **(IFIP 2010)**. En plus de la consommation de charcuteries, l'homme est exposé aux nitrates à travers le cycle entérosalivaire et la présence de nitrates réductases des bactéries buccales **(Chenni *et al.* 2013)**. Chez l'homme, la consommation de viande rouge et de charcuterie augmente les teneurs en composés *N*-nitrosés fécaux **(Bingham *et al.* 2002; Kuhnle and Bingham 2007; Joosen *et al.* 2009)**.

Peu d'études ont regardé l'association entre nitrites, nitrates et risque de cancer colorectal. En 2014, Zhu a montré dans une étude cas-témoin, une association significative entre composés *N*-nitrosés et risque de cancer colorectal et plus particulièrement risque de cancer du rectum **(Zhu *et al.* 2014)**. Loh a montré dans l'étude de cohorte EPIC que les composés *N*-nitrosés alimentaires étaient associés au risque du cancer du rectum **(Loh *et al.* 2011)**. De même, Miller a montré dans une étude cas-témoin que la consommation de nitrites et de nitrates étaient associés au cancer du côlon proximal mais pas au cancer colorectal **(Miller *et al.* 2013)**. *A contrario*, Dellavalle n'a pas observé d'association significative entre consommation de nitrites et de nitrates et risque de CRC **(Dellavalle *et al.* 2014)**.

e. Fer héminique

En 2011, l'équipe PPCA a réalisé une méta-analyse des études de cohortes qui a montré une association positive entre consommation de fer héminique et risque de cancer du côlon **(Bastide *et al.* 2011)**. Ce résultat a récemment été confirmé dans une autre méta-analyse testant les 5 études de la méta-analyse de Bastide en y ajoutant 2 études plus récentes. Le risque relatif, de la comparaison entre les plus gros et les plus faibles consommateurs d'hème, est de 1,14 [IC 95% : 1,04-1,24] **(Qiao and Feng 2013)**. Enfin, Fonseca-Nunes *et al.* ont montré un risque de cancer colorectal accru de 8 % pour chaque augmentation de 1 mg de fer héminique par jour **(Fonseca-Nunes *et al.* 2014)**.

Outre les résultats de ces trois méta-analyses, plusieurs arguments laissent à penser que le fer héminique est un agent majeur dans le lien entre consommation de viande rouge et cancérogenèse colorectale :

- La viande blanche qui ne contient que peu de fer héminique n'est pas associée à la cancérogenèse colorectale contrairement à la viande rouge **(WCRF/AICR 2007)**.
- De même la viande blanche et la viande rouge contiennent la même quantité de protéines alors que seule la viande rouge est associée au risque **(Kim *et al.* 2013a)**.
- Le poulet grillé contient plus d'amines hétérocycliques que la viande de bœuf mais n'est pas associé au risque **(Heddle *et al.* 2001; Norat *et al.* 2002; Larsson and Wolk 2006)**. De même les céréales sont la source majeure de HAP mais ne sont pas non plus associées au risque **(Phillips 1999)**.
- Enfin, très récemment l'équipe a mis en place une expérimentation animale de cancérogenèse dans laquelle elle a testé l'effet des amines hétérocycliques, des nitrites et nitrates et du fer héminique à des doses nutritionnelles. Cette étude a permis de mettre en évidence que seul le fer héminique était promoteur de la cancérogenèse colorectale chez le rat chimio-induit **(Bastide *et al.* 2014)**.

3) Le fer héminique

a. Généralités

L'hème est composé d'un noyau porphyrine renfermant en son centre un atome de fer **[Figure 15, A]**. La capacité de l'atome de fer à changer d'état d'oxydation en fait un catalyseur biologique polyvalent qui peut être impliqué dans les réactions d'oxydation, de transfert d'électron et qui peut fournir de l'oxygène aux cellules. Chez les mammifères, l'hème est inclus dans les hémoprotéines comme l'hémoglobine ou la myoglobine. Ces hémoprotéines sont indispensables au stockage et au transport de l'oxygène dans l'organisme. Outre son importance physiologique, la molécule d'hème peut s'avérer dangereuse, lorsqu'elle est libérée des hémoprotéines, en raison de sa capacité à oxyder les lipides, les protéines et à causer des dommages à l'ADN **(Dutra and Bozza 2014)**. Ainsi, l'hème semble être impliqué dans un certain nombre de maladies telles que le cancer (colorectal, pancréatique, gastro-intestinal, endométrial, pulmonaire), le diabète de type-2 et les maladies cardio-vasculaires **(Hooda *et al.* 2014)**.

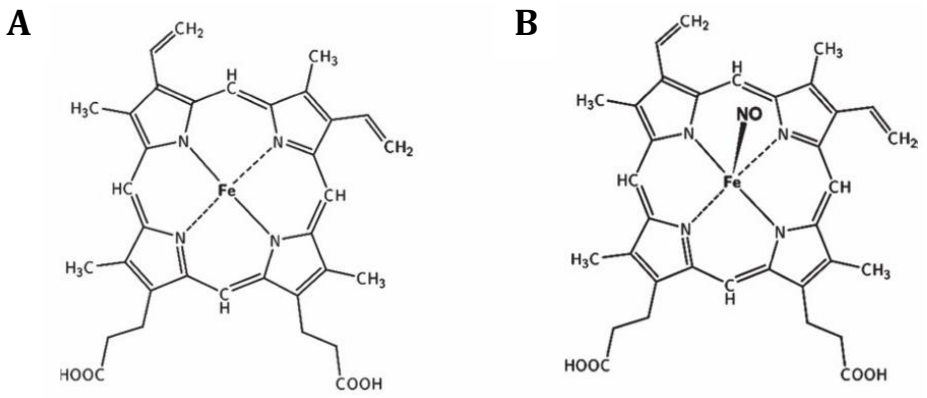

Figure 15 : Structure de l'hème **(A)** et de l'hème nitrosylé **(B)**
Bastide *et al.* 2011

b. Etat de l'hème dans les viandes et au cours de la digestion

✓ *L'hème dans les produits à base de viande*

La viande rouge est la source alimentaire la plus riche en fer héminique lequel est mieux absorbé que le fer non héminique **(Layrisse *et al.* 1969; Carpenter and Mahoney 1992)**. D'un point de vue quantitatif, 100 g de viande bovine crue apportent 2,2 à 3,8 mg de fer dont 70% est sous la forme héminique **(Bauchart *et al.* 2008; Soucheyre 2008)**.

(i) Forme du fer héminique dans la viande

Dans la viande rouge, l'hème est retrouvé en grande quantité sous forme d'hémoglobine et de myoglobine **(Hooda *et al.* 2014)**. L'hémoglobine est une protéine majoritairement retrouvée au sein des globules rouges, elle est composée de 4 chaînes d'acides aminés renfermant chacune une molécule d'hème. La myoglobine est une protéine responsable du transport de l'oxygène dans les muscles, elle contient une molécule unique d'hème.

L'intensité de la couleur rouge de la viande renseigne sur sa teneur en pigment héminique. Ainsi, plus la viande est rouge, plus elle renferme de fer héminique. La viande rouge crue est riche en oxymyoglobine et en oxyhémoglobine sur la surface du muscle et en deoxymyoglobine et en déoxyhémoglobine à l'intérieur du muscle. Dans la viande rouge cuite, la myoglobine et l'hémoglobine sont dénaturées et forment les hémichromes et les hémochromes. Les hémichromes sont les formes oxydées des hémoprotéines dénaturées et sont responsables de la couleur brune des viandes et des charcuteries cuites. Les hémochromes sont les formes réduites des hémoprotéines dénaturées et sont responsables de la couleur rose intérieure des viandes rouges et des charcuteries cuites **(Tappel 2007)**.

Dans les charcuteries nitritées, contrairement à la viande rouge, l'hème est sous forme nitrosylé **[Figure 15, B]** en raison de l'ajout de nitrites qui se retrouvent principalement sous forme d'ions nitrites NO_2^-. L'ajout d'acide ascorbique, afin d'éviter la formation de nitrosamines cancérigènes, va favoriser les réactions de nitrosylation et donc former un pontage entre les ions nitrites et l'atome de fer de l'hème ce qui aboutit à la formation d'hème nitrosylé **(Pegg and Shahidi 2000)**.

(ii) Quantité de fer héminique dans la viande

Peu de données sont disponibles dans la littérature concernant les teneurs en fer héminique dans les viandes. En effet, certains auteurs estiment qu'il existe des limitations pour déterminer ces teneurs dans les produits à base de viande telles que l'inexistence de méthodes analytiques appropriées et les différences de concentration selon les viandes, les morceaux ou encore les modes de préparations **(Carpenter and Clark 1995; Kongkachuichai *et al.* 2002; Lombardi-Boccia *et al.* 2002; Cross *et al.* 2012)**. Ce manque d'information peut poser des problèmes lorsque les épidémiologistes souhaitent associer l'ingestion de fer héminique et la pathologie qu'ils observent dans leurs études. Deux méthodes sont utilisées pour estimer la teneur en fer héminique ingéré en utilisant les valeurs de fer total :

- L'estimation que le fer héminique représente 40% du fer total **(Monsen and Balintfy 1982; Lee *et al.* 2004; Lee *et al.* 2005)**.

- L'utilisation de pourcentage spécifique au type de viande étudié : 69% pour le bœuf, 39% pour le porc et le veau et 26% pour le poulet et le poisson **(Balder *et al.* 2006)**.

Cependant, ces estimations peuvent aboutir à des biais car elles ne tiennent pas compte des différences de teneur en fer héminique selon les morceaux ou les différents niveaux de cuisson par exemple. En 2012, Cross *et al.* ont développé une méthode analytique afin de quantifier les différentes formes de fer présentes dans différents morceaux et ont ainsi pu mettre au point une base de données sur les quantités de fer héminique présentes dans les produits à base de viande **(Cross *et al.* 2012)**. Les teneurs de FH présentes dans différents type de morceaux de viande et de charcuteries sont présentés dans le **Tableau 4**. Comme nous pouvons le voir dans ce tableau, la viande de porc, considérée dans les études épidémiologiques comme viande rouge, est, selon les morceaux, moins riche en fer héminique que le poulet, considéré lui comme une viande blanche. Ainsi, le classement en viande rouge ou blanche utilisé dans les études épidémiologiques se réfère plutôt au type de viande, la viande de boucherie étant considérée comme rouge et la volaille comme blanche.

Type de viande	**Teneur en fer héminique (µg/g)**
Steak de bœuf *(Longe)*	9,3
Rôti de bœuf *(Rond de gite)*	8,3
Steak haché *(15% matière grasse)*	10,3
Porc *(Côtelette)*	3,5
Poulet *(Cuisse)*	5,1
Poulet *(Blanc)*	2,4
Jambon blanc	7,6
Hot dog	6,0
Bacon	4,9

Tableau 4 : Teneur en fer héminique de viande et de charcuterie
D'après **(Sinha *et al.* 1998 ; Cross *et al.* 2012)**

✓ *L'hème au cours de la digestion*

Le fer héminique est bien plus absorbable que le fer non héminique. Il représente plus des deux tiers des stocks de fer alors qu'il ne représente qu'un tiers du fer total ingéré **(West and Oates 2008)**. Comme nous l'avons vu précédemment, le fer héminique dans la viande est contenu dans des protéines telles que l'hémoglobine ou la myoglobine. Il va être libéré des hémoprotéines au niveau de l'estomac grâce au pH bas et à l'action des enzymes protéolytiques **(Conrad and Umbreit 2000; Omar *et al.* 2006)**. Les peptides provenant de l'hydrolyse des protéines de la viande vont empêcher l'hème de former des polymères insolubles et ainsi favoriser son absorption **(Vaghefi *et al.* 2002)**. L'hème est très bien absorbé par les entérocytes du duodénum **(Raffin *et al.* 1974; Han 2011)**. Cependant la majorité du fer ingéré est retrouvé au niveau du côlon et des fèces **(West and Oates 2008)**. En effet, l'une des particularités du métabolisme du fer est que l'organisme l'économise au maximum, fonctionnant quasiment en circuit fermé. Ainsi, pour un apport de 10 à 20 mg de fer par jour seulement 1 à 2 mg sont absorbés lors de la digestion pour compenser les pertes (desquamation des cellules de la peau, du tractus digestif, du tractus urinaire et perte de sang chez les femmes cyclées).

L'absorption du fer héminique par le tractus digestif est détaillée en **Figure 16**. L'hème rentre intact dans la cellule par le transporteur HCP1 (*heme carrier protein 1*) se trouvant sur le pôle apical des entérocytes, au niveau des microvillosités. L'absorption peut être facilitée par un système de transport vésiculaire lorsque l'hème se fixe à son transporteur ou à son récepteur **(Conrad and Umbreit 2000)**. Dans la cellule plusieurs voies sont possibles :

(i) L'hème est libéré dans la circulation sanguine via l'exportateur FLVCR1 (*cell surface receptor for feline leukemia virus, subgroup C, cellular receptor 1*) **(Khan and Quigley 2013)**. Il pourra alors être récupéré par diverses cellules, incluant les cellules du foie ou les cellules erythroïdes, afin de fabriquer de nouvelles hémoprotéines. En cas d'excès d'hème dans la cellule, FLVCR1 peut également relarguer de l'hème dans la lumière intestinale.

(ii) L'hème est pris en charge et dégradé par HO-1 (*hème oxygénase-1*) sur le réticulum endoplasmique ou HO-2 (*hème oxygénase-2*) sur la membrane vésiculaire. Ces hème-oxygénases vont dégrader le noyau porphyrine et libérer des ions Fe_2^+ qui seront, via DMT1 (*divalent metal transporter 1*), utilisés pour participer au stock cellulaire ou qui vont être libérés dans la circulation sanguine via FNP1 (*ferroportin-1*). Une fois dans la circulation sanguine le fer rejoint la moelle pour participer à la synthèse de l'hémoglobine et une petite quantité sera stockée dans le foie. Le transport du fer dans la circulation sanguine est pris en charge par la transferrine.

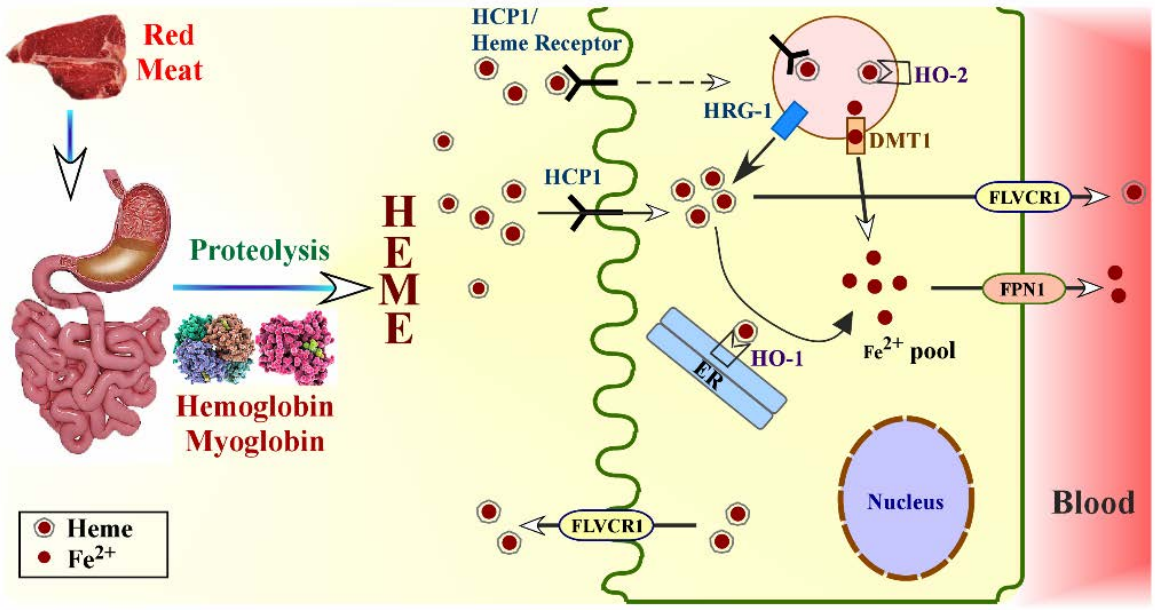

Figure 16 : Absorption intestinale du fer héminique provenant des protéines de l'alimentation **(Hooda *et al.* 2014)**

HCP1 : heme carrier protein 1; **HRG-1** : heme responsive gene-1; **FLVCR1** : cell surface receptor for feline leukemia virus, subgroup C, cellular receptor 1; **HO-1/2** : heme oxygenase-1/2; **DMT1** : divalent metal transporter 1; **FPN1** : ferroportin-1; **ER** : reticulum endoplasmique.

c. Preuves expérimentales de l'effet promoteur de l'hème

Comme nous l'avons vu précédemment, les données épidémiologiques et notamment les méta-analyses sur le sujet indiquent une association positive entre consommation de fer héminique et cancer colorectal. Cependant, comme nous l'avons vu également, l'épidémiologie nous apporte des associations que nous devons confirmer par des preuves expérimentales.

Les premières études expérimentales sur le sujet n'ont pas montré d'effet promoteur des viandes **(Parnaud and Corpet 1997; Parnaud *et al.* 2000)**. Il s'est avéré que le régime standard utilisé dans la plupart des expérimentations contenait 5 mg/g de calcium ce qui correspond à 130 µmol/g de régime. Or cette concentration est suffisante pour inhiber la cancérogenèse induite par le fer héminique **(Sesink *et al.* 2001)**. Après cette mise en évidence, les expérimentations ont été réalisées avec des régimes pauvres en calcium (20 µmol/g de régime).

✓ *Molécules purifiées*

Deux types de molécules sont utilisés pour mimer la consommation de produit à base de viande : l'**hémoglobine**, 4 noyaux d'hème entourés de 4 molécules de globine et l'**hémine**, noyau d'hème

stabilisé par un atome de chlore. En 1998, Sawa *et al.* ont nourris des rats initiés au N-nitroso-N-méthylurée, pendant 36 semaines, avec un régime à 3% d'hémoglobine. Ils ont ainsi observé une augmentation de l'incidence tumorale et des carcinomes par l'hémoglobine **(Sawa *et al.* 1998)**. Au niveau des lésions précancéreuses, l'équipe PPCA a montré qu'un régime riche en hémoglobine augmentait le nombre d'ACF et de MDF chez des rats initiés à l'azoxyméthane **(Pierre *et al.* 2003; Pierre *et al.* 2004)**. Il a également été mis en évidence une promotion dose dépendante de la taille des ACF par un régime riche en hémine **(Pierre *et al.* 2003)**. Enfin, un régime riche en hémoglobine augmente la surface tumorale des souris *Min* **(Bastide *et al.* 2014)**.

- ✓ *Viande rouge*

Il a également été observé une promotion dose-dépendante des ACF et des MDF chez des rats initiés à l'azoxyméthane nourris avec des viandes apportant des teneurs croissantes en hème. Ainsi, le poulet n'est pas promoteur et le boudin noir, qui est très riche en hème, est plus promoteur que la viande de bœuf **(Pierre *et al.* 2004)**. L'effet promoteur de la viande rouge a été confirmé dans une étude de 2008 qui montre qu'un régime riche en bœuf lyophilisé augmente le nombre d'ACF et de MDF chez des rats initiés à la diméthylhydrazine **(Pierre *et al.* 2008)**.

- ✓ *Charcuteries*

Plus récemment l'équipe PPCA s'est intéressée à la promotion induite par la consommation de charcuteries. Il a ainsi été montré qu'un régime riche en jambon blanc du commerce lyophilisé, de type jambon de Paris, augmentait le nombre de MDF chez des rats initiés **(Pierre *et al.* 2010)**. Un résultat similaire a été obtenu sur des ACF avec un jambon modèle frais, non lyophilisé et conservé pendant quelques jours à 4°C afin de mimer les pratiques de conservation des consommateurs **(Santarelli *et al.* 2010)**. Enfin, en 2013, Santarelli *et al.* ont mis en évidence qu'un régime riche en « hot-dog » (type saucisse de Strasbourg) augmentait le nombre de MDF chez des rats initiés à la diméthylhydrazine **(Santarelli *et al.* 2013)**. Le jambon blanc et le hot-dog sont les charcuteries cuites les plus consommées en France **(IFIP 2008)**.

Ainsi l'effet promoteur de l'hémine, de l'hémoglobine, de la viande rouge et de la charcuterie a été démontré dans de nombreuses études confirmant l'association observée par les études épidémiologiques.

d. Mécanismes d'action

Les données épidémiologiques et expérimentables mettent clairement en avant l'implication du fer héminique dans la cancérogenèse colorectale induite par la consommation de produits à base

de viande, cependant les mécanismes d'actions sont mal compris. L'hème, dans la lumière intestinale, catalyse deux types de réaction : la lipoperoxydation et la formation de composés *N*-nitrosés. De plus, l'hème peut avoir un effet direct sur les cellules de la muqueuse. Un schéma représentant les différents mécanismes d'action est présenté en **Figure 17**.

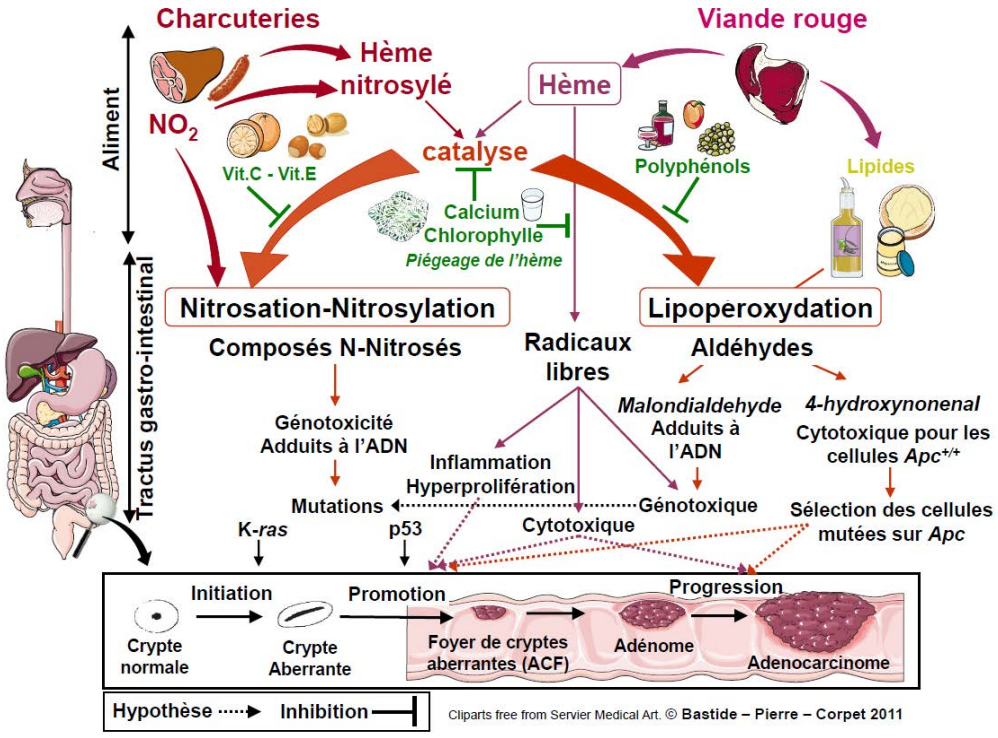

Figure 17 : Mécanismes d'action pouvant expliquer l'effet promoteur du fer héminique

Thèse Nadia Bastide, 2012

✓ *Oxydation des acides gras polyinsaturés*

Lors de la consommation de produits à base de viande, l'hème peut favoriser l'oxydation des acides gras polyinsaturés (AGPI), présents en grande quantité dans les régimes occidentaux et très sensibles à l'oxydation **(Tappel 2007)**. Les produits initiaux de la lipoperoxydation des AGPI sont des hydroperoxydes lipidiques qui vont être rapidement réduits par la gluthation peroxydase en composés non réactif ou réagir avec des métaux pour produire des composés très réactifs comme des époxydes ou des aldéhydes. Les deux principaux aldéhydes produits sont le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonénal (4-HNE). Le MDA induit des dommages à l'ADN, et la formation d'adduits, mutagéniques chez les bactéries, les mammifères et les cellules humaines **(Basu and Marnett 1983 ; Niedernhofer *et al.* 2003)**. Le 4-HNE est moins mutagénique que le MDA mais semble être le produit de lipoperoxydation le plus toxique en induisant l'apoptose et

la nécrose des cellules exposées **(Awasthi *et al.* 2003)**. L'équipe PPCA a d'ailleurs mis en évidence que le 4-HNE est plus toxique pour des cellules saines ($Apc^{+/+}$) que pour des cellules précancéreuses mutées sur le gène *Apc* ($Apc^{Min/+}$) ce qui induirait une sélection des cellules précancéreuses au détriment des cellules saines et pourrait expliquer l'effet promoteur de l'hème **(Pierre *et al.* 2006)**.

Chez l'homme, comme chez les rongeurs, la consommation de viande conduit à l'augmentation des substances réagissant à l'acide thiobarbituriques (TBARs) fécaux **(Pierre *et al.* 2003,2004,2008,2013 ; Romeu *et al.* 2013)**. Le dosage des TBARs est un biomarqueur global et non spécifique puisqu'il permet de mettre en évidence le MDA préexistant lié ou non aux molécules biologiques, les peroxydes lipidiques, les produits d'auto-oxydation des acides gras mais aussi toutes les substances pouvant réagir avec l'acide thiobarbiturique (sucres, acides aminés, bilirubine). Il est cependant couramment utilisé comme biomarqueur de lipoperoxydation et de stress oxydant en général **(Lefèvre *et al.* 1998; Meagher and FitzGerald 2000)**. Dans le même sens, chez l'homme, comme chez les rongeurs, la consommation de viande conduit à l'augmentation du DHN-MA urinaire, un autre biomarqueur de lipoperoxydation **(Pierre *et al.* 2006,2008,2010,2013 ; Santarelli *et al.* 2010,2013)**. Ce biomarqueur est très spécifique, contrairement aux TBARs, puisque le DHN-MA est le principal métabolite urinaire du 4-HNE. Il reflète la lipoperoxydation du régime et au cours de la digestion **(Gueraud *et al.* 2006,2010 ; Pierre *et al.* 2006)**.

La lipoperoxydation peut survenir pendant la digestion mais également pendant la fabrication, le stockage ou la préparation de la viande. L'équipe de De Smet utilise des systèmes de digestion *in vitro* afin de détecter les valeurs de lipoperoxydation des viandes non digérées, après digestion duodénale ou après fermentation colique grâce à l'ajout de bactéries fécales humaines. Récemment, cette équipe a regardé les valeurs de produits de lipoperoxydation sur des viandes ayant différentes teneurs en hème : du poulet (pauvre en hème), du porc (moyennement riche en hème) et du bœuf (riche en hème). L'étude a montré que la viande de bœuf contenait plus de MDA et de 4-HNE que la viande de poulet ou de porc. La viande de porc possède la même quantité de MDA que le poulet mais presque cinq fois plus de HNE. Pour le MDA, les niveaux retrouvés après digestion duodénale et colique sont comparables et supérieurs au niveau retrouvés dans la viande tandis que pour le HNE les niveaux de la viande sont comparables à ceux de la digestion duodénale et très supérieurs à ceux de la digestion colique **(Van Hecke *et al.* 2014a)**. Ces résultats confirment ceux de Hur qui a montré que les TBARs mesurés après une série de digestion étaient 4 fois supérieurs à ceux mesurés dans un steak haché avant digestion **(Hur *et al.* 2009)**. Une autre étude de l'équipe de De Smet a mis en évidence, en testant des viandes à 1, 5 ou 20% de matières grasses, que le taux de lipide n'avaient pas d'influence sur le MDA mais augmentait fortement les valeurs de 4-HNE de viande de porc qu'elle soit non digérée ou

digérée **(Van Hecke *et al.* 2014b)**. L'étude d'Ismail *et al.* sur des steaks hachés à 10, 15 ou 20% de matières grasses, ne montre pas d'augmentation des TBARs de la viande en fonction du taux de lipides, après 14 jours de stockage sous lumière fluorescente **(Ismail *et al.* 2009)**.

✓ *Formation de composés N-nitrosés*

Une autre hypothèse implique la formation des composés *N*-nitrosés (NOCs) favorisée par l'hème. L'homme est exposé aux nitrites de par son alimentation mais également par sa salive, en raison du cycle entérosalivaire **(Chenni *et al.* 2013)**. Dans la littérature les NOCs sont largement retrouvés sous le terme d'ATNC (Apparent Total N-nitroso Compounds) qui regroupe les nitrosothiols RSNO, le fer nitrosylé FeNO et d'autres composés *N*-nitrosés **(Kuhnle and Bingham 2007)**. Les RSNO se forment à partir de nitrites et de groupes thiols à pH bas comme dans l'estomac et peuvent servir de précurseur à la formation endogène de FeNO et des autres NOCs dans l'intestin grêle ou le côlon **(Joosen *et al.* 2009)**. De plus, l'hème peut être nitrosylé et agir comme un agent nitrosylant.

Chez l'homme, comme chez les rongeurs, la consommation de produits à base de viande, viande rouge ou charcuteries, induit une forte production d'ATNC fécaux **(Bingham *et al.* 1996,2002 ; Parnaud *et al.* 2000; Mirvish *et al.* 2003; Pierre *et al.* 2010,2013)**. Cette production d'ATNC est spécifiquement due au fer héminique **(Cross *et al.* 2003)**. De même, Kuhnle *et al.* ont montré que le FeNO est la principale source de NOCs lors de la consommation de viande rouge **(Kuhnle *et al.* 2007)**. Enfin, il a également été démontré que les nitrites de la charcuterie favorisent la production endogène de NOCs chez des volontaires **(Joosen *et al.* 2009)**.

Les conséquences de la formation des composés *N*-nitrosés sont encore mal connues. Kuhnle suggère un effet délétère de la formation de FeNO et de RSNO tandis que Hogg suggère un effet protecteur de la séquestration du NO par le fer **(Hogg 2007; Kuhnle *et al.* 2007)**. Dans son étude de 2006, Lewin a montré que l'augmentation des ATNC par la consommation de viande était corrélée à la formation d'adduits O^6-carboxyméthylguanine (O^6-C-MeG) dans les colonocytes de volontaire suggérant ainsi que les ATNC pouvaient être génotoxiques **(Lewin *et al.* 2006)**. L'étude réalisée sur le simulateur de digestion *in vitro* de Van Hecke *et al.* a montré qu'il n'y avait pas d'adduit O^6-C-MeG formés dans la viande ou durant la digestion duodénale. Cependant, des adduits ont été retrouvés après la digestion colique et de manière plus importante dans la viande de bœuf, que dans la viande de poulet ou de porc. De manière intéressante, ces adduits sont dépendants de l'inoculum bactérien ajoutés à la digestion suggérant fortement l'implication du microbiote et une spécificité individuelle dans la formation des adduits O^6-C-MeG. L'ajout de nitrites à la viande ne modifie pas la formation de ces adduits **(Van Hecke *et al.* 2014a)**. Cependant, l'augmentation de la teneur en matière grasse de la viande induit l'augmentation du nombre d'adduits O^6-C-MeG **(Van Hecke *et al.* 2014b)**.

✓ *Action directe de l'hème*

Des résultats *in vitro* sur des cellules laissent à penser que l'hème pourrait agir directement sur les colonocytes et induire des effets délétères. L'exposition de cellules tumorales HT29 ou de colonocytes en culture primaire avec de l'hémoglobine conduit à des dommages à l'ADN **(Glei *et al.* 2006b ; Angeli *et al.* 2011)**. De plus, l'exposition des cellules HT29 avec de l'hémine induit également de la génotoxicité mais aussi de la cytotoxicité associée à la génération de radicaux libres **(Glei *et al.* 2006b)**. Chez le rat, la cytotoxicité sur les cellules de la muqueuse intestinale est compensée par une hyperprolifération cellulaire qui peut être interprétée comme un facteur de risque de cancer **(IJssennagger *et al.* 2012b)**. Enfin, les travaux d'Ishikawa ont confirmé que l'exposition à de l'hémine de cellules épithéliales coliques cancéreuses Caco-2 induisait l'augmentation des dommages à l'ADN, de la prolifération et également la production d'interleukine-8, une chémokine impliquée dans le recrutement des neutrophiles sur le site d'une infection. Ces effets semblent être induits par l'activation de l'hème oxygénase (HO) lors de la prise en charge de l'hème puisqu'un inhibiteur de HO, la protoporphyrine de zinc, permet de les contrecarrer **(Ishikawa *et al.* 2010)**. L'effet néfaste de l'activation d'HO pourrait venir de sa production de H_2O_2 et/ou de Fe^{2+} et/ou de bilirubine lors de la dégradation de l'hème **(Noguchi *et al.* 1982; Hooda *et al.* 2014)**.

Ainsi l'effet promoteur induit par la consommation de fer héminique pourrait être expliqué par la peroxydation des AGPI, par la formation de NOCs, par l'action directe de l'hème sur les cellules épithéliales ou encore à une addition de deux ou des trois mécanismes proposés.

III. Arrêter de consommer de la viande ou agir ?

La consommation de viande est associée au risque de cancer colorectal. Mais faut-il pour autant arrêter d'en consommer ? Cette question nous est souvent posée lorsque nous discutons avec le grand public de notre problématique. Cette partie a pour vocation de faire le bilan sur le bénéfice/risque de la consommation de viande, sur les moyens qui peuvent être mis en place pour limiter le risque et enfin d'une réflexion sur la stratégie qui serait la plus efficace.

1) Bénéfice/Risque de la consommation de viande

a. Intérêt nutritionnel

✓ *Lipides*

La composition en acide gras de la viande dépend de l'animal, de son âge, de son sexe, de l'élevage, de son alimentation et du muscle en question **(Wood and Enser 1997)**. Environ 50% des lipides intra-musculaires de la viande de bœuf sont des acides gras insaturés : des acides gras monoinsaturés (AGMI) et des acides gras poly-insaturés (AGPI), principalement des AGPI n-6 et n-3 qui sont des acides gras essentiels. La consommation modérée de viande rouge maigre permet de diminuer le taux de cholestérol total dans le sang, le cholestérol LDL et les triglycérides sans effet sur l'agrégation plaquettaire qui peut aboutir à la formation de caillot sanguin **(McAfee *et al.* 2010)**.

✓ *Protéines*

La viande est une source majeure de protéines avec environ 20 g pour 100 g de bœuf consommés. La fonction fondamentale des protéines d'origine animale est d'assurer la bonne couverture des besoins azotés de l'organisme, d'un point de vue quantitatif et qualitatif, comme le renouvellement protéique des cellules musculaires par exemple **(Bourre 2011)**.

✓ *Fer héminique*

L'anémie due à une déficience de fer est un problème de santé publique affectant les populations de toute classe socioéconomique dans le monde entier et qui est particulièrement retrouvée chez les enfants et les jeunes femmes **(Gibson and Ashwell 2002)**. Comme nous l'avons déjà vu, le fer héminique de la viande est mieux absorbé que le fer non héminique des plantes. En effet, la biodisponibilité du fer non héminique est de 2% alors que celle du fer héminique est de 30%. Ainsi, l'organisme capte cent fois plus de fer dans un boudin noir cuit que dans cent grammes de lentilles cuites **(Bourre 2011)**.

✓ *Autres nutriments*

La viande rouge est également une source majeure de vitamine B12 en apportant les deux tiers des apports recommandés pour 100 g consommés. La vitamine B12 participe à la formation des cellules nerveuses et à l'élaboration des globules rouges. Sa carence peut entrainer une augmentation des risques de maladies cardiovasculaires **(McAfee *et al.* 2010).** De plus, la viande rouge est une source importante de zinc. Le zinc intervient directement dans les mécanismes biochimiques producteurs d'énergie en facilitant l'utilisation de l'oxygène et également dans la

croissance, la vision et le métabolisme glucidique **(Bourre 2011)**. Enfin, la viande est une source importante de micronutriments non présents ou peu bio-disponibles dans les plantes tels que la vitamine A et le sélénium **(Biesalski 2005)**.

b. Implication des industriels de la viande

La mise en place de la recommandation du WCRF d'éviter toute consommation de charcuterie pourrait avoir des conséquences économiques très importantes pour la filière « charcuteries-salaisons » **(Demeyer *et al.* 2008)**. Cette filière est très développée en France puisqu'elle compte 350 entreprises, principalement des petites et moyennes entreprises, employant 35 000 salariés. Ils produisent 1,36 millions de tonnes de charcuterie par an. Il s'agit de la troisième industrie alimentaire française et elle représente un chiffre d'affaire de 6,9 billions d'euros par an.

L'industrie de la viande bovine comprend 368 entreprises, 49 124 employés pour un chiffre d'affaire de 14,4 billions d'euros **(Office de l'élevage, 2008)**. Des 1 472 900 tonnes équivalent carcasse (tec) provenant des abattoirs, 472 900 tec sont vendues sur le marché dont 43% de produits à base de viande de bœuf. Sachant qu'un quart de la population française consomme plus de 500 g par semaine de viande, la recommandation de limitation du WCRF pourrait induire des conséquences économiques importantes pour la filière. De même, l'association entre viande rouge et cancer pourrait induire une image négative de la viande rouge dans la tête des consommateurs.

c. Risques pour la santé

✓ *Maladies cardiovasculaires*

Les maladies cardiovasculaires incluent les maladies cardiaques coronaires, les attaques et les infarctus du myocarde. Une récente méta-analyse de 13 études de cohorte a montré qu'une forte consommation de viande rouge et de charcuteries était associée à un risque de mortalité augmenté de 16 et 18 % respectivement **(Abete *et al.* 2014)**. Cette association pourrait être due à une forte consommation des acides gras saturés provenant de la viande comme les acides myristique, palmitique ou encore stéarique **(McAfee *et al.* 2010)**.

✓ *Cancer colorectal*

Comme nous l'avons vu plus haut dans l'introduction, la consommation de viande rouge et de charcuterie est associée au risque de cancer colorectal. Cette association pourrait être expliquée par la teneur importante en fer héminique de la viande rouge **(Bastide *et al.* 2011)**.

d. Risque écologique

La politique écologique actuelle est de diminuer les gaz à effet de serre (GES) de 50 % globalement pour 2050. Ainsi, pour participer à cet effort, l'organisation des Nations Unis pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) recommande de diminuer la production des produits à base de viande **(FAO 2006)**. En effet, la production de viande représente 18% des émissions de GES. Par exemple, la production de 10 g de viande bovine représente 1 kg de GES. Cependant l'émission est moins importante pour les viandes de porc et de volaille **(Millward and Garnett 2010)**.

Ainsi, les produits à base de viande ont de nombreux bénéfices pour la santé mais également quelques risques s'ils sont consommés de manière trop importante. A part Gonzales *et al.* qui estiment que les nutriments de la viande peuvent être facilement trouvés dans les plantes **(Gonzales *et al.* 2014)**, la plupart des auteurs s'accordent sur le fait que la viande doit continuer d'être consommée en raison de ses nombreux apports nutritionnels tout en respectant les limites données par le WCRF à moins de 500 g par semaine soit environ 70 g/jour **(Biesalski 2005; Demeyer 2010 ; McAfee *et al.* 2010 ; Bourre 2011)**.

2) Prévention de la cancérogenèse induite par le fer héminique

Comme nous venons de le voir la viande rouge est une source riche de nutriments indispensables à notre bonne santé, il ne parait donc pas pertinent d'arrêter d'en consommer. Certaines stratégies peuvent être mises en place afin de limiter le risque de cancer colorectal tout en continuant à consommer des produits à base de viande rouge. Ces stratégies peuvent être de deux formes : l'émission de recommandations nutritionnelles ou la modification directe des produits mis sur le marché. Elles peuvent cibler directement l'hème, en le piégeant dans la lumière intestinale par exemple, ou inhiber les réactions catalysées par l'hème c'est-à-dire la lipoperoxydation ou la formation de composés *N*-nitrosés.

a. Prévenir en piégeant l'hème

✓ *Calcium*

L'ajout de calcium au régime des rats permet de normaliser complètement l'augmentation du nombre de lésions précancéreuses (ACF et MDF) induite par la consommation d'hémine **(Pierre *et al.* 2003)**, de viande bovine **(Pierre *et al.* 2008)** ou de charcuterie **(Pierre *et al.* 2013 ; Santarelli *et al.* 2013)**. Les travaux d'Allam *et al.* ont montré que le calcium précipitait l'hème *in vitro* et que le

calcium carbonate était le sel le plus efficace pour piéger l'hème **(Allam *et al.* 2010)**. *In vivo*, en piégeant l'hème dans la lumière intestinale, le calcium inhibe également la peroxydation des lipides alimentaires et la formation de composés *N*-nitrosés chez le rat **(Pierre *et al.* 2003,2007 ; Santarelli *et al.* 2013)** comme chez l'homme **(Pierre *et al.* 2013)**. Il a également été démontré que le calcium diminuait l'hyperprolifération et la cytotoxicité induite par le fer héminique **(Sesink *et al.* 2001)**.

✓ *Chlorophylle*

Une étude épidémiologique de cohorte a permis de mettre en évidence un effet protecteur de la consommation de chlorophylle lors de forte consommation d'hème **(Balder *et al.* 2006)**. Dans deux études sur des modèles animaux, de Vogel *et al.* ont montré que la chlorophylle pouvait inhiber l'hyperprolifération et la cytotoxicité induite par l'hème **(de Vogel *et al.* 2005a ; de Vogel *et al.* 2005b)**. La chlorophylle étant, comme l'hème, une molécule tétrapyrrolique les auteurs émettent l'hypothèse de la formation d'un sandwich entre les molécules d'hème et de chlorophylle bloquant ainsi l'hème et l'empêchant d'induire des effets délétères sur la muqueuse intestinale. Ces résultats suggèrent que la consommation de légumes verts pourrait inhiber les effets de la consommation de viande.

✓ *Polyphénols*

Les polyphénols ont la capacité de piéger les métaux **(Mandel *et al.* 2006 ; Perron and Brumaghim 2009)**. Une expérimentation de l'équipe PPCA a mis en évidence que les rats ayant consommé des charcuteries enrichies en polyphénols avaient moins de fer héminique fécal suggérant ainsi que les polyphénols peuvent modifier la biodisponibilité de l'hème **(Bastide *et al.*, soumis)**. *In vitro*, Ma *et al.* ont montré que des polyphénols alimentaires inhibaient l'absorption du fer héminique de manière dose-dépendante en bloquant l'export basolatéral sur des cellules Caco-2 **(Ma *et al.* 2010,2011)**.

b. Prévenir en inhibant les réactions de catalyse de l'hème

✓ *Inhibition de la lipoperoxydation*

Les polyphénols et les vitamines ont des propriétés antioxydantes qui leur permettent de piéger les radicaux libres et peuvent ainsi inhiber les réactions de lipoperoxydation **(Tsao 2010 ; Lipinski 2011)**. Très récemment Hygreeva *et al.* ont publiés une revue des antioxydants ajoutés aux produits à base de viande permettant de diminuer la lipoperoxydation **(Hygreeva *et al.* 2014)**.

(i) Etudes *in vivo*

Chez des volontaires sains, la consommation de viande imprégnée de polyphénols extraits de vin rouge permet de diminuer les quantités plasmatiques de MDA **(Gorelik *et al.* 2008a)**. Ces polyphénols agiraient principalement au niveau de l'estomac et de l'intestin **(Gorelik *et al.* 2008b)**. De même, l'enrichissement d'une charcuterie modèle avec de l'α-tocophérol permet de diminuer la lipoperoxydation fécale de volontaires sains **(Pierre *et al.* 2013)**.

Chez le rat, l'addition de BHT (hydroxyanisole butylé) ou de rutine aux régimes ou le remplacement de l'huile de carthame par de l'huile d'olive permet de diminuer le nombre de lésions précancéreuses et la lipoperoxydation induites par la consommation d'hème **(Pierre *et al.* 2003)**. De plus, l'analyse de contenu stomacal de mini-porcs ayant consommés de la viande de bœuf a montré une diminution des TBARs lorsque l'alimentation était supplémentée avec un mélange de fruits et de légumes ou d'extraits polyphénoliques **(Gobert *et al.* 2014)**.

(ii) Etudes *in vitro*

De nombreuses études avec des simulateurs de digestion ont été réalisées pour étudier l'impact des polyphénols sur la lipoperoxydation induite par le fer héminique. Dans un modèle mimant l'environnement gastrique, il a été montré que la quercétine, l'α-tocophérol, la rutine, la catéchine, l'acide caféique et l'acide chlorogénique inhibaient la lipoperoxydation induite par le fer héminique **(Vulcain *et al.* 2005 ; Lorrain *et al.* 2010)**. D'autres études ont montré une inhibition par le vin rouge de la peroxydation lipidique initiée par l'hème au niveau stomacal **(Goupy *et al.* 2009 ; Kanner *et al.* 2012)**. Enfin, une étude *in vitro* mimant la composition du colon a montré que l'épigallocatéchine gallate et un extrait de thé vert peuvent neutraliser le 4-HNE **(Beretta *et al.* 2008)**.

- ✓ *Inhibition de la formation de composés N-nitrosés*

La mise en évidence de l'inhibition, *in vivo* et *in vitro*, de la formation de composés *N*-nitrosés par les vitamines C (ascorbate) et E (α-tocophérol) date de plusieurs années **(Douglass *et al.* 1978 ; Mirvish 1986)**. De même, de nombreux polyphénols sont connus pour inhiber la formation de composés *N*-nitrosés : les acides hydroxycinnamiques (acides caféique, rosmarinique, férulique, chlorogénique), les hydrostilbènes (resvératrol, piceatannol), l'épigallocatéchine gallate (thé vert), l'hydroxytyrosol (huile d'olive) ou encore les flavonoïdes (quercétine, rutine ou génistéine) **(d'Ischia *et al.* 2011)**. Cependant peu d'études ont regardé l'effet des polyphénols sur la formation des composés *N*-nitrosés induits par la consommation de fer héminique ou de viande. L'équipe PPCA a montré que l'ajout d'α-tocophérol à la charcuterie permettait de diminuer le

nombre de lésions précancéreuses ainsi que les composés *N*-nitrosés fécaux de rats initiés par un cancérigène **(Pierre *et al.* 2013)**.

c. Prévenir en modifiant les produits à base de viandes

Nous venons de voir que certains antioxydant ont la propriété d'inhiber la lipoperoxydation ou la formation de composés *N*-nitrosés. Il est également possible d'agir directement sur les viandes en modifiant l'alimentation des animaux ou en modulant des facteurs extrinsèques de la viande.

✓ *Modifier l'alimentation des animaux*

De nombreuses équipes ont essayé de diminuer les produits de lipoperoxydation dans la viande en enrichissant l'alimentation des animaux avec des antioxydants naturels. Ainsi, l'enrichissement de l'alimentation d'agneaux, de porcs et de bœufs en graines de lin, en huile de poisson, en extrait de vin rouge ou de pépin de raisin, en vitamine E ou en catéchines de thé vert semble efficace pour diminuer les TBARs de la viande **(Mason *et al.* 2005 ; Jeronimo *et al.* 2012 ; Muino *et al.* 2014)**. Cependant certaines études ne montrent pas d'effet de l'enrichissement de l'alimentation des animaux sur la teneur en TBARs de la viande **(O'Grady *et al.* 2006 ; Luciano *et al.* 2009 ; Gobert *et al.* 2010)**. Ces différences peuvent venir des extraits d'antioxydants utilisés, des doses, de la race de l'animal ou encore du morceau choisi pour le dosage.

✓ *Modulation de la biodisponibilité de l'hème dans la viande*

La toxicité de l'hème peut être limitée par la réduction de sa biodisponibilité et en contrôlant le statut du fer. Des travaux ont montré que le fer héminique peut se convertir en fer non héminique durant les traitements à la chaleur **(Lombardi-Boccia *et al.* 2002 ; Kongkachuichai *et al.* 2002; Purchas *et al.* 2003)** suggérant que le contrôle de la cuisson de la viande pourrait conduire à la réduction de la peroxydation et de la nitrosation induite par l'hème. Cette diminution de la teneur en fer héminique serait dû au fait qu'il est dégradé à haute température et converti en fer non héminique**.** De plus, le traitement thermique des viandes favoriserait la conversion du fer soluble en fer insoluble, le fer soluble étant plus biodisponible que le fer insoluble tout comme le fer héminique comparé au fer non héminique **(Purchas *et al.* 2003)**.

Ainsi, la cuisson de la viande induit :

- La conversion du fer héminique en fer non héminique par clivage oxydatif de l'hème,
- La conversion du fer héminique soluble en insoluble par dénaturation thermique de la globine,
- La conversion du fer ferreux (Fe_2^+) en fer ferrique (Fe_3^+).

Ces évolutions sont d'autant plus intenses que la température et le temps du traitement thermique appliqué à la viande augmentent **(Martinez-Torres *et al.* 1986 ; Purchas *et al.* 2003)**. Cependant, certaines études et notamment l'étude de Cross ne montre pas d'effet de la cuisson sur la teneur en fer héminique des produits **(Cross *et al.* 2012)**.

✓ *Modulation de la lipoperoxydation dans la viande*

L'oxydation lipidique conduit à une dégradation des qualités, notamment sensorielles et gustatives, de la viande. C'est pourquoi les industriels mettent en place des stratégies afin de limiter cette oxydation lipidique dans les viandes. Pour le moment, seuls les lipoperoxydes fécaux sont associés à la promotion de la cancérogenèse hème induite. Cependant, une diminution des teneurs en produits de lipoperoxydation dans les viandes pourrait aboutir à une diminution des lipoperoxydes fécaux et donc à une diminution du risque de cancer colorectal associé à la consommation de produit à base de viande rouge.

Plusieurs facteurs peuvent affecter l'oxydation des lipides de la viande durant la fabrication ou le conditionnement, incluant la lumière, la concentration en oxygène, la température, la présence d'anti- ou de pro-oxydants et l'abondance d'acides gras insaturés **(Jakobsen and Bertelsen 2000)**. Afin de protéger les produits de l'oxydation lipidique, l'ajout d'ingrédient ou d'additif à la viande ont été testés. Par exemple, Reddy et Carpenter ont montré que l'ajout d'extrait de pépin de raisin à de la viande de mouton ou de porc était efficace pour diminuer les TBARs **(Carpenter *et al.* 2007 ; Reddy *et al.* 2013)**. De même, l'addition d'extraits naturels de thé ou de raisin à de la viande hachée de porc permet de diminuer l'oxydation des lipides **(Lorenzo *et al.* 2014)**. Une autre technique est de pulvériser des anti-oxydants à la surface de la viande. Djenane *et al.* ont ainsi montré que la pulvérisation de vitamine C, de taurine, de romarin ou de vitamine E était efficace pour diminuer les TBARs, le plus efficace étant la combinaison de romarin et de vitamine C **(Djenane *et al.* 2002)**. Enfin l'ajout de nitrites à la viande de bœuf ou de porc permet de diminuer les quantités de MDA et de 4-HNE dans les viandes et également au cours de la digestion duodénale ou colique **(Van Hecke *et al.* 2014a)**.

3) Changer le consommateur ou changer l'aliment ?

Il paraît donc envisageable de diminuer le risque de cancer colorectal sans pour autant inciter à diminuer la consommation de viande rouge. Deux stratégies pourraient être mises en place :

l'émission de recommandations nutritionnelles auprès du grand public ou la modification directe des produits par les industriels. *Une stratégie semble-t-elle plus efficace qu'une autre ?*

La France a lancé en 2001, un plan de santé publique appelé PNNS (Programme National Nutrition et Santé) visant à améliorer l'état de santé de la population en agissant sur la nutrition et l'activité physique à l'aide de recommandations précises. En 2008, une étude a montré que les personnes adhérant de manière plus importante au PNNS étaient plus âgées, non-fumeurs, de classe sociale supérieure et avec un indice de masse corporelle normal **(Estaquio *et al.* 2009)**. Il en est de même par exemple pour la recommandation des 5 fruits et légumes par jour **(Estaquio *et al.* 2008)**. Ce constat est également d'actualité en Angleterre et plus généralement dans le monde **(Martikainen *et al.* 2003 ; WCRF/AICR 2010)**. Ainsi, il semble que l'adhérence aux recommandations alimentaires par les classes sociales supérieures leur permet d'avoir une alimentation plus équilibrée et un mode de vie plus sain. Par ailleurs, l'étude de Raude *et al.* et les résultats de l'étude Individuelle Nationale sur les Consommations Alimentaires 2006-2007 (INCA-2) montrent que la consommation de viande porcine, de viande bovine et de charcuteries est plus élevée dans les catégories sociales les plus modestes par rapport aux catégories sociales les plus aisées **(Raude 2008; INCA-2 2009)**. Ainsi, les personnes consommant le plus de viande rouge et de charcuterie semblent également être les moins réceptives aux recommandations nutritionnelles.

Dans ce cadre, il semblerait qu'il soit plus efficace, afin de toucher toute la population, de modifier directement les produits afin de mettre sur le marché des viandes plus sures vis-à-vis du risque de cancer colorectal.

IV. Objectifs et enjeux de la thèse

1) Prévenir en prenant en compte les attentes sociétales

Ainsi, la consommation de viande est importante pour l'équilibre alimentaire et il est peut-être possible de modifier les aliments pour parvenir à diminuer le risque de cancer colorectal sans pour autant arrêter la consommation de viande rouge. C'est dans ce but que le projet SécuriViande a été construit. Il est financé par l'Agence Nationale de la Recherche, d'une durée de 4 ans et regroupe 10 partenaires privés et public. Il a pour vocation de trouver de nouvelles conduites de production et de transformation des viandes qui permettraient de mettre sur le marché des viandes rouges et des charcuteries qui ne favoriseraient pas le cancer colorectal.

Les objectifs du projet sont donc multiples en termes de santé publique, industriels et scientifiques :

- ✓ En termes de santé publique, la mise en évidence de nouvelles méthodes de production aboutissant à des produits à base de viande plus sains pourrait entrainer la diminution significative des cas de cancers colorectaux dus à la consommation de produits à base de viande rouge.
- ✓ En termes industriel et économique, les résultats de ce projet pourront conduire à la mise en place de stratégies pour fabriquer des produits qui préviennent le risque. Ceci devrait permettre de limiter les pertes économiques pour les industries que représenterait la prise en compte des recommandations du WCRF par l'ensemble de la population.
- ✓ D'un point de vue scientifique, l'objectif est de vérifier dans des modèles animaux de cancérogenèse l'effet promoteur des viandes et des charcuteries observé dans les études épidémiologiques. Puis, de tester l'effet des viandes issues de nouveaux modes de préparation afin de vérifier si elles préviennent l'effet promoteur. L'objectif est également de comprendre les mécanismes qui lient cancérogenèse colorectale et consommation à base de viande.

Les objectifs de ma thèse, au sein de ce projet, sont :

- ✓ Faire le lien entre l'équipe PPCA et l'ADIV, partenaire principal pour la partie viande bovine qui a permis le financement de cette thèse CIFRE, afin de mettre au point des modifications de fabrication des viandes qui préviennent le risque de cancer colorectal en modulant de nombreux paramètres de la viande comme par exemple l'ajout d'antioxydant, le mode de conditionnement, le mode et le degré de cuisson.
- ✓ Valider expérimentalement l'effet promoteur de la viande rouge et de la charcuterie dans deux modèles rongeurs de cancérogenèse colorectale : le rat initié et la souris *Min*.
- ✓ Vérifier l'effet protecteur des différents procédés de fabrication dans ces deux modèles rongeurs.

Les parties du projet SécuriViande que j'ai prises en charge sont présentées en **Chapitre 1** de mon manuscrit. Ce travail m'a mobilisé pendant mes deux premières années de thèse.

2) Comprendre en prenant en compte les partenaires de l'écosystème digestif

L'effet délétère de l'hème est bien documenté et plusieurs mécanismes, présentés précédemment, sont impliqués. L'hème, dans la lumière intestinale, catalyse la formation de produits secondaires de lipoperoxydation et de composés *N*-nitrosés qui ont des conséquences

sur les étapes de la cancérogenèse colorectale. L'hème peut également agir directement sur les cellules de la muqueuse intestinale. Cependant, le tractus digestif est un environnement complexe et l'hème peut être amené à interagir avec les partenaires de cet environnement. Or l'homéostasie intestinale est basée sur la communication entre les bactéries composant le microbiote, les cellules épithéliales de la muqueuse et les cellules immunitaires **(Pott and Hornef 2007)**.

Dans ce contexte, j'ai voulu vérifier, dans un premier temps, si le microbiote était impliqué dans l'effet promoteur de l'hème (**Chapitre 2**). Puis, en dernière année de thèse, je me suis intéressée à l'effet pro-inflammatoire de l'hème et à savoir si l'hème pouvait moduler la perméabilité intestinale (**Chapitre 3**). L'objectif est de mieux comprendre les mécanismes qui relient le fer héminique et la cancérogenèse colorectale pour aboutir, à plus long terme, à des leviers qui pourraient permettre de prévenir le risque.

Ainsi de manière globale ma thèse répond à 4 enjeux :

1) Valider expérimentalement l'effet promoteur de la viande rouge et de la charcuterie fraiche dans des modèles rongeurs de cancérogenèse,
2) En collaboration avec les filières de la viande, tester des stratégies de prévention pouvant aboutir à une diminution du risque,
3) Vérifier si le microbiote joue un rôle dans l'effet promoteur de l'hème,
4) Vérifier les conséquences de la consommation d'hème sur la muqueuse intestinale en termes d'inflammation, de perméabilité et de génotoxicité.

ETUDES
&
RESULTATS

CHAPITRE 1

Validation de l'effet promoteur des viandes et des charcuteries et recherche de prévention possible avec les filières

INTRODUCTION

L'épidémiologie propose une association positive entre la consommation de viande rouge et de charcuteries et le risque de cancer colorectal. Ces données doivent, cependant, être confirmées dans des modèles animaux adaptés. Le WCRF a émis la recommandation de limiter la consommation de viande rouge et d'éviter toute consommation de charcuteries. La mise en place de telles recommandations pourrait avoir des conséquences nutritionnelles et économiques importantes pour la population et les filières de production. De plus, il a été montré que les personnes consommant le plus de viande rouge et de charcuteries étaient les moins réceptives aux messages nutritionnels.

Cette étude fait partie du projet SécuriViande qui a pour vocation de trouver de nouveaux moyens de produire et de transformer des produits à base de viande rouge.

Les objectifs de cette étude sont doubles :

- ✓ Vérifier expérimentalement l'effet promoteur des viandes rouges et des charcuteries, observé par les études épidémiologiques, dans deux modèles de cancérogenèse : le rat chimio-induit et la souris *Min*.
- ✓ Trouver de nouvelles méthodes de production industrielle qui permettent d'aboutir à des aliments plus sains vis-à-vis du risque de cancérogenèse colorectale.

La partie du projet que j'ai prise en charge est divisée en 3 études et est présentée en **Figure 18**.

La première étude est une partie industrielle, gérée par l'ADIV pour les viandes rouges et par l'IFIP/Fleury-Michon pour les charcuteries. L'objectif était d'obtenir 16 viandes de bœuf et 16 charcuteries, avec des profils d'oxydation différents obtenus par la modification de nombreux paramètres (additifs, conditionnement, cuisson, teneur en fer héminique, teneur en nitrites, provenance du muscle). De par mon financement de thèse, je n'ai participé qu'à la partie viande rouge de cette étude en réalisant, au sein de l'ADIV, les analyses biochimiques des 16 viandes produites.

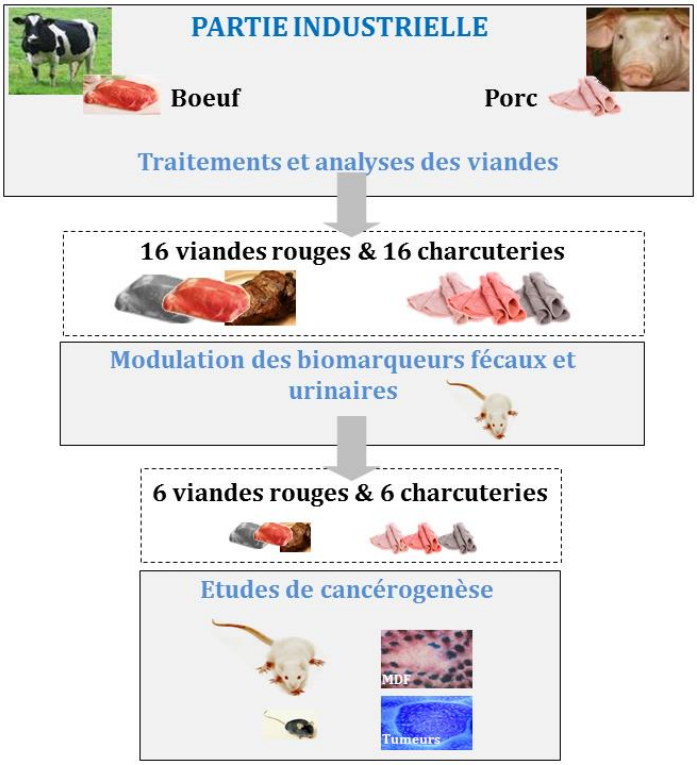

Figure 18 : Structure globale des études du chapitre 1

Ces 32 produits ont ensuite été testés dans des études court-terme chez le rat afin de vérifier la modulation des biomarqueurs que nous savons associés à la cancérogenèse colorectale induite par la consommation de fer héminique : des biomarqueurs de lipoperoxydation et de nitrosation.

Ces analyses ont permis de choisir 6 viandes de bœuf et 6 charcuteries qui ont été testées dans des études long-terme utilisant deux modèles animaux : le rat chimio-induit et la souris *Min*. Ces modèles animaux nous permettent de vérifier l'effet des produits à deux stades distincts de la cancérogenèse : les lésions précancéreuses et le stade tumoral.

Ce chapitre est divisé en deux parties : une partie viande rouge (partie A) et une partie charcuterie (partie B). Les parties sont construites de manière identique avec les résultats de l'étude industrielle, de l'étude court terme chez le rat et des deux études de cancérogenèse chez le rat chimio induit et chez la souris *Min*. Enfin le chapitre est terminé par une discussion générale sur les résultats apportés par ces études.

PARTIE A : VIANDES ROUGES

Le fer héminique, présent dans la viande rouge, est un promoteur de la cancérogenèse colorectale. Un mécanisme a été suggéré pour expliquer l'effet promoteur de l'hème : la promotion est corrélée à la peroxydation des acides gras alimentaires **(Pierre *et al.* 2003)**. Cette lipoperoxydation est associée chez le rat et chez l'homme à l'augmentation de deux biomarqueurs : les TBARs (Thiobarbituric reactive substances) fécaux et le DHN-MA (4-dihydroxynonane mercapturique acid) urinaire.

I. Modulation du statut oxydatif des viandes rouges par différents traitements technologiques et effet sur les biomarqueurs précoces de la cancérogenèse chez le rat

1) Etude industrielle

Cette partie du projet a été pris en charge par l'ADIV qui a mis en place plusieurs stratégies permettant d'obtenir des viandes de bœuf avec différents profils d'oxydation. La formulation des marinades ainsi que la fabrication des différentes viandes ont été réalisées par **Marion Benet**, ingénieure d'étude recrutée pour ce contrat par l'ADIV.

a. Formulation des marinades

L'objectif de cette sous-tâche a été de moduler la peroxydation des viandes par l'action d'additifs ayant des propriétés anti-oxydantes. Ces antioxydants ont été apportés via des solutions de marinades ou via les huiles de friture.

Les travaux ont débuté par la recherche de composés antioxydants permettant de formuler des marinades pour la viande de bœuf. Une recherche bibliographique sur l'action des molécules antioxydantes naturelles a donc été menée en parallèle de la sélection des sociétés pouvant fournir ce type d'ingrédient. Ces recherches ont abouti à la sélection de 9 antioxydants permettant de constituer 12 solutions de marinades aqueuses. Les antioxydants ont été testés seuls ou en combinaison afin de vérifier leur potentiel synergique **[Tableau 5]**. La composition de la marinade a été établie en se rapprochant au maximum des pratiques couramment utilisées dans l'industrie : eau (85%), sel (5,6%), lactose (5%), lactate de sodium (4%) et antioxydant (à la dose recommandée par le fabricant).

	N° marinade	Extraits de	Molécules actives	Familles	Quantité (ppm)
	1	Mélisse	Ac. rosmarinique Ac. chlorogénique	Ac. phénoliques	300
	2	Romarin	Ac. rosmarinique Ac. carnosique Carnosol	Ac. phénoliques Diterpènes phénoliques	120
	3	Grenade	Ac. ellagique Anthocyanes Tannins	Ac. phénoliques Flavonoïdes	300
	4	Cerise acérola	Vit. C Quercétine Anthocyanes	Vitamines Flavonoïdes	300
	5	Feuilles de thé vert	Epicatéchines Tannins	Ac. phénoliques Polyphénols	300
	6	Raisin et Olive	Resveratrol Hydroxytyrosol	Stilbènes	300
	7	Soja	αβδɣ-tocophérols	Caroténoïdes	200
	8	TBHQ (Synthèse chimique)		Quinones	200
MELANGES	9	Romarin Acérola			120 180
	10	Mélisse Soja			150 150
	11	Mélisse Soja Cerise acérola			100 100 100
	12	Cerise acérola Soja			150 150

Tableau 5 : Composés actifs et dosage des différentes marinades utilisées pour les viandes rouges

Puis le pouvoir antioxydant des molécules en marinade a été évalué en utilisant le test au DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) qui permet de déterminer l'activité anti-radicalaire **[Figure 19]**. Cette activité reflète la quantité d'antioxydant nécessaire pour piéger le radical DPPH. Ainsi, plus l'activité anti-radicalaire est faible, plus le pouvoir anti-oxydant de la marinade est élevé. Ce test a permis de mettre en évidence différentes classes d'activité des antioxydants testés. Des marinades ont été choisies dans chaque classe afin d'obtenir des profils d'oxydation variés : Les marinades raisin-olive (M6) et TBHQ (M8) possédant une puissante activité antioxydante, la

marinade romarin/acérola (M9) possédant une activité antioxydante moyenne et les marinades tocophérol (M7) et romarin (M2) possédant une activité antioxydante plus faible.

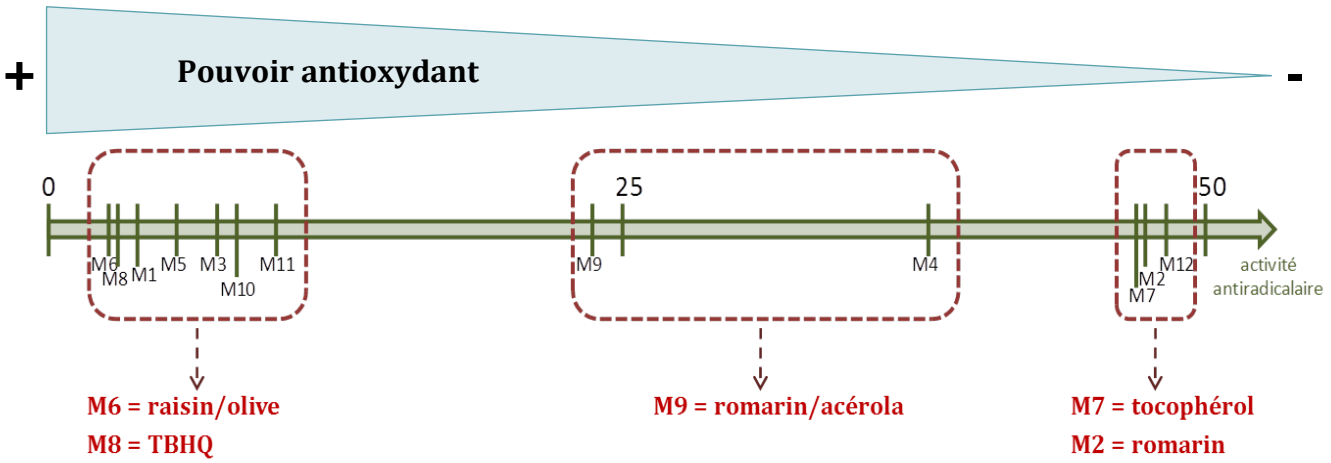

Figure 19 : Pouvoir antioxydants des marinades testées (test DPPH)

b. Mise en place des différents procédés de fabrication

La deuxième étape de la partie industrielle a été de faire varier différents paramètres (viande, cuisson, conditionnement, marinade) afin d'obtenir des voies de production différentes.

✓ *Variation des marinades et des modes de cuisson*

Dans un premier protocole **[Figure 20, A]**, les ronds de gîte de 3 animaux ont été tranchés en parts égales et ont été saumurés par technique d'injection en utilisant l'une des 6 marinades sélectionnées (M0 sans antioxydants, M1 avec extrait de romarin, M2 avec extrait de raisin-olive, M3 avec ajout de tocophérol, M4 avec ajout de TBHQ et M5 avec ajout de romarin + acérola) à hauteur de 10%. Les pièces de viandes injectées ont ensuite été barattées à raison de 4 minutes/heure pendant 15h. A l'issue de cette étape d'injection/barattage, les pièces ont été découpées en steak d'environ 15 mm d'épaisseur et en un rôti calibré de 50 mm d'épaisseur et de 70 mm de diamètre. Les steaks ont été cuits au grill jusqu'à une température à cœur de 50°C soit environ 1min30 par face (correspondant à cuisson « bleue »). Les rôtis ont été pesés, mis en sac sous vide et cuits au four en mode vapeur.

Dans un second protocole **[Figure 20, B]**, des tranches d'environ 15 mm d'épaisseur ont été découpées dans 3 cœurs de rumstecks issus de 3 animaux différents. Ces tranches ont été individuellement cuites à la poêle dans 11 g de végétaline dans lesquels la quantité appropriée d'antioxydants avait été préalablement dispersée. La quantité d'antioxydants incorporée a été

calculée de sorte à avoir un niveau d'enrichissement des viandes recommandé par le fabricant. Après un dorage à la végétaline pendant 2 min, l'échantillon a été mis dans la poêle et doré 1 min de chaque côté. La cuisson a été prolongée jusqu'à atteindre une température à cœur de 55°C en retournant la viande toutes les 30 secondes.

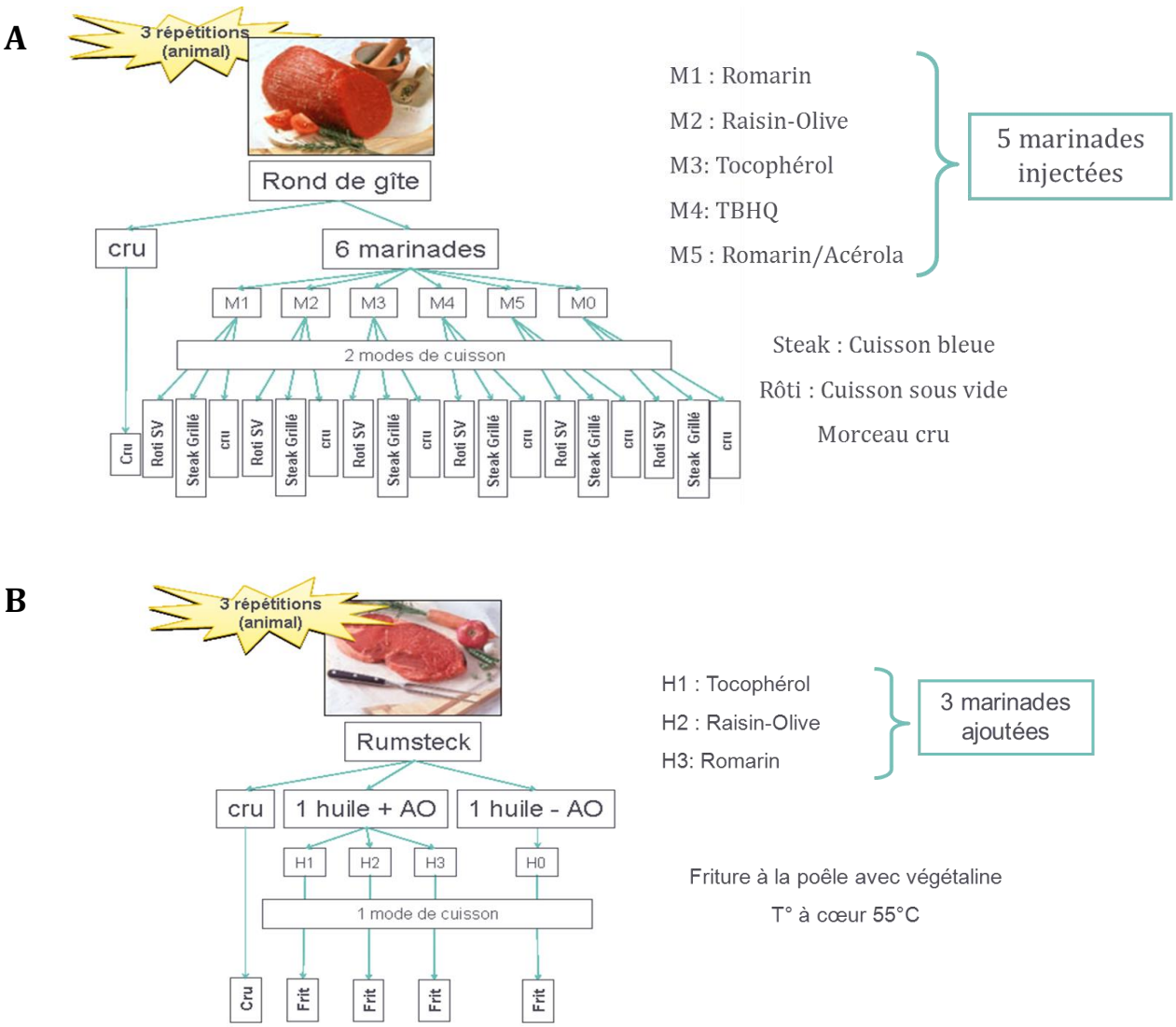

Figure 20 : Protocoles de modulation des marinades et des modes de cuisson
SV : sous-vide ; AO : antioxydant

✓ *Variation des modes de conditionnement et du niveau de cuisson*

Enfin un troisième protocole **[Figure 21]** a été choisi afin de faire varier les modes de conditionnement et les niveaux de cuisson. L'extrait de raisin-olive étant le composé qui a montré la plus faible activité anti-radicalaire par le test DPPH, il a été choisi pour être l'unique extrait testé en marinade sur ce plan d'échantillonnage. Pour chacun des 3 muscles faux-filet

(répétition de 3 animaux), un échantillon témoin correspondant à une tranche crue est conservée sous-vide. Les morceaux restants ont été injectés à hauteur de 10% puis barattés pendant 15h. Dans chaque faux-filet mariné sont ensuite découpés 9 tranches d'environ 15 mm d'épaisseur et conditionnées selon un des trois modes suivant : sous film imperméable à l'air pendant 5 jours, sous atmosphère modifiée (70% O_2 et 30% CO_2) pendant 7 jours ou sous-vide pendant 9 jours. Ces durées correspondant au 2/3 de la date limite de consommation relative à chaque mode de conditionnement. Pour chaque répétition, 3 tranches par mode de conditionnement sont utilisées : une correspond au témoin mariné conditionné cru, les 2 autres subissent un des 2 traitements thermiques par cuisson au grill. Les 2 barèmes temps/température de cuisson ont été définis de manière à obtenir des états chimiques du fer distincts. Les températures atteintes au cœur des viandes ont été respectivement de 50°C et 75°C, en retournant régulièrement les pièces (respectivement 1min30 et 3min20 par face), ce qui correspond à des steaks « bleus » et « bien cuits ».

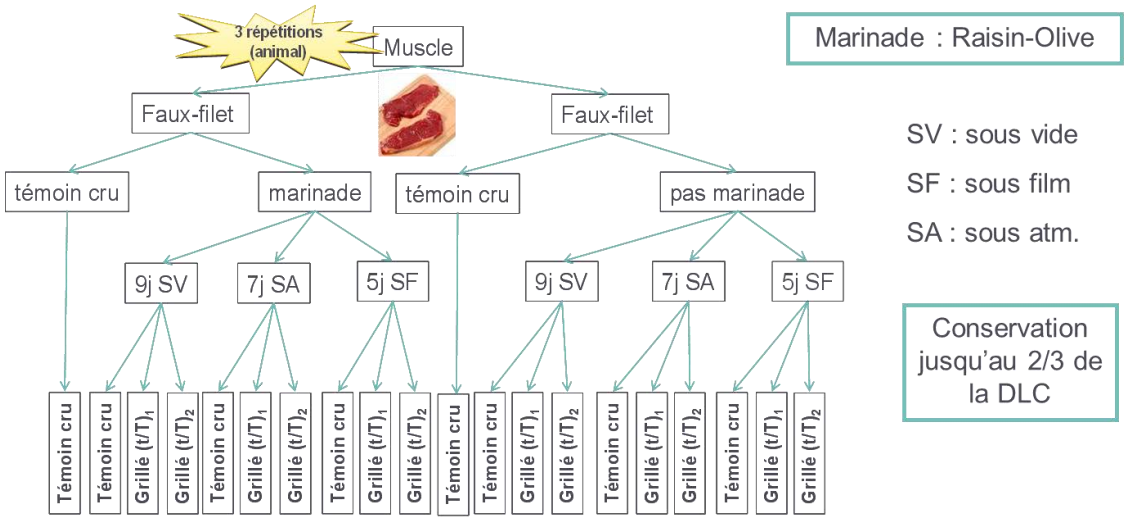

Figure 21 : Protocole de modulation des modes de conditionnement et des niveaux de cuisson
$(t/T)_1$: 1min30/face/50°C : « bleu » ; $(t/T)_2$: 3min20/face/75°C : « bien cuit »

Ces trois protocoles ont ainsi permis de faire varier un nombre important de paramètres :

- *3 types de morceaux :* Rond de gite, rumsteck ou faux-filet
- *2 types d'ajout d'antioxydants :* marinade ou huile de friture
- *6 marinades :* Sans antioxydant, raisin-olive, romarin, tocophérol, TBHQ ou romarin-acérola
- *3 types de cuisson :* Vapeur, grillé ou frit
- *3 niveaux de cuisson :* Cru, « bleu » ou « bien cuit »
- *3 types de conditionnement :* sous-film, sous-vide ou sous-atmosphère modifiée

Ce qui a abouti à la fabrication de 44 viandes différentes et de 132 échantillons (3 répétitions provenant de 3 animaux). Chaque morceau a ensuite été placé sous-vide et congelé à -20°C avant analyse.

c. Analyses biochimiques des viandes

Les analyses biochimiques des viandes ont été réalisées par **Adeline Laleuw**, technicienne de l'ADIV ainsi que par moi-même. Chaque échantillon a été cryobroyé avant de procéder aux analyses. La peroxydation lipidique a été suivi par le dosage des TBARs induits et non-induits. Les produits dérivés de la peroxydation des protéines ont été évalués par le dosage des carbonyles. Les concentrations en fer héminique et en fer non héminique ont également été mesurées.

Les résultats des dosages se trouvent en **Annexe 1 p186**.

d. Choix des viandes pour l'étude court-terme chez le rat

L'objectif de cette étude industrielle était d'obtenir des profils d'oxydation différents entre les viandes en faisant varier plusieurs paramètres (morceau, cuisson, conditionnement, marinade,…). Les résultats des analyses biologiques ont été soumis à des statistiques multivariées effectuées par la personne en charge des statistiques à l'ADIV.

Ces statistiques ont permis de séparer les échantillons en 4 groupes (clusters) distincts ayant des profils d'oxydation différents et se séparant principalement par leurs teneurs en carbonyles, en fer héminique et en fer non héminique **[Figure 22]**.

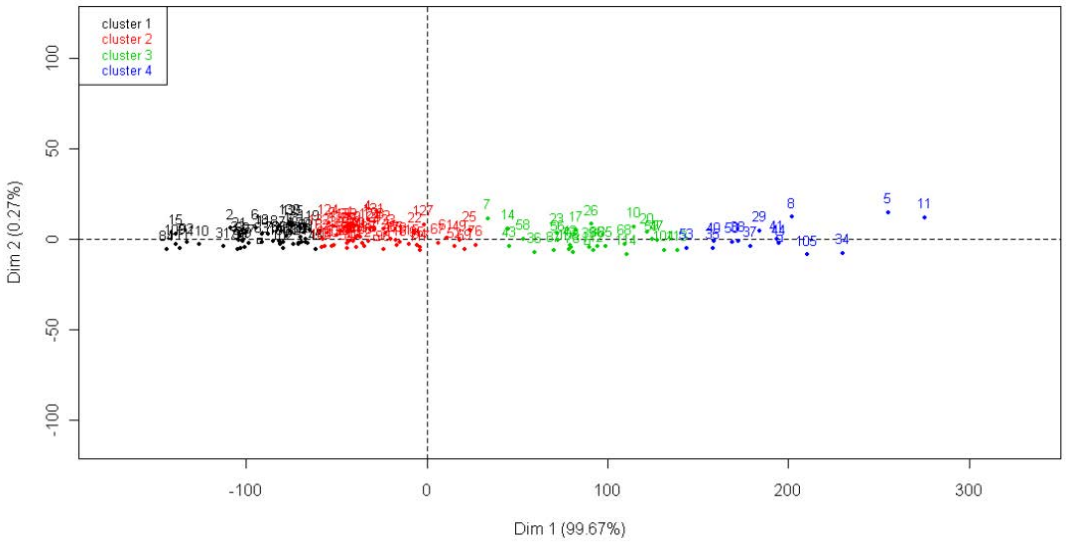

Figure 22 : Carte factorielle représentant les échantillons séparés en 4 clusters

Une analyse plus poussée a permis de définir les procédés de fabrication présents dans chaque groupe et de les quantifier. Les procédés de fabrication étant les plus représentatifs de chaque groupe ont été choisis pour être testés chez le rat dans l'étude suivante **[Figure 23]**.

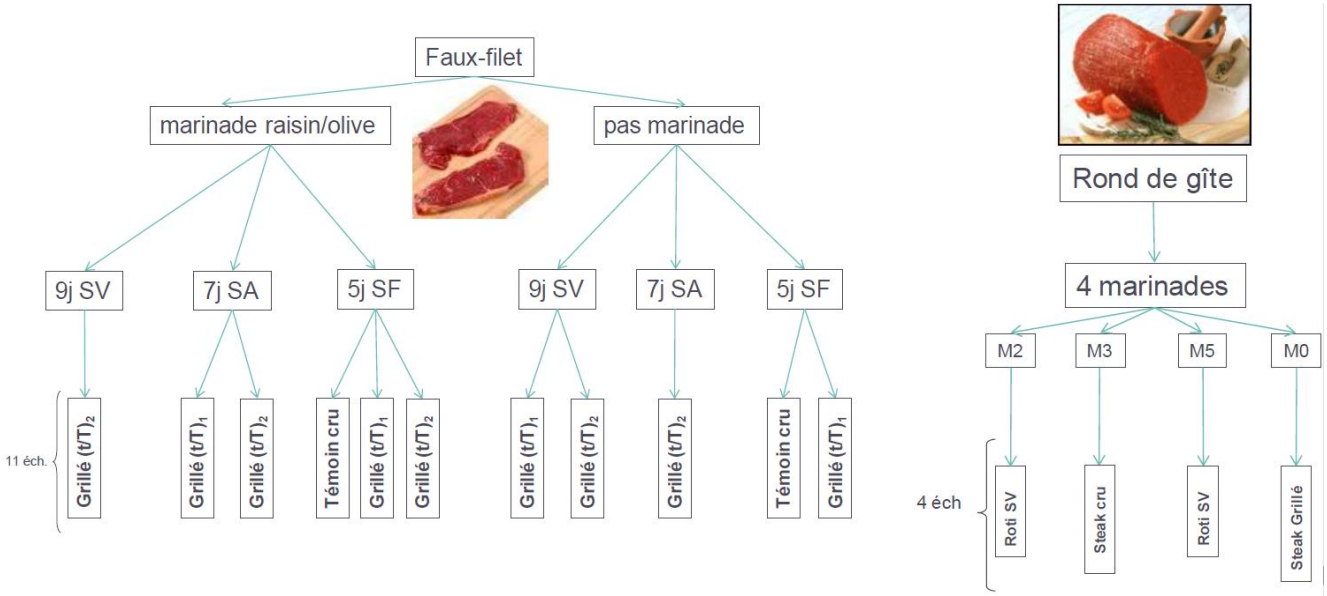

Figure 23 : Viandes de bœuf possédant différents profils d'oxydation et ayant été choisies pour être testés chez le rat dans l'étude court-terme

SV : sous-vide ; SA : sous-atmosphère modifiée ; SF : sous-film
$(t/T)_1$: 1min30/face/50°C : « bleu » ; $(t/T)_2$: 3min20/face/75°C : « bien cuit »
M2 : raisin-olive ; M3 : tocophérol ; M5 : romarin/acérola ; M0 : sans antioxydants

2) Etude court-terme chez le rat

L'objectif de cette tâche était de tester les viandes ayant différents profils d'oxydation sur les biomarqueurs précoces associés à la cancérogenèse colorectale induite par la consommation de fer héminique et donc de viande chez le rat.

a. Protocole expérimental

Le protocole d'expérimentation a été divisé en 2 cycles comportant 9 groupes de 5 rats Fischer 344 mâles âgés de 5-6 semaines soit un total de 90 rats. Les rats ont été répartis individuellement dans des cages à métabolisme dans une animalerie climatisée (22°C), avec un cycle jour/nuit de 12 h.

✓ *Régimes expérimentaux*

Après une période d'adaptation de trois jours, les rats ont été soumis aux différents régimes expérimentaux pendant 14 jours **[Tableau 6]**. Les régimes expérimentaux étaient composés de 45% de base type AIN76 additionnée de 5% d'huile de carthame et de viande de bœuf *ad-libitum*. Les rats témoins ont reçu uniquement la base type AIN76 additionnée d'huile de carthame. Pour toutes nos expérimentations, le mélange de minéraux était faible en calcium (20 µmol de calcium /g d'aliment sec) afin d'éviter l'effet protecteur du calcium sur la cancérogenèse hème-induite.

CYCLE 1	CYCLE 2
Témoin : AIN76 sans viande	Témoin : AIN76 sans viande
Steak, mariné sans antioxydant, « bleu »	Faux-filet, sous-film, non mariné, cru
Steak, mariné tocophérol, cru	Faux-filet, sous-film, mariné raisin-olive, cru
Roti, mariné romarin/acérola, cuisson vapeur sous-vide	Faux-filet, sous-film, non mariné, « bleu »
Roti, mariné raisin-olive, cuisson vapeur sous-vide	Faux-filet, sous-film, mariné raisin-olive, « bien cuit »
Faux-filet, sous-film, mariné raisin-olive, cru	Faux-filet, sous-film, mariné raisin-olive, « bleu »
Faux-filet, sous-vide, mariné raisin-olive, « bien cuit »	Faux-filet, sous-at., mariné raisin-olive, « bleu »
Faux-filet, sous-vide, non mariné, « bleu »	Faux-filet, sous-at., mariné raisin-olive, « bien cuit »
Faux-filet, sous-vide, non mariné, « bien cuit »	Faux-filet, sous-at., non mariné, « bien cuit »

Tableau 6 : Viandes de bœuf distribuées aux rats pendant 14 jours
Sous-at. : sous-atmosphère modifiée

✓ *Paramètres zootechniques*

La croissance (J0, J7 et J14) et la consommation (J12-13) des animaux ont été suivies. Les fèces (J10, J11, J12, J13 et J14) et les urines (J14) ont été récoltées afin de pouvoir analyser les biomarqueurs associés à la cancérogenèse.

✓ Biomarqueurs suivis *(pour le détail des méthodes cf Annexe 2 p188)*

La peroxydation lipidique, qui semble expliquer la promotion de la cancérogenèse colorectale induite par l'hème de la viande de bœuf, a été évaluée par le dosage des TBARs fécaux et par le DHN-MA urinaire. De plus, le contenu en hème des eaux fécales a été mesuré. Les biomarqueurs ont été dosés sur des pools d'eaux fécales par groupe.

✓ *Analyses des résultats*

Afin de mettre en évidence si les traitements technologiques apportés aux viandes permettaient d'obtenir une protection ou une promotion vis-à-vis du risque de cancérogenèse, nous avons réalisé des ratios entre 2 types de viandes ne différant que par un seul facteur.

Par exemple : dans le cycle 1 nous avons testé un [faux-filet, sous-vide, « bien cuit », **mariné raisin olive**] et un [faux-filet, sous-vide, « bien cuit », **non mariné**]. Ces deux viandes bovines ne différant que par l'ajout ou non de la marinade raisin-olive, nous avons pu réaliser le ratio : **mariné raisin-olive/non mariné** qui permet de visualiser l'effet de la marinade raisin-olive.

Ces ratios ont été effectués à chaque fois que cela était possible et pour tous les biomarqueurs testés afin de savoir si le facteur mis en évidence était protecteur (ratio < 1) ou au contraire promoteur (ratio > 1). Cette analyse nous permet de vérifier l'effet de la marinade raisin-olive, de la cuisson et du conditionnement. Cependant les groupes [steak, mariné sans antioxydant, « bleu »] et [steak, mariné tocophérol, cru] n'ont pas pu être analysé car aucun autre groupe ne différait que d'un facteur. Le code couleur utilisé pour faciliter la lecture des ratios est présenté en **Tableau 7**.

Ratio < 1 = EFFET PROTECTEUR	
0 < R < 0,5	= Fortement protecteur
0,5 < R < 1	= Légèrement protecteur
Ratio > 1 = EFFET PROMOTEUR	
R > 1,5	= Fortement promoteur
1 < R < 1,5	= Légèrement promoteur

Tableau 7 : Code couleur utilisé pour la représentation des ratios de l'étude court-terme chez le rat

Les résultats ont été soumis à des analyses de variance. Si l'analyse de variance était significative ($p<0,05$) les résultats ont été soumis à un post-test Fisher pour différencier les groupes. Les résultats complets des analyses (données chiffrées et statistiques) sont présentés en **Annexe 3 (p192)**. Dans les tableaux présentés dans la partie résultats seules les statistiques des ratios considérés apparaissent.

b. Résultats

✓ *Paramètres zootechniques*

Il n'y a pas eu de différence de poids entre les groupes dans les deux cycles. A la fin de l'expérimentation, les rats du cycle 1 pesaient 176 ± 15 g et les rats du cycle 2, 180 ± 13 g.

Il n'y a pas eu de différence de consommation entre les groupes. Pour le cycle 1, le groupe témoin a consommé 12 ± 2 g d'aliment (100 % poudre) et les groupes viandes 12 ± 1 g (repartis en 43 % de poudre et 57 % de viande). Pour le cycle 2, le groupe témoin a consommé 14 ± 1 g d'aliment (100 % poudre) et les groupes viandes 12 ± 2 g (repartis en 39 % de poudre et 61 % de viande).

✓ *Effet de la consommation de viande de bœuf*

Les rats du **cycle 1** ayant consommé les viandes de bœuf avaient significativement plus d'hème (p=0,007) et de TBARs (p=0,027) dans leurs eaux fécales que les rats ayant consommé le régime témoin sans viande mais pas de modification de la teneur en DHN-MA urinaire (p=0,1).
Les rats du **cycle 2** ayant consommé les viandes de bœuf n'avaient pas plus d'hème (p=0,15) et de TBARs (p=0,2) dans leur eaux fécales, ni de DHN-MA urinaire (p=0,15), que les rats ayant consommé le régime témoin sans viande.

✓ *Effet de la marinade raisin-olive*

Traitement	**Biomarqueurs**		
	Hème	TBARs	DHN-MA
Faux filet, sous-vide, bien cuit **Raisin-olive / sans marinade**	0,80 *	0,69 ***	1,43 NS
Faux-filet, sous-film, cru **Raisin-olive / sans marinade**	0,15 ***	0,28 ***	0,86 NS
Faux-filet, sous-film, bleu **Raisin-olive / sans marinade**	1,26 *	0,65 ***	0,67 NS
Faux-filet, sous-at, bien cuit **Raisin-olive / sans marinade**	0,72 **	0,45 ***	0,63 NS
Roti de rond de gite, cuit à la vapeur sous-vide **Raisin-olive / Romarin-acérola**	0,43 **	0,67 ***	1,24 **

Tableau 8 : Effet de la marinade raisin-olive de la viande rouge sur les biomarqueurs associés à la cancérogenèse colorectale hème induite

NS p>0.05 ; * p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001
Sous-at. : sous-atmosphère modifiée
Pour la correspondance des couleurs cf **Tableau 7 p71**
Les résultats complets des analyses (données chiffrées et statistiques) sont présentés en **Annexe 3 p192**

La marinade raisin-olive a permis de diminuer significativement les TBARs dans tous les groupes testés et la teneur en hème des eaux fécales sauf pour le faux-filet, sous-film et « bleu ». La marinade romarin/acérola ne semble pas apporter plus de protection que la marinade raisin-olive. La marinade raisin-olive n'a pas eu d'incidence significative sur le DHN-MA urinaire.

✓ *Effet de la cuisson*

Traitement	Biomarqueurs		
	Hème	TBARs	DHN-MA
Faux-filet, sous-vide, non mariné **Bleu / Bien cuit**	1,02 NS	1,47 ***	6,66 ***
Faux-filet, sous-film, mariné raisin-olive **Bleu / Bien cuit**	1,24 NS	0,67 ***	0,80 NS
Faux-filet, sous-at., marinée raisin-olive **Bleu / Bien cuit**	0,93 NS	0,83 **	0,71 NS
Faux-filet, sous-film, mariné raisin-olive **Cru / Bien cuit**	0,80 NS	0,62 ***	0,59 NS
Faux-filet, sous-film, mariné raisin-olive **Bleu / Cru**	1,55 **	1,08 NS	1,34 NS
Faux-filet, sous-film, non mariné **Bleu / Cru**	0,19 ***	0,46 ***	1,71 NS

Tableau 9 : Effet de la cuisson de la viande rouge sur les biomarqueurs associés à la cancérogenèse colorectale hème induite

NS p>0.05 ; * p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001
Sous-at. : sous-atmosphère modifiée
Pour la correspondance des couleurs cf **Tableau 7 p71**
Les résultats complets des analyses (données chiffrées et statistiques) sont présentés en **Annexe 3 p192**

Les rats ayant consommé de la viande « bleue » avaient significativement moins de TBARS fécaux que les rats ayant consommé de la viande crue ou « bien cuite », sauf pour le faux filet, sous-vide et non mariné. La cuisson ne semble pas avoir eu d'impact répétable sur la teneur en hème fécal ou sur le DHN-MA urinaire.

✓ *Effet du conditionnement avant cuisson*

Traitement	Biomarqueurs		
	Hème	TBARs	DHN-MA
Faux-filet, mariné raisin-olive, bleu **Sous-at. / Sous-film**	0,85 NS	0,87 *	0,69 NS
Faux-filet, mariné raisin-olive, bien cuit **Sous-at. / Sous-film**	1,14 NS	0,70 ***	0,77 NS

Tableau 10 : Effet du conditionnement sous atmosphère modifiée de la viande rouge sur les biomarqueurs associés à la cancérogenèse colorectale hème induite

NS p>0.05 ; * p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001
Sous-at. : sous-atmosphère modifiée
Pour la correspondance des couleurs cf **Tableau 7 p71**
Les résultats complets des analyses (données chiffrées et statistiques) sont présentés en **Annexe 3 p192**

Le conditionnement sous atmosphère modifiée, comparé au conditionnement classique sous film, permet de diminuer significativement la teneur en TBARs des eaux fécales des rats sans avoir de conséquence sur la teneur fécale en hème ou sur le DHN-MA urinaire.

c. Choix des viandes pour les études de cancérogenèse

Cette étude a permis de mettre en évidence :

- Un fort pouvoir protecteur de la **marinade raisin-olive** par la diminution de la teneur en hème et en TBARs des eaux fécales.
- Une protection apportée par la **cuisson « bleue »** comparée à une viande crue ou « bien cuite » passant par une diminution des TBARs fécaux.
- Une protection du **conditionnement sous-atmosphère modifiée** comparé au conditionnement sous film par une diminution des TBARs fécaux.

Dans cette étude, nous avions décidé de tester tous les traitements technologiques proposés par l'ADIV car ils mimaient des procédés de fabrication présents dans la filière. Ils ne permettaient cependant pas de construire un tableau complet d'analyse de variance.

Pour les études de cancérogenèse nous avons choisi un protocole factoriel qui ne nous permet malheureusement pas de tester tous les procédés de fabrication. Nous avons ainsi mis en place un protocole 2x3 pour tester :

- La marinade raisin-olive vs viande non marinée
- Viande crue *vs* « bleue » *vs* « bien cuite »

Enfin, afin d'être en accord avec les pratiques courantes des industriels ainsi que les habitudes des consommateurs, nous avons choisi des viandes conditionnées sous film.

II. Etude de cancérogenèse chez le rat chimio-induit : stade des lésions précancéreuses

1) Protocole

a. Expérimentation animale

92 rats mâles (Charles River) âgés de 3-4 semaines ont été répartis individuellement dans des cages à fond grillagé dans une animalerie climatisée (22°C), avec un cycle jour/nuit de 12 h. Après 3 jours d'adaptation les rats ont reçu une injection intra-péritonéale d'azoxyméthane (AOM, cancérigène colique) à une dose de 20 mg/kg.

✓ *Régimes expérimentaux*

A leur arrivée, les rats ont été répartis en 7 groupes correspondant à un régime sans viande et à 6 régimes à base de viande marinée ou non et crue, « bleue » ou « bien cuite » **[Tableau 11]**. Les régimes expérimentaux étaient composés de 50% de base type AIN76 additionnée de 5% d'huile de carthame et de viande de bœuf correspondant au groupe expérimental *ad-libitum*. Les rats du régime sans viande ont reçu uniquement la base type AIN76 additionnée d'huile de carthame. Les régimes expérimentaux ont été distribués quotidiennement pendant 100 jours.

Régime expérimental	Nombre de rats
Régime sans viande (AIN76 modifiée)	20
Viande non marinée crue	12
Viande non marinée « bleue »	12
Viande non marinée « bien cuite »	12
Viande marinée raisin-olive crue	12
Viande marinée raisin-olive « bleue »	12
Viande marinée raisin-olive « bien cuite »	12

Tableau 11 : Régimes expérimentaux à base de viande rouge distribués aux rats chimio-induits pendant 100 jours

✓ *Données zootechniques*

La croissance des animaux a été mesurée par des pesées hebdomadaires en début d'expérimentation (J0, J7, J14) puis bimensuelles par la suite (J28, J42, J54, J70, J84, J96). La consommation des animaux a été évaluée sur deux jours consécutifs (J61-62).

Les fèces (J24-28, J60-63, J74-77, J81-84 et J88-91) et les urines (J67-70) ont été récoltées afin de pouvoir analyser les biomarqueurs associés à la cancérogenèse.

b. Paramètres suivis *(pour le détail des méthodes cf Annexe 2 p187)*

La promotion de la cancérogenèse colorectale a été analysée en dénombrant le nombre et la taille des lésions précancéreuses de type MDF (Mucin Depleted Foci) pour chaque individu.

La peroxydation lipidique, qui semble expliquer la promotion de la cancérogenèse colorectale induite par l'hème de la viande de bœuf, a été évaluée par le dosage des TBARs fécaux et par le DHN-MA urinaire. De plus, le contenu en hème des eaux fécales a été mesuré. Enfin la cytotoxicité des eaux fécales a été évaluée sur des cellules murines normales ($Apc^{+/+}$) ou

précancéreuses ($Apc^{Min/+}$). Les biomarqueurs ont été dosés pour chaque individu sauf pour la cytotoxicité qui s'est faite sur des pools d'eaux fécales par groupe.

c. Statistiques

Les données ont été analysées par des ANOVA par facteur :

- **Facteur viande** : groupe sans viande *vs* groupes avec viandes
- **Facteur marinade** : groupe avec viandes non marinées *vs* groupes avec viandes marinées raisin-olive
- **Facteur cuisson** : groupe avec viandes crues *vs* groupes avec viandes cuites. Si le facteur cuisson était significatif, un post-test Fisher a permis de différencier les viandes crues, des viandes « bleues » et des viandes « bien cuites ».

Pour chaque analyse, l'interaction entre le facteur cuisson et le facteur marinade a été vérifié.

2) Résultats

a. Données zootechniques

A la fin de l'expérimentation les rats pesaient 337,3 ± 9,4 g sans différence significative entre les groupes (p=0,3).

Les rats ayant reçu le régime sans viande ont consommé plus que les rats ayant reçu les régimes avec viandes (16,5 ± 2,1 vs 12,0 ± 1,2 g respectivement, p<0,0001). De plus, les rats ayant reçu les régimes à base de viandes cuites ont consommé plus que les rats ayant reçu les régimes à base de viandes crues (12,3 ± 1,1 vs 11,3 ± 1,0 g respectivement, p=0,003) sans effet du niveau de cuisson (« bleu » ou « bien cuit »). La marinade n'a pas eu d'effet (p=0,9) sur la consommation alimentaire des animaux.

b. Suivi de la cancérogenèse : nombre et taille des lésions précancéreuses

Les résultats de cancérogenèse sont présentés en **Figure 24**.

Les rats ayant consommé les régimes à base de viandes avaient des MDF significativement plus gros que les rats n'ayant pas consommé de viandes (2,5 ± 0,6 vs 2,3 ± 0,3 cryptes par MDF respectivement ; p=0,028 ; **Figure 24 A**).

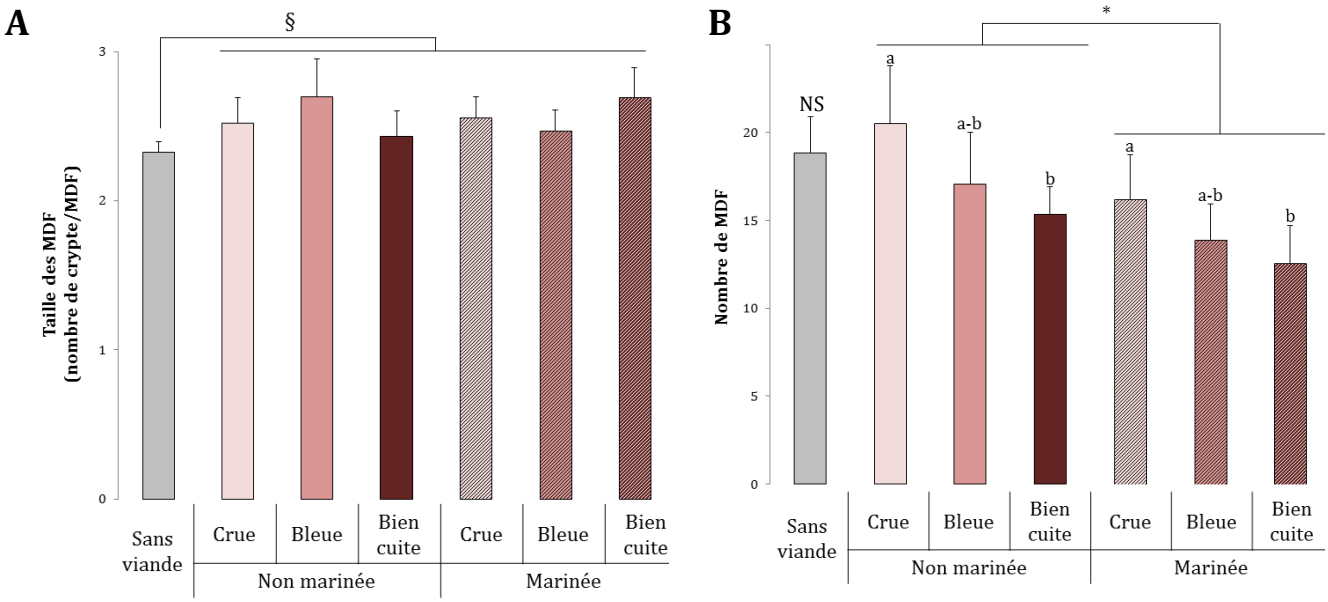

Figure 24 : Taille **(A)** et nombre **(B)** des MDF dénombrés chez les rats chimio-induits nourris avec les régimes expérimentaux à base de viande rouge pendant 100 jours

§ : facteur viande significatif ; § p<0,05 §§ p<0,01 §§§ p<0,001
* : facteur marinade significatif ; * p<0,05 ** p<0,01 *** p<0,001
Lettre : facteur cuisson significatif ; Une lettre différente indique une différence significative, les viandes marinées ou non étant regroupées pour chaque niveau de cuisson (cru, « bleu » ou « bien cuit »)

Les rats ayant consommé des viandes marinées avaient significativement moins de MDF que les rats ayant consommé les viandes non marinées (14,2 ± 7,8 vs 17,6 ± 9,3 MDF respectivement ; p=0,018 ; **Figure 24 B**).

Enfin, nous avons observé un effet significatif du facteur cuisson sur le nombre de MDF (p=0,042). Les rats ayant consommé des viandes « bien cuites » avaient moins de MDF que les rats ayant consommé des viandes crues (14,0 ± 6,6 vs 18,2 ± 10,0 MDF respectivement ; p=0,013 ; **Figure 24 B**).

Il n'y avait pas d'interaction significative entre les facteurs marinade et cuisson pour le nombre de MDF (p=0,9).

c. Suivi des biomarqueurs fécaux et urinaires

✓ *Biodisponibilité de l'hème et biomarqueurs de lipoperoxydation (TBARs et DHN-MA)*

Les résultats des dosages d'hème, de TBARs et de DHN-MA sont présentés en **Figure 25**.

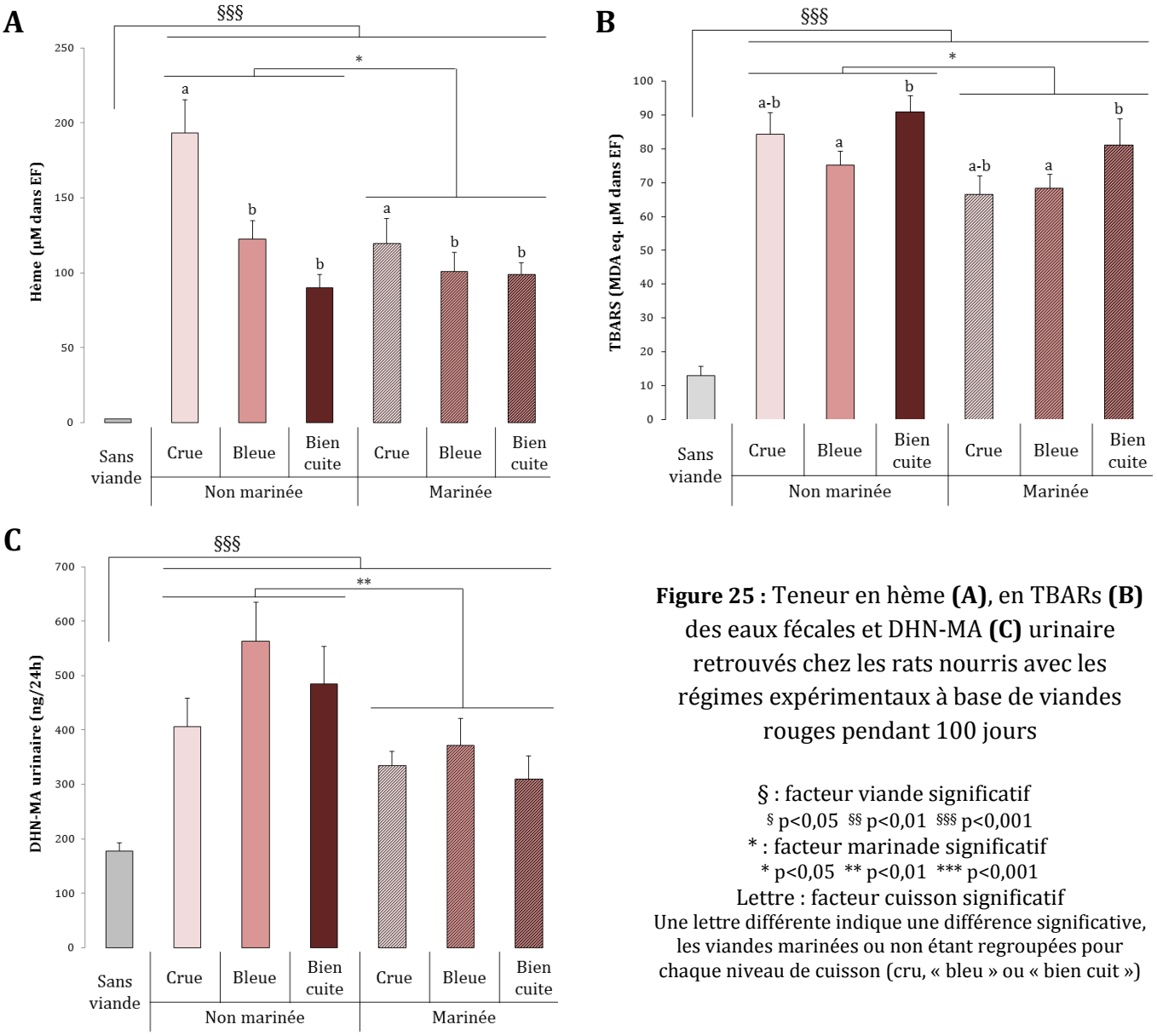

Figure 25 : Teneur en hème **(A)**, en TBARs **(B)** des eaux fécales et DHN-MA **(C)** urinaire retrouvés chez les rats nourris avec les régimes expérimentaux à base de viandes rouges pendant 100 jours

§ : facteur viande significatif
§ p<0,05 §§ p<0,01 §§§ p<0,001
* : facteur marinade significatif
* p<0,05 ** p<0,01 *** p<0,001
Lettre : facteur cuisson significatif
Une lettre différente indique une différence significative, les viandes marinées ou non étant regroupées pour chaque niveau de cuisson (cru, « bleu » ou « bien cuit »)

Les rats ayant consommé les régimes à base de viande avaient significativement plus d'hème (119,9 ± 56,9 vs 2,2 ± 2,0 µM respectivement ; p<0,0001), de TBARs (77,6 ± 20,5 vs 12,9 ± 12,3 µM respectivement ; p<0,0001) dans les eaux fécales et de DHN-MA (408,8 ± 192,9 vs 177,9 ± 62,2 ng/24h respectivement ; p<0,0001) urinaire que les rats n'ayant pas consommé de viande.

Les rats ayant consommé les viandes marinées avaient significativement moins d'hème (106,6 ± 44,1 vs 133,6 ± 65,4 µM respectivement ; p=0,014), de TBARs (72,0 ± 21,1 vs 83,4 ± 18,4 µM respectivement ; p=0,015) dans les eaux fécales et de DHN-MA (339,0 ± 138,2 vs 484,9 ± 216,2 ng/24h respectivement ; p=0,001) urinaire que les rats ayant consommé des viandes non marinées.

Enfin, nous avons observé un effet significatif du facteur cuisson sur la teneur en hème ($p<0,0001$) dans les eaux fécales. Les rats ayant consommé des viandes crues avaient plus d'hème fécal que les rats ayant consommé des viandes « bleues » (154,9 ± 73,8 vs 111,6 ± 43,6 µM respectivement ; $p=0,002$) ou « bien cuites » (154,9 ± 73,8 vs 94,7 ± 27,7 µM respectivement ; $p<0,0001$) sans différence entre les deux niveaux de cuisson ($p=0,2$).
Nous avons également observé un effet significatif du facteur cuisson sur la teneur en TBARs ($p=0,034$) dans les eaux fécales. Les rats ayant consommé des viandes « bleues » avaient moins de TBARs que les rats ayant consommé des viandes « bien cuite » (71,7 ± 14,2 vs 86,0 ± 22,4 µM respectivement ; $p=0,012$). Il n'y avait pas de différences entre les viandes crues et « bleues » ($p=0,5$) et crues et « bien cuites » ($p=0,06$).
Il n'y avait pas d'effet significatif du facteur cuisson sur le DHN-MA urinaire ($p=0,2$).

Il n'y avait pas d'interaction significative entre les facteurs marinade et cuisson pour la teneur en TBARs ($p=0,6$) mais une interaction significative pour la teneur en hème fécal ($p=0,014$).

✓ *Cytotoxicité des eaux fécales*

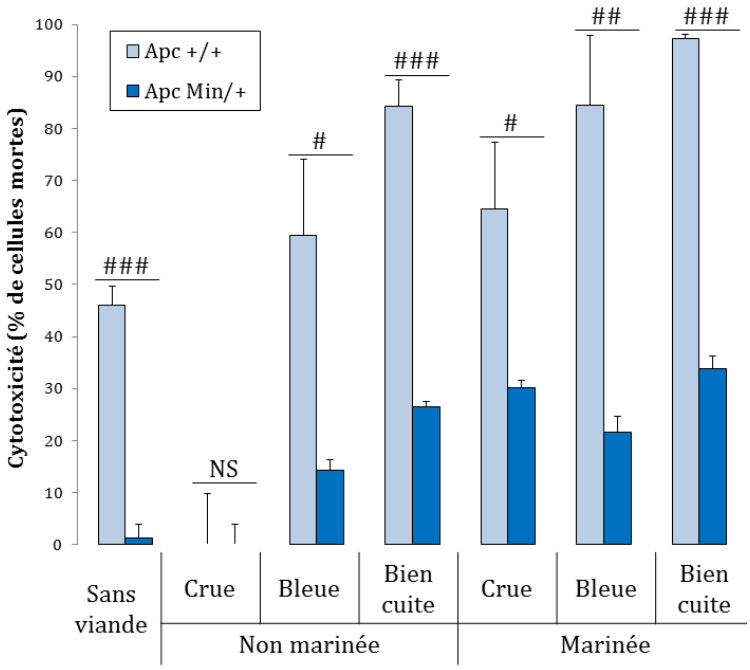

Figure 26 : Cytotoxicité des eaux fécales des rats nourris avec les régimes expérimentaux à base de viande rouge pendant 100 jours sur la lignée cellulaire normale $Apc^{+/+}$ et la lignée précancéreuse $Apc^{Min/+}$

T-test : # $p<0,05$ ## $p<0,01$ ### $p<0,001$

Pour la cytotoxicité des eaux fécales, nous nous sommes intéressés principalement au différentiel entre les lignées normales et précancéreuses puisque d'après notre hypothèse, l'hème induirait la sélection des cellules précancéreuses en étant plus cytotoxique pour les cellules normales **(Pierre *et al.* 2007)**. Nous avons observé **[Figure 26]** que les eaux fécales du groupe ayant consommé la viande non marinée crue, à la dilution au 10ème, n'étaient pas cytotoxiques pour les lignées cellulaires normale $Apc^{+/+}$ et précancéreuse $Apc^{Min/+}$. Pour tous les autres groupes, les eaux fécales des rats étaient significativement plus cytotoxiques pour la lignée cellulaire normale $Apc^{+/+}$ que pour la lignée cellulaire précancéreuse $Apc^{Min/+}$.

Nous pouvons cependant observé que globalement les eaux fécales des groupes ayant consommé des viandes étaient plus élevées que les eaux fécales du groupe témoin. Cependant, l'absence de cytotoxicité des eaux fécales des rats ayant consommé la viande non marinée crue est surprenante. De même, dans les études précédentes nous ne retrouvions pas de différentiel de cytotoxicité dans les groupes témoins **(Pierre et al. 2007 ; Santarelli et al. 2010)**.

3) Conclusions

Dans ce modèle de rat chimio–induit, la consommation de viande de bœuf a conduit à une augmentation de la taille des MDF associée à une augmentation de l'hème fécal et des produits de lipoperoxydation (TBARs fécaux et DHN-MA urinaire).

L'ajout de marinade raisin-olive à la viande de bœuf a conduit à une diminution du nombre de MDF associée à une diminution de l'hème fécal et des produits de lipoperoxydation fécaux et urinaire.

Enfin, la cuisson de la viande a conduit à une diminution du nombre de MDF. Cette diminution était associée à une diminution de la teneur en hème fécal mais à une augmentation des TBARs fécaux sans modification du DHN-MA urinaire.

III. Etude de cancérogenèse chez la souris *Min* : stade tumoral

1) Protocole

a. Expérimentation animale

97 souris C57Bl6 *Apc* Min/+ mâles et femelles (provenance Jackson) âgés de 5 à 8 semaines ont été réparties dans 22 cages à litière (maximum 5 souris/cage d'un même régime, d'un même sexe et d'un âge proche) dans une animalerie climatisée (22°C), avec un cycle jour/nuit de 12 h.

✓ *Régimes expérimentaux*

A leur arrivée, les souris ont été réparties en 5 groupes correspondant à un régime sans viande et à 4 régimes à base de viande marinée ou non et crue ou « bleue » **[Tableau 12]**. En raison du coût élevé de la souris, nous n'avons pas pu tester tous les régimes présents dans l'expérimentation rats. Nous avons décidé d'éliminer les groupes de viandes « bien cuites » car seulement 20 % de la population déclare consommer la viande « bien cuite » alors que la consommation de la viande saignante ou à point représente près de 70 % de la population **(INCA-2 2009)**.

Les régimes expérimentaux ont été distribués quotidiennement pendant 45 jours et étaient composés de 60% de base type AIN76 additionnée de 5% d'huile de carthame et de 40 % de viande de bœuf correspondant au groupe expérimental, mixée et mélangée à la poudre. Les souris du régime sans viande ont reçu uniquement la base type AIN76 additionnée d'huile de carthame.

Régime expérimental	Nombre de souris	Nombre de cages
Régime sans viande (AIN76 modifiée)	25	6
Viande non marinée crue	18	4
Viande non marinée « bleue »	18	4
Viande marinée raisin-olive crue	18	4
Viande marinée raisin-olive « bleue »	18	4

Tableau 12 : Régimes expérimentaux à base de viande rouge distribués aux souris *Min* pendant 45 jours

✓ *Données zootechniques*

La morbidité et la mortalité des animaux ont été surveillées chaque jour. La croissance des animaux a été mesurée par des pesées régulières (J0, J7, J16, J32 et J45). La consommation des animaux n'a malheureusement pas pu être évaluée car le type de cage (litière) ne le permettait pas. Les fèces (J28-32 et J37-39) et les urines (J44) ont été récoltées afin de pouvoir analyser les biomarqueurs associés à la cancérogenèse.

b. Paramètres suivis *(pour le détail des méthodes cf Annexe 2 p188)*

La promotion de la cancérogenèse colorectale a été suivie en dénombrant le nombre et la surface des tumeurs intestinales présentes chez les souris. Dans un second temps, nous avons également analysé le nombre et l'incidence des tumeurs coliques. Dans ce modèle, les tumeurs coliques sont très peu nombreuses et donc sont un paramètre secondaire.

La peroxydation lipidique, qui semble expliquer la promotion de la cancérogenèse colorectale induite par l'hème de la viande de bœuf, a été évaluée par le dosage des TBARs fécaux et par le DHN-MA urinaire. De plus, le contenu en hème des eaux fécales a été mesuré. Enfin la cytotoxicité des eaux fécales a été évaluée sur des cellules murines précancéreuses ($Apc^{Min/+}$) en cohérence avec le modèle animal puisque chez la souris *Min* toutes les cellules sont mutées pour *Apc*. Les biomarqueurs ont été dosés pour chaque cage sauf pour la cytotoxicité qui a été analysé sur des pools par sexe et par groupe.

c. Statistiques

Les données ont été analysées par des ANOVA par facteur :

- **Facteur viande** : groupe sans viande *vs* groupes avec viandes
- **Facteur marinade** : groupe avec viandes non marinées *vs* groupes avec viandes marinées raisin-olive
- **Facteur cuisson** : groupe avec viandes crues *vs* groupes avec viandes cuites.

Pour chaque analyse, l'interaction entre le facteur cuisson et le facteur marinade a été vérifié. Pour chaque facteur, nous avons également vérifié l'effet sexe.

L'incidence des tumeurs coliques a été analysée par des tableaux de contingence (Chi-2).

2) Résultats

a. Données zootechniques

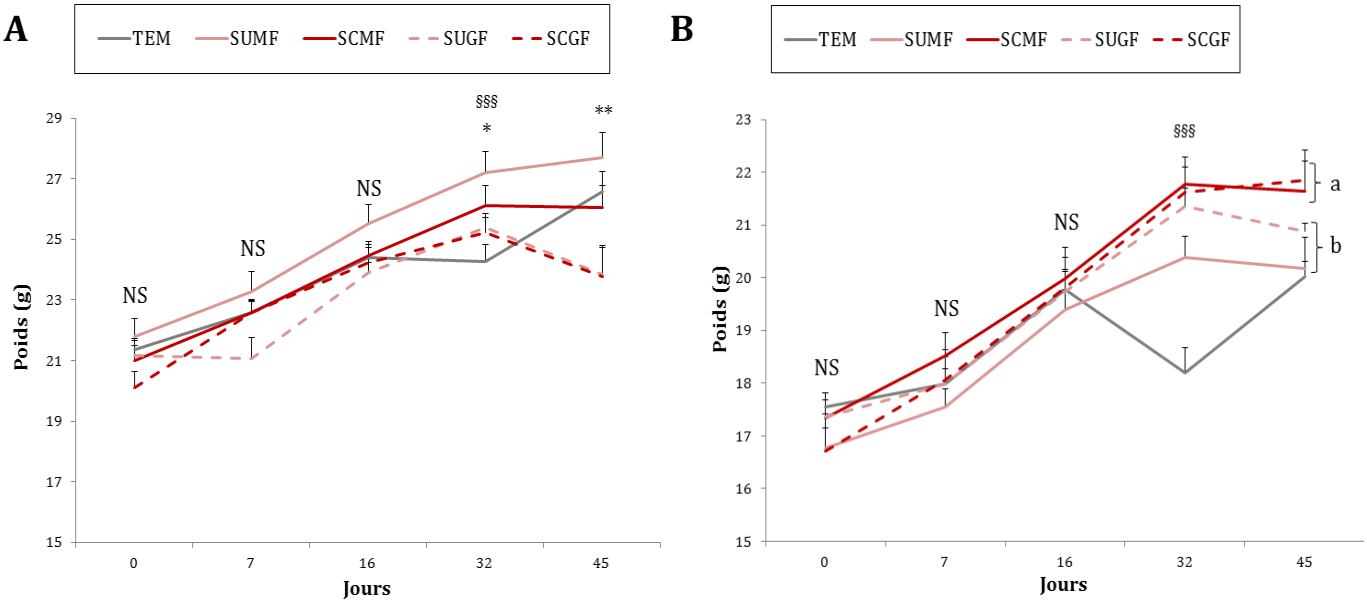

Figure 27 : Suivi de la croissance des souris *Min* mâles **(A)** et femelles **(B)** nourries avec les régimes expérimentaux à base de viande rouge pendant 45 jours

SUMF : Viande crue – SCMF : Viande « bleue »
SUGF : Viande crue et marinée – SCGF ; Viande « bleue » et marinée

NS : aucun des 3 facteurs significatifs
§ : facteur viande significatif ; § p<0,05 §§ p<0,01 §§§ p<0,001
* : facteur marinade significatif ; * p<0,05 ** p<0,01 *** p<0,001
Lettres : facteur cuisson significatif ; Une lettre différente indique une différence significative, les viandes marinées ou non étant regroupées pour chaque niveau de cuisson (cru ou « bleu »)

Souris mâles : Nous n'avons pas observé de différences de poids entre les souris à J0, J7 et J16. A J32, les souris ayant consommé le régime témoin sans viande pesaient significativement moins lourds que les souris ayant consommé les régimes à base de viande (24,3 ± 1,9 vs 26,0 ± 2,0 g respectivement ; p<0,0001). Les souris ayant consommé les viandes non marinées étaient significativement plus lourdes que les souris ayant consommé les viandes marinées à J32 (26,7 ± 2,2 vs 25,3 ± 1,5 g respectivement ; p=0,03) et à la fin de l'expérimentation (26,9 ± 2,6 vs 23,8 ± 2,8 g respectivement ; p=0,001).

Nous avons noté la mort d'un animal appartenant au groupe ayant consommé la viande crue marinée à J38.

Souris femelles : Nous n'avons pas observé de différences de poids entre les souris à J0, J7 et J16. A J32, les souris ayant consommé le régime témoin sans viande pesaient significativement moins

lourds que les souris ayant consommé les régimes à base de viande (18,2 ± 1,7 vs 20,6 ± 3,9 g respectivement ; p<0,0001). A la fin de l'expérimentation (J45), les souris ayant consommé les viandes cuites étaient significativement plus lourdes que les souris ayant consommé les viandes crues (21,7 ± 1,6 vs 20,5 ± 1,3 g respectivement ; p=0,022).

Nous pensons que la chute de poids observée chez le groupe témoin sans viande est due au fait que nous avons placé un grillage dans la cage afin de faciliter la récolte de fèces et que les souris ont fait tomber la poudre de leur aliment en dessous du grillage et n'y ont donc pas eu accès.

b. Suivi de la cancérogenèse

✓ *Nombre de tumeurs intestinales et surface tumorale*

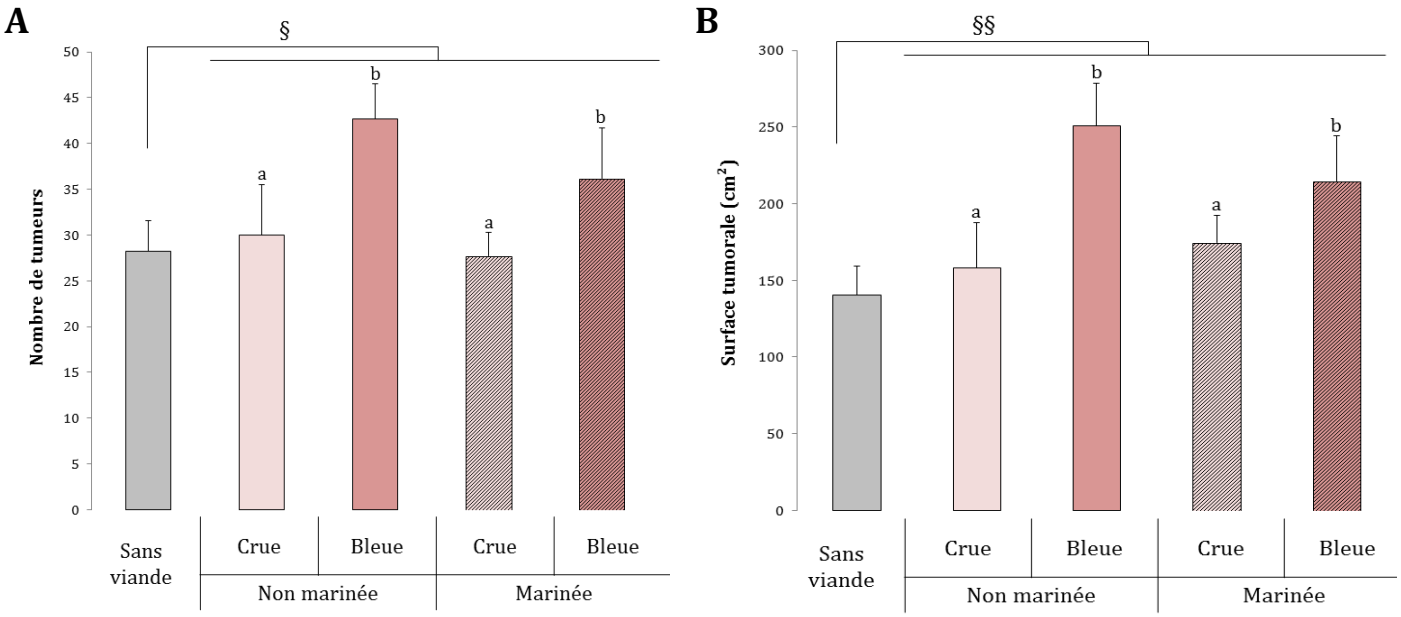

Figure 28 : Nombre de tumeurs **(A)** et surface tumorale **(B)** des souris *Min* après 45 jours de régime expérimentaux à base de viande rouge

§ : facteur viande significatif ; § p<0,05 §§ p<0,01 §§§ p<0,001
Lettre : facteur cuisson significatif ; Une lettre différente indique une différence significative, les viandes marinées ou non étant regroupées pour chaque niveau de cuisson (cru ou « bleu »)

Les souris ayant consommé les régimes à base de viandes avaient significativement plus de tumeurs intestinales (34,2 ± 19,9 vs 28,3 ± 16,3 tumeurs respectivement ; p=0,048) et une surface tumorale plus importante (199,8 ± 116,7 vs 140,1 ± 93,9 cm^2 respectivement ; p=0,001) que les souris n'ayant pas consommé de viandes.

Les souris ayant consommé des viandes marinées ont une diminution marginale du nombre de tumeurs (p=0,097) comparé aux souris ayant consommé des viandes non marinées sans effet sur la surface tumorale (p=0,4).

Les souris ayant consommé des viandes « bleues » avaient significativement plus de tumeurs intestinales (38,6 ± 18,3 vs 28,9 ± 18,3 tumeurs respectivement ; p=0,001) et une surface tumorale plus importante (229,6 ± 116,4 vs 166,0 ± 103,6 cm^2 respectivement ; p=0,001) que les souris ayant consommé les viandes crues.

Les souris femelles avaient significativement plus de tumeurs (35,6 ± 21,6 vs 30,3 ± 16,6 tumeurs respectivement ; p=0,047) et une surface tumorale plus importante (203,0 ± 120,8 vs 169,0 ± 106,1 cm^2 respectivement ; p=0,009) sans interaction avec les facteurs viande ou cuisson.

✓ *Nombre et incidence tumorale colique*

NB : Dans ce modèle animal, les tumeurs coliques sont peu nombreuses, c'est pourquoi cette analyse est un end-point secondaire.

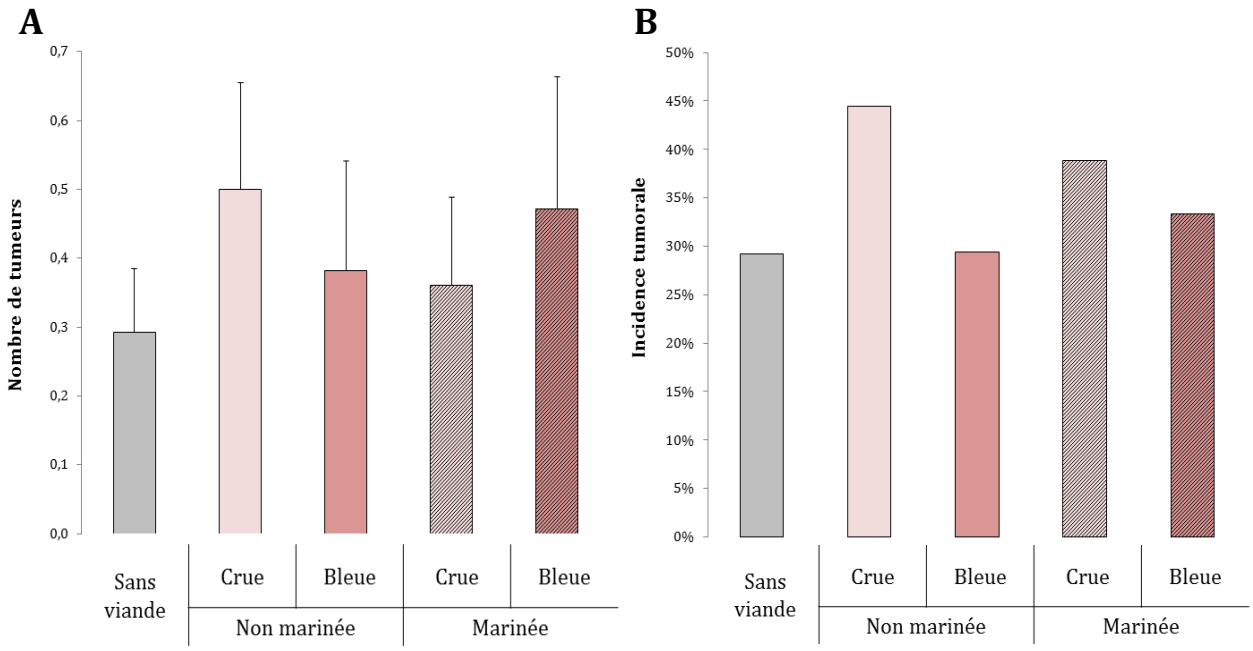

Figure 29 : Nombre de tumeurs coliques **(A)** et incidence **(B)** des souris *Min* après 45 jours de régimes expérimentaux à base de viande rouge

Nous n'avons pas observé d'effet significatif des facteurs viande, marinade ou cuisson sur le nombre de tumeurs coliques. Les souris femelles avaient significativement moins de tumeurs coliques que les souris mâles (p=0,018).

L'analyse de l'incidence tumorale, par des tableaux de contingence, n'a pas révélé de différence significative.

c. Suivi des biomarqueurs fécaux et urinaires

✓ *Hème et produits de lipoperoxydation*

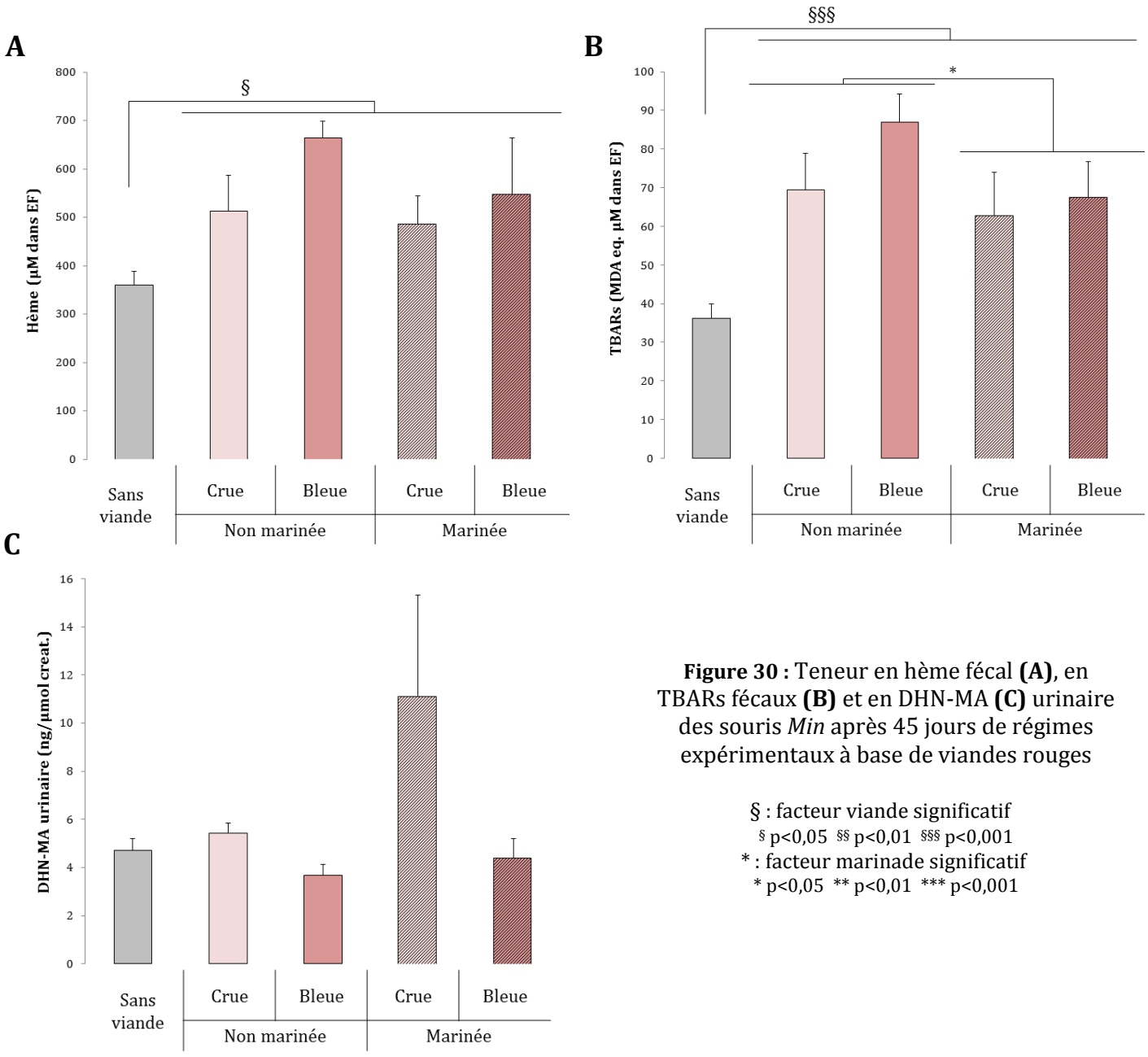

Figure 30 : Teneur en hème fécal **(A)**, en TBARs fécaux **(B)** et en DHN-MA **(C)** urinaire des souris *Min* après 45 jours de régimes expérimentaux à base de viandes rouges

§ : facteur viande significatif
§ p<0,05 §§ p<0,01 §§§ p<0,001
* : facteur marinade significatif
* p<0,05 ** p<0,01 *** p<0,001

Les souris ayant consommé de la viande avaient significativement plus d'hème (552,5 ± 154,8 vs 360,5 ± 28,3 µM respectivement ; p=0,02) et de TBARs (71,7 ± 19,1 vs 36,3 ± 8,4 µM respectivement ; p<0,0001) dans leurs eaux fécales que les souris n'ayant pas consommé de viande.

Les souris ayant consommé des viandes marinées avaient significativement moins de TBARs (58,0 ± 28,0 vs 69,5 ± 31,1 µM respectivement ; p=0,043) que les souris ayant consommé les viandes non marinées. Les femelles avaient significativement moins de TBARs dans leurs eaux fécales que les mâles (57,9 ± 14,2 vs 85,6 ± 11,9 µM respectivement ; p=0,011) sans interaction avec le facteur marinade (p=0,412).

Le dosage du DHN-MA urinaire n'a donné de résultat significatif pour aucun des 3 facteurs testés : viande, marinade et cuisson.

✓ *Cytotoxicité des eaux fécales*

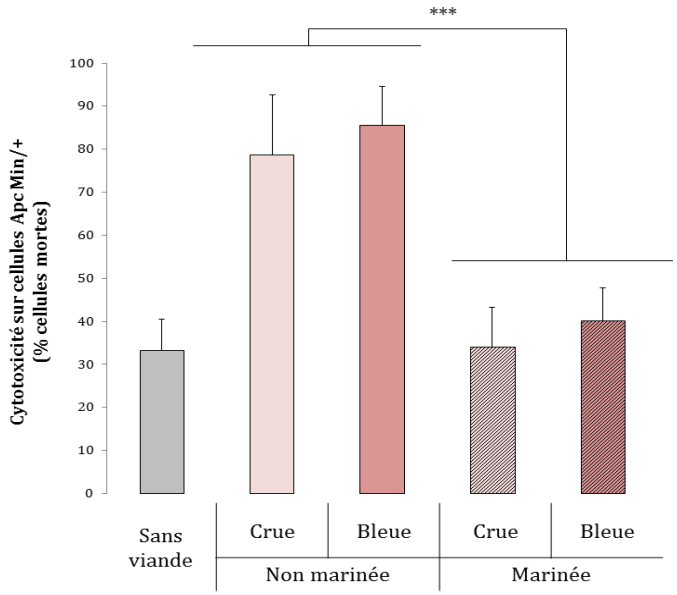

Figure 31 : Cytotoxicité des eaux fécales sur les cellules précancéreuses $Apc^{Min/+}$ des eaux fécales des souris *Min* après 45 jours de régimes expérimentaux à base de viande rouge

* : facteur marinade significatif ; * p<0,05 ** p<0,01 *** p<0,001

Les souris ayant consommé les viandes marinées ont des eaux fécales significativement moins cytotoxiques sur les cellules précancéreuses $Apc^{Min/+}$ (37,0 ± 20,2 vs 82,1 ± 27,7 % de cellules mortes respectivement ; p<0,0001) que les souris ayant consommé les viandes non marinées.

Nous n'avons pas observé d'effet viande (p=0,076), cuisson (p=0,486) ou sexe (p=0,219) significatif.

3) Conclusion

Dans ce modèle de souris *Min*, la consommation de viande de bœuf a conduit à une augmentation du nombre et de la taille des tumeurs intestinales associée à une augmentation de

l'hème fécal et des produits de lipoperoxydation fécaux (TBARs) sans incidence sur les produits de lipoperoxydation urinaires (DHN-MA) ou sur la cytotoxicité des eaux fécales.

L'ajout de marinade raisin-olive à la viande de bœuf n'a pas permis de diminuer le nombre ou la taille des tumeurs intestinales ou coliques. Malgré une diminution des TBARs et de la cytotoxicité des eaux fécales, nous n'avons pas observé de modulation de l'hème fécal ou du DHN-MA urinaire.

La cuisson de la viande a conduit à une augmentation du nombre et de la taille des tumeurs intestinales. Il n'y a pas eu de modulation des biomarqueurs fécaux ou urinaires par la cuisson de la viande.

Enfin, cette étude a mis en évidence que les souris femelles avaient plus de tumeurs intestinales et de plus grande taille que les souris mâles. Elles avaient également moins de tumeurs coliques et moins de TBARs fécaux. Il n'y avait pas de différence significative entre les mâles et les femelles pour l'hème fécal, le DHN-MA urinaire ou la cytotoxicité des eaux fécales.

PARTIE B : CHARCUTERIES

Le fer héminique, présent dans la charcuterie, est également un promoteur puissant de la cancérogenèse colorectale. De la même façon que l'hème provenant de la viande rouge, l'hème des charcuteries catalyse la formation de produits terminaux de peroxydation des lipides alimentaires. Cependant, en raison de la présence importante de nitrites dans les charcuteries, nous pensons que l'hème catalyse également la formation de composés *N*-nitrosés.

I. Modulation du statut oxydatif des charcuteries par différents traitements technologiques et effet sur les biomarqueurs précoces de la cancérogenèse chez le rat

1) Etude industrielle

L'étude de la modulation du rôle promoteur de la charcuterie par des traitements technologiques est plus avancée que pour le volet viandes rouges puisqu'un projet ANR sur ce sujet a déjà été réalisé et coordonné par le Dr Fabrice Pierre (HemeCancer, ANR-PNRA 5.E14).

Le projet HemeCancer a permis de mettre en évidence qu'un jambon modèle appelé DCNO (Dark : Muscle rouge ; Cooked ; Nitrited ; Oxydized) était promoteur de la cancérogenèse colorectal au stade des lésions précancéreuses (rats chimio-induits).

Le projet SécuriViande se base donc sur cette même charcuterie modèle (que nous appellerons charcuterie témoin) pour proposer 4 stratégies de prévention :

- **Diminution de la teneur en fer héminique** : utilisation d'un muscle « blanc » (3,5 mg d'hème/kg, issu de la cuisse) au lieu du muscle « rouge » classique (12 mg d'hème/kg, issu de l'épaule)
- **Ajout d'antioxydants** : tocophérol (1 g/kg) et grenade (7 g/kg)
- **Diminution de la teneur en nitrites** : 80 mg de $NaNO_2$/kg au lieu des 150 mg reglementaires
- **Limitation de l'oxydation** : conservation en anaérobiose

A ces 4 stratégies de prévention, nous avons également testé l'ajout d'**hydrolysat de protéines** (qui devrait favoriser la formation de composés *N*-nitrosés) et la **cuisson à haute température** de la charcuterie (80°C au lieu de 66,5°C en fin de cuisson afin de mimer la fabrication d'un pâté). La fabrication des charcuteries a été réalisée par Fleury-Michon en partenariat avec l'IFIP

(Institut du porc français). Les charcuteries testées diffèrent donc de la charcuterie témoin par un ou deux de ces facteurs.

2) Etude court-terme chez le rat

L'objectif de cette tâche était de tester les charcuteries choisis dans l'étude industrielle sur des biomarqueurs précoces associés à la cancérogenèse colorectale chez le rat.

a. Protocole expérimental

Le protocole d'expérimentation a été divisé en 2 cycles comportant 9 groupes de 5 rats Fischer 344 mâles âgés de 5-6 semaines soit un total de 90 rats. Les rats ont été répartis individuellement dans des cages à métabolisme dans une animalerie climatisée (22°C), avec un cycle jour/nuit de 12 h.

✓ *Régimes expérimentaux*

Après une période d'adaptation de trois jours, les rats ont été soumis aux différents régimes expérimentaux pendant 14 jours **[Tableau 13]**. Les régimes expérimentaux étaient composés de 45% de base type AIN76 additionnée de 5% d'huile de carthame et de charcuteries *ad-libitum*. Les rats témoins (TEM) ont reçu uniquement la base type AIN76 additionnée d'huile de carthame. Pour rappel, dans toutes nos expérimentations le mélange de minéraux était faible en calcium (20 µmol de calcium /g d'aliment sec) afin de ne pas avoir un effet protecteur de la cancérogenèse colorectale par le calcium.

CYCLE 1	CYCLE 2
AIN76	Charcuterie témoin (Rouge, 65°C, nitrite classique, oxydé)
Charcuterie témoin (Rouge, 65°C, nitrite classique, oxydé)	Rouge, 65°C, nitrite classique, oxydé **+ tocophérol**
Blanc, 65°C, nitrite classique, oxydé	**Blanc**, 65°C, nitrite classique, oxydé **+ tocophérol**
Rouge, **80°C**, nitrite classique, oxydé	Rouge, **80°C**, nitrite classique, oxydé **+ tocophérol**
Rouge, 65°C, **faible nitrite**, oxydé	Rouge, 65°C, nitrite classique, oxydé **+ grenade**
Blanc, 65°C, **faible nitrite**, oxydé	**Blanc**, 65°C, nitrite classique, oxydé **+ grenade**
Rouge, **80°C**, **faible nitrite**, oxydé	Rouge, **80°C**, nitrite classique, oxydé **+ grenade**
Rouge, 65°C, nitrite classique, oxydé, + **hydrolysats protéines**	Rouge, 65°C, nitrite classique, **anaérobiose**
Blanc, 65°C, nitrite classique, oxydé + **hydrolysats protéines**	**Blanc**, 65°C, nitrite classique, **anaérobiose**

Tableau 13 : Charcuteries distribuées aux rats pendant 14 jours

Les caractéristiques sont les suivantes : muscle (rouge, teneur en hème élevé ou blanc, teneur en hème diminué) – température de cuisson (65°C ou 80°C) – quantité de nitrites (classique ou faible) – conservation (oxydé ou anaérobiose) – additifs ou non

Le(s) facteur(s) modifié(s) par rapport à la charcuterie témoin est (sont) noté(s) en gras

✓ *Données zootechniques*

La croissance (J0, J7 et J14) et la consommation (J12-13) des animaux ont été suivies. Les fèces (J10, J11, J12, J13 et J14) et les urines (J14) ont été récoltées afin de pouvoir analyser les biomarqueurs associés à la cancérogenèse.

✓ Biomarqueurs suivis *(pour le détail des méthodes cf Annexe 2 p188)*

La peroxydation lipidique a été évaluée par le dosage des TBARs fécaux et par le DHN-MA urinaire. La nitrosation hème induite a été mesurée par la concentration en composés *N*-nitrosés fécaux (NOCs). De plus, le contenu en hème des eaux fécales a été mesuré. Les biomarqueurs ont été dosés sur des pools d'eaux fécales par groupe.

✓ *Analyses des résultats*

Afin de mettre en évidence si les traitements technologiques apportés aux charcuteries permettaient d'obtenir une protection ou une promotion vis-à-vis du risque de cancérogenèse, comme pour les viandes rouges, nous avons réalisé des ratios entre 2 types de charcuteries ne différant que par un seul facteur.

Par exemple : dans le cycle 1 nous avons testé une [charcuterie issue d'un muscle de la cuisse (**blanc**), cuite à 65°C, avec une quantité de nitrites classique et oxydée] et une [charcuterie issue d'un muscle de l'épaule (**rouge**) avec même température de cuisson, même quantité de nitrite et même conservation]. Ces deux charcuteries ne différant que par le type de muscle, nous avons pu réaliser le ratio : **blanc/rouge**.

Ces ratios ont été effectués à chaque fois que cela était possible et pour tous les biomarqueurs testés afin de savoir si le facteur mis en évidence était protecteur (ratio < 1) ou au contraire promoteur (ratio > 1) **[Tableau 14]**.

Ratio < 1 = EFFET PROTECTEUR	
0 < R < 0,5	= Fortement protecteur
0,5 < R < 1	= Légèrement protecteur
Ratio > 1 = EFFET PROMOTEUR	
R > 1,5	= Fortement promoteur
1 < R < 1,5	= Légèrement promoteur

Tableau 14 : Code couleur utilisé pour la représentation des ratios de l'étude court-terme chez le rat

Les résultats ont été soumis à des analyses de variance. Si l'analyse de variance était significative ($p<0.05$) les résultats ont été soumis à un post-test Fisher pour différencier les groupes. Les résultats complets des analyses (données chiffrées et statistiques) sont présentés en **Annexe 4 (p193)**.

Les résultats des composés *N*-nitrosés (NOCs) n'ont pas pu être analysés statistiquement car nous n'avons pas d'écart-type sur ces données. Cependant, pour une lecture facilitée des résultats nous avons gardé notre code couleur pour des ratios considérés comme très protecteur (bleu foncé) ou très promoteur (orange foncé).

b. Résultats

✓ *Données zootechniques*

Il n'y a pas eu de différence de poids entre les groupes dans les deux cycles. A la fin de l'expérimentation, les rats du cycle 1 pesaient 167 ± 14 g et les rats du cycle 2, 161 ± 14 g.

Pour le cycle 1, les groupes des régimes [témoin AIN76], [charcuterie témoin], [charcuterie rouge - 65°C - nitrite classique - oxydé **+hydrolysats de protéines**] et [charcuterie **blanc** - 65°C - **faible nitrite** - oxydé] ont significativement plus mangé que les groupes des régimes [charcuterie rouge - **80°C** - nitrite classique - oxydé] et [charcuterie rouge - 65°C - **nitrite faible** - oxydé] (12 ± 1 g dont 45 % de charcuteries vs 11 ± 2 g dont 36% de charcuteries ; $p<0,05$). Les autres groupes ont consommé 12 ± 2 g d'aliment dont 43% de charcuteries.
Pour le cycle 2, il n'y a pas eu de différence significative entre les groupes. Les groupes ont consommé en moyenne 11 ± 1 g d'aliment dont 56 % de charcuteries.

✓ *Effet de la consommation de charcuterie*

Les rats du **cycle 1** ayant consommé les charcuteries avaient significativement plus d'hème ($p=0,035$) dans leurs eaux fécales que les rats ayant consommé le régime témoin sans charcuterie mais sans modification de la teneur en TBARs fécaux ($p=0,05$) ou en DHN-MA urinaire ($p=0,1$). L'effet de la consommation de charcuterie n'a pu être vérifié que dans le cycle 1 en raison de l'absence du groupe témoin sans charcuterie dans le **cycle 2**.

✓ *Effet de la teneur en hème du muscle : muscle blanc (faible) vs muscle rouge (élevée)*

L'effet de la teneur en hème du muscle est présenté dans le **Tableau 15**.

Pour la charcuterie témoin (rouge - 65°C - nitrite classique - oxydé), le remplacement d'un muscle rouge (riche en hème) par un muscle blanc (pauvre en hème) a permis de diminuer la teneur en hème ($p<0,0001$), en TBARs ($p=0,006$) fécaux des rats et en DHN-MA urinaire ($p<0,0001$). Nous observons également une diminution de la teneur en NOCs d'un facteur 13.

Dans tous les autres cas, la diminution de la teneur en hème dans la charcuterie a permis de diminuer significativement la teneur en hème dans les eaux fécales des rats. Cette diminution semble aussi être le cas pour les composés *N*-nitrosés fécaux. De manière inattendue, la diminution de la teneur en hème dans la charcuterie conduit à une légère augmentation des TBARs pour les charcuteries enrichies en tocophérol, en grenade ou conservée sous anaérobiose. Nous n'observons pas de modulation du DHN-MA urinaire à part une diminution significative lorsque la charcuterie est pauvre en nitrites.

Traitements	Biomarqueurs			
	Hème	NOCs	TBARs	DHN-MA
65°C, nitrite classique, oxydé **blanc / rouge**	0,14***	0,08	0,80**	0,56***
65°C, nitrite classique, oxydé, hydrolysats protéines **blanc / rouge**	0,39**	0,45	1,01NS	0,93NS
65°C, nitrite classique, oxydé, tocophérol **blanc / rouge**	0,48**	0,39	1,24**	0,77NS
65°C, nitrite classique, oxydé, grenade **blanc / rouge**	0,45*	1,01	1,20**	1,02NS
65°C, nitrite classique, anaérobiose **blanc / rouge**	0,38***	0,76	1,28***	0,79NS
65°C, nitrite faible, oxydé **blanc / rouge**	0,22**	0,24	0,95NS	0,85***

Tableau 15 : Effet d'un muscle issu de l'épaule (blanc) à la place d'un muscle issu de la cuisse (rouge) sur les biomarqueurs associés à la cancérogenèse colorectale hème induite

NS p>0.05 ; * p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001

Pour la légende des couleurs cf **Tableau 14 p92**
Les résultats complets des analyses (données chiffrées et statistiques) sont présentés en **Annexe 4 p193**
Les résultats des NOCS n'ont pas pu être analysés statistiquement, seuls les ratios supérieurs à 1,5 ou inférieurs à 0,5 ont été colorés

✓ *Effet de l'ajout d'additif : charcuterie enrichie vs charcuterie non enrichie*

Traitements	Biomarqueurs			
	Hème	NOCs	TBARs	DHN-MA
Rouge, 65°C, nitrite classique, oxydé **Tocophérol : avec / sans**	0,90NS	0,66	0,90NS	0,93NS
Rouge, 65°C, nitrite classique, oxydé **Grenade : avec / sans**	0,50***	0,50	0,57***	0,76*
Rouge, 65°C, nitrite classique, oxydé **Hydrolysats prot. : avec / sans**	0,90NS	1,25	0,76**	1,09NS
Blanc, 65°C, nitrite classique, oxydé **Hydrolysats prot. : avec / sans**	2,44NS	6,98	0,96NS	1,81***

Tableau 16 : Effet de l'ajout d'additif à la charcuterie sur les biomarqueurs associés à la cancérogenèse colorectale hème induite

NS p>0.05 ; * p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001

Pour la légende des couleurs cf **Tableau 14 p92**
Les résultats complets des analyses (données chiffrées et statistiques) sont présentés en **Annexe 4 p193**
Les résultats des NOCS n'ont pas pu être analysés statistiquement, seuls les ratios supérieurs à 1,5 ou inférieurs à 0,5 ont été colorés

Etonnamment, dans cette étude, l'ajout de tocophérol à la charcuterie témoin [rouge, 65°C, nitrite classique, oxydé] n'a pas permis de diminuer significativement l'hème, les TBARs fécaux ou le DHN-MA urinaire. A l'inverse, l'ajout de grenade à la charcuterie a été efficace pour diminuer significativement l'hème ($p<0,0001$), les TBARs ($p<0,0001$), le DHN-MA urinaire ($p=0,038$) et pour diminuer d'un facteur 2 les NOCs fécaux.

L'ajout d'hydrolysats de protéines à la charcuterie témoin n'a pas modifié la teneur en hème et en DHN-MA urinaire, a augmenté légèrement la teneur en NOCS mais a diminué significativement la teneur en TBARs de l'eau fécale ($p=0,002$).

Pour la charcuterie issue d'un muscle blanc (faible en hème), nous avons observé une augmentation significative du DHN-MA urinaire ($p<0,0001$) accompagnée d'une augmentation des NOCs fécaux d'un facteur 7 sans incidence sur les teneurs en hème ou en TBARS fécaux.

✓ *Effet de la diminution en nitrites : teneur faible vs teneur classique*

Traitements	**Biomarqueurs**			
	Hème	NOCs	TBARs	DHN-MA
Rouge, 65°C, oxydé **Nitrites : faible / classique**	$0,74^{*}$	0,60	$0,76^{**}$	$1,29^{***}$
Rouge, 80°C, oxydé **Nitrites : faible / classique**	$1,34^{NS}$	1,40	$1,25^{*}$	$0,93^{**}$
Blanc, 65°C, oxydé **Nitrites : faible / classique**	$1,15^{NS}$	1,84	$0,90^{NS}$	$1,95^{***}$

Tableau 17 : Effet d'une charcuterie diminuée en nitrites sur les biomarqueurs associés à la cancérogenèse colorectale hème induite

NS $p>0.05$; * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$

Pour la légende des couleurs cf **Tableau 14 p92**
Les résultats complets des analyses (données chiffrées et statistiques) sont présentés en **Annexe 4 p193**
Les résultats des NOCS n'ont pas pu être analysés statistiquement, seuls les ratios supérieurs à 1,5 ou inférieurs à 0,5 ont été colorés

Pour la charcuterie témoin [rouge - 65°C - nitrite classique – oxydé], la diminution de la teneur en nitrites a permis de diminuer la teneur en hème ($p=0,04$) et en TBARs ($p=0,002$) fécaux mais a augmenté le DHN-MA urinaire ($p<0,0001$) des rats. Nous avons également observé une diminution de la teneur en NOCs d'un facteur 1,2.

Nous n'avons pas retrouvé le même profil lorsque la charcuterie était cuite à haute température ou lorsqu'elle est issue d'un muscle blanc (faible en hème).

✓ *Effet de la température de cuisson : Elevée (80°C) vs classique (65°C)*

Traitements	Biomarqueurs			
	Hème	NOCs	TBARs	DHN-MA
Rouge, nitrite classique, oxydé **Cuisson : 80°C / 65°C**	0,60**	0,47	0,67***	1,50***
Rouge, nitrite faible, oxydé **Cuisson : 80°C / 65°C**	1,08NS	1,11	1,10NS	1,08*
Rouge, nitrite classique, oxydé, tocophérol **Cuisson : 80°C / 65°C**	0,74*	0,97	1,20**	0,90NS
Rouge, nitrite classique, oxydé, grenade **Cuisson : 80°C / 65°C**	0,99NS	0,69	1,35**	1,36NS

Tableau 18 : Effet d'une charcuterie cuite à haute température sur les biomarqueurs associés à la cancérogenèse colorectale hème induite

NS p>0.05 ; * p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001

Pour la légende des couleurs cf **Tableau 14 p92**
Les résultats complets des analyses (données chiffrées et statistiques) sont présentés en **Annexe 4 p193**
Les résultats des NOCS n'ont pas pu être analysés statistiquement, seuls les ratios supérieurs à 1,5 ou inférieurs à 0,5 ont été colorés

Pour la charcuterie témoin [rouge - 65°C - nitrite classique – oxydé], la cuisson à haute température (afin de mimer la fabrication du pâté) a permis de diminuer la teneur en hème (p=0,005) et en TBARs (p<0,0001) fécaux des rats mais a augmenté le DHN-MA urinaire (p<0,0001). Nous avons également observé une diminution de la teneur en NOCs d'un facteur 2.

Nous n'avons pas retrouvé ce profil lorsque la charcuterie était diminuée en nitrites, additionnée de tocophérol ou additionnée de grenade.

✓ *Effet du type de conservation : Anaérobiose vs oxydé*

Traitements	Biomarqueurs			
	Hème	NOCs	TBARs	DHN-MA
Rouge, 65°C, nitrite classique **Anaérobiose / oxydé**	1,48***	1,62	0,98NS	1,28NS

Tableau 19 : Effet d'une charcuterie conservée en anaérobiose sur les biomarqueurs associés à la cancérogenèse colorectale hème induite

NS p>0.05 ; * p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001

Pour la légende des couleurs cf **Tableau 14 p92**
Les résultats complets des analyses (données chiffrées et statistiques) sont présentés en **Annexe 4 p193**
Les résultats des NOCS n'ont pas pu être analysés statistiquement, seuls les ratios supérieurs à 1,5 ou inférieurs à 0,5 ont été colorés

Pour la charcuterie témoin (rouge - 65°C - nitrite classique - oxydé), la conservation en anaérobiose a conduit à une augmentation de la teneur en hème ($p<0,0001$) sans modification des TBARs fécaux ou du DHN-MA urinaire des rats. Nous avons également observé une augmentation de la teneur en NOCs d'un facteur 0,6.

c. Choix des charcuteries pour les études de cancérogenèse

L'interprétation des résultats lorsque la charcuterie testée différait de deux facteurs par rapport à la charcuterie témoin est très difficile.
Par exemple, l'ajout de grenade à la charcuterie témoin a permis de diminuer significativement la teneur en TBARs des eaux fécales. De plus, la diminution de la teneur en hème de la charcuterie témoin (remplacement du muscle rouge riche en hème par un muscle blanc pauvre en hème) a permis également de diminuer la teneur en TBARs. Cependant, l'ajout de grenade à une charcuterie issue d'un muscle blanc (pauvre en hème) a conduit à une augmentation significative des TBARs. *Comment l'interpréter ?*
C'est pourquoi, pour nos conclusions, nous avons décidé de nous limiter uniquement aux modifications apportées à la charcuterie témoin.

Le but de cette étude court-terme était de mettre en évidence des stratégies de prévention efficaces afin de diminuer les biomarqueurs associés à la cancérogenèse colorectale hème-induite chez le rat.

Cette étude a ainsi permis de mettre en évidence plusieurs facteurs protecteurs :

- La diminution d'hème dans la charcuterie en remplaçant un muscle issu de la cuisse (rouge, 12mg d'hème/kg) par un muscle issu de l'épaule (blanc, 3,5 mg/kg) a permis de diminuer significativement les teneurs des eaux fécales en hème et en TBARs et a conduit à une diminution des composés *N*-nitrosés d'un facteur 13.

- L'enrichissement en grenade de la charcuterie (7 g/kg) a permis de diminuer significativement les teneurs des eaux fécales en hème et en TBARs et a conduit à une diminution des composés *N*-nitrosés d'un facteur 2.

- La diminution de la teneur en nitrites (des 150 mg de $NaNO_2$/kg règlementaires à 80 mg/kg) de la charcuterie a permis de diminuer significativement les teneurs des eaux fécales en hème et en TBARs et a conduit à une diminution des composés *N*-nitrosés d'un facteur 1,2.

- La cuisson à haute température (80°C au lieu des 65°C habituellement, afin de mimer la fabrication du pâté) de la charcuterie a permis de diminuer significativement les teneurs des eaux fécales en hème et en TBARs et a conduit à une diminution des composés *N*-nitrosés d'un facteur 2.

Dans la suite du projet, dans les études de cancérogenèse, nous avons décidé d'étudier :

- La **charcuterie témoin** [rouge - 65°C - nitrite classique – oxydé]
- Une charcuterie dont la **teneur en fer héminique** est diminuée (muscle blanc)
- Une charcuterie dont la **teneur en nitrites** est diminuée
- Une charcuterie enrichie en **grenade**
- Une charcuterie enrichie en **tocophérol**. En effet, même si cette étude n'a pas dévoilé d'effet protecteur de l'ajout de tocophérol, nous avions observé dans le précédent projet ANR (HemeCancer) un effet protecteur sur le modèle rongeur et sur l'homme. Nous souhaitons donc confirmer ce résultat.
- Enfin, à la demande de l'ANR, nous avons également testé une **viande de porc non transformée**.

II. Etude de cancérogenèse chez le rat chimio-induit : stade des lésions précancéreuses

1) Protocole

a. Expérimentation animale

94 rats mâles (provenance Charles River) âgés de 3-4 semaines ont été répartis individuellement dans des cages à fond grillagé dans une animalerie climatisée (22°C), avec un cycle jour/nuit de 12 h. Après 3 jours d'adaptation les rats ont reçu une injection intra-péritonéale d'AOM (Azoxyméthane : cancérigène colique) à une dose de 20 mg/kg.

✓ *Régimes expérimentaux*

A leur arrivée, les rats ont été répartis en 7 groupes correspondant à un régime sans viande (témoin AIN76), 5 régimes à base de charcuteries et un régime à base de porc cru thermisé **[Tableau 20]**. Les régimes expérimentaux ont été distribués quotidiennement pendant 100 jours et étaient composés de 50% de base type AIN76 additionnée de 5% d'huile de carthame, de

charcuteries correspondant au groupe expérimental *ad-libitum*. Les rats du régime sans viande ont reçu uniquement la base type AIN76 additionnée d'huile de carthame.

Régime expérimental	Nombre de rats
Témoin AIN76	20
Charcuterie témoin : muscle rouge (riche en hème), taux nitrite classique	24
Muscle blanc (pauvre en hème), taux nitrite classique	10
Muscle rouge, taux nitrite faible	10
Muscle rouge, taux nitrite classique, enrichie en grenade	10
Muscle rouge, taux nitrite classique, enrichie en tocophérol	10
Viande de porc crue thermisée	10

Tableau 20 : Charcuteries modèles distribuées aux rats chimio-induits pendant 100 jours

✓ *Données zootechniques*

La croissance des animaux a été mesurée par des pesées hebdomadaires en début d'expérimentation (J0, J7, J14) puis bimensuelles par la suite (J28, J42, J54, J70, J84, J96). La consommation des animaux a été évaluée sur deux jours consécutifs (J61-62).

Les fèces (J24-28, J60-63, J74-77, J81-84 et J88-91) et les urines (J67-70) ont été récoltées afin de pouvoir analyser les biomarqueurs associés à la cancérogenèse.

b. Paramètres suivis *(pour le détail des méthodes cf Annexe 2 p188)*

La promotion de la cancérogenèse colorectale a été suivie en dénombrant le nombre et la taille de Mucin Depleted Foci (MDF) qui sont des lésions précancéreuses.

La peroxydation lipidique a été évaluée par le dosage des TBARs fécaux et par le DHN-MA urinaire. La teneur en composés *N*-nitrosés (NOCs) des eaux fécales a été évaluée. De plus, le contenu en hème des eaux fécales a été mesuré. Enfin la cytotoxicité des eaux fécales a été évaluée sur des cellules murines normales ($Apc^{+/+}$) ou précancéreuses ($Apc^{Min/+}$). Les biomarqueurs ont été dosés pour chaque individu sauf la cytotoxicité qui a été évalué sur des pools par groupe.

c. Statistiques

Les données ont été analysées par des analyses de variance (ANOVA).

Nous avons vérifié :

- L'**effet charcuterie** (régime témoin *vs* toutes les charcuteries)
- L'**effet procédé de fabrication** (viande de porc non transformée *vs* toutes les charcuteries).
- Les différences entre les **groupes charcuteries** (sans le témoin et la viande de porc non transformée). Si une différence significative a été trouvée entre les différents groupes ($p<0,05$) un test de Tuckey a été effectué.

Les données de croissance et de consommation ont été analysées par des ANOVA prenant en compte tous les groupes (témoin, porc non transformé et toutes les charcuteries).

2) Résultats

a. Données zootechniques

A la fin de l'expérimentation, les rats ayant consommé le régime témoin pesaient significativement plus lourds que les rats ayant consommés les autres régimes (353 ± 18 g pour le groupe témoin vs 321 ± 20 g en moyenne pour les autres groupes, tous les $p<0,0001$). Les rats ayant consommé la charcuterie témoin pesaient significativement plus lourds que les rats ayant consommé la charcuterie pauvre en hème (329 ± 17 vs 314 ± 20 g respectivement, $p=0,042$).

Les rats du régime témoin avaient significativement plus consommé que les rats des autres régimes (17 ± 2 g pour le groupe témoin vs 13 ± 1 g en moyenne pour les autres groupes, tous les $p<0,0001$). Les rats ayant consommé la charcuterie témoin avaient significativement plus consommé que les rats ayant consommé la charcuterie diminuée en nitrites ($p=0,017$), enrichie en grenade ($p=0,035$) ou la viande de porc non transformée ($p=0,001$).

b. Suivi de la cancérogenèse : nombre et taille des MDF

Les résultats de cancérogenèse sont présentés en **Figure 32**.

Nous n'observons pas d'effet promoteur des charcuteries dans ce modèle. Les rats ayant consommé le régime témoin avaient même significativement plus de MDF que les rats ayant consommé les charcuteries (18,8 ± 9,0 vs 14,8 ± 8,2 MDF respectivement ; $p=0,011$, **Figure 32 A**) sans différence de taille ($p=0,8$).

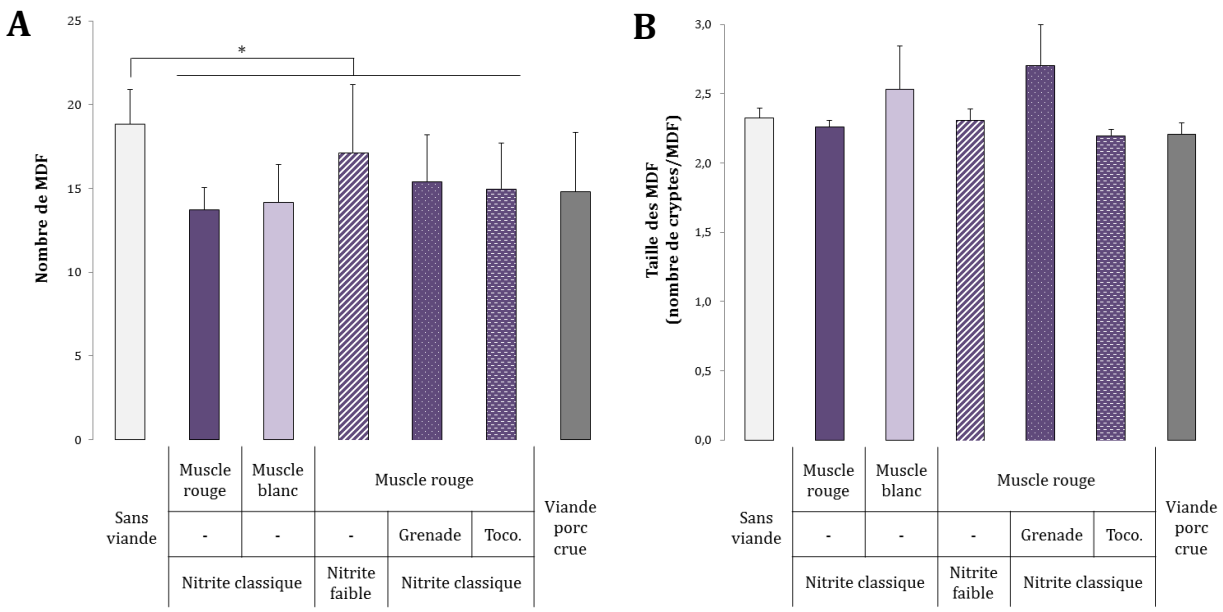

Figure 32 : Nombre **(A)** et taille **(B)** des MDF dénombrés chez les rats chimio-induits nourris avec les régimes expérimentaux à base de charcuteries pendant 100 jours

* : effet charcuterie significatif ; *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001

Les rats ayant consommé la viande de porc crue non transformée avaient autant de MDF (p=1) et de même taille (p=0,3) que les rats ayant consommé les charcuteries

Enfin, nous n'avons pas observé de différence entre les différentes charcuteries pour le nombre de MDF (p=0,6) ou pour leur taille (p=0,15).

c. Suivi des biomarqueurs fécaux et urinaires

✓ *Biodisponibilité de l'hème, biomarqueurs de lipoperoxydation et de nitrosation*

Les résultats des dosages d'hème, de NOCs, de TBARs et de DHN-MA sont présentés **Figure 33**.

Comme attendu, les rats ayant consommé les charcuteries avaient significativement plus d'hème (61,6 ± 47,5 vs 2,2 ± 2,0 µM respectivement ; p<0,0001), de TBARs (48,2 ± 13,9 vs 12,9 ± 12,3 µM ; p<0,0001) et de DHN-MA (286,3 ± 155,3 vs 177,9 ± 62,2 ng/24h respectivement ; p=0,004). Ces rats n'avaient cependant pas plus de composés *N*-nitrosés fécaux (p=0,097).

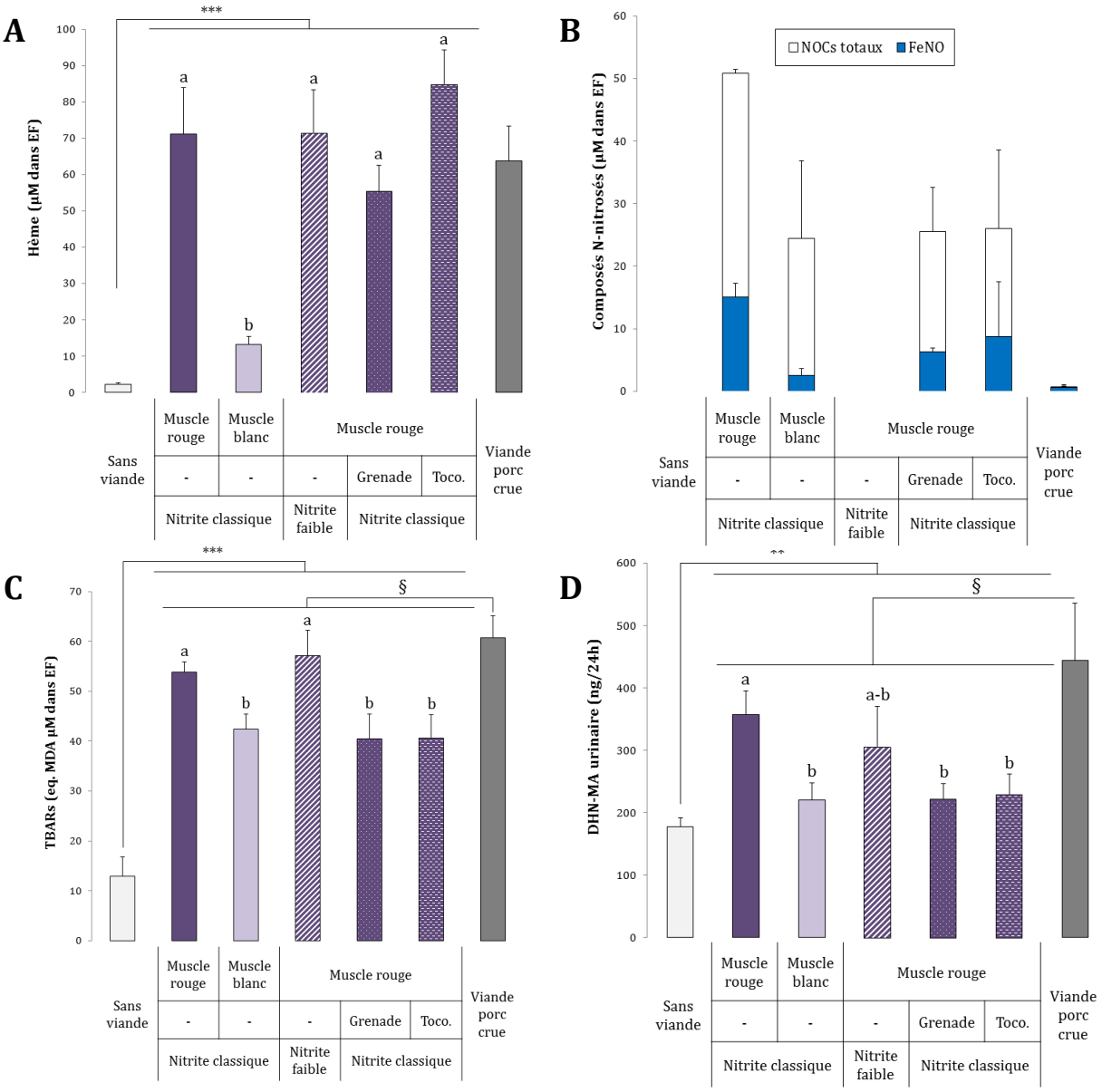

Figure 33 : Teneur en hème fécal **(A)**, en composés *N*-nitrosés fécaux **(B)**, en TBARs fécaux **(C)** et en DHN-MA urinaire **(D)** retrouvés chez les rats chimio-induits nourris avec les régimes expérimentaux à base de charcuteries pendant 100 jours

* : effet charcuterie significatif ; *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001
§ : effet procédé de fabrication significatif ; §p<0,05 §§p<0,01 §§§p<0,001
Lettre : différence entre les charcuteries ; des lettres différentes indiquent des groupes signgificativement différents

Les rats ayant consommé la viande de porc non transformée avaient la même quantité d'hème et de composés *N*-nitrosés fécaux que les rats ayant consommé les charcuteries (p=0 ,9 et p=0,1 respectivement). Ils avaient cependant significativement plus de TBARs fécaux (60,6 ± 13,4 vs

48,2 ± 13,9 µM respectivement ; p=0,014) et plus de DHN-MA urinaire (444,0 ± 274,5 vs 286,3 ± 155,3 ng/24h respectivement ; p=0,013).

La diminution de la teneur en hème de la charcuterie (muscle blanc à la place du muscle rouge) a permis de diminuer les teneurs en hème (p=0,001), TBARs (p=0,012) fécaux et en DHN-MA urinaire (p=0,017). L'ajout de grenade et de tocophérol à la charcuterie a permis de diminuer significativement les TBARs fécaux (p=0,006 et p=0,007 respectivement) et le DHN-MA urinaire (p=0,023 et p=0,025 respectivement). La diminution de la teneur en nitrites de la charcuterie n'a pas permis de moduler significativement les biomarqueurs. Enfin, il n'y a pas eu de différence significative des composés *N*-nitrosés fécaux entre les groupes ayant consommé des charcuteries (p=0,4).

✓ *Cytotoxicité des eaux fécales*

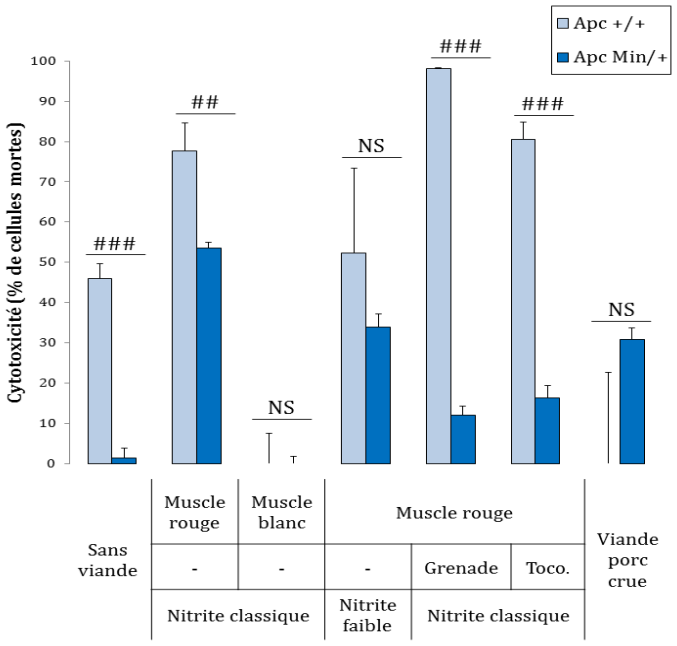

Figure 34 : Cytotoxicité des eaux fécales des rats nourris avec les régimes expérimentaux à base de charcuteries pendant 100 jours sur la lignée cellulaire normale $Apc^{+/+}$ et la lignée précancéreuse $Apc^{Min/+}$

T-test : # p<0,05 ## p<0,01 ### p<0,001

Pour la cytotoxicité des eaux fécales, nous nous sommes intéressés principalement au différentiel entre les deux lignées puisque d'après notre hypothèse, l'hème induirait la sélection des cellules précancéreuses en étant plus cytotoxique pour les cellules normales **(Pierre *et al.* 2007)**.

Nous avons observé **[Figure 34]** que les eaux fécales du groupe ayant consommé la charcuterie issue d'un muscle blanc, à la dilution au 10ème, n'étaient pas cytotoxiques pour les lignées cellulaires normale $Apc^{+/+}$ et précancéreuse $Apc^{Min/+}$. Nous avons observé une absence de différentiel sur les eaux fécales des rats ayant consommé la charcuterie diminuée en nitrites (p=0,4) et la viande de porc crue non transformée (p=0,2). Pour tous les autres groupes les eaux fécales des rats étaient significativement plus cytotoxiques pour la lignée cellulaire normale $Apc^{+/+}$ que pour la lignée cellulaire précancéreuse $Apc^{Min/+}$.

Lignée cellulaire $Apc^{+/+}$ (barres claires **Figure 34**) : les rats ayant consommé les charcuteries n'avaient pas des eaux fécales significativement plus cytotoxiques que les rats ayant consommé le régime témoin sans charcuterie (p=0,3) mais avaient des eaux fécales significativement plus cytotoxiques que les rats ayant consommé la viande de porc crue non transformée (0,0 ± 55,6 vs 58,6 ± 47,3 % respectivement ; p=0,012). Les eaux fécales des rats ayant consommé la charcuterie pauvre en hème étaient significativement moins cytotoxiques que les eaux fécales de tous les autres groupes ayant consommé des charcuteries (0,0 ± 18,6 vs 77,1 ± 30,9 % respectivement ; tous p<0,0001).

Lignée cellulaire $Apc^{Min/+}$ (barre foncées **Figure 34**) : les rats ayant consommé les charcuteries avaient des eaux fécales significativement plus cytotoxiques que les rats ayant consommé le régime témoin sans charcuterie (21,8 ± 21,6 vs 1,3 ± 6,3 % respectivement ; p=0,019) mais non différentes des eaux fécales des rats ayant consommé la viande de porc crue non transformée (p=0,4). Enfin, les eaux fécales des rats ayant consommé la charcuterie témoin (riche en hème) avaient des eaux fécales significativement plus cytotoxiques que les rats ayant consommé les autres charcuteries (53,5 ± 3,7 vs 13,8 ± 16,1 % respectivement ; tous p<0,0001).

3) Conclusion

Dans ce modèle de rat chimio–induit, la consommation de charcuteries, comparée à la consommation d'un régime témoin sans charcuterie, n'a pas permis d'augmenter significativement le nombre ou la taille des MDF. Nous avons cependant observé une augmentation de l'hème fécal et des produits de lipoperoxydation fécaux (TBARs) et urinaire (DHN-MA) sans modulation significative des composés *N*-nitrosés fécaux.

Les rats ayant consommé la viande de porc crue non transformée avaient autant de MDF, d'hème fécal et de composés *N*-nitrosés fécaux mais significativement plus de TBARs et de DHN-MA que les rats ayant consommé les charcuteries.

Enfin, nous n'avons pas observé de différence significative de nombre ou de taille de MDF entre les rats ayant consommé les différentes charcuteries. Les rats ayant consommé la charcuterie pauvre en hème avaient cependant moins d'hème fécal, de TBARs fécaux et de DHN-MA urinaire et des eaux fécales moins cytotoxiques que les rats ayant consommé la charcuterie témoin. Les rats ayant consommé la charcuterie témoin diminuée en nitrites n'avaient pas de composés *N*-nitrosés fécaux et avaient autant d'hème, de TBARs et de DHN-MA que les rats ayant consommé la charcuterie témoin. Les rats ayant consommé les charcuteries enrichies en tocophérol et en grenade avaient significativement moins de produits de lipoperoxydation fécaux et urinaires et des eaux fécales moins cytotoxiques sur la lignée cellulaire $Apc^{Min/+}$. Nous n'avons pas observé de modulation des composés *N*-nitrosés fécaux entre les groupes.

III. Etude de cancérogenèse chez la souris *Min* : stade tumoral

1) Protocole

a. Expérimentation animale

115 souris C57Bl6 *Apc* Min/+ mâles et femelles (provenance Jackson) âgées de 5 à 8 semaines ont été réparties dans 26 cages à litière (maximum 5 souris/cage d'un même régime, d'un même sexe et d'un âge proche) dans une animalerie climatisée (22°C), avec un cycle jour/nuit de 12 h.

✓ *Régimes expérimentaux*

A leur arrivée, les souris ont été réparties en 5 groupes correspondant à un régime témoin et à 4 régimes à base de charcuteries **[Tableau 21]**. En raison du coût élevé de la souris et de la nécessité d'en mettre plus par groupe, nous n'avons pas pu tester tous les régimes présents dans l'expérimentation rats. Nous avons décidé d'éliminer la viande de porc crue et la charcuterie avec une teneur faible en nitrites.

Régime expérimental	Nombre de souris	Nombre de cages
Régime témoin (AIN76 modifiée)	25	6
Charcuterie témoin : muscle rouge (riche en hème)	36	8
Muscle blanc	18	4
Muscle rouge, enrichie en grenade	18	4
Muscle rouge, enrichie en tocophérol	18	4

Tableau 21 : Charcuteries modèles distribuées aux souris *Min* pendant 45 jours

Les régimes expérimentaux ont été distribués quotidiennement pendant 45 jours et étaient composés de 60% de base type AIN76 additionnée de 5% d'huile de carthame et de 40 % de charcuterie correspondant au groupe expérimental mixée et mélangée à la poudre. Les souris du régime témoin ont reçu uniquement la base type AIN76 additionnée d'huile de carthame.

✓ *Données zootechniques*

La morbidité et la mortalité des animaux ont été surveillées chaque jour. La croissance des animaux a été mesurée par des pesées régulières (J0, J7, J16, J32 et J45). La consommation des animaux n'a malheureusement pas pu être évaluée car le type de cage (litière) ne le permettait pas.

Les fèces (J28-32 et J37-39) et les urines (J44) ont été récoltées afin de pouvoir analyser les biomarqueurs associés à la cancérogenèse.

b. Paramètres suivis *(pour le détail des méthodes cf Annexe 2 p188)*

La promotion de la cancérogenèse colorectale a été suivie en dénombrant le nombre et la surface des tumeurs intestinales présentes chez les souris. Dans un second temps, nous avons également analysé le nombre et l'incidence des tumeurs coliques. Dans ce modèle, les tumeurs coliques sont très peu nombreuses et donc passent en second plan.

La peroxydation lipidique a été évaluée par le dosage des TBARs fécaux et par le DHN-MA urinaire. La teneur en composés *N*-nitrosés des eaux fécales a été évaluée. De plus, le contenu en hème des eaux fécales a été mesuré. Enfin la cytotoxicité des eaux fécales a été évaluée sur des cellules murines précancéreuses ($Apc^{Min/+}$). Les biomarqueurs ont été dosés pour chaque cage sauf pour la cytotoxicité qui a été évaluée sur des pools par sexe et par groupe.

c. Statistiques

Les données ont été analysées par des analyses de variance (ANOVA). Après avoir vérifié **l'effet charcuterie** (tous les groupes charcuteries vs le groupe témoin), nous avons comparé les **groupes charcuteries** entre eux (sans le groupe témoin). Si une différence significative a été trouvée entre les différents groupes ($p<0,05$) un test de Tuckey a été effectué.

Les données de mortalité et d'incidence tumorale colique ont été analysées par des tableaux de contingence (Chi-2). Les données de croissance et de consommation ont été analysées par des ANOVA prenant en compte tous les groupes (Témoin et toutes les charcuteries).

2) Résultats

a. Données zootechniques

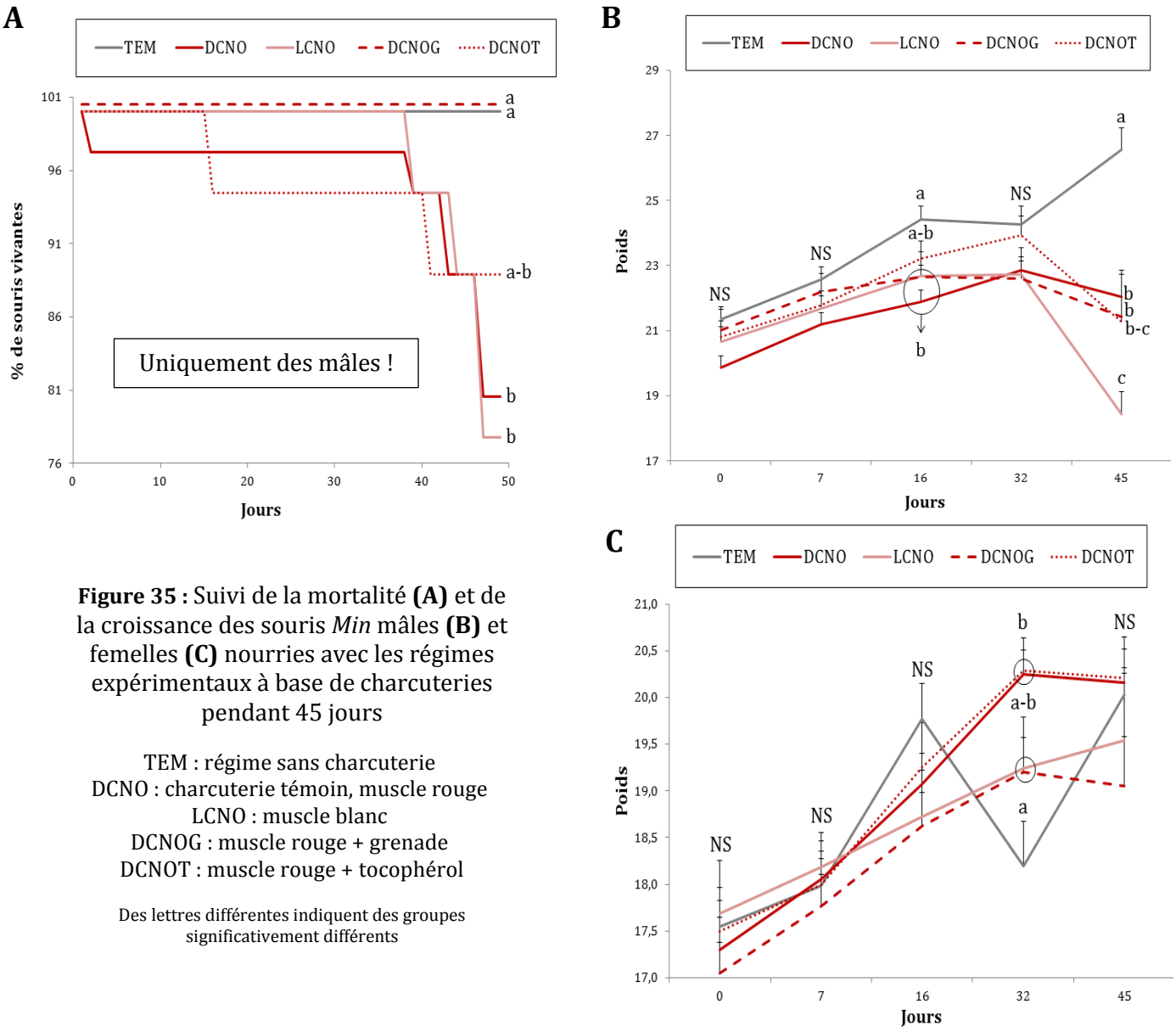

Figure 35 : Suivi de la mortalité **(A)** et de la croissance des souris *Min* mâles **(B)** et femelles **(C)** nourries avec les régimes expérimentaux à base de charcuteries pendant 45 jours

TEM : régime sans charcuterie
DCNO : charcuterie témoin, muscle rouge
LCNO : muscle blanc
DCNOG : muscle rouge + grenade
DCNOT : muscle rouge + tocophérol

Des lettres différentes indiquent des groupes significativement différents

Comparé au groupe témoin sans charcuterie (TEM), nous avons observé une mortalité significativement plus importante chez les souris ayant consommé la charcuterie riche en hème (muscle rouge, DCNO ; p=0,04, 7 souris mortes/36) et les souris ayant consommé la charcuterie pauvre en hème (muscle blanc, LCNO ; p=0,03, 4 souris mortes/18). Aucune mortalité n'a été observée dans le groupe ayant consommé la charcuterie riche en hème enrichie en grenade (DCNOG p=0,008 comparé à la charcuterie riche en hème non enrichie DCNO) **[Figure 35, A]**. La mortalité n'a concerné que des souris mâles.

Concernant la croissance des souris, nous avons observé une interaction significative entre le facteur groupe et le facteur sexe (p<0,0001) nous avons donc du analyser séparément la croissance des mâles et des femelles **[Figure 35, B et C]**.

Souris mâles : Nous n'avons pas observé de différence de poids au début de l'expérimentation (J0), à J7 et à J32. A J16, les souris ayant consommé le régime témoin sans charcuterie pesaient significativement plus lourds (24,4 ± 1,4 g ; TEM) que les souris ayant consommé la charcuterie témoin (21,9 ± 1,6 ; p<0,0001 ; DCNO), la charcuterie pauvre en hème (22,7 ± 1,0 g ; p=0,019 ; LCNO) et la charcuterie enrichie en grenade (22,7 ± 0,8 g ; p=0,017 ; DCNOG). A la fin de l'expérimentation (J44), nous avons observé globalement une chute de poids des souris ayant consommé les régimes composés de charcuteries. Les souris ayant consommé le régime témoin sans charcuterie (26,6 ± 2,3 g ; TEM) pesaient significativement plus lourds que les souris ayant consommés la charcuterie témoin (22,0 ± 2,8 g ; p<0,0001 ; DCNO), la charcuterie pauvre en hème (18,4 ± 2,0 g ; p<0,0001 ; LCNO), la charcuterie enrichie en grenade (21,4 ± 4,1 g ; p<0,0001 ; DCNOG) et la charcuterie enrichie en tocophérol (21,3 ± 4,2 g ; p=0,001 ; DCNOT). La chute de poids la plus importante s'est observée chez le groupe ayant consommé la charcuterie pauvre en hème (LCNO).

Souris femelles : Nous n'avons pas observé de différence de poids au début de l'expérimentation (J0), à J7, J16 et à J44. A J32, nous avons une chute de poids des souris du régime témoin sans charcuterie. Les souris ayant consommé le régime témoin (18,2 ± 1,7 g ; TEM) étaient significativement moins lourds que les souris ayant consommé la charcuterie témoin riche en hème (20,2 ± 1,1 g ; p<0,0001 ; DCNO) et la charcuterie enrichie en tocophérol (20,3 ± 0,3 g ; p=0,001 ; DCNOT). Nous pensons que cette chute de poids est due au fait que nous avons placé un grillage dans la cage afin de faciliter la récolte de fèces et que les souris ont fait tomber la poudre de leur aliment en dessous du grillage et n'y ont donc pas eu accès. Nous n'observons cependant pas cette chute de poids chez les souris mâles mais une stagnation du poids.

b. Suivi de la cancérogenèse

✓ *Nombre de tumeurs intestinales et surface tumorale*

Les résultats de la cancérogenèse intestinale sont présentés en **Figure 36**.

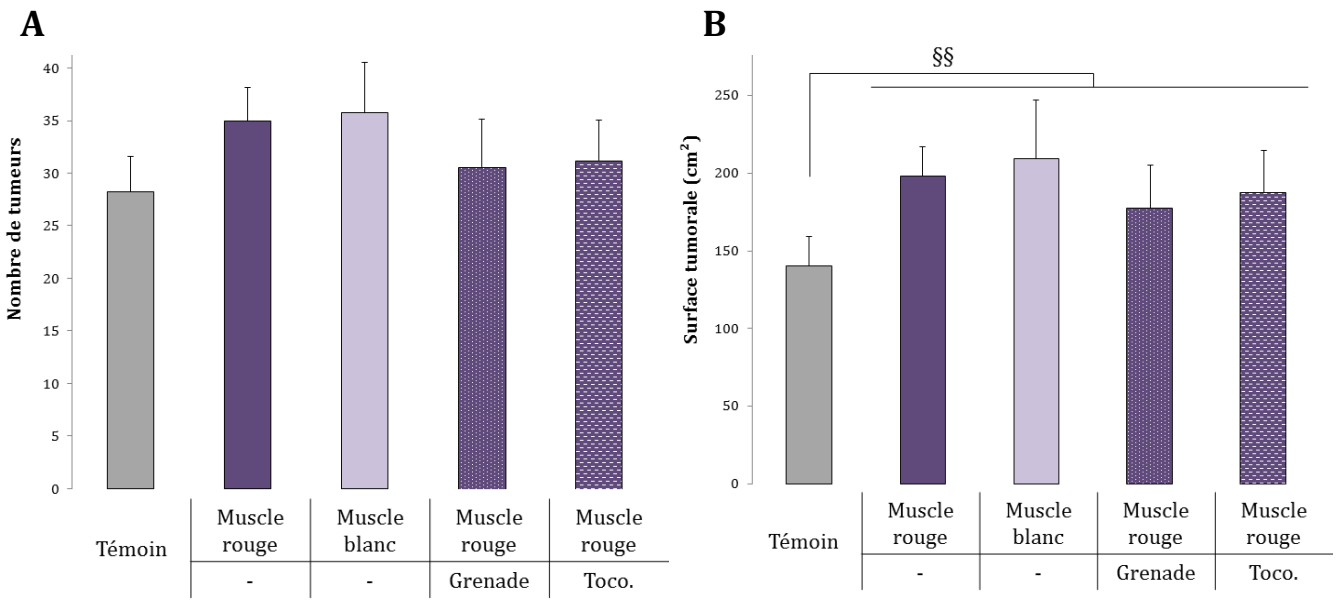

Figure 36 : Nombre de tumeurs intestinales **(A)** et surface tumorale **(B)** des souris *Min* nourries avec les régimes expérimentaux à base de charcuteries pendant 45 jours

§ : facteur charcuterie significatif ; § p<0,05 §§ p<0,01 §§§ p<0,001

Les souris ayant consommé les charcuteries avaient une surface tumorale significativement plus importante que les souris n'ayant pas consommé de charcuterie (194,4 ± 116,9 vs 140,1 ± 93,9 cm^2 respectivement ; p=0,005) sans différence significative entre les groupes (p=0,8). Cette différence est due au fait que les souris ayant consommé les charcuteries avaient significativement plus de moyennes (p=0,025) et de grosses (p=0,007) tumeurs.

Nous n'avons pas observé de différence significative entre les groupes ayant consommé les charcuteries que ce soit sur le nombre de tumeurs (p=0,6) ou sur la surface tumorale (p=0,7).

Les souris femelles ayant consommé des charcuteries avaient significativement plus de tumeurs intestinales que les souris mâles (36,8 ± 20,0 vs 29,3 ± 14,3 tumeurs ; p=0,03) et notamment plus de petites tumeurs (p=0,01) sans changement de la surface tumorale (p=0,4).

✓ *Nombre et incidence tumorale colique*

NB : Dans ce modèle animal, les tumeurs coliques sont peu nombreuses, c'est pourquoi cette analyse est un end-point secondaire.

Nous n'avons pas observé d'effet charcuterie significatif sur le nombre ou l'incidence des tumeurs coliques **[Figure 37]**.

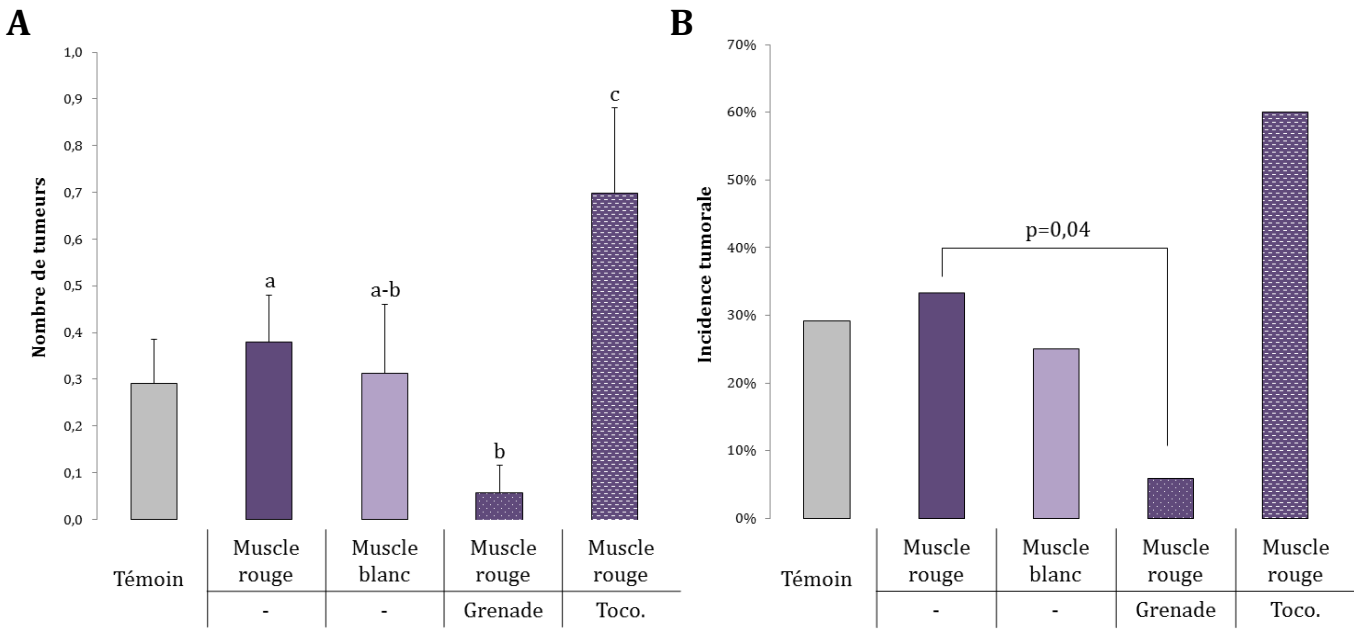

Figure 37 : Nombre **(A)** et incidence **(B)** tumorale colique des souris *Min* nourries avec les régimes expérimentaux à base de charcuteries pendant 45 jours

Des lettres différentes indiquent des groupes significativement différents
Nombre de tumeurs analysé par analyse de variance ; Incidence analysée par des tests de Chi-2

Les souris ayant consommé la charcuterie riche en hème enrichie en grenade avaient significativement moins de tumeurs coliques (0,06 ± 0,24 vs 0,38 ± 0,58 tumeurs respectivement ; p=0,003) et une incidence tumorale plus faible (5,9 vs 33,3 % respectivement ; p=0,04) que les souris ayant consommé la charcuterie témoin.

Les souris ayant consommé la charcuterie riche en hème enrichie en tocophérol avaient significativement plus de tumeurs coliques (0,70 ± 0,18 vs 0,38 ± 0,58 tumeurs respectivement ; p=0,02) que les souris ayant consommé la charcuterie témoin sans effet sur l'incidence tumorale (p=0,12).

Nous observons une augmentation marginale (p=0.093) du nombre de tumeurs coliques chez les mâles comparés aux femelles.

c. Suivi des biomarqueurs fécaux et urinaires

✓ *Hème, composés N-nitrosés et produits de lipoperoxydation*

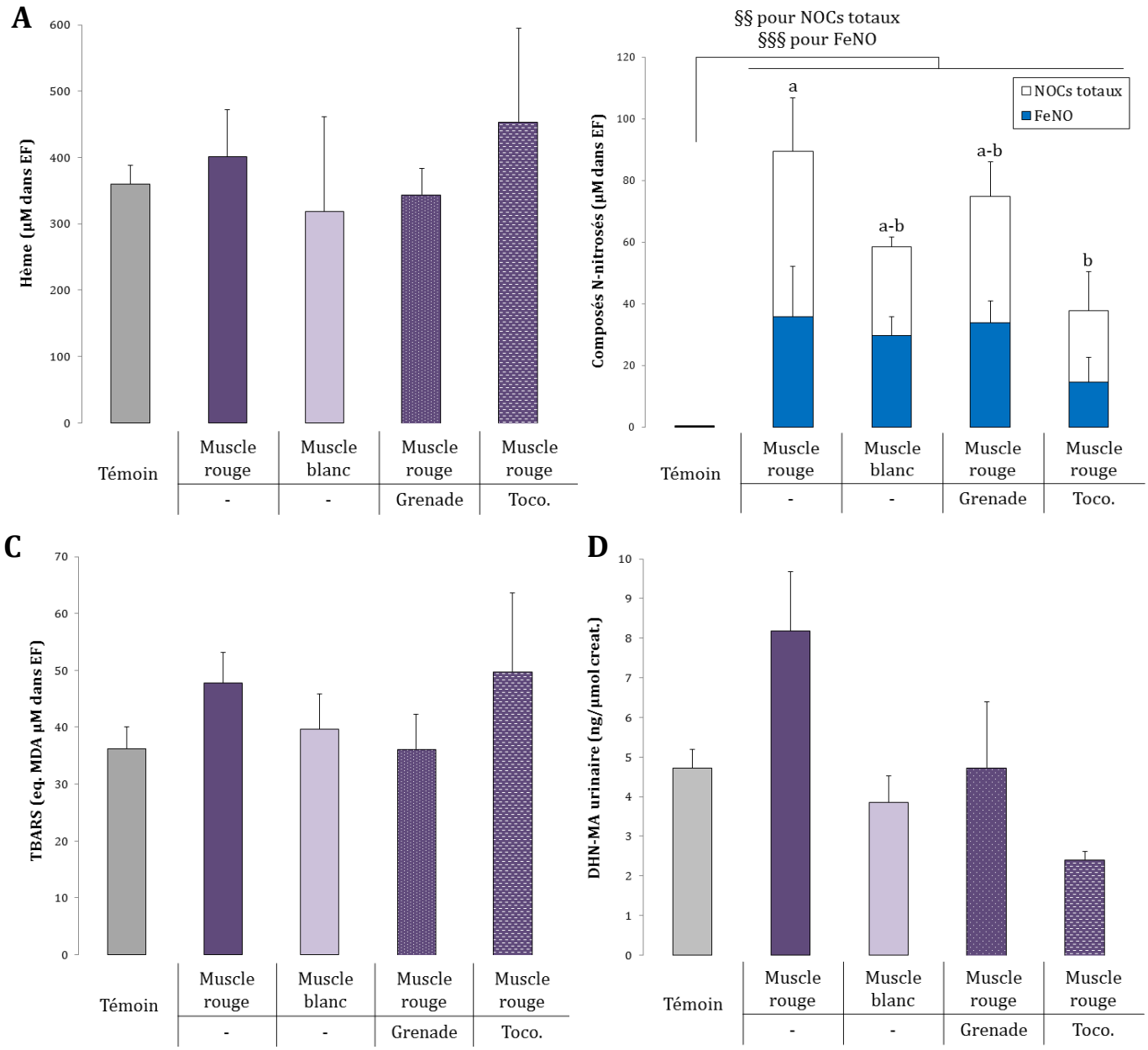

Figure 38 : Teneur en hème fécal **(A)**, en composés *N*-nitrosés fécaux **(B)**, en TBARs fécaux **(C)** et en DHN-MA urinaire **(D)** des eaux fécales des souris *Min* nourries avec les régimes expérimentaux à base de charcuteries pendant 45 jours

§ : facteur charcuterie significatif ; § p<0,05 §§ p<0,01 §§§ p<0,001
Des lettres différentes indiquent des groupes significativement différents

De manière inattendue, nous n'avons pas observé d'augmentation de l'hème, des TBARs fécaux ou du DHN-MA urinaire (p=0,8) pour les souris ayant consommé des charcuteries comparées aux souris n'en ayant pas consommé (p=0,7 et p=0,3 respectivement). De même, nous

n'observons pas de différence significative entre les groupes pour ces trois biomarqueurs (p=0,7, p=0,5 et p=0,1 respectivement).

Les souris ayant consommé des charcuteries avaient cependant plus de composés *N*-nitrosés totaux (61,0 ± 45,6 vs 0,2 ± 0,5 µM respectivement ; p=0,001) et plus de FeNO (26,5 ± 22,7 vs 0,2 ± 0,5 µM respectivement ; p=0,009) dans leurs eaux fécales que les souris n'en ayant pas consommé. Les rats ayant consommé la charcuterie enrichie en tocophérol avaient significativement moins de composés *N*-nitrosés totaux que les souris ayant consommé la charcuterie témoin (14,6 ± 19,8 vs 36,0 ± 36,4 µM respectivement ; p=0,007). Il n'y avait pas de différence significative entre les groupes charcuteries pour les teneurs en FeNO (p=0,3).

Les souris femelles ayant consommé les charcuteries avaient moins d'hème (p=0,006), de TBARs (p=0,023) et de composés *N*-nitrosés (p=0,001) dans leurs eaux fécales que les souris mâles.

✓ *Cytotoxicité des eaux fécales*

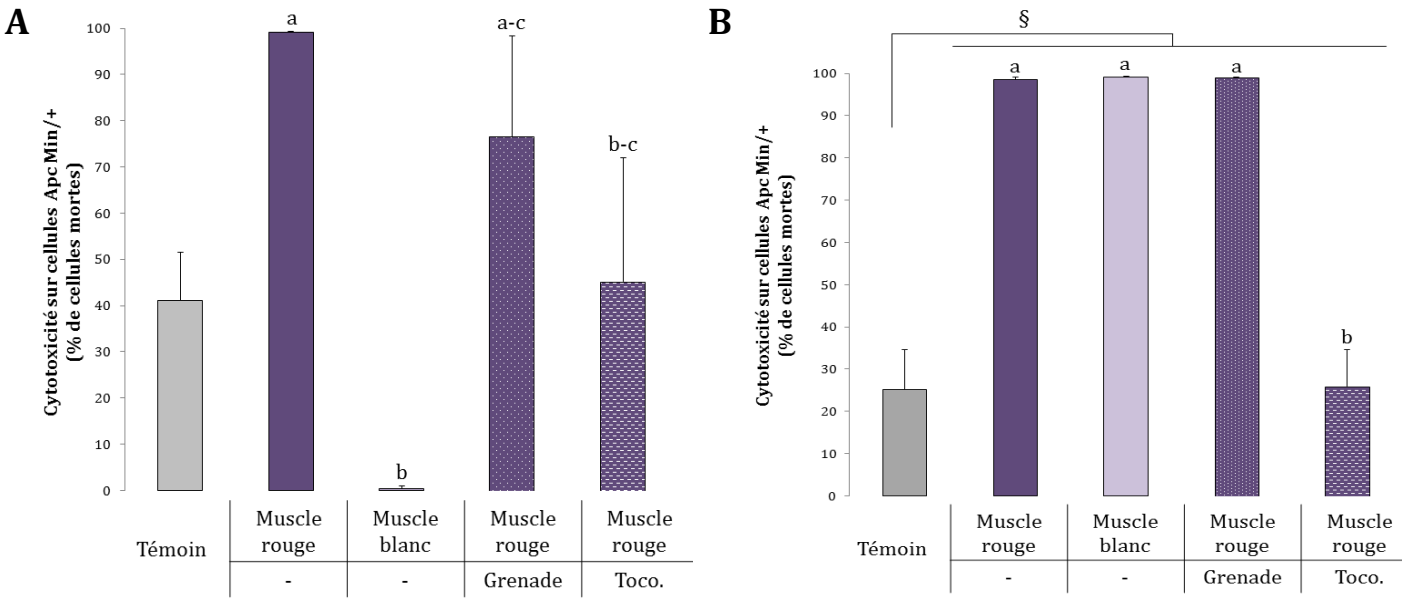

Figure 39 : Cytotoxicité des eaux fécales sur la lignée précancéreuse $Apc^{Min/+}$ pour les mâles **(A)** et pour les femelles **(B)** des souris *Min* nourries avec les régimes expérimentaux à base de charcuteries pendant 45 jours

§ : facteur charcuterie significatif ; § p<0,05 §§ p<0,01 §§§ p<0,001
Des lettres différentes indiquent des groupes significativement différents

L'interaction significative entre le facteur sexe et les facteurs charcuteries et groupe (p<0,0001) nous oblige à analyser séparément les mâles et les femelles. Les femelles avaient des eaux fécales significativement plus cytotoxiques que les mâles (p<0,0001).

Chez les femelles uniquement, les souris ayant consommé les charcuteries ont des eaux fécales plus cytotoxiques que les souris n'en ayant pas consommé (80,7 ± 33,7 vs 25,2 ± 16,5 % de cytotoxicité respectivement ; p=0,018).

Les eaux fécales des souris mâles ayant consommé la charcuterie pauvre en hème étaient significativement moins cytotoxiques que les eaux fécales des souris ayant consommé la charcuterie témoin (0,5 ± 0,8 vs 99,03 ± 0,4 % de cytotoxicité respectivement ; p<0,0001). Cette différence ne s'observe pas chez les femelles (p=0,9).

Les eaux fécales des souris ayant consommé la charcuterie riche en hème enrichie en tocophérol avaient des eaux fécales moins cytotoxiques que les souris ayant consommé la charcuterie témoin pour les deux sexes (p=0,013 pour les mâles 99,0 ± 0,4 vs 45,3 ± 46,4 % de cytotoxicité respectivement et p<0,0001 pour les femelles 25,9 ±15,0 vs 98,6 ± 0,7 % de cytotoxicité respectivement).

3) Conclusions

Les souris ayant consommé les charcuteries avaient des tumeurs intestinales significativement plus grosses, plus de composés *N*-nitrosés fécaux et notamment plus de FeNO que les souris ayant consommé le régime témoin sans charcuterie. Nous n'avons pas observé de différence des teneurs en hème fécal ou en produits de lipoperoxydation fécaux et urinaires entre les souris ayant consommé les charcuteries et les souris ayant consommé le régime témoin sans charcuterie. Les souris ayant consommé les charcuteries témoin et pauvre en hème avaient une mortalité significativement plus importante que les souris ayant consommé le régime témoin sans charcuterie. Cette mortalité n'a concerné que les souris mâles.

Les souris ayant consommé la charcuterie enrichie en grenade ont été protégées de la mortalité et avaient significativement moins de tumeurs coliques que les souris ayant consommé la charcuterie témoin.

Les souris ayant consommé la charcuterie enrichie en tocophérol avaient significativement plus de tumeurs coliques mais moins de composés *N*-nitrosés fécaux et des eaux fécales moins cytotoxiques que les souris ayant consommé la charcuterie témoin.

Outre les différences sur la mortalité, les souris femelles avaient significativement plus de tumeurs et des eaux fécales plus cytotoxiques que les souris mâles mais moins d'hème, de TBARs et de composés *N*-nitrosés fécaux.

CONCLUSION GENERALE ET DISCUSSION

Les objectifs de cette étude étaient doubles :

- ✓ Vérifier expérimentalement l'effet promoteur des viandes rouges et des charcuteries, observé par les études épidémiologiques, dans des deux modèles de cancérogenèse : le rat chimio-induit et la souris *Min*.
- ✓ Mettre en évidence de nouvelles méthodes de production industrielle qui permettent d'aboutir à des produits alimentaires plus sains vis-à-vis du risque de cancérogenèse colorectale.

I. Partie Viande rouge

1) Preuve expérimentale et mécanismes de l'effet promoteur de la viande rouge

Cette étude est la première à montrer expérimentalement l'effet promoteur de la viande de bœuf fraîche au stade des lésions précancéreuses du rat chimio-induit et au stade tumoral de la souris *Min*. Ces résultats viennent confirmer les travaux précédents de l'équipe montrant un effet promoteur des lésions précancéreuses ou des tumeurs de l'hémoglobine ou de la viande de bœuf lyophilisée **(Pierre *et al.* 2003,2004,2008 ; Bastide *et al.* 2014)**. Nous pouvons cependant remarquer que, dans cette étude utilisant de la viande fraiche, l'effet promoteur du bœuf chez le rat a été observé sur la **taille** des lésions précancéreuses et non sur leur **nombre** contrairement aux expériences précédentes.

La promotion de la cancérogenèse est associée dans nos deux modèles à une augmentation de l'hème et des produits de lipoperoxydation fécaux. La promotion est également associée à une augmentation du biomarqueur de lipoperoxydation urinaire (DHN-MA) dans le modèle rat mais pas dans le modèle souris. Ces résultats confirment que l'effet promoteur de la consommation de viande de bœuf passe par l'oxydation des lipides alimentaires **(Sawa *et al.* 1998 ; Pierre *et al.* 2004,2006)**.

2) Prévention de l'effet promoteur par la marinade de la viande

L'utilisation de viande marinée dans des études de cancérogenèse, dans un but de prévention, est innovante puisqu'aucun article n'est identifié sur ce sujet. Dans la littérature, la marinade de la viande de bœuf s'utilise pour diminuer le risque microbiologique en ayant des actions anti-listeria ou anti-salmonelle par exemple **(Rhoades *et al.* 2013)**, pour rendre la viande plus tendre

(Burke and Monahan 2003 ; Kim *et al.* 2013b) ou pour diminuer les amines hétérocycliques formées lors de la cuisson de la viande **(Melo *et al.* 2008 ; Smith *et al.* 2008)**. Dans les études long-terme du projet nous avons testé l'effet de la marinade raisin-olive. Cette marinade, à base d'eau, est cohérente avec les pratiques couramment utilisées par les industriels et a un fort pouvoir antioxydant comme démontré par le test au DPPH. Elle s'est révélée efficace pour diminuer le nombre de lésions précancéreuses, la teneur fécale en hème et les biomarqueurs de lipoperoxydation chez le rat. Chez la souris *Min*, malgré une diminution des TBARs et de la cytotoxicité des eaux fécales, nous n'avons pas observé de diminution du nombre ou de la taille des tumeurs. De plus, comme signalé au début de la discussion, l'effet promoteur de la viande de bœuf s'est observé sur la **taille** des lésions précancéreuses du rat chimio-induit alors que l'effet de la marinade s'est observé sur le **nombre** de lésions précancéreuses. Classiquement, le pouvoir initiateur d'une molécule s'observe sur le nombre de lésions tandis que la promotion s'observe sur la taille des lésions **(McLellan and Bird 1988; McLellan *et al.* 1991)**. Nous avons donc bien validé l'effet promoteur de la viande sur la taille des MDF mais il est difficile de comprendre comment la marinade a permis de diminuer le nombre et donc, comme interprété classiquement, l'initiation. Nous pouvons émettre l'hypothèse que la marinade a permis aux lésions précancéreuses déjà présentes de ne pas grossir, ce qui les a rendu difficilement dénombrables. En conclusion, même si la marinade apportée par la viande diminue la promotion du cancer colorectal, ces différences ne nous permettent pas, malheureusement, de conclure que la marinade apporte un effet protecteur sur la promotion induite spécifiquement par la consommation de viande de bœuf.

3) Effet de la cuisson de la viande

Nous nous sommes également intéressés à l'impact de la cuisson sur la cancérogenèse colorectale hème-induite. Nous avons testé la cuisson « bleue » et « bien cuite » chez le rat chimio-induit et uniquement la cuisson « bleue » chez la souris *Min*. Contrairement à ce que nous pouvions attendre, chez le rat chimio-induit, l'effet global de la cuisson est de diminuer le nombre de lésions précancéreuses sans différence entre la viande « crue » et la viande « bleue ». Cet effet est associé à une diminution globale de la teneur en hème dans les eaux fécales. Chez la souris *Min*, nous avons observé une augmentation du nombre et de la taille des tumeurs entre la viande « crue » et la viande « bleue » sans modulation significatives des biomarqueurs fécaux et urinaires.

Afin d'écarter l'hypothèse de formation de composés délétères pendant la cuisson, la plateforme AXIOM de ToxAlim a dosé les amines hétérocycliques (AHC) présentes dans les viandes. A partir

d'extraits lyophilisés, treize AHC ont été caractérisées et quantifiées par UHPLC-APCI-MS/MS. Parmi les 13 AHC dosées, 8 n'ont été retrouvées que sous forme de traces (IQ, MeIQ, Glup1, Glup2, Trpp1, Trpp2, AαC, MeAαC) et 5 ont pu être dosées (MeIQx, IQx, DiMeIQx, PhIp, DMIP). Comme attendu, les AHC n'étaient pas détectables dans les viandes crues. En ce qui concerne la cuisson, nous avons observé que les viandes « bien cuites » (cuite à 75°C à cœur) avaient plus de MeIQx, IQx et DiMeIQx que les viandes « bleues » (cuite à 50°C à cœur). A l'inverse, les viandes « bien cuites » avaient moins de PhIP que les viandes « bleues ». La marinade a permis de diminuer les taux de MeIQx, DiMeIQx, PhIP et DMIP mais a augmenté l'IQx. Les valeurs mesurées sont en dessous des valeurs retrouvées pour des steaks grillé dans les mêmes gammes de température **(Sinha *et al.* 1998)** et sont également inférieures aux doses utilisées dans la littérature pour promouvoir la cancérogenèse intestinale de souris mutées pour *Apc* **(Andreassen *et al.* 2006 ; Svendsen *et al.* 2012)**. Prenons l'exemple du PhIP, qui est l'amine hétérocyclique que nous avons retrouvé en plus grande quantité dans la viande « bleue » et non marinée, cette viande étant promotrice de la cancérogenèse intestinale dans notre étude chez la souris *Min*. Dans les études chez les souris mutées pour *Apc*, la dose couramment utilisée pour induire la promotion de la cancérogenèse intestinale est de 50 mg/kg de poids corporel. D'après les analyses de la plateforme AXIOM, la viande « bleue » et non marinée contenait 1,88 ng de PhIP par g de viande. En prenant en compte le ratio viande/poudre et la quantité de régime distribuée, nous pouvons estimer que les souris ont consommé environ 10 ng de PhIP par jour. En prenant le poids moyen d'une souris à 20 g (poids du début de l'étude) et la durée de l'expérimentation nutritionnelle (45 jours), nous pouvons estimer que les souris ont consommé, durant toute l'étude, environ 18 mg de PhIP par kg de poids corporel soit environ 3 fois moins que la dose promotrice sans l'étude d'Andreassen *et al.* ou de Svendsen *et al*. **(Andreassen *et al.* 2006 ; Svendsen *et al.* 2012)**. Par ailleurs, nos viandes n'ayant pas été cuites au contact direct d'une flamme, elles ne devraient pas contenir d'hydrocarbures polycycliques aromatiques (HAP) **(Phillips 1999)**. Ainsi, la formation d'AHC et d'HAP ne semble pas expliquer l'effet promoteur de la cuisson observé chez la souris *Min*.

L'**augmentation** du nombre et de la taille des tumeurs intestinales de la **souris *Min*** est significativement corrélée à la quantité d'hème dans les eaux fécales (r=0,5 ; p=0,02 pour les deux corrélations). Chez le **rat chimio-induit**, les corrélations entre les lésions précancéreuses et l'hème fécal ne sont pas significatives. Nous pouvons cependant remarquer que, contrairement à ce que nous avons observé chez la souris *Min*, la cuisson entraine une **diminution** significative du nombre de lésions précancéreuses associée à une diminution significative du contenu en hème dans l'eau fécal. Ainsi, la promotion de la cancérogenèse

semble être associée, dans nos deux modèles, au contenu luminal en hème. Les différences de résultats entre la souris *Min* et le rat chimio-induit suggèrent une différence de biodisponibilité de l'hème selon le modèle animal.
Malheureusement, ces différences de résultat entre les deux modèles ne nous permettent pas de conclure quant à l'effet de la cuisson sur la cancérogenèse induite par la consommation de viande bovine.

En conclusion, pour la partie viande rouge, ce projet a permis :

- De valider expérimentalement l'effet promoteur de la viande bovine dans deux modèles de cancérogenèse colorectale
- De valider un effet protecteur de la marinade raisin-olive sur la promotion du nombre de lésions précancéreuses de type MDF
- De valider qu'une marinade raisin-olive permet de diminuer la lipoperoxydation induite par la consommation de viande bovine dans les deux modèles.

II. Partie Charcuterie

1) Preuve expérimentale et mécanismes de l'effet promoteur de la charcuterie

Cette étude est la première à montrer un effet promoteur de la consommation de charcuterie au stade tumoral. Malheureusement, nous n'avons pas confirmé l'effet promoteur des charcuteries au stade des lésions précancéreuses contrairement à nos précédents résultats **(Santarelli *et al.* 2010 ; Pierre *et al.* 2013)**.

La promotion de la surface tumorale de la souris *Min* est associée à une augmentation significative des composés *N*-nitrosés fécaux et notamment à une augmentation significative du fer nitrosylé (FeNO) mais à une absence de modulation des biomarqueurs de lipoperoxydation. Chez le rat, l'absence d'effet promoteur est associée à une absence de modulation significative des composés *N*-nitrosés fécaux malgré une augmentation des produits de lipoperoxydation fécaux. Ainsi, la catalyse de formation de composés *N*-nitrosés par l'hème semble être la voie principale pour expliquer la promotion induite par la consommation de charcuteries. Ce résultat confirme les résultats obtenus récemment par l'équipe **(Pierre *et al.* 2013)** où nous avions observé que l'inhibition de la lipoperoxydation seule ne suffisait pas à inhiber l'effet promoteur de la

charcuterie tandis que l'inhibition de la lipoperoxydation et de la nitrosation, par un agent chélateur de l'hème, comme le calcium, est efficace.

Plusieurs hypothèses peuvent être émises concernant l'absence d'effet promoteur des charcuteries chez le rat chimio-induit : **(i)** le faible effet promoteur de la charcuterie, **(ii)** un problème dans l'expérimentation ou **(iii)** un problème dans le modèle animal choisit.

i. La consommation de charcuterie a peut-être un **effet promoteur trop faible** pour être significatif dans toutes les expérimentations

C'est effectivement le cas si on regarde certaines étude de cohorte **(Ferrucci *et al.* 2012)** ou de cas-témoins **(Ferrucci *et al.* 2009)** pour lesquels les risques relatifs calculés ne sont pas significatifs. Cependant, la dernière méta-analyse sur la consommation de charcuterie et le nombre d'adénomes colorectaux, qui regroupait 10 études prospectives et de cas-témoin, donne un risque relatif de 1,29 [IC 95% : 1,10-1,53] pour 50 g de charcuterie par jour **(Aune *et al.* 2013)**. Ce risque relatif traduit une augmentation de 29 % du risque d'adénomes colorectaux pour 50 g de consommation par jour. Alexander considère que les conclusions sur les associations données par les méta-analyses peuvent être fausses lorsque le risque relatif est inférieur à 1,20 **(Alexander *et al.* 2011)**. Un risque relatif de 1,29 de la méta-analyse d'Aune *et al.* est donc assez fort pour supporter une réelle association entre consommation de charcuteries et risque de cancer colorectal.

ii. L'**expérimentation** est peut-être à remettre en cause

Dans cette étude nous avons trouvé un nombre très élevé de lésions précancéreuses. Pour le régime témoin sans charcuterie, nous avons obtenu 18,8 ± 9,0 MDF et pour la charcuterie témoin, 13,7 ± 6,5 MDF. L'équipe, dans leur précédent projet ANR **(Santarelli *et al.* 2010)** utilisant la même charcuterie témoin avait obtenu 2,9 ± 1,9 MDF pour le régime témoin sans charcuterie et 4,1 ± 2,9 MDF pour la charcuterie témoin. En moyenne, le nombre de MDF dénombré chez le rat chimio-induit est d'une dizaine **(Caderni *et al.* 2003)**. Ainsi, le nombre de MDF dénombrés dans cette expérimentation est plus important que normalement. Cependant, malgré un nombre également élevé pour la partie viande rouge, nous avons quand même pu observer un effet promoteur de la viande de bœuf sur la taille des lésions précancéreuses. Nous n'avons pour le moment pas d'hypothèse pour expliquer ce taux élevé de lésions précancéreuses retrouvés chez nos rats si ce n'est une forte variabilité entre les expérimentations *in vivo*.

iii. Le **modèle animal** est peut-être à remettre en cause

Le modèle de rat chimio-induit possède des inconvénients notamment une mutation initiatrice principale du gène *K-ras* au lieu du gène *Apc*. De plus, ce modèle nécessite une induction par un cancérigène dont l'homme n'est pas exposé. Cependant, le rat chimio-induit est couramment

utilisé pour étudier l'impact de facteurs alimentaires sur la cancérogenèse colorectale **(Zhao *et al.* 2011 ; Femia *et al.* 2012)**. Grâce à lui, l'équipe PPCA a déjà démontré l'effet promoteur de l'hémine, de l'hémoglobine, de la viande de bœuf lyophilisée, d'une charcuterie modèle, de jambon blanc de type jambon de Paris et de saucisse de type hot-dog **(Pierre *et al.* 2003,2004,2008,2010,2013 ; Santarelli *et al.* 2010)**. De même, grâce à ce modèle nous avons mis en évidence des facteurs de prévention comme le calcium ou les antioxydants **(Pierre *et al.* 2003,2008,2013 ; Santarelli *et al.* 2010,2013)**. Ainsi, ce modèle semble être adapté pour les études de promotion ou de prévention de facteurs alimentaires.

2) Prévention par l'ajout d'antioxydant ou par la diminution de la teneur en hème de la charcuterie

Les deux études de cancérogenèse n'ont malheureusement pas aboutit à la mise en évidence de stratégie de prévention efficace pour limiter l'effet promoteur des charcuteries.

Grâce à ce projet, nous souhaitions confirmer l'effet protecteur de l'ajout d'α-tocophérol à la charcuterie témoin que nous avions observé dans le précédent projet de l'équipe : HemeCancer. Ce projet, construit de manière identique au projet SécuriViande, avait montré que l'ajout d'α-tocophérol à la charcuterie témoin permettait de diminuer les biomarqueurs de lipoperoxydation (TBARs et DHN-MA) dans l'étude court-terme et de diminuer les MDF et les composés *N*-nitrosés dans l'étude de cancérogenèse chez le rat initié **(Pierre *et al.* 2013)**. Dans ce projet, dès l'étude court-terme nous n'avons pas observé d'effet anti-lipoperoxydant ou anti-nitrosant du tocophérol. Dans l'étude chez le rat initié, nous n'avons pas observé de modulation des MDF et des composés *N*-nitrosés mais une diminution des biomarqueurs de lipoperoxydation. Ainsi, les résultats des deux projets concernant l'effet potentiellement protecteur de l'ajout d'α-tocophérol ne vont pas dans le même sens. Dans la littérature, comme dans le projet HemeCancer, l'α-tocophérol est connu pour avoir des propriétés anti-lipoperoxydantes et anti-nitrosantes **(Mirvish 1986 ; Djenane *et al.* 2002 ; Pierre *et al.* 2013)**. Cette différence entre les résultats est peut-être due à une différence dans la fabrication des viandes et charcuteries.

De nombreuses études ont montré l'effet potentiellement bénéfique de la grenade sur la santé. Ainsi l'extrait de grenade pourrait prévenir les cancers (prostate, sein, poumon, colon, peau), les maladies cardio-vasculaires, l'ostéoarthrite, la maladie d'Alzheimer et protéger contre les UVB. Ces effets pourraient être expliqués par les effets antioxydant, anti-inflammatoire et anti-prolifératif de la grenade **(Zarfeshany *et al.* 2014)**. Des études chez le rat initié à l'AOM ont montré que l'huile de pépin permettaient de diminuer l'incidence tumorale **(Kohno *et al.* 2004)**. *In vitro*,

Seeram *et al.* ont montré une inhibition de l'induction et de la prolifération de différentes lignées cellulaires cancéreuses coliques et Adams *et al.* ont montré un effet anti-inflammatoire du jus de grenade sur la lignée HT-29 **(Seeram *et al.* 2005 ; Adams *et al.* 2006)**. Ajouter à la viande, l'extrait de grenade permet de diminuer l'oxydation sans en altérer les qualités organoleptique **(Karre *et al.* 2013)**. De plus, la grenade semble avoir un effet anti-bactérien et anti-viral contre les pathogènes d'origine alimentaire **(Howell and D'Souza 2013)**. Dans cette étude, la grenade utilisée est extraite de la peau et est donc riche en tannins et en flavonoïdes **(Zarfeshany *et al.* 2014).** Ces types de polyphénols sont connus pour inhiber la lipoperoxydation et la nitrosation **(d'Ischia *et al.* 2011)**. Malgré toute la littérature sur l'effet bénéfique de la grenade, nous n'avons pas observé d'effet protecteur de l'ajout de grenade contre la promotion induite par la consommation de charcuterie dans les deux modèles de cancérogenèse. Dans l'étude court-terme, nous avions observé une diminution de l'hème, des biomarqueurs de lipoperoxydation et des composés *N*-nitrosés chez les rats ayant consommé la charcuterie témoin enrichie en grenade. Dans les études de cancérogenèse, malgré l'absence d'effet sur la cancérogenèse dans l'intestin grêle, l'ajout de grenade a permis de diminuer les biomarqueurs de lipoperoxydation chez le rat initié. L'ajout de grenade a également permis de prévenir la mortalité induite par la consommation de charcuterie et l'incidence tumorale colique de la souris *Min* qui reste toutefois un end-point secondaire pour l'évaluation de la cancérogenèse dans ce modèle.

Enfin, nous avons testé la diminution de la teneur en hème de la charcuterie. Cette diminution nous permet de nous rapprocher du jambon blanc classiquement vendu dans le commerce, la charcuterie témoin étant réalisée avec un muscle plus rouge issu de l'épaule et contenant donc plus de fer héminique.

Dans l'étude court-terme, une charcuterie moins riche en hème permettait de diminuer de manière importante, l'hème fécal, les biomarqueurs de lipoperoxydation et les composés *N*-nitrosés fécaux. Chez le rat initié nous avons observé une diminution de l'hème, des produits de lipoperoxydation, de la cytotoxicité des eaux fécales sans modulation de la teneur en composés *N*-nitrosés fécaux. Chez la souris, la diminution de la teneur en hème de la charcuterie n'a pas permis de prévenir la mortalité, ni de diminuer les teneurs en hème, en composés *N*-nitrosés fécaux ou en produits de lipoperoxydation.

Cette stratégie ne s'est pas révélée efficace pour diminuer l'effet promoteur de la charcuterie. Ainsi, même une charcuterie contenant plus de 3 fois moins de fer héminique (3,5 µg/g pour la charcuterie diminuée en hème vs 12 µg/g pour la charcuterie témoin) entraine la promotion de la surface tumorale intestinale des souris *Min*. Précédemment, l'effet promoteur du fer héminique avait été vérifié chez des souris *Min* ayant consommé 2,5 % d'hémoglobine soit 0,09 g

de fer héminique par kg de régime **(Bastide *et al.* 2014)**. La consommation des souris de notre étude étant de 60 % de charcuterie, elles ont consommé 0,0021 g de fer héminique par kg de régime soit plus de 45 moins que dans l'expérimentation de Bastide *et al.*. Cependant, les souris de notre expérimentation avaient plus d'hème fécal (300 µM dans notre expérimentation contre 200 µM dans l'expérimentation de Bastide) et des tumeurs plus grosses (150 mm^2 *vs* 60 mm^2 respectivement). Ces résultats suggèrent que le fer héminique nitrosylé des charcuteries a un effet promoteur plus puissant que le fer héminique libre provenant de l'hémoglobine. Cette différence pourrait expliquer pourquoi, chez l'homme, la consommation de charcuterie est plus fortement associée à la cancérogenèse colorectale que la consommation de viande rouge **(Corpet 2011b)**.

3) Surmortalité observée chez la souris *Min*

Un point intéressant observé chez les souris *Min* ayant consommé de la charcuterie est l'augmentation de la mortalité. Cette mortalité est spécifique : **(i)** des charcuteries, **(ii)** des mâles et enfin **(iii)** du modèle animal.

i. **Des charcuteries** puisque nous n'avons pas observé de mortalité dans les groupes viandes rouges

Au niveau épidémiologique, ce résultat est cohérent avec la dernière méta-analyse sur le sujet **(Larsson and Orsini 2013)** mais aussi avec les résultats obtenus dans l'étude de cohorte européenne sur Cancer et Nutrition **(Rohrmann *et al.* 2013)** qui montrent une augmentation significative de la mortalité lors de la consommation de charcuterie mais pas lors de la consommation de viande rouge fraîche.

ii. **Des mâles** puisque nous n'avons pas observé de mortalité chez les femelles

Nous avons observé de fortes différences entre souris *Min* mâles et femelles : les souris femelles avaient significativement plus de tumeurs intestinales et des eaux fécales plus cytotoxiques mais moins d'hème, de TBARs et de composés *N*-nitrosés que les souris mâles. Ainsi, la mortalité semble indépendante de la cancérogenèse intestinale puisque nous avons dénombré plus de tumeurs chez les femelles. Le fait que les souris *Min* femelles aient plus de tumeurs que les mâles a déjà été décrit dans la littérature **(Cherukuri *et al.* 2014).** Nous n'avons, pour le moment, pas d'explication concernant la surmortalité des mâles. Cependant, nous pouvons trouver quelques éléments de réponse dans la littérature. La mortalité par cancer est associée chez l'homme et chez les rongeurs à de la cachexie, cette pathologie, qui serait associée à une atrophie cardiaque, étant plus associé à l'homme qu'à la femme **(Cosper and Leinwand 2010)**. Effectivement, nous pouvons observer chez nos souris mâles ayant consommé de la charcuterie une chute du poids

corporel à la fin de l'expérimentation. Cette chute de poids ne s'observe pas chez les femelles. De même, dans le cas de mortalité par septicémie, Scotland *et al.* ont observé que les souris mâles étaient plus sensibles que les femelles en raison d'une réponse inflammatoire moins efficace **(Scotland *et al.* 2011)**.

iii. De la souris *Min* puisque nous n'avons pas observé de mortalité chez les rats.

Outre le développement d'adénomes rapide chez cette souris, on observe d'autres caractéristiques pathologiques importantes chez la souris *Min* qui pourraient expliquer une surmortalité telles que la dyslipidémique, la cachexie, de l'inflammation, des dysfonctions de la barrière intestinale et de l'endotoxémie **(Niho *et al.* 2003 ; Puppa *et al.* 2011)**.

Ainsi, ces études ont permis de valider expérimentalement, au stade tumoral, l'effet promoteur de la charcuterie. Malheureusement, les stratégies de prévention testées, par ajout d'antioxydants ou par diminution de la teneur en hème de la charcuterie ne se sont pas avérées efficaces pour inhiber l'effet promoteur des charcuteries. De manière remarquable, nous avons noté une surmortalité chez les souris *Min* mâles ayant consommé des charcuteries non enrichies en antioxydants.

CHAPITRE 2

Le microbiote est-il impliqué dans la lipoperoxydation induite par le fer héminique ?

INTRODUCTION

Le microbiote intestinal représente la plus grande colonie bactérienne de notre corps **(Sommer and Backhed 2013)**. Le colon contient, à lui seul, près de 70 % des bactéries du corps humain **(Whitman *et al.* 1998; Ley *et al.* 2006)**. Des études ont montré que de nombreux facteurs pouvaient modifier le microbiote intestinal **(Sekirov *et al.* 2010)**. Ainsi, les gros consommateurs de viande rouge possèdent un microbiote intestinal altéré **(Maier *et al.* 1974)**. De même, des différences ont été observées entre des patients atteints de cancer colorectal et des individus sains **(Scanlan *et al.* 2008 ; Collins *et al.* 2011)**.

1) Le microbiote intestinal

a. Description et composition

Le microbiote intestinal, composé majoritairement de bactéries anaérobies strictes, est dominé par deux phyla bactérien : les *Firmicutes* et les *Bacteroidetes* **(Gordon and Dubos 1970 ; Savage 1970 ; Harris *et al.* 1976 ; Eckburg *et al.* 2005)**. Le nombre d'espèces bactériennes qui le composent varie selon les études mais il est généralement admis qu'il contient entre 500 et 1000 espèces **(Qin *et al.* 2010)**. Par ailleurs, le microbiote intestinal n'est pas homogène : sa densité et sa composition évolue tout au long du tractus digestif. De 10^1 à 10^3 bactéries par g de contenu dans l'estomac, il évolue de 10^3 à 10^7 bactéries par g de contenu dans l'intestin grêle, composé principalement de *Firmicutes Bacilli* et d'*Actinobacteria*, pour atteindre 10^{11} à 10^{12} bactéries par g de contenu dans le colon, avec majoritairement des *Bacteroidetes*. En plus, de cette hétérogénéité longitudinale, il a été relaté une forte hétérogénéité latitudinale. En effet, le microbiote proche de l'épithélium intestinal est différent de celui du contenu digestif ou des fèces **(Sekirov *et al.* 2010)**. La colonisation massive de l'intestin débute lors de la naissance. Vers un an, le nombre de bactéries intestinales se stabilise et est comparable à celui de jeunes adultes. Cependant, la composition du microbiote évolue continuellement tout au long de la vie **(Sekirov *et al.* 2010)**.

b. Principaux rôles physiologiques

Le microbiote intestinal a deux rôles principaux : il participe à la formation d'éléments nutritifs et il agit comme une protection vis-à-vis d'éventuels pathogènes.

- **Participation à la nutrition**

Des composés alimentaires comme certaines fibres et certains glucides ne sont pas absorbés au niveau de l'intestin grêle, ils peuvent cependant être dégradés par les bactéries composant le microbiote colique. La fermentation des glucides, par les bactéries coliques, permet notamment la synthèse des acides gras à chaines courtes (AGCC) comme le propionate ou le butyrate. Ces AGCC sont une source d'énergie importante pour les colonocytes **(Pryde *et al.* 2002)**. Le microbiote permet également la synthèse de vitamines essentielles comme les vitamines B et K et facilite l'absorption de la vitamine D **(Smith *et al.* 2007 ; Resta 2009)**.

- **Barrière physique écologique**

Le microbiote commensal constitue une ligne de défense importante de la barrière épithéliale intestinale en limitant le développement et l'adhésion des bactéries pathogènes aux cellules épithéliales **(Bernet *et al.* 1993)**. De plus, le microbiote, directement ou indirectement, a la faculté de modifier la production et la qualité du mucus, qui participe lui aussi à l'efficacité de la barrière. Par exemple, les bifidobactéries ou le butyrate peuvent augmenter l'expression de certains gènes comme *muc2* modulant ainsi le profil de la couche de mucus **(Gaudier *et al.* 2009 ; Wrzosek *et al.* 2013)**. Enfin, le microbiote régule également positivement la production de peptides antimicrobiens par les cellules de Paneth ou les entérocytes comme Reg3β and Reg3γ, lesquels se retrouvent piégés dans le mucus, intensifiant son effet de barrière **(Larsson *et al.* 2012)**.

2) Microbiote et cancérogenèse colorectale

Le nombre de preuves reliant microbiote et cancer colorectal augmente de manière croissante. Le microbiote semble jouer un rôle dans l'étiologie du cancer colorectal, *via* des processus impliquant l'inflammation, les dommages à l'ADN, l'apoptose ou encore la production de toxines mutagéniques **(Collins *et al.* 2011 ; Louis *et al.* 2014)**. Les souris *Min*, mutées sur *Apc*, germ-free développent deux fois moins de tumeurs intestinales que des souris *Min* conventionnelles **(Dove *et al.* 1997)**. Chez l'homme, la composition du microbiote est altérée dans les carcinomes coliques de patients. La cancérogenèse colorectale est associée à une augmentation des *Bacteroides spp.*, des *Bifidobacterium spp.* et des *Clostridium spp* **(Scanlan *et al.* 2008 ; Collins *et al.* 2011)**. A l'inverse, le microbiote de personnes ayant un risque faible de cancer colorectal est abondant en bactéries produisant de l'acide lactique comme les *Lactobacillus spp.* et *Eubacterium aerofaciens* **(Moore and Moore 1995)**. Cependant, le lien de causalité entre ces modifications et la cancérogenèse reste encore à établir. En effet, il reste encore à déterminer si les modifications du microbiote

contrôlent la cancérogenèse ou si la cancérogenèse induit une modification de la communauté microbienne résidente **(Sekirov *et al.* 2010)**.

3) Microbiote, consommation de viande rouge et lipoperoxydation

Les habitudes alimentaires peuvent influer la composition du microbiote. Des études récentes sur le métagénome bactérien ont démontré que les bactéries fécales sont séparées en entérotypes, différenciables principalement par leur teneur en *Bacteroides* et *Prevotella* et très fortement associées aux régimes alimentaires. L'enterotype *Bacteroides* est fortement associé à la consommation de protéines animales et d'acides gras saturés suggérant que la consommation de viande est caractéristique de cet entérotype **(Arumugam *et al.* 2011 ; Wu *et al.* 2011)**. Dans le même sens, des études chez l'homme ont montré qu'un régime riche en viande induit une modification du microbiote caractérisée notamment par une augmentation des *Bacteroides* et une diminution des *Firmicutes* **(Maier *et al.* 1974)**. Tout comme la consommation de viande rouge chez l'homme, il a été montré, chez la souris, que la consommation de fer héminique induisait une augmentation des *Bacteroides* et une diminution des *Firmicutes*. Cette modification est probablement due à l'augmentation du ratio $GRAM^-/GRAM^+$ en raison d'une sensibilité des bactéries $GRAM^+$ à l'hème **(IJssennagger *et al.* 2012a)**.

Certaines bactéries du microbiote intestinal peuvent réduire la peroxydation induite par le fer. Ito *et al.* ont montré que la lipoperoxydation de la muqueuse colique était inhibée chez des souris surchargées en fer et nourries avec 0,4% *Bifidobaterium bifidum*, 0,4% *Streptococcus thermophilus* et 2% *Lactobacillus casei* **(Ito *et al.* 2001 ; Ito *et al.* 2003)**. De plus, Lee *et al.* ont montré que *Bifidobaterium animalis* and *Bifidobacterium cholerium* peuvent inhiber la lipoperoxydation dans des liposomes, tandis que *Escherichia coli*, *Klebsellia pneumoniae* et *Proteus mirabilis* l'augmente **(Lee *et al.* 2010)**.

Dans ce contexte et dans le cadre de notre projet sur la relation entre consommation de viande et risque de cancer colorectal, nous avons émis l'hypothèse que les bactéries coliques pourraient moduler la peroxydation induite par le fer héminique et par conséquent la promotion de la cancérogenèse colorectale induite par ce fer héminique. Après avoir vérifié qu'un traitement antibiotique était efficace pour dépléter le microbiote de rats, nous avons testé si la modulation de la lipoperoxydation fécale était similaire chez des rats nourris avec de l'hémoglobine et traités ou non par un cocktail d'antibiotiques. Cette étude a été répétée avec des rats nourris avec de l'hémoglobine et de l'hémine, le noyau tétrapyrolique sans la globine.

Antibiotic Suppression of Intestinal Microbiota Reduces Heme-Induced Lipoperoxidation Associated with Colon Carcinogenesis in Rats

MARTIN O.C.B.[1,2], LIN C.[1], NAUD N.[1], TACHE S.[1], RAYMOND-LETRON I.[3], CORPET D.E.[1,3] & PIERRE F.H.[1]

[1] Université de Toulouse, UMR1331 Toxalim INRA, BP-93173, 180 ch. de Tournefeuille, F-31027, Toulouse, France

[2] ADIV, 10 Rue Jacqueline Auriol, 63100 Clermont-Ferrand, France.

[3] Université de Toulouse, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, INP-ENVT, 23 ch. des Capelles, 31076, Toulouse, France.

ABSTRACT

Epidemiological studies show that heme iron from red meat is associated with increased colorectal cancer risk. In carcinogen induced-rats, a heme iron-rich diet increases the number of precancerous lesions and raises associated fecal biomarkers. Heme-induced lipoperoxidation measured by fecal thiobarbituric acid reagents (TBARs) could explain the promotion of colon carcinogenesis by heme. Using a factorial design we studied if microbiota could be involved in heme-induced carcinogenesis, by modulating peroxidation. Rats treated or not with an antibiotic cocktail, were given a control or a hemoglobin-diet. Fecal bacteria were counted on agar and TBARs concentration assayed in fecal water. The suppression of microbiota by antibiotics was associated with a reduction of crypt height and proliferation and with a cecum enlargement, which are characteristics of germ-free rats. Rats given hemoglobin diets had increased fecal TBARs, which were suppressed by the antibiotic treatment. A duplicate experiment in rats given dietary hemin yielded similar results. These data show that the intestinal microbiota is involved in enhancement of lipoperoxidation by heme iron. We thus suggest that microbiota could play a role in the heme-induced promotion of colorectal carcinogenesis.

Key words: Colorectal cancer – Red meat – Heme iron – Experimental – Microbiota – Lipid peroxidation.

INTRODUCTION

Colorectal cancer (CRC) is a major cause of mortality by cancer in Western countries. Epidemiological studies show that red and processed meat consumption is associated with an increased risk of CRC (1). One suggested mechanism underlying this relationship is that heme, the iron-porphyrin pigment of red meat, stimulates colorectal carcinogenesis. In fact, a meta-analysis of prospective cohort studies shows that relative risk of colon cancer is 1.18 [95% CI: 1.06-1.32] for subjects in the highest category of heme intake compared with those in the lowest category (2). In chemically-induced rats, we observed a dose-response relationship between heme iron intake and promotion of colorectal carcinogenesis (3). In the same way, our team demonstrated that black-pudding (blood sausage) fed rats have more mucin-depleted foci (MDF), precancer lesions, than beef fed rats (4). This heme-induced precancer lesions promotion in rats is always associated with an increase of fecal end-products of lipoperoxidation (3-5) measured by ThioBarbituric Acid Reagents (TBARs), an overall measure of aldehyde molecules. In a recent cross-sectional prospective study, lipoperoxidation measured by TBARs is associated with heme iron intake from meat (6). Moreover, a volunteers study shows that consumption of cured meat for few days increase significantly fecal TBARs as in rats (7). Polyunsaturated fatty acids oxidation led to formation of highly reactive compounds, such as aldehydes. The main aldehydes from lipoperoxidation are malondialdehyde (MDA) and 4-hydroxynonenal (4-HNE) (8). MDA can bind to DNA (8) and proteins (9) and 4-HNE can form proteins adducts and propagate oxidative stress (10). Toxicity of these lipoperoxidation-derived aldehydes and association between lipoperoxidation and precancerous lesions in rats suggest that lipoperoxidation would be one of the mechanisms may explain heme promotion of carcinogenesis.

Humans possess approximately 1000 different bacterial species in the gastrointestinal tract (11). The gut microbiota has been suggested to have a critical role in promotion (12) and prevention (13) of colorectal carcinogenesis. Moreover, distinct fecal microbiota was observed between individuals with a high colon cancer risk and healthy individuals (14). Furthermore, distinct fecal microbiota was observed in humans with a high red meat diet characterized by an increased density of *Bacteroides* spp (15). In the same way, recent studies on bacterial metagenome have demonstrated that fecal bacteria are clustered into enterotypes distinguished primarily by levels of *Bacteroides* and *Prevotella* and strongly associated with long-term diets. The *Bacteroides* enterotype was strongly associated with animal protein

and saturated fat intake, which suggests that meat consumption characterize this enterotype (16, 17). Recently, it was shown that heme alters microbiota in mice. In fact, heme intake increases the ratio of Gram-negative to Gram-positive bacteria due to a selective susceptibility of Gram-positive bacteria to heme (18). Furthermore, bacteria can reduce iron-induced peroxidation. Ito *et al.* (19, 20) found that lipid peroxidation was inhibited on colonic mucosa of the iron-overloaded mice by feeding 0.4% *B. bifidum*, 0.4% *S. thermophilus* and 2% *L. casei*. Moreover, Lee *et al.* (21) showed that *B. animalis* and *B. cholerium* could inhibit lipid peroxidation in liposomes, although *E. coli*, *K. pneumoniae* and *P. mirabilis* could increase lipid peroxidation. Pro-lipoperoxidant bacteria could thus participate to colitis by increasing fecal peroxidation (19-21).

We speculated that the colonic bacteria could likewise modulate heme-induced peroxidation and consequently heme-induced promotion of colorectal cancer. After checking that an antibiotic treatment was effective to deplete rats' microbiota and to impact colonic mucosa, we tested if modulation of lipoperoxidation was similar in fecal water from hemoglobin-fed rats treated or not with antibiotics. A duplicate study was done in rats given dietary hemoglobin and hemin, another form of heme-iron.

MATERIAL AND METHODS

Animals and diets

Animal care was in accordance with the guidelines of the European Council on animals used in experimental studies. Rats were housed individually in metabolic cages. The room was kept at a temperature of 22°C on a 12-h light-dark cycle, and allowed free access to the diets and tap water at pH 3. Body weights were monitored at the beginning, at the middle and at the end of experimental period. In **study 1**, thirty-two male Fisher 344 rats were purchased at 5 weeks of age from Charles River. After 5 days of acclimatization, rats were randomly allocated to 2 dietary groups: a control (CON) and hemoglobin (HB) groups. In **study 2**, thirty female Fischer 344 rats were purchased at 5 weeks of age from Charles River. After acclimatization, rats were randomly allocated to 3 dietary groups: a control (CON), hemoglobin (HB) and hemin (HEM) groups. Rats were fed experimental diets for 14 days. All diets were based on a modified standard AIN76 diet, prepared and formulated in a powdered form by UPAE (INRA, Jouy-en-Josas, France) and maintained at -20°C. Calcium level is critical for heme promotion, calcium was thus excluded from mineral mix but dibasic calcium phosphate was included in all diets at a low concentration of 3.4 g/kg. All diets were balanced for protein (50%) and fat (5%) by the addition of casein and safflower

oil. Control groups received no-heme diet containing 0.036% ferric citrate to balance the iron content. Hemoglobin and hemin groups received the same amount of heme (1.5 µmol/g diet, Sigma Chemical).

Antibiotic treatment

Half of rats of each diet groups received an antibiotic cocktail in distilled water [4mg/mL kanamycin, 0.35 mg/mL gentamicin, 8500 U/mL colistin, 2.15 mg/mL metronidazole and 0.45 mg/mL vancomycin (Sigma Chemical, St Quentin, France)]. Each rat belonging to the antibiotic groups received a daily gavage of antibiotic mixture (1mL) for seventeen days. The antibiotics-treated groups are designated by the diet name followed by /A (groups CON/A and HB/A in study 1 and groups CON/A, HB/A and HEM/A in study 2). Untreated rats (groups CON and HB in study 1 and CON, HB and HEM in study 2) got sterilized-water (1mL).

Bacterial cultivation of feces

Feces were collected at the beginning, at 7 days and at 14 days of experimental diets under sterile conditions. Fecal samples from antibiotic-treated rats were diluted at 10^{-2}, 10^{-3} and 10^{-4} then cultured on plate count agar medium aerobically and on Schaedler + blood medium anaerobically. Untreated rats samples were diluted at 10^{-5} and 10^{-6} before being spread on the same culture media. Colonies forming unit were counted after 24h at 37°C.

Immunohistochemistry

After fourteen days of experimental diets, rats were killed by CO_2 asphyxiation. Four colons per group of **study 1** were collected and fixed in 10% formalin before being automatically processed and embedded in paraffin as Swiss rolls. Number of cells per half-crypt was evaluated on routine hematoxylin and eosin stained slides from rat Swiss rolls under a light microscope using 400x magnification: at least 20 crypt were selected for counting. For Ki-67 staining, antigen retrieval was performed in 10 mM citrate buffer pH 6.0 for 30 min in a water bath at 95°C. Cooled sections were then incubated in Dako peroxidase blocking solution (Dako S2023) to quench endogenous peroxidase activity. To block non-specific binding, sections were incubated in normal goat serum (dilution 1:10, Dako X0902) for 20 min at room temperature. Sections were incubated 50 min at Room temperature (RT) with primary antibody (rabbit monoclonal antibody (Ki-67, SP6 Thermoscientific, dilution 1:200). The secondary antibody, biotinylated swine anti-rabbit immmunoglobulins (Dako, E0431, dilution 1:200) was applied for 25 min at RT followed by an HRP-streptavidin solution (Dako, P0397, dilution 1:500) for 25 min. Peroxidase activity was revealed by 3,

3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride substrate (DAKO, K3468). Finally sections were counterstained with Harris hematoxylin, dehydrated and coverslipped.

Fecal water analysis

Fecal pellets were collected under each cage for 24h. 1 mL of distilled water and 50 µL of butylated hydroxytoluene 0.45 M were added to 0.5 g of fresh feces. Feces were grinded using Fast-Prep during 3 x 30 s and then centrifuged at 5500 g for 20 min.

TBARs were measured in fecal water according to Ohkawa *et al*. (22). Ten microliters of fecal water were diluted in 90 µL of distilled water. This sample was mixed with 100 µL of sodium dodecyl sulfate (8.1%) and 1 mL of 2-thiobarbituric acid (TBA, 0.5% in acetic acid 10%). Samples were homogenized and heated at 95°C for 1h. For blanks, TBA was omitted and replaced by 1 mL of acetic acid (10%). After heating, TBARs were extracted with 1 mL of butanol, and then centrifuged for 10 min at 4000 g. The amount of TBARs was determined as malondialdehyde equivalents by measure of the absorbance of the butanol extract at 532 nm against a standard (1,1,3,3-tetramethoxypropane at 0, 100, 200, 400, 600, 800 and 1000 µM).

Heme of fecal water was assayed by fluorescence according to Van den Berg (23). Briefly, 50 µL of fecal water was diluted in 250 µL of a 5:1 mix of 2-propanol and HCl (1 M). Samples were homogenized, then centrifuged at 10 000g for 10 min. Samples were mixed with 1mL of glacial acetic acid. Subsequently, a mixture of 50 µL of $FeSO_4.7H_2O$ (0.12 M) freshly prepared and HCL (4.5 M) were added. After mixing, the samples were immediately incubated at 60 °C for 30 min. 2 mL of 2-propanol/water (v/v) were added and agitated before measurement using excitation and emission wavelengths of 409 and 594 nm. Blanks were obtained using the same protocol, but without the incubation at 60°C.

Heme in total feces

The amount of heme in feces was determined according to Van den Berg *et al.* (23). An acidified methanol/chloroform extract (final concentration of HCl 1 M) was carried out on 20 mg of dry feces. After centrifugation, the chloroform phase was recovered and dried under vacuum. Samples were dissolved in 0.45 ml 250 mM KOH, sonicated for 30 seconds (Vibra Cell 72434, Bioblock Scientific) and mixed with 50 µL of distilled water and 500 µL isopropanol/HCl (5:1). This mix was homogenized, then centrifuged for 10 min at 1500 g and the supernatants were assayed for their heme content as described above.

Statistical analysis

Results were analyzed using Systat version 12-software for Windows, and reported as means and standard deviation (SD). All data were analyzed by two factors analysis of variance (ANOVA), the factors

being antibiotic treatment and dietary heme iron.

RESULTS

To test the hypothesis that gut microbiota is involved in heme-induced lipoperoxidation, TBARs modulation and depletion of cultivable bacteria were measured in antibiotic-treated rats.

Weight and food intake

Final body weight of rats was 177 ± 13 and 129 ± 6 g, study 1 (CON and HB diets) and 2 (CON, HB and HEM diets) respectively, after 14 days on experimental diets, without significant effect of antibiotic treatment (179 ± 12 and 175 ± 13 g for untreated and antibiotics-treated rats respectively in study 1 and 128 ± 6 and 131 ± 6 g for untreated and antibiotics-treated rats respectively in study 2). Daily food intake was similar in all groups (13 ± 1 and 9 ± 2 g/day, study 1 and 2 respectively) without significant differences between groups.

Bacterial counts

In study 1, after 17 days of antibiotic treatment by gavage, aerobic bacteria seemed depleted, but the ANOVA analysis per factor of aerobic bacteria counts showed no significant difference between groups. However, antibiotic-treated rats had significantly less anaerobic bacteria ($p<0.0001$) than untreated rats. Dietary heme had no effect on bacterial counts. **(Figure 1 B)**.

In study 2, antibiotic-treated rats had significantly less aerobic (4.6 ± 1.2 vs. 7.9 ± 0.3 log(CFU/g feces); $p=0.002$) and anaerobic (4.4 ± 0.8 vs. 8.0 ± 0.1 log(CFU/g feces); $p<0.0001$) bacteria than untreated rats. As in study 1, neither heme effect nor interaction was observed (full data not shown).

Histo- and immunohistological characterization of colonic mucosa

Antibiotic-treated rats in study 1 had significantly shorter colon crypts than untreated rats (121–± 15 vs. 157 ± 28 µm; $p=0.008$). Moreover, **Figure 2** shows that antibiotic treatment was efficient to reduce the number of cell per half-crypt ($p<0.0001$, panels **A and B**) and to reduce epithelial regenerative activity in terms of fewer Ki67 positive cells ($p=0.006$, panels **C and D**). The height of the highest Ki67 positive cell was significantly reduced in antibiotics rats compared with untreated rats (49 ± 9 vs. 72 ± 21 µm; $p=0.012$). Similarly, the rank of the last Ki67 positive cells was significantly reduced (14 ± 2 vs. 19 ± 3, $p=0.001$). Finally, antibiotic-treated rats had a significantly larger cecum than untreated rats ($p<0.0001$, panels **E and F**).

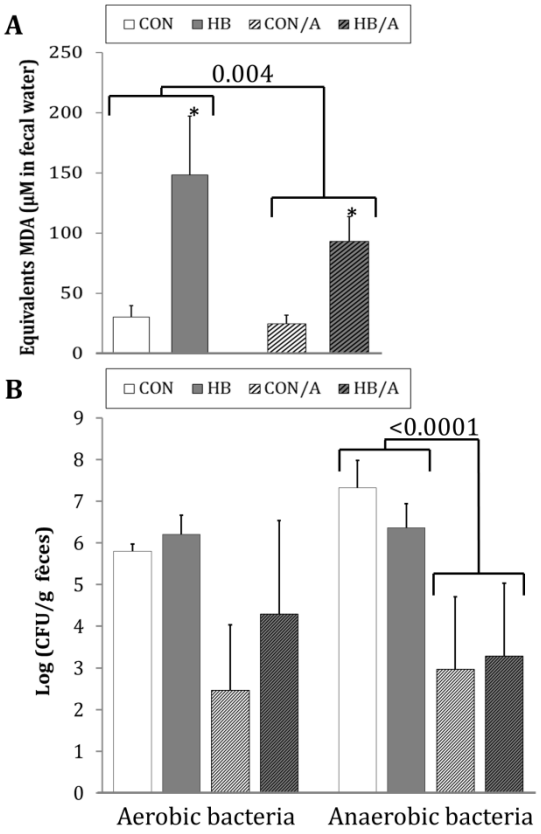

Figure 1: Fecal TBARs **(A)** and cultivable fecal bacteria **(B)** in rats given experimental diets with 2.5% hemoglobin (groups HB and HB/A) or no heme iron (groups CON and CON/A) for 14 days, and treated with an antibiotic cocktail by gavage for 12 days (groups CON/A and HB/A).

Panel A: Equivalents MDA were assessed with ThioBarbituric Acid Reagents (TBARs) assay according to Okhawa *et al.* **[22]**, data are means ± SD (n=8). *: significant effect of hemoglobin ($p<0.0001$).

Panel B: cultivable fecal bacteria after 14 days of antibiotic treatment were assessed counting colony-forming unit (CFU) after 24h incubation at 37°C on plate count agar medium for aerobic bacteria and on Schaedler + blood medium and without oxygen for anaerobic bacteria. Data are means ± SD (n=8 for antibiotics groups CON/A and HB/A ; n=3 for no-antibiotics groups CON and HB).

Fecal TBARs

In studies 1 and 2, ANOVA analysis per factor shows that heme-fed rats had more TBARs in feces than control-fed rats ($p<0.0001$, both studies). Moreover, antibiotics-treated rats had less TBARs in feces than untreated rats ($p=0.004$ in study 1 and $p<0.0001$ in study 2). In both studies, there was a significant interaction between hemoglobin and antibiotic effects ($p=0.016$ **Fig. 1 A** and $p=0.003$, **Fig. 3**). Similar results were seen in rats given dietary hemin (**Fig. 3**).

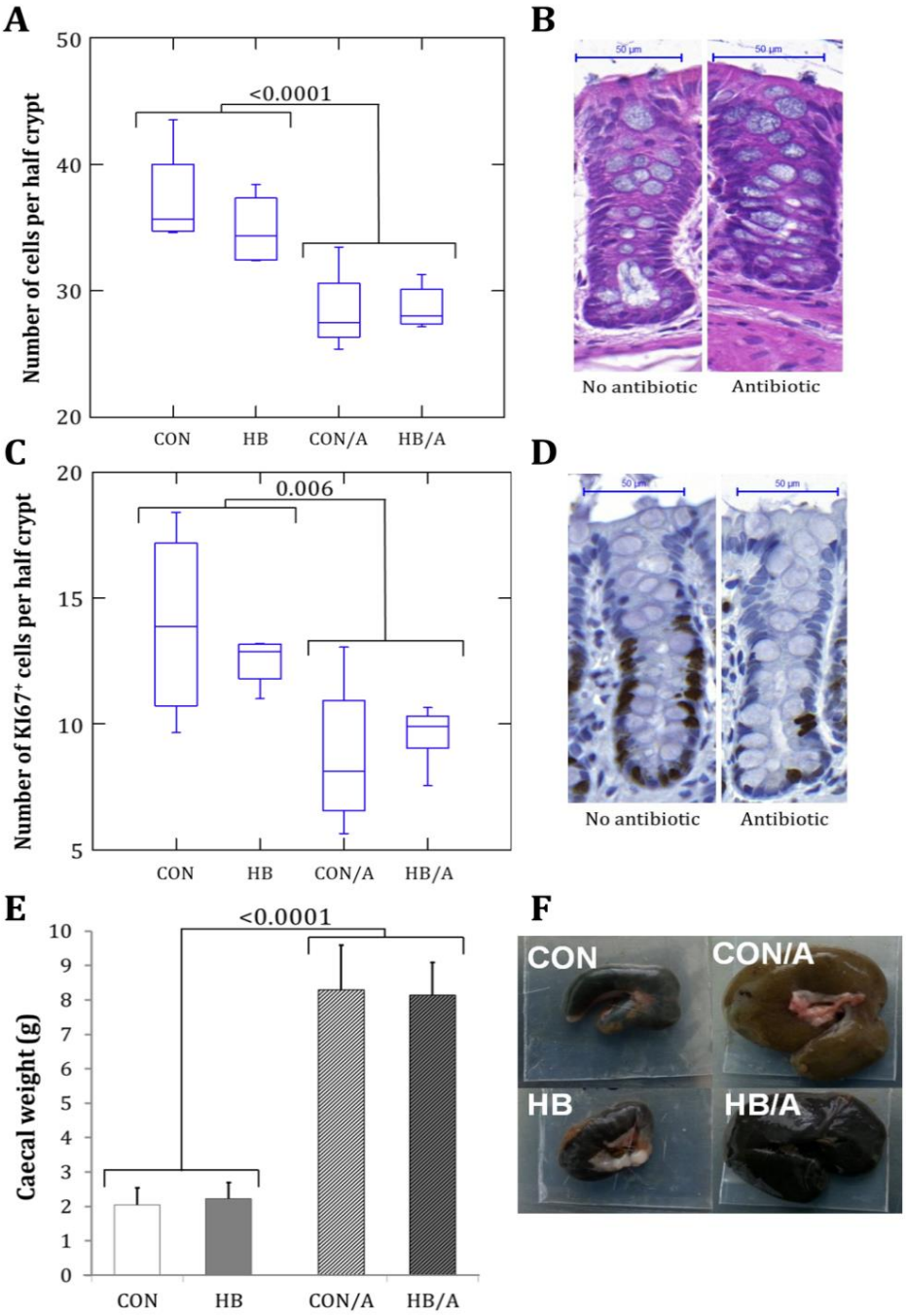

Figure 2: Number of cells per half-crypt **(A)** and photos of a crypt from an antibiotic treated-rat (right) and from an untreated rat (left) **(B);** Counts of Ki67+ cells per half-crypt **(C)** and photos of a crypt from an antibiotic treated-rat (right) and from an untreated rat (left) **(D);** caecal weight **(E)** and photos of caeca **(F)** in rats given experimental diets with 2.5% hemoglobin (groups HB and HB/A) or no heme iron (groups CON and CON/A) and treated with antibiotics (groups CON/A and HB/A).

Panels A and B: crypt height was measured on colon sections stained with Hemalun-Eosin, data are means ± SD (n=4).

Panels C and D: proliferation was assessed by the number of Ki67 positive cells on colon sections after one night of incubation with anti-Ki67 antibody, data are means ± SD (n=4).

Panels E and F: data are means ± SD (n=8).

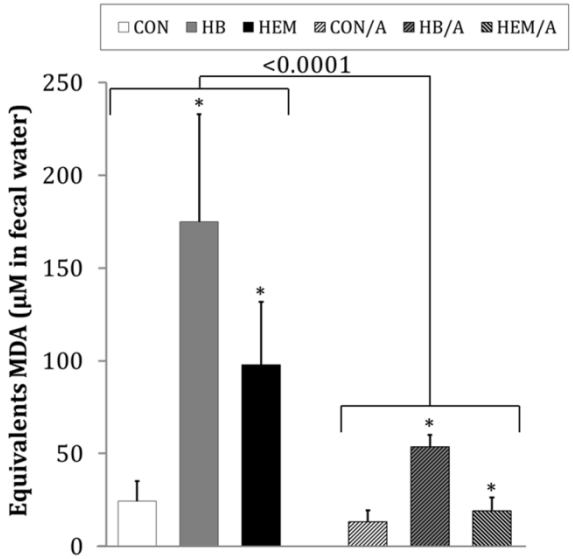

Figure 3: Fecal TBARs in rats given experimental diets with 2.5% hemoglobin (groups HB and HB/A), 0.094% hemin (HEM and HEM/A), or no heme iron (groups CON and CON/A) for 14 days and treated with an antibiotic cocktail by gavage for 17 days (groups CON/A, HB/A and HEM/A). Equivalents MDA were assessed with TBARs assay, data are means ± SD (n=5). *: significant effects of hemin and hemoglobin ($p<0.0001$).

DISCUSSION

The present data show for the first time that the gut microbiota was involved in the modulation of intestinal lipoperoxidation associated with heme-induced promotion of colorectal carcinogenesis in rats.

At first, we checked if the antibiotic treatment was effective to deplete the gut microbiota. The cocktail of antibiotics commonly used in mice (24-26) was effective here in rats to deplete the gut microbiota **(Fig. 1B)**. Although the colon of rats was not fully decontaminated, we observed several germ-free features (27): decreased crypt height, reduced proliferation and a fourfold increase in cecum size in the antibiotic-treated rats compared with controls **(Fig. 2)**. These results are in agreement with those obtained by Reikvam *et al.* (28) who used a similar antibiotic cocktail to deplete the gut microbiota in mice. Thereby, this antibiotic treatment was effective to deplete the rats' gut microbiota and to get typical features of germ-free animals.

Fecal water lipoperoxides are associated with heme-induced carcinogenesis (3-5). We have suggested they could be used as short-term surrogate biomarkers to study heme-induced promotion of colon cancer (5). In addition, Radulescu *et al*. have shown that the luminal iron pool (rather than the circulating iron pool) was a major driver of carcinogenesis, especially via peroxidation (29). To evaluate heme-induced lipoperoxidation in this study we assayed TBARs in fecal water. Dietary heme-iron (hemoglobin in study 1 and hemoglobin and hemin in study 2) increased fecal TBARs **(Fig. 1A and 3)** as already seen (3-5). This study shows, for the first time, that heme-induced lipoperoxidation was reduced when the gut microbiota was depleted by an antibiotic treatment. There was a clear correlation between the microbial density reduction and TBARs reduction in feces (Pearson's r=0.9). One hypothesis that could explain this result is that gut bacteria can

modulate lipoperoxidation. *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* and *Streptococcus* strains, all being Gram positive bacteria, can inhibit lipoperoxidation while *Enterobacteriaceae* strains can enhance it (19-21). Dietary heme selects Gram negative bacteria in the gut at the expense of Gram positive bacteria, probably because Gram positive bacteria are susceptible to heme cytotoxic activity (18). We thus assume that heme intake favors the expansion of pro-oxidative Gram negative bacteria and that this selection could participate to the promotion of heme-induced colorectal carcinogenesis via increased lipoperoxidation. The growth of Gram negative bacteria after heme (16) or red meat (16, 17) intake is consistent with the growth of microbiota favoring lipoperoxidation. Moreover, we observed a significant heme concentration reduction in fecal water when microbiota was depleted (242 ± 272 µM in HB vs 150 ± 184 µM in HB/A; p=0.024 with a significant interaction between heme and antibiotics p=0.023) while total amount of heme in feces is the same (41 ± 22 µmol in HB vs. 41 ± 18 µmol in HB/A per 24 hours). These results suggest a role of microbiota in the bioavailability of heme. Although we do not have a hypothesis to explain it, this result is important because that is the soluble fraction of colonic heme which is associated with the modulation of lipid peroxidation (5, 30).

Here, dietary heme iron did not increase proliferation of epithelial cells, in contrast with Van der Meer's group studies (18, 31, 32). Hemoglobin (iron bound inside a hemoprotein) was used here, while Van der Meer used hemin (free heme, iron stabilized by a chlorine atom) to feed rats and mice. The present study is thus the first to evaluate the effect of hemoglobin on epithelial cell proliferation. Difference was not due to the dose: hemin 0.2-0.5 µmol/g diet increase the number of cells, and the number of Ki67 labeled cells, per crypt (18, 31, 32). Here, hemoglobin at 1.5 µmol/g didn't raise these numbers. We can so suspect a difference of toxicity between hemin and hemoglobin. In this way, we have already shown that hemin and hemoglobin do not have the same effects on biomarkers associated with heme-induced promotion (3). We showed that dietary hemin mimics ham effect on early biochemical markers associated with carcinogenesis (33), while hemoglobin mimics the effects of fresh-red meat (4). Per gram of intake, cured meat is associated with a higher risk of cancer than fresh red meat (34). This difference of toxicity on colon cancer biomarkers and on epithelial cell proliferation may be explained by the fact that free heme iron raises epithelial proliferation while hemoglobin (and likely myoglobin) did not.

In conclusion, the present study supports the concept that gut microflora is involved in the modulation of

lipoperoxidation associated with heme-induced colorectal carcinogenesis in a rodent model. Longer-term studies with carcinogenesis endpoints should now be carried out. Although preliminary, the present results open the doors to researches of antioxidative probiotics that could reduce colon carcinogenesis.

ACKNOWLEDGEMENTS

This project was supported by French INRA through team Toxalim-E9 annual funding and by French Min.of Agriculture through DGER-ENVT research funding.

O. Martin PhD studentship was supported by a grant of ADIV, the French Tech.Inst. of Meat.

REFERENCES

1. World Cancer Research Fund W, and American Institute for Cancer Research A: Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. *WCRF and AICR, Washington DC*, 1-537, 2007.
2. Bastide NM, Pierre FH, and Corpet DE: Heme iron from meat and risk of colorectal cancer: a meta-analysis and a review of the mechanisms involved. *Cancer Prev Res (Phila)* **4**, 177-84, 2011.
3. Pierre F, Tache S, Petit CR, Van der Meer R, and Corpet DE: Meat and cancer: haemoglobin and haemin in a low-calcium diet promote colorectal carcinogenesis at the aberrant crypt stage in rats. *Carcinogenesis* **24**, 1683-90, 2003.
4. Pierre F, Freeman A, Tache S, Van der Meer R, and Corpet DE: Beef meat and blood sausage promote the formation of azoxymethane-induced mucin-depleted foci and aberrant crypt foci in rat colons. *Journal of Nutrition* **134**, 2711-2716, 2004.
5. Pierre F, Santarelli R, Tache S, Gueraud F, and Corpet DE: Beef meat promotion of dimethylhydrazine-induced colorectal carcinogenesis biomarkers is suppressed by dietary calcium. *Br J Nutr* **99**, 1000-6, 2008.
6. Romeu M, Aranda N, Giralt M, Ribot B, Nogues MR, et al.: Diet, iron biomarkers and oxidative stress in a representative sample of Mediterranean population. *Nutr J* **12**, 102, 2013.
7. Pierre FH, Martin OC, Santarelli RL, Tache S, Naud N, et al.: Calcium and alpha-tocopherol suppress cured-meat promotion of chemically induced colon carcinogenesis in rats and reduce associated biomarkers in human volunteers. *Am J Clin Nutr* **98**, 1255-62, 2013.
8. Marnett LJ: Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* **21**, 361-70, 2000.
9. Traverso N, Menini S, Maineri EP, Patriarca S, Odetti P, et al.: Malondialdehyde, a lipoperoxidation-derived aldehyde, can bring about secondary oxidative damage to proteins. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **59**, B890-5, 2004.
10. Dalleau S, Baradat M, Gueraud F, and Huc L: Cell death and diseases related to oxidative stress: 4-hydroxynonenal (HNE) in the balance. *Cell Death Differ* **20**, 1615-30, 2013.
11. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, et al.: A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* **464**, 59-65, 2010.
12. Azcarate-Peril MA, Sikes M, and Bruno-Barcena JM: The intestinal microbiota, gastrointestinal environment and colorectal cancer: a putative role for probiotics in prevention of colorectal cancer? *Am*

J Physiol Gastrointest Liver Physiol **301**, G401-24, 2011.

13. Davis CD, and Milner JA: Gastrointestinal microflora, food components and colon cancer prevention. *J Nutr Biochem* **20**, 743-52, 2009.
14. Collins D, Hogan AM, and Winter DC: Microbial and viral pathogens in colorectal cancer. *Lancet Oncol* **12**, 504-12, 2011.
15. Maier BR, Flynn MA, Burton GC, Tsutakawa RK, and Hentges DJ: Effects of a high-beef diet on bowel flora: a preliminary report. *Am J Clin Nutr* **27**, 1470-4, 1974.
16. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, et al.: Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* **473**, 174-80, 2011.
17. Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen YY, et al.: Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* **334**, 105-8, 2011.
18. IJssennagger N, Derrien M, van Doorn GM, Rijnierse A, van den Bogert B, et al.: Dietary heme alters microbiota and mucosa of mouse colon without functional changes in host-microbe cross-talk. *PLoS One* **7**, e49868, 2012.
19. Ito M, Ohishi K, Yoshida Y, Yokoi W, and Sawada H: Antioxidative effects of lactic acid bacteria on the colonic mucosa of iron-overloaded mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 4456-4460, 2003.
20. Ito M, Sawada H, Ohishi K, Yoshida Y, Yokoi W, et al.: Suppressive effects of bifidobacteria on lipid peroxidation in the colonic mucosa of iron-overloaded mice. *J Dairy Sci* **84**, 1583-9, 2001.
21. Lee IA, Bae EA, Hyun YJ, and Kim DH: Dextran sulfate sodium and 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid induce lipid peroxidation by the proliferation of intestinal gram-negative bacteria in mice. *J Inflamm (Lond)* **7**, 7, 2010.
22. Ohkawa H, Ohishi N, and Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. In: Analytical Biochemistry; 1979. p. 351-358.
23. Van den Berg JW, Koole-Lesuis R, Edixhoven-Bosdijk A, and Brouwers N. Automating the quantification of heme in feces. In: Clinical Chemistry; 1988. p. 2125-2126.
24. Julia V, McSorley SS, Malherbe L, Breittmayer JP, Girard-Pipau F, et al.: Priming by microbial antigens from the intestinal flora determines the ability of CD4+ T cells to rapidly secrete IL-4 in BALB/c mice infected with Leishmania major. *J Immunol* **165**, 5637-45, 2000.
25. Bashir ME, Louie S, Shi HN, and Nagler-Anderson C: Toll-like receptor 4 signaling by intestinal microbes influences susceptibility to food allergy. *J Immunol* **172**, 6978-87, 2004.
26. Reeves AE, Theriot CM, Bergin IL, Huffnagle GB, Schloss PD, et al.: The interplay between microbiome dynamics and pathogen dynamics in a murine model of Clostridium difficile Infection. *Gut Microbes* **2**, 145-58, 2011.
27. Smith K, McCoy KD, and Macpherson AJ: Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. *Semin Immunol* **19**, 59-69, 2007.
28. Reikvam DH, Erofeev A, Sandvik A, Grcic V, Jahnsen FL, et al.: Depletion of murine intestinal microbiota: effects on gut mucosa and epithelial gene expression. *PLoS One* **6**, e17996, 2011.
29. Radulescu S, Brookes MJ, Salgueiro P, Ridgway RA, McGhee E, et al.: Luminal iron levels govern intestinal tumorigenesis after Apc loss in vivo. *Cell Rep* **2**, 270-82, 2012.
30. Lapre JA, and Vandermeer R: Diet-Induced Increase of Colonic Bile Acids Stimulates Lytic Activity of Fecal Water and Proliferation of

Colonic Cells. *Carcinogenesis* **13**, 41-44, 1992.

31. de Vogel J, van-Eck WB, Sesink AL, Jonker-Termont DS, Kleibeuker J, et al.: Dietary heme injures surface epithelium resulting in hyperproliferation, inhibition of apoptosis and crypt hyperplasia in rat colon. *Carcinogenesis* **29**, 398-403, 2008.
32. Ijssennagger N, Rijnierse A, de Wit NJ, Boekschoten MV, Dekker J, et al.: Dietary heme induces acute oxidative stress, but delayed cytotoxicity and compensatory hyperproliferation in mouse colon. *Carcinogenesis* **34**, 1628-35, 2013.
33. Pierre FH, Santarelli RL, Allam O, Tache S, Naud N, et al.: Freeze-dried ham promotes azoxymethane-induced mucin-depleted foci and aberrant crypt foci in rat colon. *Nutr Cancer* **62**, 567-73, 2010.
34. Corpet DE: Red meat and colon cancer: should we become vegetarians, or can we make meat safer? *Meat Sci* **89**, 310-6, 2011.

DISCUSSION

Cette étude montre pour la première fois que le microbiote est impliqué dans la modulation de la lipoperoxydation fécale, induite par le fer héminique. Cette lipoperoxydation étant associée à la promotion de la cancérogenèse colorectale.

L'antibiothérapie que nous avons mise en place a permis de diminuer significativement le nombre de bactérie anaérobies **[Figure 1B]**, les bactéries anaérobies étant les plus présentes au niveau colique **(Gordon and Dubos 1970 ; Savage 1970 ; Harris *et al.* 1976 ; Eckburg *et al.* 2005)**. De plus, l'analyse des colons des rats a permis de mettre en évidence plusieurs caractéristiques retrouvées chez les animaux germ-free **(Smith *et al.* 2007)** telles qu'une diminution de la hauteur de crypte et une diminution de la prolifération cellulaire **[Figure 2]**. Ainsi, ces résultats montrent que le cocktail d'antibiotiques et le protocole utilisés sont efficaces chez le modèle rat.

Les travaux précédents de l'équipe ont permis de démontrer que les lipoperoxydes fécaux, mesurés par les TBARs présents dans les eaux fécales, sont associés à la cancérogenèse hème-induite **(Pierre *et al.* 2003,2004,2008)**. Comme attendu, nous montrons dans cette étude que les régimes riches en hème (hémoglobine pour l'étude 1 et hémoglobine/hémine pour l'étude 2) ont conduit à une augmentation des TBARs fécaux. Nous démontrons également que les rats ayant consommé les régimes riches en hème et traités aux antibiotiques avaient significativement moins de TBARs fécaux que les rats non traités suggérant que la lipoperoxydation induite par le fer héminique est réduite lorsque le microbiote est déplété par des antibiotiques **[Figures 1A et 3]**. Nous avons observé une nette corrélation entre la réduction du nombre de bactéries fécales et la réduction des TBARs (coefficient de Pearson = 0,9).

Nous proposons 2 hypothèses pour expliquer ce résultat :

- **L'hème favoriserait les bactéries ayant des propriétés pro-lipoperoxydantes**

En effet les souches *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* et *Streptococcus*, toutes GRAM$^+$, peuvent inhiber la lipoperoxydation tandis que les souches *Enterobacteriaceae* peuvent l'augmenter **(Ito *et al.* 2001 ; Ito *et al.* 2003 ; Lee *et al.* 2010)**. Par ailleurs, un régime riche en hème sélectionne les bactéries intestinales GRAM$^-$ au dépend des bactéries GRAM$^+$ **(IJssennagger *et al.* 2012a)**. Nous pouvons donc supposer que la consommation d'hème favorise l'expansion des bactéries GRAM$^-$ ayant des propriétés pro-lipoperoxydante et que cette sélection pourrait participer à l'effet promoteur de l'hème *via* une augmentation de la lipoperoxydation.

- **Le microbiote participe à la biodisponibilité de l'hème**

Nous avons observé une diminution significative de la concentration en hème dans l'eau fécale lorsque le microbiote était annihilé (242 ± 272 µM pour le groupe hémoglobine non traité vs 150 ± 184 µM pour le groupe hémoglobine + antibiotiques; p=0.024) tandis que la quantité totale d'hème dans les fèces est la même (41 ± 22 µmol/g de fèces pour le groupe hémoglobine non traité vs. 41 ± 18 µmol/g de fèces pour le groupe hémoglobine + antibiotiques). Bien que nous n'ayons pas d'hypothèse pour expliquer ce résultat, il est important de le mettre en évidence puisque c'est la fraction soluble du contenu colique qui est associée à la modulation de la peroxydation **(Lapre and Van der Meer 1992 ; Pierre *et al.* 2008)**.

En conclusion, cette étude montre que le microbiote intestinal est impliqué dans la modulation de la lipoperoxydation associée à la cancérogenèse colorectale induite par la consommation de fer héminique dans un modèle rongeur.

CHAPITRE 3

L'hème est-il un agent pro-inflammatoire ? Module-t-il la perméabilité et la génotoxicité de la barrière intestinale ?

INTRODUCTION

L'homéostasie intestinale repose sur des interactions complexes entre le microbiote, l'épithélium intestinal et le système immunitaire. Une perturbation de cette homéostasie peut aboutir à l'installation d'une inflammation chronique **(Maloy and Powrie 2011)**. Des études, chez l'homme, ont montré que la consommation de viande et de fer héminique conduisait à l'augmentation de la protéine C-réactive plasmatique, un biomarqueur de l'inflammation **(Azadbakht and Esmaillzadeh 2009 ; de Oliveira Otto *et al.* 2011)**. De plus, de nombreuses études suggèrent l'implication de l'inflammation dans le développement de la cancérogenèse colorectale **(Elinav *et al.* 2013 ; Grivennikov 2013 ; Okada 2014)**. Enfin, l'inflammation est également associée à l'augmentation de la perméabilité intestinale **(Arrieta *et al.* 2006 ; Edelblum and Turner 2009 ; Turner 2009)**.

1) Inflammation, génotoxicité et cancérogenèse colorectale

L'inflammation chronique est le prolongement aberrant de la réponse de l'organisme face à la perte de l'homéostasie d'un tissu **(Elinav *et al.* 2013)**. De nombreuses revues établissent un lien moléculaire et cellulaire entre l'inflammation et la cancérogenèse et notamment la cancérogenèse colorectale **(Elinav *et al.* 2013 ; Grivennikov 2013 ; Okada 2014)**. Les patients atteints de maladies inflammatoires intestinales ont six fois plus de risque de développer un cancer colorectal que la population générale **(Bae and Kim 2014)**. Chez les rongeurs modèles de cancérogenèse colorectale, comme les rats initiés à l'azoxyméthane ou les souris *Min*, l'induction de l'inflammation par des traitements au dextran sulfate de sodium (DSS) augmente le nombre de tumeurs colorectales **(Sussman *et al.* 2012)**.

La consommation de viande et donc d'hème aboutit à une augmentation de la génotoxicité des eaux fécales chez l'homme, comme dans les modèles animaux **(Pearson *et al.* 2009 ; Hebels *et al.* 2012)**. Or, des études, chez le rat, ont montré que la génotoxicité des eaux fécales est associée au cancer du côlon **(Klinder, 2004)**. Elinav *et al.* rapportent, dans leur revue, que l'inflammation peut être considérée comme causalement liée au développement du cancer via des processus impliquant la génotoxicité. Trois mécanismes semblent lier inflammation et génotoxicité : **(i)** la production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) ou de l'azote (RNS) produits par les

macrophages ou les neutrophiles qui peuvent causer des cassures de l'ADN, des mutations de bases ou des lésions de l'ADN plus complexes, **(ii)** la production de certaines cytokines, telles que le TNF, IL1β, IL4, IL13 et TGFβ, qui peuvent induire des mutations de gènes associés à la cancérogenèse, comme *p53* et *myc*, et ainsi induire la promotion de la cancérogenèse et enfin **(iii)** une modification du microbiote conduisant à l'expansion de bactéries ayant des propriétés génotoxiques telles que *Escherichia coli*, *Bacteroides fragilis* ou encore *Fusobacterium nucleatum* **(Elinav *et al.* 2013)**. Ainsi la consommation de viande pourrait induire une inflammation chronique qui conduirait à des lésions génotoxiques et donc à l'initiation ou la promotion de la cancérogenèse colorectale.

2) Inflammation et perméabilité intestinale

Le tractus digestif est composé d'une couche continue de cellules qui sépare l'intérieur du corps de l'environnement extérieur. Le rôle de cet épithélium intestinal est de maintenir l'homéostasie en formant une barrière impénétrable aux pathogènes, dans des conditions physiologiques **(Peterson and Artis 2014)**. Des jonctions intercellulaires permettent le maintien de la barrière intestinale tout en régulant sa perméabilité aux ions, aux nutriments et à l'eau. Les jonctions serrées, les jonctions intercellulaires les plus importantes, sont formées par un complexe de protéines transmembranaires telles que l'occludine, les claudines et les molécules d'adhésion jonctionnelle (JAM). Les portions intracellulaires de ces protéines transmembranaires interagissent avec des protéines de la membrane cytoplasmique comme les zona-occludens (ZO). Ces protéines interagissent, elles même, avec les réseaux d'actine et de myosine ancrant ainsi les jonctions serrées au cytosquelette de la cellule **(Turner 2009 ; Edelblum and Turner 2009)**.

Les maladies inflammatoires intestinales sont associées à un défaut de ce rôle de barrière et donc à une augmentation de la perméabilité intestinale **(Arrieta *et al.* 2006 ; Edelblum and Turner 2009 ; Turner 2009)**. Cette perméabilité intestinale est régulée directement *via* l'altération des protéines de jonction ou indirectement *via* des effets sur le cytosquelette **(Laukoetter *et al.* 2008)**. Cependant, le fait que l'augmentation de la perméabilité soit la cause ou la conséquence de l'inflammation est encore en cours de débat **(Piche 2014)**. Par exemple, il a été montré, chez des patients ayant la maladie de Crohn, mais n'ayant pas encore développé les symptômes, qu'une augmentation de la perméabilité intestinale pouvait précéder, de plus d'un an, une poussée inflammatoire **(D'Inca *et al.* 1999)**. D'un autre côté, il a également été montré que la production de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL1β, pouvait augmenter la perméabilité intestinale **(Al-Sadi and Ma 2007)**.

Plusieurs études *in vitro* ont montré que des composés alimentaires pouvaient moduler la perméabilité intestinale. Les acides gras insaturés comme l'acide docosahexaénoïque (DHA), l'acide eicosapentaenoïque (EPA), issus des oméga-3, l'acide γ linolénique, issu des oméga-6, la gliadine, glycoprotéine issue du blé, ou encore le poivre doux et le poivre de cayenne sont connus pour augmenter la perméabilité cellulaire. A l'inverse, la quercétine, un flavonoïde, le thé noir et les poivres noir et vert diminuent la perméabilité cellulaire **(Ulluwishewa *et al.* 2011)**. Cependant, aucune étude n'a testé l'effet de la consommation de viande et/ou d'hème sur l'inflammation et la perméabilité intestinale.

Dans ce contexte, nous avons émis l'hypothèse que le fer héminique pouvait être un agent pro-inflammatoire et qu'il pouvait causer une augmentation de la perméabilité et de la génotoxicité de la muqueuse intestinale. Pour répondre à cette hypothèse, nous avons réalisé deux études court-terme, chez le rat. La première de 15 jours avait pour objectif de vérifier si l'inflammation mucosale était augmentée lorsque les rats étaient nourris avec un régime riche en hème. La deuxième, de trois semaines, a eu pour objectif de confirmer l'effet pro-inflammatoire de l'hème et de vérifier si cette inflammation était associée à une augmentation de la perméabilité et de la génotoxicité de la muqueuse intestinale. Des groupes supplémentés en calcium ont été ajoutés à cette deuxième expérimentation. Le calcium piégeant l'hème au niveau luminal, ces groupes nous permettent de démontrer le rôle de l'hème dans les modulations observées. Les analyses d'inflammation et de perméabilité se sont faites en collaboration avec l'équipe de **NeuroGastroenterologie & Nutrition** (NGN) de l'unité ToxAlim. L'analyse de génotoxicité, réalisée par des tests de comètes, s'est faite en collaboration avec l'équipe **Génotoxicité & Signalisation** (GS) de l'unité ToxAlim.

Heme Iron Increases Intestinal Permeability, Inflammation, Genotoxicity And Biomarkers Associated With Colorectal Cancer In Rats

Martin OCB [1,2], Leveque M[1], Naud N[1], Tache S[1], Gaultier E[1], Tondereau V[1], Boutet E[1-3], Guéraud F[1], Theodorou V[1] & Pierre FHF[1]

[1]: INRA, UMR1331 Toxalim, Research Centre in Food Toxicology, Toulouse, France
[2]: ADIV, Clermont-Ferrand, France
[3]: Université de Toulouse, UPS, UMR1331, Toxalim, F-31062 Toulouse, France

Abstract

Epidemiological studies show that heme iron from red meat is associated with increased colorectal cancer risk. In rats, a heme diet increases lipoperoxydation in the gut, measured by TBARs and DHN-MA assays, and associated cytotoxicity. These biomarkers are associated with colorectal cancer promotion. Calcium supplementation protects against deleterious effect of heme iron. Inflammation could explain, in part, promotion of colorectal cancer. Furthermore, inflammatory bowel diseases, which increase the risk of colorectal cancer, are characterized by an increased intestinal permeability.

We performed two short-term studies in rats. The first one evaluated if a hemin-diet increases intestinal inflammation compared with a control-diet. After 14 days of experimental diets, mucosal myeloperoxidase activity and cytokines levels were assayed. In the second one, a 2x2 design study, we tested if a hemin-diet increases intestinal permeability. Four groups of rats were given control or hemin-diet added or not with calcium carbonate for 3 weeks. ^{51}Cr intestinal paracellular permeability, mucosal myeloperoxidase, mucosal genotoxicity (comet assay) and fecal biomarkers were assayed.

As expected, in the two studies, hemin-diet increased fecal water TBARs, urinary DHN-MA and associated cytotoxicity in murine cells. Hemin-diet also increased mucosal myeloperoxidase activity and pro-inflammatory cytokine IL1 β level and decreased anti-inflammatory cytokine IL10 level. In the second study, hemin-diet increased intestinal paracellular permeability, mucosal myeloperoxidase activity and mucosal genotoxicity. Calcium supplementation, which inhibits heme-induced TBARs, restored intestinal paracellular permeability and associated mucosal inflammation and genotoxicity.

We propose that increased intestinal permeability and mucosal inflammation are involved in heme-induced promotion of colorectal cancer.

Keywords: Heme iron, intestinal permeability, inflammation, biomarkers, colorectal cancer.

Introduction

Colorectal cancer is the third most common type of cancer worldwide after lung and prostate cancer in men and after lung and breast cancer in women. In 2010, the World Cancer Research Fund panel has reviewed all epidemiological studies on red meat and processed meats intake and colorectal cancer. They judged that the risk of meat intake is convincing and recommended to limit fresh meat and to avoid processed meat intake **(WCRF/AICR 2007- 2010)**. In rats, we showed that meat intake increases the number of precancer lesions depending on the level of heme iron in low-calcium diets **(Pierre *et al.* 2003; Pierre *et al.* 2004)**. In all our studies, heme-induced number of precancer lesions increase is associated with an increase of fecal and urinary lipoperoxidation biomarkers suggesting an implication of dietary fatty acids peroxidation in the promoting effect of heme **(Pierre *et al.* 2003; Pierre *et al.* 2004; Pierre *et al.* 2006)**. Calcium, and especially calcium carbonate, supplementation is efficient to decrease the heme-induced number of precancerous lesions and lipoperoxidation biomarkers **(Pierre *et al.* 2003; Pierre *et al.* 2008; Allam *et al.* 2010).**

In humans, like in rodent model, inflammation is associated with colorectal cancer. Patients with inflammatory bowel diseases colitis are 6 times more likely to develop colorectal cancer than the general population **(Bae and Kim 2014)**. In colorectal cancer rodent model, like azoxymethane-initated rats or Apc*Min* mice, induction of inflammation with dextran sulfate sodium (DSS) treatment enhances the number of colorectal tumors **(Sussman *et al.* 2012).** The role of intestinal epithelial cells is to maintain intestinal homeostasis forming an impenetrable barrier to pathogens, under normal situation **(Peterson and Artis 2014)**. Inflammatory bowel diseases are associated with barrier defects and so an increase of intestinal permeability **(Arrieta *et al.* 2006; Edelblum and Turner 2009; Turner 2009)**. Intestinal permeability is regulated directly through alteration of tight junction proteins, or indirectly through effects on the cytoskeleton **(Laukoetter *et al.* 2008)**.

In humans, meat or heme intakes increase plasmatic C-reactive protein, an inflammatory biomarker **(Azadbakht and Esmaillzadeh 2009; de Oliveira Otto *et al.* 2011)**. However, no study has yet shown dietary heme-induced inflammation at intestinal mucosal level. *In vitro* studies have shown that certain food components such as some unsaturated fatty acids, gliadin or sweet and cayenne pepper increased cell permeability. Conversely, quercetin, black tea and black and green pepper decrease cell permeability **(Ulluwishewa *et al.* 2011).** Although dietary component appear to modulate intestinal permeability, no study has investigated the heme effect on this modulation. We speculated that heme could be the link between meat intake, inflammation, intestinal permeability and colorectal cancer risk. We performed two short-term studies, in

rats, to check if heme iron is an intestinal pro-inflammatory agent and if it can increase intestinal permeability.

Materials & Methods

Animals and diets

Animal care was in accordance with the guidelines of the European Council on animals used in experimental studies. Rats were housed individually in metabolic cages. The room was kept at a temperature of 22°C on a 12-h light-dark cycle, and allowed free access to the diets and tap water at pH 3. Body weights were monitored at the beginning, at the middle and at the end of experimental period. In **study 1**, sixteen male Fisher 344 rats were purchased at 5 weeks of age from Charles River. After 5 days of acclimatization, rats were randomly allocated to 2 dietary groups: a control (CON) and hemin (HEM) groups. Rats were fed experimental diets for 14 days. In **study 2**, thirty-two male Fischer 344 rats were purchased at 5 weeks of age from Charles River. After acclimatization, rats were randomly allocated to 4 dietary groups: a control (CON), calcium carbonate (Ca), hemin (HEM) and hemin + calcium carbonate (HEM-Ca) groups. Rats were fed experimental diets for 22 days. All diets were based on a modified standard AIN76 diet, prepared and formulated in a powdered form by UPAE (INRA, Jouy-en-Josas, France) and maintained at -20°C. All diets were balanced for protein (50%), fat (5%) and iron (0,036%) by the addition of casein, safflower oil and ferric citrate respectively. For the 2 studies, hemin groups received the same amount (1.5 µmol/g diet, Sigma Chemical). Calcium level is critical for heme promotion, calcium was thus excluded from mineral mix but dibasic calcium phosphate was included in all diets at a low concentration of 3.4 g/kg. Calcium groups (Ca and HEM-Ca) received 2% of calcium carbonate (Sigma chemical)

Fecal water analysis

Fecal pellets were collected under each cage for 24h after 12-14 days of experimental diets. 1 mL of distilled water and 50 µL of butylated hydroxytoluene 0.45 M were added to 0.5 g of fresh feces. Feces were grinded using Fast-Prep during 3 x 30 s and then centrifuged at 5500 g for 20 min.

TBARs were measured in fecal water according to Ohkawa *et al.* **(Ohkawa *et al.* 1979)**. Ten microliters of fecal water were diluted in 90 µL of distilled water. This sample was mixed with 100 µL of sodium dodecyl sulfate (8.1%) and 1 mL of 2-thiobarbituric acid (TBA, 0.5% in acetic acid 10%). Samples were homogenized and heated at 95°C for 1h. For blanks, TBA was omitted and replaced by 1 mL of acetic acid (10%). After heating, TBARs were extracted with 1 mL of butanol, and then centrifuged for 10 min at 4000 g. The amount of TBARs was determined as malondialdehyde equivalents by measure of the absorbance of the butanol extract at 532 nm against a standard (1,1,3,3-tetramethoxypropane at 0, 100, 200, 400, 600, 800 and 1000 µM).

Heme of fecal water was assayed by fluorescence according to Van den Berg **(Van den Berg *et al.* 1988)**. Briefly, 50 µL of fecal water was diluted in 250 µL of a 5:1 mix of 2-propanol and HCl (1 M). Samples were homogenized, then centrifuged at 10 000g for 10 min. Samples were mixed with 1mL of glacial acetic acid. Subsequently, a mixture of 50 µL of $FeSO_4.7H_2O$ (0.12 M) freshly prepared and HCL (4.5 M) were added. After mixing, the samples were immediately incubated at 60 °C for 30 min. 2 mL of 2-propanol/water (v/v) were added and agitated

before measurement using excitation and emission wavelengths of 409 and 594 nm. Blanks were obtained using the same protocol, but without the incubation at 60°C.

Urinary DHN-MA

The 24-hours urine was collected under each metabolic cage of one rat, 14 days after the beginning of experimental diets. DHN-MA assay was done by competitive enzyme immunoassay as previously described, using DHN-MA-linked acetylcholinesterase enzyme **(Gueraud *et al.* 2006)**.

Colonic paracellular permeability

Colonic paracellular permeability was evaluated using ^{51}Cr-EDTA (Perkin Elmer Life Sciences, Paris, France). After 14 days of experimental diets, animals received an oral administration of 51Cr-EDTA (25.9 kBq) diluted in 0.5 mL of saline by gavage. Rats were then placed in metabolic cages and after 24h, radioactivity in urine was measured with a gamma counter (Cobra II; Packard,Meriden, CT, USA). Permeability to 51Cr-EDTA was expressed as the percentage of total radioactivity administered.

Inflammation assessment

The activity of myeloperoxidase (MPO) in rat distal colon was measured as described earlier. Briefly, samples of distal colon (1 cm) were suspended in a potassium phosphate buffer (50 mM, pH 6.0) and homogenized on ice. Three cycles of freeze-thaw were undertaken. Suspensions were then centrifuged at 10 000 g for 15 min at 4°C. Supernatants were discarded and pellets were resuspended in hexadecyl trimethylammonium bromide buffer (HTAB 0.5% w/v, in 50 mM potassium phosphate buffer, pH 6.0). These suspensions were sonicated on ice, and centrifuged again at 10 000 g for 15 min at 4°C. The supernatants obtained were diluted in potassium phosphate buffer (pH 6.0) containing 0.167 mg/ml of Odianisidin dihydrochloride and 0.0005% of hydrogen peroxide. Myeloperoxidase from human neutrophils (0.1 units per 100 µl) was used as a standard. The kinetic changes in absorbance at 450 nm, every 30s over 6 min, were recorded with a spectrophotometer. One unit of MPO was defined as the quantity of MPO degrading 1 µmol of hydrogen peroxide/min/ml at 25°C. Protein concentration was determined with a commercial kit using a modified method of Lowry (protein Quantitation Kit, Interchim, Montluçon, France). MPO activity was expressed as units per gram of protein.

To evaluate pro-inflammatory (IL1β) and anti-inflammatory (IL10) cytokines, tissue proteins were extracted with RIPA buffer (1% Igepal, 0.5% deoxycholic acid, and 0.1% sodium dodecyl sulfate in Tris-buffered saline 1; pH 7.4) with protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Clear lysates were prepared by centrifugation at 10,000 g for 10 minutes, and protein concentrations were assessed using the BC Assay Uptima kit (Interchim). Samples were then processed for ELISA using commercial kits to determine colonic contents of IL1β and IL10 (Duoset ELISA, R&D Systems, Lille, France) according to the manufacturers' protocols. Data were expressed as concentration per mg of total protein, and determined in duplicate.

Mucosal genotoxicity assessment

Genotoxicity on colon mucosa was evaluated by alkaline comet assay. Colon mucosa cells were collected by scraping and stored in NaCl 0.075 M/EDTA 0.024 M buffer at 7.5 pH before slow freezing at -80°C. After thawing, cells were

mechanically separated using a dounce and NaCl/EDTA buffer. Cells were counted and embedded in 0.7 % Low Melting Point agarose (Sigma) and laid on comet slides (Trevigen). Samples were laid in triplicate. Slides were immersed overnight in a lysis solution (NaCl 2.5 M/EDTA 0.1 M/Tris 10 µM 10 pH/DMSO 10%/Triton 1%). After 40 min for unwinding in electrophoresis buffer (EDTA 2.5 mM/NaOH 0.3M, 13 pH), slides were then transferred into an electrophoresis tank at 28V for 24 min in buffer (EDTA 2.5 mM /NaOH 0.3M). Finally, slides were immersed in a PBS solution for neutralization; cells were fixed using cold absolute ethanol. For DNA staining, 2µg/mL of ethidium bromide is added on each sample and cells are analyzed using a Nikon 50i fluorescence microscope equipped with a camera and the Komet 6.0 software.

Statistical analysis

Data from first study were analyzed by t-test using GraphPad software. Data from the second study were analyzed by analysis of variance (ANOVA) using Systat version 12-software for Windows. All data were reported as means and standard error of the mean (SEM).

Results

Study 1: Heme is a pro-inflammatory agent

After 14-days of experimental diets, control-fed rats (CON) were significantly heavier than hemin-fed rats (HEM) (202 ± 14 vs 186 ± 15 g respectively; p=0.04). There was no difference in food intake between groups.

As expected, hemin-diet fed rats had significantly more fecal heme (311 ± 156 vs 0 ± 6 µM respectively), fecal TBARs (69± 18 vs 23 ± 9 µM respectively, **Figure 1 A**) and urinary DHN-MA (3646 ± 823 vs 146 ± 57 ng/24h respectively, **Figure 1 B**) than control-diet fed rats (All p=0.0001).

We also observed that hemin-diet fed rats had a more inflamed mucosa than control-diet fed rats resulting in a significantly increase of myeloperoxidase activity (148.4 ± 49.7 vs 83.8 ± 30.9 U MPO/g proteins respectively, p=0.008, **Figure 1 C**), a significantly increase of pro-inflammatory IL1β cytokine (61.1 ± 20.2 vs 41.2 ± 5.7 pg/mL proteins respectively, p=0.02, **Figure 1 D**) and a significantly decrease of anti-inflammatory IL10 cytokine (63.3 ± 14.0 vs 107.4 ± 26.4 pg/mL proteins respectively, p=0.001).

Study 2: Heme increased intestinal permeability and mucosal genotoxicity

After 22 days of experimental diets, the mean weight gain of rats fed with diets high in calcium was significantly lower than the weight gain of rats fed with diets low in calcium (189 ± 18 vs 216 ± 11 g for control-diets 204 ± 10 vs 156 ± 17 g for hemin-diets, p<0.0001)

Rats fed hemin-diet enriched with calcium carbonate had a significantly lower plasma hematocrit level compared with rats fed unenriched hemin-diet (41 ± 4 vs 48 ± 2 % respectively, p=0.009) reflecting a weak

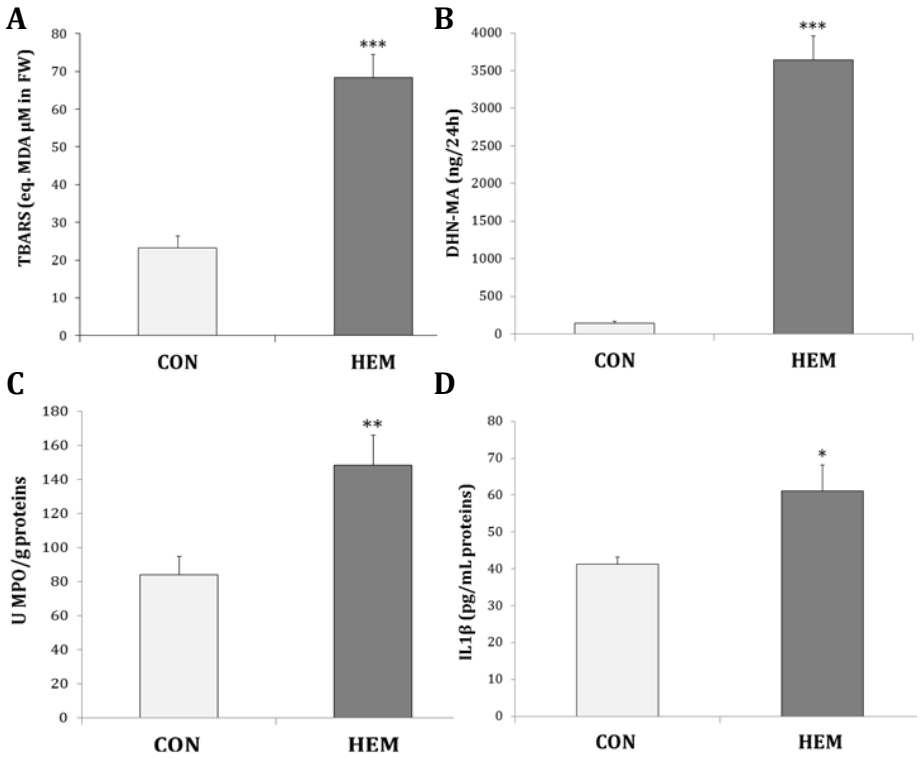

Figure 1: Fecal water TBARs **(A)**, urinary DHN-MA **(B)**, mucosal myeloperoxidase level **(C)**, and mucosal IL1β level **(D)** of rats after 14 days of experimental diets

* p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001

anemia because normal value in rats should be between 46.5 and 62 % (Supplier data). Rats fed control-diet enriched with calcium carbonate were not anemic compared with rats fed unenriched control-diet (47 ± 3 vs 49 ± 2 % respectively, p=0.4).

As expected, hemin-diet fed rats had significantly more fecal heme (337.9 ± 21.1 vs 0.0 ± 0.0 µM respectively), fecal TBARs (81.1 ± 17.9 vs 37.0 ± 10.4 µM respectively, **Figure 2 A**) and urinary DHN-MA (13,304 ± 3,251 vs 254 ± 49 ng/24h respectively) than control-diet fed rats (All p<0.0001). Rats fed hemin-diet enriched with calcium had significantly less fecal heme (307.7 ± 26.4 vs 337.9 ± 21.1 µM respectively, p=0,006), fecal TBARs (44.2 ± 10.6 vs 81.1 ± 17.9 µM respectively, p<0.0001, **Figure 2 A**) and urinary DHN-MA (4,656 ± 2291 vs 13,304 ± 3251 ng/24h respectively, p=0.001) than rats fed hemin-diet unenriched. Rats fed control-diet enriched with calcium had significantly less fecal TBARs (p=0.011) but not less urinary DHN-MA than rats fed with the control-diet unenriched.

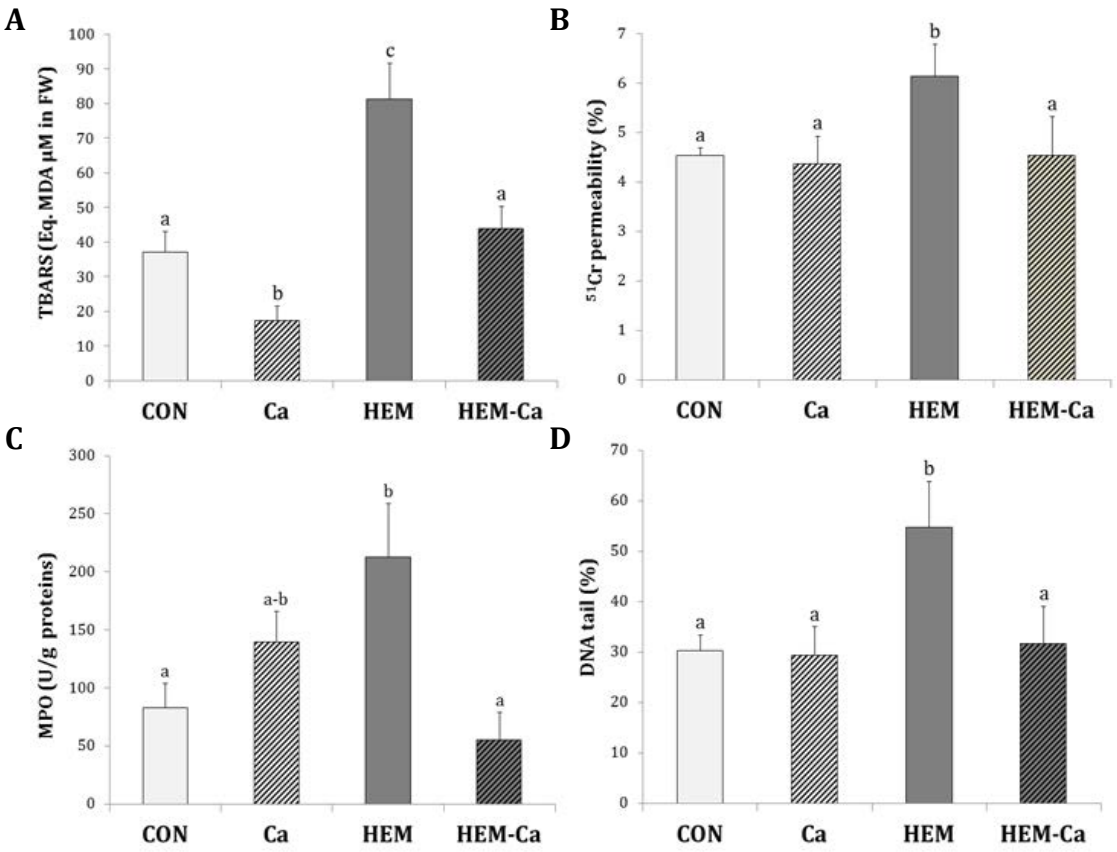

Figure 2: Fecal water TBARs **(A)**, intestinal permeability **(B)**, mucosal myeloperoxidase level **(C)**, and mucosal genotoxicity **(D)** of rats after 12-22 days of experimental diets

Different letter show significantly different group
* p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001

We observed a significant increase of intestinal permeability (6.1 ± 1.8 vs 4.5 ± 0.4 % respectively, p=0.039, **Figure 2 B**), mucosal myeloperoxidase activity (212 ± 114 vs 83 ± 57 U MPO/g proteins respectively, p=0.04, **Figure 2 C**) and mucosal level of genotoxic damages (54.6 ± 22.3 vs 30.3 ± 7.5 %, p=0.016, **Figure 2 D**) in hemin-fed rats compared with control-diet fed rats. Rats fed the high-calcium hemin-diet had significantly lower intestinal permeability (4.5 ± 2.2 vs 6.1 ± 1.8 % respectively, p=0.04, **Figure 2 B**), mucosal myeloperoxidase activity (55.2 ± 62.6 vs 212.4 ± 113.8 U MPO/g proteins respectively, p=0.003, **Figure 2 C**) and mucosal level of genotoxic damages (31.6 ± 16.5 vs 54.6 ± 22.3 % respectively, p=0.027, **Figure 2 D**) compared with rats fed the low-calcium hemin-diet. Finally, calcium alone had no significant effect on intestinal permeability, myeloperoxidase activity and genotoxicity damages level.

Discussion

This study is the first to show that dietary free heme, supplied in the form of hemin chloride, increased intestinal permeability, colonic mucosal inflammation and genotoxicity. The addition of calcium carbonate to the diet, which chelates heme in intestinal lumen, normalized these heme-induced effects.

As in our previous studies **(Pierre *et al.* 2003; Pierre *et al.* 2004; Pierre *et al.* 2006)**, high-heme diet increased lipoperoxidation biomarkers measured by fecal TBARs and urinary DHN-MA **[Figures 1A and 2A]**. Polyunsaturated fatty acids oxidation led to formation of highly reactive compounds, such as aldehydes. The main aldehydes from lipoperoxidation are malondialdehyde (MDA) and 4-hydroxynonenal (4-HNE) **(Marnett 2000)**. These compounds can have deleterious effect on mucosal **(Marnett 2000; Traverso *et al.* 2004; Dalleau *et al.* 2013)**. In carcinogenesis studies increase of lipoperoxidation is associated with an increased number of precancer lesions and tumors **(Pierre *et al.* 2003; Pierre *et al.* 2004)** suggesting that aldehydes formation could explain, at least in part, heme-induced colorectal carcinogenesis **(Bastide *et al.* 2011; Corpet 2011)**.

High-heme diet increased colonic mucosal inflammation with an increase of myeloperoxidase (MPO) activity **[Figures 1C and 2C]**, an increase of pro-inflammatory cytokine IL1β **[Figure 1D]** and a decrease of anti-inflammatory cytokine IL10. Recently, IJssennagger and colleagues fed C57BL6/J mice with 0.5 µmol of heme per gram of diet and did not observe difference in gene expression of MPO and IL1β **(Ijssennagger *et al.* 2013)**. These results differences may be because they have looked at the expression of genes in mice given 0.5 µmol of heme per g of diet while we looked at the protein level in rats given 1.5 µmol per g of diet. As it is the first study to show the colonic mucosal inflammatory effect of heme, we have not causal explanation. However, the pro-inflammatory effect of heme is well known in diseases with increased hemolysis. For example, heme induced neutrophiles and macrophages activation that stimulates inflammatory responses by producing cytokines such as IL1β **(Dutra and Bozza 2014))**. Moreover, α-β unsaturated aldehydes, like HNE, can regulate inflammation by modulating NFκB signaling **(Lee and Park 2013)**. Taking together, these results suggest that heme can induce gut inflammation directly or via aldehydes formation.

High-heme diet increased intestinal permeability measured by radiolabelled chromium-EDTA **[Figure 2B]**. In humans, increased gut permeability is associated with several inflammatory diseases, including inflammatory bowel disease, celiac disease and irritable bowel syndrome **(Camilleri *et al.* 2012)**. Increased gut permeability is explained by a defect of intestinal barrier associated with

alterations of tight junctions **(Piche 2014)**. In this study, we observed an under-expression of junctional adhesion molecule-A (JAM-A) in rats fed with high-heme diet compared to rats fed with control diet (0.7 ± 0.2 vs 1.0 ± 0.3 relative RNAm expression respectively; p=0.03; full data not shown). This result is preliminary and needs to be confirmed with western-blotting. JAM-A is a single-pass transmembrane protein which is expressed in several cells type and especially in epithelial cells **(Martin-Padura *et al.* 1998)**. JAM-A is implicated in cell polarity, cell adhesion, cell migration, angiogenesis and leukocyte migration **(Luissint *et al.* 2014)**. Studies using JAM-A$^{-/-}$ mice have shown that JAM-A is also involved in intestinal permeability, inflammation and proliferation **(Laukoetter *et al.* 2007)**. This result is particularly interesting because our study shows that dietary heme leads to increased intestinal permeability and inflammation and numerous studies have shown that heme intake results in an increased colonic cell proliferation **(Sesink *et al.* 1999- 2000- 2001; de Vogel *et al.* 2005a; de Vogel *et al.* 2005b; de Vogel *et al.* 2008; IJssennagger *et al.* 2012)**. To our knowledge, no study has investigated the *in vivo* effect of heme or aldehydes on intestinal permeability. However, a study has shown, *in vitro*, that HNE increases permeability of human colorectal cancer cells Caco2 **(Cindric *et al.* 2013)**.

High-heme diet increased colonic mucosal genotoxicity measured by comet assay **[Figure 2D]**. Moreover, there was a positive correlation between mucosal genotoxicity and fecal TBARs (Pearson's r=0.862, p=0.006) suggesting that genotoxicity could be explain by heme-induced aldehydes formation. Numerous studies have shown a genotoxic effect of HNE on human colon cancer cells **(Ebert *et al.* 2001; Schaeferhenrich *et al.* 2003; Knoll *et al.* 2005; Glei *et al.* 2006a; Wang *et al.* 2012)** but it appears that no study has investigated the genotoxic effect of aldehydes *in vivo*. In humans, studies have demonstrated that red-meat intake is associated with increased fecal water genotoxicity **(Pearson *et al.* 2009; Hebels *et al.* 2012)**. Fecal water genotoxicity is related to colon carcinogenesis in animals **(Klinder *et al.* 2004)**. In 2006, Glei and colleagues have shown that hemin is genotoxic for human colon cells **(Glei *et al.* 2006b)**. These results suggest that heme iron from red meat could be responsible for genotoxicity directly or via aldehydes formation. Induction of inflammation in mice by dextran-sulfate sodium treatment leads to oxidative stress and DNA damage measuring by comet assay **(Westbrook *et al.* 2011; Trivedi and Jena 2012)**. So, it seems that there is a link between mucosal inflammation and genotoxicity.

Calcium carbonate was used in this study because it is the most efficient calcium salt to chelate hemoglobin or heme from beef in intestinal lumen and because it has no promoting effect **(Allam *et al.* 2010)**. Thus, use of calcium carbonate allows us to confirm involvement of heme and heme-induced

lipoperoxidation on physiological changes. As expected, calcium has reduced heme-induced lipoperoxidation **[Figures 1A and 2A]**. Calcium has also normalized intestinal inflammation, permeability and genotoxicity suggesting that lipoperoxydation could be responsible for these modulations. Importantly, we observed that calcium has no direct effect on intestinal inflammation, permeability and gentoxicity as results in unenriched or calcium enriched control diets are similar. In our previous studies we have shown that calcium carbonate added to beef meat or to processed meat can decrease lipoperoxidation biomarkers in rats and humans **(Pierre *et al.* 2013)**. This result suggests that calcium may be used as a protective nutrient against promotion by heme. However, before making dietary recommendations, we must be sure that addition of calcium carbonate will not decrease iron absorption. Anemia is the most common blood disorder around the world, especially in premenopausal women and children and is mainly caused by iron deficiency **(Nosratnejad *et al.* 2014)**. In this study, we observed that high-calcium hemin-fed rats were anemic while high-calcium controle-diet fed rats fed are not. Both diets being iron balanced, this result suggests that calcium carbonate can chelate heme iron and not ferric citrate. To our knowledge, only two studies in premenopausal women have investigated the effect of calcium carbonate supplementation with heme iron intake **(Sokoll and Dawson-Hughes 1992; Rios-Castillo *et al.* 2014)**. Neither a supplementation of 600 mg of calcium carbonate during 34 days, nor a supplementation of 1000 mg of calcium carbonate during 12 weeks have an effect on heme iron biodisponibility or iron stores. These results, coupled with the fact that in our previous studies we have not observed anemia in rats **(Allam *et al.* 2010; Pierre *et al.* 2013)**, suggest that the used dose of calcium carbonate, in this study, was too high and should be reduced for future studies.

Dietary heme increased intestinal permeability, colonic mucosal inflammation and genotoxicity of rats fed during three weeks. These modulations are probably due to heme-induced aldehydes. Heme could be the link between meat intake, inflammation and colorectal cancer. Carcinogenesis studies are needed to confirm inflammation involvement in the promoting effect of heme iron.

Allam, O., D. Bahuaud, S. Tache, N. Naud, D. E. Corpet and F. H. Pierre (2010). "Calcium carbonate suppresses haem toxicity markers without calcium phosphate side effects on colon carcinogenesis." Br J Nutr **105**(3): 384-92.

Arrieta, M. C., L. Bistritz and J. B. Meddings (2006). "Alterations in intestinal permeability." Gut **55**(10): 1512-20.

Azadbakht, L. and A. Esmaillzadeh (2009). "Red meat intake is associated with metabolic syndrome and the plasma C-reactive protein concentration in women." J Nutr **139**(2): 335-9.

Bae, S. I. and Y. S. Kim (2014). "Colon cancer screening and surveillance in inflammatory bowel disease." Clin Endosc **47**(6): 509-15.

Bastide, N. M., F. H. Pierre and D. E. Corpet (2011). "Heme iron from meat and risk of colorectal cancer: a meta-analysis and a review of the mechanisms involved." Cancer Prev Res (Phila) **4**(2): 177-84.

Camilleri, M., K. Madsen, R. Spiller, B. Greenwood-Van Meerveld and G. N. Verne (2012). "Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease." Neurogastroenterol Motil **24**(6): 503-12.

Cindric, M., A. Cipak, E. Zapletal, M. Jaganjac, L. Milkovic, G. Waeg, S. Stolc, N. Zarkovic and S. Suzana Borovic (2013). "Stobadine attenuates impairment of an intestinal barrier model caused by 4-hydroxynonenal." Toxicol In Vitro **27**(1): 426-32.

Corpet, D. E. (2011). "Red meat and colon cancer: should we become vegetarians, or can we make meat safer?" Meat Sci **89**(3): 310-6.

Dalleau, S., M. Baradat, F. Gueraud and L. Huc (2013). "Cell death and diseases related to oxidative stress: 4-hydroxynonenal (HNE) in the balance." Cell Death Differ **20**(12): 1615-30.

de Oliveira Otto, M. C., A. Alonso, D. H. Lee, G. L. Delclos, N. S. Jenny, R. Jiang, J. A. Lima, E. Symanski, D. R. Jacobs, Jr. and J. A. Nettleton (2011). "Dietary micronutrient intakes are associated with markers of inflammation but not with markers of subclinical atherosclerosis." J Nutr **141**(8): 1508-15.

de Vogel, J., D. S. Jonker-Termont, M. B. Katan and R. van der Meer (2005a). "Natural chlorophyll but not chlorophyllin prevents heme-induced cytotoxic and hyperproliferative effects in rat colon." J Nutr **135**(8): 1995-2000.

de Vogel, J., D. S. Jonker-Termont, E. M. van Lieshout, M. B. Katan and R. van der Meer (2005b). "Green vegetables, red meat and colon cancer: chlorophyll prevents the cytotoxic and hyperproliferative effects of haem in rat colon." Carcinogenesis **26**(2): 387-93.

de Vogel, J., W. B. van-Eck, A. L. Sesink, D. S. Jonker-Termont, J. Kleibeuker and R. van der Meer (2008). "Dietary heme injures surface epithelium resulting in hyperproliferation, inhibition of apoptosis and crypt hyperplasia in rat colon." Carcinogenesis **29**(2): 398-403.

Dutra, F. F. and M. T. Bozza (2014). "Heme on innate immunity and inflammation." Front Pharmacol **5**: 115.

Ebert, M. N., G. Beyer-Sehlmeyer, U. M. Liegibel, T. Kautenburger, T. W. Becker and B. L. Pool-Zobel (2001). "Butyrate induces glutathione S-transferase in human colon cells and protects from genetic damage by 4-hydroxy-2-nonenal." Nutr Cancer **41**(1-2): 156-64.

Edelblum, K. L. and J. R. Turner (2009). "The tight junction in inflammatory disease: communication breakdown." Curr Opin Pharmacol **9**(6): 715-20.

Glei, M., T. Hofmann, K. Kuster, J. Hollmann, M. G. Lindhauer and B. L. Pool-Zobel (2006a). "Both wheat (Triticum aestivum) bran arabinoxylans and gut flora-mediated fermentation products protect human colon cells from genotoxic activities of 4-hydroxynonenal and hydrogen peroxide." J Agric Food Chem **54**(6): 2088-95.

Glei, M., S. Klenow, J. Sauer, U. Wegewitz, K. Richter and B. L. Pool-Zobel (2006b). "Hemoglobin and hemin induce DNA damage in human colon tumor cells HT29 clone 19A and in primary human colonocytes." Mutat Res **594**(1-2): 162-71.

Gueraud, F., G. Peiro, H. Bernard, J. Alary, C. Creminon, L. Debrauwer, E. Rathahao, M. F. Drumare, C. Canlet, J. M. Wal and G. Bories (2006). "Enzyme immunoassay for a urinary metabolite of 4-hydroxynonenal as a marker of lipid peroxidation." Free Radic Biol Med **40**(1): 54-62.

Hebels, D. G., K. M. Sveje, M. C. de Kok, M. H. van Herwijnen, G. G. Kuhnle, L. G. Engels, C. B. Vleugels-Simon, W. G. Mares, M. Pierik, A. A. Masclee, J. C. Kleinjans and T. M. de Kok (2012). "Red meat intake-induced increases in fecal water genotoxicity correlate with pro-carcinogenic gene expression changes in the human colon." Food Chem Toxicol **50**(2): 95-103.

IJssennagger, N., A. Rijnierse, N. de Wit, D. Jonker-Termont, J. Dekker, M. Muller and R. van der Meer (2012). "Dietary haem stimulates epithelial cell turnover by downregulating feedback inhibitors of proliferation in murine colon." Gut **61**(7): 1041-9.

Ijssennagger, N., A. Rijnierse, N. J. de Wit, M. V. Boekschoten, J. Dekker, A. Schonewille, M. Muller and R. van der Meer (2013). "Dietary heme induces acute oxidative stress, but delayed cytotoxicity and compensatory hyperproliferation in mouse colon." Carcinogenesis **34**(7): 1628-35.

Klinder, A., A. Forster, G. Caderni, A. P. Femia and B. L. Pool-Zobel (2004). "Fecal water genotoxicity is predictive of tumor-preventive activities by inulin-like oligofructoses, probiotics (Lactobacillus rhamnosus and Bifidobacterium lactis), and their synbiotic combination." Nutr Cancer **49**(2): 144-55.

Knoll, N., C. Ruhe, S. Veeriah, J. Sauer, M. Glei, E. P. Gallagher and B. L. Pool-Zobel (2005). "Genotoxicity of 4-hydroxy-2-nonenal in human colon tumor cells is associated with cellular levels of glutathione and the modulation of glutathione S-transferase A4 expression by butyrate." Toxicol Sci **86**(1): 27-35.

Laukoetter, M. G., P. Nava, W. Y. Lee, E. A. Severson, C. T. Capaldo, B. A. Babbin, I. R. Williams, M. Koval, E. Peatman, J. A. Campbell, T. S. Dermody, A. Nusrat and C. A. Parkos (2007). "JAM-A regulates permeability and inflammation in the intestine in vivo." J Exp Med **204**(13): 3067-76.

Laukoetter, M. G., P. Nava and A. Nusrat (2008). "Role of the intestinal barrier in inflammatory bowel disease." World J Gastroenterol **14**(3): 401-7.

Lee, S. E. and Y. S. Park (2013). "Role of lipid peroxidation-derived alpha, beta-unsaturated aldehydes in vascular dysfunction." Oxid Med Cell Longev **2013**: 629028.

Luissint, A. C., A. Nusrat and C. A. Parkos (2014). "JAM-related proteins in mucosal homeostasis and inflammation." Semin Immunopathol **36**(2): 211-26.

Marnett, L. J. (2000). "Oxyradicals and DNA damage." Carcinogenesis **21**(3): 361-70.

Martin-Padura, I., S. Lostaglio, M. Schneemann, L. Williams, M. Romano, P. Fruscella, C. Panzeri, A. Stoppacciaro, L. Ruco, A. Villa, D. Simmons and E. Dejana (1998). "Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration." J Cell Biol **142**(1): 117-27.

Nosratnejad, S., E. Barfar, H. Hosseini, E. Barooti and A. Rashidian (2014). "Cost-effectiveness of Anemia Screening in Vulnerable Groups: A Systematic Review." Int J Prev Med **5**(7): 813-9.

Ohkawa, H., N. Ohishi and K. Yagi (1979). "Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction." Anal Biochem **95**(2): 351-8.

Pearson, J. R., C. I. Gill and I. R. Rowland (2009). "Diet, fecal water, and colon cancer--development of a biomarker." Nutr Rev **67**(9): 509-26.

Peterson, L. W. and D. Artis (2014). "Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis." Nat Rev Immunol **14**(3): 141-53.

Piche, T. (2014). "Tight junctions and IBS--the link between epithelial permeability, low-grade inflammation, and symptom generation?" Neurogastroenterol Motil **26**(3): 296-302.

Pierre, F., A. Freeman, S. Tache, R. Van der Meer and D. E. Corpet (2004). "Beef meat and blood sausage promote the formation of azoxymethane-induced mucin-depleted foci and aberrant crypt foci in rat colons." J Nutr **134**(10): 2711-6.

Pierre, F., G. Peiro, S. Tache, A. J. Cross, S. A. Bingham, N. Gasc, G. Gottardi, D. E. Corpet and F. Gueraud (2006). "New marker of colon cancer risk associated with heme intake: 1,4-dihydroxynonane mercapturic acid." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **15**(11): 2274-9.

Pierre, F., R. Santarelli, S. Tache, F. Gueraud and D. E. Corpet (2008). "Beef meat promotion of dimethylhydrazine-induced colorectal carcinogenesis biomarkers is suppressed by dietary calcium." Br J Nutr **99**(5): 1000-6.

Pierre, F., S. Tache, C. R. Petit, R. Van der Meer and D. E. Corpet (2003). "Meat and cancer: haemoglobin and haemin in a low-calcium diet promote colorectal carcinogenesis at the aberrant crypt stage in rats." Carcinogenesis **24**(10): 1683-90.

Pierre, F. H., O. C. Martin, R. L. Santarelli, S. Tache, N. Naud, F. Gueraud, M. Audebert, J. Dupuy, N. Meunier, D. Attaix, J. L. Vendeuvre, S. S. Mirvish, G. C. Kuhnle, N. Cano and D. E. Corpet (2013). "Calcium and alpha-tocopherol suppress cured-meat promotion of chemically induced colon carcinogenesis in rats and reduce associated biomarkers in human volunteers." Am J Clin Nutr **98**(5): 1255-62.

Rios-Castillo, I., M. Olivares, A. Brito, D. L. de Romana and F. Pizarro (2014). "One-month of calcium supplementation does not affect iron bioavailability: a randomized controlled trial." Nutrition **30**(1): 44-8.

Schaeferhenrich, A., G. Beyer-Sehlmeyer, G. Festag, A. Kuechler, N. Haag, A. Weise, T. Liehr, U. Claussen, B. Marian, W. Sendt, J. Scheele and B. L. Pool-Zobel (2003). "Human adenoma cells are highly susceptible to the genotoxic action of 4-hydroxy-2-nonenal." Mutat Res **526**(1-2): 19-32.

Sesink, A. L., D. S. Termont, J. H. Kleibeuker and R. Van der Meer (1999). "Red meat and colon cancer: the cytotoxic and hyperproliferative effects of dietary heme." Cancer Res **59**(22): 5704-9.

Sesink, A. L., D. S. Termont, J. H. Kleibeuker and R. Van Der Meer (2000). "Red meat and colon cancer: dietary haem, but not fat, has cytotoxic and hyperproliferative effects on rat colonic epithelium." Carcinogenesis **21**(10): 1909-15.

Sesink, A. L., D. S. Termont, J. H. Kleibeuker and R. Van der Meer (2001). "Red meat and colon cancer: dietary haem-induced colonic cytotoxicity and epithelial hyperproliferation are inhibited by calcium." Carcinogenesis **22**(10): 1653-9.

Sokoll, L. J. and B. Dawson-Hughes (1992). "Calcium supplementation and plasma ferritin concentrations in premenopausal women." Am J Clin Nutr **56**(6): 1045-8.

Sussman, D. A., R. Santaolalla, S. Strobel, R. Dheer and M. T. Abreu (2012). "Cancer in inflammatory bowel disease: lessons from animal models." Curr Opin Gastroenterol **28**(4): 327-33.

Traverso, N., S. Menini, E. P. Maineri, S. Patriarca, P. Odetti, D. Cottalasso, U. M. Marinari and M. A. Pronzato (2004). "Malondialdehyde, a lipoperoxidation-derived aldehyde, can bring about secondary oxidative damage to proteins." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **59**(9): B890-5.

Trivedi, P. P. and G. B. Jena (2012). "Dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis leads to increased hematopoiesis and induces both local as well as systemic genotoxicity in mice." Mutat Res **744**(2): 172-83.

Turner, J. R. (2009). "Intestinal mucosal barrier function in health and disease." Nat Rev Immunol **9**(11): 799-809.

Ulluwishewa, D., R. C. Anderson, W. C. McNabb, P. J. Moughan, J. M. Wells and N. C. Roy (2011). "Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary components." J Nutr **141**(5): 769-76.

Wang, X., Y. Yang, D. R. Moore, S. L. Nimmo, S. A. Lightfoot and M. M. Huycke (2012). "4-hydroxy-2-nonenal mediates genotoxicity and bystander effects caused by Enterococcus faecalis-infected macrophages." Gastroenterology **142**(3): 543-551 e7.

WCRF/AICR (2007). Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. Washington DC: AICR, 2007.

WCRF/AICR (2010). Continuous Update Project Report. Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Colorectal Cancer.

Westbrook, A. M., B. Wei, J. Braun and R. H. Schiestl (2011). "Intestinal inflammation induces genotoxicity to extraintestinal tissues and cell types in mice." Int J Cancer **129**(8): 1815-25.

DISCUSSION

Cette étude est la première à montrer que le fer héminique alimentaire libre augmente la perméabilité intestinale, l'inflammation et la génotoxicité de la muqueuse. Ces augmentations sont associées positivement à la lipoperoxydation hème-induite, elle-même associée à la cancérogenèse colorectale dans le modèle rat **(Pierre *et al.* 2003,2004)**. Lorsque l'hème est chélaté dans la lumière intestinale, par l'ajout de calcium dans le régime, les paramètres observés sont normalisés. Ces résultats suggèrent que l'hème, directement ou *via* la formation d'aldéhydes, est responsable de l'augmentation de l'inflammation, de la perméabilité et de la génotoxicité de la muqueuse colique.

Un régime riche en hème augmente l'**inflammation** de la muqueuse colique *via* l'augmentation de la myeloperoxydase, qui reflète le recrutement des neutrophiles sur le site d'une infection, et de la cytokine pro-inflammatoire IL1β **[Figures 1C-D, 2C]**. A notre connaissance, aucune étude n'a regardé l'effet pro-inflammatoire de l'hème au niveau intestinal. Des études ont cependant montré que l'hème pouvait être responsable du recrutement de neutrophiles et de macrophages qui stimuleraient la réponse inflammatoire en produisant des cytokines comme l'IL1β **(Dutra and Bozza 2014)**. Nos résultats confirmeraient donc ces travaux au niveau de la muqueuse colique. De plus, les aldéhydes insaturés, comme le HNE, peuvent réguler l'inflammation en modulant la voie NFκB **(Lee and Park 2013)**.

L'augmentation de la **perméabilité** intestinale pourrait être expliquée par une altération des protéines de jonction serrées. En effet, nous avons observé, en qPCR, une sous-expression de JAM-A (*Junctional adhesion molecule-A*) chez les rats nourris avec de l'hème (0,7 ± 0,2 vs 1,0 ± 0,3 expression relative d'ARNm respectivement ; p=0,03 ; données non présentées). Ce résultat est préliminaire et nécessite d'être confirmé par des western-blot. JAM-A est une protéine transmembranaire qui est impliqué dans la perméabilité intestinale mais également dans l'inflammation et la prolifération **(Laukoetter *et al.* 2007)**. Par ailleurs, une étude *in vitro* a montré que le HNE pouvait augmenter la perméabilité intestinale de cellules cancéreuses humaines **(Cindric *et al.* 2013)**.

Nous avons observé une corrélation significative entre la **génotoxicité** des cellules de la muqueuse colique et les TBARs fécaux (coefficient de Pearson = 0,86 ; p=0,006), suggérant que la formation d'aldéhydes est responsable de la génotoxicité. Des études *in vitro* ont également montré des effets génotoxiques d'aldéhydes, tels que le HNE **(Ebert *et al.* 2001 ; Schaeferhenrich *et al.* 2003 ; Knoll *et al.* 2005 ; Glei *et al.* 2006a ; Wang *et al.* 2012)**. De plus, d'autres études *in vitro* ont montré un effet génotoxique direct de l'hème **(Glei *et al.* 2006b)**. Enfin, la génotoxicité observée au niveau

de la muqueuse colique pourrait être induite par l'inflammation. En effet, nous avons observé un recrutement de neutrophiles et une production d'IL1β mucosale, ces paramètres pouvant induire des effets génotoxiques **(Elinav *et al.* 2013)**. Chez l'homme, des études ont montré que la consommation de viande rouge est associée à une augmentation de la génotoxicité de l'eau fécale **(Hebels *et al.* 2012 ; Pearson *et al.* 2009)**. La génotoxicité de l'eau fécale est associé au cancer du côlon dans les modèles animaux **(Klinder *et al.* 2004)**.

En conclusion, cette étude montre que le fer héminique alimentaire augmente la perméabilité intestinale, l'inflammation et la génotoxicité de la muqueuse colique *via* un effet direct ou *via* la formation d'aldéhydes. Ainsi, la perméabilité, l'inflammation et la génotoxicité pourraient être de nouveaux mécanismes expliquant l'effet promoteur de l'hème. Des études sont, cependant, nécessaires pour mieux caractériser la part des aldéhydes dans ces modulations.

Résultats préliminaires *in vitro*

Les aldéhydes sont-ils responsables des modulations induites par la consommation de fer héminique ?

L'objectif de ces travaux est de mettre en place des outils *in vitro* qui puissent être représentatifs des résultats obtenus *in vivo* tout en mettant en avant l'implication des aldéhydes. Pour ce faire nous utilisons les eaux fécales des rats ayant consommé les régimes contrôle (CON) et riche en hémine (HEM). Ces eaux fécales ont été mises en contact avec des billes de polymères pour piéger les aldéhydes. Ce traitement nous permet de comparer l'effet des eaux fécales natives ou déplétées en aldéhydes, afin de démontrer le rôle de ceux-ci. Des cellules normales $Apc^{+/+}$ sont exposées à ces eaux fécales et soumises à différents tests qui correspondent, *in vitro*, aux résultats obtenus *in vivo*. Nous utilisons les cellules normales $Apc^{+/+}$ puisque dans le modèle animal utilisé les cellules ne sont pas mutées. Ces résultats sont préliminaires, certains outils restant à mettre au point. Le détail des méthodes est présenté en ***Annexe 2 p188***.

1) Efficacité du piégeage des aldéhydes par le traitement aux billes

Dans un premier temps, nous avons vérifié l'efficacité du traitement avec un dosage des TBARs. Comme attendu, nous avons observé une diminution de près de 70% des aldéhydes présents dans les eaux fécales du groupe HEM après le traitement aux billes (81,1 ± 17,9 *vs* 26,2 ± 7,2 µM

équivalent MDA respectivement ; p<0,0001) et de 60% pour le groupe CON (37,0 ± 10,4 *vs* 14,6 ± 6,6 µM équivalent MDA respectivement ; p<0,0001).

Par ailleurs, les aldéhydes sont responsables de la cytotoxicité des cellules **(Awasthi *et al.* 2003)**. Nous avons donc réalisé des tests MTT et nous avons observé que le traitement aux billes permet de diminuer totalement la cytotoxicité des eaux fécales CON au 10ème (86 ± 29 *vs* 0 ± 15 % de cellules morte ; p<0,0001) et de diminuer de 92% la cytotoxicité des eaux fécales HEM au 80ème (80 ± 41 *vs* 6 ± 31 % de cellules morte ; p<0,0001).

2) Mesure de la perméabilité cellulaire

In vivo, nous avons vu que le régime riche en hème augmentait la perméabilité intestinale. La mesure de la perméabilité cellulaire peut se faire *in vitro* par la mesure de la résistance trans-épithéliale (TEER) **(Le Ferrec *et al.* 2001)**. Ainsi, une diminution de la résistance trans-épithéliale traduit une augmentation de la perméabilité cellulaire. Je suis, pour le moment, encore en train de mettre au point la technique puisqu'elle n'était pas utilisée avant dans l'équipe. J'ai réalisé différents tests afin de voir quel protocole était le plus robuste pour l'étude de la TEER avec l'appareil acquis (CellZscope) et sur nos cellules.

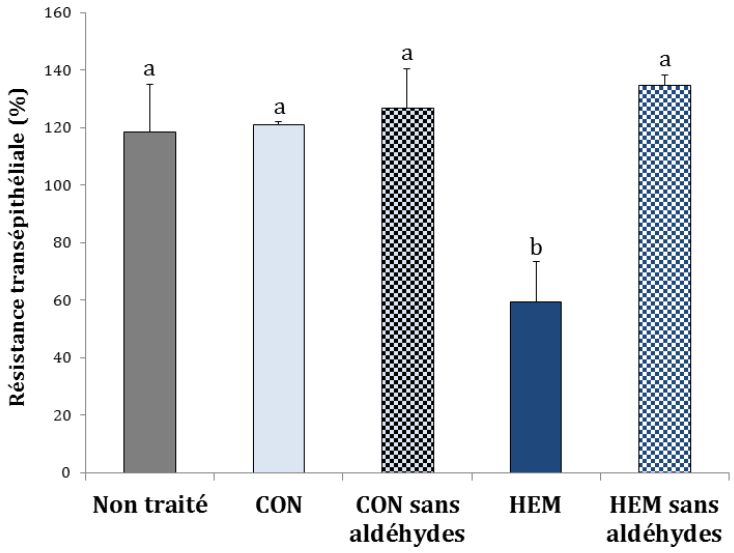

Figure 40 : Mesure de la résistance trans-épithéliale des cellules Apc$^{+/+}$ exposées pendant 48h aux eaux fécales des rats soumis aux régimes expérimentaux CON et HEM

(Moyenne ± SEM, n=2)

La **Figure 40** présente les résultats d'un des essais pour lequel les eaux fécales ont été diluées au 160ème dans du DMEM. De manière intéressante nous pouvons voir que la TEER des cellules non

traitées est identique à la TEER des cellules traitées aux eaux fécales des rats ayant consommé le régime contrôle sans hème (CON). De plus, j'ai observé une diminution significative de la TEER lorsque les cellules sont exposées pendant 48h aux eaux fécales des rats ayant consommé le régime riche en hème (HEM) (p=0,013). Enfin, nous pouvons observer que le piégeage des aldéhydes des eaux fécales du groupe HEM permet de rétablir la TEER (HEM sans aldéhydes) (p=0,006). Ces résultats, bien que devant être confirmés, semblent suggérer qu'il est possible de mimer *in vitro* l'augmentation de la perméabilité induite par le fer héminique et que les aldéhydes semblent être responsables de cette augmentation de la perméabilité.

3) Génotoxicité des eaux fécales

In vivo, nous avons observé qu'un régime riche en hème augmentait significativement la génotoxicité de la muqueuse intestinale. Nous avons voulu vérifier *in vitro* le pouvoir génotoxique des eaux fécales avec ou sans aldéhydes afin de déterminer si cette activité génotoxique est dépendante des aldéhydes **[Figure 41]**.

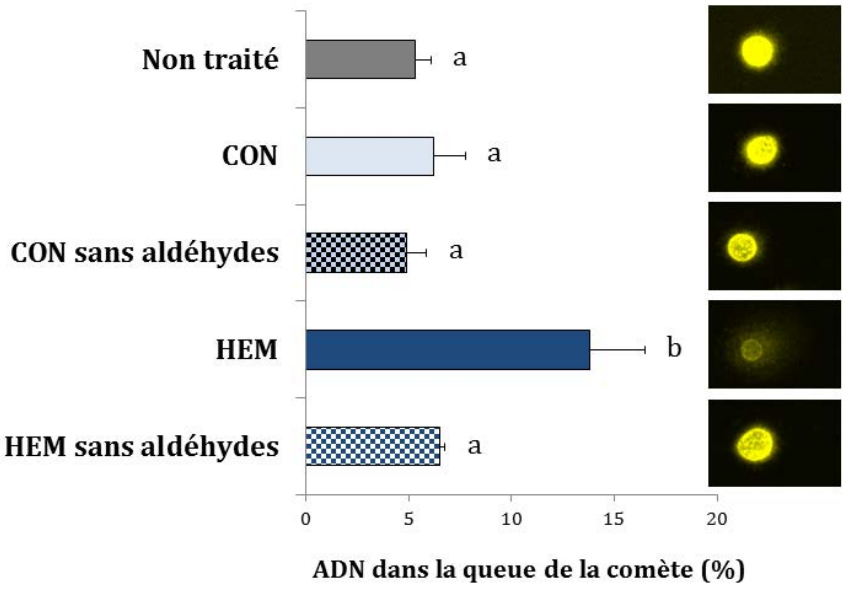

Figure 41 : Valeurs de génotoxicité obtenues sur les cellules $Apc^{+/+}$ exposées pendant 24h aux eaux fécales des rats soumis aux régimes expérimentaux CON et HEM

(Moyenne ± SEM, n=3)

Les valeurs de génotoxicité ont été obtenues par des tests de comètes. Nous pouvons observer que le taux de dommages entre les cellules non traitées, traitées aux eaux fécales CON et aux eaux fécales CON déplétées en aldéhydes sont similaires. Les eaux fécales du groupe HEM sont

plus génotoxiques que les eaux fécales du groupe CON (p=0,008). L'absence d'aldéhydes dans les eaux fécales du groupe HEM permet de normaliser cette génotoxicité (p=0,017). Ainsi, les aldéhydes semblent être responsables de la génotoxicité des cellules $Apc^{+/+}$ induite par le fer héminique présent dans les eaux fécales HEM.

4) Conclusions des résultats préliminaires

Ces premiers résultats montrent qu'il est possible de mimer *in vitro* les résultats obtenus *in vivo*. Ils mettent également en évidence le rôle des aldéhydes dans la perméabilité et la génotoxicité induites par le fer héminique. Ces tests seront refaits afin d'obtenir des statistiques robustes.

Afin de s'assurer que l'augmentation de la génotoxicité et la diminution de la TEER observées dans le groupe HEM ne sont pas dues à de la mortalité cellulaire, des tests de viabilité par des comptages de noyaux au DAPI seront effectués.

Concernant la part de l'inflammation, nous avons observé *in vivo* qu'un régime riche en hème augmente l'inflammation de la muqueuse colique. Nous allons donc analyser les marqueurs d'inflammation produits par les cellules lorsqu'elles sont exposées aux eaux fécales. Nous allons également réaliser des marquages immunofluorescents des protéines des jonctions serrées (JAM-A, occludine, claudine, ZO) afin de vérifier si l'augmentation de la perméabilité cellulaire passe par une altération des jonctions serrées.

DISCUSSION & PERSPECTIVES

Les études épidémiologiques montrent une association positive entre consommation de viandes rouges et de charcuterie et risque de cancer colorectal **(WCRF/AICR 2010)** et entre consommation de fer héminique, très riche dans les viandes rouges, et risque de cancer colorectal **(Qiao and Feng 2013)**. La consommation de viande rouge ou de charcuterie aboutit à la libération de fer héminique dans l'estomac **(Omar *et al.* 2006)**. Une petite partie de ce fer héminique va être absorbé par les entérocytes du début de l'intestin grêle **(Han 2011)**. Cependant, la majorité va se retrouver au niveau colique **(West and Oates 2008)**. L'hème peut catalyser deux types de réactions : la peroxydation des acides gras alimentaires ou la formation de composés *N*-nitrosés **(Bastide *et al.* 2011)**. Ces réactions peuvent se dérouler dans l'aliment ou tout au long du tractus digestif.

I. Principaux résultats de la thèse

Les principaux résultats de la thèse sont présentés dans la **Figure 42**.

1) Validation de l'effet promoteur de produits à base de viande

L'association entre le risque de cancer colorectal et la consommation de produits à base de viande est donnée par les études épidémiologiques. Cependant, elle doit être validée dans des modèles animaux adaptés **(WCRF/AICR 2007)**. Le projet SécuriViande avait pour objectif de valider cette association dans deux modèles animaux de cancérogenèse : le rat chimio-induit et la souris *Min*, mutée sur le gène *Apc*.

Viande rouge : Nous avons montré, pour la première fois, qu'une viande de bœuf fraîche était promotrice de la cancérogenèse colorectale au stade des lésions précancéreuses et au stade tumoral. Cet effet promoteur est associé aux teneurs en hème et en produits de lipoperoxydation fécaux confirmant que l'effet promoteur de la viande rouge passe par l'oxydation des acides gras alimentaires.

Charcuterie : Nous avons montré, pour la première fois, qu'une charcuterie modèle était promotrice de la cancérogenèse colorectale au stade tumoral. Cet effet promoteur est associé à la formation de composés *N*-nitrosés, et notamment de fer nitrosylé (FeNO) et non à la formation de produits le lipoperoxydation. Ce résultat suggère que la formation de composés *N*-nitrosés est suffisante pour induire l'effet promoteur observé lors de la consommation de charcuterie.

2) Recherche de prévention par la modification des produits

Des études ont montré que les personnes consommant le plus de viande rouge et de charcuterie étaient également les moins réceptives aux messages nutritionnels **(Raude 2008; INCA-2 2009)**. Le deuxième objectif du projet SécuriViande était donc de trouver de nouveaux modes de production industrielle afin de mettre sur le marché des produits à base de viande plus sains vis-à-vis du risque sans avoir besoin de changer les habitudes des consommateurs. Nous avons ainsi pu mettre en évidence, que mariner sa viande bovine avec un mélange de raisin-olive était efficace pour diminuer le nombre de lésions précancéreuses et la lipoperoxydation associée. Cette marinade est en accord avec les techniques couramment utilisées dans l'industrie. Cependant, cet effet protecteur de la cancérogenèse ne s'est observé que dans un des deux modèles utilisés et ne semble pas être spécifique de l'effet de la viande. Des études complémentaires sont donc nécessaires afin de déterminer si cette technique peut être utilisée pour contrer l'effet promoteur de la viande.

3) Implication du microbiote dans la lipoperoxydation induite par le fer héminique

Un des objectifs de ma thèse était de prendre en compte les partenaires de l'écosystème digestif qui peuvent être amenés à être en interaction avec le fer héminique. Deux études court-terme chez le rat, traité ou non avec un cocktail d'antibiotiques, ont permis de montrer que le microbiote est impliqué dans la lipoperoxydation induite par le fer héminique.

4) Effet du fer héminique sur l'inflammation, la perméabilité et la génotoxicité de la muqueuse colique

Enfin, je me suis intéressée aux conséquences de la consommation de fer héminique sur la muqueuse colique en termes d'inflammation, de perméabilité et de génotoxicité. Deux études court terme, chez le rat, ont permis de mettre en évidence que le fer héminique alimentaire était un agent pro-inflammatoire. De plus, la consommation d'hème induit une augmentation de la perméabilité intestinale et de la génotoxicité de la muqueuse colique. Les études *in vitro* réalisées à partir des échantillons issus des expérimentations *in vivo* montrent que les aldéhydes sont impliqués dans la perméabilité et la génotoxicité cellulaire.

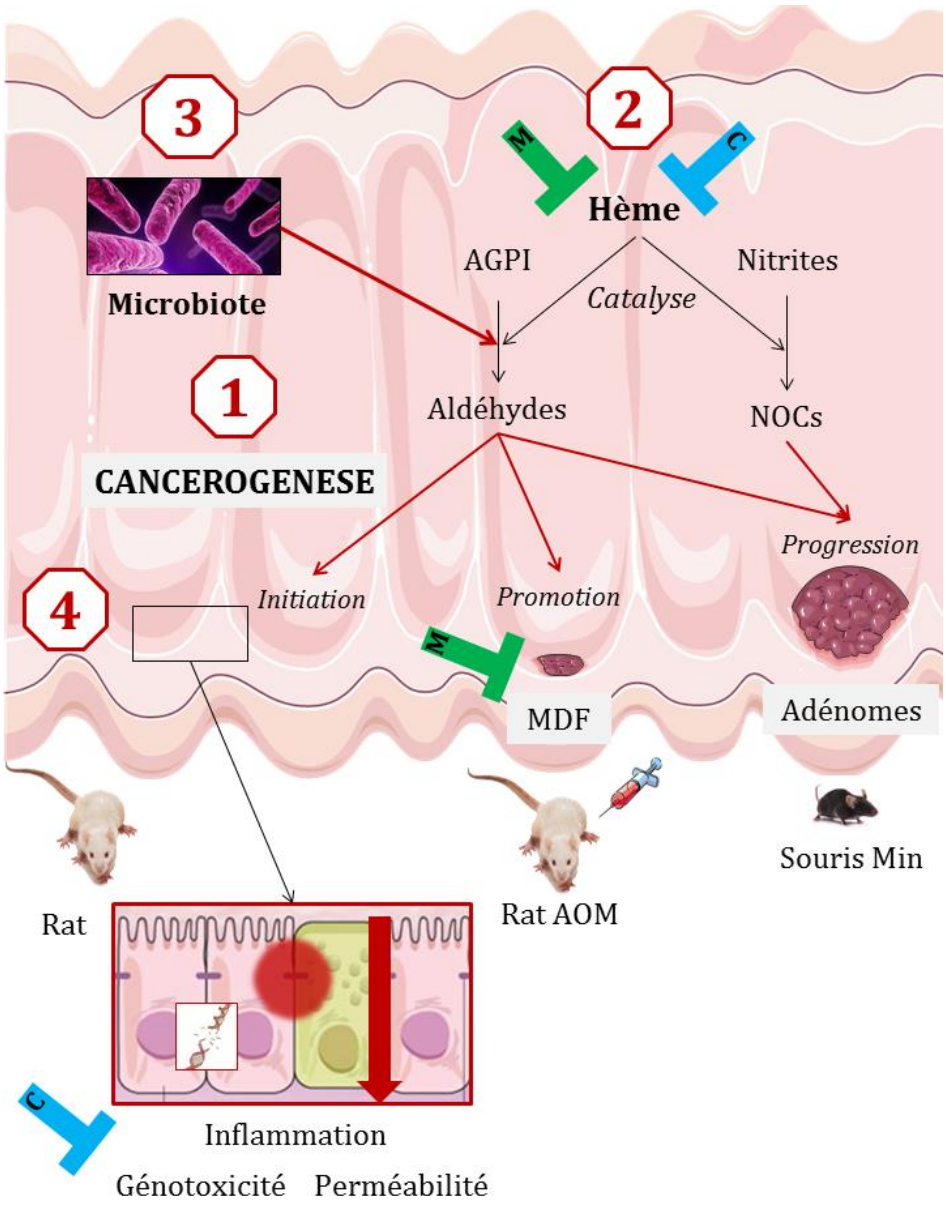

Figure 42 : Principaux résultats de la thèse

1 : Le fer héminique issu des viandes rouges et des charcuteries, *via* la formation de produits de lipoperoxydation ou de composés *N*-nitrosés, induit la promotion de la cancérogenèse colorectale au stade des lésions précancéreuses et au stade tumoral.
2 : Mariner la viande de bœuf avec un mélange raisin-olive permet de diminuer le nombre de lésions précancéreuses chez le rat chimio-induit. Cette protection est associée à une diminution de l'hème et des produits de lipoperoxydation fécaux et urinaires.
3 : Le microbiote est impliqué dans la lipoperoxydation induite par le fer héminique.
4 : La consommation de fer héminique induit une augmentation de l'inflammation, de la perméabilité et de la génotoxicité de la muqueuse colique. La formation d'aldéhydes, favorisée par le fer héminique, semble expliquer ces modulations. Le calcium, en piégeant l'hème dans la lumière intestinale, permet de rétablir l'inflammation, la perméabilité et la génotoxicité induite par le fer héminique.

C : calcium, M : marinade, AGPI : acides gras polyinsaturés, NOCs : composés *N*-nitrosés, MDF : foyers déplétés en mucine.

II. Critiques des méthodes et modèles utilisés

1) Stratégies d'étude suivies

La stratégie mise en place par l'équipe PPCA est, à mon sens, cohérente. Pour rappel sur la démarche de complexification progressive : chaque nouvelle hypothèse est testée, dans un premier temps, par des études court-terme de 15 jours chez le rat non initié et avec des régimes alimentaires enrichis en molécules purifiées. Puis si l'hypothèse semble étayée par ces études de courte durée, nous réalisons des expérimentations de cancérogenèse sur des animaux modèles et en complexifiant la matrice alimentaire afin de se rapprocher au maximum de ce qui est consommé par l'homme. Cette démarche est possible grâce à la mise en évidence de biomarqueurs associés à la cancérogenèse colorectale induite par le fer héminique dans nos modèles animaux, comme la formation de lipoperoxydes, de composés *N*-nitrosés dans les eaux fécales ou encore la cytotoxicité de ces eaux fécales **(Pierre *et al.* 2003,2004,2006)**.

Cependant, cette démarche pose la question de la prédictivité des études court-terme. Globalement, parmi les différentes études réalisées par l'équipe, les résultats entre court-terme et long-terme sont cohérents **(Santarelli *et al.* 2010 ; Pierre *et al.* 2013)**. Néanmoins, dans certains cas nous retrouvons des différences entre les deux types d'études. Par exemple, l'ajout de grenade dans la charcuterie du projet SécuriViande (Chapitre 1) a abouti dans l'étude court-terme à une réduction d'un facteur 2 de la formation des NOCs mais n'a pas modulé cette formation dans les deux études long-terme. Je me suis donc interrogée sur les causes qui pouvaient amener de telles différences et en ai identifié trois : **(i)** la variabilité de la matrice alimentaire, **(ii)** les conséquences de la maladie et/ou **(iii)** la variabilité de l'écosystème colique des animaux.

(i) Variabilité de la matrice alimentaire

La variabilité de la matrice alimentaire peut effectivement conduire à des modifications de résultats entre les études. Pour le projet SécuriViande, trois lots de viandes et de charcuteries ont été fabriqués par les industriels : un pour l'étude court-terme (nous l'appellerons *Lot 1*), un pour les 2 études de cancérogenèse (*Lot 2*) et un troisième pour les études chez l'homme (*Lot 3*, nous reviendrons sur l'étude chez l'homme dans la partie perspective). Afin de ne pas amener de différences entre ces trois lots, des protocoles stricts ont été établis et suivis. Pour les viandes rouges, les lots 1 et 3 ont été caractérisés et pour la charcuterie tous les lots ont été caractérisés. Malgré toute l'attention portée, des différences entre les lots peuvent être soulignées. Par exemple, pour les viandes rouges, la cuisson augmente les TBARs dans les viandes marinées pour le lot 1 alors qu'elle les diminue dans le lot 3. Pour la charcuterie, les valeurs de TBARs de la charcuterie enrichie en tocophérol sont supérieures à la charcuterie témoin dans les lots 1 et 2 mais sont inférieures dans le lot 3. Ainsi, pour la rédaction des articles mais également pour la

fiabilité des conclusions, je pense qu'il sera nécessaire de prendre en compte la caractérisation des aliments pour établir des corrélations avec les résultats obtenus *in vivo*. En conséquence, la caractérisation des viandes bovines utilisées dans les études de cancérogenèse (Lot 2) devrait être effectuée.

(ii) Conséquence de la cancérogenèse

Un autre paramètre pourrait expliquer les différences entre les études, il s'agit des conséquences amenées par le développement de la cancérogenèse colorectale. Dans ce cas, nous pouvons supposer que les différences sont également retrouvées chez l'homme et que nos études nous permettent de nous placer à deux stades différents. Les études court-terme miment une situation non pathologique, avant le développement de la maladie tandis que nos études long-terme miment des situations pathologiques à différents stades grâce à l'utilisation du rat initié ou de la souris *Min*. Parmi les conséquences induites par le cancer colorectal, nous pouvons citer la modification du microbiote caractérisée par une augmentation des espèces appartenant au *Bacteroides* et *Prevotella* **(Sobhani *et al.* 2011)**. De par l'implication du microbiote dans la lipoperoxydation induite par l'hème il serait intéressant de caractériser la modification éventuelle de microbiote entre rat non initié ou initié et souris C57BL6 classique ou *Min* afin de voir si les conséquences de la maladie sont identiques chez l'homme atteint de cancer colorectal et dans nos modèles animaux.

(iii) Variabilité de l'écosystème colique

Nous l'avons vu dans l'introduction du chapitre 2, le microbiote intestinal peut être modulé par de nombreux facteurs dont l'alimentation **(Sekirov *et al.* 2010)**. Cependant, nous pouvons nous demander si, lors de nos expérimentations de 15 jours, la composition et la densité du microbiote a atteint sa phase de stabilité. Prenons l'exemple de la production d'acides gras à chaine courte (AGCC) qui est dépendante des bactéries du microbiote. Dans le cadre d'un régime riche en amidon, la production d'AGCC n'est stabilisée qu'à partir de 44 jours. Or l'effet protecteur des fibres ne s'observe que lorsque la production d'AGCC est stable **(Perrin *et al.* 2001)**. Ainsi, les 15 jours des expérimentations court-terme sont peut-être insuffisants pour obtenir une modification stable du microbiote par le fer héminique, ce qui pourrait avoir des conséquences sur les analyses effectuées.

2) Pondération des hypothèses de lipoperoxydation et de nitrosation hème-induite

Les différents travaux de l'équipe PPCA suggèrent que la lipoperoxydation est la voie principale pour expliquer la promotion par la viande rouge tandis que la nitrosation est la voie principale pour les charcuteries **(Corpet 2011b)**.

Dans le cas de la **viande rouge**, et sur les modèles rongeurs que nous avons utilisés, la consommation de viande de bœuf était associée à l'augmentation de produits de lipoperoxydation fécaux et urinaires et non à la formation de composés *N*-nitrosés (données non présentées). Ce résultat conforte l'hypothèse selon laquelle la promotion de la cancérogenèse induite par la consommation de viande de bœuf passe principalement par l'oxydation des lipides alimentaires **(Sawa *et al.* 1998 ; Pierre *et al.* 2004,2006)**. Cependant, chez l'homme, la formation de composés *N*-nitrosés catalysée par l'hème n'est pas à négliger puisque la consommation de viande rouge ou d'hème entraine une augmentation importante de ces composés au niveau fécal **(Bingham *et al.* 1996 ; Cross *et al.* 2003)**. Cette augmentation semble être expliquée par une formation endogène puisque 600 g de viande rouge n'apportent que 13 µg de composés *N*-nitrosés fécaux **(Silvester *et al.* 1997)**. La différence observée entre les modèles rongeurs et l'homme pourrait-être expliquée par :

- Le faible taux de nitrates et de nitrites dans la salive du rongeur **(Djekoun-Bensoltane *et al.* 2007)** contrairement à l'homme grâce au cycle entéro-salivaire des nitrites **(Mirvish *et al.* 2000)**.
- Une différence de microbiote entre rongeur et homme. La consommation de viande rouge chez des rats possédant une flore humaine conduit à une augmentation des composés *N*-nitrosés fécaux **(Rumney *et al.* 1993)**.

Ainsi, l'absence de nitrites dans la salive de nos modèles, nous fait arbitrairement favoriser l'hypothèse de la lipoperoxydation et nous fait probablement sous-estimer l'effet promoteur de la viande rouge chez le rongeur par rapport à celui chez l'homme. Dans ce sens, une étude récente de l'équipe PPCA, dans laquelle des nitrites et des nitrates ont été ajoutés dans l'eau de boisson des animaux afin de mimer le cycle entérosalivaire de l'homme, a montré que les rats ayant reçu un régime riche en hémoglobine avec les nitrates-nitrites avaient plus de MDF que les rats n'ayant reçu que de l'hémoglobine cependant sans effet significatif du facteur « nitrite ». Cette étude a également permis de montrer que les composés *N*-nitrosés totaux n'étaient pas associés à la cancérogenèse colorectale contrairement au fer nitrosylé (FeNO) mais non de manière dose dépendante **(Bastide *et al.* 2014)**. Ce résultat devrait être confirmé dans une expérimentation long-terme utilisant de la viande de bœuf fraiche et des nitrites/nitrates dans l'eau de boisson. Ainsi, s'il est maintenant bien démontré que l'effet promoteur de la viande de

bœuf passe par la peroxydation des acides gras alimentaires, il faudra répondre à la question de l'implication de l'hème nitrosylé chez l'homme.

La consommation de **charcuterie** induit la formation de produits terminaux de lipoperoxydation et de composés *N*-nitrosés en raison de la présence de nitrites dans la charcuterie. Le précédent projet ANR de l'équipe PPCA a montré que le blocage de la lipoperoxydation seule ne permet pas de diminuer l'effet promoteur induit par la consommation de charcuterie contrairement au blocage de la nitrosylation **(Pierre *et al.* 2013)**. Ce résultat suggère que la formation de composés *N*-nitrosés est primordiale pour expliquer l'effet promoteur de la charcuterie. De plus, dans le projet SécuriViande, nous avons mis en évidence que l'effet promoteur de la charcuterie chez la souris *Min* était associée à la formation de NOCs et plus particulièrement de FeNO et non à la formation de lipoperoxydes. Ainsi, la formation de composés *N*-nitrosés est nécessaire et suffisante pour expliquer l'effet promoteur de la charcuterie. Cependant, l'absence de nitrites dans nos modèles animaux sous-estime peut-être l'effet promoteur des charcuteries vis-à-vis du risque réel chez l'homme comme nous l'avons évoqué plus haut pour les viandes rouges. Dans ce sens, une expérimentation de cancérogenèse avec de la charcuterie et des nitrites et nitrates dans l'eau de boisson serait à envisager.

3) Modèles utilisés

Le rat initié par un cancérigène et la souris *Min* sont des modèles admis et très utilisés de cancérogenèse colorectale. Ils permettent de mettre en avant aussi bien un effet promoteur que préventeur et peuvent être utilisés comme modèle préclinique avant des phases chez l'homme **(Corpet and Pierre 2005)**. Comme nous l'avons vu dans l'introduction chaque modèle possède des avantages et des inconvénients d'où la nécessité de les utiliser de manière complémentaire.

a. Le rat chimio-induit à l'AOM

La différence majeure entre le rat initié à l'azoxyméthane (AOM) et l'homme est l'absence de la mutation *Apc* dans le modèle rat AOM. En effet, plus de 80 % des cas de cancers colorectaux chez l'homme présentent la mutation du gène *Apc* **(Perse and Cerar 2011)**. Chez le rat AOM, seulement 8% des adénocarcinomes possèdent une mutation d'*Apc*, la majorité des mutations étant retrouvées sur *K-ras* et *β-caténine* **(Takahashi and Wakabayashi 2004)**. D'un autre côté, la cancérogenèse du rat AOM est composée de plusieurs étapes qui présentent de nombreuses caractéristiques morphologiques et histologiques communes avec la cancérogenèse de l'homme. Comme chez l'homme, la cancérogenèse débute par des lésions précancéreuses, visibles dès 8 à 12 semaines, et évolue à des tumeurs, visibles dès 40 semaines **(Perse and Cerar 2011)**. Ces éléments, en plus du fait que ce modèle soit facile d'utilisation et peu couteux, font qu'il est

pertinent d'utiliser le rat AOM dans les études de prévention ou de promotion de la cancérogenèse colorectale.

b. La souris *Min*

La souris *Min* possède une mutation sur le gène *Apc* similaire aux patients atteints de polypose adénomateuse familiale et dans la majorité des cancers colorectaux sporadiques. Le développement spontané et rapide des tumeurs en fait un modèle très utilisé en cancérogenèse colorectale **(Corpet and Pierre 2003)**. Cependant, certains résultats et réflexions m'ont poussée à me demander si la souris *Min* était réellement un bon modèle dans nos études de par **(i)** son développement tumoral rapide, **(ii)** la localisation de ses tumeurs principalement au niveau de l'intestin grêle, **(iii)** les différences entre les sexes et enfin **(iv)** les teneurs en hème retrouvées dans les eaux fécales.

(i) Développement tumoral rapide

Ces souris développent des tumeurs très rapidement et ont une espérance de vie courte. Chez l'homme le développement de la cancérogenèse colorectale dure une dizaine d'année **(INCA 2010)**. Il est ainsi légitime de se demander s'il est réellement possible de mimer toutes les étapes de la situation pathologique chez l'homme en si peu de temps. Dans le même sens, Il est possible que ce fort et rapide développement de la cancérogenèse empêche de mettre en évidence des effets protecteurs légers comme, par exemple, les stratégies de prévention de SécuriViande. L'expérimentation sur le rat initié a permis de mettre en évidence un effet protecteur de la marinade raisin-olive à la fois sur les lésions précancéreuses et sur les biomarqueurs de lipoperoxydation. Cependant, chez la souris *Min* nous n'avons pas observé d'effet protecteur de la marinade au niveau tumoral malgré une diminution significative des TBARs fécaux.

(ii) Localisation intestinales des tumeurs

Ces souris développent principalement des tumeurs au niveau de l'intestin grêle. Chez l'homme, les tumeurs coliques sont prépondérantes comparées aux tumeurs de l'intestin grêle **(Preston *et al.* 2008 ; Tomasetti and Vogelstein 2015)**. De plus, cette thèse a permis de mettre en évidence que le microbiote pouvait contribuer à l'effet promoteur de l'hème en participant à la lipoperoxydation. Candela *et al.* suggèrent également que la modification du microbiote par l'alimentation pourrait permettre d'instaurer une flore pro-inflammatoire qui initierait la cancérogenèse **(Candela *et al.* 2014)**. Ainsi, il semble que la localisation intestinale des tumeurs chez la souris *Min* ne permet pas de réellement mimer la situation humaine car le microbiote du grêle est beaucoup moins développé que celui du colon **(Sekirov *et al.* 2010)**. Donc, si le microbiote joue réellement un rôle dans l'effet promoteur du fer héminique il est probable que cet effet soit sous-estimé chez la souris *Min*. Par ailleurs, pour les charcuteries, nous avons observé un fort effet protecteur de

l'addition de grenade au niveau colique mais pas au niveau intestinal. Ces résultats posent la question de l'implication du microbiote dans la prévention de l'effet promoteur de l'hème et de la pertinence de l'utilisation de ce modèle dans les études de prévention. Dans ce sens, la méta-analyse de Corpet et Pierre a montré que la cohérence des résultats d'études de prévention entre l'homme et la souris *Min* était moins bonne qu'entre homme et rat initié **(Corpet and Pierre 2005)**.

(iii) Différence entre les sexes

Les souris *Min* femelles développent plus de tumeurs que les souris *Min* mâles **(McAlpine *et al.* 2006 ; Cherukuri *et al.* 2014)** ce qui est contraire à la situation humaine **(Murphy *et al.* 2011)**. De plus, nous avons observé de fortes disparités entre mâles et femelles sur les biomarqueurs associés à la cancérogenèse hème-induite.

(iv) Teneur en hème des eaux fécales

Enfin, un dernier biais apporté par ce modèle est le niveau très important d'hème retrouvé dans les eaux fécales du groupe témoin n'ayant pourtant pas consommé d'hème. J'ai donc comparé ces valeurs avec une précédente étude sur souris *Min* réalisée par l'équipe PPCA **(Bastide *et al.* 2014)**. Nos témoins avaient effectivement 18 fois plus d'hème dans les fèces que ceux de l'étude de Bastide *et al.* (350 µM vs 20 µM respectivement), cependant les valeurs de TBARs sont comparables (environ 30 µM) dans les deux études. De plus, la surface tumorale mesurée chez les témoins était 3 fois plus importante dans notre étude que dans la sienne (150 mm^2 vs 60 mm^2 respectivement). Nous pensons que la forte promotion de la cancérogenèse dans notre étude pourrait être à l'origine de saignement au niveau des tumeurs intestinales ce qui aurait pour conséquence un afflux d'hème dans la lumière intestinale et colique. Cet afflux d'hème ne modifie pas la teneur en TBARs fécaux, cependant comme nous l'avons vu dans l'introduction, l'hème peut avoir des effets directs sur la muqueuse intestinale en provoquant de la cytotoxicité et de la génotoxicité ce qui aurait pu conduire à une augmentation de la cancérogenèse.

En conclusion, ces deux modèles animaux sont très utilisés dans les études de cancérogenèse colorectale. Néanmoins, le rat chimio-induit me semble être plus adapté que la souris *Min*, en gardant à l'esprit l'absence de mutation *Apc* dans ce modèle. L'intérêt de l'utilisation des deux modèles est d'observer l'effet de traitement à deux stades distincts de la cancérogenèse. Ceci est également possible à partir du rat AOM en abattant la moitié des animaux d'un groupe après 3 mois de traitement afin de dénombrer les lésions précancéreuses et en gardant l'autre moitié pendant 40 semaines afin de dénombrer les tumeurs. Nous reviendrons sur l'utilisation d'un autre modèle animal dans la partie perspective.

4) Biomarqueurs

Les biomarqueurs que nous utilisons sont associés à la cancérogenèse colorectale induite par la consommation de produits à base de viande dans nos modèles animaux **(Pierre *et al.* 2003,2004,2006)**. Il semble donc qu'ils puissent être utilisés comme biomarqueur prédictif chez l'homme.

a. Biomarqueurs de lipoperoxydation

Le biomarqueur de lipoperoxydation que l'équipe PPCA utilise depuis les premières études est le dosage des TBARs des eaux fécales. Ce dosage, bien que couramment utilisé pour mesurer la lipoperoxydation, est non spécifique puisqu'il permet de mettre en évidence le MDA préexistant lié ou non aux molécules biologiques, les peroxydes lipidiques, les produits d'auto-oxydation des acides gras mais aussi toutes les substances pouvant réagir avec l'acide thiobarbiturique (sucres, acides aminés, bilirubine) **(Lefèvre *et al.* 1998 ; Meagher and FitzGerald 2000)**. Cette non spécificité peut être considérée comme un avantage puisqu'elle nous donne une image globale de ce qui se passe dans le tractus digestif cependant elle peut entrainer une surestimation de la lipoperoxydation qui se produit réellement. Ce biomarqueur est associé à la cancérogenèse colorectale dans les modèles animaux **(Pierre *et al.* 2003)**, il peut donc être utilisé comme biomarqueur de risque chez l'homme. Cependant, il ne peut être, au sens strict, considéré comme un biomarqueur de lipoperoxydation de par sa non spécificité.

Le second biomarqueur que nous utilisons est le DHN-MA urinaire. Il s'agit du principal métabolite du 4-HNE. Ce biomarqueur est donc spécifique de la lipoperoxydation des acides gras polyinsaturés n-6, il n'est cependant pas spécifique de la lipoperoxydation colique puisqu'il reflète également le 4-HNE formé dans les produits et au cours de la digestion **(Gueraud *et al.* 2006,2010 ; Pierre *et al.* 2006)**.

b. Biomarqueurs de nitrosation

Pour évaluer la catalyse de la nitrosation par le fer héminique, nous faisons doser par Gunter Kuhnle les ATNC globaux (Université de Reading en Angleterre). Ce dosage s'accompagne de la caractérisation des parts de fer nitrosylé (FeNO), de nitrosothiols (RSNO) et des autres composés *N*-nitrosés **(Kuhnle and Bingham 2007)**. Cependant, les NOCs mesurés ne sont pas forcément tous cancérigènes, il existe donc d'autres biomarqueurs plus spécifiques du risque comme les adduits, par exemple.

Nous évoquerons, dans la partie perspective, les autres biomarqueurs qui pourraient être utilisés.

III. Perspectives

1) Pour aller plus loin sur la validation de l'effet promoteur de l'hème

a. Chez l'homme

Un des atouts majeur du projet SécuriViande est de tester les mêmes viandes et charcuteries dans des études chez les modèles rongeurs et chez des volontaires sains. L'étude chez les volontaires sains va être réalisée par le Centre de Recherche en Nutrition Humaine (CRNH) de Clermont-Ferrand. Vingt-quatre hommes sédentaires, âgés de 40 à 75 ans, ayant un IMC entre 20 et 30 et ne présentant pas de pathologies avérées seront inclus dans l'étude. L'intervention nutritionnelle, d'une durée de 12 semaines, sera composée de 6 périodes d'intervention durant lesquelles seront testés, dans un ordre aléatoire, la charcuterie témoin, la charcuterie enrichie en grenade, la charcuterie enrichie en tocophérol, le faux-filet « bleu », le faux-filet « bleu » mariné et le faux filet « bien cuit » mariné. Une période sans viande ou charcuterie, appelée « wash-out » de 3 jours séparera chaque période d'intervention et un wash-out de 15 jours séparera la période charcuterie de la période viande rouge. Un recueil de selles et d'urines sera effectué durant les trois derniers jours de chaque période d'intervention et lors du dernier jour des périodes wash-out. Ces prélèvements permettront les dosages des TBARs et NOCs fécaux, du DHN-MA urinaire et d'évaluer l'activité cytotoxiques des eaux fécales.

Résultats attendus : Le précédent projet de l'équipe a montré que 4 jours de consommation de charcuterie étaient suffisants pour augmenter la formation de produits de lipoperoxydation et de nitrosation fécaux chez l'homme **(Pierre *et al.* 2013)**. Le projet SécuriViande devrait permettre de confirmer ce résultat pour la charcuterie témoin et de le mettre en évidence, également, pour la viande bovine. Mariner la viande avec un mélange raisin-olive a été efficace dans les deux modèles animaux pour diminuer les biomarqueurs de lipoperoxydation, nous nous attendons donc à retrouver ce résultat chez les volontaires sains. De plus, la marinade raisin-olive est riche en polyphénols de la famille des stilbènes et notamment en resveratrol qui est connu pour inhiber la formation de composés *N*-nitrosés **(d'Ischia *et al.* 2011)**. Ainsi, nous nous attendons à observer également une diminution de la formation des composés *N*-nitrosés chez les volontaires lors de la consommation de la viande marinée. Concernant les charcuteries, les études chez les modèles rongeurs n'ont pas permis de mettre en évidence des stratégies de prévention efficace. Cependant, dans le précédent projet, l'ajout d'α-tocophérol avait permis de diminuer la lipoperoxydation fécale des volontaires, nous pouvons donc espérer retrouver le même résultat.

b. Chez l'animal

Le projet SécuriViande est le premier à montrer l'effet promoteur de la viande rouge et de la charcuterie fraiche à différents stades de la cancérogenèse colorectale. Utiliser des aliments frais est un atout très important pour se rapprocher de la consommation humaine. Je propose dans ce paragraphe un nouveau modèle animal, de nouveaux biomarqueurs et quelques modifications de protocole. Ces suggestions pourraient être utilisées pour confirmer l'effet promoteur de la viande fraîche ou dans des études court-terme afin de mettre en évidence de nouveaux mécanismes ou de nouveaux leviers de prévention. Ils nécessitent, cependant, une mise au point importante qui réside dans la réponse à ces questions : *l'effet promoteur des viandes, ou plus généralement du fer héminique, peut-il être mis en évidence dans le nouveau modèle animal ? Les biomarqueurs que nous utilisons actuellement sont-ils corrélés à la cancérogenèse de ce nouveau modèle animal ? Les nouveaux biomarqueurs sont-ils également corrélés à la cancérogenèse de ce nouveau modèle animal ?*

- Modèle animal proposé

L'avantage principal du rat AOM, par rapport à la souris *Min*, est de développer des lésions précancéreuses et des tumeurs au niveau colique mais ces inconvénients sont le besoin de l'initier en injectant un cancérigène et la mutation prépondérante du gène *K-ras*. L'avantage principal de la souris *Min* est la mutation du gène *Apc*, comme chez l'homme, et son inconvénient est la localisation des tumeurs au niveau de l'intestin grêle. Un modèle réunit les avantages de ces deux modèles sans les inconvénients : il s'agit du rat *Pirc* (*polyposis in the rat colon*). Ces rats possèdent une mutation hétérozygote sur le gène *Apc* et développe spontanément des tumeurs intestinales et coliques avec prédominance des tumeurs coliques. De plus, comme dans la situation humaine, les mâles développent plus, et plus rapidement, de tumeurs que les femelles. Leur durée de vie est d'environ un an ce qui permet des expérimentations plus long terme que chez la souris *Min* **(Amos-Landgraf *et al.* 2007)**. Une étude récente a montré que le dénombrement des MDF était possible dans ce modèle dès l'âge d'un mois et que le nombre de MDF était fortement diminué lors de l'administration de sulindac, un anti inflammatoire non stéroïdien largement utilisé en chémoprévention **(Femia *et al.* 2015)**. Ainsi, ce modèle semble être pertinent pour les études de promotion et de prévention, en réunissant les avantages des deux modèles animaux actuellement utilisés et en combinant la possibilité de travailler à la fois sur les lésions précancéreuses de type MDF et au stade tumoral.

- Biomarqueurs proposés

La recherche de biomarqueurs associés à la cancérogenèse est essentielle pour pouvoir effectuer la transition modèle animaux – homme. Voici quelques propositions, issues du projet SécuriViande ou de recherches bibliographiques.

(i) Biomarqueurs de lipoperoxydation

Les biomarqueurs de lipoperoxydation que nous utilisons actuellement ne sont pas spécifiques de la lipoperoxydation colique. En effet, le dosage des TBARs est un biomarqueur fécal, qui représente donc la localisation colique, mais n'est pas spécifique de la peroxydation des lipides. Le DHN-MA, quant à lui, est spécifique de l'oxydation des lipides n-6 mais ne représente pas cette lipoperoxydation au niveau colique. Le projet SécuriViande a permis, en partenariat avec l'INRA de Theix, de mettre au point le dosage du HNE et du HHE (produits d'oxydation des acides gras polyinsaturés n-3) libre et lié dans les eaux fécales par chromatographie gazeuse couplée à de la spectrométrie de masse. Les premières analyses, réalisées à partir des échantillons de l'expérimentation sur le rat chimio-induit, confirment les résultats des dosages de TBARs et de DHN-MA :

- ✓ **Viande rouge :** Le HNE et le HHE libres et liés sont retrouvés en plus grande quantité dans les fèces des animaux ayant consommé les viandes comparés aux animaux ayant consommé le régime témoin. La marinade de la viande permet de diminuer les TBARs fécaux et le DHN-MA urinaire mais également les valeurs de HNE/HHE fécaux.
- ✓ **Charcuterie :** Le HNE et le HHE libres et liés sont retrouvés en plus grande quantité dans les fèces des animaux ayant consommé les charcuteries non modifiées comparés aux animaux ayant consommé le régime témoin. L'ajout de grenade ou de tocophérol à la charcuterie permet de diminuer les valeurs de HNE/HHE fécaux.

Lorsque les analyses seront terminées, il sera nécessaire de corréler ces données avec les données de cancérogenèse afin de valider l'association entre ce biomarqueur et la cancérogenèse colorectale induite par la consommation de viande rouge ou de charcuterie. Puis, ce biomarqueur pourra être utilisé, dans les prochaines études, comme biomarqueur spécifique et local de la lipoperoxydation hème induite.

Enfin, un autre objectif du projet SécuriViande est d'aboutir à une caractérisation, par LC/MS après dérivation, des aldéhydes présents dans les eaux fécales des rats. Cette caractérisation pourrait aboutir à des expérimentations ayant pour but de déterminer la toxicité de ces aldéhydes ou encore au développement de nouveaux biomarqueurs.

(ii) Biomarqueurs de nitrosation

Les composés *N*-nitrosés peuvent interagir avec les centres nucléophiles des bases de l'ADN et ainsi former des adduits. Il a été montré une corrélation positive entre composés *N*-nitrosés fécaux, provenant d'un régime riche en viande et adduits de type O^6-carboxymethylguanine (O^6CMG) sur des cellules coliques exfoliées de volontaires sains **(Lewin *et al.* 2006)**. Ces adduits semblent plus susceptibles que d'autres à s'accumuler dans les cellules du tractus digestif car il semble qu'ils ne soient pas réparés **(Vanden Bussche *et al.* 2014)**. Ils peuvent être mesurés en immunohistochimie ou par HPLC couplée à de la spectrométrie de masse. La mise en place d'une telle technique permettrait d'avoir un endpoint de génotoxicité spécifiquement dû à la formation des composés *N*-nitrosés.

- Réflexion sur le témoin idéal

Le régime témoin que nous avons utilisé pour les études de cancérogenèse est celui que nous utilisons lors des études avec des régimes enrichis en hémoglobine ou en hémine. Dans ce cas, le témoin est pertinent puisqu'entre les deux régimes, seule la molécule purifiée, hémine ou hémoglobine, diffère. Ce n'est pas vraiment le cas lorsque nous travaillons, comme pour SécuriViande, sur des matrices plus complexes. Il semble donc que ce groupe témoin ne soit pas adapté dans ce cas.

A la demande de l'ANR et pour la partie charcuterie, nous avons inclus dans notre expérimentation de cancérogène sur les rats une viande de porc crue non transformée. Cette viande nous a permis de vérifier l'effet du procédé de transformation mais elle différait en plusieurs points des charcuteries étudiées :

- ✓ La viande de porc est une viande crue alors que la charcuterie que nous étudions est une viande cuite. Or, nous avons vu dans l'introduction que la cuisson entrainait une modification des protéines et du fer **(Purchas *et al.* 2003)**.
- ✓ La viande de porc n'est pas nitritée contrairement aux charcuteries. Or nous avons également vu que l'ajout de nitrites diminuait les valeurs d'aldéhydes présents dans la viande et au cours de la digestion **(Van Hecke *et al.* 2014a)**, ce résultat est d'ailleurs confirmé par notre étude puisque nous observons une diminution des TBARs fécaux et du DHN-MA urinaire lorsque les charcuteries sont nitritées comparé au porc cru non nitrité.

Ainsi, le porc cru ne me semble pas être un témoin adéquat pour être comparé aux charcuteries.

Je me suis donc demandé *quel serait le témoin idéal ?*

A mon sens, un vrai témoin serait une viande préparée dans les mêmes conditions (cuisson, additifs, conditionnement) mais dans laquelle le fer héminique serait absent. Ainsi, cela

permettrait de vérifier l'effet de l'hème en s'affranchissant des autres paramètres. Enlever le fer héminique de la viande, ne me semble pas faisable. Par contre, nous pouvons le chélater, par exemple en ajoutant du calcium. L'équipe PPCA a montré que l'ajout de calcium à un régime de bœuf ou de charcuterie permettait de normaliser le nombre de lésions précancéreuses et les biomarqueurs fécaux et urinaires associés **(Pierre *et al.* 2003,2013)**. Je propose donc d'utiliser cette stratégie de prévention comme témoin dans les expérimentations utilisant des viandes rouges ou des charcuteries. Afin d'être le plus efficace possible, il faudrait que le calcium puisse être ajouté pendant la fabrication du produit. Il faudrait ensuite vérifier si le calcium ajouté diminue bien les produits de lipoperoxydation et la formation de composés *N*-nitrosés dans le régime et au cours de la digestion en utilisant une approche comparable à celle de l'équipe de De Smet **(Van Hecke *et al.* 2014a)**. Enfin, un point important à vérifier serait que le régime de nos rats leur apporte suffisamment de fer pour qu'ils ne soient pas anémiés. La viande rouge et la charcuterie apporte une part de fer non héminique, qui ne sera donc pas piégé par le calcium, mais il serait nécessaire de vérifier qu'elle est suffisante pour couvrir les besoins des animaux. Dans le cas contraire, il faudrait apporter ce fer en complément en plus des minéraux et vitamines qui leur sont indispensables et qu'ils ne pourraient pas trouver dans la viande ou la charcuterie seule. En conclusion, je propose d'utiliser comme témoin une viande ou une charcuterie dans lesquelles le fer héminique serait chélaté.

- Ajout de nitrites et de nitrates dans l'eau de boisson

Afin de mettre en application les réflexions que j'ai menées sur la pondération des hypothèses entre lipoperoxydation et nitrosation, je pense qu'il est nécessaire d'ajouter des nitrites et des nitrates dans l'eau de boisson des rongeurs. Cet ajout permettrait de mimer le cycle entéro-salivaire de l'homme et ainsi de favoriser la formation de composés *N*-nitrosés lors de la consommation de viande rouge chez le rongeur.

2) Pour aller plus loin dans les mécanismes pouvant expliquer l'effet promoteur du fer héminique

a. L'effet promoteur de l'hème est-il lié au microbiote et/ou à l'inflammation ?

La suite logique des travaux de cette thèse est de confirmer l'implication du microbiote et de l'inflammation dans l'effet promoteur du fer héminique par des études de cancérogenèse.

✓ Validation de l'implication du microbiote dans l'effet promoteur de l'hème

Afin de valider l'implication du microbiote dans la cancérogenèse colorectale hème-induite, je propose de tester l'effet d'un régime riche en hème sur des rats conventionnels, axéniques ou hébergeant dans leur colon une flore humaine. La comparaison de la cancérogenèse entre rats conventionnels et axéniques devrait nous permettre de conclure si le microbiote est impliqué dans l'effet promoteur du fer héminique. La comparaison des rats conventionnels avec ceux qui hébergent une flore humaine permettrait de vérifier si les différences de microbiote entre le rat et l'homme ne sont pas un biais des modèles rongeurs que nous avons utilisés.

✓ Validation de l'implication de l'inflammation dans l'effet promoteur de l'hème

La mise en évidence de l'implication de l'inflammation dans l'effet promoteur de l'hème semble plus compliquée à mettre en place. En effet, afin de pouvoir confirmer cette hypothèse, il faudrait pouvoir montrer que lorsque l'inflammation est diminuée, la cancérogenèse hème-induite l'est également. Or, il semble que tous les anti-inflammatoires connus possèdent des effets protecteurs de la cancérogenèse. Ainsi, la recherche d'une molécule ou d'une technique permettant de diminuer l'inflammation sans avoir de conséquence sur la cancérogenèse est à continuer.

Il est cependant possible de vérifier si l'inflammation est bien associée à la cancérogenèse colorectale. Des travaux précédents de l'équipe ont montré une augmentation dose dépendante du nombre de lésions précancéreuses en fonction de la teneur en fer héminique du régime **(Pierre *et al.* 2003,2004)**. Je propose de réitérer ces expérimentations, avec des molécules purifiées ou des aliments, et de regarder dans chaque groupe des marqueurs inflammatoires comme par exemple les cytokines pro-inflammatoires TNFα, IL6, IL1β ou encore l'enzyme Cox 2 qui est activée par les facteurs inflammatoires et de vérifier si l'activation de ces marqueurs est aussi dose-dépendante. De plus, la consommation de viande est associée, chez l'homme, à l'augmentation de l'inflammation systémique mesurée par le dosage de la protéine C-réactive **(Barbaresko *et al.* 2013 ; Wood *et al.* 2014)**. L'effet d'un régime riche en hème sur l'inflammation systémique des rats pourra donc être également vérifié. Enfin, des études *in vitro* ont montré que les aldéhydes insaturés, comme le HNE, pouvait réguler l'inflammation *via* la voie NFκB **(Lee and Park 2013)**. De manière intéressante, dans sa revue, Elinav conclut que les principales voies inflammatoires qui sont impliquées dans la cancérogenèse induite par l'inflammation convergent vers la transcription de NFκB ou de STAT3 **(Elinav *et al.* 2013)**. Ainsi, la modulation de NF-κB par les aldéhydes produits lors de la lipoperoxydation hème-induite est à évaluer. Cette expérimentation pourrait être réalisée sur des rats *Pirc*, puisqu'ils sont adaptés aux études sur l'inflammation **(Irving *et al.* 2014)**.

✓ Mise en évidence du lien entre inflammation et microbiote dans la cancérogenèse colorectale hème-induite

Depuis peu de temps, des études appuient le lien entre microbiote, inflammation intestinale et risque de cancer. Ainsi dans leur revue, Candela *et al.* proposent qu'une modification du régime alimentaire puisse entrainer un changement de microbiote qui conduirait à une inflammation intestinale chronique permettant le développement d'une communauté bactérienne pro-inflammatoire favorable au déclenchement du cancer **(Candela *et al.* 2014)**. Des études chez l'homme ont montré qu'un régime riche en viande induisait une modification du microbiote caractérisée notamment par une augmentation des *Bacteroidetes* et une diminution des *Firmicutes* **(Maier *et al.* 1974 ; Wu *et al.* 2011)**. Un résultat identique a été retrouvé chez des souris nourries avec de l'hème, les auteurs suggérant une sélection des GRAM$^-$ par le fer héminique **(IJssennagger *et al.* 2012a)**. Ainsi, en reprenant le schéma proposé par Candela *et al.*, je propose que la modulation du microbiote par un régime riche en fer héminique provoque l'installation d'une flore pro-inflammatoire qui favoriserait la cancérogenèse colorectale. Cette hypothèse pourrait être testée dans l'expérimentation utilisant des rats axéniques et des rats conventionnels. Nous pourrions comparer les marqueurs d'inflammation entre les deux groupes de rats ce qui permettrait de savoir si le microbiote a un effet pro-inflammatoire qui favoriserait la promotion de la cancérogenèse comme suggéré par Candela.

De plus, l'augmentation des bactéries de type GRAM$^-$ par la consommation de fer héminique conduit la muqueuse intestinale à être plus exposée au lipopolysaccharide (LPS), constituant principal de la paroi des bactéries GRAM$^-$ **(Erridge *et al.* 2007)**. Or une exposition au LPS induit une induction des macrophages pouvant aboutir à la production de cytokines pro-inflammatoires **(Bose *et al.* 2012)**. Nous avons mis en évidence que la consommation de fer héminique aboutissait à une augmentation de la perméabilité intestinale. Ainsi, la consommation d'hème, par la sélection des bactéries GRAM$^-$, expose la muqueuse à plus de LPS et en augmentant la perméabilité intestinale, permet au LPS de pénétrer dans la muqueuse afin d'aller interagir avec les cellules du système immunitaire et favoriser ainsi la mise en place d'une réponse inflammatoire. Il serait intéressant de doser le LPS plasmatique de rats ayant été nourris avec du fer héminique ou avec du régime contrôle afin de vérifier si la consommation de fer héminique induit une endotoxémie.

b. L'hème peut-il initier la cancérogenèse colorectale ?

La consommation de viande et donc d'hème aboutit à une augmentation de la génotoxicité des eaux fécales chez l'homme, comme dans les modèles animaux **(Hebels *et al.* 2012 ; Pearson *et al.* 2009)**. Or la génotoxicité des eaux fécales est associée au cancer du côlon **(Klinder, 2004)**. Les

travaux de cette thèse ont montré que la consommation de fer héminique était associée à une augmentation de la génotoxicité des eaux fécales mais également à une augmentation des dommages génotoxiques de la muqueuse colique. Lorsque l'hème est chélaté dans la lumière intestinale, la lipoperoxydation et la génotoxicité sont inhibées. Ces résultats suggèrent que la consommation de fer héminique pourrait initier la cancérogenèse colorectale par des effets génotoxiques *via* un effet direct de l'hème ou *via* la formation d'aldéhydes.

Afin de vérifier si le fer héminique peut initier la cancérogenèse colorectale, je propose deux types d'expérimentations :

- ✓ Une étude de cancérogenèse long-terme, sur des rats non-initiés, dans laquelle du fer héminique serait distribué pendant deux ans. Cette expérimentation pourrait se baser sur les travaux qui ont permis de montrer qu'un régime pauvre en fibre, calcium, folate et riche en lipide était suffisant pour initier la cancérogenèse colorectale **(Yang *et al.* 2008 ; Newmark *et al.* 2009)**.
- ✓ Une étude de trois mois dans laquelle des rats seront nourris avec du fer héminique ou un régime contrôle pendant 15 jours. Puis les rats seront initiés avec une injection d'azoxyméthane et soumis à un régime sans fer héminique pendant le reste de l'expérimentation.

Pour les deux études, le dénombrement des lésions précancéreuses et/ou des tumeurs devrait permettre de mettre en évidence un effet initiateur de la consommation de fer héminique. L'analyse des dommages génotoxiques permettrait de savoir si la génotoxicité de la muqueuse est associée à cet effet initiateur. De plus, des travaux ont montré que la génotoxicité était induite par l'augmentation de cytokines pro-inflammatoires **(Westbrook *et al.* 2011)**. Dans ce sens, des analyses de marqueurs inflammatoires, tels que des cytokines pro-inflammatoires, permettraient de vérifier l'association entre initiation – génotoxicité et inflammation. Enfin, ces expérimentations pourront également être réalisées avec des aldéhydes. Dans l'idéal ces aldéhydes seront encapsulés afin d'être délivrés uniquement dans le colon comme cela a déjà été réalisé pour du butyrate **(Caderni *et al.* 2001)**. Ces études permettront de vérifier si l'effet initiateur observé est dû à un effet direct de l'hème ou à la formation d'aldéhydes.

c. L'effet promoteur de l'hème est-il lié à l'activation de NRF2 ?

Les travaux *in vitro* de l'équipe PPCA ont mis en évidence qu'une exposition des cellules au HNE induit une sélection des cellules précancéreuses ($Apc^{Min/+}$) au détriment des cellules normales ($Apc^{+/+}$). Cette sélection pourrait expliquer l'effet promoteur du fer héminique observé *in vivo* **(Pierre *et al.* 2007)**. Les cellules précancéreuses sont, en fait, capables de mieux détoxifier le HNE qui rentre dans la cellule, ce qui permet de les rendre plus résistantes que les cellules saines

(Baradat *et al.* 2011). Cette détoxification passe par l'activation du facteur de transcription Nrf2 *(nuclear factor erythroid 2-related factor 2)* dans le cytosol qui va permettre sa translocation dans le noyau et l'expression de gènes impliqués dans la défense anti-oxydante **(Dalleau *et al.*, en préparation)**. Afin de mettre en évidence le rôle de NRF2 dans la promotion de la cancérogenèse par la viande, il serait intéressant de mettre en place une expérimentation utilisant des rongeurs mutés pour le gène *NRF2* et qui seront initiés avec des injections d'azoxyméthane. Les animaux seraient nourris, dans un premier temps, avec des régimes enrichis en fer héminique. La comparaison du nombre de lésions précancéreuses et/ou de tumeurs entre les animaux mutés ou les animaux conventionnels permettra de déterminer si NRF2 est bien impliqué dans l'effet promoteur de la cancérogenèse colorectale hème-induite.

3) Pour aller plus loin sur l'identification d'une stratégie de prévention efficace

Comme rappelé au début de cette discussion, des études ont montré que les personnes consommant le plus de viande rouge et de charcuterie étaient également les moins réceptives aux messages nutritionnels **(Raude 2008 ; Estaquio *et al.* 2009 ; INCA-2 2009)**. Il semblerait donc qu'il soit plus efficace, afin de toucher toute la population et notamment les personnes les plus à risque, de modifier directement les produits afin de mettre sur le marché des viandes plus sures vis-à-vis du risque de cancer colorectal.

a. Avec quelles approches ?

Cette modification des produits peut passer par deux types d'approche : une approche dite empirique ou une approche ciblée.

- ✓ **L'approche empirique :** on teste des molécules, comme par exemple des antioxydants, au hasard selon leurs propriétés décrites dans la littérature.

Ainsi, il serait intéressant de tester d'autres antioxydants ou mélange d'antioxydants qui seraient susceptibles d'avoir des effets de chélation de l'hème, anti-lipoperoxydant et/ou anti-nitrosant. Les polyphénols sont une classe d'antioxydants qui regroupent plusieurs familles dont les acides phénoliques, les stilbènes, les tannins ou encore les flavonoïdes **(Kang *et al.* 2011)**. Le projet SécuriViande a permis de mettre en évidence que la marinade raisin-olive, utilisée dans les viandes des études de cancérogenèse, possédait un fort pouvoir antioxydant. Ce pouvoir antioxydant provient principalement de polyphénols de la famille des stilbènes. Cependant, d'autres marinades ont démontré des pouvoirs antioxydants comparables comme la mélisse, les feuilles de thé vert ou la grenade. Tester ces marinades permettrait de tester d'autres familles de

polyphénols (acides phénoliques, tannins et flavonoïdes respectivement) qui seraient peut-être plus efficaces pour inhiber la lipoperoxydation et/ou la nitrosation hème induite.

- ✓ **L'approche ciblée :** on teste des molécules en fonction des mécanismes mis en évidence dans des études précédentes.

Par exemple, comme expliqué précédemment, les travaux *in vitro* de l'équipe PPCA ont mis en évidence que l'activation du facteur de transcription Nrf2 pouvait expliquer la résistance des cellules précancéreuses aux aldéhydes **(Dalleau *et al.*, en préparation)**. Ainsi, l'induction de Nrf2 chez les cellules normales pourrait permettre de prévenir la promotion de la cancérogenèse colorectale associée à la consommation de fer héminique. Le curcumin et le ptérostilbène sont des inducteurs connus de Nrf2 **(Shen *et al.* 2005 ; Chiou *et al.* 2011)**. Le curcumin a déjà été utilisé dans des études *in vivo* par l'équipe. L'ajout de curcumin à la charcuterie a permis de diminuer significativement le nombre de lésions précancéreuses de type MDF chez des rats chimio-induits **(Bastide *et al.*, soumis)**. Il serait intéressant d'ajouter du curcumin à de la viande rouge afin de vérifier s'il permet également de protéger contre l'effet promoteur de la viande de bœuf. De plus, ce résultat est à confirmer au stade tumoral en utilisant, par exemple, des rats *Pirc*. L'ajout de ptérostylbène aux produits à base de viande pourrait également être envisagé.

Mes travaux de thèse suggèrent que l'inflammation pourrait être impliquée dans l'effet promoteur du fer héminique. Si l'équipe parvient à valider cette hypothèse, de nouvelles stratégies de prévention pourraient être envisagées. Ainsi, nous pourrions tester l'ajout de polyphénols ayant des propriétés anti-inflammatoires comme par exemple des flavonoïdes **(Gonzalez *et al.* 2011)** et vérifier que la diminution de l'inflammation est bien associée à une diminution de la cancérogenèse.

Enfin, le microbiote est impliqué dans la lipoperoxydation hème-induite. Dans ce sens, nous pouvons envisager l'ajout de probiotiques afin de diminuer la lipoperoxydation induite par le fer héminique. Des études ont, en effet, permis de mettre en évidence un effet protecteur de *Bifidobaterium bifidum*, de *Streptococcus thermophilus*, de *Lactobacillus casei* , de *Bifidobaterium animalis* ou encore de *Bifidobacterium cholerium* sur la lipoperoxydation **(Ito *et al.* 2001 ; Ito *et al.* 2003 ; Lee *et al.* 2010)** .

b. Avec quelles techniques ?

L'équipe a précédemment mis en évidence que l'ajout de tocophérol directement lors de la fabrication de la charcuterie permettait de diminuer la promotion de la cancérogenèse chez le rat chimio-induit mais également les biomarqueurs qui y sont associés chez l'homme **(Pierre *et al.* 2013)**. Ainsi, la modification directe des produits est une stratégie qui peut être mise en place. Cependant, une étude italienne a montré que l'ajout de tocophérol dans la ration des porc est

plus efficace pour diminuer les TBARs de la viande que l'ajout direct pendant la fabrication de la charcuterie **(Meineri *et al.* 2013)**. En conséquence, il serait pertinent de mettre en place un projet où les molécules d'intérêt seraient directement ajoutées aux rations des porcs et/ou des bovins. Enfin, l'étude court-terme du projet SécuriViande a permis de mettre en évidence que conditionner la viande sous-atmosphère protectrice permettait de diminuer les TBARs fécaux des rats. S'agissant d'un mode de conditionnement utilisé par les industriels, il serait intéressant de travailler sur des viandes ou des charcuteries conservées sous atmosphère protectrice dans des études de cancérogenèse afin de vérifier s'il peut être validé comme stratégie de prévention.

En conclusion, les travaux de cette thèse offrent des possibilités de prévenir le risque de cancer colorectal associé à la consommation de produits à base de viande. Cependant, le chemin sera encore long avant de pouvoir mettre sur le marché des produits plus sains. Les stratégies de prévention choisies devront être, dans un premier temps, acceptées par les industriels. De plus, puisque les personnes les plus à risques, c'est-à-dire les personnes consommant le plus de viande rouge et de charcuterie, sont les personnes ayant des revenus modestes, les produits devront être modifiés sans surcout pour le consommateur. Enfin, et c'est peut-être le point le plus important, la modification des produits devra être acceptée par les consommateurs. Pour ce faire, des tests organoleptiques et d'acceptabilité de concept devront être réalisés afin de s'assurer que les produits générés respectent les attentes des consommateurs.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Analyses biochimiques des viandes de bœuf (étude industrielle)

Protocole 1 : Modulation des marinades et des modes de cuisson

Echantillons		TBARs non induits (ng/g d'échantillon)	TBARs induits (ng/g d'échantillon)	Carbonyles (nmol/g d'échantillon)	Fer héminique (µg/g d'échantillon)	Fer non héminique (µg/g d'échantillon)
Témoin cru		1,0 ± 0,02	2,9 ± 0,4	246,8 ± 37,9	13,0 ± 1,8	7,9 ± 3,6
M0	Cru	1,3 ± 0,3	2,7 ± 0,5	219,9 ± 20,6	11,7 ± 1,2	5,6 ± 1,5
	Rôti	1,5 ± 0,3	3,5 ± 0,4	325,0 ± 55,8	11,3 ± 1,6	8,3 ± 4,0
	Steak	1,6 ± 0,3	3,5 ± 0,3	205,9 ± 2,1	13,7 ± 2,8	5,1 ± 0,9
M1	Cru	1,1 ± 0,2	3,2 ± 0,1	190,3 ± 13,9	11,2 ± 3,1	9,5 ± 7,4
	Rôti	1,7 ± 0,9	2,6 ± 2,3	341,9 ± 30,8	10,4 ± 1,5	6,0 ± 1,8
	Steak	1,3 ± 0,4	2,9 ± 0,4	238,8 ± 26,1	11,8 ± 2,0	7,9 ± 2,3
M2	Cru	1,2 ± 0,3	3,3 ± 0,1	176,6 ± 36,4	10,1 ± 2,6	3,6 ± 0,5
	Rôti	1,6 ± 0,4	3,4 ± 0,5	367,2 ± 15,4	10,6 ± 1,5	8,7 ± 1,9
	Steak	1,3 ± 0,3	2,1 ± 0,7	236,5 ± 10,0	12,1 ± 1,5	4,7 ± 1,1
M3	Cru	1,3 ± 0,2	3,3 ± 0,3	178,8 ± 33,4	10,3 ± 1,7	4,3 ± 2,2
	Rôti	1,5 ± 0,1	1,6 ± 0,5	268,4 ± 11,1	10,0 ± 1,2	3,8 ± 0,5
	Steak	1,5 ± 0,1	1,7 ± 0,1	207,8 ± 28,6	11,0 ± 1,7	5,3 ± 1,7
M4	Cru	0,7 ± 0,1	3,4 ± 0,3	202,2 ± 5,3	10,2 ± 1,2	3,7 ± 0,4
	Rôti	1,3 ± 0,3	1,7 ± 0,6	419,7 ± 66,3	9,9 ± 1,6	4,6 ± 0,9
	Steak	1,4 ± 0,3	3,4 ± 0,6	233,5 ± 11,2	11,1 ± 2,8	4,3 ± 0,1
M5	Cru	0,9 ± 0,1	3,2 ± 0,5	145,6 ± 6,9	9,2 ± 1,3	4,8 ± 2,3
	Rôti	1,8 ± 0,6	4,4 ± 0,1	393,1 ± 23,4	9,1 ± 1,3	3,6 ± 0,4
	Steak	1,2 ± 0,2	3,1 ± 0,5	269,3 ± 6,4	10,3 ± 1,8	5,3 ± 2,5

M0 : marinade sans antioxydant ; M1 : romarin ; M2 : raisin-olive ; M3 : tocophérol ; M4 : TBHQ ; M5 : romarin/acérola

Protocole 2 : Ajout d'antioxydants dans l'huile de friture

Echantillons	TBARs non induits (ng/g d'échantillon)	TBARs induits (ng/g d'échantillon)	Carbonyles (nmol/g d'échantillon)	Fer héminique (µg/g d'échantillon)	Fer non héminique (µg/g d'échantillon)
Témoin cru	1,8 ± 0,3	3,8 ± 0,4	205,2 ± 12,1	16,5 ± 1,6	5,3 ± 1,3
H0	2,5 ± 0,3	6,0 ± 0,3	246,6 ± 10,6	19,3 ± 2,8	9,1 ± 1,8
H1	2,0 ± 0,1	3,8 ± 0,4	221,9 ± 15,6	20,6 ± 1,3	9,6 ± 2,4
H2	2,3 ± 0,2	4,2 ± 0,5	255,2 ± 23,4	20,3 ± 1,3	6,2 ± 1,8
H3	2,1 ± 0,3	4,2 ± 0,6	224,7 ± 23,8	20,9 ± 1,8	8,2 ± 2,4

H0 : huile de friture sans antioxydants ; H1 : tocophérol ; H2 : raisin-olive ; H3 : romarin

Protocole 3 : Modulation des modes de conditionnement et des niveaux de cuisson

Echantillons			TBARs non induits (ng/g d'échantillon)	TBARs induits (ng/g d'échantillon)	Carbonyles (nmol/g d'échantillon)	Fer héminique (µg/g d'échantillon)	Fer non héminique (µg/g d'échantillon)
Non mariné	Témoin cru		1,5 ± 0,2	3,3 ± 0,4	213,8 ± 37,4	19,7 ± 0,9	10,4 ± 2,8
	Cru	SF	2,0 ± 0,5	3,3 ± 0,4	222,5 ± 35,7	19,9 ± 0,8	6,8 ± 0,8
		SA	2,4 ± 0,4	4,6 ± 0,1	168,2 ± 24,9	15,4 ± 0,9	6,0 ± 0,9
		SV	1,4 ± 0,2	2,3 ± 0,4	235,6 ± 5,4	16,5 ± 1,8	5,1 ± 0,8
	Bleu	SF	1,8 ± 0,5	2,2 ± 0,2	318,0 ± 40,5	24,9 ± 1,8	5,7 ± 0,7
		SA	2,7 ± 0,1	2,7 ± 0,3	226,2 ± 18,9	17,9 ± 0,4	6,1 ± 1,3
		SV	2,0 ± 0,3	2,4 ± 0,2	275,5 ± 26,5	19,0 ± 0,9	6,3 ± 1,9
	Bien cuit	SF	2,2 ± 0,3	2,5 ± 0,4	523,5 ± 37,9	30,6 ± 1,9	8,8 ± 1,1
		SA	2,7 ± 0,3	2,7 ± 0,3	362,6 ± 38,4	19,5 ± 0,7	13,1 ± 2,1
		SV	2,4 ± 0,5	2,9 ± 0,5	394,8 ± 60,0	21,5 ± 2,5	7,2 ± 2,0
Mariné	Témoin cru		1,6 ± 0,3	2,6 ± 0,4	184,2 ± 22,7	11,0 ± 1,9	3,9 ± 0,8
	Cru	SF	1,1 ± 0,1	2,3 ± 0,2	355,7 ± 15,2	10,6 ± 2,4	5,2 ± 0,4
		SA	1,0 ± 0,1	1,9 ± 0,2	210,2 ± 9,2	10,7 ± 2,1	3,5 ± 0,2
		SV	1,0 ± 0,2	3,6 ± 0,1	208,1 ± 38,6	10,3 ± 1,5	3,8 ± 0,6
	Bleu	SF	1,4 ± 0,4	3,9 ± 0,6	468,7 ± 36,5	12,8 ± 2,8	6,6 ± 1,9
		SA	1,3 ± 0,03	3,6 ± 1,1	294,0 ± 32,8	13,2 ± 1,7	5,8 ± 1,2
		SV	1,2 ± 0,2	5,0 ± 0,3	296,6 ± 35,3	13,0 ± 2,3	4,5 ± 1,1
	Bien cuit	SF	1,6 ± 0,3	4,7 ± 0,3	454,4 ± 17,7	14,8 ± 2,8	7,6 ± 2,2
		SA	1,9 ± 0,1	4,1 ± 0,6	443,1 ± 34,1	15,2 ± 0,5	11,8 ± 0,8
		SV	1,2 ± 0,5	6,2 ± 0,3	392,9 ± 36,9	14,1 ± 2,3	8,6 ± 1,7

SF : sous-film ; SA : sous-atmosphère protectrice ; SV : sous-vide

ANNEXE 2 : Détail des techniques utilisées pendant la thèse

Biomarqueurs fécaux et urinaires

Préparation des eaux fécales

Les eaux fécales ont été préparées dans des tubes 15 mL en ajoutant 1 mL d'eau et 50 µL de BHT 0,45 M pour 0,4 g de fèces fraîches. Les préparations ont été soumises à 3 cycles de 30 secondes au Fast-Prep à une vitesse de 5500 g puis à une centrifugation à 5500 g pendant 20 minutes. Le surnageant a été récolté et aliquoté sur glace.

Hème dans l'eau fécale

La quantité d'hème présente dans les eaux fécales est dosée selon la méthode de **(Sesink *et al.* 2000)**. 50 µL d'eau fécale ont été dilués dans 250 µL du mélange propanol/HCl 1M (5 : 1) puis centrifugés 10 min à 10000 g afin de précipiter les protéines. Ensuite, 50 µL de surnageant ont été mélangés à 1 mL d'acide acétique glacial et 50 µL d'une solution de $FeSO_4$, $7H_2O$ à 0,12 mol/L et de HCl à 4,5 mol/L, afin de transformer l'hème en porphyrine fluorescente. Les essais sont incubés à 60 °C pendant 30 min tandis que les blancs ne subissent pas d'incubation. A la fin de l'incubation pour les essais ou immédiatement après l'ajout des réactifs pour les blancs, 2 mL d'une solution de propanol-eau (1 : 1) ont été ajoutés pour arrêter la réaction. La fluorescence des échantillons a été mesurée par spectrofluorimétrie, à une longueur d'onde d'excitation de 405 nm et une longueur d'onde d'émission de 609 nm. Une gamme étalon a été réalisée avec de l'hémoglobine à différentes concentrations (4,375 ; 8,75 ; 17,5 ; 35 ; 70 ; 140 µM), permettant d'estimer la quantité d'hème des échantillons. Les résultats sont exprimés en µM dans l'eau fécale.

TBARs dans l'eau fécale

Le protocole est basé sur celui établi par **(Ohkawa *et al.* 1979)**. Ce dosage permet de doser les aldéhydes terminaux de la lipoperoxydation, et notamment le MDA (malondialdéhyde) par une réaction avec le TBA (acide thiobarbiturique). La réaction se traduit par la formation de diènes conjugués que l'on dose par spectrophotométrie, à une longueur d'onde λ=532 nm. L'estimation de la lipoperoxydation s'effectue au moyen d'une gamme étalon réalisée avec du MDA. Pour chaque échantillon, 2 essais et 2 blancs ont été réalisés. 90 µL d'eau distillée et 100 µL de sodium dodécyl sulfate (SDS) à 8,1% ont été ajoutés à 10 µL d'eau fécale. 1 mL de TBA à 0,8% dans de l'acide acétique 10% a été ajouté dans les essais, alors que 1 mL d'acide acétique à 10% a été mis dans les blancs. Les échantillons ont ensuite été mis à incuber 75 min à 95 °C. Après refroidissement, les tubes ont été centrifugés à 4000 g pendant 10 min. On a ajouté alors 1 ml de butanol à 0.8 mL de surnageant, puis mélangé au vortex, et les échantillons ont été à nouveau centrifugés 10 min à 4000 g. Le surnageant a été récupéré afin de mesurer sa densité optique à la longueur d'onde de 532 nm. Une gamme étalon réalisée avec du MDA à différentes concentrations (0, 100, 200, 400, 600 µM) a permis d'estimer la lipoperoxydation. Les résultats sont exprimés en µM d'équivalent MDA dans l'eau fécale.

Composés *N*-nitrosés fécaux

Ces dosages ont été réalisés par un prestataire de service : G.C KUHNLE selon la méthode décrite dans **(Joosen *et al.* 2009)** adaptée de **(Kuhnle *et al.* 2007)**.

Cytotoxicité des eaux fécales sur les cellules $Apc^{+/+}$ et $Apc^{Min/+}$

L'activité cytotoxique des eaux fécales a été testée sur les cellules $Apc^{+/+}$ (cellules saines de l'épithélium colique) et $Apc^{Min/+}$ (cellule mutée sur le gène *Apc*). Les cellules sont ensemencées dans une plaque 96 puits à 10^4 cellules par puits dans 200 µL de DMEM (milieu avec 10% de sérum de veau, 2% de glutamine et 1% de pénicilline/ streptomycine) et cultivées en condition permissive à 33 °C en présence d'interféron gamma et de facteur de croissance. A 80% de confluence, elles sont mises en conditions non permissives (milieu sans interféron gamma ni facteur de croissance et température de 37°C). Les eaux fécales sont diluées dans du DMEM (sans sérum de veau) et filtrées sur unité de filtration à 0.22 µm puis déposés dans la plaque 96 puits. Des « puits contrôles » ne contenaient que du milieu DMEM filtré. L'activité cytotoxique a été mesurée selon la méthode de **(Bonneson *et al.* 2001)**. Après 24h, le milieu a été éliminé et les cellules ont été rincées avec du PBS. On a ajouté alors 100 µL MTT (4.5 µg/100 ml de PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)) dans chaque puits. Le MTT est un chromogène jaune. Il est métabolisé et oxydé par les cellules vivantes pour donner un chromogène violet quantifiable par spectrophotométrie. Après 1h30 d'incubation dans l'étuve 37 °C, 5% CO_2 à l'obscurité, 100 µL de tampon de lyse (SDS 10% dans NaOH 0,01 M) ont été ajoutés et on a laissé incuber 1 nuit à 37 °C à l'obscurité (étape qui correspond à la lyse des cellules et à la libération du chromogène). L'absorbance a été ensuite lue à l'aide d'un lecteur de microplaque (microquant, bioteck) à 570 nm et 690 nm pour le bruit de fond. La viabilité des cellules a été exprimée en pourcentage de l'absorbance des puits traités par rapport aux puits contrôles.

DHN-MA urinaire

L'un des produits finaux de la lipoperoxydation est le 4-hydroxynonenal (4-HNE). Il résulte de la dégradation des acides gras polyinsaturés ω-6, contenus dans l'alimentation. Le DHN-MA (1,4-Dihydroxynonene Mercapturic Acid) est son métabolite mercapturique majoritaire. C'est un composé stable qui est excrété dans les urines. Son dosage immunoenzymatique mesure le HNE formé *in vivo* et celui ingéré avec les aliments **(Gueraud *et al.* 2005)**. Le principe du dosage consiste en une compétition entre le DHN-MA présent dans nos échantillons, et du DHN-MA fourni couplé à l'acétylcholinestérase (DHN-MA-AchE). Ce dosage est effectué sur des plaques de microtitration contenant un anticorps immobilisé (monoclonal de souris anti-immunoglobuline de lapin). Les anticorps de lapin anti-DHN-MA sont directement immobilisés sur la phase solide via le monoclonal de souris. Le signal mesuré (correspondant à l'activité de l'acétylcholinetérase) est inversement proportionnel à la concentration du compétiteur en solution (le DHN-MA présent dans nos échantillons). Les dilutions des échantillons ont été faites dans du tampon EIA/BSA : tampon phosphate 0,1 M, pH 7,4 avec 0,15 M de NaCl, 0,1% de BSA et 0,01% d'acide de sodium. Le tampon de lavage a été réalisé avec du tampon phosphate à 0,1 M, pH 7,4 et 0,05% de tween 20. Le dosage a été réalisé par le dépôt en une seule étape des anticorps de lapin spécifiques du DHN-MA, du compétiteur (DHN-MA à doser) et du traceur (DHN-MA-AchE). Après 18 h de réaction à 4 °C, la plaque a été lavée (2 cycles de lavage) et 200 µL de réactif d'Ellman, substrat de l'AchE,

ont été déposés dans chaque puits. L'absorbance a été lue à 414 nm (lecteur de plaque) après 2h30 de réaction enzymatique à l'obscurité.

Histologie

Lésions précancéreuses (MDF) du rat chimio-induit

A l'issue de l'expérience (100 jours), les rats ont été sacrifiés au CO_2. Les colons ont été prélevés, vidés par injection de tampon Kreb's Ringer, ouverts longitudinalement et fixés à plat entre deux feuilles de papier filtre (codées) dans du formol tamponné (10%). Plusieurs critères permettent d'identifier les MDF : pas ou peu de production de mucine, distorsion de la lumière, surélévation des foyers par rapport à la muqueuse colique, nombre de cryptes supérieurs à 2 **(Caderni *et al.* 2003)**. Les colons ont été colorés selon la méthode HIDAB (high-iron diamine Alcian blue) et ont été lus par 2 opérateurs en aveugle. Le nombre et la taille des MDF (nombre de cryptes par MDF) ont été évalués.

Tumeurs de la Souris *Min*

A l'issue de l'expérience (45 jours), les souris ont été sacrifiées au CO_2. Les intestins et les colons ont été prélevés, vidés par injection de tampon Kreb's Ringer, ouverts longitudinalement et fixés à plat entre deux feuilles de papier filtre (codées) dans du formol tamponné (10%). Ils ont ensuite été colorés au méthylène (9 ppm pour les grêles et 12 ppm pour les colons) pendant 2 jours dans des alvéoles en plastique. Les tumeurs intestinales ont été dénombrées à la loupe x 120 (lumière traversante par-dessous) et classifiées en 3 tailles : petites (< à 1 mm), moyennes (1 à 2 mm) et grosses (> 2 mm). Les tumeurs coliques ont été dénombrées soit à la loupe x 250 (lumière traversante par-dessous) soit directement au microscope x 40 et mesurées avec l'oculaire micrométrique. Tous les comptages ont été réalisés par 2 opérateurs et en aveugle.

Analyses *in vitro* du chapitre 3

Piégeage des aldéhydes des eaux fécales

Les billes utilisées sont composées de résine contenant des fonctions hydrazines protégées par des groupes Fmoc (4-Fmoc-hydrazinobenzoyl AM NovaGel™, Nobabiochem R Merck Chemicals, Nottingham, UK). Dans le but d'enlever leur protection, les billes sont lavées avec 0,8 mL de DMSO + 0,2 mL de piperidine, vortexées pendant 1 minute et mises à incuber pendant 15 minutes. Puis les billes sont rincées deux fois avec du DMSO, quatre fois avec de l'éthanol puis avec de l'eau distillée. La quantité de billes utilisée pour chaque échantillon est 100 fois supérieure à la quantité de MDA présent dans l'échantillon d'eau fécale. Les billes sont ajoutées à l'eau fécale puis les échantillons sont mis sous agitation pendant 2h à 4°C. Après avoir laissé reposer pendant 15 minutes sans agitation, les surnageants sont transférés dans des tubes et dilués dans un milieu du DMEM sans sérum de veau fœtal.

Résistance trans-épithéliale (TEER) des cellules $Apc^{+/+}$ exposées aux eaux fécales des rats

Les cellules sont ensemencées dans du milieu complet enrichi en IFNγ et en EGF sur des inserts avec membrane apicale (Greiner Bio-one®, membrane transparente en polyethylene terephthalate (PET), taille des pores 3.0 µm, $0,6 \times 10^6$ pores/cm^2) à une densité moyenne de 260 000 cellules par insert. 24 inserts sont placés dans l'appareil CellZscope (NanoAnalytics, Münster, Allemagne) et d'abord mis à incuber à 33°C (5% CO_2) en conditions permissives jusqu'à obtenir stabilisation de la TEER (soit environ 24h). Le milieu est remplacé par du milieu complet et l'appareil est déplacé à 37°C (5% CO_2) pour permettre aux cellules de se différencier. Lorsque la TEER a atteint une phase de stabilité, soit environ 24h après le changement de milieu, les cellules sont privées de sérum de veau fœtal. Environ 6h après, les cellules sont traitées avec les eaux fécales filtrées, natives ou déplétées en aldéhydes, diluées au 160ème dans du DMEM + glutamine. Des « puits contrôles » ne contenaient que du milieu DMEM filtré. Quatre ou cinq réplicats par condition sont effectués. Les valeurs TEER sont mesurées toutes les 40 minutes en temps réel. Pour chaque insert, les résultats sont normalisés par la valeur avant traitement et exprimés en moyenne ± SEM.

Génotoxicité des cellules $Apc^{+/+}$ exposées aux eaux fécales des rats

La génotoxicité des cellules $Apc^{+/+}$ exposées aux eaux fécales des rats est évaluée par des essais de comètes alcalins. Les cellules sont ensemencées dans une plaque 24 puits à 260 000 cellules par puits dans 500 µL de DMEM (milieu avec 10% de sérum de veau, 2% de glutamine et 1% de pénicilline/ streptomycine) et cultivées en condition permissive à 33 °C en présence d'interféron gamma et de facteur de croissance. A confluence, elles sont mises en conditions non permissives (milieu sans interféron gamma ni facteur de croissance et température de 37°C). Les eaux fécales sont diluées, au 320ème, dans du DMEM (sans sérum de veau) et filtrées sur unité de filtration à 0.22 µm puis déposés dans la plaque 24 puits. Des « puits contrôles » ne contenaient que du milieu DMEM filtré. Les cellules sont ensuite récupérées et utilisées comme expliqué dans la partie Matériel & Méthodes de l'article 2. Les données représentent le pourcentage d'ADN dans la queue de la comète et sont exprimées en moyenne ± SEM correspondant à trois passages indépendants.

ANNEXE 3 : Résultats biomarqueurs étude court-terme (Viandes rouges)

	Groupe	Hème (µM dans l'eau fécale)	TBARs (µM dans l'eau fécale)	DHN-MA (ng dans urines/24h)
CYCLE 1	*ANOVA*	**p<0,0001**	**p<0,0001**	**p<0,0001**
	Témoin : AIN76	4,2 ± 6,0	28,0 ± 1,6	177,3 ± 8,0
	Steak, mariné sans antioxydant, « bleu »	187,7 ± 1,3	45,7 ± 1,7	781,4 ± 71,1
	Steak, mariné tocophérol, cru	81,0 ± 13,0	49,8 ± 0,8	740,7 ± 13,5
	Roti, mariné romarin/acérola, cuisson vapeur sous-vide	32,5 ± 4,0	46,4 ± 2,4	1662,6 ± 0,0
	Roti, mariné raisin-olive, cuisson vapeur sous-vide	75,8 ± 9,0 [f]	69,3 ± 0,0 [f]	1341,3 ± 6,5 [f]
	Faux-filet, sous-film, mariné raisin-olive, cru	151,0 ± 24,0	41,4 ± 0,0	317,0 ± 11,6
	Faux-filet, sous-vide, mariné raisin-olive, « bien cuit »	112,5 ± 8,3 [e]	38,6 ± 0,8 [e]	442,4 ± 52,5
	Faux-filet, sous-vide, non mariné, « bleu »	144,6 ± 9,8	82,5 ± 0,8 [e]	2062,3 ± 14,0 [e]
	Faux-filet, sous-vide, non mariné, « bien cuit »	141,4 ± 6,3	56,2 ± 1,7	309,6 ± 256,2
CYCLE 2	*ANOVA*	**p<0,0001**	**p<0,0001**	**p=0,216**
	Témoin : AIN76	4,0 ± 0,2	26,9 ± 1,7	235,1 ± 10,0
	Faux-filet, sous-film, non mariné, cru	366,6 ± 2,2 [a]	115,74 ± 2,4 [a]	340,1 ± 288,7
	Faux-filet, sous-film, mariné raisin-olive, cru	56,3 ± 0,2	32,2 ± 0,8	292,1 ± 6,9
	Faux-filet, sous-film, non mariné, « bleu »	69,34 ± 1,1 [b,c]	53,7 ± 0,0 [b,c]	580,7 ± 2,7
	Faux-filet, sous-film, mariné raisin-olive, « bien cuit »	70,55 ± 6,9	52,0 ± 2,4 [a,c,d]	491,3 ± 13,4
	Faux-filet, sous-film, mariné raisin-olive, « bleu »	87,4 ± 0,4 [a]	34,7 ± 1,6	390,6 ± 36,7
	Faux-filet, sous-at., mariné raisin-olive, « bleu »	74,3 ± 6,9	30,2 ± 1,6 [c,d]	269,0 ± 2,7
	Faux-filet, sous-at., mariné raisin-olive, « bien cuit »	80,1 ± 8,1	36,3 ± 0,8	379,7 ± 24,3
	Faux-filet, sous-at., non mariné, « bien cuit »	112,0 ± 19,8 [d]	81,3 ± 2,5 [d]	599,7 ± 313,1

a : significativement différent du faux-filet, sous film, mariné raisin-olive, cru ;
b : significativement différent du faux-filet, sous film, non mariné, cru
c : significativement différent du faux-filet, sous film, mariné raisin-olive, bleu ;
d : significativement différent du faux-filet, sous-at., mariné raisin-olive, bien cuit
e : significativement différent du faux-filet, sous vide, non mariné, bien cuit ;
f : significativement différent du rôti, mariné romarin/acérola, vapeur sous vide

ANNEXE 4 : Résultats biomarqueurs étude court-terme (Charcuteries)

	Groupe	**Hème** (µM dans l'eau fécale)	**NOCs** (µM dans l'eau fécale)	**TBARs** (µM dans l'eau fécale)	**DHN-MA** (ng dans urines/24h)
CYCLE 1	*ANOVA*	**p<0,0001**	**Pas de stats**	**p=0,008**	**p<0,0001**
	AIN76	1,4 ± 2,0	1,5	29,4 ± 1,0	297,7 ± 11,8
	Charcuterie témoin (Rouge, 65°C, nitrite classique, oxydé)	41,1 ± 8,6 **b,c,g**	49,4	34,8 ± 1,0 **b,c,f,g**	380,4 ± 7,4 **b,c,g**
	Blanc, 65°C, nitrite classique, oxydé	5,9 ± 0,8 **a**	3,9	28,0 ± 2,9 **a**	212,0 ± 2,0 **a**
	Rouge, **80°C**, nitrite classique, oxydé	24,5 ± 2,5 **a**	23,5	23,4 ± 3,3 **a**	569,2 ± 15,5 **a**
	Rouge, 65°C, **faible nitrite**, oxydé	30,5 ± 2,5 **a**	29,8	26,6 ± 2,9 **a**	489,6 ± 22,5 **a**
	Blanc, 65°C, **faible nitrite**, oxydé	6,8 ± 4,1 **c**	7,3	25,3 ± 1,0	414,4 ± 2,0 **b,c**
	Rouge, **80°C**, **faible nitrite**, oxydé	32,9 ± 4,0	33,1	29,4 ± 1,0 **g**	528,4 ± 26,6 **c,g**
	Rouge, 65°C, nitrite classique, oxydé, + **hydrolysats protéines**	36,9 ± 7,2	61,9	26,6 ± 1,0 **a**	413,5 ± 9,7
	Blanc, 65°C, nitrite classique, oxydé + **hydrolysats protéines**	14,4 ± 3,2 **f**	27,6	26,9 ± 0,0	382,9 ± 21,6 **b**
CYCLE 2	*ANOVA*	**p<0,0001**	**Pas de stats**	**p<0,0001**	**p=0,017**
	Charcuterie témoin (Rouge, 65°C, nitrite classique, oxydé)	59,6 ± 0,2 **e,h**	90,2	34,1 ± 0,0 **e**	209,7 ± 21,2 **e**
	Rouge, 65°C, nitrite classique, oxydé **+ tocophérol**	53,3 ± 3,6	59,4	30,7 ± 2,9	194,7 ± 3,8
	Blanc, 65°C, nitrite classique, oxydé **+ tocophérol**	25,5 ± 2,2 **d**	23,3	38,2 ± 1,9 **d**	150,7 ± 11,0
	Rouge, **80°C**, nitrite classique, oxydé **+ tocophérol**	39,4 ± 9,8 **d**	57,8	36,9 ± 0,8 **d**	175,6 ± 19,8
	Rouge, 65°C, nitrite classique, oxydé **+ grenade**	29,8 ± 4,4 **a**	45,0	19,3 ± 0,8 **a**	158,4 ± 41,2 **a**
	Blanc, 65°C, nitrite classique, oxydé **+ grenade**	13,5 ± 4,7 **e**	45,5	23,2 ± 2,1 **e**	161,9 ± 17,8
	Rouge, **80°C**, nitrite classique, oxydé **+ grenade**	29,4 ± 2,5	31,2	26,1 ± 2,1 **e**	214,9 ± 19,7
	Rouge, 65°C, nitrite classique, **anaérobiose**	88,3 ± 9,4 **a**	146,5	33,4 ± 0,8	267,7 ± 41,0
	Blanc, 65°C, nitrite classique, **anaérobiose**	33,5 ± 0,7 **h**	110,7	42,7 ± 1,0 **h**	212,1 ± 14,2

a : significativement différent de la charcuterie témoin
b : significativement différent de la charcuterie **blanc**, 65°C, nitrite classique, oxydée
c : significativement différent de la charcuterie rouge, 65°C, **faible nitrite**, oxydée
d : significativement différent de la charcuterie rouge, 65°C, nitrite classique, oxydé **+ tocophérol**
e : significativement différent de la charcuterie rouge, 65°C, nitrite classique, oxydé **+ grenade**
f : significativement différent de la charcuterie rouge, 65°C, nitrite classique, oxydé **+ hydrolysats protéines**
g : significativement différent de la charcuterie rouge, **80°C**, nitrite classique, oxydé
h : significativement différent de la charcuterie rouge, 65°C, nitrite classique, anaérobiose

COMMUNICATIONS, ENSEIGNEMENT & FORMATIONS

I. Communications

1) Publications dans revues à comité de lecture

MARTIN OCB, LIN C, NAUD N, TACHE S, RAYMOND-LETRON I, CORPET DE, PIERRE FH.
Antibiotic suppression of intestinal microbiota reduces heme-induced lipoperoxidation associated with colon carcinogenesis in rats.
Nutrition and Cancer, 2014*. In press*.

PIERRE FHF, **MARTIN OCB**, SANTARELLI RL, TACHÉ S, NAUD N, GUÉRAUD F, AUDEBERT M, DUPUY J, MEUNIER N, ATTAIX D, VENDEUVRE JL, MIRVISH SS, KUHNLE GCG, CANO N, CORPET DE.
Calcium and α-Tocopherol Suppress Cured Meat Promotion of Chemically-Induced Colon Carcinogenesis in Rats and Reduce Associated Biomarkers in Human Volunteers.
American Journal of Clinical Nutrition, 2013. 98(5):1255-1262.

2) Communications orales

HNE-Club and SAS meeting. *8-10 Septembre 2014, Toulouse (France).*
MARTIN OCB, NAUD N, TACHE S, TONDEREAU V, BOUTET-ROBINET E, THEODOROU V & PIERRE FHF.
Heme iron increases intestinal permeability, inflammation and biomarkers associated with colorectal cancer in rats.

Journée Nutrition & Cancer. NACRe-CLARA. *17-18 Juin 2014, Lyon (France).*
MARTIN OCB, LIN C, NAUD N, TACHE S, RAYMOND-LETRON I, CORPET DE & PIERRE FHF.
La suppression du microbiote intestinal par les antibiotiques réduit la lipoperoxidation heme induite associée à la cancérogenèse colorectale.

Nutrition and cancer: Hot topics from biology to public health issue, INCA. *20 Juin 2013, Paris (France).*
MARTIN OCB, SANTARELLI RL, TACHÉ S, NAUD N, GUÉRAUD F, ATTAIX D, VENDEUVRE JL, MIRWISH S, KUHLNE G, CORPET DE and PIERRE FHF.
Calcium and tocopherol suppress cured-meat promotion of colon carcinogenesis in rats. A volunteer study also suggests prevention in humans.

4th Symposium on Veterinary Sciences Toulouse - München – Zaragoza. *11-13 avril 2013, Toulouse (France).*
MARTIN OCB, NAUD N, TACHE S, et al, CORPET DE, PIERRE FHF.
Cooked beef meat, and cured pork meat promotion of tumors in $Apc^{(Min)}$ mice. Plant extracts added to meat show no protection.

International nutrition and health symposium. *19 juillet 2012, Toulouse (France).*
MARTIN OCB, SANTARELLI RL, TACHE S, NAUD N, GUERAUD F, ATTAIX D, VENDEUVRE JL, MIRWISH S, KUHLNE G, CORPET DE and PIERRE FHF.
Suppression by calcium and α-tocopherol of cured meat promotion of fecal biomarkers in human and rat is associated to protection against promotion of dimethylhydrazine-induced mucin-depleted foci in rat colons.

3) Communications par poster

AICR Annual Research Conference on Food, Nutrition, Physical Activity and Cancer. *Octobre 2014, Washington DC (USA)***.**
MARTIN OCB, NAUD N, TACHE S, BOUTET E, THEODOROU V, PIERRE FHF *et al*.
Dietary heme iron increases intestinal permeability, inflammation and biomarkers associated with colorectal cancer in rats.

AICR Annual Research Conference on Food, Nutrition, Physical Activity and Cancer. Octobre 2014, Washington DC (USA)**.**
MARTIN OCB, NAUD N, TACHE S, PIERRE FHF, CORPET DE.
Meat intake promotes colorectal carcinogenesis in two rodent models: chemical-induced rats and $Apc^{(Min)}$ mice. Effect of antioxidant marinade and cooking.

Journée Nutrition & Cancer. NACRe-CLARA. 17-18 Juin 2014, Lyon (France).
MARTIN OCB, NAUD N, TACHE S, et al, CORPET DE, PIERRE FHF.
Promotion tumorale par la viande de bœuf cuite et par la viande de porc transformée chez la souris $Apc^{(Min)}$. L'ajout d'extrait de plante ne montre pas de protection.

Nutrition and cancer: hot topics from biology to public health issues. INCa. *20 juin 2013, Paris (France).*
MARTIN OCB, NAUD N, TACHE S, et al, CORPET DE, PIERRE FHF.
Cooked beef meat, and cured pork meat promotion of tumors in $Apc^{(Min)}$ mice. Plant extracts added to meat show no protection.

AICR Annual Research Conference on Food, Nutrition, Physical Activity and Cancer. *1-2 Novembre 2012, Washington DC (USA)***.**
MARTIN OCB, NAUD N, TACHE S, et al, CORPET DE, PIERRE FHF.
Cooked beef meat, and cured pork meat promotion of tumors in $Apc^{(Min)}$ mice. Plant extracts added to meat show no protection.

4) Vulgarisation scientifique

Ma thèse en 180 secondes. Finale régionale. *Mai 2014, Toulouse (31)*
Congrès scientifique des enfants. *Mai 2013, Toulouse (31)*
Intervention métier de la science INRA. *Avril 2013, Toulouse (31)*
Animation d'un atelier de speed-cherching pour la nuit des chercheurs. *Septembre 2012, Toulouse (31)*
Médiation scientifique n°8 INP. *Mai 2012, Fonsorbes-Albi-Toulouse (31-81)*

II. Enseignements/Encadrements

1) Enseignements

Nutrition & Cancer

2012 **Cours Tour d'horizon sur les cancérigènes alimentaires.** Niveau : 2ème année master professionnel et recherche. 2 heures.

Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (31)

Sciences des aliments

2013 **Cours de toxicologie des aliments.** Niveau : Licence pro QSSA. 8 heures.
IUT Paul Sabatier (32)

2012 **TP d'œnologie.** Niveau : 1ère année ingénieur. 13 heures.
Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse (31)

Microbiologie

2012-13 **TD microbiologie générale.** Niveau : 1ère année. 2x22 heures.
Ecole Ingénieur Purpan (31)

TP microbiologie générale. Niveau : 2ème année licence. 2x24 heures.
Université Paul Sabatier (31). Centre universitaire Jean Champollion (81).

2) Encadrement

2014 **Stage licence. Andréa Garcia de Salazar**, 2 mois.
Universidad Complutense de Madrid (Espagne)

2013 **Stage 2ème année vétérinaire. Charlotte Coquerel**, 2 mois.
Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (31)

2012 **Thèse vétérinaire. Auréline Malric**, 8 mois.
Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (31

III. Formations

2014 **Initiation à la radioprotection.**
INRA ToxAlim, Toulouse.

2013 **La nutrition périnatale et ses conséquences chez l'adulte.**
Ecole d'été AlimH. La Baule.

2012 **Les lipides, de la calorie au neuro-médiateur.**
Ecole d'été AlimH. St Brévin les Pins.

Utilisation et Protection des Animaux de Laboratoire.
Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

2011 **Module de biostatistiques niveau 1 « Eléments de méthodologie ».**
Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Module de biostatistiques niveau 2 « Analyse des données ».
Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

REFERENCES

Abete, I., D. Romaguera, A. R. Vieira, A. Lopez de Munain and T. Norat (2014). "Association between total, processed, red and white meat consumption and all-cause, CVD and IHD mortality: a meta-analysis of cohort studies." Br J Nutr **112**(5): 762-75.

Abid, Z., A. J. Cross and R. Sinha (2014). "Meat, dairy, and cancer." Am J Clin Nutr **100**(Supplement 1): 386S-393S.

Adams, L. S., N. P. Seeram, B. B. Aggarwal, Y. Takada, D. Sand and D. Heber (2006). "Pomegranate juice, total pomegranate ellagitannins, and punicalagin suppress inflammatory cell signaling in colon cancer cells." J Agric Food Chem **54**(3): 980-5.

Al-Sadi, R. M. and T. Y. Ma (2007). "IL-1beta causes an increase in intestinal epithelial tight junction permeability." J Immunol **178**(7): 4641-9.

Alexander, D. D., C. A. Cushing, K. A. Lowe, B. Sceurman and M. A. Roberts (2009). "Meta-analysis of animal fat or animal protein intake and colorectal cancer." Am J Clin Nutr **89**(5): 1402-9.

Alexander, D. D., D. L. Weed, C. A. Cushing and K. A. Lowe (2011). "Meta-analysis of prospective studies of red meat consumption and colorectal cancer." Eur J Cancer Prev **20**(4): 293-307.

Allam, O., D. Bahuaud, S. Tache, N. Naud, D. E. Corpet and F. H. Pierre (2010). "Calcium carbonate suppresses haem toxicity markers without calcium phosphate side effects on colon carcinogenesis." Br J Nutr **105**(3): 384-92.

Alrawi, S. J., M. Schiff, R. E. Carroll, M. Dayton, J. F. Gibbs, M. Kulavlat, D. Tan, K. Berman, D. L. Stoler and G. R. Anderson (2006). "Aberrant crypt foci." Anticancer Res **26**(1A): 107-19.

Amos-Landgraf, J. M., L. N. Kwong, C. M. Kendziorski, M. Reichelderfer, J. Torrealba, J. Weichert, J. D. Haag, K. S. Chen, J. L. Waller, M. N. Gould and W. F. Dove (2007). "A target-selected Apc-mutant rat kindred enhances the modeling of familial human colon cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(10): 4036-41.

Ancelle, T. (2011). Statistique épidémiologique, Paris : Maloine.

Andreassen, A., R. Vikse, A. Mikalsen, T. Adamovic, I. L. Steffensen, H. Hjertholm, G. Levan and J. Alexander (2006). "2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) induces genetic changes in murine intestinal tumours and cells with ApcMin mutation." Mutat Res **604**(1-2): 60-70.

Angeli, J. P., C. C. Garcia, F. Sena, F. P. Freitas, S. Miyamoto, M. H. Medeiros and P. Di Mascio (2011). "Lipid hydroperoxide-induced and hemoglobin-enhanced oxidative damage to colon cancer cells." Free Radic Biol Med **51**(2): 503-15.

Arrieta, M. C., L. Bistritz and J. B. Meddings (2006). "Alterations in intestinal permeability." Gut **55**(10): 1512-20.

Arumugam, M., J. Raes, E. Pelletier, D. Le Paslier, T. Yamada, D. R. Mende, G. R. Fernandes, J. Tap, T. Bruls, J. M. Batto, M. Bertalan, N. Borruel, F. Casellas, L. Fernandez, L. Gautier, T. Hansen, M. Hattori, T. Hayashi, M. Kleerebezem, K. Kurokawa, M. Leclerc, F. Levenez, C. Manichanh, H. B. Nielsen, T. Nielsen, N. Pons, J. Poulain, J. Qin, T. Sicheritz-Ponten, S. Tims, D. Torrents, E. Ugarte, E. G. Zoetendal, J. Wang, F. Guarner, O. Pedersen, W. M. de Vos, S. Brunak, J. Dore, M. Antolin, F. Artiguenave, H. M. Blottiere, M. Almeida, C. Brechot, C. Cara, C. Chervaux, A. Cultrone, C. Delorme, G. Denariaz, R. Dervyn, K. U. Foerstner, C. Friss, M. van de Guchte, E. Guedon, F. Haimet, W. Huber, J. van Hylckama-Vlieg, A. Jamet, C. Juste, G. Kaci, J. Knol, O. Lakhdari, S. Layec, K. Le Roux, E. Maguin, A. Merieux, R. Melo Minardi, C. M'Rini, J. Muller, R. Oozeer, J. Parkhill, P. Renault, M. Rescigno, N. Sanchez, S. Sunagawa, A. Torrejon, K. Turner, G. Vandemeulebrouck, E. Varela, Y. Winogradsky, G. Zeller, J. Weissenbach, S. D. Ehrlich and P. Bork (2011). "Enterotypes of the human gut microbiome." Nature **473**(7346): 174-80.

Aune, D., D. S. Chan, A. R. Vieira, D. A. Navarro Rosenblatt, R. Vieira, D. C. Greenwood, E. Kampman and T. Norat (2013). "Red and processed meat intake and risk of colorectal adenomas: a systematic review and meta-analysis of epidemiological studies." Cancer Causes Control **24**(4): 611-27.

Awasthi, Y. C., R. Sharma, J. Z. Cheng, Y. Yang, A. Sharma, S. S. Singhal and S. Awasthi (2003). "Role of 4-hydroxynonenal in stress-mediated apoptosis signaling." Mol Aspects Med **24**(4-5): 219-30.

Azadbakht, L. and A. Esmaillzadeh (2009). "Red meat intake is associated with metabolic syndrome and the plasma C-reactive protein concentration in women." J Nutr **139**(2): 335-9.

Bae, S. I. and Y. S. Kim (2014). "Colon cancer screening and surveillance in inflammatory bowel disease." Clin Endosc **47**(6): 509-15.

Balder, H. F., J. Vogel, M. C. Jansen, M. P. Weijenberg, P. A. van den Brandt, S. Westenbrink, R. van der Meer and R. A. Goldbohm (2006). "Heme and chlorophyll intake and risk of colorectal cancer in the Netherlands cohort study." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **15**(4): 717-25.

Baradat, M., I. Jouanin, S. Dalleau, S. Tache, M. Gieules, L. Debrauwer, C. Canlet, L. Huc, J. Dupuy, F. H. Pierre and F. Gueraud (2011). "4-Hydroxy-2(E)-nonenal metabolism differs in Apc(+/+) cells and in

Apc(Min/+) cells: it may explain colon cancer promotion by heme iron." Chem Res Toxicol **24**(11): 1984-93.
Barbaresko, J., M. Koch, M. B. Schulze and U. Nothlings (2013). "Dietary pattern analysis and biomarkers of low-grade inflammation: a systematic literature review." Nutr Rev **71**(8): 511-27.
Bastide, N., F. Chenni, M. Audebert, R. Santarelli, S. Tache, N. Naud, M. Baradat, I. Jouanin, R. Surya, D. A. Hobbs, G. G. Kuhnle, I. Raymond-Letron, F. Gueraud, D. Corpet and F. Pierre (2014). "A central role for heme iron in colon carcinogenesis associated with red meat intake." Cancer Res.
Bastide, N. M., F. H. Pierre and D. E. Corpet (2011). "Heme iron from meat and risk of colorectal cancer: a meta-analysis and a review of the mechanisms involved." Cancer Prev Res (Phila) **4**(2): 177-84.
Basu, A. K. and L. J. Marnett (1983). "Unequivocal demonstration that malondialdehyde is a mutagen." Carcinogenesis **4**(3): 331-3.
Bauchart, D., F. Chantelot and G. Gandemer (2008). "Qualité nutritionnelle de la viande et des abats chez le bovin : données récentes sur les principaux constituants d'intérêt nutritionnel." Cahier de nutrition et de diététique **43**: 29-39.
Beauchemin, N. (2011). "The colorectal tumor microenvironment: the next decade." Cancer Microenviron **4**(2): 181-5.
Beresford, S. A., K. C. Johnson, C. Ritenbaugh, N. L. Lasser, L. G. Snetselaar, H. R. Black, G. L. Anderson, A. R. Assaf, T. Bassford, D. Bowen, R. L. Brunner, R. G. Brzyski, B. Caan, R. T. Chlebowski, M. Gass, R. C. Harrigan, J. Hays, D. Heber, G. Heiss, S. L. Hendrix, B. V. Howard, J. Hsia, F. A. Hubbell, R. D. Jackson, J. M. Kotchen, L. H. Kuller, A. Z. LaCroix, D. S. Lane, R. D. Langer, C. E. Lewis, J. E. Manson, K. L. Margolis, Y. Mossavar-Rahmani, J. K. Ockene, L. M. Parker, M. G. Perri, L. Phillips, R. L. Prentice, J. Robbins, J. E. Rossouw, G. E. Sarto, M. L. Stefanick, L. Van Horn, M. Z. Vitolins, J. Wactawski-Wende, R. B. Wallace and E. Whitlock (2006). "Low-fat dietary pattern and risk of colorectal cancer: the Women's Health Initiative Randomized Controlled Dietary Modification Trial." JAMA **295**(6): 643-54.
Beretta, G., S. Furlanetto, L. Regazzoni, M. Zarrella and R. M. Facino (2008). "Quenching of alpha,beta-unsaturated aldehydes by green tea polyphenols: HPLC-ESI-MS/MS studies." J Pharm Biomed Anal **48**(3): 606-11.
Bernet, M. F., D. Brassart, J. R. Neeser and A. L. Servin (1993). "Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen-cell interactions." Appl Environ Microbiol **59**(12): 4121-8.
Biesalski, H. K. (2005). "Meat as a component of a healthy diet - are there any risks or benefits if meat is avoided in the diet?" Meat Sci **70**(3): 509-24.
Bingham, S. A., R. Hughes and A. J. Cross (2002). "Effect of white versus red meat on endogenous N-nitrosation in the human colon and further evidence of a dose response." J Nutr **132**(11 Suppl): 3522S-3525S.
Bingham, S. A., B. Pignatelli, J. R. Pollock, A. Ellul, C. Malaveille, G. Gross, S. Runswick, J. H. Cummings and I. K. O'Neill (1996). "Does increased endogenous formation of N-nitroso compounds in the human colon explain the association between red meat and colon cancer?" Carcinogenesis **17**(3): 515-23.
Boland, C. R. and A. Goel (2010). "Microsatellite instability in colorectal cancer." Gastroenterology **138**(6): 2073-2087 e3.
Bonneson, C., I. M. Eggleston and J. D. Hayes (2001). Dietary indoles and isothiocyanates that are generated from cruciferous vegetables can both stimulate apoptosis and confer protection against DNA damage in human colon cell lines. Cancer Research. **61:** 6120-6130.
Bose, S., M. Y. Song, J. K. Nam, M. J. Lee and H. Kim (2012). "In vitro and in vivo protective effects of fermented preparations of dietary herbs against lipopolysaccharide insult." Food Chem **134**(2): 758-65.
Bourre, J.-M. (2011). "Réintégrer la viande bovine dans l'équilibre alimentaire." Bulletin Académique Vétérinaire de France **164**(3): 237-244.
Burgess, A. W., M. C. Faux, M. J. Layton and R. G. Ramsay (2011). "Wnt signaling and colon tumorigenesis--a view from the periphery." Exp Cell Res **317**(19): 2748-58.
Burke, R. M. and F. J. Monahan (2003). "The tenderisation of shin beef using a citrus juice marinade." Meat Sci **63**(2): 161-8.
Caderni, G., A. P. Femia, A. Giannini, A. Favuzza, C. Luceri, M. Salvadori and P. Dolara (2003). "Identification of mucin-depleted foci in the unsectioned colon of azoxymethane-treated rats: correlation with carcinogenesis." Cancer Res **63**(10): 2388-92.
Caderni, G., C. Luceri, C. De Filippo, M. Salvadori, A. Giannini, L. Tessitore and P. Dolara (2001). "Slow-release pellets of sodium butyrate do not modify azoxymethane (AOM)-induced intestinal carcinogenesis in F344 rats." Carcinogenesis **22**(3): 525-7.

Calle, E. E. and R. Kaaks (2004). "Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms." Nat Rev Cancer **4**(8): 579-91.

Candela, M., S. Turroni, E. Biagi, F. Carbonero, S. Rampelli, C. Fiorentini and P. Brigidi (2014). "Inflammation and colorectal cancer, when microbiota-host mutualism breaks." World J Gastroenterol **20**(4): 908-22.

Carpenter, C. E. and E. Clark (1995). "Evaluation of Methods Used in Meat Iron Analysis and Iron Content of Raw and Cooked Meats." Journal of Agricultural Food Chemistry **43**(7): 1824-1827.

Carpenter, C. E. and A. W. Mahoney (1992). "Contributions of heme and nonheme iron to human nutrition." Crit Rev Food Sci Nutr **31**(4): 333-67.

Carpenter, R., M. N. O'Grady, Y. C. O'Callaghan, N. M. O'Brien and J. P. Kerry (2007). "Evaluation of the antioxidant potential of grape seed and bearberry extracts in raw and cooked pork." Meat Sci **76**(4): 604-10.

Chenni, F. Z., S. Tache, N. Naud, F. Gueraud, D. A. Hobbs, G. G. Kunhle, F. H. Pierre and D. E. Corpet (2013). "Heme-induced biomarkers associated with red meat promotion of colon cancer are not modulated by the intake of nitrite." Nutr Cancer **65**(2): 227-33.

Cherukuri, D. P., T. O. Ishikawa, P. Chun, A. Catapang, D. Elashoff, T. R. Grogan, J. Bugni and H. R. Herschman (2014). "Targeted Cox2 gene deletion in intestinal epithelial cells decreases tumorigenesis in female, but not male, ApcMin/+ mice." Mol Oncol **8**(2): 169-77.

Chiou, Y. S., M. L. Tsai, K. Nagabhushanam, Y. J. Wang, C. H. Wu, C. T. Ho and M. H. Pan (2011). "Pterostilbene is more potent than resveratrol in preventing azoxymethane (AOM)-induced colon tumorigenesis via activation of the NF-E2-related factor 2 (Nrf2)-mediated antioxidant signaling pathway." J Agric Food Chem **59**(6): 2725-33.

Cindric, M., A. Cipak, E. Zapletal, M. Jaganjac, L. Milkovic, G. Waeg, S. Stolc, N. Zarkovic and S. Suzana Borovic (2013). "Stobadine attenuates impairment of an intestinal barrier model caused by 4-hydroxynonenal." Toxicol In Vitro **27**(1): 426-32.

Collins, D., A. M. Hogan and D. C. Winter (2011). "Microbial and viral pathogens in colorectal cancer." Lancet Oncol **12**(5): 504-12.

Conrad, M. E. and J. N. Umbreit (2000). "Iron absorption and transport-an update." Am J Hematol **64**(4): 287-98.

Corpet, D. E. (2011a). "The Chemoprevention database." from http://www.inra.fr/reseau-nacre/sci-memb/corpet/indexan.htlm.

(2011b). "Red meat and colon cancer: should we become vegetarians, or can we make meat safer?" Meat Sci **89**(3): 310-6.

Corpet, D. E. and F. Pierre (2003). "Point: From animal models to prevention of colon cancer. Systematic review of chemoprevention in min mice and choice of the model system." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **12**(5): 391-400.

(2005). "How good are rodent models of carcinogenesis in predicting efficacy in humans? A systematic review and meta-analysis of colon chemoprevention in rats, mice and men." Eur J Cancer **41**(13): 1911-22.

Cosper, P. F. and L. A. Leinwand (2010). "Cancer causes cardiac atrophy and autophagy in a sexually dimorphic manner." Cancer Res **71**(5): 1710-20.

Crosnier, C., D. Stamataki and J. Lewis (2006). "Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control." Nat Rev Genet **7**(5): 349-59.

Cross, A. J., L. M. Ferrucci, A. Risch, B. I. Graubard, M. H. Ward, Y. Park, A. R. Hollenbeck, A. Schatzkin and R. Sinha (2010). "A large prospective study of meat consumption and colorectal cancer risk: an investigation of potential mechanisms underlying this association." Cancer Res **70**(6): 2406-14.

Cross, A. J., J. M. Harnly, L. M. Ferrucci, A. Risch, S. T. Mayne and R. Sinha (2012). "Developing a heme iron database for meats according to meat type, cooking method and doneness level." Food Nutr Sci **3**(7): 905-913.

Cross, A. J., J. R. Pollock and S. A. Bingham (2003). "Haem, not protein or inorganic iron, is responsible for endogenous intestinal N-nitrosation arising from red meat." Cancer Res **63**(10): 2358-60.

Cucherat, M., J. Boissel and A. Leizorovicz (1997). Manuel pratique de méta-analyse des essais thérapeutiques. Lyon.

Cummings, J. H. and S. A. Bingham (1998). "Diet and the prevention of cancer." BMJ **317**(7173): 1636-40.

D'Inca, R., V. Di Leo, G. Corrao, D. Martines, A. D'Odorico, C. Mestriner, C. Venturi, G. Longo and G. C. Sturniolo (1999). "Intestinal permeability test as a predictor of clinical course in Crohn's disease." Am J Gastroenterol **94**(10): 2956-60.

d'Ischia, M., A. Napolitano, P. Manini and L. Panzella (2011). "Secondary targets of nitrite-derived reactive nitrogen species: nitrosation/nitration pathways, antioxidant defense mechanisms and toxicological implications." Chem Res Toxicol **24**(12): 2071-92.

Daniel, C. R., A. J. Cross, C. Koebnick and R. Sinha (2011). "Trends in meat consumption in the USA." Public Health Nutr **14**(4): 575-83.

de Oliveira Otto, M. C., A. Alonso, D. H. Lee, G. L. Delclos, N. S. Jenny, R. Jiang, J. A. Lima, E. Symanski, D. R. Jacobs, Jr. and J. A. Nettleton (2011). "Dietary micronutrient intakes are associated with markers of inflammation but not with markers of subclinical atherosclerosis." J Nutr **141**(8): 1508-15.

de Vogel, J., D. S. Jonker-Termont, M. B. Katan and R. van der Meer (2005a). "Natural chlorophyll but not chlorophyllin prevents heme-induced cytotoxic and hyperproliferative effects in rat colon." J Nutr **135**(8): 1995-2000.

de Vogel, J., D. S. Jonker-Termont, E. M. van Lieshout, M. B. Katan and R. van der Meer (2005b). "Green vegetables, red meat and colon cancer: chlorophyll prevents the cytotoxic and hyperproliferative effects of haem in rat colon." Carcinogenesis **26**(2): 387-93.

Dellavalle, C. T., Q. Xiao, G. Yang, X. O. Shu, B. Aschebrook-Kilfoy, W. Zheng, H. Lan Li, B. T. Ji, N. Rothman, W. H. Chow, Y. T. Gao and M. H. Ward (2014). "Dietary nitrate and nitrite intake and risk of colorectal cancer in the Shanghai Women's Health Study." Int J Cancer **134**(12): 2917-26.

Demeyer, D. (2010). "Letter to the editors: Balancing the risks and benefits of unprocessed and processed red meat consumption for both consumers and the environment." Meat Sci **86**(2): 529-30; author reply 531.

Demeyer, D., K. Honikel and S. De Smet (2008). "The World Cancer Research Fund report 2007: A challenge for the meat processing industry." Meat Sci **80**(4): 953-9.

Djekoun-Bensoltane, S., M. Kammerer, M. Larhantec, N. Pilet and C. Thorin (2007). "Nitrate and nitrite concentrations in rabbit saliva Comparison with rat saliva." Environ Toxicol Pharmacol **23**(1): 132-4.

Djenane, D., A. Sánchez-Escalante, J. A. Beltrán and P. Roncalés (2002). "Ability of α-tocopherol, taurine and rosemary, in combination with vitamin C, to increase the oxidative stability of beef steaks packaged in modified atmosphere." Food chem.

Douglass, M. L., B. L. Kabacoff, G. A. Anderson and M. C. Cheng (1978). "The chemistry of nitrosamine formation, inhibition and destruction." Journal of the Society of Cosmetic Chemists **29**: 581-606.

Dove, W. F., L. Clipson, K. A. Gould, C. Luongo, D. J. Marshall, A. R. Moser, M. A. Newton and R. F. Jacoby (1997). "Intestinal neoplasia in the ApcMin mouse: independence from the microbial and natural killer (beige locus) status." Cancer Res **57**(5): 812-4.

Downward, J. (2003). "Role of receptor tyrosine kinases in G-protein-coupled receptor regulation of Ras: transactivation or parallel pathways?" Biochem J **376**(Pt 3): e9-10.

Dutra, F. F. and M. T. Bozza (2014). "Heme on innate immunity and inflammation." Front Pharmacol **5**: 115.

Ebert, M. N., G. Beyer-Sehlmeyer, U. M. Liegibel, T. Kautenburger, T. W. Becker and B. L. Pool-Zobel (2001). "Butyrate induces glutathione S-transferase in human colon cells and protects from genetic damage by 4-hydroxy-2-nonenal." Nutr Cancer **41**(1-2): 156-64.

Eckburg, P. B., E. M. Bik, C. N. Bernstein, E. Purdom, L. Dethlefsen, M. Sargent, S. R. Gill, K. E. Nelson and D. A. Relman (2005). "Diversity of the human intestinal microbial flora." Science **308**(5728): 1635-8.

Edelblum, K. L. and J. R. Turner (2009). "The tight junction in inflammatory disease: communication breakdown." Curr Opin Pharmacol **9**(6): 715-20.

Elinav, E., R. Nowarski, C. A. Thaiss, B. Hu, C. Jin and R. A. Flavell (2013). "Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms." Nat Rev Cancer **13**(11): 759-71.

Engle, S. J., I. Ormsby, S. Pawlowski, G. P. Boivin, J. Croft, E. Balish and T. Doetschman (2002). "Elimination of colon cancer in germ-free transforming growth factor beta 1-deficient mice." Cancer Res **62**(22): 6362-6.

Erridge, C., T. Attina, C. M. Spickett and D. J. Webb (2007). "A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation." Am J Clin Nutr **86**(5): 1286-92.

Estaquio, C., N. Druesne-Pecollo, P. Latino-Martel, L. Dauchet, S. Hercberg and S. Bertrais (2008). "Socioeconomic differences in fruit and vegetable consumption among middle-aged French adults: adherence to the 5 A Day recommendation." J Am Diet Assoc **108**(12): 2021-30.

Estaquio, C., E. Kesse-Guyot, V. Deschamps, S. Bertrais, L. Dauchet, P. Galan, S. Hercberg and K. Castetbon (2009). "Adherence to the French Programme National Nutrition Sante Guideline Score is associated with better nutrient intake and nutritional status." J Am Diet Assoc **109**(6): 1031-41.

FAO (2006). Livestock's long shadow: Environmental issues and options. R. F. a. A. O. o. t. U. Nations.

Fearon, E. R. (2011). "Molecular genetics of colorectal cancer." Annu Rev Pathol **6**: 479-507.
Fearon, E. R. and B. Vogelstein (1990). "A genetic model for colorectal tumorigenesis." Cell **61**(5): 759-67.
Femia, A. P. and G. Caderni (2008). "Rodent models of colon carcinogenesis for the study of chemopreventive activity of natural products." Planta Med **74**(13): 1602-7.
Femia, A. P., P. Dolara and G. Caderni (2004). "Mucin-depleted foci (MDF) in the colon of rats treated with azoxymethane (AOM) are useful biomarkers for colon carcinogenesis." Carcinogenesis **25**(2): 277-81.
Femia, A. P., P. Dolara, A. Giannini, M. Salvadori, A. Biggeri and G. Caderni (2007). "Frequent mutation of Apc gene in rat colon tumors and mucin-depleted foci, preneoplastic lesions in experimental colon carcinogenesis." Cancer Res **67**(2): 445-9.
Femia, A. P., P. Dolara, C. Luceri, M. Salvadori and G. Caderni (2009). "Mucin-depleted foci show strong activation of inflammatory markers in 1,2-dimethylhydrazine-induced carcinogenesis and are promoted by the inflammatory agent sodium dextran sulfate." Int J Cancer **125**(3): 541-7.
Femia, A. P., C. Luceri, F. Bianchini, M. Salvadori, F. Salvianti, P. Pinzani, P. Dolara, L. Calorini and G. Caderni (2012). "Marie Menard apples with high polyphenol content and a low-fat diet reduce 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis in rats: effects on inflammation and apoptosis." Mol Nutr Food Res **56**(8): 1353-7.
Femia, A. P., C. Luceri, P. V. Soares, M. Lodovici and G. Caderni (2015). "Multiple mucin depleted foci, high proliferation and low apoptotic response in the onset of colon carcinogenesis of the PIRC rat, mutated in Apc." Int J Cancer **136**(6): E488-95.
Ferguson, L. R. (2010). "Meat and cancer." Meat Sci **84**(2): 308-13.
Ferrucci, L. M., R. Sinha, B. I. Graubard, S. T. Mayne, X. Ma, A. Schatzkin, P. S. Schoenfeld, B. D. Cash, A. Flood and A. J. Cross (2009). "Dietary meat intake in relation to colorectal adenoma in asymptomatic women." Am J Gastroenterol **104**(5): 1231-40.
Ferrucci, L. M., R. Sinha, W. Y. Huang, S. I. Berndt, H. A. Katki, R. E. Schoen, R. B. Hayes and A. J. Cross (2012). "Meat consumption and the risk of incident distal colon and rectal adenoma." Br J Cancer **106**(3): 608-16.
Fonseca-Nunes, A., P. Jakszyn and A. Agudo (2014). "Iron and cancer risk--a systematic review and meta-analysis of the epidemiological evidence." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **23**(1): 12-31.
Forest, V., M. Clement, F. Pierre, K. Meflah and J. Menanteau (2003a). "Butyrate restores motile function and actin cytoskeletal network integrity in apc mutated mouse colon epithelial cells." Nutr Cancer **45**(1): 84-92.
Forest, V., F. Pierre, E. Bassonga, K. Meflah, C. Olivier and J. Menanteau (2003b). "Apc+/Min colonic epithelial cells express TNF receptors and ICAM-1 when they are co-cultured with large intestine intra-epithelial lymphocytes." Cell Immunol **223**(1): 70-6.
Gaudier, E., M. Rival, M. P. Buisine, I. Robineau and C. Hoebler (2009). "Butyrate enemas upregulate Muc genes expression but decrease adherent mucus thickness in mice colon." Physiol Res **58**(1): 111-9.
Gay, L. J., P. N. Mitrou, J. Keen, R. Bowman, A. Naguib, J. Cooke, G. G. Kuhnle, P. A. Burns, R. Luben, M. Lentjes, K. T. Khaw, R. Y. Ball, A. E. Ibrahim and M. J. Arends (2012). "Dietary, lifestyle and clinicopathological factors associated with APC mutations and promoter methylation in colorectal cancers from the EPIC-Norfolk study." J Pathol **228**(3): 405-15.
Gibson, S. and M. Ashwell (2002). "The association between red and processed meat consumption and iron intakes and status among British adults." Public Health Nutrition **6**(4): 341-350.
Gilsing, A. M., S. I. Berndt, E. H. Ruder, B. I. Graubard, L. M. Ferrucci, L. Burdett, J. L. Weissfeld, A. J. Cross and R. Sinha (2012). "Meat-related mutagen exposure, xenobiotic metabolizing gene polymorphisms and the risk of advanced colorectal adenoma and cancer." Carcinogenesis **33**(7): 1332-9.
Glei, M., T. Hofmann, K. Kuster, J. Hollmann, M. G. Lindhauer and B. L. Pool-Zobel (2006a). "Both wheat (Triticum aestivum) bran arabinoxylans and gut flora-mediated fermentation products protect human colon cells from genotoxic activities of 4-hydroxynonenal and hydrogen peroxide." J Agric Food Chem **54**(6): 2088-95.
Glei, M., S. Klenow, J. Sauer, U. Wegewitz, K. Richter and B. L. Pool-Zobel (2006b). "Hemoglobin and hemin induce DNA damage in human colon tumor cells HT29 clone 19A and in primary human colonocytes." Mutat Res **594**(1-2): 162-71.
GLOBOCAN (2012). Cancer incidence and mortality worldwide, International Agency for Research on Cancer.

Gobert, M., D. Gruffat, M. Habeanu, E. Parafita, D. Bauchart and D. Durand (2010). "Plant extracts combined with vitamin E in PUFA-rich diets of cull cows protect processed beef against lipid oxidation." Meat Sci **85**(4): 676-83.

Gobert, M., D. Remond, M. Loonis, C. Buffiere, V. Sante-Lhoutellier and C. Dufour (2014). "Fruits, vegetables and their polyphenols protect dietary lipids from oxidation during gastric digestion." Food Funct **5**(9): 2166-74.

Goldbohm, R. A., P. A. van den Brandt, P. van 't Veer, H. A. Brants, E. Dorant, F. Sturmans and R. J. Hermus (1994). "A prospective cohort study on the relation between meat consumption and the risk of colon cancer." Cancer Res **54**(3): 718-23.

Gonzales, J. F., N. D. Barnard, D. J. Jenkins, A. J. Lanou, B. Davis, G. Saxe and S. Levin (2014). "Applying the precautionary principle to nutrition and cancer." J Am Coll Nutr **33**(3): 239-46.

Gonzalez, R., I. Ballester, R. Lopez-Posadas, M. D. Suarez, A. Zarzuelo, O. Martinez-Augustin and F. Sanchez de Medina (2011). "Effects of flavonoids and other polyphenols on inflammation." Crit Rev Food Sci Nutr **51**(4): 331-62.

Gordon, J. H. and R. Dubos (1970). "The anaerobic bacterial flora of the mouse cecum." J Exp Med **132**(2): 251-60.

Gorelik, S., M. Ligumsky, R. Kohen and J. Kanner (2008a). "A novel function of red wine polyphenols in humans: prevention of absorption of cytotoxic lipid peroxidation products." FASEB J **22**(1): 41-6.

(2008b). "The stomach as a "bioreactor": when red meat meets red wine." J Agric Food Chem **56**(13): 5002-7.

Goupy, P., A. B. Bautista-Ortin, H. Fulcrand and O. Dangles (2009). "Antioxidant activity of wine pigments derived from anthocyanins: hydrogen transfer reactions to the dpph radical and inhibition of the heme-induced peroxidation of linoleic acid." J Agric Food Chem **57**(13): 5762-70.

Grivennikov, S. I. (2013). "Inflammation and colorectal cancer: colitis-associated neoplasia." Semin Immunopathol **35**(2): 229-44.

Gryfe, R., C. Swallow, B. Bapat, M. Redston, S. Gallinger and J. Couture (1997). "Molecular biology of colorectal cancer." Curr Probl Cancer **21**(5): 233-300.

Gueraud, F., M. Atalay, N. Bresgen, A. Cipak, P. M. Eckl, L. Huc, I. Jouanin, W. Siems and K. Uchida (2010). "Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products." Free Radic Res **44**(10): 1098-124.

Gueraud, F., G. Peiro, H. Bernard, J. Alary, C. Creminon, L. Debrauwer, E. Rathahao, M. F. Drumare, C. Canlet, J. M. Wal and G. Bories (2006). "Enzyme immunoassay for a urinary metabolite of 4-hydroxynonenal as a marker of lipid peroxidation." Free Radic Biol Med **40**(1): 54-62.

Gueraud, F., G. Peiro, H. Bernard, J. Alary, F. Gueraud, L. Debrauwer, G. Bories and J. M. Wal (2005). "EIA for DHN-MA: an urinary metabolite of 4-HNE as a marker of lipid peroxidation /4-hydroxynonenal." Manuscript.

Guzman, J. R., V. S. Conlin and C. Jobin (2013). "Diet, microbiome, and the intestinal epithelium: an essential triumvirate?" Biomed Res Int **2013**: 425146.

Haenszel, W. and P. Correa (1973). "Cancer of the large intestine: epidemiologic findings." Dis Colon Rectum **16**(5): 371-7.

Han, O. (2011). "Molecular mechanism of intestinal iron absorption." Metallomics **3**(2): 103-9.

Harris, M. A., C. A. Reddy and G. R. Carter (1976). "Anaerobic bacteria from the large intestine of mice." Appl Environ Microbiol **31**(6): 907-12.

Hebels, D. G., K. M. Sveje, M. C. de Kok, M. H. van Herwijnen, G. G. Kuhnle, L. G. Engels, C. B. Vleugels-Simon, W. G. Mares, M. Pierik, A. A. Masclee, J. C. Kleinjans and T. M. de Kok (2012). "Red meat intake-induced increases in fecal water genotoxicity correlate with pro-carcinogenic gene expression changes in the human colon." Food Chem Toxicol **50**(2): 95-103.

Heddle, J. A., M. G. Knize, D. Dawod and X. B. Zhang (2001). "A test of the mutagenicity of cooked meats in vivo." Mutagenesis **16**(2): 103-7.

Heinen (2010). "Genotype to phenotype: analyzing the effects of inherited mutations in colorectal cancer families." Mutation research **693**(1-2): 32-45.

Hogg, N. (2007). "Red meat and colon cancer: heme proteins and nitrite in the gut. A commentary on "diet-induced endogenous formation of nitroso compounds in the GI tract"." Free Radic Biol Med **43**(7): 1037-9.

Hooda, J., A. Shah and L. Zhang (2014). "Heme, an essential nutrient from dietary proteins, critically impacts diverse physiological and pathological processes." Nutrients **6**(3): 1080-102.

Hopkins, J. (2014). "Johns Hopkins colon cancer center
", from http://www.hopkinscoloncancercenter.org/

Howell, A. B. and D. H. D'Souza (2013). "The pomegranate: effects on bacteria and viruses that influence human health." Evid Based Complement Alternat Med **2013**: 606212.
Hur, S. J., B. O. Lim, G. B. Park and S. T. Joo (2009). "Effects of various fiber additions on lipid digestion during in vitro digestion of beef patties." J Food Sci **74**(9): C653-7.
Hygreeva, D., M. C. Pandey and K. Radhakrishna (2014). "Potential applications of plant based derivatives as fat replacers, antioxidants and antimicrobials in fresh and processed meat products." Meat Sci **98**(1): 47-57.
IFIP (2008). "Les consommateurs de porc frais et de charcuterie : qui sont-ils? Eclairage sociologique." TechniPorc, revue technique de l'IFIP **31**(4).
(2010). Vers une recommandation de réduction du taux de nitrites dans les différentes familles de charcuterie.
IJssennagger, N., M. Derrien, G. M. van Doorn, A. Rijnierse, B. van den Bogert, M. Muller, J. Dekker, M. Kleerebezem and R. van der Meer (2012a). "Dietary heme alters microbiota and mucosa of mouse colon without functional changes in host-microbe cross-talk." PLoS One **7**(12): e49868.
IJssennagger, N., A. Rijnierse, N. de Wit, D. Jonker-Termont, J. Dekker, M. Muller and R. van der Meer (2012b). "Dietary haem stimulates epithelial cell turnover by downregulating feedback inhibitors of proliferation in murine colon." Gut **61**(7): 1041-9.
INCA-2 (2009). Etude Individuelle Nationale des Consommations Alimentaires 2 2006-2007.
INCA. (2010). "Institut National du Cancer : Les cancers." from http://www.e-cancer.fr/cancerinfo/les-cancers/

(2013). Les cancers en France en 2013, Institut National du CAncer.
Irving, A. A., K. Yoshimi, M. L. Hart, T. Parker, L. Clipson, M. R. Ford, T. Kuramoto, W. F. Dove and J. M. Amos-Landgraf (2014). "The utility of Apc-mutant rats in modeling human colon cancer." Dis Model Mech **7**(11): 1215-1225.
Ishikawa, S., S. Tamaki, M. Ohata, K. Arihara and M. Itoh (2010). "Heme induces DNA damage and hyperproliferation of colonic epithelial cells via hydrogen peroxide produced by heme oxygenase: a possible mechanism of heme-induced colon cancer." Mol Nutr Food Res **54**(8): 1182-91.
Ismail, H. A., E. J. Lee, K. Y. Ko and D. U. Ahn (2009). "Fat content influences the color, lipid oxidation, and volatiles of irradiated ground beef." J Food Sci **74**(6): C432-40.
Issa, J. P., L. Shen and M. Toyota (2005). "CIMP, at last." Gastroenterology **129**(3): 1121-4.
Ito, M., K. Ohishi, Y. Yoshida, W. Yokoi and H. Sawada (2003). "Antioxidative effects of lactic acid bacteria on the colonic mucosa of iron-overloaded mice." J Agric Food Chem **51**(15): 4456-60.
Ito, M., H. Sawada, K. Ohishi, Y. Yoshida, W. Yokoi, T. Watanabe and T. Yokokura (2001). "Suppressive effects of bifidobacteria on lipid peroxidation in the colonic mucosa of iron-overloaded mice." J Dairy Sci **84**(7): 1583-9.
Itzkowitz, S. H. and X. Yio (2004). "Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **287**(1): G7-17.
Jagerstad, M. and K. Skog (1991). "Formation of meat mutagens." Adv Exp Med Biol **289**: 83-105.
Jakobsen, M. and G. Bertelsen (2000). "Colour stability and lipid oxidation of fresh beef. Development of a response surface model for predicting the effects of temperature, storage time, and modified atmosphere composition." Meat Sci **54**(1): 49-57.
Jeronimo, E., C. M. Alfaia, S. P. Alves, M. T. Dentinho, J. A. Prates, V. Vasta, J. Santos-Silva and R. J. Bessa (2012). "Effect of dietary grape seed extract and Cistus ladanifer L. in combination with vegetable oil supplementation on lamb meat quality." Meat Sci **92**(4): 841-7.
Joosen, A. M., G. G. Kuhnle, S. M. Aspinall, T. M. Barrow, E. Lecommandeur, A. Azqueta, A. R. Collins and S. A. Bingham (2009). "Effect of processed and red meat on endogenous nitrosation and DNA damage." Carcinogenesis **30**(8): 1402-7.
Kang, N. J., S. H. Shin, H. J. Lee and K. W. Lee (2011). "Polyphenols as small molecular inhibitors of signaling cascades in carcinogenesis." Pharmacol Ther **130**(3): 310-24.
Kanner, J., S. Gorelik, S. Roman and R. Kohen (2012). "Protection by polyphenols of postprandial human plasma and low-density lipoprotein modification: the stomach as a bioreactor." J Agric Food Chem **60**(36): 8790-6.
Karnoub, A. E. and R. A. Weinberg (2008). "Ras oncogenes: split personalities." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(7): 517-31.
Karre, L., K. Lopez and K. J. Getty (2013). "Natural antioxidants in meat and poultry products." Meat Sci **94**(2): 220-7.
Khan, A. A. and J. G. Quigley (2013). "Heme and FLVCR-related transporter families SLC48 and SLC49." Mol Aspects Med **34**(2-3): 669-82.

Kim, E., D. Coelho and F. Blachier (2013a). "Review of the association between meat consumption and risk of colorectal cancer." Nutr Res **33**(12): 983-94.

Kim, H. W., Y. S. Choi, J. H. Choi, H. Y. Kim, M. A. Lee, K. E. Hwang, D. H. Song, Y. B. Lim and C. J. Kim (2013b). "Tenderization effect of soy sauce on beef M. biceps femoris." Food Chem **139**(1-4): 597-603.

Klinder, A., A. Forster, G. Caderni, A. P. Femia and B. L. Pool-Zobel (2004). "Fecal water genotoxicity is predictive of tumor-preventive activities by inulin-like oligofructoses, probiotics (Lactobacillus rhamnosus and Bifidobacterium lactis), and their synbiotic combination." Nutr Cancer **49**(2): 144-55.

Knoll, N., C. Ruhe, S. Veeriah, J. Sauer, M. Glei, E. P. Gallagher and B. L. Pool-Zobel (2005). "Genotoxicity of 4-hydroxy-2-nonenal in human colon tumor cells is associated with cellular levels of glutathione and the modulation of glutathione S-transferase A4 expression by butyrate." Toxicol Sci **86**(1): 27-35.

Kohno, H., R. Suzuki, Y. Yasui, M. Hosokawa, K. Miyashita and T. Tanaka (2004). "Pomegranate seed oil rich in conjugated linolenic acid suppresses chemically induced colon carcinogenesis in rats." Cancer Sci **95**(6): 481-6.

Kongkachuichai, R., P. Napatthalung and R. Charoensiri (2002). "Heme and nonheme iron content of animal products commonly consumed in Thailand." Journal of food composition and analysis **15**: 389-398.

Koropatkin, N. M., E. A. Cameron and E. C. Martens (2012). "How glycan metabolism shapes the human gut microbiota." Nat Rev Microbiol **10**(5): 323-35.

Kuhnle, G. G. and S. A. Bingham (2007). "Dietary meat, endogenous nitrosation and colorectal cancer." Biochem Soc Trans **35**(Pt 5): 1355-7.

Kuhnle, G. G., G. W. Story, T. Reda, A. R. Mani, K. P. Moore, J. C. Lunn and S. A. Bingham (2007). "Diet-induced endogenous formation of nitroso compounds in the GI tract." Free Radic Biol Med **43**(7): 1040-7.

Lapre, J. A. and R. Van der Meer (1992). "Diet-induced increase of colonic bile acids stimulates lytic activity of fecal water and proliferation of colonic cells." Carcinogenesis **13**(1): 41-4.

Larsson, E., V. Tremaroli, Y. S. Lee, O. Koren, I. Nookaew, A. Fricker, J. Nielsen, R. E. Ley and F. Backhed (2012). "Analysis of gut microbial regulation of host gene expression along the length of the gut and regulation of gut microbial ecology through MyD88." Gut **61**(8): 1124-31.

Larsson, S. C. and N. Orsini (2013). "Red meat and processed meat consumption and all-cause mortality: a meta-analysis." Am J Epidemiol **179**(3): 282-9.

Larsson, S. C. and A. Wolk (2006). "Meat consumption and risk of colorectal cancer: a meta-analysis of prospective studies." Int J Cancer **119**(11): 2657-64.

Laukoetter, M. G., P. Nava, W. Y. Lee, E. A. Severson, C. T. Capaldo, B. A. Babbin, I. R. Williams, M. Koval, E. Peatman, J. A. Campbell, T. S. Dermody, A. Nusrat and C. A. Parkos (2007). "JAM-A regulates permeability and inflammation in the intestine in vivo." J Exp Med **204**(13): 3067-76.

Laukoetter, M. G., P. Nava and A. Nusrat (2008). "Role of the intestinal barrier in inflammatory bowel disease." World J Gastroenterol **14**(3): 401-7.

Layrisse, M., J. D. Cook, C. Martinez, M. Roche, I. N. Kuhn, R. B. Walker and C. A. Finch (1969). "Food iron absorption: a comparison of vegetable and animal foods." Blood **33**(3): 430-43.

Le Ferrec, E., C. Chesne, P. Artusson, D. Brayden, G. Fabre, P. Gires, F. Guillou, M. Rousset, W. Rubas and M. L. Scarino (2001). "In vitro models of the intestinal barrier. The report and recommendations of ECVAM Workshop 46. European Centre for the Validation of Alternative methods." Altern Lab Anim **29**(6): 649-68.

Lee, D. H., K. E. Anderson, A. R. Folsom and D. R. Jacobs, Jr. (2005). "Heme iron, zinc and upper digestive tract cancer: the Iowa Women's Health Study." Int J Cancer **117**(4): 643-7.

Lee, D. H., K. E. Anderson, L. J. Harnack, A. R. Folsom and D. R. Jacobs, Jr. (2004). "Heme iron, zinc, alcohol consumption, and colon cancer: Iowa Women's Health Study." J Natl Cancer Inst **96**(5): 403-7.

Lee, I. A., E. A. Bae, Y. J. Hyun and D. H. Kim (2010). "Dextran sulfate sodium and 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid induce lipid peroxidation by the proliferation of intestinal gram-negative bacteria in mice." J Inflamm (Lond) **7**: 7.

Lee, S. E. and Y. S. Park (2013). "Role of lipid peroxidation-derived alpha, beta-unsaturated aldehydes in vascular dysfunction." Oxid Med Cell Longev **2013**: 629028.

Lefèvre, G., M. Beljean-Leymarie, F. Beyerle, D. Bonnefont-Rousselot, J.-P. Cristol, P. Thérond and J. Torreilles (1998). "Evaluation de la peroxydation lipidique par le dosage des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique " Annales de biologie clinique **56**(3): 305-319.

Lewin, M. H., N. Bailey, T. Bandaletova, R. Bowman, A. J. Cross, J. Pollock, D. E. Shuker and S. A. Bingham (2006). "Red meat enhances the colonic formation of the DNA adduct O6-carboxymethyl guanine: implications for colorectal cancer risk." Cancer Res **66**(3): 1859-65.

Ley, R. E., D. A. Peterson and J. I. Gordon (2006). "Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine." Cell **124**(4): 837-48.

Lipinski, B. (2011). "Hydroxyl radical and its scavengers in health and disease." Oxid Med Cell Longev **2011**: 809696.

Loh, Y. H., P. Jakszyn, R. N. Luben, A. A. Mulligan, P. N. Mitrou and K. T. Khaw (2011). "N-Nitroso compounds and cancer incidence: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Norfolk Study." Am J Clin Nutr **93**(5): 1053-61.

Lombardi-Boccia, G., B. Martinez-Diminguez and A. Aguzzi (2002). "Total heme an non-heme iron in raw and cooked meats." Journal of food science **67**(5): 1738-1741.

Lorenzo, J. M., J. Sineiro, I. R. Amado and D. Franco (2014). "Influence of natural extracts on the shelf life of modified atmosphere-packaged pork patties." Meat Sci **96**(1): 526-34.

Lorrain, B., C. Dufour and O. Dangles (2010). "Influence of serum albumin and the flavonol quercetin on the peroxidase activity of metmyoglobin." Free Radic Biol Med **48**(9): 1162-72.

Louis, P., G. L. Hold and H. J. Flint (2014). "The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer." Nat Rev Microbiol **12**(10): 661-72.

Luciano, G., F. J. Monahan, V. Vasta, L. Biondi, M. Lanza and A. Priolo (2009). "Dietary tannins improve lamb meat colour stability." Meat Sci **81**(1): 120-5.

Lynch, H. T., P. M. Lynch, S. J. Lanspa, C. L. Snyder, J. F. Lynch and C. R. Boland (2009). "Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications." Clin Genet **76**(1): 1-18.

Ma, Q., E. Y. Kim and O. Han (2010). "Bioactive dietary polyphenols decrease heme iron absorption by decreasing basolateral iron release in human intestinal Caco-2 cells." J Nutr **140**(6): 1117-21.

(2011). "Bioactive dietary polyphenols decrease heme iron absorption by decreasing basolateral iron release in human intestinal Caco-2 cells." J Nutr **140**(6): 1117-21.

MacFarlane, A. J. and P. J. Stover (2007). "Convergence of genetic, nutritional and inflammatory factors in gastrointestinal cancers." Nutr Rev **65**(12 Pt 2): S157-66.

Magnuson, B. A., I. Carr and R. P. Bird (1993). "Ability of aberrant crypt foci characteristics to predict colonic tumor incidence in rats fed cholic acid." Cancer Res **53**(19): 4499-504.

Maier, B. R., M. A. Flynn, G. C. Burton, R. K. Tsutakawa and D. J. Hentges (1974). "Effects of a high-beef diet on bowel flora: a preliminary report." Am J Clin Nutr **27**(12): 1470-4.

Maloy, K. J. and F. Powrie (2011). "Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease." Nature **474**(7351): 298-306.

Mandel, S., O. Weinreb, L. Reznichenko, L. Kalfon and T. Amit (2006). "Green tea catechins as brain-permeable, non toxic iron chelators to "iron out iron" from the brain." J Neural Transm Suppl(71): 249-57.

Marteau, P. R., M. de Vrese, C. J. Cellier and J. Schrezenmeir (2001). "Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics." Am J Clin Nutr **73**(2 Suppl): 430S-436S.

Martikainen, P., E. Brunner and M. Marmot (2003). "Socioeconomic differences in dietary patterns among middle-aged men and women." Soc Sci Med **56**(7): 1397-410.

Martinez-Torres, C., I. Leets, P. Taylor, J. Ramirez, M. del Valle Camacho and M. Layrisse (1986). "Heme, ferritin and vegetable iron absorption in humans from meals denatured of heme iron during the cooking of beef." J Nutr **116**(9): 1720-5.

Mason, L. M., S. A. Hogan, A. Lynch, K. O'Sullivan, P. G. Lawlor and J. P. Kerry (2005). "Effects of restricted feeding and antioxidant supplementation on pig performance and quality characteristics of longissimus dorsi muscle from Landrace and Duroc pigs." Meat Sci **70**(2): 307-17.

McAfee, A. J., E. M. McSorley, G. J. Cuskelly, B. W. Moss, J. M. Wallace, M. P. Bonham and A. M. Fearon (2010). "Red meat consumption: an overview of the risks and benefits." Meat Sci **84**(1): 1-13.

McAlpine, C. A., Y. Barak, I. Matise and R. T. Cormier (2006). "Intestinal-specific PPARgamma deficiency enhances tumorigenesis in ApcMin/+ mice." Int J Cancer **119**(10): 2339-46.

McIntosh, G. H. and R. K. Le Leu (2001). "The influence of dietary proteins on colon cancer risk." Nutr Res **21**(7): 1053-1066.

McLellan, E. A. and R. P. Bird (1988). "Aberrant crypts: potential preneoplastic lesions in the murine colon." Cancer Res **48**(21): 6187-92.

McLellan, E. A., A. Medline and R. P. Bird (1991). "Dose response and proliferative characteristics of aberrant crypt foci: putative preneoplastic lesions in rat colon." Carcinogenesis **12**(11): 2093-8.

Meagher, E. A. and G. A. FitzGerald (2000). "Indices of lipid peroxidation in vivo: strengths and limitations." Free Radic Biol Med **28**(12): 1745-50.

Meineri, G., C. Medana, V. Giancotti, S. Visentin and P. G. Peiretti (2013). "Effect of dietary supplementation of vitamin E in pigs to prevent the formation of carcinogenic substances in meat products." Journal of food composition and analysis **30**: 67-72.

Melo, A., O. Viegas, C. Petisca, O. Pinho and I. M. Ferreira (2008). "Effect of beer/red wine marinades on the formation of heterocyclic aromatic amines in pan-fried beef." J Agric Food Chem **56**(22): 10625-32.

Miller, P. E., P. Lazarus, S. M. Lesko, A. J. Cross, R. Sinha, J. Laio, J. Zhu, G. Harper, J. E. Muscat and T. J. Hartman (2013). "Meat-related compounds and colorectal cancer risk by anatomical subsite." Nutr Cancer **65**(2): 202-26.

Millward, D. J. and T. Garnett (2010). "Plenary Lecture 3: Food and the planet: nutritional dilemmas of greenhouse gas emission reductions through reduced intakes of meat and dairy foods." Proc Nutr Soc **69**(1): 103-18.

Mirvish, S. S. (1986). "Effects of vitamins C and E on N-nitroso compound formation, carcinogenesis, and cancer." Cancer **58**(8 Suppl): 1842-50.

Mirvish, S. S., J. Haorah, L. Zhou, M. Hartman, C. R. Morris and M. L. Clapper (2003). "N-nitroso compounds in the gastrointestinal tract of rats and in the feces of mice with induced colitis or fed hot dogs or beef." Carcinogenesis **24**(3): 595-603.

Mirvish, S. S., K. J. Reimers, B. Kutler, S. C. Chen, J. Haorah, C. R. Morris, A. C. Grandjean and E. R. Lyden (2000). "Nitrate and nitrite concentrations in human saliva for men and women at different ages and times of the day and their consistency over time." Eur J Cancer Prev **9**(5): 335-42.

Monsen, E. R. and J. L. Balintfy (1982). "Calculating dietary iron bioavailability: refinement and computerization." J Am Diet Assoc **80**(4): 307-11.

Moore, W. E. and L. H. Moore (1995). "Intestinal floras of populations that have a high risk of colon cancer." Appl Environ Microbiol **61**(9): 3202-7.

Moser, A. R., H. C. Pitot and W. F. Dove (1990). "A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse." Science **247**(4940): 322-4.

Muino, I., E. Apeleo, J. de la Fuente, C. Perez-Santaescolastica, A. Rivas-Canedo, C. Perez, M. T. Diaz, V. Caneque and S. Lauzurica (2014). "Effect of dietary supplementation with red wine extract or vitamin E, in combination with linseed and fish oil, on lamb meat quality." Meat Sci **98**(2): 116-23.

Murphy, G., S. S. Devesa, A. J. Cross, P. D. Inskip, K. A. McGlynn and M. B. Cook (2011). "Sex disparities in colorectal cancer incidence by anatomic subsite, race and age." Int J Cancer **128**(7): 1668-75.

Narayan, S. and D. Roy (2003). "Role of APC and DNA mismatch repair genes in the development of colorectal cancers." Mol Cancer **2**: 41.

Nathke, I. S. (2004). "The adenomatous polyposis coli protein: the Achilles heel of the gut epithelium." Annu Rev Cell Dev Biol **20**: 337-66.

Newmark, H. L., K. Yang, N. Kurihara, K. Fan, L. H. Augenlicht and M. Lipkin (2009). "Western-style diet-induced colonic tumors and their modulation by calcium and vitamin D in C57Bl/6 mice: a preclinical model for human sporadic colon cancer." Carcinogenesis **30**(1): 88-92.

Niedernhofer, L. J., J. S. Daniels, C. A. Rouzer, R. E. Greene and L. J. Marnett (2003). "Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells." J Biol Chem **278**(33): 31426-33.

Niho, N., M. Takahashi, T. Kitamura, Y. Shoji, M. Itoh, T. Noda, T. Sugimura and K. Wakabayashi (2003). "Concomitant suppression of hyperlipidemia and intestinal polyp formation in Apc-deficient mice by peroxisome proliferator-activated receptor ligands." Cancer Res **63**(18): 6090-5.

Noguchi, M., T. Yoshida and G. Kikuchi (1982). "Identification of the product of heme degradation catalyzed by the heme oxygenase system as biliverdin IX alpha by reversed-phase high-performance liquid chromatography." J Biochem **91**(5): 1479-83.

Norat, T., A. Lukanova, P. Ferrari and E. Riboli (2002). "Meat consumption and colorectal cancer risk: dose-response meta-analysis of epidemiological studies." Int J Cancer **98**(2): 241-56.

Nougayrede, J. P. and E. Oswald (2011). "Microbiota and colorectal cancer: genotoxic bacteria in the intestinal tract." Bull Acad Natl Med **195**(6): 1295-304; discussion 1304-5.

O'Grady, M. N., M. Maher, D. J. Troy, A. P. Moloney and J. P. Kerry (2006). "An assessment of dietary supplementation with tea catechins and rosemary extract on the quality of fresh beef." Meat Sci **73**(1): 132-43.

O'Keefe, S. J., D. Chung, N. Mahmoud, A. R. Sepulveda, M. Manafe, J. Arch, H. Adada and T. van der Merwe (2007). "Why do African Americans get more colon cancer than Native Africans?" The Journal of nutrition **137**(1 Suppl).

Ohkawa, H., N. Ohishi and K. Yagi (1979). "Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction." Anal Biochem **95**(2): 351-8.
Okada, F. (2014). "Inflammation-related carcinogenesis: current findings in epidemiological trends, causes and mechanisms." Yonago Acta Med **57**(2): 65-72.
Ollberding, N. J., L. R. Wilkens, B. E. Henderson, L. N. Kolonel and L. Le Marchand (2012). "Meat consumption, heterocyclic amines and colorectal cancer risk: the Multiethnic Cohort Study." Int J Cancer **131**(7): E1125-33.
Omar, S., M. Feki and N. Kaabachi (2006). "[Iron metabolism, overview and recent insights]." Ann Biol Clin (Paris) **64**(6): 523-34.
Parkin, D. M. (2011). "The fraction of cancer attributable to lifestyle and environmental factors in the UK in 2010." Br J Cancer **105 Suppl 2**: S2-5.
Parnaud, G. and D. E. Corpet (1997). "[Colorectal cancer: controversial role of meat consumption]." Bull Cancer **84**(9): 899-911.
Parnaud, G., B. Pignatelli, G. Peiffer, S. Tache and D. E. Corpet (2000). "Endogenous N-nitroso compounds, and their precursors, present in bacon, do not initiate or promote aberrant crypt foci in the colon of rats." Nutr Cancer **38**(1): 74-80.
PathologyOutlines. from http://www.pathologyoutlines.com/.
Pearson, J. R., C. I. Gill and I. R. Rowland (2009). "Diet, fecal water, and colon cancer--development of a biomarker." Nutr Rev **67**(9): 509-26.
Pegg, R. B. and F. Shahidi (2000). Nitrite curing of meat: the N-nitrosamine problem and nitrite alternatives, Food & Nutrition PressInc.
Perrin, P., F. Pierre, Y. Patry, M. Champ, M. Berreur, G. Pradal, F. Bornet, K. Meflah and J. Menanteau (2001). "Only fibres promoting a stable butyrate producing colonic ecosystem decrease the rate of aberrant crypt foci in rats." Gut **48**(1): 53-61.
Perron, N. R. and J. L. Brumaghim (2009). "A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding." Cell Biochem Biophys **53**(2): 75-100.
Perse, M. and A. Cerar (2011). "Morphological and molecular alterations in 1,2 dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats." J Biomed Biotechnol **2011**: 473964.
Peterson, L. W. and D. Artis (2014). "Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis." Nat Rev Immunol **14**(3): 141-53.
Phillips, D. H. (1999). "Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet." Mutat Res **443**(1-2): 139-47.
Piche, T. (2014). "Tight junctions and IBS--the link between epithelial permeability, low-grade inflammation, and symptom generation?" Neurogastroenterol Motil **26**(3): 296-302.
Pierre, F., A. Freeman, S. Tache, R. Van der Meer and D. E. Corpet (2004). "Beef meat and blood sausage promote the formation of azoxymethane-induced mucin-depleted foci and aberrant crypt foci in rat colons." J Nutr **134**(10): 2711-6.
Pierre, F., G. Peiro, S. Tache, A. J. Cross, S. A. Bingham, N. Gasc, G. Gottardi, D. E. Corpet and F. Gueraud (2006). "New marker of colon cancer risk associated with heme intake: 1,4-dihydroxynonane mercapturic acid." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **15**(11): 2274-9.
Pierre, F., R. Santarelli, S. Tache, F. Gueraud and D. E. Corpet (2008). "Beef meat promotion of dimethylhydrazine-induced colorectal carcinogenesis biomarkers is suppressed by dietary calcium." Br J Nutr **99**(5): 1000-6.
Pierre, F., S. Tache, F. Gueraud, A. L. Rerole, M. L. Jourdan and C. Petit (2007). "Apc mutation induces resistance of colonic cells to lipoperoxide-triggered apoptosis induced by faecal water from haem-fed rats." Carcinogenesis **28**(2): 321-7.
Pierre, F., S. Tache, C. R. Petit, R. Van der Meer and D. E. Corpet (2003). "Meat and cancer: haemoglobin and haemin in a low-calcium diet promote colorectal carcinogenesis at the aberrant crypt stage in rats." Carcinogenesis **24**(10): 1683-90.
Pierre, F. H., O. C. Martin, R. L. Santarelli, S. Tache, N. Naud, F. Gueraud, M. Audebert, J. Dupuy, N. Meunier, D. Attaix, J. L. Vendeuvre, S. S. Mirvish, G. C. Kuhnle, N. Cano and D. E. Corpet (2013). "Calcium and alpha-tocopherol suppress cured-meat promotion of chemically induced colon carcinogenesis in rats and reduce associated biomarkers in human volunteers." Am J Clin Nutr **98**(5): 1255-62.
Pierre, F. H., R. L. Santarelli, O. Allam, S. Tache, N. Naud, F. Gueraud and D. E. Corpet (2010). "Freeze-dried ham promotes azoxymethane-induced mucin-depleted foci and aberrant crypt foci in rat colon." Nutr Cancer **62**(5): 567-73.
PNNS (2009). Nutrition & prévention des cancers : des connaissances scientifiques aux recommandations, Institution National du Cancer.
Pott, J. and M. Hornef (2007). "Innate immune signalling at the intestinal epithelium in homeostasis and disease." EMBO Rep **13**(8): 684-98.

Preston, S. L., S. J. Leedham, D. Oukrif, M. Deheregoda, R. A. Goodlad, R. Poulsom, M. R. Alison, N. A. Wright and M. Novelli (2008). "The development of duodenal microadenomas in FAP patients: the human correlate of the Min mouse." J Pathol **214**(3): 294-301.

Pretlow, T. P., B. J. Barrow, W. S. Ashton, M. A. O'Riordan, T. G. Pretlow, J. A. Jurcisek and T. A. Stellato (1991). "Aberrant crypts: putative preneoplastic foci in human colonic mucosa." Cancer Res **51**(5): 1564-7.

Pryde, S. E., S. H. Duncan, G. L. Hold, C. S. Stewart and H. J. Flint (2002). "The microbiology of butyrate formation in the human colon." FEMS Microbiol Lett **217**(2): 133-9.

Puppa, M. J., J. P. White, S. Sato, M. Cairns, J. W. Baynes and J. A. Carson (2011). "Gut barrier dysfunction in the Apc(Min/+) mouse model of colon cancer cachexia." Biochim Biophys Acta **1812**(12): 1601-6.

Purchas, R. W., D. C. Simcock, T. W. Knight and B. H. P. Wilkinson (2003). "Variation in the form of iron in beef and lamb meat and losses of iron during cooking and storage." International journal of food science & technology **38**(7): 827-837.

Qiao, L. and Y. Feng (2013). "Intakes of heme iron and zinc and colorectal cancer incidence: a meta-analysis of prospective studies." Cancer Causes Control **24**(6): 1175-83.

Qin, J., R. Li, J. Raes, M. Arumugam, K. S. Burgdorf, C. Manichanh, T. Nielsen, N. Pons, F. Levenez, T. Yamada, D. R. Mende, J. Li, J. Xu, S. Li, D. Li, J. Cao, B. Wang, H. Liang, H. Zheng, Y. Xie, J. Tap, P. Lepage, M. Bertalan, J. M. Batto, T. Hansen, D. Le Paslier, A. Linneberg, H. B. Nielsen, E. Pelletier, P. Renault, T. Sicheritz-Ponten, K. Turner, H. Zhu, C. Yu, M. Jian, Y. Zhou, Y. Li, X. Zhang, N. Qin, H. Yang, J. Wang, S. Brunak, J. Dore, F. Guarner, K. Kristiansen, O. Pedersen, J. Parkhill, J. Weissenbach, P. Bork and S. D. Ehrlich (2010). "A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing." Nature **464**(7285): 59-65.

Raffin, S. B., C. H. Woo, K. T. Roost, D. C. Price and R. Schmid (1974). "Intestinal absorption of hemoglobin iron-heme cleavage by mucosal heme oxygenase." J Clin Invest **54**(6): 1344-52.

Raude, J. (2008). "La place de la viande dans le modèle alimentaire francais." Cah Nutr Diét **43**: 1S19-1S28.

Reddy, G. V., A. R. Sen, P. N. Nair, K. S. Reddy, K. K. Reddy and N. Kondaiah (2013). "Effects of grape seed extract on the oxidative and microbial stability of restructured mutton slices." Meat Sci **95**(2): 288-94.

Resta, S. C. (2009). "Effects of probiotics and commensals on intestinal epithelial physiology: implications for nutrient handling." J Physiol **587**(Pt 17): 4169-74.

Rhoades, J., C. Kargiotou, E. Katsanidis and K. P. Koutsoumanis (2013). "Use of marination for controlling Salmonella enterica and Listeria monocytogenes in raw beef." Food Microbiol **36**(2): 248-53.

Rohrmann, S., K. Overvad, H. B. Bueno-de-Mesquita, M. U. Jakobsen, R. Egeberg, A. Tjonneland, L. Nailler, M. C. Boutron-Ruault, F. Clavel-Chapelon, V. Krogh, D. Palli, S. Panico, R. Tumino, F. Ricceri, M. M. Bergmann, H. Boeing, K. Li, R. Kaaks, K. T. Khaw, N. J. Wareham, F. L. Crowe, T. J. Key, A. Naska, A. Trichopoulou, D. Trichopoulos, M. Leenders, P. H. Peeters, D. Engeset, C. L. Parr, G. Skeie, P. Jakszyn, M. J. Sanchez, J. M. Huerta, M. L. Redondo, A. Barricarte, P. Amiano, I. Drake, E. Sonestedt, G. Hallmans, I. Johansson, V. Fedirko, I. Romieux, P. Ferrari, T. Norat, A. C. Vergnaud, E. Riboli and J. Linseisen (2013). "Meat consumption and mortality--results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition." BMC Med **11**: 63.

Romeu, M., N. Aranda, M. Giralt, B. Ribot, M. R. Nogues and V. Arija (2013). "Diet, iron biomarkers and oxidative stress in a representative sample of Mediterranean population." Nutr J **12**: 102.

Rumney, C. J., I. R. Rowland, T. M. Coutts, K. Randerath, R. Reddy, A. B. Shah, A. Ellul and I. K. O'Neill (1993). "Effects of risk-associated human dietary macrocomponents on processes related to carcinogenesis in human-flora-associated (HFA) rats." Carcinogenesis **14**(1): 79-84.

Rusan, N. M. and M. Peifer (2008). "Original CIN: reviewing roles for APC in chromosome instability." J Cell Biol **181**(5): 719-26.

Santarelli, R. L., N. Naud, S. Tache, F. Gueraud, J. L. Vendeuvre, L. Zhou, M. M. Anwar, S. S. Mirvish, D. E. Corpet and F. H. Pierre (2013). "Calcium inhibits promotion by hot dog of 1,2-dimethylhydrazine-induced mucin-depleted foci in rat colon." Int J Cancer **133**(11): 2533-41.

Santarelli, R. L., J. L. Vendeuvre, N. Naud, S. Tache, F. Gueraud, M. Viau, C. Genot, D. E. Corpet and F. H. Pierre (2010). "Meat processing and colon carcinogenesis: cooked, nitrite-treated, and oxidized high-heme cured meat promotes mucin-depleted foci in rats." Cancer Prev Res (Phila) **3**(7): 852-64.

Savage, D. C. (1970). "Associations of indigenous microorganisms with gastrointestinal mucosal epithelia." Am J Clin Nutr **23**(11): 1495-501.

Sawa, T., T. Akaike, K. Kida, Y. Fukushima, K. Takagi and H. Maeda (1998). "Lipid peroxyl radicals from oxidized oils and heme-iron: implication of a high-fat diet in colon carcinogenesis." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **7**(11): 1007-12.

Scanlan, P. D., F. Shanahan, Y. Clune, J. K. Collins, G. C. O'Sullivan, M. O'Riordan, E. Holmes, Y. Wang and J. R. Marchesi (2008). "Culture-independent analysis of the gut microbiota in colorectal cancer and polyposis." Environ Microbiol **10**(3): 789-98.

Schaeferhenrich, A., G. Beyer-Sehlmeyer, G. Festag, A. Kuechler, N. Haag, A. Weise, T. Liehr, U. Claussen, B. Marian, W. Sendt, J. Scheele and B. L. Pool-Zobel (2003). "Human adenoma cells are highly susceptible to the genotoxic action of 4-hydroxy-2-nonenal." Mutat Res **526**(1-2): 19-32.

Scotland, R. S., M. J. Stables, S. Madalli, P. Watson and D. W. Gilroy (2011). "Sex differences in resident immune cell phenotype underlie more efficient acute inflammatory responses in female mice." Blood **118**(22): 5918-27.

Seeram, N. P., L. S. Adams, S. M. Henning, Y. Niu, Y. Zhang, M. G. Nair and D. Heber (2005). "In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice." J Nutr Biochem **16**(6): 360-7.

Sekirov, I., S. L. Russell, L. C. Antunes and B. B. Finlay (2010). "Gut microbiota in health and disease." Physiol Rev **90**(3): 859-904.

Sesink, A. L., D. S. Termont, J. H. Kleibeuker and R. Van Der Meer (2000). "Red meat and colon cancer: dietary haem, but not fat, has cytotoxic and hyperproliferative effects on rat colonic epithelium." Carcinogenesis **21**(10): 1909-15.

Sesink, A. L., D. S. Termont, J. H. Kleibeuker and R. Van der Meer (2001). "Red meat and colon cancer: dietary haem-induced colonic cytotoxicity and epithelial hyperproliferation are inhibited by calcium." Carcinogenesis **22**(10): 1653-9.

Shacter, E. and S. A. Weitzman (2002). "Chronic inflammation and cancer." Oncology (Williston Park) **16**(2): 217-26, 229; discussion 230-2.

Shanahan, F. and P. W. O'Toole (2014). "Host-microbe interactions and spatial variation of cancer in the gut." Nat Rev Cancer **14**(8): 511-2.

Sharma, S. and S. J. O'Keefe (2007). "Environmental influences on the high mortality from colorectal cancer in African Americans." Postgrad Med J **83**(983): 583-9.

Shen, G., W. S. Jeong, R. Hu and A. N. Kong (2005). "Regulation of Nrf2, NF-kappaB, and AP-1 signaling pathways by chemopreventive agents." Antioxid Redox Signal **7**(11-12): 1648-63.

Silvester, K. R., S. A. Bingham, J. R. Pollock, J. H. Cummings and I. K. O'Neill (1997). "Effect of meat and resistant starch on fecal excretion of apparent N-nitroso compounds and ammonia from the human large bowel." Nutr Cancer **29**(1): 13-23.

Sinha, R., N. Rothman, C. P. Salmon, M. G. Knize, E. D. Brown, C. A. Swanson, D. Rhodes, S. Rossi, J. S. Felton and O. A. Levander (1998). "Heterocyclic amine content in beef cooked by different methods to varying degrees of doneness and gravy made from meat drippings." Food Chem Toxicol **36**(4): 279-87.

Smith, J. S., F. Ameri and P. Gadgil (2008). "Effect of marinades on the formation of heterocyclic amines in grilled beef steaks." J Food Sci **73**(6): T100-5.

Smith, K., K. D. McCoy and A. J. Macpherson (2007). "Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota." Semin Immunol **19**(2): 59-69.

Sobhani, I., J. Tap, F. Roudot-Thoraval, J. P. Roperch, S. Letulle, P. Langella, G. Corthier, J. Tran Van Nhieu and J. P. Furet (2011). "Microbial dysbiosis in colorectal cancer (CRC) patients." PLoS One **6**(1): e16393.

Sommer, F. and F. Backhed (2013). "The gut microbiota--masters of host development and physiology." Nat Rev Microbiol **11**(4): 227-38.

Soucheyre, V. (2008). "Teneur et biodisponibilité du fer héminique et non héminique dans la viande et les abats de boeuf : influence de la conservation et de la cuisson." Cahier de nutrition et de diététique **43**(HS1): 46-51.

Stryker, S. J., B. G. Wolff, C. E. Culp, S. D. Libbe, D. M. Ilstrup and R. L. MacCarty (1987). "Natural history of untreated colonic polyps." Gastroenterology **93**(5): 1009-13.

Su, L. K., K. W. Kinzler, B. Vogelstein, A. C. Preisinger, A. R. Moser, C. Luongo, K. A. Gould and W. F. Dove (1992). "Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the APC gene." Science **256**(5057): 668-70.

Sugimura, T., K. Wakabayashi, H. Nakagama and M. Nagao (2004). "Heterocyclic amines: Mutagens/carcinogens produced during cooking of meat and fish." Cancer Sci **95**(4): 290-9.

Sun, Z., L. Liu, P. P. Wang, B. Roebothan, J. Zhao, E. Dicks, M. Cotterchio, S. Buehler, P. T. Campbell, J. R. McLaughlin and P. S. Parfrey (2012). "Association of total energy intake and macronutrient consumption with colorectal cancer risk: results from a large population-based case-control study in Newfoundland and Labrador and Ontario, Canada." Nutr J **11**: 18.

Sussman, D. A., R. Santaolalla, S. Strobel, R. Dheer and M. T. Abreu (2012). "Cancer in inflammatory bowel disease: lessons from animal models." Curr Opin Gastroenterol **28**(4): 327-33.

Suzui, M., T. Morioka and N. Yoshimi (2013). "Colon preneoplastic lesions in animal models." J Toxicol Pathol **26**(4): 335-41.

Svendsen, C., W. Meinl, H. Glatt, J. Alexander, H. K. Knutsen, H. Hjertholm, T. Rasmussen and T. Husoy (2012). "Intestinal carcinogenesis of two food processing contaminants, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine and 5-hydroxymethylfurfural, in transgenic FVB min mice expressing human sulfotransferases." Mol Carcinog **51**(12): 984-92.

Tabatabaei, S. M., J. S. Heyworth, M. W. Knuiman and L. Fritschi (2010). "Dietary benzo[a]pyrene intake from meat and the risk of colorectal cancer." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **19**(12): 3182-4.

Takahashi, M. and K. Wakabayashi (2004). "Gene mutations and altered gene expression in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rodents." Cancer Sci **95**(6): 475-80.

Tappel, A. (2007). "Heme of consumed red meat can act as a catalyst of oxidative damage and could initiate colon, breast and prostate cancers, heart disease and other diseases." Med Hypotheses **68**(3): 562-4.

Terzic, J., S. Grivennikov, E. Karin and M. Karin (2010). "Inflammation and colon cancer." Gastroenterology **138**(6): 2101-2114 e5.

Tomasetti, C. and B. Vogelstein (2015). "Cancer etiology. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions." Science **347**(6217): 78-81.

Torlakovic, E., E. Skovlund, D. C. Snover, G. Torlakovic and J. M. Nesland (2003). "Morphologic reappraisal of serrated colorectal polyps." Am J Surg Pathol **27**(1): 65-81.

Triantafillidis, J. K., G. Nasioulas and P. A. Kosmidis (2009). "Colorectal cancer and inflammatory bowel disease: epidemiology, risk factors, mechanisms of carcinogenesis and prevention strategies." Anticancer Res **29**(7): 2727-37.

Tsao, R. (2010). "Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols." Nutrients **2**(12): 1231-46.

Turner, J. R. (2009). "Intestinal mucosal barrier function in health and disease." Nat Rev Immunol **9**(11): 799-809.

Ulluwishewa, D., R. C. Anderson, W. C. McNabb, P. J. Moughan, J. M. Wells and N. C. Roy (2011). "Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary components." J Nutr **141**(5): 769-76.

Vaghefi, N., F. Nedjaoum, D. Guillochon, F. Bureau, P. Arhan and D. Bougle (2002). "Influence of the extent of hemoglobin hydrolysis on the digestive absorption of heme iron. An in vitro study." J Agric Food Chem **50**(17): 4969-73.

Van Hecke, T., J. Vanden Bussche, L. Vanhaecke, E. Vossen, J. Van Camp and S. De Smet (2014a). "Nitrite curing of chicken, pork, and beef inhibits oxidation but does not affect N-nitroso compound (NOC)-specific DNA adduct formation during in vitro digestion." J Agric Food Chem **62**(8): 1980-8.

Van Hecke, T., E. Vossen, J. Vanden Bussche, K. Raes, L. Vanhaecke and S. De Smet (2014b). "Fat content and nitrite-curing influence the formation of oxidation products and NOC-specific DNA adducts during in vitro digestion of meat." PLoS One **9**(6): e101122.

Vanden Bussche, J., L. Y. Hemeryck, T. Van Hecke, G. G. Kuhnle, F. Pasmans, S. A. Moore, T. Van de Wiele, S. De Smet and L. Vanhaecke (2014). "O(6)-carboxymethylguanine DNA adduct formation and lipid peroxidation upon in vitro gastrointestinal digestion of haem-rich meat." Mol Nutr Food Res **58**(9): 1883-96.

Visser, J., J. Rozing, A. Sapone, K. Lammers and A. Fasano (2009). "Tight junctions, intestinal permeability, and autoimmunity: celiac disease and type 1 diabetes paradigms." Ann N Y Acad Sci **1165**: 195-205.

Vulcain, E., P. Goupy, C. Caris-Veyrat and O. Dangles (2005). "Inhibition of the metmyoglobin-induced peroxidation of linoleic acid by dietary antioxidants: Action in the aqueous vs. lipid phase." Free Radic Res **39**(5): 547-63.

Wang, H., J. F. Yamamoto, C. Caberto, B. Saltzman, R. Decker, T. M. Vogt, L. Yokochi, S. Chanock, L. R. Wilkens and L. Le Marchand (2011). "Genetic variation in the bioactivation pathway for polycyclic hydrocarbons and heterocyclic amines in relation to risk of colorectal neoplasia." Carcinogenesis **32**(2): 203-9.

Wang, X., Y. Yang, D. R. Moore, S. L. Nimmo, S. A. Lightfoot and M. M. Huycke (2012). "4-hydroxy-2-nonenal mediates genotoxicity and bystander effects caused by Enterococcus faecalis-infected macrophages." Gastroenterology **142**(3): 543-551 e7.

WCRF/AICR (2007). Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. Washington DC: AICR, 2007.

(2010). Continuous Update Project Report. Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Colorectal Cancer.

(2011). Continuous Update Project Report. Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Colorectal Cancer.

Weitz, J. r., M. Koch, J. r. Debus, T. HÃ¶hler, P. R. Galle and M. W. BÃ¼chler (2005). "Colorectal cancer." Lancet **365**(9454): 153-165.

West, A. R. and P. S. Oates (2008). "Mechanisms of heme iron absorption: current questions and controversies." World J Gastroenterol **14**(26): 4101-10.

Westbrook, A. M., B. Wei, J. Braun and R. H. Schiestl (2011). "Intestinal inflammation induces genotoxicity to extraintestinal tissues and cell types in mice." Int J Cancer **129**(8): 1815-25.

Whitman, W. B., D. C. Coleman and W. J. Wiebe (1998). "Prokaryotes: the unseen majority." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(12): 6578-83.

Williams, C. D., J. A. Satia, L. S. Adair, J. Stevens, J. Galanko, T. O. Keku and R. S. Sandler (2010). "Associations of red meat, fat, and protein intake with distal colorectal cancer risk." Nutr Cancer **62**(6): 701-9.

Wood, A. D., A. A. Strachan, F. Thies, L. S. Aucott, D. M. Reid, A. C. Hardcastle, A. Mavroeidi, W. G. Simpson, G. G. Duthie and H. M. Macdonald (2014). "Patterns of dietary intake and serum carotenoid and tocopherol status are associated with biomarkers of chronic low-grade systemic inflammation and cardiovascular risk." Br J Nutr **112**(8): 1341-52.

Wood, J. D. and M. Enser (1997). "Factors influencing fatty acids in meat and the role of antioxidants in improving meat quality." Br J Nutr **78 Suppl 1**: S49-60.

Wrzosek, L., S. Miquel, M. L. Noordine, S. Bouet, M. Joncquel Chevalier-Curt, V. Robert, C. Philippe, C. Bridonneau, C. Cherbuy, C. Robbe-Masselot, P. Langella and M. Thomas (2013). "Bacteroides thetaiotaomicron and Faecalibacterium prausnitzii influence the production of mucus glycans and the development of goblet cells in the colonic epithelium of a gnotobiotic model rodent." BMC Biol **11**: 61.

Wu, G. D., J. Chen, C. Hoffmann, K. Bittinger, Y. Y. Chen, S. A. Keilbaugh, M. Bewtra, D. Knights, W. A. Walters, R. Knight, R. Sinha, E. Gilroy, K. Gupta, R. Baldassano, L. Nessel, H. Li, F. D. Bushman and J. D. Lewis (2011). "Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes." Science **334**(6052): 105-8.

Xu, X., E. Yu, X. Gao, N. Song, L. Liu, X. Wei, W. Zhang and C. Fu (2013). "Red and processed meat intake and risk of colorectal adenomas: a meta-analysis of observational studies." Int J Cancer **132**(2): 437-48.

Yang, K., N. Kurihara, K. Fan, H. Newmark, B. Rigas, L. Bancroft, G. Corner, E. Livote, M. Lesser, W. Edelmann, A. Velcich, M. Lipkin and L. Augenlicht (2008). "Dietary induction of colonic tumors in a mouse model of sporadic colon cancer." Cancer Res **68**(19): 7803-10.

Zarfeshany, A., S. Asgary and S. H. Javanmard (2014). "Potent health effects of pomegranate." Adv Biomed Res **3**: 100.

Zhao, Y., J. Hasjim, L. Li, J. L. Jane, S. Hendrich and D. F. Birt (2011). "Inhibition of azoxymethane-induced preneoplastic lesions in the rat colon by a cooked stearic acid complexed high-amylose cornstarch." J Agric Food Chem **59**(17): 9700-8.

Zheng, W. and S. A. Lee (2009). "Well-done meat intake, heterocyclic amine exposure, and cancer risk." Nutr Cancer **61**(4): 437-46.

Zheng, Y., P. M. Kramer, R. A. Lubet, V. E. Steele, G. J. Kelloff and M. A. Pereira (1999). "Effect of retinoids on AOM-induced colon cancer in rats: modulation of cell proliferation, apoptosis and aberrant crypt foci." Carcinogenesis **20**(2): 255-60.

Zhong, X., Y. J. Fang, Z. Z. Pan, B. Li, L. Wang, M. C. Zheng, Y. M. Chen and C. X. Zhang (2013). "Dietary fat, fatty acid intakes and colorectal cancer risk in Chinese adults: a case-control study." Eur J Cancer Prev **22**(5): 438-47.

Zhu, Q., R. Gao, W. Wu and H. Qin (2013). "The role of gut microbiota in the pathogenesis of colorectal cancer." Tumour Biol **34**(3): 1285-300.

Zhu, Y., P. P. Wang, J. Zhao, R. Green, Z. Sun, B. Roebothan, J. Squires, S. Buehler, E. Dicks, M. Cotterchio, P. T. Campbell, M. Jain, P. S. Parfrey and J. R. McLaughlin (2014). "Dietary N-nitroso compounds and risk of colorectal cancer: a case-control study in Newfoundland and Labrador and Ontario, Canada." Br J Nutr **111**(6): 1109-17.