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, Génétique et Nutrition

Présentée et soutenue par :

Mme JULIA KELLER

le jeudi 8 décembre 2016

Titre :

Le 4-hydroxynonénal, un produit d'oxydation des lipides alimentaires : étude du métabolisme et du rôle dans l'inflammation et la cancérogénèse colorectale

---

Ecole doctorale :

Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :

Toxicologie Alimentaire (ToxAlim)

Directeur(s) de Thèse :

MME FRANCOISE GUERAUD

MME VASSILIA THEODOROU

Rapporteurs :

Mme BLANDINE COMTE, INRA CLERMONT FERRAND

Mme SYLVIA PIETRI, INRA PACA

Membre(s) du jury :

M. JEAN DAYDE, EI PURPAN, Président

Mme ANNE MEYNIER, INRA NANTES, Membre

Mme FRANCOISE GUERAUD, INRA TOULOUSE, Membre

Mme VASSILIA THEODOROU, EI PURPAN, Membre

On ne fait jamais attention à ce qui a été fait ;

on ne voit que ce qui reste à faire.

Dans la vie, rien n'est à craindre,

tout est à comprendre.

Marie Curie

Remerciements

Merci

Aux membres du jury de me faire l'honneur de juger ce travail : le Dr **Blandine Comte**, le Dr **Sylvia Pietri**, le Dr **Anne Meynier** et le Pr **Jean Daydé**.

A mes directrices de thèse : le Dr **Françoise** Guéraud pour son encadrement patient, plein de compréhension et d'humanité mais aussi pour la recherche de financement qui m'a permis de démarrer cette thèse. C'est assurément grâce à toi que mon jeune parcours scientifique se réalise avec un vrai plaisir dans le travail, dans un monde scientifique pourtant souvent rude. Le Pr **Vassilia** Theodorou, pour avoir accepté de co-diriger mon travail.

À **l'Ecole d'Ingénieurs de Purpan** et à l'**INRA** pour le financement de ce travail.

Au Dr **Laurence** Huc : tout a commencé avec toi quand tu as accepté, à l'été 2010 de me prendre pour un stage volontaire, moi qui voulais approcher la thématique de la cancéro avant de faire un choix d'orientation pour le M2. Puis, après une année de M2 difficile, j'ai repris contact avec toi à la recherche d'un financement de thèse. C'est finalement comme ça que j'ai commencé à travailler dans l'équipe en CDD. Merci aussi pour les stages de Body Karaté et de Bokwa (je m'en souviendrai !).

À **Maryse** Baradat pour ton accompagnement bienveillant dans le monde étrange du métabolisme. J'ai beaucoup aimé travailler en binôme avec toi et j'ai énormément appris en ta compagnie (l'HPLC et la spectro de masse me paraissent moins obscures grâce à toi !).

Aux autres membres de **l'équipe PPCA** : le Dr **Cécile** Héliès, le Dr **Fabrice** Pierre, le Dr **Sylviane** Taché, le Dr **Jacques** Dupuy, Mme **Nathalie** Naud, le (nouveau !) Dr **Reggie** Surya, le Pr **Denis** Corpet, merci pour votre aide, votre soutien et votre bonne humeur. Cette thèse est un vrai travail d'équipe et je vous quitte aujourd'hui avec de réels regrets.

Aux autres membres de **l'équipe NGN/DIXIT** : le Dr **Laurent** Ferrier (pour les manips en chambre de Ussing et la perméabilité au chrome), **Christel** et **Valérie Ba** (pour le dénombrement des scores microscopiques et pour leur gentillesse et leur disponibilité dans leur accompagnement pour les manips lancées la semaine du 14 juillet !), **Mathilde** (pour les dosages en Elisa), **Sandrine** (pour les discussions sur les cytokines), **Valérie Bé** (pour la MPO).

Au Dr **Elisa** Boutet et à **Marianne** de l'équipe GS, pour les manips de comètes. Au Dr **Marc** Audebert et à **Laure** de l'équipe MeX pour les dosages de γH2AX. À **Florence** et **Perrine** de la plateforme EZOP pour le soin qu'elles ont porté aux animaux et pour leur gentillesse et leur adaptabilité face à mes changements d'avis intempestifs !

À la **plateforme AXIOM** : le Dr **Isabelle** Jouanin, le Dr **Sylvie** Chevolleau et **Maria-Hélèna**, pour la production et le dosage du HNE qui ont été si fondamentaux dans le déroulement de mes travaux et le Dr **Laurent** Debrauwer pour la spectrométrie de masse.

Au Pr **Denis Poncelet**, **Nina**, **Francesca** pour le développement des capsules et des billes et tout particulièrement à **Marine** avec qui j'ai pris beaucoup de plaisir à échanger.

À mon comité de thèse pour les discussions qui ont rythmé mes avancées (le Dr **Pauline Anton**, le Pr **Hélène Eutamène** avec qui j'ai fait des essais de gavage avec les capsules ! Et le Dr **Anne Salvayre** qui a fait des essais de marquage en histologie)

À tous ceux qui sont passés dans l'équipe, en thèse, en stage ou en CDD et qui ont participé tous à leur manière à mes travaux de thèse :

À **Thibault**, pour ma première expérience d'encadrement. Tu as su faire preuve d'une prise d'autonomie rapide, ce qui m'a laissé la possibilité de me concentrer sur d'autres choses.

À **Vanessa** pour son expertise sur γH2AX et pour les longues discussions sur tout et rien, au bureau ou dans les couloirs !

À **Laura** pour son aide précieuse sur les manips avec les billes (les récoltes d'urine et de fèces !), les préparations d'EF (« le caca c'est merveilleux ! ») et pour m'avoir permis de décompresser à la salle (en souvenir de toute cette sueur évacuée, de nos fous rires et de la choré du Jam sur « Proud Mary »!).

Aux filles de PPCA : **Nadia**, **Sabine**, **Océane**, thésardes passées dans l'équipe avant moi. Nadia pour tes conseils avisés et plein de recul ; Sabine pour le partage de bureau pendant quelques années et pour les longs échanges de sms et de mails qui remontent le moral ; Océane pour le partage de bureau pendant quelques mois et pour nos longues discussions sur la faisabilité des manips animales et l'organisation de cette dernière année de thèse bien remplie (à l'aide d'une modélisation à base de bonbons !).

Enfin, un grand merci à ceux qui m'ont accompagnée au cours de mes derniers mois de manips, si chargés : **Edwige** qui m'a supportée dans la réalisation des manips de 2015/2016 et qui m'a empêchée de me noyer grâce à son organisation hors norme ! Les stagiaires de l'année 2016 qui ont fait du gros boulot : **Manon** pour la prise en charge de la manip de promotion, **Camille** pour le dénombrement des ACF, **Marina** pour la re-mise au point de la coloration des MDF ! Merci à toutes les quatre pour votre intérêt, votre implication et votre gentillesse.

J'ai également une pensée toute particulière pour mes **professeures de SVT** au collège et au lycée qui m'ont sans aucun doute donné le goût de la biologie.

À ma famille et plus particulièrement à **mes parents**, **mes grands-parents** (« Alors, ça avance ton doctorat ? Et qu'est-ce que tu vas faire après ? »).

Enfin, **Choupi**, merci pour le soutien au quotidien, sans faille, aussi bien dans les phases d'euphories que dans les quelques phases de détresse. Merci pour l'intérêt que tu as toujours porté à mon travail, merci pour ton esprit scientifique et de synthèse, merci de m'avoir aidée sortir de quelques impasses, merci pour ton soutien au cours de la rédaction de ce manuscrit, merci d'avoir relu mes mails, mes rapports, mes power-points, de m'avoir fait répéter, sans fin, avant mes présentations, jusqu'à ce que je sois satisfaite de mon travail. Je ne suis pas sûre que j'aurais pu accomplir ce travail sans toi. Cette thèse m'a fait beaucoup murir, mais ton accompagnement tout au long de ce parcours m'a été indispensable.

Résumé

Le 4-hydroxy-2-nonénal (HNE), un aldéhyde α-β-insaturé, produit secondaire de la peroxydation des acides gras polyinsaturés en n-6 qui est cytotoxique et génotoxique *in vitro*. Cet aldéhyde a été largement étudié dans divers états pathologiques dans lesquels sa formation est la conséquence d'un stress oxydant associé à un état inflammatoire. Cependant, outre sa formation endogène, le HNE peut également être formé à partir des lipides alimentaires, entraînant sa présence dans les aliments mais également sa néoformation dans le tractus digestif. Ainsi, le rôle du HNE est suspecté dans la cancérogénèse colorectale induite par le fer héminique. L'effet promoteur du fer héminique, présent en grande quantité dans la viande rouge, a été démontré dans des modèles animaux, aux stades prénéoplasique et tumoral et a également été associé à la lipoperoxydation luminale.

Ce travail a eu pour vocation la caractérisation du métabolisme du HNE alimentaire et l'étude de son rôle dans la cancérogénèse colorectale associée à la consommation de viande rouge, en explorant un possible effet pro-inflammatoire. Au préalable, nous avons démontré expérimentalement l'effet initiateur du fer héminique dans la cancérogénèse colorectale en plus de l'effet promoteur déjà validé.

Concernant l'étude de métabolisme, nous avons identifié et caractérisé les métabolites du HNE présents dans l'urine suite à une exposition par voie orale chez le rat grâce à une méthode de suivi isotopique. Les voies majeures de métabolisation du HNE ont été identifiées et quantifiées. De plus, de nouveaux métabolites urinaires tel que des conjugués thiométhyles et glucuronides ont été mis en évidence pour la première fois.

Les études de cancérogénèse ont porté sur les effets co-initiateurs ou promoteurs des régimes. De plus, les liens entre l'inflammation et le cancer du côlon étant souvent évoqués dans la littérature, nous avons également testé les effets du HNE sur l'inflammation colique.

Au cours d'études court terme chez le rat F344, nous avons démontré l'absence d'effet du HNE sur l'inflammation et la perméabilité colique. Dans l'étude de co-initiation testant l'effet d'un régime alimentaire contenant du fer héminique ou du HNE pendant 15 jours suivi d'une initiation chimique par l'azoxyméthane, nous avons démontré pour la première fois un effet co-initiateur du fer héminique mais pas du HNE sur la cancérogénèse colorectale, au stade prénéoplasique. Dans l'étude de promotion de la cancérogénèse colorectale sur rats chimio-induits, nous avons également démontré une absence d'effet au stade prénéoplasique d'un régime riche en HNE donné pendant 100 jours après la chimio-induction.

En conclusion, cette thèse apporte : (i) une description précise des métabolites urinaires du HNE absorbé par voie orale, (ii) une première démonstration expérimentale de l'effet co-initiateur du fer héminique sous forme hémine, (iii) une démonstration de l'absence d'effet du HNE seul et aux doses testées sur la cancérogénèse colorectale et l'inflammation colique.

Abstract

This thesis focuses on 4-hydroxynonenal (HNE), an α-β-unsaturated aldehyde by-product of polyunsaturated fatty acids n-6 peroxidation, which is demonstrated to be cytotoxic and genotoxic *in vitro*. This aldehyde has been extensively studied in various pathological conditions in which its formation is the result of oxidative stress associated to inflammation. However, in addition to its endogenous formation, the HNE can also be formed from dietary fats, leading to its presence in food but also to its new formation in the digestive tract.

The role of HNE is suspected in heme iron induced colorectal carcinogenesis. Indeed, it has been experimentally shown that heme iron, found in large amounts in red meat, increases the incidence of pre-neoplastic lesions in animal models concomitantly with luminal lipoperoxidation.

This work aims at characterizing the metabolism of dietary HNE and at studying its role in colorectal carcinogenesis associated with red meat consumption, because HNE is suspected to be one of reactive intermediates between heme iron and the development of this cancer. Suspected pro-inflammatory effects have also been tested. Beforehand, we have experimentally validated the initiating effect of heme iron in colorectal carcinogenesis in addition to its promoting effect already demonstrated.
Regarding the metabolism study, we identified and characterized HNE metabolites in urine following oral exposure in rats using a stable isotope tracking method. The major routes of metabolism of HNE were identified as oxidation of carbons 1 and 9 (ALDH and P450 CYP 4A), β-oxidation and mercapturic acids derivatives. In addition, new urinary metabolites such as glucuronide conjugates and thiomethyl were highlighted for the first time.

Regarding carcinogenicity studies on the co-initiating or promoting effect of diet, we used doses of heme iron or HNE that are representative of a diet rich in meat or of a highly peroxidized diet. Furthermore, as the links between inflammation and colon cancer are often mentioned in the literature, we also tested the effects of HNE on colonic inflammation.

First of all, during 2 short term studies of 2 and 3 weeks in F344 rats, we demonstrated the lack of effect of HNE on colonic inflammation and permeability.
In the co-initiation study in which rats where fed for 15 days with a diet rich in heme iron or HNE, followed by chemical initiation azoxymethane, we demonstrated a co-initiating effect of heme iron but not of HNE on colorectal carcinogenesis.

In the promotion study, we also have shown the lack of effect of a diet rich in HNE given for 100 days using a chemically-induced carcinogenesis model in rats.

In conclusion, this thesis provides: (i) a precise description of urinary metabolites of HNE absorbed orally, (ii) a first experimental demonstration of the co-initating effect of heme iron in hemin form, (iii) a demonstration of the lack of effect of HNE on colorectal carcinogenesis and inflammation.

Sommaire

INTRODUCTION 17

I. Le 4-hydroxy-2-nonénal 18
1. 4-hydoxy-2-nonénal et lipoperoxydation 18
   a. La lipoperoxydation spontanée initiée par les radicaux libres 18
      i. Phase d'initiation 18
      ii. Phase de propagation 19
      iii. Phase de terminaison 19
      iv. Les alcénals, produits secondaires de lipoperoxydation 20
   b. Sites et mécanisme de formation du HNE 20
      i. Sites de formation du HNE 20
      ii. Mécanisme de formation du HNE 21
2. Structure et réactivité du HNE 22
3. HNE, physiologie et pathologie 23
   a. Taux physiologiques de HNE 24
   b. Toxicité du HNE in vivo 24
   c. HNE et pathologies 24
      i. HNE et cancer 24
      ii. HNE et autres pathologies 30
4. HNE et nutrition 30
5. Le métabolisme du HNE 31
   a. Métabolisme in vitro 32
   b. Métabolisme in vivo 33

II. Le cancer colorectal 36
1. Anatomie, histologie et fonction du côlon 36
   a. Anatomie 36
   b. Histologie 36
   c. Fonction 37
2. Epidémiologie du cancer colorectal 37
3. Symptômes, dépistage et traitement 38
4. Histopathologie du cancer colorectal et séquence de cancérogénèse 38
5. Les altérations génétiques majeures du cancer colorectal et les modèles génétiques 40
   a. Les évènements génétiques initiateurs 40
      i. Inactivation d'APC – voie de l'instabilité chromosomique 40
      ii. Inactivation des gènes MMR – voie de l'instabilité microsatellitaire 40
      iii. Autres voies initiatrices 41
   b. Évènements génétiques impliqués dans la promotion et la progression 42
      i. Rôle de l'instabilité génomique 42
      ii. Mutations dans la voie de l'instabilité chromosomique 42
      iii. Mutations dans la voie de l'instabilité microsatellitaire 42
   c. La mutation d'APC, un évènement génétique majeur dans la cancérogénèse colorectale 43
      i. APC et régulation des niveaux de β-caténine dans la voie Wnt 44
      ii. APC et cytosquelette 46
      iii. APC et ségrégation normale des chromosomes 46
6. Les facteurs de risque du cancer colorectal 46
   a. Cancer colorectal et viande rouge 48
      i. Augmentation du risque et recommandations nutritionnelles 48
      ii. Habitudes de consommation et intérêt nutritionnel 49

iii. Les hypothèses mécanistiques 50
b. Cancer colorectal et inflammation 56
i. Liens mécanistiques entre cancer colorectal et inflammation 56
ii. Viande, fer héminique et inflammation 57
c. Cancer colorectal et microbiote 57
7. Les méthodes et modèles utilisés pour les études de cancérogénèse 57
a. Modèle animal utilisé pendant la thèse : rat initié à l'azoxyméthane (AOM) 58
i. Le rat initié à AOM 58
ii. Pertinence et critique du modèle 59
iii. Méthodes d'étude des différents stades de la cancérogénèse chez le rat AOM 60
b. Modèle cellulaire utilisé pendant la thèse : les lignées $Apc^{+/+}$ et $Apc^{Min/+}$ 61
8. Intégration de mes travaux de thèse dans la stratégie de l'équipe de recherche 61

III. Objectifs de la thèse 63

ETUDES ET RESULTATS 64

I. Métabolisme du HNE alimentaire 65
1. Introduction 65
2. Article 66
3. Conclusion 79

II. Effet du fer héminique et du HNE sur la cancérogénèse colorectale et l'inflammation 80
1. Faire parvenir une dose cible de HNE dans le côlon 80
a. Les capsules et billes à libération colique 81
i. Capsules 81
ii. Billes 84
iii. Conclusion 87
b. Le HNE par voie orale 87
c. La stabilité du HNE 89
i. Stabilité du HNE dans l'huile de maïs 89
ii. Stabilité du HNE dans l'aliment 90
2. Effet du HNE sur l'inflammation 92
a. Protocole 92
i. Choix des doses de HNE 92
ii. Expérimentation animale 93
iii. Paramètres suivis 94
iv. Statistiques 95
b. Résultats 96
c. Conclusion et discussion 101
i. Conclusions 101
ii. Discussion 101
3. Effet du fer héminique et du HNE sur l'initiation de la cancérogénèse colorectale 102
a. Protocole 102
i. Expérimentation animale 103
ii. Paramètres suivis 105
iii. Statistiques 106
b. Résultats : effet du fer héminique sur la génotoxicité et l'initiation 106
c. Résultats : effet du HNE sur la génotoxicité et l'initiation 113
d. Conclusion et discussion sur les effets du fer héminique sur la génotoxicité et l'initiation 118
i. Conclusion 118
ii. Discussion 118

e. Conclusion et discussion sur les effets du HNE sur la génotoxicité et l'initiation 120
i. Conclusion 120
ii. Discussion 121
4. Effet du HNE sur la promotion de la cancérogénèse colorectale 122
a. Protocole 122
i. Expérimentation animale 122
ii. Paramètres suivis 122
iii. Statistiques 123
b. Résultats 123
c. Conclusion et discussion 126
i. Conclusion 126
ii. Discussion 126

DISCUSSION ET PERSPECTIVES 127

I. Principaux résultats 128

II. Discussion et perspectives 129

ANNEXES 133

I. Annexe 1 : Détails des techniques et des méthodes utilisées pendant la thèse 134

II. Annexe 2 : Communication, formation et encadrement 140
1. Communications 140
a. Publications dans revues à comité de lecture 140
b. Communications par poster 140
2. Formations 140
3. Encadrement 141

REFERENCES 142

Liste des abréviations

ACF : Aberrant Crypt Foci (foyers de cryptes aberrantes)

AGPI : Acide Gras Polyinsaturé

AHC : Amines Hétérocycliques

AICR : American Institute for Cancer Research

ANOVA : Analyse de Variance

AKR : Aldo/Keto Reductase

ALDH : Aldéhyde Déshydrogénase

AOM : Azoxyméthane

AOR : Alkenal-one oxydoreductase

APC : Adenomatous Polyposis Coli

CCR : Cancer Colorectal

CIN : Chromosome Instability

CIMP : CpG island methylator phenotype

COX-2 : Cyclo-oxygénase-2

DCC **:** Deleted in Colorectal Carcinogenesis

DHN : 1,4-dihydroxy-2-nonene

DHN-MA : 1,4-dihydroxynonane-mercapturic acid

DL_{50} : Dose Létale 50

GSH : Glutathion

GSH/GSSG : Ratio glutathion réduit/oxydé

GST : Glutathion-*S*-transferase

H_2O_2 : Peroxyde d'hydrogène

HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

HHE : 4-hydroxy-2-hexenal

HNA : 4-hydroxy-2-nonenoic acid

HNE : 4-hydroxy-2-nonenal

HNPCC : Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer (syndrome de Lynch)

HO-1 : Heme oxygenase-1

HPLC : High Pressure Liquid Chromatography

LOD / LOQ : Limit Of Detection / Limit Of Quantification

MDA : Malondialdehyde

MDF : Mucin Depleted Foci (foyers déplétés en mucine)

Min : Multiple intestinal neoplasia

MMR : Mismatch Repair system

MSI : Microsatellite Instability

NF-κB : Nuclear Factor-kappa B

NGN : Neuro-Gastroenterologie Nutrition

NOAEL : No-Observed-Adverse-Effect Level

Nrf2/ARE : Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 / Antioxidant Responsive Element

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PAF : Polypose Adenomateuse Familiale

Pirc : Polypose in the rat colon

PPCA : Prévention et Promotion de la Cancérogénèse par les Aliments

ROS : Reactive Oxygen Species

TBARS : Thiobarbituric Reactive Substances

WCRF : World Cancer Research Fund

Liste des figures et des tableaux

Figure 1 : Représentation schématique de la phase de propagation de la peroxydation lipidique non enzymatique initiée par les ROS 19
Figure 2 : Produits d'oxydation des lipides 20
Figure 3 : Structure chimique du 4-hydroxy-2-nonénal 20
Figure 4 : Mécanismes chimiques proposés pour la formation du HNE (Yin et al., 2011) 21
Figure 5 : Fonctions réactives du HNE et mécanismes d'adduction aux protéines (adapté de (Dalleau et al., 2013)) 23
Figure 6 : Exemples de propano-adduits et d'éthéno-adduits substitués ou non 26
Figure 7 : Voies de détoxication du HNE. GST : glutathion-S-transférase ; ALDH : aldéhyde déshydrogénase ; AKR : aldo/kéto réductase ; AOR : alkenal-one oxydoréductase ; HNA : acide 4-hydroxynonenoic ; Nrf2 : nuclear factor (erythroid 2)-related factor ; TRX1 : thioredoxine réductase 1 ; xCT : cystein/glutamate exchange transporter, d'après (Dalleau et al., 2013) 32
Figure 8 : Voies métaboliques du HNE chez le rat (Alary et al., 2003a) 33
Figure 9 : Formation de l'acide mercapturique à partir d'un conjugué glutathion (Bounias, 1999) ... 34
Figure 10 : Les quatre tuniques de la paroi du côlon (muqueuse, sous-muqueuse, musculeuse et séreuse) (INCa) 37
Figure 11 : Incidence du cancer colorectal dans le monde. Taux estimé standardisé sur l'âge pour 100 000 habitants (IARC, 2012b) 38
Figure 12 : Séquence de la cancérogénèse colorectale – épithélium normal, initiation, promotion, progression, invasion (adapté de (Zarate et al., 2012)) 39
Figure 13 : Voie de l'instabilité chromosomique (d'après (Fearon, 2011)) 42
Figure 14 : Voies de l'instabilité microsatellitaire (d'après (Fearon, 2011) 43
Figure 15 : Structure de la protéine APC (d'après (Fearon, 2011)) 44
Figure 16 : Implication de la protéine APC dans la régulation du pool de β-caténine lorsque la voie Wnt est inactive (A) ou active (B) d'après (Fearon, 2011) 45
Figure 17 : Signal Wnt le long de la crypte colique (d'après (Sadanandam et al., 2013) 45
Figure 18 : Structure du résidu hème de la myoglobine (A) et structure de la myoglobine (B : en rouge l'hème, en bleu la myoglobine) (adapté de (Ordway and Garry, 2004)) 50
Figure 19 : Mécanismes d'action pouvant expliquer l'effet promoteur du fer héminique (adapté de (Bastide et al., 2011)) 53
Figure 20 : Mécanisme proposé de cancérogénèse induite par l'hème : effet sur l'initiation et la promotion (d'après (Ishikawa et al., 2010)) 54
Figure 21 : Foyer de cryptes aberrantes (ACF) formé de 25 cryptes (d'après (Corpet, 2011)) 58
Figure 22 : Foyer déplété en mucine (MDF) formé de 5 (A) et 11 (B) cryptes (grossissement x32 au microscope) (Pierre et al., 2004) 59
Figure 23 : Déroulement du protocole expérimental de co-initiation de la cancérogénèse colorectale 60
Figure 24 : Déroulement du protocole expérimental de promotion de la cancérogénèse colorectale 61
Figure 25 : Schéma du dispositif d'encapsulation du HNE 81
Figure 26 : Déroulement du protocole expérimental d'acceptabilité des capsules 82
Figure 27 : Déroulement du protocole expérimental d'estimation de la perte de capsules avant le côlon 83
Figure 28 : Structure des billes de silice poreuses 84
Figure 29 : Concentration en HNE dans les eaux fécales des animaux ayant reçu pendant 1 semaine des régimes contenant ou non des billes de HNE. 86

Figure 30 : Concentration en HNE dans l'extrait colique et les eaux fécales de 24h (A), quantité de HNE dans les extraits de contenus digestifs et les eaux fécales de 24h des rats du groupe HNE (B) et DHN-MA urinaire (C) après 7 jours de régimes expérimentaux. 88
Figure 31 : Pourcentage de recouvrement du HNE après différentes durées et températures de stockage (n=1) 90
Figure 32 : Stabilité du HNE : Suivi de la stabilité du HNE dans l'aliment par radioactivité. Radio-chromatogramme de l'extrait d'aliment à la préparation (A) et après 12h à température ambiante (B). Tableau résumant le pourcentage de radioactivité représenté par le HNE et par ses produits de dégradation aux 2 temps (C). 91
Figure 33 : Stabilité du HNE : concentration du HNE dans l'extrait d'aliment à la préparation (t0) et après 1 semaine à -20°C sous vide puis 15h à température ambiante (t gamelle)..... 92
Figure 34 : Déroulement du protocole expérimental de l'étude de 3 semaines sur les effets inflammatoires du HNE. 94
Figure 35 : Représentation schématique d'une chambre de Ussing 95
Figure 36 : Concentration du HNE dans les eaux fécales (A) et du DHN-MA urinaire (B) des rats ayant été nourris pendant 2 semaines avec les régimes expérimentaux. 96
Figure 37 : Ratio GSH/GSSG dans le sang après 2 semaines de régimes expérimentaux 97
Figure 38 : Concentration en cytokines sur des extraits de muqueuse colique après 2 semaines de régimes expérimentaux : IL10 (A), IL1β (B), IL6 (C) et IL8 (D). 97
Figure 39 : Score microscopique sur le côlon après 2 semaines de régimes expérimentaux 98
Figure 40 : Concentration de la CRP sérique après 2 semaines de régimes expérimentaux. 98
Figure 41 : Flux de FITC (A) et résistance trans-épithéliale (B) sur des explants de côlon après 2 semaines de régimes expérimentaux. 99
Figure 42 : Concentrations sanguine d'ALT (A), d'AST (B), d'ALT (C), d'urée (D), de Créatinine (E) après 2 semaines de régimes expérimentaux. 99
Figure 43 : Activité MPO (A) et perméabilité au ^{51}CR-EDTA (B) après respectivement 3 et 2 semaines de régimes expérimentaux. 100
Figure 44 : Flux de FITC (A) et résistance trans-épithéliale (B) sur des explants de côlon et de jéjunum après 3 semaines de régimes expérimentaux. 100
Figure 45 : Déroulement du protocole de l'expérimentation de co-initiation chez le rat 105
Figure 46 : Teneur en HNE dans les eaux fécales (A), DHN-MA urinaire (B) et TBARS dans les eaux fécales (C) après 2 semaines de régimes expérimentaux. 107
Figure 47 : Induction de γH2AX (A et C) et de p-H_3 (B et D) sur la muqueuse colique après 2 semaines de régimes expérimentaux 108
Figure 48 : Induction de γH2AX in vitro sur des cellules épithéliales coliques normales, après exposition pendant 24h à des eaux fécales de J11 à J13 109
Figure 49 : Nombre d'ACF par côlon (A), taille des ACF (B) et nombre d'ACF de plus que 3, 5 et 7 cryptes/ACF (respectivement C, D et E) après 2 semaines de régimes expérimentaux suivi d'une chimio-induction et de 60 jours de régime témoin chez le rat. 110
Figure 50 : Teneur en HNE dans les eaux fécales (A), en DHN-MA urinaire (B), en TBARS dans les eaux fécales (C) après 2 semaines de régimes expérimentaux, et teneur en TBARS dans les eaux fécales à J72 (D) 111
Figure 51 : Induction de γH2AX (A et B) et de p-H_3 (C et D) sur la muqueuse colique après 14 jours de régimes expérimentaux suivis d'une chimio-induction et de 60 jours de régime témoin chez le rat 112
Figure 52 : Induction de γH2AX in vitro sur des cellules épithéliales coliques normales, après exposition pendant 24h à des eaux fécales de J12 à J14 113

Figure 53 : Induction de γH2AX (A) et de p-H_3 (B) sur la muqueuse colique après 2 semaines de régimes expérimentaux. 114
Figure 54 : Test des comètes sans FPG (A) et avec FPG (B) sur muqueuse colique après 3 semaines de régimes expérimentaux. 114
Figure 55 : Fold induction de γH2AX in vitro sur des cellules coliques épithéliales normales après exposition pendant 24h à des eaux fécales en pool par groupe de régime provenant de J11 à J13 . 115
Figure 56 : Nombre d'ACF totaux (A) et nombre ACF de plus que 3, 5 et 7 cryptes/ACF (respectivement B, C et D) après 2 semaines de régimes expérimentaux suivi d'une chimio-induction et de 60 jours de régime témoin chez le rat 116
Figure 57 : Teneur en HNE dans les eaux fécales (A), en DHN-MA urinaire (B), en TBARS dans les eaux fécales (C) après 2 semaines de régimes expérimentaux, et teneur en TBARS dans les eaux fécales à J72 (D) 116
Figure 58 : Induction de γH2AX (A) et p-H_3 (B) sur la muqueuse colique après 14 jours de régimes expérimentaux suivis d'une chimio-induction et de 60 jours de régime témoin chez le rat 117
Figure 59 : Fold induction de γH2AX in vitro sur des cellules coliques épithéliales normales après exposition pendant 24h à des eaux fécales en pool par groupe de régime provenant de J12 à J14 . 117
Figure 60 : Déroulement du protocole de l'expérimentation sur la promotion de la cancérogénèse par le HNE. 122
Figure 61 : Nombre (A) et taille (B) des ACF dénombrés chez des rats chimio-induits après 100 jours de régimes expérimentaux. 123
Figure 62 : Teneur en HNE fécal (A), TBARS fécaux (B) et en DHN-MA urinaire (C) chez des rats chimio-induits après 100 jours de régimes expérimentaux. 124
Figure 63 : Viabilité de la lignée normale $Apc^{+/+}$ et de la lignée précancéreuse $Apc^{Min/+}$ (barres hachurées) après exposition pendant 24h à des eaux fécales issues de rats chimio-induits après 55 jours de régimes expérimentaux. 125
Figure 64 : Induction de γH2AX sur la muqueuse colique de rats chimio-induits après 100 jours de régimes expérimentaux (A) et in vitro sur des cellules normales après exposition à des eaux fécales de J55 à 57 pendant 24h (B). 125

Tableau 1 : Concentration en HNE dans des tissus ou des organes humains ou animaux 24
Tableau 2 : Dosages du HNE dans différents aliments 30
Tableau 3 : Facteurs augmentant ou diminuant le risque de cancer colorectal (d'après (AICR/WCRF, 2011)) 48
Tableau 4 : Méta-analyse de la dose-réponse de la consommation de viande rouge et du risque de cancer colorectal (d'après (Chan et al., 2011) 49
Tableau 5 : Composition des régimes expérimentaux contenant ou non les billes de HNE (expérimentation d'une semaine) 85
Tableau 6 : Composition des régimes expérimentaux contenant ou non du HNE (expérimentation d'une semaine) 87
Tableau 7 : Composition des régimes expérimentaux pour l'expérimentation de 2 semaines sur les effets du HNE sur l'inflammation. 93
Tableau 8 : Composition des régimes expérimentaux pour l'expérimentation de 3 semaines sur les effets du HNE sur l'inflammation. 94
Tableau 9 : Composition des régimes expérimentaux pour les expérimentations sur l'initiation de la cancérogénèse colorectale. 103

Tableau 10 : Composition des régimes expérimentaux l'expérimentation sur la promotion de la cancérogénèse par le HNE..... 122

Préambule

Cette thèse a été financée par le département Alimentation Humaine de l'INRA et par l'Ecole d'Ingénieurs de Purpan. Ce financement m'a permis d'établir une interaction avec mes deux équipes d'accueil : l'équipe Prévention et Promotion de la Cancérogénèse par les Aliments (PPCA) et l'équipe Neuro-Gastroentérologie et Nutrition (NGN) de l'INRA ToxAlim.

Mes travaux ont été dirigés par le Dr Françoise Guéraud et le Pr Vassilia Theodorou.

Ce manuscrit est construit autour de deux chapitres dans la partie « *Etudes et Résultats* » :

- Le premier chapitre présente les résultats d'un article expérimental intitulé *"Twin peaks": searching for 4-hydroxynonenal urinary metabolites after oral administration in rats* et publié dans Redox Biology en 2015. Cet article porte sur le métabolisme urinaire du HNE alimentaire chez le rat.
- Le deuxième chapitre présente les résultats de plusieurs études expérimentales portant sur les effets du 4-hydroxynonénal sur l'inflammation et la cancérogénèse colique. Une partie de ces études est inclus dans le projet ITMO Cancer et Environnement NeoMeaTox, qui s'intéresse aux effets des composés néoformés de la viande rouge sur la cancérogénèse colorectale. Ce projet, qui regroupe trois équipes partenaires, est toujours en cours en cette année 2016. La valorisation de ces travaux sera effectuée à la fin du projet, par des articles regroupant l'ensemble des résultats obtenus par les différents partenaires, c'est pourquoi ce chapitre n'est pas présenté sous forme d'article dans ce manuscrit.

INTRODUCTION

I. Le 4-hydroxy-2-nonénal

1. 4-hydoxy-2-nonénal et lipoperoxydation

Dans le domaine des radicaux libres et du stress oxydant, la lipoperoxydation (définie comme l'oxydation des lipides insaturés, et particulièrement des lipides polyinsaturés) a été largement étudiée tout d'abord dans le champ de la chimie et de la chimie alimentaire. Ensuite, la recherche sur la lipoperoxydation est devenue un thème très attractif en biologie. En effet, il est aujourd'hui largement reconnu que les processus de lipoperoxydation jouent un rôle dans différentes maladies et processus de vieillissement, notamment *via* la formation de nombreux produits d'oxydation de lipides (Grune et al., 2010).

a. La lipoperoxydation spontanée initiée par les radicaux libres

De manière générale, l'oxydation non enzymatique des acides gras polyinsaturés (AGPI) est la principale responsable des phénomènes de rancissement, de perte de vitamines (E et C notamment) et de formation de composés toxiques, dont certains aldéhydes, dans les aliments. Cette lipoperoxydation peut avoir lieu à tout stade de préparation, stockage, utilisation ou consommation des aliments. Ce phénomène est très dépendant de la nature du précurseur lipidique : la peroxydation des lipides est d'autant plus favorisée que le nombre de doubles liaisons est élevé.

La lipoperoxydation peut avoir 3 origines en fonction de son évènement initiateur : l'auto-oxydation initiée par des radicaux libres ; l'auto-oxydation non-initiée par des radicaux libres ; l'oxydation enzymatique, initiée par des enzymes d'oxydation (Niki et al., 2005). Notre travail portant sur le 4-hydroxy-2-nonénal (HNE) exogène (alimentaire et néoformé dans le tractus digestif, voir définition en p20), nous détaillerons ici la lipoperoxydation par auto-oxydation initiée par les radicaux libres.

Acteurs clés de ce type de lipoperoxydation, les espèces réactives dérivées de l'oxygène (ROS, « Reactive Oxygen Species ») incluent différents composés dérivés de l'oxygène et possédant une grande réactivité. On compte notamment parmi les ROS :

- Les radicaux libres (c'est-à-dire possédant un ou plusieurs électrons non appariés), comme les radicaux hydroxyles (°OH, le plus réactif), alkoxyle (RO°), peroxyle (ROO°), monoxyde d'azote (NO°) ou encore l'anion superoxyde ($O_2^{\circ -}$)
- Les dérivés de l'oxygène non radicalaires, comme le peroxyde d'oxygène (H_2O_2) ou l'oxygène singulet ($^1O_2$)

La formation des ROS, et en particulier des radicaux libres, est notamment facilitée par la présence d'ions métalliques. Fe^{2+} intervient par exemple dans le cadre de la réaction de Fenton, entraînant la formation du radical hydroxyle °OH.

On peut noter que lors de la l'oxydation des AGPI initiée par les radicaux libres, ces derniers interviennent au cours des 3 phases de la réaction : initiation, propagation et terminaison.

i. Phase d'initiation

L'initiation a lieu lorsqu'un radical libre (le plus efficace étant °OH, (Halliwell and Gutteridge, 1990)) arrache un atome d'hydrogène d'un groupement méthylène, situé en deux double liaisons, sur un AGPI (RH). Cette réaction entraîne la formation d'un radical d'acide gras libre (radical alkyle, R°) (Bielski et al., 1983).

RH + Radical libre ROS (initiateur) => R° + H_2O

ii. Phase de propagation

Le radical alkyle R° formé après l'initiation entre rapidement en réaction avec du dioxygène (O_2), et forme un radical peroxyle ROO°. Ce dernier va réagir avec un AGPI voisin (R'H) en lui arrachant un atome d'hydrogène, entraînant la formation d'un hydroperoxyde ROOH et d'un nouveau radical alkyle R° (**Figure 1**).

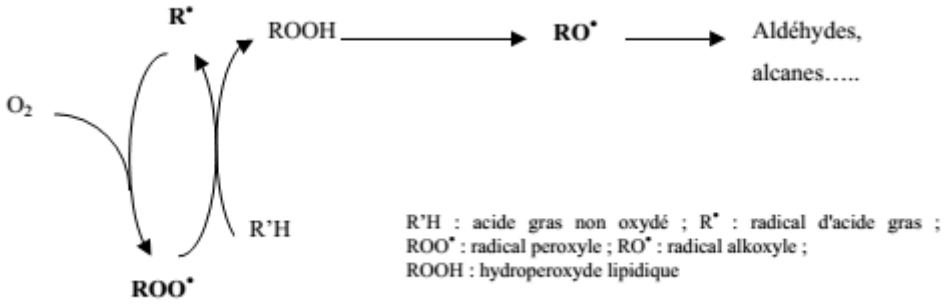


Figure 1 : *Représentation schématique de la phase de propagation de la peroxydation lipidique non enzymatique initiée par les ROS*

Il s'agit donc d'une phase d'amplification, au cours de laquelle le R° formé dans la phase d'initiation va générer un cycle de formation d'autres radicaux R° en réagissant avec les AGPI adjacents, le tout alimenté par l'O_2. Ainsi, il est généralement admis qu'un radical R° peut entraîner la formation d'une centaine d'hydroperoxydes.

Les hydroperoxydes (ROOH) formés durant cette phase étant instables, ils sont convertis en d'autres radicaux (alkoxyle RO°, peroxyle ROO°) ou en composés provenant de leur scission (alcanes, aldéhydes, principalement le malondialdehyde (MDA), le HNE et le 4-hydroxyhexénal (HHE) (van Kuijk et al., 1986)). Cette conversion est catalysée par la présence de métaux de transitions divalents (fer, cuivre) libres ou appartenant à des structures héminiques (hème, cytochrome) (Sevanian and Hochstein, 1985).

iii. Phase de terminaison

Cette phase permet la formation de composés stables, par trois voies potentielles :

- Neutralisation des radicaux : ROO° se combine avec un autre radical pour former un composé stable. Le cycle de propagation est alors progressivement ralenti, jusqu'à l'arrêt.

$$\mathbf{ROO° + ROO° \rightarrow ROOR + O_2}$$

- Neutralisation par des antioxydants (AH) : des molécules antioxydantes piègent le radical peroxyle, stoppant ainsi la propagation.

$$\mathbf{ROO° + AH \rightarrow ROOH + A°}$$

Le radical A° peut réagir avec des radicaux peroxyles présents, ou être régénéré en AH et ainsi contribuer à nouveau à la neutralisation des radicaux peroxyles.

Les ROOH formés lors de la phase de terminaison peuvent finalement être convertis ou scindés par les mêmes mécanismes que ceux décrits lors de la phase de propagation, et ainsi aboutir à la formation des composés décrits plus haut : alcanes et aldéhydes principalement.

iv. Les alcénals, produits secondaires de lipoperoxydation

À l'origine, il était communément admis que les processus liés à la lipoperoxydation entraînaient systématiquement des dommages. En effet, les aldéhydes possédant une meilleure stabilité que les radicaux libres ayant initié leur formation, peuvent diffuser de leur site de formation pour atteindre et endommager des cibles plus lointaines. Ils sont alors qualifiés de « seconds messagers toxiques » de la peroxydation lipidique (Esterbauer et al., 1991). Cependant, les dernières avancées montrent que la lipoperoxydation est un processus complexe, modulant également de nombreux effets indispensables à l'intégrité et à la réponse adaptative des cellules (Grune et al., 2010) (**Figure 2**).

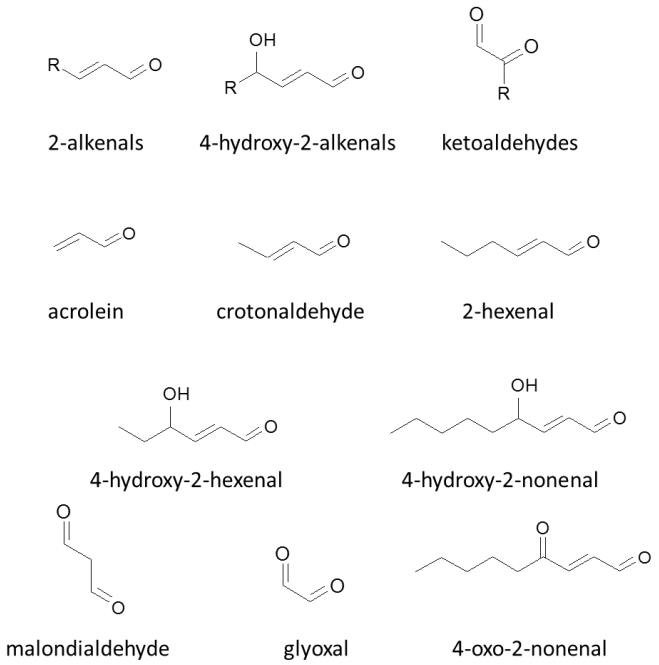


Figure 2 : *Produits d'oxydation des lipides*

b. Sites et mécanisme de formation du HNE

Parmi les produits issus de la lipoperoxydation, le 4-hydroxy-2-nonénal (HNE) qui est un aldéhyde à 9 carbones ($C_9H_{16}O_2$, **Figure 3**), est un produit d'oxydation secondaire des acides gras polyinsaturés en n-6.

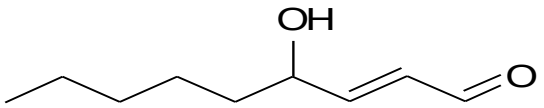


Figure 3 : *Structure chimique du 4-hydroxy-2-nonénal*

i. Sites de formation du HNE

Chez l'Homme, l'exposition au HNE peut avoir lieu par deux voies : endogène ou exogène. Le **HNE endogène** correspond au HNE formé dans la cellule à partir des acides gras n-6 en conditions physiologiques ou pathologiques de stress oxydatif (génération de ROS par la chaîne de transport des électrons dans la mitochondrie, par les activités de biotransformation du cytochrome P450 ou en cas d'inflammation par exemple) (Grune et al., 2010). Parallèlement, le corps humain peut également être exposé de manière **exogène** au HNE, *via* la consommation d'aliments « contaminés » en HNE, le **« HNE alimentaire »** ou *via* sa formation dans le tractus digestif à partir d'un bol alimentaire contenant ses précurseurs, le **« HNE néoformé pendant la digestion »**. Dans le cadre de cette thèse, nous nous intéresserons uniquement au **HNE produit dans la matrice alimentaire, depuis l'aliment jusque dans**

le tractus digestif. Nous ne détaillerons donc pas les mécanismes de formation du **HNE endogène**, issu de contextes physiologique ou pathologique, ces mécanismes de lipoperoxydation étant similaires (avec une formation supplémentaire possible *via* des réactions enzymatiques).

ii. Mécanisme de formation du HNE

Le mécanisme de formation des hydroxyalcénals et du HNE en particulier a était largement étudié ces trente dernières années. Le HNE est généré à partir d'hydroperoxides des AGPI en n-6 dont l'acide linoléique et l'acide arachidonique.

En 1990, Pryor et Porter proposent deux hypothèses théoriques de formation du HNE durant la peroxydation lipidique, basées sur l'autoxydation de 2 AGPI en présence de Fe^{2+} (acide 11-hydroperoxy-arachidonique (ou acide 9-hydroperoxy-linoléique) ou acide 15-hydroperoxy-arachidonique (ou acide 13-hydroperoxy-linoléique)) (Pryor and Porter, 1990). En 1993, Gardner et Hamberg apportent une preuve expérimentale de la formation du HNE par voie enzymatique, à partir d'hydroperoxydes lipidiques, et ayant pour dernier précurseur le 4-HPNE (4-hydroperoxy-nonénal) (Gardner et al., 1993).

Une revue de 2008 décrit les mécanismes chimiques proposés pour la formation du HNE (Schneider et al., 2008) (Figure 4). L'acide linoléique peut être oxydé en 9(S)-HPODE par une lipoxygenase des plantes avant d'être clivé par le cytochrome P450 CYP74C pour générer 2 aldéhydes, dont le 3Z-nonenal rapidement oxydé de manière non enzymatique en 4-HPNE. Même si l'analogue chez l'animal du cytochrome réalisant le clivage de l'hydroperoxyde n'a pas été découvert, des mécanismes similaires non enzymatiques ont été proposés pour expliquer la formation de HNE à partir de 9 et de 13-HPODE (Schneider et al., 2001).

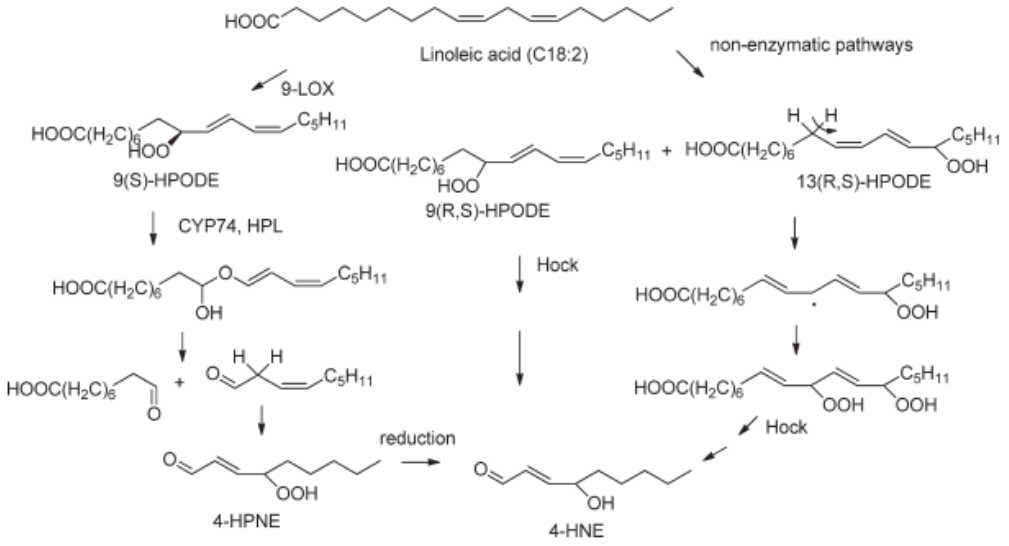


***Figure 4** : Mécanismes chimiques proposés pour la formation du HNE (Yin et al., 2011)*

D'autre part, une étude récente a montré que le HNE pouvait être formé *via* la décomposition (catalysée par l'hème) du diendoperoxyde produit par les voies 5-LOX et COX-2 (Griesser et al., 2009). Le HNE semble également pouvoir être formé à partir des phospholipides de la membrane cellulaire. En effet, des quantités significatives de HNE se forment après l'oxydation de la cardiolipine L_4CL par des radicaux libres. Ce nouveau mécanisme de formation du HNE a une relevance biologique puisque la cardiolipine L_4CL est une cardiolipine majoritaire dans la plupart des cellules mammifères. Celle-ci se trouvant associée au cytochrome *c* (présentant des activités peroxydante et oxydante) joue un rôle critique dans l'apoptose (Liu et al., 2011).

Enfin, Kanazawa *et al*. se sont intéressés au devenir dans le tube digestif des hydroperoxydes provenant de l'acide linoléique. Après une administration intra-gastrique, des aldéhydes provenant des précurseurs administrés (monohydroperoxydes de l'acide linoléique ou LA-OOH) ont été retrouvés dans les contenus gastriques et intestinaux ainsi que dans les tissus intestinaux et dans le foie (Kanazawa and Ashida, 1998). Ces auteurs montrent donc que des aldéhydes se forment, à partir de leurs précurseurs dans le tube digestif et peuvent ensuite être absorbés et distribués dans l'organisme.

2. Structure et réactivité du HNE

Le HNE est un hydroxy-alcénal α,β-insaturé, amphiphile (avec de grandes propriétés lipophiles), composé d'une chaîne à 9 C porteuse de 3 fonctions importantes, lui conférant une grande réactivité chimique envers de nombreuses molécules. De plus, la présence de deux doubles liaisons conjuguées (celle entre les carbones 2 et 3 et celle du groupement carbonyl) donne au HNE un fort caractère électrophile, qui est encore renforcé par l'effet du groupement hydroxy sur le carbone 4. Cette propriété permet au HNE de réaliser des attaques nucléophiles sur des groupements électrophiles présents dans diverses molécules organiques, notamment les protéines ou l'ADN (**Figure 5**).

Les 3 groupements fonctionnels du HNE sont :

- **Une fonction carbonyle (C=O) portée par le groupement aldéhyde** sur le 1er carbone. Ce groupement est impliqué dans la formation de bases de Schiff, résultat de la réaction entre HC=O et un groupement amine (provenant d'une protéine). Les bases de Schiff sont en partie responsables de l'agrégation de protéines associée au HNE (« cross-linking »).
- **Une double liaison (C=C)** entre le 2ème et le 3ème carbone. Cette double liaison est impliquée dans les additions de Michael, consistant en l'ajout d'un nucléophile (lysine, cystéine, histidine ou encore acide nucléique comme la guanine par exemple) sur le groupement C=C.
- **Un groupement hydroxy (OH)** sur le 4ème carbone, pouvant entraîner la formation d'hémi-acétals ou de cétones par oxydation.

Ces trois groupements peuvent subir diverses réactions, participant à la métabolisation du HNE (détaillé au paragraphe « *Le métabolisme du HNE* » p31). On peut notamment citer l'implication de la double liaison C=C dans la conjugaison au glutathion par addition de Michael *via* la Glutathion-*S*-Transferase (GST), la réduction de la double liaison C=C par l'alcénal/one réductase (AOR ou Prostaglandine Réductase PGTR1), l'oxydation de la liaison C=O par les aldéhydes déshydrogénases (ALDH) ou sa réduction par les alcool déshydrogénases et par les AKR (aldo-kéto réductases), ou encore l'oxydation du groupement OH en cétones.

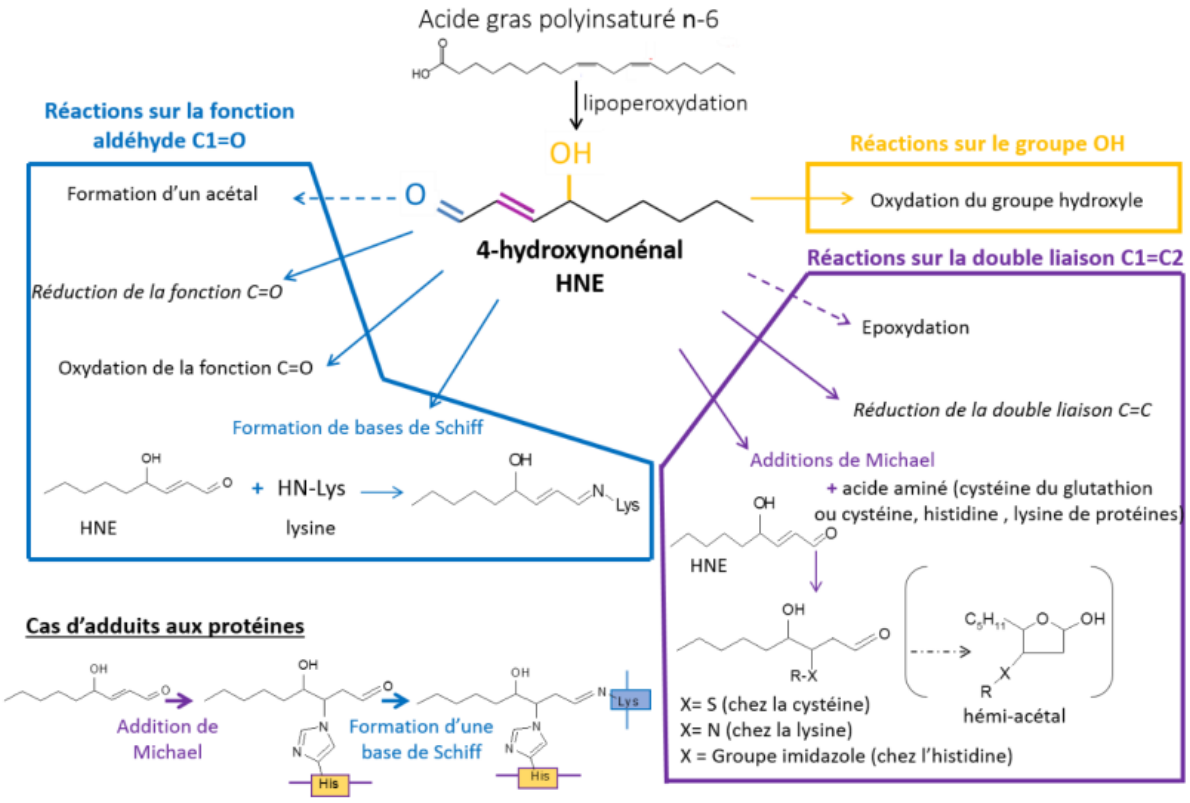


Figure 5 : *Fonctions réactives du HNE et mécanismes d'adduction aux protéines (adapté de (Dalleau et al., 2013))*

Le HNE, de par sa capacité à former des adduits à l'ADN et aux protéines, possède de nombreux effets biologiques. Quantitativement, les protéines et les peptides représentent le groupe de biomolécules le plus souvent ciblé par le HNE. On estime que 1 à 8% du HNE formé dans les cellules va entraîner des modifications protéiques (Siems and Grune, 2003). La présence d'adduits HNE sur des protéines peut engendrer des modifications de leur structure ou de leur activité ou même entraîner leur inactivation (notamment pour les enzymes) (Dalleau et al., 2013; Schaur, 2003).

Outre ces modifications biochimiques, le HNE est également capable d'engendrer des modifications biophysiques des propriétés des protéines et des lipides, comme par exemple l'altération de la fluidité de la membrane cellulaire ou la perte d'asymétrie des phospholipides (Poli et al., 2008). On peut noter que ces effets biochimiques ou biophysiques interviennent à des doses de HNE très différentes : les modifications des protéines peuvent apparaître dès 1µM de HNE (une concentration physiologiquement pertinente), alors que la fluidité de la membrane augmente seulement à des concentrations beaucoup plus élevées (50µM) (Subramaniam et al., 1997).

3. HNE, physiologie et pathologie

Le HNE est aujourd'hui considéré comme une molécule possiblement impliquée dans de nombreuses maladies humaines. Cependant, il peut également exercer des effets physiologiques bénéfiques, selon la concentration intracellulaire. Par exemple, à des concentrations basses (<2µM), le HNE promeut la survie et la prolifération de cellules endothéliales *in vitro* (Vatsyayan et al., 2012).

Grâce aux méthodes actuelles, notamment par spectrométrie de masse avec dérivatisation, le HNE peut être détecté et quantifié dans les tissus et les fluides biologiques. La mesure du HNE, de certains de ses métabolites stables ou des adduits HNE-protéine, est d'ailleurs déjà utilisée comme marqueur

de lipoperoxydation ou de stress oxydant dans de nombreux processus pathologiques, souvent dans des contextes inflammatoires (Poli et al., 2008).

a. Taux physiologiques de HNE

La concentration en HNE a été mesurée dans un certain nombre d'organes ou de tissus sains, à l'aide de diverses méthodes, chez l'homme et chez le rat (**Tableau 1**).

Système biologique	Valeur physiologique en HNE	Référence
Foie de rat	2,82 ± 0,53 nmol/g	(Yoshino et al., 1986)
Hépatocytes de rat	1,30 ± 0,5 nmol/10^8 cellules	(Poli et al., 1985)
Rétine de rat	0,64 ± 0,64 nmol/mL	(van Kuijk et al., 1988)
Plasma de rat	0,86 ± 0,2 nmol/mL	(Yoshino et al., 1986)
LDL humain	0,14 ± 0,17 nmol/mL	(Esterbauer et al., 1987)
Monocytes humains	3,9 ± 0,8 nmol/10^8 cellules	(Selley et al., 1989)

Tableau 1 : *Concentration en HNE dans des tissus ou des organes humains ou animaux*

La concentration du HNE dans le sérum dans des conditions basales semble se situer entre 0.05 et 0,15µM (Michel et al., 1997), avec un maximum observé à 0,5µM (Selley et al., 1989). Dans un groupe de 194 individus sains âgés de 18 à 84 ans, le statut redox dans le plasma a été estimé et la corrélation avec le vieillissement a été étudiée. La valeur moyenne de la concentration en HNE dans le plasma est de 0.074µM dans cette étude et une tendance vers le déséquilibre oxydatif a été observée avec le vieillissement (Gil et al., 2006).

b. Toxicité du HNE *in vivo*

De rares études se sont penchées sur la toxicité *in vivo* du HNE. En 1977, Schauenstein *et al.* établissent la DL_{50} (Dose Létale 50) du HNE à 68mg/kg chez la souris en administration intra-péritonéale (Schauenstein et al., 1977). En 1993, Nishikawa *et al.* administrent du HNE par gavage à 10, 30, 100, 300 et 1000mg/kg à des rats F344. La forte dose entraîne une nécrose aigüe du rein et la mort de certains animaux en quelques heures. À plus faible dose, les rats présentent après 14 jours des nécroses diffuses du foie, de manière dose-dépendante (Nishikawa et al., 1992). Enfin, Kang *et al.* montrent une hépatotoxicité et une néphrotoxicité chez le rat Sprague-Dawley après une administration de HNE par gavage pendant 28 jours. Les doses utilisées dans cette étude étaient comprises entre 0,5 et 12,5mg/kg/jour, leur permettant de conclure que la NOAEL (No-Observed-Adverse-Effect Level) du HNE est inférieure à 0,5mg/kg/jour (Kang et al., 2011).

c. HNE et pathologies

i. HNE et cancer

Le HNE est considéré comme un acteur des effets mutagène et cancérigène associés à la lipoperoxydation induite par le stress oxydant (Shoeb et al., 2014).

Le dosage du HNE libre dans des tissus ou des cellules tumorales a été réalisé par différents auteurs. Ces études montrent des résultats contradictoires. Des niveaux augmentés de HNE libre ont été observés dans un modèle d'adénocarcinome rénal chez le rat (Skrzydlewska et al., 2001). À l'inverse, le niveau de HNE libre dans des lignées cellulaires d'hépatome est diminué par rapport à des cellules

moins transformées (Hammer et al., 1997; Rossi and Cecchini, 1983). Ces différences peuvent s'expliquer du point de vue du métabolisme oxydatif. En effet, l'une des caractéristiques des cellules tumorales est leur stress oxydant, entraînant une homéostasie oxydative relative (Masotti et al., 1988). De ce fait, le HNE peut s'avérer indétectable dans certaines cellules tumorales tandis que d'autres en présentent au contraire des taux élevés.

Le HNE peut exercer ses effets délétères *via* son adduction à différentes macro-molécules comme l'ADN ou les peptides et les protéines :

- le HNE ou ses métabolites actifs peuvent endommager l'ADN, entraînant la formation de lésions pro-mutagènes dans les cancers liés à l'inflammation (Bartsch and Nair, 2006).
- les adduits HNE-protéine sont présents en conditions physiologiques et pathologiques (Poli et al., 2008). Cependant, plusieurs études montrent que la présence d'adduits HNE-protéine dans des cellules cancéreuses de rein et de côlon est reliée à la croissance et à la progression de ces cancers (Shoeb et al., 2014). Des niveaux augmentés d'adduits HNE-protéine ont également été observés dans un modèle d'adénocarcinome rénal chez le rat (Skrzydlewska et al., 2001) et dans des biopsies de cancer du sein, en lien avec le degré de malignité (Karihtala et al., 2011). Cependant d'autres études montrent des résultats contradictoires, avec une diminution des adduits HNE-protéine dans les tumeurs rénales (Oberley et al., 1999).

Le HNE pourrait donc, selon différentes hypothèses, agir sur la cancérogénèse en tant que composé mutagène ou comme agent impactant la fonction de protéines impliquées dans des processus cellulaires fondamentaux (prolifération, différenciation et apoptose) ou encore dans l'inflammation. Le lien entre HNE, cancer colorectal et viande rouge sera développé au chapitre « *Les facteurs de risque du cancer colorectal* » (p46).

✓ *Génotoxicité et mutagénicité*

Plusieurs auteurs ont démontré la génotoxicité du HNE *in vitro.* Eckl et al. ont montré en 1993 et en 2003 qu'un traitement au HNE à faibles concentrations (0,1µM) sur des hépatocytes primaires entraîne une augmentation des échanges de chromatides sœurs, tandis qu'à de plus fortes concentrations (1 et 10µM), on observe une augmentation des micronoyaux et des aberrations chromosomiques. On peut noter que l'échange des chromatides sœurs ainsi que le dénombrement des micronoyaux et des aberrations chromosomiques sont des tests classiquement utilisés pour mesurer les dommages chromosomiques et la génotoxicité (Eckl, 2003; Eckl et al., 1993). Parallèlement, Karlhuber et al. ont montré des résultats similaires sur des cellules endothéliales cérébrales porcines (Karlhuber et al., 1997). On peut préciser que les traitements utilisés sont représentatifs des concentrations de HNE retrouvées *in vivo*, à savoir entre 1 et 25µM dans des conditions physiopathologiques (Forman et al., 2008).

Le mécanisme proposé pour expliquer cette génotoxicité implique la formation d'adduits exocycliques à l'ADN (caractérisés par la présence de cycles supplémentaires à 5 ou 6 éléments selon le type d'adduit). Deux types d'adduits exocycliques ont été décrits suite à l'exposition de nucléosides ou d'ADN isolé à des aldéhydes issus de l'oxydation des lipides : les propano-adduits et les éthéno-adduits (Chung et al., 1996) (**Figure 6**).

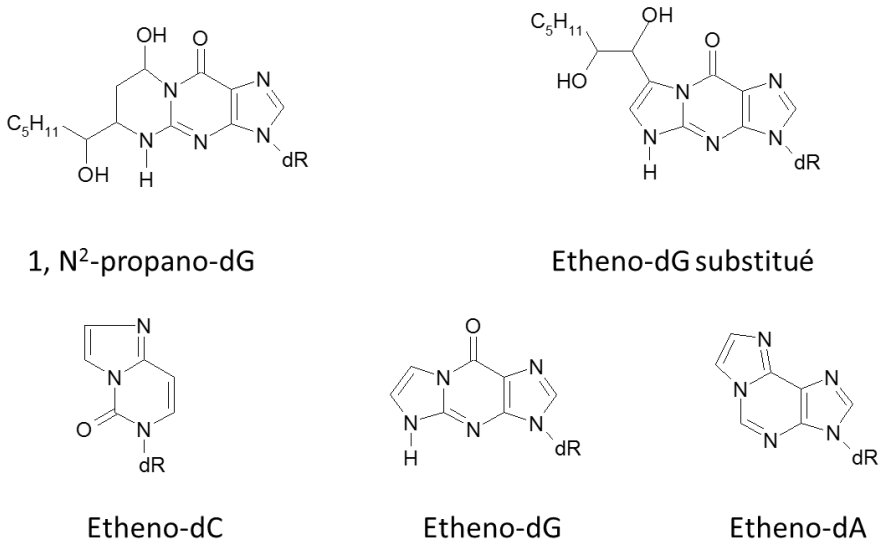


Figure 6 : *Exemples de propano-adduits et d'éthéno-adduits substitués ou non*

Propano-adduits

Les propano-adduits sont caractérisés par la présence d'un cycle à 6 éléments et proviennent de l'adduction directe par addition de Michael entre le HNE et la déoxyguanosine. Cette réaction est suivie de la fermeture du cycle, entraînant la formation de l'adduit HNE-dGuo.

Ethéno-adduits

Les éthéno-adduits sont quant à eux caractérisés par un cycle à 5 éléments, et proviennent de l'adduction indirecte du HNE avec la cytosine, l'adénine ou la guanine. La formation d'un intermédiaire époxyde, plus réactif vis-à-vis de l'ADN que le HNE, entraîne l'adduction à la base nucléique. Les éthéno-adduits existent sous 2 formes : éthéno-adduit substitué, lorsque la chaîne latérale (correspondant à l'aldéhyde réactif) est conservée ; et éthéno-adduit non substitué, dans le cas où la chaîne latérale est perdue. Dans le cas des éthéno-adduits non substitués, il est donc difficile d'identifier l'aldéhyde à l'origine de l'adduit.

Les mécanismes de réparation de l'ADN mis en jeu dépendent de la nature de l'adduit présent. Les éthéno-adduits non substitués induisent des transversions et des transitions dans l'ADN tandis que les éthéno-adduits substitués et les propano-adduits inhibent fortement la synthèse de l'ADN, du fait de leur structure massive. Les éthéno-adduits non substitués, ne provoquant qu'une légère distorsion de l'hélice et des lésions n'impliquant que quelques bases, ils sont réparés par la voie du BER (Base Excision Repair). À l'inverse, les éthéno-adduits substitués et les propano-adduits, étant plus massif, sont réparés par la voie NER (Nucleotide Excision Repair) (Chung et al., 2003; Winczura et al., 2012). On peut noter que certains auteurs ont montré que les adduits à l'ADN présentent une mutagénicité et une cytotoxicité accrues dans des cellules déficientes pour le système de réparation NER par rapport à des cellules sauvages (Feng et al., 2003).

Concernant le lien entre HNE et cancer, plusieurs études montrent que le HNE forme préférentiellement des propano-adduits sur les hot-spots mutationnels de *p53,* qui est un important gène suppresseur de tumeur, fréquemment muté dans des cancers humains (notamment le cancer colorectal) (Chung et al., 2003; Feng et al., 2003; Hu et al., 2002).

- ✓ *Signalisation*

La modification des protéines par leur adduction aux produits de lipoperoxydation entraîne, dans la majorité des cas l'altération de leur fonction. Cependant, il a été montré que les fonctions de certaines

protéines sont au contraire activées par le HNE (Caspase-3, EGFR, PDGFRβ et certaines isosymes PKCβ) (Poli et al., 2008). Les adduits HNE-protéine sont éliminés par la voie classique de dégradation des protéines, la voie du protéasome. Il est intéressant de noter que le protéasome est une cible du HNE, entraînant la diminution de son activité de protéolyse et de la dégénération cellulaire (Grune and Davies, 2003). La présence de cystéine, d'histidine ou de lysine dans les sites de catalyse, de liaison, ou dans les domaines de régulation des protéines impliquées dans la signalisation cellulaire rendent ces dernières particulièrement sensibles aux produits réactifs de l'oxydation des lipides. Ainsi, ces composés doivent être considérés comme de réels messagers secondaires du stress oxydant.

Le HNE, *via* la modification protéique, module plusieurs voies de signalisation, impliquées notamment dans la régulation de la croissance, de la différenciation et de l'apoptose des cellules mais également de l'inflammation. Comme présenté au chapitre « *Cancer colorectal et inflammation* » (p56), un lien étroit existe entre inflammation et cancérogénèse. Nous présentons donc ici quelques voies modulées par le HNE et pouvant être impliquées dans la cancérogénèse et l'inflammation. Parmi ces voies, on trouve :

- **Nrf2/ARE**. La voie Nrf2/ARE (Nuclear factor E2-related factor 2/Antioxidant responsive element) est une voie majeure de la défense antioxydante puisqu'elle permet l'induction de la transcription de nombreux gènes codant pour des protéines régulant l'homéostasie redox de la cellule. Ces gènes présentent dans leurs régions promotrices une séquence nommée ARE, qui est spécifiquement reconnue par Nrf2. Parmi les gènes régulés par ce facteur de transcription, on trouve des enzymes de détoxication de phase I (comme le cytochrome P450, l'hème oxygénase (HO-1) ou encore les NAD(P)H quinone oxidoreductases (NQO)), des enzymes de phase II (comme des enzymes de conjugaison au glutathion (GSTs)), ainsi que des transporteurs (de la famille des ABC transporteurs et des MRPs).

Ainsi, de nombreuses enzymes métabolisant les produits de lipoperoxydation (tels que la GST, AKR, ALDH, voir chapitre *« Le métabolisme du HNE »* en p31) sont régulées par la voie Nrf2/ARE. Cette voie est fortement impliquée dans la biotransformation et l'excrétion des produits d'oxydation des lipides. De plus, il existe des liens entre cette voie de signalisation et le développement du cancer et sa thérapie.

Nrf2 est un facteur de transcription qui joue un rôle important dans la réponse antioxydante dans les cellules (Li and Kong, 2009). Dans des conditions basales, Nrf2 est séquestré dans le cytoplasme par son inhibiteur Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1). Le recrutement de Cul3 (Cullin-3-based E3 ubiquitin ligase) par ce dimère provoque l'ubiquitination de Nrf2. Le complexe ubiquitiné est alors ciblé vers le protésome où il est dégradé (Kobayashi et al., 2004). Dans des conditions de stress oxydant, certaines cystéines critiques de Keap1 sont oxydées ou modifiées par adduction de composés électrophiles, entraînant un changement de conformation de Keap1, affectant sa liaison à Nrf2. Ainsi, le complexe entre Keap1 et Nrf2 ne se forme plus, ce qui entraîne la translocation nucléaire de Nrf2. Une fois dans le noyau, Nfr2 s'associe à d'autres protéines et se lie aux domaines ARE, présents dans les régions régulatrices de gènes codant pour de nombreuses enzymes de la réponse antioxydante, induisant leur transcription (Itoh et al., 1997).

Parmi les gènes cibles de la voie Nrf2/ARE, on peut citer NQO1 (NAD(P)H quinone oxydoréductase 1 qui catalyse la réduction des quinones hautement réactives), HO-1 (heme-oxygenase-1 qui catalyse la métabolisation de l'hème), certaines enzymes de phase II comme les GST (Glutathion-*S*-transferase) qui catalysent la conjugaison entre le glutathion et de nombreux composés électrophiles), les UGT (UDP-glucuronosyltransférases qui catalysent la conjugaison de l'acide glucuronique à des composés

variés) ainsi que des transporteurs membranaires comme les MRPs (multidrug resistance-associated proteins, impliqués dans l'efflux de nombreux composés) (Wu et al., 2012).

Parmi les activateurs de Nrf2, on peut citer les ROS, H_2O_2, mais également des composés électrophiles et des composés naturels présents dans les fruits et les légumes comme le sulforaphane (Kensler et al., 2013), le curcumin ou le pterostilbène (Ramkumar et al., 2013).

De par ses propriétés antioxydantes, Nrf2 est considéré comme un facteur suppresseur de tumeur. Par exemple, des souris Nrf2 déficientes sont plus sensibles aux maladies inflammatoires et au développement du cancer que des souris sauvages (Chan and Kan, 1999; Ramos-Gomez et al., 2001). De plus, l'injection de DSS (dextran sodium sulfate), un agent pro-inflammatoire chez des souris Nrf2 déficientes entraîne l'augmentation du nombre de lésions prénéoplasiques dans le côlon après initiation à l'AOM (azoxyméthane) (Khor et al., 2008; Osburn et al., 2007). La perte de Nrf2 a également été associée à l'augmentation de la formation de métastases dans le poumon (Satoh et al., 2010). Cependant l'effet protecteur de la voie Nrf2/ARE peut s'avérer problématique dans le traitement du cancer car cette dernière participe à la chimiorésistance à travers l'activation de l'expression d'enzymes (comme la GST) et de transporteurs d'efflux (Sporn and Liby, 2012). De plus, dans des cellules cancéreuses, l'expression du signal ne peut pas revenir à un niveau basal en l'absence de stimulus oxydant, pouvant mener à une sur-activation du système, cette dernière ayant été proposée comme impliquée dans la tumorigénèse. Ces données permettent à certains auteurs de définir Nrf2 comme un proto-oncogène et à l'inverse Keap-1 comme un gène suppresseur de tumeur (Gañán-Gómez et al., 2013).

En plus de ses effets sur la réponse antioxydante, Nrf2 peut également promouvoir la croissance et la prolifération cellulaire et diminuer l'apoptose *via* la régulation d'autres facteurs de transcriptions (Yamadori et al., 2012). Nrf2 peut également jouer un rôle dans la reprogrammation métabolique (Mitsuishi et al., 2012). De plus, le gène suppresseur de tumeur *p53*, qui augmente l'apoptose en cas de dommages à l'ADN et qui régule négativement Nrf2, est souvent muté dans le cancer. Ceci entraîne une exacerbation des effets de Nrf2, conjointement à une diminution de l'apoptose (Gañán-Gómez et al., 2013). En parallèle, Nrf2 peut également activer l'inhibiteur de p53 (You et al., 2011). Enfin, il a été montré que la surexpression de Nrf2 peut être due à des mutations de Nrf2 ou de Keap-1 dans différents types de cancer (Hayes and McMahon, 2009; Shibata et al., 2008a, 2008b).

Le HNE et les autres alcénals sont des activateurs de Nrf2 de par leurs propriétés électrophiles (Surya et al., 2016). Il a été montré que le HNE induit la transcription de la GCT (Glutamate-Cystéine Ligase) et de la GST *via* l'activation de la voie Nrf2/ARE (Tjalkens et al., 1998; Zhang et al., 2007). En 2012, Huang *et al.* constatent une translocation nucléaire de Nrf2 rapide dans des cellules HeLa suite à un traitement au HNE. Ces effets semblent être dus à la liaison du HNE sur des cystéines de Keap1 et sont accompagnés de l'augmentation de la transcription de certains gènes cibles de cette voie (Huang et al., 2012).

- **NF-κB**. Le facteur de transcription NF-κB (Nuclear Factor-kappa B) régule divers processus cellulaires tels que la réponse immunitaire, l'inflammation, la prolifération cellulaire et l'apoptose. À l'état basal, NF-κB est séquestré dans le cytoplasme sous forme inactive car lié à son inhibiteur IκB. Suite à une stimulation, IκB est phosphorylé par IKK (IκB kinase), ce qui entraîne sa dégradation par le protéasome. Ceci permet la translocation rapide de NF-κB dans le noyau, permettant la transcription de gènes portant des séquences de liaison à ce facteur de transcription.

NF-κB étant un régulateur majeur de la prolifération cellulaire, la dérégulation de cette voie peut être mise en relation avec le développement du cancer (Fan et al., 2013). Dans les cellules cancéreuses, NF-

κB est souvent activé constitutivement, à cause d'une mutation soit sur NF-κB, soit sur un de ses régulateurs.

Le HNE peut activer ou inhiber NF-κB en fonction du type cellulaire et de la quantité de HNE. En particulier, une inhibition de NF-κB par le HNE a été montrée dans des lignées cellulaires de carcinome colorectal humain et de carcinome pulmonaire (Ji et al., 2001). À l'inverse, une activation de NF-κB a été reporté dans des cellules musculaires lisses suite à une exposition à une faible dose de HNE (1µM) (Ruef et al., 2001).

- **PKC.** Les protéines kinases C sont des enzymes impliquées dans la transduction intracellulaire de signaux de la différenciation, de la prolifération et de l'apoptose. L'effet du HNE sur l'activité de PKC dépend de sa concentration et de l'isoforme de l'enzyme concernée (Forman et al., 2008). Les PKC possèdent plusieurs cystéines critiques dans leur domaine de régulation et dans leur site catalytique, qui pourraient être ciblées par le HNE (Gopalakrishna and Jaken, 2000). La voie des PKC est une voie indirecte d'activation par le HNE des voies Nrf2 (Huang et al., 2002) et AP-1 (Nitti et al., 2002), qui est un autre facteur de transcription impliqué dans la réponse inflammatoire et sous le contrôle du stress oxydant.
- **MAPK.** La famille des Mitogen Activated Protein Kinase est un groupe de serine-thréonine kinase, qui inclut les ERKs, les JNKs et les p38 MAPKs. Ces enzymes sont impliquées dans la transduction de signaux intracellulaires de la différenciation, la prolifération et l'apoptose. Leur dérégulation est fréquemment associée au cancer (Chang and Karin, 2001). Ces kinases sont particulièrement sensibles à la modulation par les produits de lipoperoxydation comme le HNE (Forman et al., 2008). Par exemple, JNK, qui est impliquée dans l'apoptose est directement activée par le HNE *via* son adduction sur un résidu histidine (Parola et al., 1998).
- **AP-1**. Les facteurs de transcription de la famille AP-1 possèdent un rôle à double tranchant dans la tumorigénèse, en ayant à la fois une action oncogénique et suppresseur de tumeur selon le membre de la famille AP-1 impliqué (Eferl and Wagner, 2003). D'après plusieurs études sur des lignées cellulaires modèles de différentes pathologies, le HNE régule positivement l'activité d'AP-1 (Ayala et al., 2014)
- **COX-2**. La cyclo-oxygénase-2 (COX-2) est une enzyme catalysant la formation des prostaglandines, c'est donc un acteur important de l'inflammation. Il a été montré dans des cellules épithéliales de foie de rat, que le HNE régule positivement l'expression de COX-2, *via* l'activation de la voie des MAP kinases (Kumagai et al., 2002).
- **PTEN**. Ce gène suppresseur de tumeur (PTEN : Phosphatase and Tensin homolog) est inactivé par l'activation de la voie Akt en condition de stress oxydant. De plus, il a été montré que le HNE est capable de modifier PTEN, entraînant son inhibition (Shearn et al., 2013).
- **TrxR**. L'enzyme TrxR (Thioredoxine Reductase) est la seule capable de réduire la classe de protéines Thioredoxine (TRX), impliquées dans la réponse au stress oxydant, en favorisant la réduction d'autres protéines. Cette enzyme est également impliquée dans l'inflammation et la cancérogénèse *via* son effet régulateur sur des protéines sensibles à l'oxydo-réduction, telles que p53 et NF-kB. Le HNE, mais également un de ses précurseurs, inhibe TrxR dans les cellules de cancer colorectal (Yu et al., 2004). Dans d'autres conditions, le HNE est un inducteur de TrxR, *via* l'activation de Nrf2 (Schaur et al., 2015), facteur de transcription majeur de la réponse antioxydante dans les cellules.

Enfin, vis-à-vis de l'inflammation, les aldéhydes exercent un effet double. À faible concentration, le HNE active la voie de signalisation PKC-β, tandis qu'à forte concentration, il inhibe l'activation de NF-kB (Negre-Salvayre et al., 2010). Le HNE a également été montré comme un facteur clé de la régulation de l'activité de cytokines impliqués dans différents processus inflammatoires, *via* NF-kB (Coussens and Werb, 2002; Kreuzer et al., 1998).

ii. HNE et autres pathologies

L'implication du HNE a été démontrée dans d'importantes maladies neurodégénératives comme les maladies d'Alzheimer (Zarkovic, 2003) et de Parkinson (Selley, 1998) ou la sclérose en plaques (Newcombe et al., 1994). Le HNE est également incriminé dans le développement du diabète (Akude et al., 2010), de certaines complications inflammatoires (Mukhopadhyay et al., 2011), de l'athérosclérose (Kumano-Kuramochi et al., 2012) ou de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (Ethen et al., 2007). De nombreuses études ont identifié une augmentation du HNE ou des protéines modifiées par le HNE dans des maladies humaines (Shoeb et al., 2014). Le HNE engendre des modifications protéiques de type réticulation ou formation d'agrégats, qui s'accumulent car ces composés sont difficilement ou mal pris en charge par le système de dégradation protéique de la cellule, notamment dans le cadre des maladies neurodégénératives. Dans des études sur la maladie d'Alzheimer, il a été montré que le HNE été toxique pour les cellules P19 (neuro-gliales) *via* la réticulation de la protéine tau, entraînant la formation de composés de haut poids moléculaire, conjugués à l'ubiquitine (Montine et al., 1996a). Dans le même contexte, la capacité du HNE à engendrer la réticulation des protéines APOE3 et APOE4 a été montré, entraînant leur accumulation dans la cellule (Montine et al., 1996b).

Shoeb indique qu'une meilleure compréhension du rôle du HNE et des aldéhydes issus de la lipoperoxydation dans la physiologie et dans la pathologie est nécessaire. D'autre part, la régulation de l'activité des enzymes impliquées dans sa détoxication et le maintien de sa concentration *in situ* pourraient permettre de contrôler la progression de certaines maladies (Shoeb et al., 2014).

4. HNE et nutrition

Les niveaux de HNE dans les tissus pourraient être influencés par la quantité d'aldéhydes en provenance du régime alimentaire (Poli et al., 2008). Plusieurs études se sont intéressées à la présence de HNE dans différents types d'aliments (**Tableau 2**).

Aliment testé	Concentration de HNE (mg/kg d'aliment ± SD)	Référence
Huile de friture avant et après chauffage à 185°C pendant 5h	575±163	(Seppanen and Csallany, 2004)
Plat préparé réfrigéré Charcuterie crue émincée Saucisse de Strasbourg Noix	5 3,7 2 1,3	(Papastergiadis et al., 2014a)
Lait maternisé et aliments pour bébé, 10 jours après ouverture	0,8±0,03 et 0,6±0,1	(Surh et al., 2007)
Imitation de mozzarella (contenant des huiles végétales) après cuisson pendant 30min à 232°C	0,9	(Han and Csallany, 2012)
Poisson	2,94	(Sakai and Kuwazuru, 1995)
Boudin noir	12,5	(Gasc et al., 2007)
Porc et boeuf	23	(Sakai et al., 1995)

Tableau 2 : *Dosages du HNE dans différents aliments*

D'autre part, une étude a estimé l'exposition quotidienne au HNE et au HHE de la population coréenne, montrant une exposition journalière à hauteur de 2,7µg de HNE et 1,6µg de HHE. De plus, l'exposition pourrait monter à plus de 11,8µg/jour de 4-hydroxy-2-alcénals, *via* la consommation d'aliments frits. L'exposition combinée serait donc de 16,1µg/jour de 4-hydroxy-2-alcénals, soit 0,3µg/kg pour un adulte de 60kg. En conclusion, les auteurs indiquent que malgré les données sur la toxicité biologique de ces composés, le risque pour l'homme ne peut pas être quantifié, du fait de l'absence de connaissance sur une dose sans effet toxique observable (Surh and Kwon, 2005).

Plus récemment, une étude de 2014 a réalisé une estimation du risque de la consommation de HNE, HHE et MDA (Papastergiadis et al., 2014a). Étant donné le manque de données de toxicologie, l'approche dite du seuil de préoccupation toxicologique (TTC – Threshold of Toxicological Concern) a été appliquée par les auteurs. Cette méthode permet d'évaluer de manière qualitative le risque associé à des substances en faible concentration dans le régime alimentaire, dont la toxicité n'est pas connue. L'utilisation de l'arbre de décision de Cramer a permis aux auteurs de classer les 3 composés d'intérêt selon le risque toxicologique qu'ils pourraient présenter. Cette méthode permet de classer des composés à la toxicité non connue, en répondant à une série de questions portant sur leur structure chimique. La progression au sein de l'arbre de décision permet de classer les composés en 3 classes de risque, sous l'hypothèse d'une relation entre la structure et la toxicité orale. L'arbre de Cramer a permis de classer le HNE dans la classe II, cependant, les auteurs indiquent que cette classe intermédiaire est aujourd'hui critiquée par la communauté scientifique. Ils ont donc suivi les dernières suggestions de EFSA et ont surclassé le HNE dans la classe III (EFSA Scientific Committee, 2012). Ainsi, le seuil de préoccupation toxicologique pour le HNE a été défini à 1,5µg/kg de poids corporel/jour. Étant donné les analyses de probabilité de consommation et les données de contamination des aliments par le HNE, il a été suggéré par les auteurs que la consommation des produits étudiés ne présente pas de risque. Une exception est mise en évidence par les auteurs et concerne les charcuteries émincées, pour lesquelles 3,8% des consommateurs de ce type de produit sont exposés au-delà du seuil de 1,5µg/kg de poids corporel/jour.

Cependant, la prise de probiotiques (VSL#3, un mélange probiotique de bactéries lactiques et de bifidobactéries) ou d'antioxydants (isoflavones contenues dans les protéines de soja) est capable de faire diminuer les taux de HNE respectivement dans le plasma de patients atteint de maladies du foie, et dans le cerveau de rat (Chowdhury and Soulsby, 2002; Loguercio et al., 2005). Enfin, l'ingestion *via* le régime de toxiques environnementaux pourrait augmenter les niveaux de HNE dans les tissus humains. En effet, il a été montré que le traitement de mitochondries isolées de cerveau de rat par des fongicides (comme le manèbe et le benomyl) diminue la détoxication du HNE, entraînant son accumulation (Leiphon and Picklo, 2007).

5. Le métabolisme du HNE

Des études sur le métabolisme du HNE ont été réalisées sur des organelles subcellulaires, sur différents types de cellules et sur des organismes entiers, mais jamais après exposition par voie orale. L'une de conclusions majeures de toutes ces études est la métabolisation rapide du HNE par les cellules. À partir de ces observations, il est possible de conclure que le HNE peut difficilement s'accumuler à des taux élevés dans des systèmes biologiques. Le plus haut taux mesuré a été enregistré dans un modèle d'intestin de rat à 6,5µM, pendant la période de reperfusion post-ischémique (Mark et al., 2002).

Plusieurs équipes ont travaillé à l'identification et la quantification des métabolites du HNE dans différents modèles biologiques, permettant de mettre en évidence les intermédiaires primaires et secondaires de métabolisation. Les métabolites primaires étant définis comme ceux subissant une

nouvelle conversion métabolique ayant pour résultat un intermédiaire secondaire. Certains métabolites du HNE étant stable (comme les acides mercapturiques excrétés dans l'urine), ils sont utilisés comme des biomarqueurs du stress oxydant et plus précisément de la lipoperoxydation, permettant notamment des diagnostics médicaux (Schaur et al., 2015).

a. Métabolisme *in vitro*

La détoxication du HNE dépend du type cellulaire. Par exemple, des colonocytes métabolisent 100% de 40µM de HNE en 90 minutes (Baradat et al., 2011), tandis que des hépatocytes métabolisent 95% de 100µM de HNE en 3 minutes (Siems et al., 1997). D'une manière générale, les voies de détoxication du HNE sont basées sur la modification des groupements réactifs que sont la double-liaison entre les carbones 2 et 3 et la fonction aldéhyde sur le premier carbone.

Les modifications majeures sont des réactions d'oxydation, de réduction, de saturation ou de conjugaison (**Figure 7**). Les principales enzymes responsables de ces modifications sont : les Glutathion-*S*-Transferases (notamment la GSTA4), les aldéhyde déshydrogénases (ALDH), les aldo-kéto réductases (AKR) et l'alcénal/one oxydoréductase (AOR).

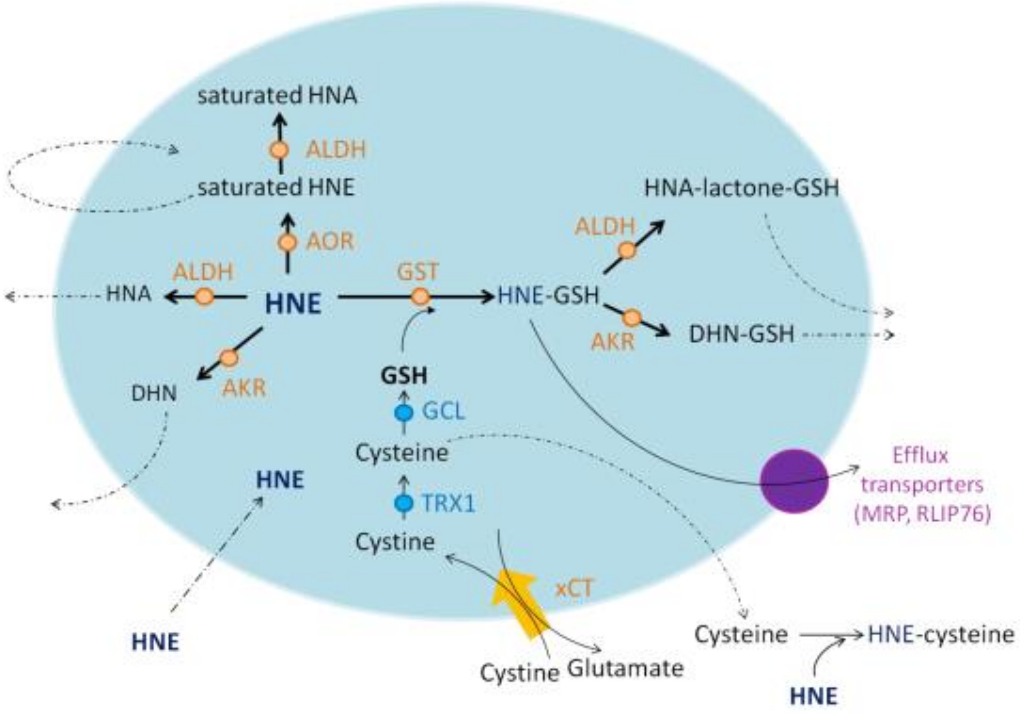


Figure 7 : *Voies de détoxication du HNE. GST : glutathion-S-transférase ; ALDH : aldéhyde déshydrogénase ; AKR : aldo/kéto réductase ; AOR : alkenal-one oxydoréductase ; HNA : acide 4-hydroxynonenoic ; Nrf2 : nuclear factor (erythroid 2)-related factor ; TRX1 : thioredoxine réductase 1 ; xCT : cystein/glutamate exchange transporter, d'après (Dalleau et al., 2013)*

Une fois entré dans le cytoplasme, le HNE peut être engagé dans différentes réactions enzymatiques, permettant sa détoxication :

- La conjugaison du HNE au glutathion (GSH) est une voie majeure de détoxication. Le glutathion est un tripeptide antioxydant composé de cystéine, glycine et acide glutamique. La conjugaison entre le GSH et le HNE est catalysée par la GSTA4 (même si elle peut se dérouler spontanément de manière moins rapide).

- La réduction du groupe carbonyle par les AKR1b3 et 1b10 entraîne la production de 1,4-dihydroxy-2-nonène (DHN)
- L'oxydation du groupe carbonyle par les ALDH1A1, ALDH2 et ALDH3A1 entraîne la formation d'acide 4-hydroxy-2-nonénoïque (HNA)
- L'hydrogénation de la double liaison C=C par l'AOR entraîne la formation de 4-hydroxynonanal hémiacétal (HNE saturé), qui peut à son tour être oxydé par l'ALDH et former du 4-hydroxynonanoïque acide (HNA saturé).

Le complexe HNE-GSH peut être efflué *via* différents transporteurs (MRP et RLIP76) ou être pris en charge par l'ALDH ou l'AKR, entraînant la formation de la lactone GS-HNA et de DHN-GSH, eux-mêmes efflués *via* des transporteurs. Les autres métabolites du HNE peuvent également être relargués à l'extérieur de la cellule (Dalleau et al., 2013).

b. Métabolisme *in vivo*

L'objectif principal de la plupart des études de métabolisme du HNE *in vivo* est la caractérisation des métabolites terminaux du HNE, notamment dans l'urine, dans le but de développer des biomarqueurs spécifiques et non invasifs de la lipoperoxydation.

Après une administration en intraveineuse, le HNE est majoritairement excrété dans l'urine et la bile sous forme de métabolites conjugués, dans des proportions dépendantes de la voie d'administration (Alary et al., 1995, 2003a; de Zwart et al., 1996). De plus, il a été montré que les métabolites biliaires subissent un cycle entéro-hépatique qui pourrait limiter leur excrétion dans les fèces (Laurent et al., 1999). Enfin, seule une petite partie des métabolites est retrouvée liée à des macromolécules.

Selon Alary et al, deux groupes de composés représentent la majorité des métabolites urinaires du HNE : les dérivés mercapturiques et les composés polaires (Alary et al., 2003b) (**Figure 8**).

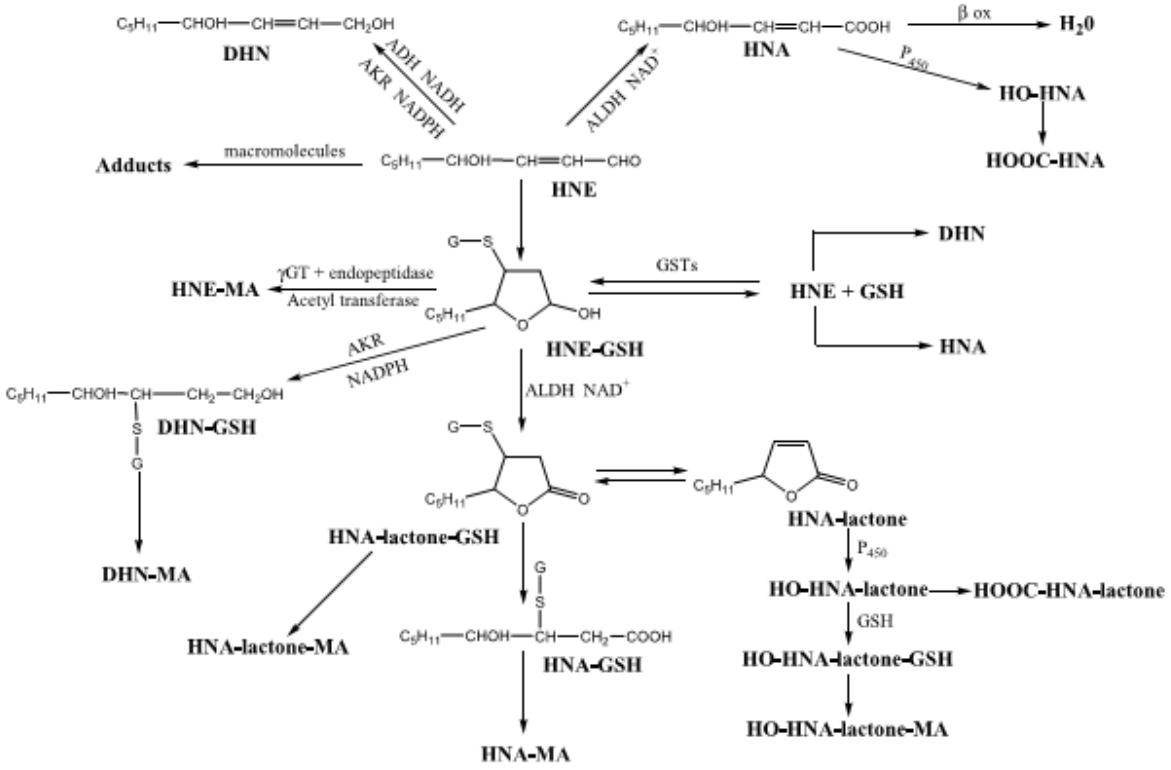


Figure 8 : *Voies métaboliques du HNE chez le rat (Alary et al., 2003a)*

Le premier groupe de métabolites est composé de métabolites non polaires qui sont des dérivés mercapturiques. Ceux-ci proviennent initialement de l'addition de Michael entre le GSH et le HNE, avant de subir une réduction ou une oxydation du groupe aldéhyde aboutissant à la formation de 1,4-dihydroxynonène-glutathion (DHN-GSH), de la lactone du 4-hydroxynonanoïque-GSH (HNA-lactone-GSH) et du HNA-GSH. L'addition de Michael entre le GSH et le HNE a lieu dans la cellule, où la concentration en GSH est élevée. Cette réaction peut se dérouler spontanément ou être catalysée par les GST, qui accélèrent considérablement la réaction. La partie glutathion des conjugués est ensuite métabolisée par le foie et le rein suite à leur prise en charge par des peptidases et des N-acétyl transférases utilisant l'acétyl-Co-A et formant *in fine* des dérivés mercapturiques (conjugués *N*-acétyl-cystéine) (**Figure 9**).

Au niveau biliaire, les métabolites du HNE sont des conjugués glutathion ou des conjugués à l'acide mercapturique du DHN, du HNE ou du HNA.

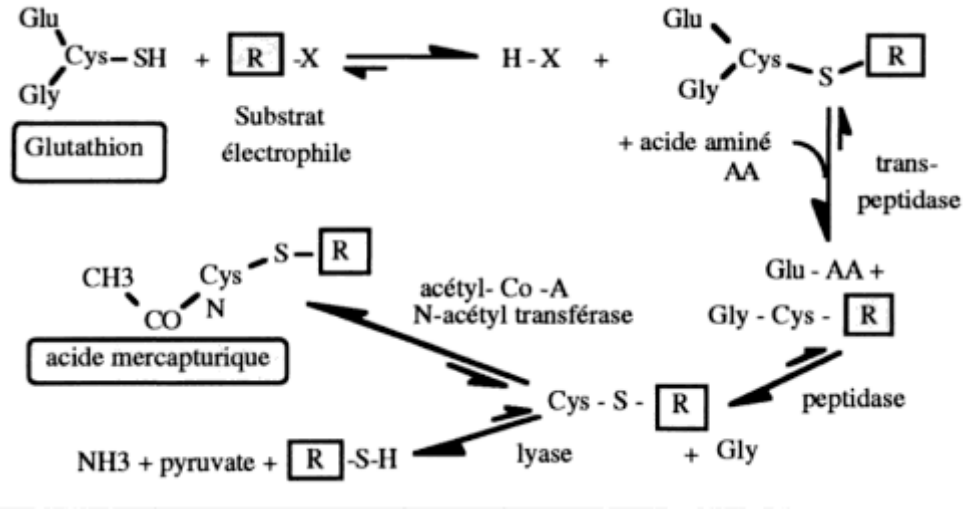


Figure 9 : *Formation de l'acide mercapturique à partir d'un conjugué glutathion (Bounias, 1999)*

Les métabolites du deuxième groupe sont des composés polaires, qui subissent tous une oxydation sur la position terminale de la chaîne alkyle. Cette oxydation est une hydroxylation, suivie ou non d'une oxydation donnant un acide carboxylique (Alary et al., 1998a, 1998b). L'ω-hydroxylation du HNA ou de la HNA-lactone est réalisée, chez le rat, par les cytochromes P450 4A (Guéraud et al., 1999). La HNA-lactone ω-hydroxylée est un composé légèrement électrophile, qui est donc sensible à la conjugaison au glutathion. Ainsi, celle-ci représente la majorité des métabolites polaires conjugués du HNE, retrouvés ensuite sous forme de dérivés mercapturiques dans les urines.

Concernant les conjugués glutathion, une remarque peut être faite sur le rôle du clivage par rétro-Michael dans la formation des métabolites urinaires du HNE. Une étude sur des fractions cytosoliques de rein et de foie de rat, a montré que la déconjugaison du HNE-GSH est possible (Alary et al., 2003b). Ces données permettent de suggérer qu'*in vivo*, après formation du HNE-GSH, celui-ci pourrait être transporté dans l'organisme avant d'être déconjugué, le HNE pouvant ainsi avoir des effets délétères à distance de son lieu de production. Cependant, il est à noter que cette réaction doit se réaliser dans une faible mesure dans des conditions physiologiques.

En conclusion, deux voies majeures sont impliquées dans la biotransformation du HNE *in vivo* après son administration en intraveineuse : la réduction ou l'oxydation du groupement aldéhyde, et la conjugaison du HNE au glutathion menant à la formation de conjugués mercapturiques excrétés dans l'urine. Après isolement par HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) et identification par

spectrométrie de masse, les métabolites suivants ont été répertoriés : acide mercapturique du HNE, acide mercapturique du 1,4-dihydroxynonène, acide mercapturique du 4-hydroxynonénoïque ainsi que sa lactone.

Concernant le métabolisme du HNE absorbé par voie orale, un article original est présenté dans la partie *« Etudes et résultats* » de ce manuscrit.

II. Le cancer colorectal

1. Anatomie, histologie et fonction du côlon

a. Anatomie

Le côlon et le rectum constituent la partie inférieure du tractus digestif, reliant l'intestin grêle à l'anus. Ils constituent le gros intestin, mesurant environ 1,50m et permettant la formation de la matière fécale. Le côlon se divise en 4 segments :

- Le côlon droit ou côlon ascendant
- Le côlon transverse
- Le côlon gauche
- Le côlon sigmoïde

Bien que des lésions cancéreuses puissent apparaître sur toutes les portions du côlon, dans plus de la moitié des cas, le cancer se développe au niveau du côlon sigmoïde.

Le rectum mesurant entre 15 et 18cm de long est tapissé sur toute sa surface interne de plusieurs replis horizontaux puis verticaux au niveau de la jonction avec le canal anal (INCa, 2016).

b. Histologie

Le côlon et le rectum, tout comme les autres organes du tube digestif, sont constitués de 4 tuniques (**Figure 10**) :

- La muqueuse est la couche la plus interne. Elle est constituée d'un épithélium de revêtement qui présente des invaginations appelées glandes (ou cryptes) de Lieberkühn ainsi que d'un tissu conjonctif sous-jacent, le chorion. Les glandes de Lieberkühn contiennent plusieurs types cellulaires (Humphries and Wright, 2008) :
  - Les cellules caliciformes, secrétant le mucus intestinal
  - Les cellules absorbantes ou colonocytes, absorbant l'eau, les électrolytes et les nutriments non absorbés par l'intestin grêle
  - Les cellules entéro-endocrines, secrétant des hormones
  - Les cellules souches, au nombre de 5 à 6 par cryptes, sont localisées dans le fond des glandes et permettent le renouvellement cellulaire (Baker et al., 2014)
- La sous-muqueuse, constituée d'un tissu conjonctif dense et abritant un important réseau vasculaire et lymphatique, ainsi que des fibroblastes et des mastocytes.
- La musculeuse, constituée de 2 couches de tissu musculaire lisse, assurant les mouvements permettant l'excrétion des matières fécales
- La séreuse est la couche la plus externe. Elle est composée d'un tissu conjonctif, tapissé par un épithélium simple.

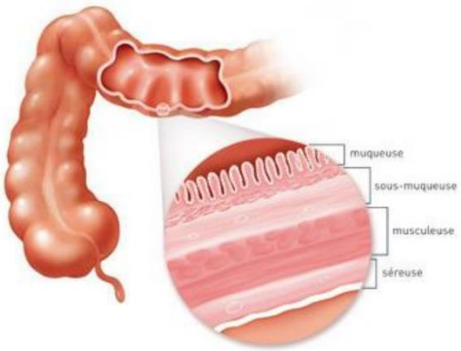


Figure 10 : *Les quatre tuniques de la paroi du côlon (muqueuse, sous-muqueuse, musculeuse et séreuse) (INCa)*

L'homéostasie de l'épithélium du côlon est basée sur le renouvellement rapide et constant de la monocouche épithéliale. Les cellules souches se divisent au fond de la crypte puis se différencient en remontant le long de la glande jusqu'à être exfoliées après mort cellulaire par apoptose. Ce processus de renouvellement prend entre 2 et 7 jours et est qualifié de 'turnover cellulaire' (Crosnier et al., 2006).

c. Fonction

Le côlon a pour principales fonctions la sécrétion de mucus et l'absorption d'eau et de nutriments. De plus, cet organe est le siège d'une activité microbienne permettant notamment la synthèse de la vitamine K et de l'acide folique. Le rectum a ensuite pour fonction le stockage de la matière fécale avant l'expulsion par l'anus.

Il est important de noter que les cellules de l'épithélium colique participent à la fonction d'absorption tout en jouant un rôle de barrière protectrice envers les pathogènes de la lumière intestinale (Guzman et al., 2013). Ce rôle de barrière est assuré par la forte interaction qui se met en place entre les cellules épithéliales grâce à plusieurs complexes de jonctions intercellulaires : les jonctions serrées, les jonctions intermédiaires, les desmosomes et les jonctions communicantes. Ce sont les jonctions serrées qui assurent le bon fonctionnement de la fonction filtre sélectif de l'épithélium. Elles sont constituées de protéines transmembranaires, permettant la fixation de protéines intracellulaires, ces dernières assurant la liaison avec les protéines du cytosquelette.

2. Epidémiologie du cancer colorectal

Avec 43 068 nouveaux cas diagnostiqués en France en 2015, le cancer colorectal est le troisième cancer le plus fréquemment diagnostiqué. C'est donc un problème de santé publique majeur. Il représente environ 10% des cancers tous sexes confondus. En termes d'incidence, il se situe au deuxième rang chez la femme après le cancer du sein. Chez l'homme, il se situe en troisième position, après la prostate et le poumon. En termes de mortalité, il se situe au deuxième rang des décès par cancer, derrière le cancer du poumon, tous sexes confondus (17 833 décès estimés en 2015 par cancer colorectal). La survie nette est de 63% à 5 ans, 52% à 10 ans. La survie à 5 ans diminue avec l'âge et le taux de survie dépend du stade de dépistage (INCa, 2016; NCI, 2015).

Dans le monde, 1,36 millions de cas de cancer colorectal ont été diagnostiqués en 2012 dont près de la moitié s'est révélée mortelle. C'est le troisième cancer le plus fréquent chez l'homme et le deuxième chez la femme. Plus de la moitié des cas survient dans les régions du monde les plus développées et on observe une variation d'un facteur 10 sur l'incidence entre les pays les plus touchés (Australie et Nouvelle-Zélande) et les régions les moins touchées (Afrique de l'Ouest) (IARC, 2012a) (**Figure 11**).

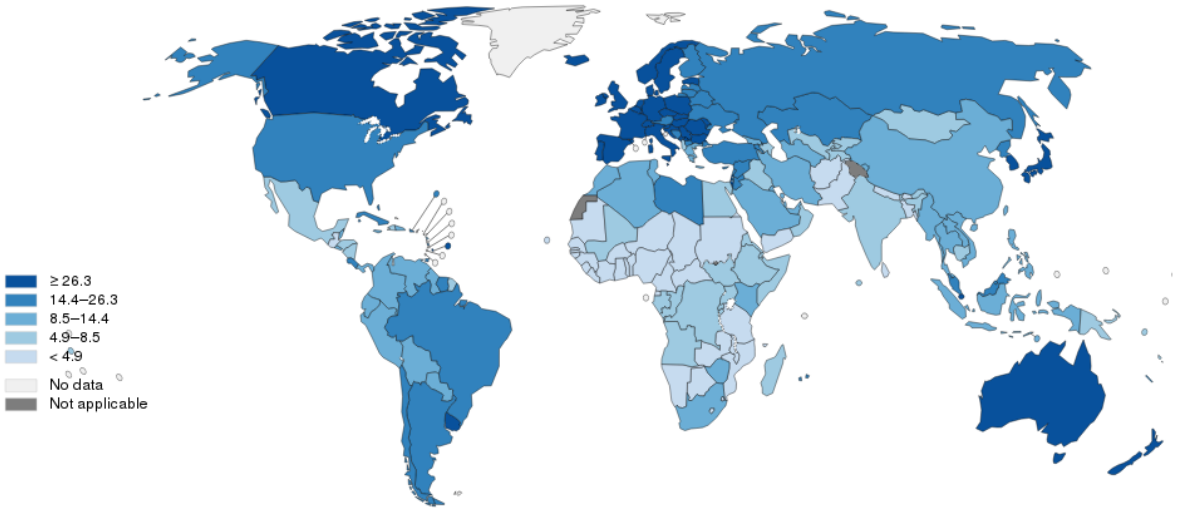


Figure 11 : *Incidence du cancer colorectal dans le monde. Taux estimé standardisé sur l'âge pour 100 000 habitants (IARC, 2012b)*

3. Symptômes, dépistage et traitement

Les symptômes du cancer colorectal dépendent de la localisation et de la présence éventuelle de métastases. Les symptômes les plus répandus sont la présence de sang dans les selles, une constipation importante, une diminution de la taille des selles, une perte d'appétit et de poids (Adelstein et al., 2011; Astin et al., 2011).

Le diagnostic le plus commun consiste à réaliser un prélèvement de côlon à l'occasion d'une sigmoïdoscopie (technique d'observation de l'anus, du rectum et des parties basses du côlon) ou d'une coloscopie (technique d'observation du côlon-rectum et de l'anus). Ces techniques médicales permettent, non seulement l'observation mais également le prélèvement de tissu suspecté à risque dans le but d'effectuer des analyses complémentaires (Cunningham et al., 2010; NCI, 2015).

En France le dépistage organisé se fait par test immunologique permettant la détection de sang dans les selles. Ce dépistage est proposé de manière systématique tous les 2 ans, à toutes personnes entre 50 et 74 ans, ne présentant pas de symptômes, ni d'antécédent personnel ou familial. En cas de test positif, une coloscopie constitue alors l'examen de référence.

À des stades précoces, le cancer peut être traité par ablation de la lésion lors de la coloscopie, alors qu'à des stades avancés, la chimiothérapie est préférée. Les traitements les plus utilisés étant les suivants : capecitabine, fluorouracil, irinotecan, oxaliplatine (NCI, 2015)

4. Histopathologie du cancer colorectal et séquence de cancérogénèse

Toute perturbation de l'équilibre entre prolifération et différenciation cellulaire au sein de l'épithélium colique peut entraîner la mise en place de lésions cancéreuses. En effet, la présence d'une dysplasie, c'est-à-dire d'accumulation d'anomalies dans la régulation de la différenciation, de la prolifération et/ou de l'apoptose des cellules épithéliales, peut aboutir à un cancer colorectal. Du tissu sain au carcinome, différents stades se distinguent (**Figure 12**) :

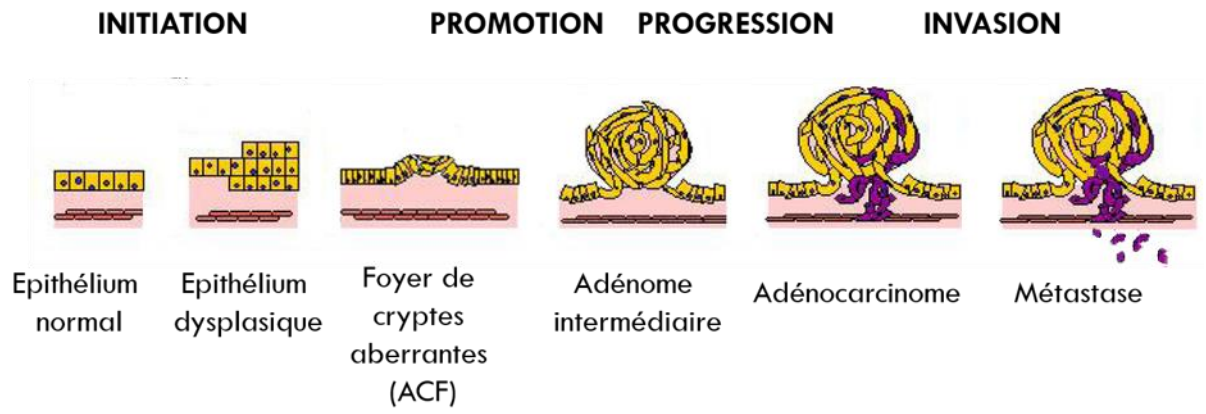


Figure 12 : *Séquence de la cancérogénèse colorectale – épithélium normal, initiation, promotion, progression, invasion (adapté de (Zarate et al., 2012))*

✓ *Lésion prénéoplasique*

La lésion prénéoplasique est considérée comme la première anomalie décelable. Plusieurs types de lésions sont aujourd'hui décrits, les plus souvent retrouvés étant les foyers de cryptes aberrantes (ACF - Aberrant Crypt Foci - ou micro-adénome) (Pretlow et al., 1991) et les foyers deplétés en mucine (MDF – Mucin Depleted Foci) (Femia et al., 2004). Le changement d'état entre crypte normale et crypte aberrante est appelé « **initiation** ».

✓ *Adénome*

L'adénome est une lésion bénigne, précancéreuse, pouvant engendrer un carcinome. La durée moyenne de transition entre un adénome et une lésion cancéreuse est d'environ 10 ans et concerne 5% des adénomes (Stryker et al., 1987). Deux types d'adénomes sont décrits (Torlakovic et al., 2003) :

- L'adénome plan ou non polypoïde dont la taille est de l'ordre du centimètre. Cette lésion érythémateuse et tubuleuse se localise entre le côlon proximal et distal, majoritairement dans le côlon transverse.
- L'adénome polypoïde ou polype qui mesure entre 2 et plus de 60mm et qui se retrouve dans le rectum et le côlon sigmoïde.

Le changement d'état entre micro-adénome et adénome est appelé « **promotion** ».

✓ *Adénocarcinome*

L'adénocarcinome est une tumeur maligne qui constitue la majorité des cancers colorectaux. L'adénocarcinome se développe d'abord en superficie, au niveau de l'épithélium, il est dit *in situ*. Puis la lésion évolue vers les tuniques internes : dans la muqueuse, puis dans la musculaire muqueuse (adénocarcinome infiltrant). Le carcinome peut ensuite progresser dans la paroi colique jusque dans la séreuse.

Le changement d'état entre adénome et adénocarcinome est appelé « **progression** ».

✓ *Métastases*

Lorsque les cellules tumorales sécrètent des enzymes digérant les membranes (métalloprotéases matricielles), les tissus adjacents sont touchés. La dissémination des cellules tumorales par les systèmes sanguin et lymphatique permet alors la formation de métastases dans des tissus à distance de la tumeur d'origine.

Le changement d'état entre adénocarcinome et apparition de métastases est appelé « **invasion** ».

5. Les altérations génétiques majeures du cancer colorectal et les modèles génétiques

De nombreuses altérations génétiques ou épigénétiques surviennent dans les tissus en voie de cancérisation, entraînant une forte instabilité génomique, ce qui contribue à l'accumulation de défauts moléculaires de 2 types : les modifications qui entraînent de nouvelles fonctions oncogéniques ou augmentent leurs effets et celles qui mènent à la perte de fonction des gènes suppresseurs de tumeur (Fearon, 2011). Dans un article de 2002, Grady et Markowitz estiment que les adénomes colorectaux contiennent approximativement 11 000 altérations génomiques (Grady and Markowitz, 2002).

Même si tous les cancers colorectaux (CCR) ont pour cause des altérations génétiques, celles-ci peuvent avoir 2 origines : héréditaire ou sporadique, ce qui définit donc deux formes de CCR. 5 à 10% des cancers colorectaux sont des formes génétiques, héréditaires, dues à des mutations germinales (mutation sur l'ADN d'un gamète), alors que la majorité des cancers colorectaux sont dits sporadiques, dus à des mutations somatiques spontanées (dans des cellules qui ne sont pas impliquées dans la reproduction) (AICR/WCRF, 2007).

Les mécanismes génétiques et moléculaires expliquant la progression entre tissu sain et carcinome ont été modélisés pour la première fois par Fearon et Vogelstein en 1990 (Fearon and Vogelstein, 1990), avant une actualisation de ce modèle en 2011 (Fearon, 2011). Cet article de Fearon décrit les 3 modèles moléculaires de la cancérogénèse qui ont été mis en évidence et les altérations génétiques héritées ou somatiques qui y sont associées. Même si l'ordre d'apparition de ces défauts génétiques n'est pas clairement établi, les mutations décrites montrent une forte association avec des stades précis de la cancérogénèse. D'autre part, même si les CCR présentent souvent plusieurs des mutations citées, seulement quelques cas les cumulent toutes.

a. Les évènements génétiques initiateurs

i. Inactivation d'APC – voie de l'instabilité chromosomique

Le gène *APC* (Adenomatous Polyposis Coli) est retrouvé muté dans 70 à 80% de toutes les tumeurs colorectales et est aujourd'hui considéré comme un évènement précoce du processus de cancérogénèse (Heinen, 2010). La mutation initiatrice du gène *APC* contribue à la perte du contrôle de la croissance cellulaire (Jasperson et al., 2010) et peut avoir une origine héréditaire ou spontanée.

Dans le cas de la polypose adénomateuse familiale (PAF), maladie génétique autosomique dominante, la mutation du gène *APC* est retrouvée chez 100% des patients. Cette maladie héréditaire, qui représente 0,5 à 1% des CRC, se caractérise par un nombre très élevé d'adénomes (100 à 1000) dans le côlon et le rectum qui apparaissent généralement entre 20 et 30 ans. Le seul traitement consiste en une colectomie totale préventive. Il existe également une forme atténuée de la maladie (environ 10% des cas), se caractérisant par l'apparition tardive du cancer, accompagné d'un nombre de polypes inférieur à 100. C'est vraisemblablement la position de la mutation sur le gène *APC* qui détermine la sévérité de la pathologie (Heinen, 2010).

Lorsque l'évènement initiateur est l'inactivation du gène *APC*, la voie impliquée dans la cancérogénèse est celle de l'instabilité chromosomique (CIN, Chromosome INstability).

ii. Inactivation des gènes MMR – voie de l'instabilité microsatellitaire

Le deuxième type d'évènement initiateur décrit par Fearon est l'inactivation des gènes *MMR* (MisMatch Repair system). Ces gènes étant impliqués dans le maintien de la stabilité génétique, cette voie de cancérogénèse est appelée voie de l'instabilité microsatellitaire (MSI, Microsatellite Instability). Deux mécanismes sont aujourd'hui décrits pour l'inactivation des gènes *MMR* : soit par mutation, soit par modification épigénétique de leurs promoteurs.

✓ *Inactivation par mutation - Forme familiale - (syndrome de Lynch)*

La mutation des gènes *MMR* est, dans la grande très grande majorité des cas, germinale. Cette mutation caractérise le syndrome de Lynch. Cette pathologie est la forme génétique la plus fréquente de CRC (2 à 4%) (Hampel et al., 2008; Heinen, 2010). Elle se caractérise par l'apparition de tumeurs dans le côlon proximal mais aussi dans d'autres organes (intestin grêle, ovaire, estomac, endomètre, voies urinaires et biliaires).

✓ *Inactivation par hyperméthylation du promoteur (CIMP) - Forme sporadique*

L'inactivation des gènes *MMR* peut également avoir pour cause des modifications épigénétiques. Ici, l'inactivation est due à l'hyperméthylation de leur promoteur au niveau de régions riches en dinucléotides cytosine/guanine (appelés ilots CpG d'où la dénomination de cette voie : CIMP pour CpG island methylator phenotype). Ce mécanisme d'inactivation des gènes MMR est retrouvé majoritairement dans des formes sporadiques de CCR et présente des particularités histopathologiques. En effet, les tumeurs se développant à partir de cet évènement initiateur ont pour origine des adénomes festonnés sessiles. Les tumeurs se développant *via* la voie des CIMP représentent 10 à 12% des cancers sporadiques suivant la voie des MSI et auraient comme origine majoritaire l'inactivation du gène *MLH1* (Issa et al., 2005). La non-fonctionnalité de ce gène favoriserait la formation du cancer en augmentant la prolifération cellulaire et en inhibant l'apoptose (Fearon, 2011).

iii. Autres voies initiatrices

D'autres mutations initiatrices, plus rares, sont également rapportées par certains auteurs.

✓ *Mutation activatrice de K-ras*

Les protéines Ras sont de petites GTPases impliquées dans de nombreuses voies de signalisation de récepteur de type tyrosine kinase (Karnoub and Weinberg, 2008). Les mutations de *K-ras* aboutissent à l'activation constitutive de ces voies de signalisation, favorisant la croissance, la survie, la progression tumorale, l'angiogenèse et la formation de métastases (Downward, 2003). Chez l'homme, la mutation de *K-ras* est retrouvée dans la majorité des ACF hyperplasiques (Alrawi et al., 2006) et il est aujourd'hui admis que ce gène est muté de manière précoce dans la séquence de la cancérogénèse. Cependant, le rôle potentiellement initiateur de la mutation de cet oncogène est encore aujourd'hui controversé. D'après deux études du début des années 2000 : l'une utilisant un modèle de souris transgénique portant une mutation *K-ras* humaine (Janssen et al., 2002), l'autre recensant les mutations dans des tissus de côlon à différents stades de la cancérogénèse (Takayama et al., 2001), la mutation de *K-ras* pourrait constituer un évènement initiateur de la cancérogénèse colorectale.

✓ *Polyposes héréditaires très rares*

Il existe des formes très rares de polypose héréditaire qui sont associées à un risque augmenté de CCR et qui ne présentent aucune des mutations initiatrices mentionnées précédemment On peut notamment citer :

- La polypose juvénile, qui se caractérise par la formation de polypes dans le côlon et le rectum avant l'âge de 10 ans. Cette pathologie est liée à des mutations sur les gènes SMAD4, PTEN et BMPR1A
- Le syndrome de Peutz-Jegher qui se caractérise par la formation de polypes dans l'estomac et l'intestin grêle, avant d'atteindre le côlon. Cette pathologie est liée à des mutations sur le gène STK11 (Sérine/Thréonine kinase 11) (Fearnhead et al., 2002)
- Le syndrome de Cowden's, qui se caractérise par le développement de polypes multiples dans tout le tube digestif et particulièrement dans le côlon et qui est du à la mutation du gène PTEN (Jelsig et al., 2014)

b. Évènements génétiques impliqués dans la promotion et la progression

Après les mutations initiatrices, la séquence de cancérogénèse continue d'être ponctuée de nouvelles mutations. Nous développerons ici les phénomènes impliqués dans les voies de l'instabilité chromosomique et microsatellitaire, ces 2 voies étant largement majoritaires dans le développement des adénocarcinomes.

i. Rôle de l'instabilité génomique

Certaines altérations génétiques et épigénétiques, en plus de leurs effets sur la biologie des cellules, peuvent avoir pour résultat la perte de la stabilité génomique, qui correspond à l'augmentation de la fréquence des mutations dans le génome. Cette perte de stabilité joue un rôle important dans la progression de la cancérogénèse puisqu'elle contribue à l'accumulation de mutations dans des gènes suppresseurs de tumeurs ou dans des oncogènes. Du point de vue séquentiel, la perte de la stabilité génomique, qu'elle soit qualifiée d'instabilité chromosomique (CIN) ou d'instabilité microsatellitaire (MSI) semble se déclencher après la formation de l'adénome mais avant la progression vers la malignité franche (Grady and Markowitz, 2002).

ii. Mutations dans la voie de l'instabilité chromosomique

La voie de l'instabilité chromosomique est à l'origine de la grande majorité des cancers sporadiques et se retrouve dans tous les cas de polypose adénomateuse familiale (Fearon, 2011).

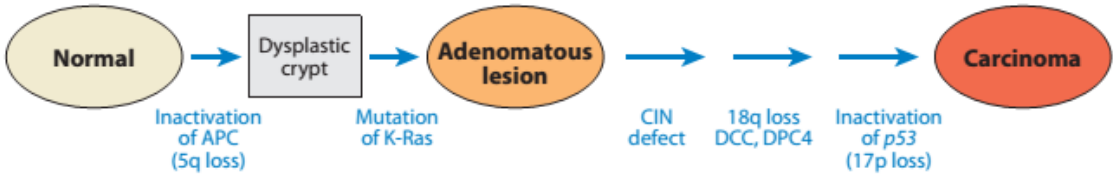


Figure 13 : *Voie de l'instabilité chromosomique (d'après (Fearon, 2011))*

La **Figure 13** montre qu'après l'initiation de la cancérogénèse par l'inactivation du gène *APC*, la mutation de l'oncogène *K-ras* semble responsable de la promotion de la dysplasie en microadénome. Concernant la progression de l'adénome vers le cancer, l'instabilité chromosomique fait partie des premiers évènements décrits, suivie de la délétion du gène *DCC* (Deleted in Colorectal Carcinogenesis). Ce gène, retrouvé délété dans plus de 70% des carcinomes, code pour un récepteur trans-membranaire dont le principal ligand serait la netrine-1. En absence de son ligand, DCC induirait l'apoptose, alors qu'en sa présence, la cellule se dirigerait vers la survie. La perte de l'hétérozygotie de ce gène dans les cas de CCR entraînerait l'émission dérégulée de signaux entraînant la croissance cellulaire (Arakawa, 2004; Mehlen and Fearon, 2004). La perte du bras long du chromosome 18, notamment porteur du gène suppresseur de tumeurs *SMAD4*, codant pour un facteur de transcription impliqués comme effecteurs dans la voie de signalisation du TGFβ (connu pour être un inhibiteur de la prolifération des cellules épithéliales dans le tractus gastro-intestinal) est également un évènement important de la progression tumorale. Enfin, la mutation du gène *TP57* entraîne la perte de la protéine p53 alors qu'elle est un élément central de la régulation de la division cellulaire. Le gène codant pour p53 est muté dans 75% des tumeurs colorectales mais également dans 50% des cancers tous organes confondus (Vogelstein et al., 1988). Ce gène suppresseur de tumeurs présente donc un caractère pléiotropique.

iii. Mutations dans la voie de l'instabilité microsatellitaire

Dans cette voie, suite à l'initiation, les gènes mutés les plus précocement sont *K-Ras* (codant pour une petite protéine G) dans le syndrome de Lynch (HNPCC) et B-Raf (protéine activatrice des effecteurs de la voie des MAPK) dans le CIMP (**Figure 14**). Ces deux gènes sont des proto-oncogènes, impliqués dans

l'activation des voies de régulation de la croissance, la différenciation et la mort cellulaire par apoptose (Tibbles and Woodgett, 1999).

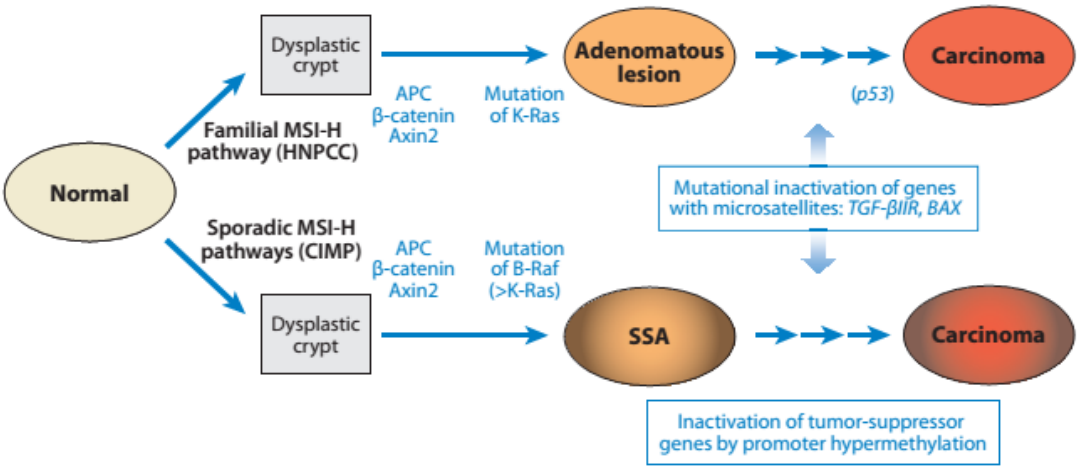


Figure 14 : *Voies de l'instabilité microsatellitaire (d'après (Fearon, 2011)*

De plus, l'inactivation des gènes *MMR,* qui est considérée dans cette voie comme l'évènement initiateur, joue également un rôle dans la progression du cancer. Les gènes *MMR* sont nécessaires au maintien de la stabilité génétique car ils codent pour des enzymes qui participent à la correction des mésappariements et des boucles d'insertion/délétion qui apparaissent durant la réplication de l'ADN. Le dysfonctionnement du système MMR entraîne l'instabilité microsatellitaire (MSI).

Les microsatellites sont des séquences répétées d'ADN, composées d'une à 6 paires de bases. Ceux-ci se localisant le plus souvent dans des régions non codantes de l'ADN, la MSI n'entraîne pas de conséquence. En revanche, le génome est affecté lorsque les microsatellites se localisent dans des régions codantes : les gènes *TGFb* et *BAX* font partie des gènes impactés par l'instabilité microsatellitaire. La mutation de ces gènes, impliqués respectivement dans la prolifération cellulaire et l'apoptose, participe à la progression de la cancérogénèse dans cette voie (Imai and Yamamoto, 2008).

c. La mutation d'*APC*, un évènement génétique majeur dans la cancérogénèse colorectale

La mutation du gène *APC* est l'un des évènements le plus précoce de la cancérogénèse colorectale. Son inactivation est retrouvée dans 70 à 80% des cancers sporadiques et chez tous les patients atteint de polypose adénomateuse familiale. Plusieurs centaines de mutations du gène *APC* ont été recensées, la plupart menant à la synthèse d'une protéine tronquée non fonctionnelle, suite à des mutations affectant le cadre de lecture ou à des mutations non-sens (Béroud and Soussi, 1996).

Le gène *APC* est localisé sur le bras long du chromosome 5 et possède une fonction suppresseur de tumeur. Ce gène est exprimé constitutivement dans l'épithélium colique normal. Le produit de ce gène est la protéine APC localisée principalement dans le cytoplasme et qui possède de multiples fonctions. Cette protéine de 300kDa est composée de différents domaines (**Figure 15**). La partie N-terminale contient le domaine d'oligomérisation et des séquences répétées permettant l'association de la protéine avec le réseau d'actine (domaine d'Armadillo). La partie centrale de la protéine comporte les sites de de fixation et de liaison à la β-caténine, ainsi que les sites liaison à l'actine. La partie C-terminale contient un domaine de fixation aux microtubules ainsi que les sites de fixation aux protéines EB1 (end binding protein 1) et hDlg (human homologue of Drosophila *sises large*), ayant des fonctions suppresseurs de tumeurs (Narayan and Roy, 2003).

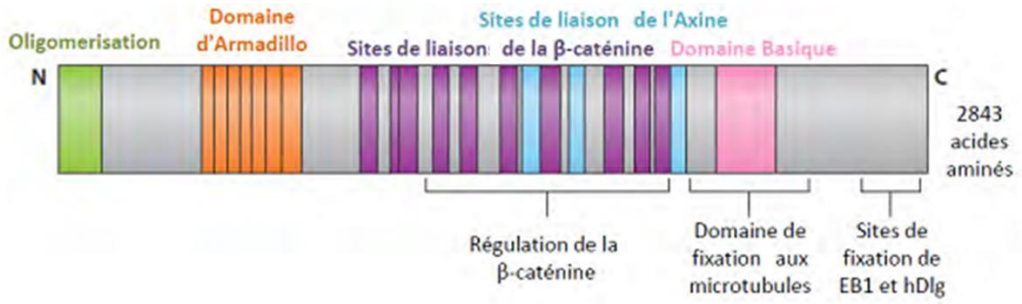


Figure 15 : *Structure de la protéine APC (d'après (Fearon, 2011))*

i. APC et régulation des niveaux de β-caténine dans la voie Wnt

La principale fonction de la protéine APC est la régulation du pool cellulaire de β-caténine, impliquée dans la voie de signalisation Wnt-1. Dans des conditions normales, cette voie joue un rôle important dans l'homéostasie colique en contrôlant le renouvellement de l'épithélium colique et l'architecture des cryptes (Burgess et al., 2011).

Dans une cellule normale, en l'absence de stimulation du récepteur Frizzled par son ligand Wnt (**Figure 16** A), APC prend part à un complexe protéique composé d'APC, de l'axine, de la GSK3β (glycogène synthase kinase-3 β) et de la CK1α (caséine kinase 1α). La formation de ce complexe va permettre la phosphorylation de la β-caténine par les 2 kinases, induisant son ubiquitination et entraînant sa dégradation par le protéasome. Lors de la stimulation du récepteur Frizzled par son ligand (**Figure 16** B), l'activation de la voie de signalisation entraîne l'inhibition de la formation du complexe APC/axine/GSK3β/CK1α aboutissant à l'augmentation du pool de β-caténine dans le cytoplasme. Cette accumulation de β-caténine cytoplasmique entraîne sa translocation dans le noyau, lui permettant d'activer la transcription de ses gènes cibles, en association avec d'autres facteurs de transcription. Parmi les gènes cibles de la β-caténine on retrouve des gènes impliqués dans la survie cellulaire, la prolifération ou la différenciation.

Ainsi, en cas de mutation du gène *APC,* l'absence de la protéine fonctionnelle entraîne une activation constitutive de la voie Wnt et de l'activité transcriptionelle de la β-caténine. Cette activation a pour conséquence l'expression constitutive d'oncogènes tels que c-Myc ou la cycline D1 impliqués dans la prolifération et le cycle cellulaire, favorisant la prolifération incontrôlée des cellules (Fearon, 2011; Narayan and Roy, 2003).

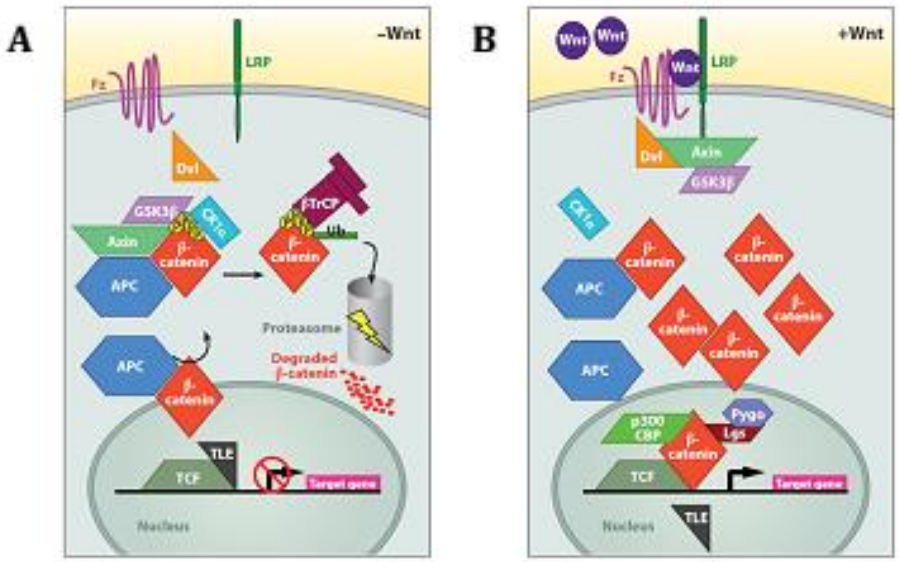


Figure 16 : *Implication de la protéine APC dans la régulation du pool de β-caténine lorsque la voie Wnt est inactive (**A**) ou active (**B**) d'après (Fearon, 2011)*

La voie de signalisation Wnt constitue donc un mécanisme normal par lequel la prolifération des cellules est régulée dans les cryptes coliques. Situées au fond des cryptes, les cellules souches présentent un fort taux de prolifération et produisent des progéniteurs prolifératifs (transit amplifying cells ou TA cells). Ces progéniteurs, au cours de leur remontée le long de la crypte, vont se différencier en cellules épithéliales de différents types : colonocyte, cellule endocrine ou cellule caliciforme. La voie de signalisation Wnt présente donc un gradient d'activation le long de la crypte : elle est activée dans les cellules souches et dans les progéniteurs prolifératifs pour permettre la prolifération cellulaire ; progressivement, cette voie de signalisation s'inactive, à mesure que les cellules se différencient et migrent vers le haut de la crypte (**Figure 17**). L'hyperactivité de la voie Wnt dans des cellules situées dans le haut des cryptes peut entraîner une croissance cellulaire incontrôlée et la formation de masses cellulaires sur l'épithélium colique présentant un risque cancéreux (Sadanandam et al., 2013).

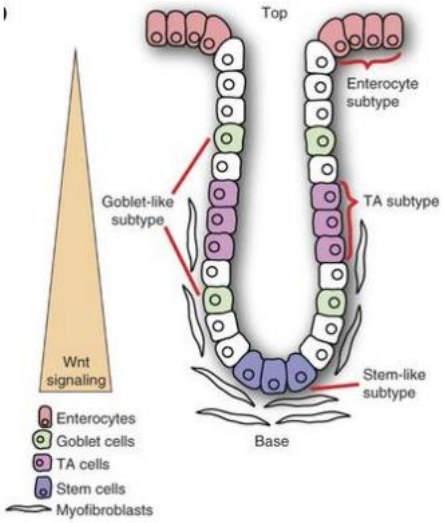


Figure 17 : *Signal Wnt le long de la crypte colique (d'après (Sadanandam et al., 2013)*

ii. APC et cytosquelette

Le renouvellement constant de l'épithélium colique sollicite des mécanismes de migration, de division et de différenciation cellulaire, dans lesquels le cytosquelette est impliqué. La protéine APC participe au maintien de l'intégrité du cytosquelette en régulant la stabilité des microtubules, la migration cellulaire, ainsi que l'orientation et la polarité des cellules. APC assure ces fonctions en interagissant directement avec les protéines régulatrices de l'actine et des microtubules telles que ASEF (APC stimulated exchange factor) et EB1 (Burgess et al., 2011). En cas de mutation du gène *APC* et de synthèse d'une protéine tronquée, ces fonctions sont perturbées, participant à l'instabilité chromosomique (Näthke, 2004).

iii. APC et ségrégation normale des chromosomes

Durant la mitose, la protéine APC se retrouve dans 2 localisations :

- Au niveau des kinétochores (complexe protéique s'assemblant près des centromères des chromosomes mitotiques), où elle régule l'attachement correct des chromosomes au fuseau mitotique et participe ainsi aux contrôles de la mitose (en particulier le SAC : Spindle Assembly Checkpoint).
- Au niveau des centrosomes (points de polymérisation des microtubules), qui permettent la formation de la plaque équatoriale et le déplacement polaire des chromosomes.

La mutation du gène *APC*, empêchant la bonne ségrégation des chromosomes (c'est-à-dire une instabilité chromosomique), peut donc entraîner une aneuploïdie, qui est l'une des caractéristiques des tumeurs avancées (Rusan and Peifer, 2008).

6. Les facteurs de risque du cancer colorectal

Parmi les facteurs de risque, l'environnement joue un rôle prépondérant dans la survenue de la plupart des cancers (Anand et al., 2008; Minamoto et al., 1999). Ici, l'environnement se définit au sens large par des facteurs environnementaux tels que la consommation de tabac et d'alcool, l'exposition au soleil, l'alimentation, l'exposition à des polluants, le stress, l'obésité et la sédentarité (Minamoto et al., 1999). De ce fait, le cancer, et en particulier le cancer colorectal, est une maladie pour laquelle des causes modifiables sont identifiées. Il s'agit donc d'une pathologie théoriquement évitable, notamment en adoptant un mode de vie sain (Boyle and Langman, 2000; Haggar and Boushey, 2009).

Parmi les preuves de ce risque environnemental pour le cancer colorectal, on peut citer des études faites dans les années 2000 sur des populations émigrantes d'une zone à faible incidence vers une zone à forte incidence. Ces études révèlent que, dès la première génération, l'incidence de CCR dans ces populations devient comparable à celle du pays hôte (O'Keefe et al., 2007; Sharma and O'Keefe, 2007). Ces études démontrent que les facteurs génétiques à eux seuls ne peuvent expliquer l'incidence du cancer colorectal et que les facteurs environnementaux ont une grande importance.

Une étude récente a montré que les facteurs extrinsèques contribuent à hauteur de 70 à 90% du risque de survenue d'un cancer au long de la vie, alors que les facteurs intrinsèques contribuent à hauteur de 10 à 30% (Wu et al., 2015). Ces auteurs définissent les facteurs intrinsèques comme résultant de mutations dues à des erreurs aléatoires dans la réplication de l'ADN. Les facteurs extrinsèques sont quant à eux définis comme les facteurs environnementaux qui affectent le taux de mutagénèse comme les radiations UV, et les produits cancérigènes par exemple.

A l'inverse, une étude controversée datant de 2015 a estimé par des méthodes statistiques que seulement 1/3 de la plupart des cas de cancer sont dus à des facteurs héréditaires et environnementaux, alors que les 2/3 restant sont dus à la « malchance », c'est-à-dire à des mutations qui surviennent pendant la réplication de l'ADN dans des cellules souches normales non cancéreuses

(Tomasetti and Vogelstein, 2015). De plus, ces auteurs estiment que le risque de survenue d'un cancer dans un tissu est corrélé au taux de division des cellules souches dans ce tissu. Concernant le CCR, il est intéressant de noter que cette étude le catégorise comme un cancer qui est plus susceptible de dépendre de prédispositions génétiques et de facteurs environnementaux plutôt que de la « malchance ».

Plusieurs facteurs environnementaux ont été identifiés comme des facteurs de risque du CCR : l'alimentation, la sédentarité et l'obésité, la consommation d'alcool (AICR/WCRF, 2011; Haggar and Boushey, 2009). Afin de clarifier le rôle de l'environnement et en particulier le rôle de l'alimentation sur le risque de cancer, le World Cancer Research Fund (WCRF) et l'American Institute for Cancer Research (AICR) ont publié en 2007 une synthèse systématique de tous les résultats publiés sur l'alimentation, l'activité physique et la prévention du cancer (AICR/WCRF, 2007). Les données sur le cancer colorectal ont été mises à jour en 2011 *via* la publication d'un CUP (Continuous Update Project) sur cet organe (AICR/WCRF, 2011). À partir de ces travaux, le rapport du WCRF propose 10 recommandations pour diminuer le risque de cancer :

- Soyez aussi mince que possible tout en évitant l'insuffisance pondérale.
- Pratiquez une activité physique au moins trente minutes par jour.
- Évitez les boissons sucrées. Limitez la consommation d'aliments à forte densité calorique (en particulier les produits à teneur élevée en sucres ajoutés, ou faibles en fibre, ou riches en matières grasses).
- Augmentez et variez la consommation de légumes, fruits, céréales complètes et légumes secs.
- **Limitez la consommation de viande rouge et évitez de consommer de la charcuterie.**
- En cas de consommation d'alcool, limitez-vous à une boisson par jour pour les femmes et à deux pour les hommes.
- Limitez la consommation d'aliments salés et de produits contenant du sel ajouté.
- Ne prenez pas de compléments alimentaires pour vous protéger du cancer.
- De préférence, les mères devraient exclusivement allaiter pendant les six premiers mois avant d'introduire d'autres liquides et aliments.
- Après le traitement d'un cancer, les patients devraient suivre l'ensemble de ces recommandations.

Concernant le risque de cancer colorectal, les experts ont classé les différents facteurs (majoritairement des aliments) en 4 catégories augmentant ou diminuant le risque, selon les preuves scientifiques existantes : convaincant, probable, limité et non concluant (**Tableau 3**).

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 3 : *Facteurs augmentant ou diminuant le risque de cancer colorectal (d'après (AICR/WCRF, 2011))*

Ce tableau montre que la viande rouge est classée comme un facteur qui augmente le risque de CCR de manière convaincante.

a. Cancer colorectal et viande rouge

i. Augmentation du risque et recommandations nutritionnelles

Selon le WCRF, la viande rouge est définie comme provenant du bœuf, du veau, du porc, du mouton, de l'agneau et des abats. Une méta-analyse récente (Chan et al., 2011) conclut à un risque relatif significatif de 1,17 [95% IC 1.05-1,31] pour 100g de viande rouge consommée par jour. Autrement dit, chaque tranche de 100g de viande rouge consommée par jour entraîne une augmentation du risque à hauteur de 17% (**Tableau 4**). Même si cette question ne sera pas détaillée dans cette thèse, les charcuteries sont également considérées comme un facteur de risque du CCR, avec un risque relatif de 1,18 [95% IC 1,10-1,28] pour chaque tranche de 50g consommée par jour. Le terme charcuterie regroupe toutes les viandes qui ont subi, dans une visée de conservation, un traitement par fumage, salaison ou agent préservateur.

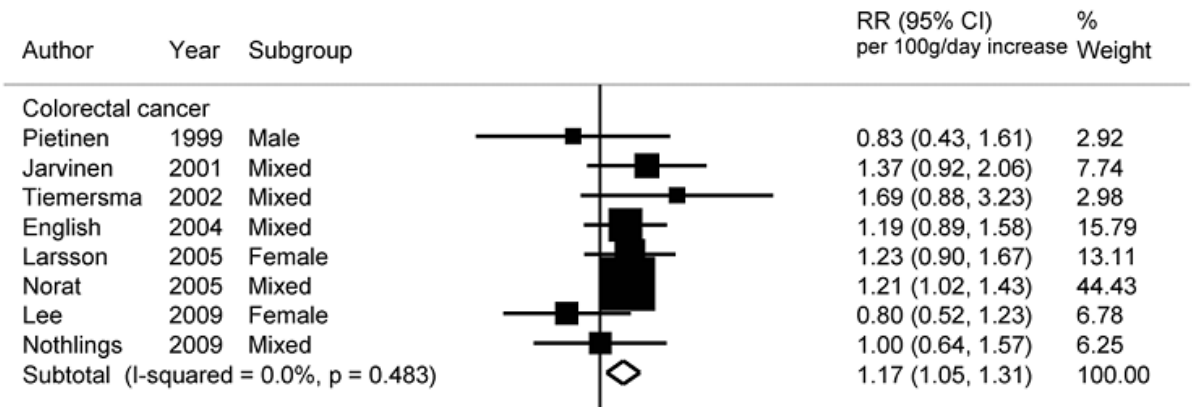


Tableau 4 : *Méta-analyse de la dose-réponse de la consommation de viande rouge et du risque de cancer colorectal (d'après (Chan et al., 2011)*

De plus, dans une étude anglaise de 2011, les auteurs estiment que 21,1% des cas de cancers colorectaux pourraient être dus à la consommation de viande rouge et de charcuteries (Parkin et al., 2011).

Ainsi, le WCRF recommande de limiter la consommation de viande rouge à moins de 500g par semaine au niveau individuel et à moins de 300g par semaine au niveau de la population et recommande d'éviter toute consommation de charcuterie.

Enfin, il est à noter qu'en 2015, l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), *via* le CIRC (Centre International de Recherche sur le Cancer) a classé la consommation de viande rouge comme probablement cancérigène pour l'homme (groupe 2A) et la consommation de charcuterie comme cancérigène pour l'homme (groupe 1), en mettant en évidence le côlon-rectum comme organe le plus exposé.

ii. Habitudes de consommation et intérêt nutritionnel

La consommation moyenne de viande rouge en France (hors volaille, gibier et abats) se situe autour de 50 grammes par jour par personne, tous sexes confondus. Cependant, près d'un quart de la population consommatrice de viande absorbe plus de 500 grammes de viande rouge par semaine, se situant donc au-delà des recommandations du WCRF (PNNS, 2009). On peut également noter que la portion de la population consommatrice varie en fonction des pays entre 5 et 100% et la moyenne globale de consommation quotidienne, parmi les consommateurs, est d'environ 50-100g par jour.

La viande rouge présente de multiples intérêts nutritionnels *via* ses apports en lipides, protéines, fer héminique et micronutriments. Les lipides contenus dans la viande rouge sont à 50% des acides gras insaturés (principalement mono-insaturés). La consommation modérée de viande maigre permet de diminuer le taux de cholestérol total dans le sang, le cholestérol LDL et les triglycérides (McAfee et al., 2010). La viande rouge est également une source en protéines (environ 20g pour 100g dans la viande de bœuf) qui contribue à couvrir les besoins azotés de l'organisme d'un point de vue quantitatif et qualitatif (Bourre, 2011).

D'autre part, la viande rouge est un aliment riche en fer héminique. Le fer, en complexe avec un anneau porphyrine forme l'hème (**Figure 18** A), qui est inclus dans les hémoprotéines comme l'hémoglobine présente dans les hématies et la myoglobine (**Figure 18** B), présente dans les muscles. Ces hémoprotéines sont nécessaires au stockage et au transport de l'oxygène. Le fer sous forme héminique présente un grand intérêt nutritionnel puisqu'il offre une bien meilleure biodisponibilité que le fer minéral contenu dans les végétaux (30% vs 2%) (Bourre, 2011). La viande rouge est également une source majeure en micronutriments tels que la vitamine B12, le zinc, ou le sélénium (Biesalski, 2005).

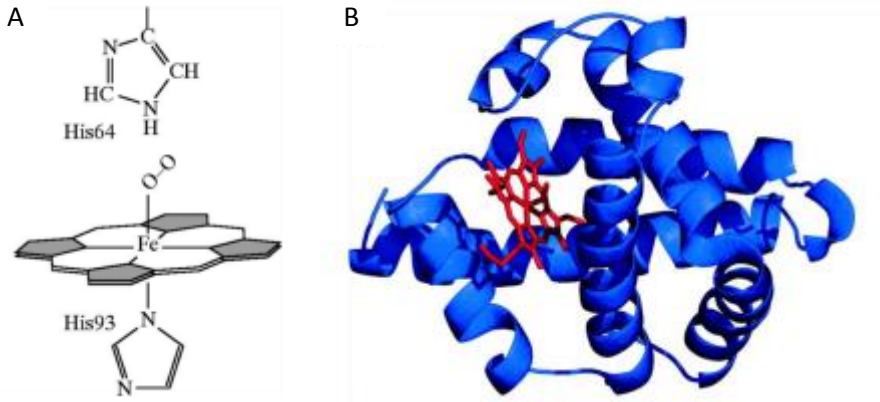


Figure 18 : *Structure du résidu hème de la myoglobine (A) et structure de la myoglobine (B : en rouge l'hème, en bleu la myoglobine) (adapté de (Ordway and Garry, 2004))*

iii. Les hypothèses mécanistiques

L'association entre consommation de viande rouge et risque de cancer colorectal apparaît de plus en plus évidente grâce aux études épidémiologiques. Cependant, les mécanismes expliquant ce lien restent encore à éclaircir. Plusieurs hypothèses ont été testées, notamment la teneur de la viande en graisses, en protéines, en amines hétérocycliques ou en hydrocarbures aromatiques polycycliques (formés lors de la cuisson), en composés *N*-nitrosés, en acide N-glycolylneuraminique et en fer héminique. Cependant la viande étant une matrice complexe, il est envisageable que l'effet observé soit la somme des effets de plusieurs composants et non dû à un seul d'entre eux.

✓ *Graisses d'origine animale*

L'une des premières hypothèses avancées pour expliquer l'étiologie du CCR est la présence de graisses dans la viande rouge. Plusieurs études ont ainsi montré, sur différents modèles animaux, une augmentation du nombre de tumeurs suite à un régime riche en graisses (Corpet, 2011). Ces effets pourraient être liés à l'action délétère des acides biliaires, secrétés lors de l'ingestion de graisses, pour les solubiliser (Bruce, 1987; Corpet, 2011; Larsson and Wolk, 2006). D'autres auteurs avancent l'hypothèse de l'augmentation de l'obésité (reconnue comme facteur de risque convaincant par le WCRF), ayant pour conséquence une augmentation de la prolifération et une diminution de l'apoptose des cellules cancéreuses et ce, *via* l'insulino-résistance (Calle and Kaaks, 2004; Calle and Thun, 2004) et entrainant également un état d'inflammation à bas bruit. Cependant, la dernière méta-analyse, regroupant 6 études de cohorte, rapporte l'absence d'effet d'un régime riche en graisse sur le risque de CCR chez l'homme (Alexander et al., 2009). Ces résultats sont confirmés par deux études épidémiologiques plus récentes (Sun et al., 2012; Zhong et al., 2013).

✓ *Protéines*

Une autre hypothèse avancée implique les protéines qui, fermentées en amines, en phénols ou en sulfure d'hydrogène pourraient se révéler toxiques pour la muqueuse (Windey et al., 2012). Les

résultats des études menées chez l'animal sont controversés, certaines études montrant un effet protecteur, d'autre un effet promoteur dépendant de la quantité et de la qualité des protéines présentes dans le régime (McIntosh and Le Leu, 2001). De plus, dans la méta-analyse d'Alexander, le lien entre protéine et risque de CCR a également été étudié, montrant un risque relatif non significatif de 0,9 [IC95% 0,70-1,15] (Alexander et al., 2009).

- ✓ Composés formés lors de la cuisson : amines hétérocycliques (AHC) et hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)

La cuisson des viandes à haute température génère la production d'AHC et de HAP, qui sont des composés cancérigènes.

Les **AHC** sont produits suite à la réaction, à haute température, entre la créatine ou la créatinine, des acides aminés et des sucres provenant de la viande. Leur formation est dépendante de la surface de cuisson, du degré de brunissement et de la durée de la cuisson (Sinha et al., 1998; Skog et al., 1998). Le MeIQx et le PhiP sont les AHC les plus abondantes dans le bœuf grillé (Turesky, 2007).

Des études chez le rongeur et le singe ont montré le fort effet cancérigène des AHC, cependant, il est à noter que les doses utilisées dans ces études sont très nettement supérieures aux doses retrouvées dans la viande cuisinée.

Les études épidémiologiques sur l'association entre AHC et cancer colorectal montrent des résultats contradictoires (Abid et al., 2014; Cross et al., 2010; Ollberding et al., 2012; Zheng and Lee, 2009). De plus, on peut noter que le poulet grillé bien que contenant plus d'AHC que le bœuf n'est pas associé à l'augmentation du risque de cancer colorectal (Heddle et al., 2001; Larsson and Wolk, 2006; Norat et al., 2002), ceci pouvant s'expliquer par la nature différente des AHC présents dans les 2 types de viande.

Les **HAP** sont formés suite à la combustion incomplète des matières organiques contenues dans la viande, et notamment suite à la pyrolyse des lipides lors d'une cuisson en contact direct avec une flamme. Les principales sources d'exposition aux HAP pour l'homme sont le poisson et la viande grillés ou fumés, la viande cuite au barbecue et la fumée de cigarette (Phillips, 1999). Plusieurs HAP, dont le BaP, sont considérés comme mutagène et cancérigène chez l'animal, à des doses très élevées. Chez l'homme, il a été montré que le BaP pouvait former des adduits à l'ADN dans la muqueuse colique (Alexandrov et al., 1996). Les études épidémiologiques s'intéressant au lien entre BaP et CCR n'apportent pas de réponse claire (Abid et al., 2014; Tabatabaei et al., 2010). De plus, on peut noter que les céréales bien que source majeure d'HAP ne sont pas associées à l'augmentation du risque de cancer colorectal (Phillips, 1999; WCRF/AICR, 2010).

Enfin, il est à noter que les études épidémiologiques réalisées à ce jour sur les AHC et les HAP souffrent de l'absence de biomarqueurs d'exposition et sont donc réalisées à partir de questionnaires interrogeant sur les niveaux de cuisson généralement utilisés. Ainsi, en l'absence de méta-analyse, il est difficile de conclure sur l'implication de ces 2 composés dans l'augmentation du risque de CCR. Il est également intéressant de prendre en compte le polymorphisme génétique individuel des gènes impliqués dans la métabolisation de ces composés. En effet, il a déjà été constaté que des génotypes particuliers pouvaient être impliqués dans le risque de cancérogénèse colorectal associé à la viande cuite. Ces génotypes incluent des polymorphismes sur les gènes *NTA1* (N-acetyl transferase, une enzyme de phase II) et *CYP1 A2* (cytochrome p450, une enzyme de phase I) (Gilsing et al., 2012; Wang et al., 2012).

✓ *Composés N-nitrosés (NOCs)*

Des nitrites et des nitrates sont ajoutés dans les charcuteries afin d'assurer la sécurité sanitaire des produits ainsi que pour des raisons visuelles et gustatives (IFIP, 2010). L'homme est également exposé aux nitrates à travers le cycle entérosalivaire des nitrates et par la présence de bactéries buccales, porteuses de fonction nitrate réductase (Chenni et al., 2013). Le terme 'composés *N*-nitrosés' regroupe les nitrosothiols (RSNO), le fer nitrosylé FeNO et d'autres composés *N*-nitrosés. Ceux-ci se forment à bas pH (comme dans l'estomac) à partir de nitrites et de groupement thiols (Kuhnle et al., 2007). Ces composés *N*-nitrosés peuvent également servir de précurseur à la formation de FeNO et d'autres NOCs dans le tube digestif (Joosen et al., 2009). De plus, l'hème peut se retrouver nitrosylé et avoir des effets nitrosylants. Enfin, il est à noter que les industriels utilisent différents additifs permettant de limiter la formation de NOCs dans la charcuterie, comme l'acide ascorbique, l'ascorbate de sodium ou encore l'érythorbate.

Des études *in vivo* ont montré la présence de NOCs dans les fèces d'animaux ayant ingéré un régime riche en charcuterie. Dans ce contexte, le fer nitrosylé (FeNO) constitue 80 à 90% des NOCs totaux retrouvés dans les fèces (Haorah et al., 2001; Mirvish et al., 2003; Parnaud et al., 2000). Cette corrélation entre consommation de charcuterie et excrétion de NOCs dans les fèces a également été constatée chez l'Homme (Bingham et al., 2002; Joosen et al., 2009; Kuhnle and Bingham, 2007).

De nombreux NOCs, incluant les nitrosamines et les nitrosamides (issus de la réaction entre les nitrites ou les nitrates et des amines ou des amides), sont suggérés comme génotoxiques car pouvant causer des dommages à l'ADN (Bastide et al., 2011). Chez l'Homme, des études épidémiologiques mettent en avant un lien entre NOCs alimentaires et cancer du rectum, mais ne permettent pas d'établir un lien clair avec le cancer colorectal (Dellavalle et al., 2014; Loh et al., 2011; Miller et al., 2013; Zhu et al., 2013).

✓ *Acide N-glycolylneuramique (Neu5GC)*

Plusieurs études récentes ont montré la présence d'acide N-glycolylneuraminique (Neu5GC) dans des tissus malins. Or, ce composé, dérivé de l'acide sialique, présent à la surface des cellules de tous les mammifères, n'est pas présent chez l'homme. En effet, le gène codant l'enzyme responsable de sa formation est irréversiblement muté, depuis 2 à 3 millions d'années. L'apport en Neu5GC *via* l'ingestion de tissu mammifère (comme la viande rouge) est suspecté d'être la source de l'incorporation de Neu5GC dans les tissus humains. À la manière d'un xénobiotique, le Neu5GC incorporé provoque la génération d'anti-NGNA 'xénoauto-anticorps', causant une inflammation (appelée xenosialite) (Samraj et al., 2014, 2015). Des études chez la souris ont montré un lien entre la progression tumorale et l'ingestion de Neu5GC (Banda et al., 2012; Hedlund et al., 2008; Samraj et al., 2015).Cependant, ces résultats peuvent être mis en balance avec le fait que les fromages de brebis et de chèvre contiennent quasiment autant de Neu5GC que la viande bovine, mais ne sont pas associés à la cancérogénèse colorectale (Byres et al., 2008).

✓ *Fer héminique*

Comme évoqué plus haut au chapitre « *Habitudes de consommation et intérêt nutritionnel »* (p49), le fer héminique est un atome de fer Fe^{2+}, inclus dans un noyau porphyrine. Ce complexe est appelé hème. Initialement, le lien entre le fer héminique et la cancérogénèse colorectale a été fait suite au constat que l'association entre consommation de viande rouge et cancer colorectal ne se retrouve pas avec la viande blanche, celle-ci étant en moyenne 10 fois moins riche en fer héminique que la viande rouge.

Une méta-analyse regroupant des études de cohortes, réalisée par l'équipe PPCA en 2011 a montré une association positive entre consommation de fer héminique et risque de cancer du côlon (Bastide

et al., 2011). Ce résultat a été confirmé par une méta-analyse plus récente, qui établit le risque relatif entre les plus gros et les plus faibles consommateurs d'hème à 1,14 [IC 95% : 1.04-1,24] (Qiao and Feng, 2013). De même une étude prospective sur une cohorte de 100 000 femmes publiée récemment montre une association dose dépendante entre la consommation d'hème et le risque d'adénome ainsi qu'un effet protecteur de la consommation d'aliments riches en antioxydants (Bastide et al., 2016).

D'autre part, une étude expérimentale récente de l'équipe PPCA a permis de mettre en évidence que le fer héminique est le seul agent responsable de la promotion de la cancérogénèse colorectale chez le rat chimio-induit, en comparaison avec les AHC, les nitrites et les nitrates, donnés à doses nutritionnelles (Bastide et al., 2015).

Plusieurs mécanismes, sont aujourd'hui avancés pour expliquer l'effet de l'hème sur la cancérogénèse colorectale (**Figure 19**).

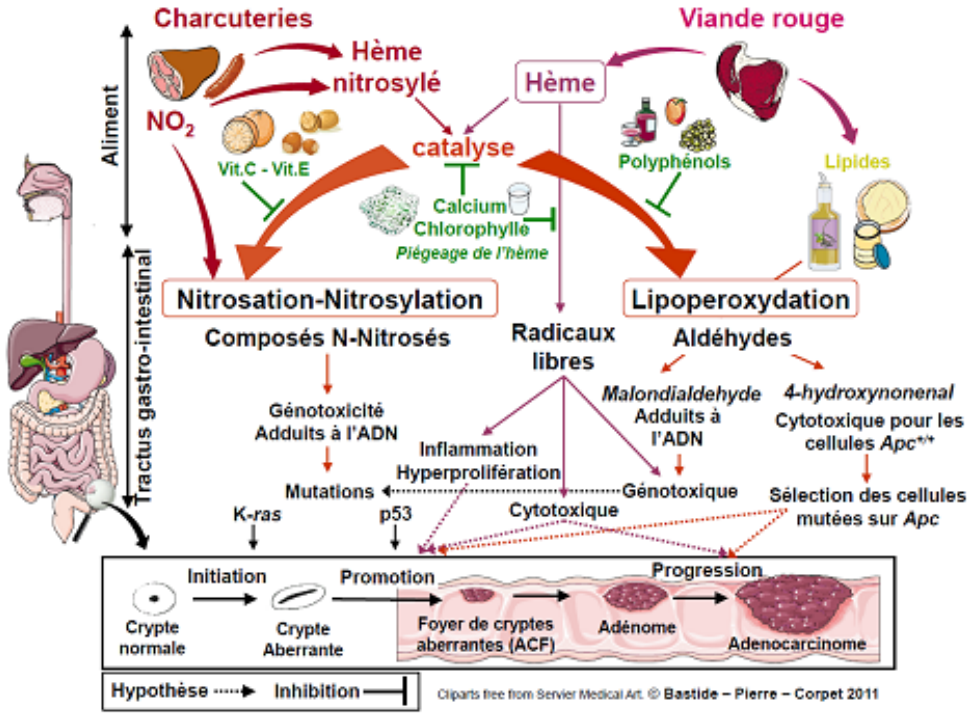


Figure 19 : *Mécanismes d'action pouvant expliquer l'effet promoteur du fer héminique (adapté de (Bastide et al., 2011))*

- Effet direct de l'hème

Des études réalisées *in vitro* montre que l'hème pourrait avoir des effets délétères directs sur les cellules coliques. Deux molécules purifiées permettent d'exposer des cellules *in vitro* ou des animaux à du fer héminique : l'hémoglobine, qui est constituée de 4 noyaux d'hème entourés de 4 molécules de globine et l'hémine, qui est constitué d'une molécule d'hème, stabilisée par un atome de chlore.

L'hème pourrait présenter des effets génotoxiques, comme le montrent plusieurs études réalisées après exposition à l'hémoglobine ou à l'hémine de cellules tumorales ou de colonocytes en culture primaire (Angeli et al., 2011; Glei et al., 2006). Des effets cytotoxiques ont également été observés *in vitro* sur des lignées tumorales humaines (Glei et al., 2006). Comme observé chez le rat, ces effets cytotoxiques pourraient contribuer à endommager la surface de l'épithélium colique et générer, en compensation, une hyper-prolifération cellulaire pouvant être interprétée comme un facteur de risque du cancer (IJssennagger et al., 2012a).

De plus, plusieurs articles évoquent le lien entre formation de radicaux libres et génotoxicité de l'hème. Glei *et al.* montrent notamment que l'exposition *in vitro* à l'hémoglobine entraîne la formation de radicaux libres (Glei et al., 2006). En 2010, Ishikawa propose quant à lui un mécanisme pouvant expliquer le lien entre hème et cancérogénèse impliquant des ROS (Ishikawa et al., 2010) (**Figure 20**) : l'hème absorbé par les cellules est dégradé par l'hème oxygénase-1 (HO-1), qui libère l'atome de fer sous forme Fe^{2+}, entraînant la libération massive de H_2O_2 (Noguchi et al., 1983) (cette réaction entraîne également la libération de monoxyde de carbone (CO) et de biliverdine). Ainsi, Ishikawa propose que H_2O_2 et Fe^{2+} s'engagent dans la réaction de Fenton, aboutissant à la production de ROS (dont OH°), elles-mêmes responsables de dommages à l'ADN, participant donc à l'initiation de la cancérogénèse. On peut noter qu'Ishikawa propose également que l'hème participe à la promotion de la cancérogénèse *via* la production H_2O_2 lors de sa dégradation : l'H_2O_2 provoquant hyperpolifération, inflammation et signaux anti-apoptotiques. Cependant, le rôle hyperprolifératreur de l' H_2O_2 est rejeté par Ijssennagger, qui avance préférentiellement la responsabilité d'un effet indirect de l'hème (IJssennagger et al., 2013).

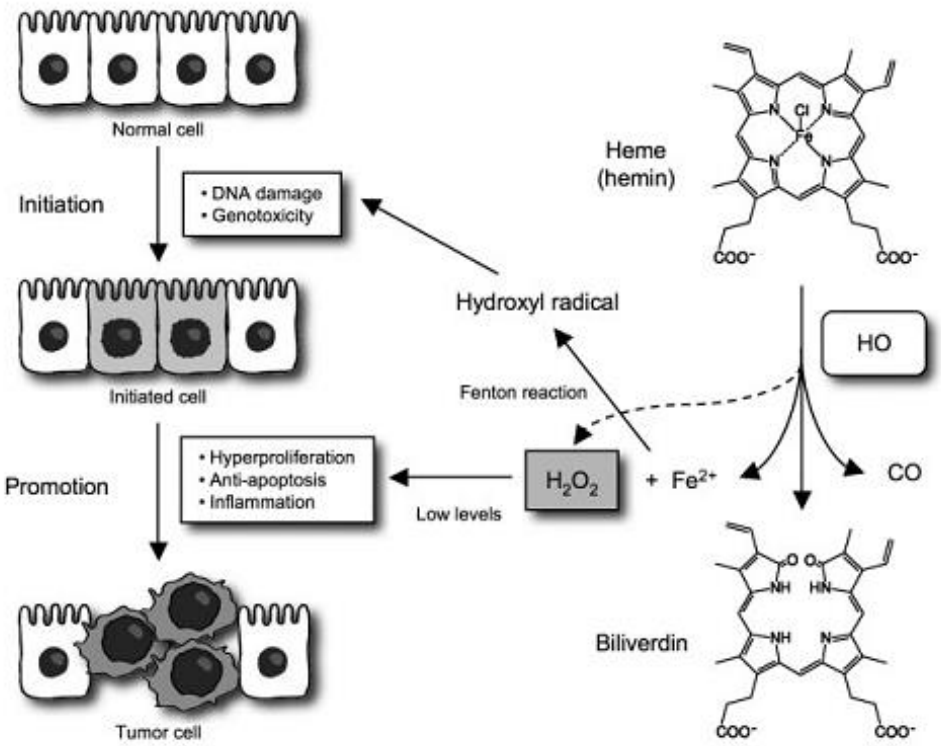


Figure 20 : *Mécanisme proposé de cancérogénèse induite par l'hème : effet sur l'initiation et la promotion (d'après (Ishikawa et al., 2010))*

- Effets indirects du fer héminique : catalyse de la lipoperoxydation et de la production de NOCs

Les effets indirects de l'hème sur la cancérogénèse colorectale impliquent son rôle en tant que catalyseur de la lipoperoxydation et de la *N*-nitrosation. Ces deux voies entraînent la formation de molécules cytotoxiques et génotoxiques. D'une manière générale, les effets catalytiques de l'hème peuvent être inhibés par le calcium ou la chlorophylle, par des mécanismes de piégeage (Pierre et al., 2003, 2008; Sesink et al., 2001; de Vogel et al., 2005).

- Catalyse de la lipoperoxydation

Présents en grande quantité dans les régimes occidentaux, les acides gras polyinsaturés (AGPI) sont des composés particulièrement sensibles à l'oxydation (Tappel, 2007). L'hème contenu dans la viande rouge peut catalyser la lipoperoxydation aussi bien dans le tractus digestif que dans l'aliment, au cours de sa fabrication ou de son stockage. L'hème peut intervenir à deux étapes distinctes et séquentielles de la lipoperoxydation : il peut favoriser la production de ROS initiateur, et/ou favoriser la formation d'aldéhydes durant la phase de propagation, en catalysant la conversion des hydroperoxydes.

Plusieurs équipes ont évalué la lipoperoxydation dans des viandes digérées ou non dans des systèmes *in vitro*. Les principaux résultats de ces expérimentations montrent que des aldéhydes comme le MDA et le HNE sont dosables dans la viande de bœuf, et que la simulation de digestion (jusqu'au niveau du côlon) a pour effet une augmentation du MDA et la diminution du HNE (Van Hecke et al., 2014).

Le MDA est connu pour induire des dommages à l'ADN *via* la formation d'adduits (Basu and Marnett, 1983; Niedernhofer et al., 2003) et le HNE, semble être le produit de lipoperoxydation le plus toxique *via* l'induction d'apoptose et de nécrose des cellules exposées (Awasthi et al., 2003).

Les effets potentiels du HNE sur les différentes étapes de la cancérogénèse ont été développé au chapitre *«HNE et cancer»* en p24. Plusieurs travaux de l'équipe PPCA ont mis en évidence une toxicité supérieure du HNE sur des cellules épithéliales normales de souris ($Apc^{+/+}$) que sur des cellules précancéreuses mutées pour *Apc* ($Apc^{Min/+}$) (Pierre et al., 2006). L'intérêt de l'utilisation de ce modèle cellulaire original est détaillé au chapitre *« Les méthodes et modèles utilisés pour les études de cancérogénèse »* (p57). Ce phénomène de sélection darwinienne des cellules précancéreuses au détriment des cellules saines pourrait être une clé dans l'explication de l'effet promoteur de l'hème. L'explication mécanistique de cette sélection pourrait résider en partie dans le fait que les cellules précancéreuses (mutées sur le gène *Apc*) présentent de meilleures capacités à métaboliser le HNE (Baradat et al., 2011), potentiellement grâce au fait que la voie Nrf2 est activée constitutivement dans ces cellules (pour des détails sur la voie Nrf2, voir le chapitre « *Signalisation* » en p26). De plus, il est intéressant de noter qu'il existe un lien entre APC et Nrf2, *via* la voie Wnt. En effet, la protéine APC est connue pour participer à la signalisation de la voie Wnt, mais il a été démontré récemment qu'il existe une connexion entre Wnt et Nrf2 (Rada et al., 2015). Dans cette étude réalisée sur des hépatocytes, les auteurs montrent que le complexe Axine1/Nrf2 est régulé par la voie Wnt-3A.

Plusieurs études montrent que la consommation d'hème sous forme de molécules purifiées (hémine et hémoglobine (Pierre et al., 2003) ou dans le cadre de la consommation de viande rouge (Pierre et al., 2004, 2006, 2008; Romeu et al., 2013) ou de charcuterie modèle (Pierre et al., 2010, 2013, Santarelli et al., 2010, 2013) entraîne l'augmentation de deux biomarqueurs de la lipoperoxydation : les TBARS (Thiobarbituric Reactive Substances) fécaux et le DHN-MA urinaire.

Le dosage des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique (TBARS) est un biomarqueur global mais non spécifique, couramment utilisé comme biomarqueur de lipoperoxydation et de stress oxydant en général (Meagher and FitzGerald, 2000). En effet, ce dosage révèle le MDA (qu'il soit libre ou lié aux molécules biologiques), les peroxydes lipidiques, les produits d'oxydation des acides gras et toutes substances pouvant réagir avec l'acide thiobarbiturique. Quant à lui, le DHN-MA urinaire est un biomarqueur très spécifique de l'exposition de l'organisme au HNE, aldéhyde lui-même issu de la lipoperoxydation des acides gras en n-6 uniquement. En effet, le DNH-MA est l'un des métabolites principaux du HNE, et reflète l'exposition au HNE présent dans l'aliment ou se formant au cours de la digestion (Guéraud et al., 2006, 2010).

- Catalyse de la formation de NOCs

Plusieurs études montrent que la consommation de viande rouge et de charcuterie entraîne une forte production d'ATNC fécaux (Apparent Total *N*-Nitroso Compounds, soit les NOCs totaux) (Bingham et al., 2002; Mirvish et al., 2003; Parnaud et al., 2000; Pierre et al., 2010, 2013).

Par ailleurs, des études chez des volontaires sains ont montré que le taux d'ATNC fécaux après un régime viande rouge est beaucoup plus élevé que suite à un régime pauvre en viande rouge ou ne contenant que de la viande blanche (Bingham et al., 1996, 2002; Hughes et al., 2001). D'après une étude de Cross, la production d'ATNC dans ces conditions est spécifiquement due au fer héminique (Cross et al., 2003). Si ce lien a été établi, le mécanisme par lequel le fer héminique catalyse la formation de NOCs n'est pas encore élucidé (Bastide et al., 2011). L'effet des NOCs sur la cancérogénèse colorectale a été détaillé au chapitre « *Composés N-nitrosés (NOCs)* » (p52).

b. Cancer colorectal et inflammation

i. Liens mécanistiques entre cancer colorectal et inflammation

Il existe une association entre maladies inflammatoires de l'intestin (maladie de Crohn et colite ulcéreuse) et risque accru de cancer colorectal (Triantafillidis et al., 2009). En effet, ces patients atteints de ces pathologies présentent environ 10 fois plus de risque de développer ce type de cancer (Itzkowitz and Yio, 2004; Terzić et al., 2010). Ce constat a conduit de nombreux auteurs à étudier le lien entre CCR et inflammation, qui est aujourd'hui reconnu.

On peut noter que l'inflammation peut être d'origine intrinsèque (mutations génétiques sous-jacentes), ou extrinsèque (infection chronique par exemple) liée à différents pathogènes. Dans le cas du CCR, il a par exemple été montré que de faibles doses d'aspirine, un anti-inflammatoire non stéroïdien, ont été efficaces pour réduire le risque de cancérogénèse (Beauchemin, 2011).

Les cellules inflammatoires produisent de nombreux médiateurs comme des radicaux libres, des prostaglandines et des cytokines qui prennent part aux différentes phases de la réaction inflammatoire. Il a été montré que ces médiateurs entraînent, dans le cas d'une exposition chronique, une augmentation de la prolifération cellulaire, une mutagénèse, une activation d'oncogènes et de l'angiogenèse (Shacter and Weitzman, 2002). Ces mécanismes peuvent prendre part à tous les stades de la cancérogénèse. Le lien entre inflammation et CCR est donc multifactoriel, engageant de nombreuses voies et de nombreux médiateurs.

À un stade précoce, les mécanismes inflammatoires centraux dans le développement de la cancérogénèse impliquent principalement les macrophages et les neutrophiles, ainsi que les cyclooxygénases (COX) et les résolvines. En effet, l'activation de ces voies permet l'installation d'un microenvironnement oxydatif et anaérobie. Les caractéristiques de ce microenvironnement entraînent l'apparition de dommages à l'ADN dans les cellules épithéliales, et un shift métabolique de l'aérobie vers l'anaérobie (Mariani et al., 2014).

Une des principales fonctions de l'épithélium intestinal est son rôle de barrière, permettant de séparer l'intérieur du tissu de l'environnement extérieur. Des jonctions intercellulaires permettent le maintien de l'imperméabilité aux pathogènes, tout en régulant la perméabilité aux ions, aux nutriments et à l'eau (Peterson and Artis, 2014). On constate, dans le cas des maladies inflammatoires intestinales, un défaut du rôle de barrière exercé par l'épithélium. Plus précisément, une augmentation de la perméabilité intestinale est observée (Arrieta et al., 2006; Edelblum and Turner, 2009; Turner, 2009). Cependant, aucun consensus n'a à l'heure actuelle été trouvé quant au lien de causalité et de subordination entre augmentation de la perméabilité et inflammation (Piche, 2014).

ii. Viande, fer héminique et inflammation

Plusieurs études chez l'homme ont montré un lien entre la consommation de viande ou de fer héminique et l'inflammation. En effet, suite à l'ingestion de ces aliments, on observe une augmentation de la protéine C réactive plasmatique, qui est un biomarqueur de l'inflammation (Azadbakht and Esmaillzadeh, 2009; de Oliveira Otto et al., 2011).

D'autre part, l'hypothèse a été émise que l'H_2O_2, produit au cours de la dégradation de l'hème par l'enzyme HO-1, favoriserait la production de cytokines inflammatoires par les cellules épithéliales coliques (IJssennagger et al., 2012a).

Enfin, une étude récente réalisée dans l'équipe chez le rat a montré un effet pro-inflammatoire sur la muqueuse colique d'un régime riche en hème (Martin et al., En préparation).

c. Cancer colorectal et microbiote

La densité microbienne du contenu du côlon est très importante, elle est estimée entre 10^{13} et 10^{14} cellules/g de contenu (Candela et al., 2014). Le microbiote, aujourd'hui considéré comme un organe à part entière, possède des fonctions essentielles à son hôte incluant des fonctions importantes pour son métabolisme et le développement correct de son système immunitaire. Cependant, des dysbioses peuvent influencer le développement de certaines pathologies comme le CCR. En effet, de plus en plus de preuves montrent l'implication du microbiote dans la prévention, l'initiation, la progression, mais également dans l'efficacité des traitements du CCR (Drewes et al., 2016).

Par exemple, plusieurs études montrent qu'il existe des différences de microbiote entre individus sains et patient atteints de CCR (Collins et al., 2011; Scanlan et al., 2008; Zhu et al., 2013). De plus, les habitudes alimentaires peuvent faire varier la composition du microbiote. Par exemple, il est démontré que les gros consommateurs de viande présentent un profil de microbiote intestinal altéré, avec une augmentation des *Bacteroides* et une diminution des *Firmicutes* (Maier et al., 1974). La même modification a été observé chez des souris ayant consommé de l'hème, ayant pour cause probable l'augmentation du ratio $GRAM^-/GRAM^+$ en raison d'une sensibilité des bactéries $GRAM^+$ à l'hème (IJssennagger et al., 2012b).

Bien que le rôle du microbiote dans la cancérogénèse colorectale, et que son lien avec la consommation de viande ne soient pas plus détaillés dans cette thèse, ce sujet est un axe de recherche important pour les équipes d'accueil PPCA (Prévention et Promotion de la Cancérogénèse par les Aliments) et NGN (Neuro-Gastroentérologie et Nutrition).

7. Les méthodes et modèles utilisés pour les études de cancérogénèse

Le rapport du WCRF/AICR de 2007 propose un classement des études qui s'intéressent au lien alimentation et cancer, en fonction de la robustesse des modèles utilisés :

- Classe 1 : les données *in vivo* provenant d'études chez des volontaires humains, d'études chez des animaux modèles génétiquement modifiés ou d'études utilisant des rongeurs modèles de cancérogénèse conçus pour étudier le processus de cancérogénèse.
- Classe 2 : les données *in vitro* provenant d'études sur des cellules humaines
- Classe 3 : les données *in vitro* provenant d'études sur des cellules animales ou de système d'étude mécanistique (enzyme ou gène isolés)

Ce classement permet à la communauté scientifique de s'interroger sur la pertinence des modèles qu'elle utilise et d'éclairer ses choix.

Concernant les études chez l'animal, le modèle du rat Fisher 344 initié à l'azoxyméthane est un modèle utilisé classiquement pour des études de cancérogénèse colique afin d'accélérer la survenue des lésions cancéreuses. Aujourd'hui des modèles génétiques sont également à la disposition de la communauté scientifique. On peut notamment citer la souris *Min* (Multiple Intestinal Neoplasia), mutée sur le gène *Apc*, qui développe de nombreuses tumeurs spontanées vers 10 semaines, principalement localisées dans l'intestin grêle (Moser et al., 1990; Su et al., 1992). Enfin, le rat *Pirc* (*Polyposis in the rat colon*) présentant une mutation hétérozygote sur le gène *Apc*, développe spontanément des tumeurs, principalement au niveau colique et au niveau intestinal. Ce modèle est d'autant plus pertinent que comme chez l'homme, les mâles présentent un développement tumoral plus important et plus rapide que les femelles. De plus, la durée de vie de ces animaux est d'environ un an, ce qui permet la réalisation d'études plus longue que chez la souris *Min* (Amos-Landgraf et al., 2007).

a. Modèle animal utilisé pendant la thèse : rat initié à l'azoxyméthane (AOM)

i. Le rat initié à AOM

Les animaux reçoivent une injection intrapéritonéale de ce cancérigène chimique afin d'induire l'apparition de lésions précancéreuses ou de tumeurs coliques dans un délai de 100 jours ou de 1 an après l'injection, respectivement (Femia and Caderni, 2008). Après l'injection intrapéritonéale, l'AOM est métabolisé par le foie en methylazoxymethanol, qui va ensuite former des ions methyl-carbonium CH_3^+, un électrophile capable de provoquer des mutations par mésappariements de base guanine-tyrosine l'ADN.

Dans ce modèle, deux types de lésions précancéreuses sont décrites : les foyers de cryptes aberrantes (ACF) et les foyers de cryptes déplétés en mucine (MDF) (Bird, 1987; Caderni et al., 2003).

- ✓ *Les foyers de cryptes aberrantes (ACF)*

Décrites pour la première fois par Bird (Bird, 1987), ces lésions sont observables après coloration de la muqueuse colique au bleu de méthylène dès 2 semaines après l'injection du cancérigène (**Figure 21**). Ces lésions sont généralement surélevées par rapport au reste de la muqueuse et l'orifice des cryptes est plus allongé et plus dilaté par rapport à des cryptes normales (McLellan and Bird, 1988). Les ACF présentent des marqueurs moléculaires de la cancérogénèse colorectale : ils sur-expriment certains gènes impliqués dans la prolifération cellulaire et sont parfois mutés pour le gène *Apc* (Alrawi et al., 2006; Kristt et al., 1999). De plus, les ACF montrent des caractères d'hyperplasie comme la présence de gros noyaux, l'absence de polarité cellulaire, une augmentation des mitoses et l'absence de mucine (Kristt et al., 1999). Ces lésions peuvent contenir de 2 à plus de 20 cryptes aberrantes, et certaines évolueront en adénocarcinome (Bruce and Corpet, 1996; Takayama et al., 1998).

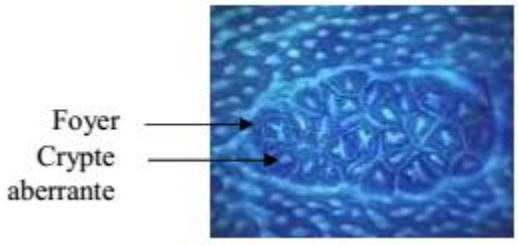


Figure 21 : *Foyer de cryptes aberrantes (ACF) formé de 25 cryptes (d'après (Corpet, 2011))*

✓ *Les foyers déplétés en mucine (MDF)*

Décrits plus récemment (Caderni et al., 2003), ils sont observables après coloration à « high-iron diamine alcian blue » (HIDAB) et se caractérisent par une production nulle ou limitée de mucine, par des cryptes plus petites et par une distorsion de leur lumière (Femia et al., 2004) (**Figure 22**). Ces lésions sont observables à partir de 7 semaines après l'injection du composé initiateur de la cancérogénèse. D'après certains auteurs, les MDF semblent être de meilleurs prédicteurs de la cancérogénèse colique que les ACF et ce, pour plusieurs raisons (Caderni et al., 2003; Cui et al., 2012) :

- 25% des MDF présentent la mutation du gène *Apc*, alors que les ACF ne présentent que rarement cette lésion (Femia et al., 2007; Perše and Cerar, 2011)
- Les MDF sont beaucoup moins nombreux que les ACF (environ 10 MDF et plus de 100 ACF par côlon), ce qui est plus cohérent avec le nombre de tumeurs (Femia et al., 2004)
- Les corrélations entre MDF et tumeurs sont plus souvent observées qu'entre ACF et tumeurs, certainement à cause de la forte hétérogénéité de ACF (Magnuson et al., 1993; Zheng et al., 1999)
- Les MDF et les tumeurs se retrouvent principalement dans le côlon distal (comme chez l'homme), alors que les ACF sont plus souvent localisées dans la partie médiane du côlon (Suzui et al., 2013).

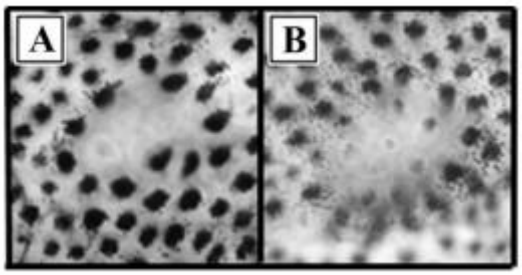


Figure 22 : *Foyer déplété en mucine (MDF) formé de 5 (**A**) et 11 (**B**) cryptes (grossissement x32 au microscope) (Pierre et al., 2004)*

ii. Pertinence et critique du modèle

Les tumeurs induites par l'AOM chez le rat présentent de nombreuses caractéristiques communes avec les tumeurs humaines, notamment du point de vue de leur localisation et de leur histopathologie. De plus, la séquence de développement des lésions précancéreuses et des carcinomes est similaire à celle décrite chez l'homme. Cependant, les altérations génétiques diffèrent de celles retrouvées chez l'homme (Corpet and Pierre, 2005) :

- *K-ras* est muté plus souvent que chez l'homme (30-60%)
- Comme chez l'homme, la β-caténine s'accumule dans le noyau des cellules, même si *APC* n'est muté que rarement (8%)
- La mutation du gène codant pour p53 n'est jamais décrite chez le rat

Ces éléments mettent en évidence que le modèle de rat initié à l'AOM n'est pas parfait pour mimer la situation humaine. Dans ce sens, certains auteurs proposent de compléter les études réalisées chez le rat initié à l'AOM par des études chez la souris *Min* : une méta-analyse regroupant des études chez l'homme et des études réalisées avec ces 2 modèles animaux a montré qu'ils prédisaient globalement assez bien la cancérogénèse humaine (Corpet and Pierre, 2005).

iii. Méthodes d'étude des différents stades de la cancérogénèse chez le rat AOM

Afin de mieux comprendre l'impact potentiel d'un aliment sur la cancérogénèse, son effet peut être étudié à différents stades : l'initiation ou la promotion. Pour chaque stade étudié, le protocole expérimental diffère.

✓ *Effet sur l'initiation de la cancérogénèse*

Les études ayant pour but de définir les effets d'un agent nutritionnel sur l'initiation de la cancérogénèse présentent une forte contrainte temporelle. En effet, le temps nécessaire pour l'apparition de lésions prénéoplasiques ou tumorales approche les 2 années d'exposition chez la souris C57Bl/6 (Yang et al., 2008). Ce type d'étude est donc très rarement effectué.

D'autre part, il est à noter que ces études n'ont pour l'instant été menées que chez la souris, qui est un modèle plus éloigné de l'homme que le modèle rat. La différence principale entre les 2 modèles de rongeurs utilisés pour les études sur le cancer du côlon est la localisation des lésions cancéreuses : chez la souris *Min*, elles se retrouvent dans l'intestin, contrairement au rat initié à l'AOM, qui développe les lésions dans le côlon.

Pour éviter cette importante contrainte de temps, il est nécessaire de co-initier la cancérogénèse avec un agent chimique. La comparaison du nombre de lésions prénéoplasiques entre les animaux ayant reçu uniquement l'agent chimio-inducteur et les animaux ayant été co-initiés par l'agent nutritionnel et l'agent chimique permettra de conclure quant à l'effet de l'agent testé sur l'initiation.

Le protocole expérimental d'initiation que nous avons choisi est le suivant : après exposition au régime expérimental pendant 2 semaines, les rats F344 ont reçu une injection intrapéritonéale d'AOM (20mg/kg de poids corporel). Suite à l'injection, les animaux ont été nourris avec le régime témoin pendant 60 jours avant mise à mort et dénombrement des lésions prénéoplasiques dans le côlon (**Figure 23**).

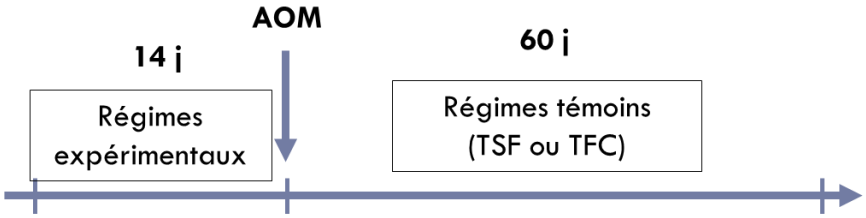


Figure 23 : *Déroulement du protocole expérimental de co-initiation de la cancérogénèse colorectale*

✓ *Effet sur la promotion de la cancérogénèse*

La majorité des études expérimentales de cancérogénèse réalisées chez l'animal s'intéressent à l'effet promoteur de l'agent alimentaire testé. Dans ce cadre, les animaux sont initiés par un agent chimique avant l'administration du régime expérimental (Femia and Caderni, 2008).

Le protocole expérimental de promotion que nous avons choisi est le suivant : les rats F344 ont reçu dans un premier temps une injection d'AOM (20mg/kg de poids corporel). Suite à l'injection, les animaux ont été nourris avec le régime expérimental pendant 100 jours avant mise à mort et dénombrement des lésions prénéoplasiques dans le côlon (**Figure 24**).

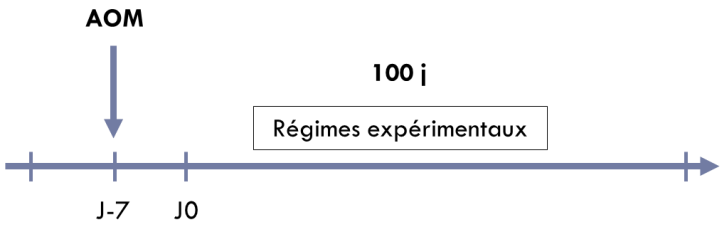


***Figure 24** : Déroulement du protocole expérimental de promotion de la cancérogénèse colorectale*

b. Modèle cellulaire utilisé pendant la thèse : les lignées $Apc^{+/+}$ et $Apc^{Min/+}$

Les modèles cellulaires couramment utilisés dans la recherche en cancérologie (HT29, Caco-2, CMT93) ont été obtenus à partir de carcinomes, en conséquence, ils représentent un stade avancé de la cancérogénèse colorectale. Ces lignées ne correspondent donc pas aux stades de la pathologie auquel nous nous intéressons, qui sont des stades beaucoup plus précoces.

Afin d'apporter plus de cohérence à nos études *in vitro*, nous travaillons sur un modèle cellulaire original composé de deux lignées. Celles-ci ont été obtenues à partir de souris C57Bl/6 wild-type ($Apc^{+/+}$) et de souris *Min,* mutées sur le gène *Apc* ($Apc^{Min/+}$) (Forest et al., 2003a). Ces deux lignées de souris ont été croisées avec des souris Immortomouse, apportant aux cellules un gène immortalisant permettant leur maintien en culture. La lignée $Apc^{+/+}$ est normale alors que la lignée $Apc^{Min/+}$ est précancéreuse. La caractérisation de la lignée type $Apc^{Min/+}$ a mis en évidence, comme attendu, que la mutation augmentait faiblement l'expression de la β-caténine, désorganisait le réseau d'actine et augmentait la capacité des cellules à former des clones en agar (Forest et al., 2003b).

Ce modèle présente plusieurs avantages :

- En utilisant la lignée normale ($Apc^{+/+}$), on peut étudier *in vitro* le stade de l'initiation de la cancérogénèse en testant par exemple le potentiel génotoxique de composés d'intérêt.
- En utilisant la lignée précancéreuse ($Apc^{Min/+}$), on peut étudier le stade de la promotion de la cancérogénèse, puisque cette lignée présente la mutation initiatrice la plus fréquemment retrouvée chez l'homme.
- Enfin, la comparaison des deux lignées au sein d'un même test permet de s'approcher du système que représente l'épithélium colique, au sein duquel cohabitent des cellules normales et des cellules prénéoplasiques. On peut ainsi comparer les effets, sur des cellules normales et prénéoplasiques, d'agents initiateurs, promoteurs ou encore protecteurs.

8. Intégration de mes travaux de thèse dans la stratégie de l'équipe de recherche

Mes travaux de thèse s'intègrent dans l'approche globale que l'équipe PPCA met en place pour mener ses recherches sur la consommation de viande et le risque de cancer colorectal.

Les travaux historiques de l'équipe ont eu pour objectif de valider expérimentalement chez l'animal les observations mises en évidence par des données épidémiologiques qui montrent une association positive entre la consommation de viande rouge et le risque de cancer colorectal. Ces études chez l'animal ont donc permis d'en apporter une preuve expérimentale mais également de définir des biomarqueurs fécaux et urinaires associés à la promotion de la cancérogénèse induite par la viande rouge et également d'émettre des hypothèses mécanistiques. La compréhension des mécanismes est un point-clé des travaux de l'équipe puisque cela permet de cibler au mieux les stratégies de prévention à tester. Après avoir validé expérimentalement l'effet de la viande rouge, puis l'effet du fer héminique sur la promotion de la cancérogénèse colorectale, d'autres questions restaient en suspens.

Le fer héminique a-t-il un rôle sur l'initiation de la cancérogénèse ? Les aldéhydes produits *via* la lipoperoxydation hème induite sont-ils responsables des effets du fer héminique sur la cancérogénèse colorectale ? Si oui, par quels mécanismes ?

III. Objectifs de la thèse

Cette thèse est centrée sur le 4-hydroxy-2-nonénal (HNE), un aldéhyde α-β-insaturé, produit secondaire de la peroxydation des acides gras polyinsaturés en n-6 qui est cytotoxique et génotoxique *in vitro*. Cet aldéhyde a été largement étudié dans divers états pathologiques dans lesquels sa formation est la conséquence d'un stress oxydant associé à un état inflammatoire. Cependant, outre sa formation endogène, le HNE peut également être formé par oxydation des lipides alimentaires, entraînant sa présence dans les aliments mais également sa néoformation dans le tractus digestif.

Le rôle du HNE est notamment suspecté dans la cancérogénèse colorectale induite par le fer héminique, qui agirait comme pro-oxydant sur les lipides alimentaires. En effet, il a été expérimentalement démontré que le fer héminique, présent en grande quantité dans la viande rouge, augmente l'incidence des lésions prénéoplasiques dans des modèles animaux (rats chimio-induits) et ce, de manière dépendante de la lipoperoxydation luminale. De plus, il a été démontré que l'ajout d'antioxydants dans le régime diminue cette incidence. Le HNE est suspecté d'être l'un des intermédiaires réactifs entre fer héminique et développement de ce cancer, en ayant probablement des effets pro-inflammatoires.

Ce travail a pour vocation la caractérisation du métabolisme du HNE alimentaire et l'étude de son rôle dans la cancérogénèse colorectale associée à la consommation de viande rouge.

Les objectifs de ma thèse se divisent donc en deux grandes thématiques :

- La première partie concerne l'étude du métabolisme du HNE alimentaire, au cours de laquelle le but était de caractériser les métabolites urinaires du HNE suite à une exposition alimentaire
- La deuxième partie traite des effets cancérigènes du fer héminique et du HNE sur le côlon
    - Objectif 1 : tester les effets du HNE sur l'inflammation colique
    - Objectif 2 : tester l'effet initiateur du fer héminique
    - Objectif 3 : tester l'effet initiateur du HNE
    - Objectif 4 : tester l'effet promoteur du HNE

ETUDES ET RÉSULTATS

I. Métabolisme du HNE alimentaire

1. Introduction

Des travaux précédents menés par l'équipe et par d'autres groupes de recherche (Alary et al., 2003a, 2003b) se sont intéressés au métabolisme urinaire du HNE après une administration par voie intraveineuse et intrapéritonéale, dans le but de définir un biomarqueur spécifique et non invasif de lipoperoxydation. Ces travaux avaient permis de conclure que le HNE est majoritairement excrété dans l'urine et dans la bile, sous forme de métabolites conjugués. Les métabolites principaux identifiés sont les suivants : acide mercapturique du HNE, acide mercapturique du 1,4-dihydroxynonène, acide mercapturique de l'acide 4-hydroxynonénoïque ainsi que sa lactone.

En revanche, à part ces quelques travaux sur le métabolisme du HNE après administration par voie intraveineuse, aucun groupe ne s'est intéressé au métabolisme du HNE après administration par voie orale. Cependant, comme présenté dans l'introduction de ce manuscrit au chapitre « *HNE et nutrition* » (p30), le HNE est présent dans certains de nos aliments et peut présenter un risque toxicologique ; il est donc important d'étudier le métabolisme du HNE absorbé par voie alimentaire.

Dans l'article qui suit, intitulé *"Twin peaks": searching for 4-hydroxynonenal urinary metabolites after oral administration in rats* et publié dans Redox Biology en 2015, nous avons caractérisé et quantifié les métabolites urinaires du HNE après son administration par voie orale chez le rat grâce à la combinaison de deux méthodes : le marquage radioactif ([4-^{3}H]-HNE) et l'utilisation d'un isotope stable ([1,2-^{13}C]-HNE). Cette méthode d'analyse novatrice nous a permis de quantifier les métabolites du HNE grâce à l'analyse des urines par radio-HPLC. L'analyse des échantillons par HPLC couplé à la spectrométrie de masse a permis de détecter les métabolites du HNE donné par voie orale, grâce à la présence de l'isotope stable ([1,2-^{13}C]-HNE). Enfin l'analyse des spectres de fragmentation, obtenus par MS/MS nous a permis définir les fonctions chimiques présentes sur les métabolites urinaires et ainsi d'identifier ces composés d'intérêt.

2. Article

Redox Biology 4 (2015) 136–148

Contents lists available at ScienceDirect

Redox Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/redox

Research Paper

"Twin peaks": Searching for 4-hydroxynonenal urinary metabolites after oral administration in rats

Julia Keller [a,1], Maryse Baradat [a,1], Isabelle Jouanin [b], Laurent Debrauwer [b], Françoise Guéraud [a,*]

[a] UMR 1331 Toxalim, INRA, INP, UPS, Team 9 "Prevention, Promotion of Carcinogenesis by Food", BP 93173, 180 chemin de Tournefeuille, 31027 Toulouse CEDEX, France
[b] UMR 1331 Toxalim, INRA, INP, UPS, Axiom Platform, BP 93173, 180 chemin de Tournefeuille, 31027 Toulouse CEDEX, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 28 November 2014
Received in revised form
19 December 2014
Accepted 22 December 2014
Available online 24 December 2014

Keywords:
4-Hydroxynonenal
Lipoperoxidation
Metabolism
HRMS
Isotope tracking

ABSTRACT

4-Hydroxynonenal (HNE) is a cytotoxic and genotoxic lipid oxidation secondary product which is formed endogenously upon peroxidation of cellular n-6 fatty acids.

However, it can also be formed in food or during digestion, upon peroxidation of dietary lipids. Several studies have evidenced that we are exposed through food to significant concentrations of HNE that could pose a toxicological concern. It is then of importance to known how HNE is metabolized after oral administration. Although its metabolism has been studied after intravenous administration in order to mimick endogenous formation, its in vivo fate after oral administration had never been studied.

In order to identify and quantify urinary HNE metabolites after oral administration in rats, radioactive and stable isotopes of HNE were used and urine was analyzed by radio-chromatography (radio-HPLC) and chromatography coupled with High Resolution Mass Spectrometry (HPLC–HRMS).

Radioactivity distribution revealed that 48% of the administered radioactivity was excreted into urine and 15% into feces after 24 h, while 3% were measured in intestinal contents and 2% in major organs, mostly in the liver. Urinary radio-HPLC profiles revealed 22 major peaks accounting for 88% of the urinary radioactivity. For identification purpose, HNE and its stable isotope [1,2-^{13}C]-HNE were given at equimolar dose to be able to univocally identify HNE metabolites by tracking twin peaks on HPLC–HRMS spectra. The major peak was identified as 9-hydroxy-nonenoic acid (27% of the urinary radioactivity) followed by classical HNE mercapturic acid derivatives (the mercapturic acid conjugate of di-hydroxynonane (DHN-MA), the mercapturic acid conjugate of 4-hydroxynonenoic acid (HNA-MA) in its opened and lactone form) and by metabolites that are oxidized in the terminal position. New urinary metabolites as thiomethyl and glucuronide conjugates were also evidenced. Some analyses were also performed on feces and gastro-intestinal contents, revealing the presence of tritiated water that could originate from beta-oxidation reactions.

© 2014 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Introduction

4-Hydroxynonenal (HNE) is an α,β-unsaturated aldehydic secondary lipid peroxidation product, arising from omega-6 polyunsaturated fatty acid oxidation. It has been extensively studied in numerous pathological states in which its generation is a consequence of oxidative stress accompanying inflammatory events. However, this product is not only a mere product of lipid peroxidation: it is a reactive compound that can play a biological role or have cytotoxic and genotoxic properties, depending on its concentration, through covalent attachment to macromolecules.

In addition to its endogenous formation, HNE can be found in various foodstuffs, upon non enzymatic oxidation of dietary PUFAs due to an imbalance between pro- and anti-oxidant compounds, or due to food-processing oxidation during cooking or storage. Seppanen and Csallany have reported HNE formation in thermally oxidized oils, and its presence in food fried in those oils to a concentration reaching 600 mg/kg of oil [1,2]. HNE can be found in meat products, or in fish in concentration reaching 5 mg/kg in case of prolonged storage [3,4] and in PUFA fortified infant formula and

Abbreviations: a.m.u, atomic mass unit; DHN, 1,4-dihydroxy-2-nonene; DHN-MA, 1,4-dihydroxy-2-nonane mercapturic acid; dpm, desintegration per minute; HNA, 4-hydroxy-2-nonenoic acid; HNA-MA, 4-hydroxy-2-nonanoic mercapturic acid; HNE, 4-hydroxynon-2-enal; ^{3}HNE, [4-^{3}H]-4-hydroxynon-2-enal; ^{12}C-HNE, 4-hydroxynon-2-enal; ^{13}C-HNE, [1,2-$^{13}C_2$]-4-hydroxynon-2-enal; HPLC–HRMS, High Pressure Liquid Chomatography–High Resolution Mass Spectrometry; MS/MS, tandem mass spectrometry

* Corresponding author.
E-mail address: fgueraud@toulouse.inra.fr (F. Guéraud).
[1] These authors contributed equally to this work.

http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2014.12.016
2213-2317/© 2014 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

baby food (up to 0.8 mg/kg, 10 days after package opening) [5]. Our group has shown that heme iron concentration may have a prominent role [6].

Several studies have evidenced the oral toxicity of HNE. Nishikawa et al. reported an acute toxicity of HNE after a single dose given by gavage (from 10 to 1000 mg/kg BW). They observed a diffuse liver cell necrosis 14 days after the treatment in all treated animals, while rats that died few hours after the 1000 mg/kg dosing presented extensive kidney tubular necrosis [7]. They concluded that HNE administered at high dose can induce lethal renal damage before severe hepatic damage occurs. Such hepatotoxicity was reported after injection in the portal vein of 4-hydroxy-hexenal (HHE), an analog of HNE formed upon omega-3 PUFAs [8]. Chung et al. reported a liver tumorigenic activity of crotonaldehyde, another α, β-unsaturated aldehyde, after oral exposure in drinking water for 113 weeks. Wacker et al. [9] reported a slight increase of HNE specific propano-adducts in forestomach DNA in rats treated with single oral dose of HNE (500 mg/kg BW). Kang et al. reported nephro-and hepatotoxicity of HNE after 4 weeks of daily dose ranging from 0.5 to 12.5 mg/kg BW [10]. From this study, these authors have calculated a no-adverse-effect-level (NOAEL) below 0.5 mg/kg/day for HNE.

Taken together, those studies show that we are exposed through food to significant concentrations of HNE that could pose a toxicological concern. It is then of importance to known how HNE is metabolized after oral administration. If some studies have been done, by our group [11,12] and others [13,14], on the in vivo metabolism of HNE or HHE after parenteral administration, none has been achieved to elucidate oral fate of HNE.

In the present work, we used a strategy based on both radioactive (i.e. [4-^{3}H]-HNE) and stable (i.e. [1,2-^{13}C]-HNE) isotope labeling to elucidate its oral metabolic fate, that is to say to identify and quantify the major HNE metabolites in urine.

Material and methods

Chemicals

Reagents were purchased from Sigma-Aldrich (France). Solvents for HPLC were of analytical grade and purchased from Fisher, France. Ultrapure water from MilliQ system (gradient A10, Millipore) was used for HPLC.

[4-^{3}H]-4-Hydroxynon-2(*E*)-enal (^{3}H-HNE) was obtained by acid hydrolysis of aldehyde protected diethyl acetal precursor, synthesized as previously described [15], and purified by thin layer chromatography (Fig. 1). The synthesis was carried out at CEA, Service des Molecules Marquees, CEN, Saclay, France. Radiochemical purity (> 95%) was checked by HPLC before administration to rats. Specific activity was 222 GBq/mol [1,2-$^{13}C_2$]-4-Hydroxynon-2(*E*)-enal (^{13}C-HNE) (Fig. 1): ^{13}C-HNE was prepared from ethyl [1,2-$^{13}C_2$]-2-bromoacetate according to our published method [16], with modifications as previously described [17]. 4-Hydroxynon-2(*E*)-enal (HNE): HNE was prepared from ethyl 2-bromoacetate by the same method as for ^{13}C-HNE. 4,9-dihydroxy-2-nonenoic acid (9-hydroxy-HNA) standard was obtained as previously described [12]. 1,4-dihydroxynonane mercapturic acid (DHN-MA) and 4-hydroxynonanoic mercapturic acid (HNA-MA) standards were synthesized as previously described [11].

Animal treatments

Male Wistar rats (200 g) were purchased from Charles River. Animal care was in accordance with our local ethic committee (number TOXCOM/0008/FG). 3 Rats were treated by gavage with 0.9 ml of an equimolar mixture of HNE and ^{13}C-HNE and of ^{3}H-HNE diluted in water. 3 Other rats were treated by gavage with 1 ml of the same mixture of ^{12}C-HNE and ^{13}C-HNE diluted in water, without radiolabeled HNE. These treatments contained 1 mg/ml of HNE, 1 mg/ml of ^{13}C-HNE and, when appropriate, 0.97 MBq/ml of ^{3}H-HNE. HNE concentration was checked spectrophotometrically (λ, 223 nm; ε, 13,750 l/mol/cm).

The rats were housed in individual metabolism cages and food (A03 breeding diet, SAFE, France) and tap water were provided ad libitum. 24 h Feces and 0–6 h and 6–24 h urine were collected. Rats were sacrificed by CO_2 inhalation. Several organs and tissues were collected and stored at − 80 °C until analysis. Organs and tissues coming from rats treated with radiolabeled HNE were used for distribution of radioactivity and radio-HPLC analyses. Urine of rats treated with HNE and ^{13}C-HNE mixture only was used for HPLC/HRMS analyses (1st set of experiments, Fig. 2). For radio-HPLC analyses followed by MS/MS analyses (2nd set of experiments, Fig. 2), a mixture of radioactive (1/3) and non radioactive (2/3) urine was used, in order to be able to detect radioactive peaks but to avoid an important radioactive contamination of mass spectrometry equipment.

Radioactivity determination

Radioactivity was counted PerkinElmer Tri-carb 2910 TR liquid scintillation analyzer (PerkinElmer, France), using Ultima Gold (PerkinElmer) as scintillation cocktail. Urine was analyzed directly, while intestinal contents and 0–24 h homogenized feces were first dissolved in 1 M NaOH before being counted for radioactivity. Rat tissues and organs were homogenized and sampled (n = 3, 100–200 mg) before combustion by a Packard Sample Oxidizer (Model 307, PerkinElmer) and then sample radioactivity was counted using Monophase *S* (PerkinElmer) as scintillation cocktail.

"Metabolite tracking" strategy (Figs. 2 and 3)

Metabolite tracking strategy has been previously used by our group to study in vitro HNE metabolism in colon epithelial cells [17,18]. In the present study, urine and feces coming from rats treated with HNE were analyzed by HPLC–HRMS for twin peaks tracking and identification purpose and by radio-HPLC for quantification purpose. Urine was first fully analyzed by HPLC–HRMS and radio HPLC (Fig. 2, 1st set of experiment) but quantification and identification results were difficult to match on the basis of retention time, due to slight differences between the two techniques (even if the same column was used for chromatography). To clarify and to confirm our results, we undertook a second set of experiments (Fig. 2), analyzing radio-HPLC collected fractions by HRMS and MS/MS (Fig. 3). For feces samples, we only realized the 2nd set of experiments as metabolites concentrations were too low to achieve a full analysis.

Radio-HPLC system

The system consisted of two HPLC Kontron 420 pumps (Kontron, Selabo, France), managed with the HPLC software Diamir (Varian Medical Systems, USA). The HPLC system was equipped with a 500 µl loop and an Interchrom Strategy KR100 column C18 (5 µm, 4.6 × 250 mm) (Interchim, France) kept in an oven thermostated at 35 °C and connected to an on-line radioactivity analyzer (Packard Flo-one, Flow scintillation analyzer) using Flo-scint as the scintillation cocktail or connected to a Gilson FC 204 fraction collector (Gilson, France) for 4 tubes/min collection, using Packard Ultima Gold as scintillation cocktail, when appropriate. Two mobile phases were used. Mobile phase A containing: water/acetonitrile/acetic acid: 97.5/2.5/0.1; and mobile phase B containing:

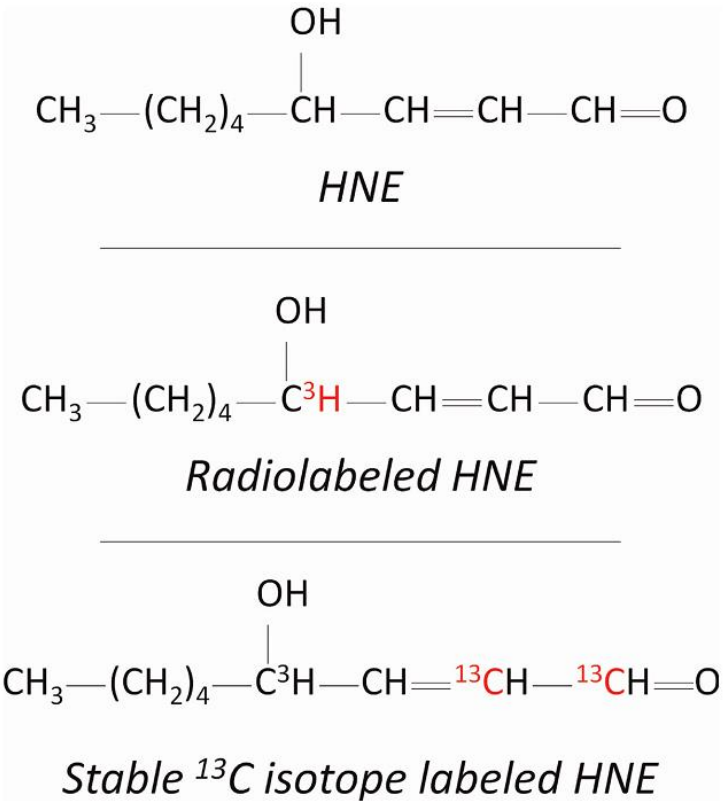


Fig. 1. Labeling position of the HNE isotopes used for metabolite tracking and quantification.

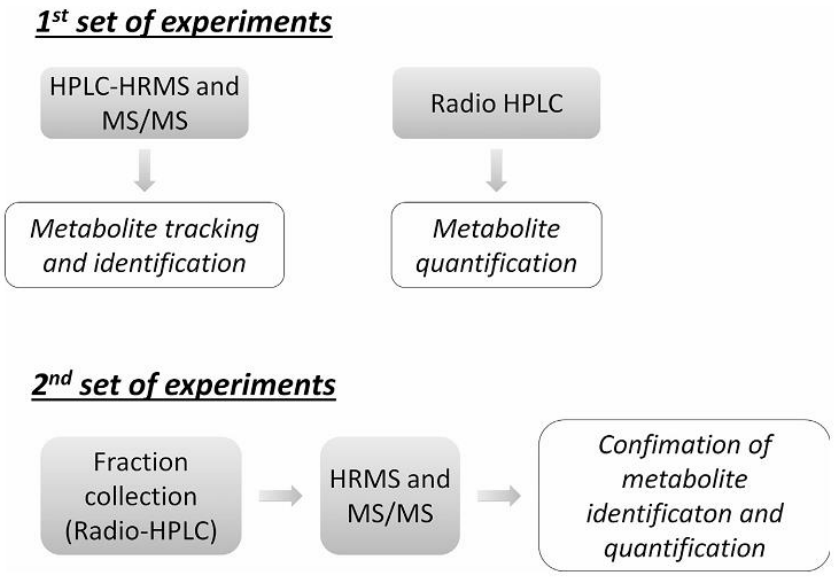


Fig. 2. Workflow for metabolites identification and quantification.

water/acetonitrile/acetic acid: 40/60/0.1. Elution gradient was as follows: 100% A from 0 to 4 min, a linear gradient from 4 to 20 min from 0% to 6% B, a linear gradient from 20 to 25 min from 6% to 25% B, a plateau at 25% B from 25 to 35 min, a linear gradient from 35 to 50 min from 25% to 90% B, a plateau at 90% B from 50 to 60 min.

Urine was injected directly whereas intestinal contents and 0–24 h homogenized feces were extracted by 2 volumes of 0.5 M

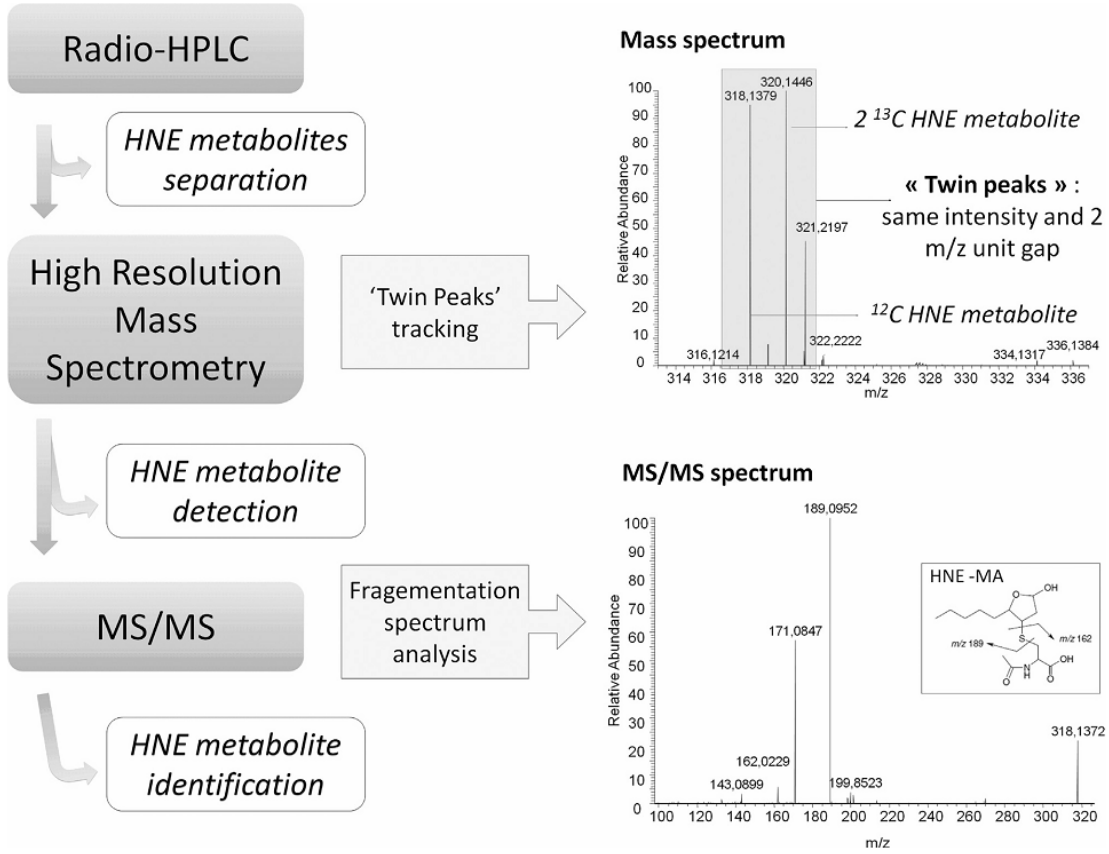


Fig. 3. Work flow of the 2nd set of experiments. Metabolites were identified using radio-HPLC separation, 'twin peaks' tracking by High Resolution Mass Spectrometry and further ion fragmentation by MS/MS.

NaCl.

HPLC–HRMS analysis (1st set of experiments)

Urine sample analysis was achieved using HPLC coupled to an LTQ Orbitrap XL high-resolution mass spectrometer (Thermo, Fisher Scientific, Les Ulis, France). Briefly, 25 μl of urine was injected into an HPLC system using the same column and the same mobile phases and gradients as for radio-HPLC profiling, and a 1/4 post-column splitting HRMS acquisitions were performed using electrospray ionization (ESI) in the negative mode with the following operating parameters: spray voltage (−3.5 kV), heated transfer capillary temperature (300 C), heated transfer capillary voltage (−1 V), tube lens voltage (−50 V), sheath gas (N_2) flow rate 40 au, auxiliary gas (N_2) flow rate 5 au. Full MS spectra were recorded at a resolution of 30,000 from *m/z* 120–750.

Chromatograms for 0–6 h and 6–24 h urine and mass spectra were analyzed for 0–6 h and 6–24 h urine and feces samples using Xcalibur software (Thermo Scientific). Twin peaks were detected on the basis of their *m/z* difference of 2.0067 a.m.u. corresponding to similar chemical formula for $^{12}C_n$ and $^{12}C_{(n-2)}{}^{13}C_2$ compounds using the MetWorks software package (Thermo Scientific). The search criteria for chemical formula determination were restricted to a mass error below 5 ppm and C, H, O, N, S, P, K and Na were the only accepted elements. Further MS/MS fragmentation was achieved on twin peaks, for HNE metabolite identification. For MS/MS experiments, excitation parameters (isolation width (1.5 a.m.u.), normalized collision energy (35%), excitation time (30 ms)) were adjusted in order to get maximum structural information for the compound of interest. When possible, high resolution was used (R=7500) for fragment ion composition assignment. All analyses were achieved under automatic gain control conditions using helium as damping as well as collision gas for MS/MS experiments.

HRMS and MS/MS infusion experiments (2nd set of experiments) (Fig. 3)

Fractions of interest collected from urine and feces samples were passed through a SPE cartridge. Obtained purified fractions were evaporated under a nitrogen stream, and taken up by the appropriate volume of methanol–water (50/50, v/v) to get a concentration of 1–5 ng/μl. Samples were infused at a flow rate of 8 μl/min into the LTQ Orbitrap XL high-resolution mass spectrometer. The same mass spectrometry parameters as described above were used for HRMS acquisitions and MS/MS experiments.

Results and discussion

Radioactivity distribution

Radioactivity distribution was analyzed in the group treated with ^{3}H-HNE in urine, feces, intestinal contents and major organs

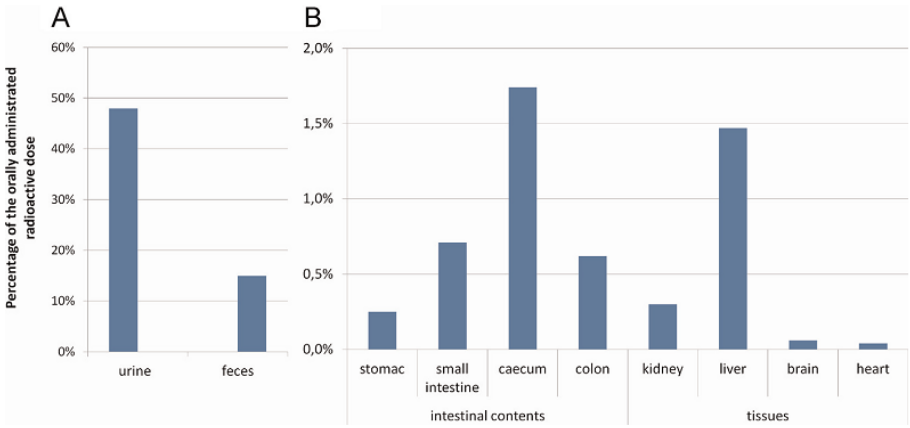


Fig. 4. Radioactivity distribution after ^{3}H-HNE oral administration in rats ($n=3$). Percentage of the given radioactivity found in 0–24 h urine and feces (A), intestinal contents and tissues after 24 h (B) (volume or weight related).

(Fig. 4). 24 h After radiolabeled HNE oral administration, most radioactivity was found in urine (48%). 15% of the orally given dose was found in feces. Around 3% was measured in the intestinal contents (including 1.7% in cecum content) and around 2% in major organs (including 1.5% in liver). Total radioactivity recovery was 68% knowing that this result is non-exhaustive given that only the radioactivity in major organs was measured. In a previous study done by our group on HNE metabolism following intra-venous administration, 67% and 3% of the administered radioactivity was found in urine and feces, respectively, 48 h after treatment [11].

Urinary HNE metabolites identification and quantification

First, we performed radio-HPLC analyses on urine collected within 24 h after oral administration of ^{3}H-HNE (Fig. 5A). Then, we performed radio-HPLC analyses on urine collected over the first 6 h after treatment and on urine collected between 6 and 24 h after treatment (Fig. 5B and C).

On 0–24 h urine, a first peak eluted at 3.1 min, then the major peak eluted at 28.2 min, followed by a group of peaks eluting up to 33 min. Finally, a second group of peaks eluted between 41 and

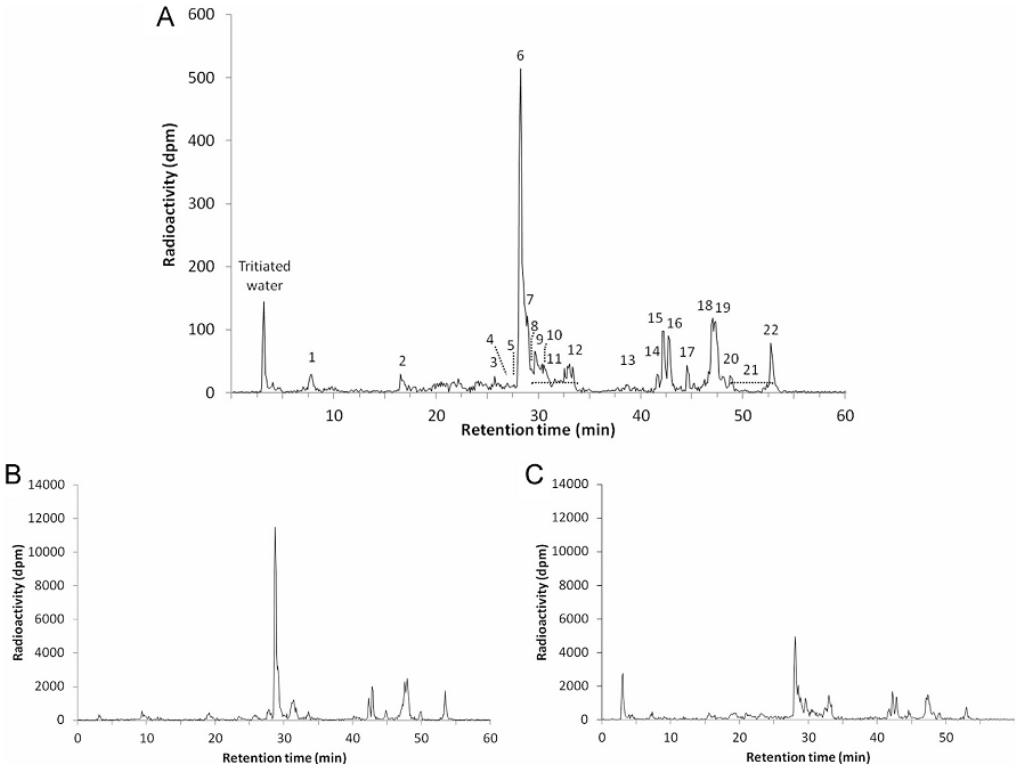


Fig. 5. Radio-HPLC profiles of ^{3}H-HNE urinary metabolites after oral administration in rats. A: 0–24 h urine. B: 0–6 h urine. C: 6–24 h urine.

Table 1
Metabolites identified in 0–24 h urine of rats treated with HNE.

Peak (% of urinary radioactivity)	Ion *m/z*		Fragments			Proposed structure
	From HNE from [^{13}C]-HNE	Chemical formula	^{12}C fragment *m/z* ions	^{13}C fragment *m/z* ions	Fragment interpretation	
1 (2.07)	173.0456	$C_7H_9O_5$	155		$[M–H–H_2O]^-$	**7-Carboxy-4-hydroxy-hep-**
	175.0523		137		$[M–H–2H_2O]^-$	**tenoic acid**
			129		$[M–H–COO]^-$	
			111		$[M–H–COO–H_2O]^-$	
			85		$[M–H–COO–COO]^-$	
2 (2.20)	205.1082	$C_9H_{17}O_5$	187		$[M–H–H_2O]^-$	**4,8,9-Trihydroxy-nonanoic**
	207.1148		169		$[M–H–2H_2O]^-$	**acid**
			161		$[M–H–COO]^-$	
			145		$[M–H–CHOH–CHOH]^-$	
3 (1.85)	185. 0821	$C_9H_{13}O_4$	167	169	$[M–H–H_2O]^-$	**9-Carboxy-HNE**
	187.0888		141	143	$[M–H–COO]^-$	
			123	125	$[M–H–COO–H_2O]^-$	
4 (1.29)	201.0769	$C_9H_{13}O_5$	183		$[M–H–H_2O]^-$	**9-Carboxy-HNA**
	203.0836		157		$[M–H–COO]^-$	
			139		$[M–H–COO-H_2O]^-$	
5 (0.23)	203.0926	$C_9H_{15}O_5$	185		$[M–H–H_2O]^-$	**9-Carboxy-4-Hydroxy-non-**
	205.0992		159		$[M–H–COO]^-$	**anoic acid**
			141		$[M–H–COO–H_2O]^-$	
6 (26.72)	187.0977	$C_9H_{15}O_4$	169	171	$[M–H–H_2O]^-$	**9-Hydroxy-HNA**
	189.1044		143	144	$[M–H–COO]^-$	
			113	114	$[M–H–CHOH]^-$	
7 (3.74)	350.1281	$C_{14}H_{24}NO_7S$	332	334	$[M–H–H_2O]^-$	**9-Carboxy-DHN-MA**
	352.1348		306	308	$[M–H–COO]^-$	
			221	223	$[A+S]^-$	
			162	162	$[B]^-$	
			128	128	$[B–S]^-$	
	364.1064	$C_{14}H_{22}NO_8S$	346		$[M–H–H_2O]^-$	**9-Carboxy-HNA-MA**
	366.1136		320		$[M–H–COO]^-$	
			235		$[A+S]^-$	
			162		$[B]^-$	
8 (1.25)	203.0020	$C_9H_{15}O_5$	185		$[M–H–H_2O]^-$	**8,9-Dihydroxy-HNA**
	205.0091		172		$[M–H–CHOH]^-$	
			141		$[M–H–COO–H_2O]^-$	
			121		$[M–H–COO–2H_2O]^-$	
9 (5.22)	185.0818	$C_9H_{13}O_4$	167	169	$[M–H–H_2O]^-$	**9-Oxo-HNA or 9-Hydroxy-**
	187.0882		141	142	$[M–H–COO]^-$	**4-oxo-nonenoic acid**
			123	124	$[M–H–COO–H_2O]^-$	
	348.1109	$C_{14}H_{22}NO_7S$	304	306	$[M–H–COO]^-$	**9-Carboxy-HNE-MA**
	350.1177		219	221	$[A+S]^-$	
			162	162	$[B]^-$	
10 (2.14)	336.1486	$C_{14}H_{26}NO_6S$	207	209	$[A+S]^-$	**9-Hydroxy-DHN-MA**
	338.1552		189	191	$[A+S–H_2O]^-$	
			159	160	$[A+S–H_2O–CHOH]^-$	
			128	128	$[B–S]^-$	
11 (2.35)	235.1035	$C_{10}H_{19}O_4S$	191		$[M–H–COO]^-$	**3-Thiomethyl-9-Hydroxy-**
	237.1077		187		$[M–H–S–CH_3]^-$	**HNA**
	249.0803	$C_{10}H_{17}O_5S$	205		$[M–H–COO]^-$	**3-Thiomethyl-9-Carboxy-**
	251.0867		201		$[M–H–SCH_3]^-$	**HNA**
12	No twin peak					
13 (1.46)	332.1172	$C_{14}H_{22}NO_6S$	203	205	$[A+S]^-$	**9-Hydroxy-HNA-lactone-**
	334.1239		162	162	$[B]^-$	**MA**
	346.0964	$C_{14}H_{20}NO_7S$	301	304	$[M–H–COO]^-$	**9-Carboxy-HNA-lactone-**
	348.1031		217	219	$[A+S]^-$	**MA**
			162	162	$[B]^-$	
14 (1.10)	199.0598	$C_9H_{11}O_5$	181	183	$[M–H–H_2O]^-$	**9-Carboxy-4-oxo-none-**
	201.0667		155	157	$[M–H–COO]^-$	**noique acid**
			137	139	$[M–H–COO-H_2O]^-$	
15 (4.38)	189.1132	$C_9H_{17}O_4$	171		$[M–H–H_2O]^-$	**4, (8 or 9)-Dihydroxy-non-**
	191.1198		129		$[M–H–CH_2COOH]^-$	**anoic acid**
			99			
			59		$[CH_2COOH]$	
16 (3.92)	189.1133	$C_9H_{17}O_4$	171	173	$[M–H–H_2O]^-$	**4, (8 or 9)-Dihydroxy-non-**
	191.1199		129	129	$[M–H–CH_2COOH]^-$	**anoic acid**
			59	61	$[CH_2COOH]$	
17	No twin peak					
	333.1554	$C_{15}H_{25}O_8$	193	193	Glucuronide	**4-Glucuronide-DHN**
	335.1621		157	159	$[M–H\text{-glucuronide}]^-$	
	347.1346	$C_{15}H_{23}O_9$	193	193	Glucuronide	**4-Glucuronide-HNA**

Table 1 (*continued*)

Peak (% of urinary radioactivity)	**Ion *m/z***		**Fragments**			**Proposed structure**
	From HNE from [^{13}C]-HNE	**Chemical formula**	**^{12}C fragment *m/z* ions**	**^{13}C fragment *m/z* ions**	**Fragment interpretation**	
	349.1416					
18 (6.53)	320.1539	$C_{14}H_{26}NO_5S$	191	193	$[A+S]^-$	**DHN-MA**
	322.1603		128	128	[B–S]-	
19 (6.98)	334.1331	$C_{14}H_{24}NO_6S$	290	292	$[B–COO]^-$	**HNA-MA**
	336.1395		205	207	$[A+S]^-$	
			162	162	$[B]^-$	
			128	128	$[B–S]^-$	
	320.1539	$C_{14}H_{26}NO_5S$	191	193	$[A+S]^-$	**DHN-MA**
	322.1603		128	128	$[B–S]^-$	
20 (1.35)	318.1379	$C_{14}H_{24}NO_5S$	274	276	$[B–COO]^-$	**HNE-MA**
	320.1445		189	191	$[A+S]^-$	
			171	173	$[A+S–H_2O]^-$	
			162	162	$[B]^-$	
	334.1328	$C_{14}H_{24}NO_6S$	205	207	$[A+S]^-$	**HNA-MA**
	336.1396		162	162	$[B]^-$	
			128	128	$[B–S]^-$	
	219.1064	$C_{10}H_{19}O_3S$	175		$[M–H–COO]^-$	**3-Thiomethyl-HNA**
	221.1130		171		$[M–H–SCH_3]^-$	
21 (4.31)	316.1225	$C_{14}H_{22}NO_5S$	162	162	$[B]^-$	**HNA–lactone-MA**
	318.1285					

52.5 min. The analyzed peaks represent 88% of the urinary radioactivity.

When 0–6 h urine was analyzed by radio-HPLC, the relative abundance of the first peak was very reduced compared to the major peak. In contrast, in 6–24 h urine analysis, the first peak became one of the most important, whereas the relative abundance of the major peak was greatly reduced.

Tritiated water

In radio-HPLC profiles we obtained from 0–24 h and 6–24 h rat urine, a peak which retention time corresponded to the column void volume was observed. This peak was not present when samples were passed through a SPE cartridge. To tentatively identify this peak, we have tested different methods, using evaporation or activated charcoal treatment of the SPE cartridge unretained fraction of urine. Activated charcoal added to the unretained fraction for 24 h, followed by filtration on a Whatman GF/A filter, did not decrease the radioactivity of the unretained fraction. This result allowed us to identify this peak as tritiated water. However, evaporation of this fraction led to a minor concentration of radioactivity in the unretained fraction. This could be explained by a weak enrichment of tritium, due to isotope discrimination during water phase change [19].

Moreover, when organ samples were left for several hours for drying purpose, an important loss of radioactivity (55%) was observed, probably indicating tritiated water evaporation.

Tritiated water has been observed previously by our group during radio-HPLC analysis of urine after intra-venous HNE treatment [12] or of liver slices incubated with HNE [20]. It represented 3.5% of 0–24 h urinary radioactivity and was completely unretained by all kinds of SPE cartridge. Moreover, it was recovered in the condensate after evaporation. Other authors have reported the presence of tritiated water in several in vitro and in vivo ^{3}H-HNE metabolic studies [21,22] but using tritiated HNE with a different labeling position: [2-^{3}H]-HNE compared to the [4-^{3}H]-HNE used in our group. These authors attributed the formation of tritiated water to the first step of β-oxidation of HNA. Indeed, they reported a decrease of tritiated water formation by the use of 4-pentaenoic acid, an inhibitor of β-oxidation [21]. Interestingly, a decrease in tritiated water following 4-pentaenoic acid treatment was also observed in a study done in our group with the tritium located on carbon 4, probably indicating further β-oxidation steps [20]. The fact that in the present study, but also in the previous studies done by our group [12,20], the formation of tritiated water increased with time after dosing or incubation time, indicates probably a multi-step process. Indeed, in the present study, tritiated water accounted for 1.1% of urinary radioactivity for 0–6 h urine, while it represented 15.9% of the urinary radioactivity for the 6–24 h urine. Alary et al. [12] found no tritiated water in the 0–2 h urine, 3.5% in the 2–24 h urine and 28% in the 24–48 h urine, following intra-venous HNE treatment. Moreover, in the present study, tritiated water represented the major radioactive peak in the intestinal contents 24 h following exposure (Fig. 9). All together these results indicate an important catabolism of HNE, given by oral or parenteral route, through β-oxidation of HNA and possibly also through ω-oxidation of HNA and further β-oxidation steps originating from the carbon 9 of HNA as recently reported by some authors [23].

Other HNE metabolites identification

Peak 1 eluted at 7.8 min (Fig. 5A). Using our metabolite tracking technique with high resolution mass spectrometry for highlighting HNE metabolites on the basis of their $^{12}C/^{13}C_2$ characteristic isotopic pattern, twin peaks were evidenced at *m/z* 173.0456 ($^{12}C_7H_9O_5$, calc. 173.0444, $\Delta = 0.5$ ppm) and 175.0523 ($^{12}C_5{}^{13}C_2H_9O_5$, calc. 175.0512, $\Delta = 0.5$ ppm) (Table 1). High resolution accurate mass measurements allowed accessing elemental composition of these ions, which were both in agreement with the molecular formula $C_7H_9O_5$. The MS/MS spectrum of *the m/z* 173 precursor ion exhibited 2 fragment ions corresponding to two subsequent decarboxylations (*m/z* 129 and *m/z* 85 ions) that indicated the presence of a dicarboxylic acid. On the basis of the molecular formula and of this fragmentation pattern, peak 1 can correspond to 7-carboxy-4-hydroxy-heptenoic acid. Such metabolite has not been observed in our previous studies. This metabolite could originate from a β-oxidation step originating from the carbon 9 of HNA, as we observed the "twin compound" still retaining the stable isotope labeling on carbon 1 and 2 (ion at *m/z* 175), precluding any possibility of β-oxidation step on the carbons 1 and 2 of HNA. The presence of this metabolite accounting for 2% of urinary radioactivity reinforces the HNE disposition pathway evidenced recently by Jin et al. [23].

Peak 2 eluted at 16.5 min and accounted for 2.2% of urinary radioactivity. Twin peaks at *m/z* 205.1086/207.1148, corresponding

to the $C_9H_{17}O_5$ molecular formula were obtained. The MS/MS spectrum of *the* m/z 205 ion exhibited a fragment ion corresponding to a decarboxylation (m/z 161 ion) and to the loss of a terminal CH_2OH-CH_2OH (m/z 145 ion). Based on these information, the structure of 4,8,9-tri-hydroxy-nonanoic acid was tentatively assigned to peak 2. Such chemical structure has not been evidenced in our previous studies. However, $\omega-1$ oxidation has been reported by Jin et al. [23].

Peak 3 eluted at 25.7 min and accounted for 1.85% of urinary radioactivity. The $C_9H_{13}O_4$ molecular formula could be deduced from the twin peaks observed at m/z 185.0821/187.0888. MS/MS of *the* m/z 185 ion exhibited a fragment ion corresponding to a decarboxylation (m/z 141 ion). As *the* m/z 143 ion (and not m/z 142) was observed following fragmentation of *the* m/z 187 twin precursor ion, it can be concluded that the decarboxylation did not concern the labeled C1 carbon atom and that consequently the carboxylic acid function is located at the carbon 9 position. This peak should then correspond to 9-carboxy-DHN.

The HNE metabolite tracking allowed us to tentatively identify those minor peaks as new HNE metabolites.

Peak 4 eluted at 26.9 min and represented 1.3% of urinary radioactivity. Twin peaks corresponding to the $C_9H_{13}O_5$ molecular formula were measured at m/z 201.0769/203.0836. The MS/MS spectrum of *the* m/z 201 precursor ion exhibited major fragment ions corresponding to dehydration and decarboxylation processes (m/z 183, 157 and 139 fragment ions). This peak should then correspond to 9-carboxy-HNA. Such a metabolite has been previously observed in the rat, after intravenous administration [12] and in mice after intraperitoneal treatment [24].

Peak 5 eluted at 27.6 min and represented 0.23 % of urinary radioactivity and displayed twin peaks at m/z 203.0926/205.0992 corresponding to the $C_9H_{15}O_5$ molecular formula. Similarly as for peak 4, MS/MS carried out on *the* m/z 203 ion yielded a fragment ions corresponding to dehydration and decarboxylation (m/z 185, 159 and 141 ions). This peak was then tentatively identified as 9-carboxy-4-hydroxy-nonanoic acid. This minor peak has not been evidenced before.

Peak 6 was the major peak obtained on the radio-HPLC analysis; it eluted at 28.2 min and represented 27% of the urinary radioactivity. Twin peaks were measured at m/z 187.0977 ($^{12}C_9H_{15}O_4$, calc. 187.0965, $\Delta=0.7$ ppm)/189.1044 ($^{12}C_7{}^{13}C_2H_{15}O_4$, calc. 189.1032, $\Delta=0.6$ ppm), allowing to propose $C_9H_{15}O_4$ as molecular formula. The MS/MS spectrum of *the* m/z 187 ion exhibited a fragment ion corresponding to a decarboxylation (m/z 143 ion, Fig. 7). Opposite to what has been observed for Peak 3, an m/z 144 ion was observed following fragmentation of *the* m/z 189 twin

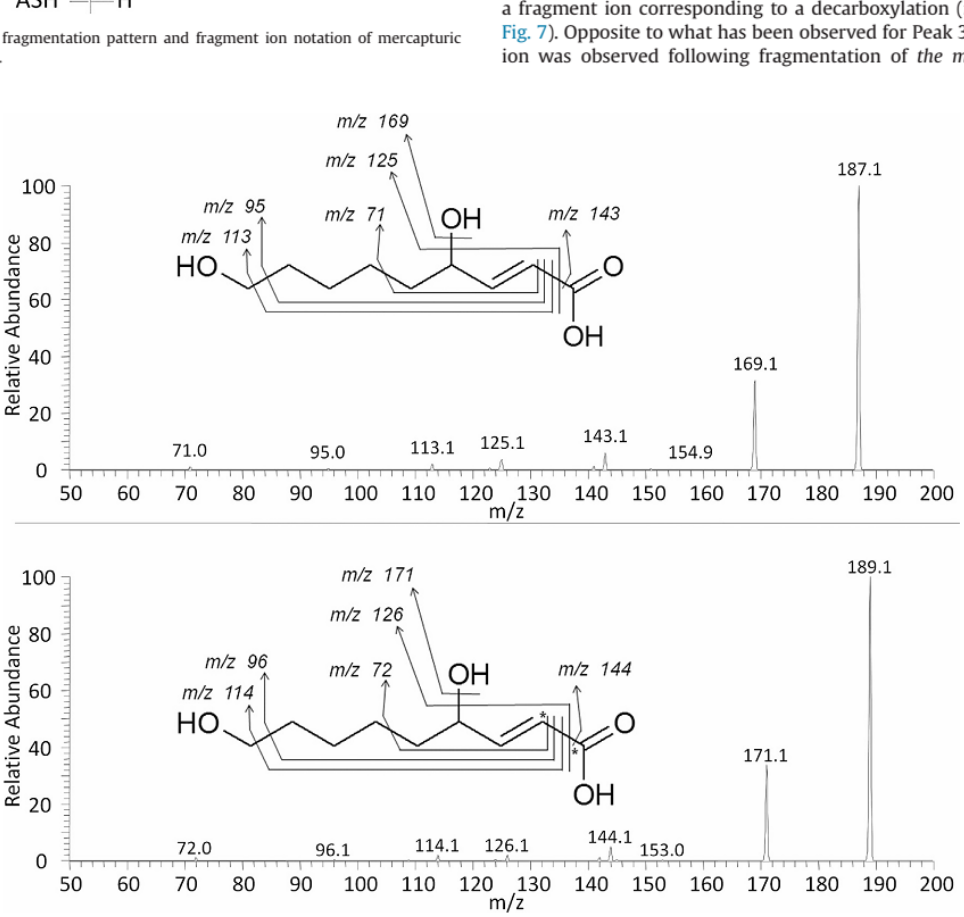


Fig. 6. General fragmentation pattern and fragment ion notation of mercapturic acid derivatives.

Fig. 7. Fragmentation mass spectra and interpretation for ions 187.0977 (^{12}C-HNE metabolite) and 189.1044 (^{13}C-HNE metabolite).

peak (corresponding to a 45 a.m.u. loss). It can thus be concluded that the decarboxylation involved the labeled C1 carbon atom of the metabolite. Consecutive losses of 30 a.m.u. (*m/z* 113 and 114 fragment ions) from both *m/z* 143 and 144 ions indicated the presence of a CH_2OH moiety in the terminal position. Moreover, this peak coeluted with 9-hydroxy-HNA standard. This allowed us to identify this metabolite as 9-hydroxy-HNA. As for 9-carboxy-HNA, 9-hydroxy-HNA has been observed in urine of rats and mice after parenteral HNE administration. Such terminal oxidation process could involve cytochrome P450 4A family because fibrate treated mice excreted more of those compounds than untreated ones, or than PPARα-deficient and fibrate treated ones [12,24]. Cytochrome P450 4A enzymes specifically catalyze the ω- and $\omega-1$-hydroxylation of medium and long chain fatty acids [25]. The presence of 9-hydroxy-HNA as a major metabolite in the present study indicated a prominent role of cytochrome P450 4A family in HNE metabolization after oral administration.

Peak 7 was not fully resolved from Peak 6. It eluted at 28.9 min and represented approximately 4% of urinary radioactivity. However, this peak revealed the occurrence of two pairs of twin peaks. The first pair of ions at *m/z* 350.1281/352.1348 (molecular formula $C_{14}H_{24}NO_7S$) gave upon fragmentation the characteristic fragment ions of a mercapturic acid conjugate at *m/z* 162 $[B]^-$ and of and *m/z* 128 $[B-S]^-$ (see Fig. 6 for fragment notation of mercapturic acid derivatives). MS/MS fragmentation of the pair of *m/z* 350/352 ions also yielded fragment ions corresponding to a decarboxylation (*m/z* 306/308 ions), indicating that this decarboxylation should be on the carbon 9 as it was the case for Peak 3. Intense fragment ions of were observed at *m/z* 221/223 and corresponded to $[A+S]^-$ fragments. Taken together, those results indicated that this metabolite should be identified as 9-carboxy-DHN-MA. The second pair of twin ions was detected at *m/z* 364.1069/366.1136, and gave upon fragmentation almost the same fragment ions as the previous pair, with a mass difference of 14 a.m.u., which could be attributed to the occurrence of a COOH group instead of a CH_2OH group. This metabolite could then be identified as 9-carboxy-HNA-MA. Mercapturic acids derivatives of ω-oxidized HNE metabolites have been identified previously in rat urine, after intravenous administration [12]. Mercapturic acid metabolites derive from conjugation of the parent compound to glutathione, catalyzed by glutathione *S*-transferases, and the subsequent metabolization of the glutathione moiety into mercapturic acid [26].

Peak 8 eluted at 29.3 min and represented 1.25% of urinary radioactivity. Twin peaks were detected at *m/z* 203.0020/205.0091, in agreement with a $C_9H_{15}O_5$ molecular formula, as observed for Peak 5. However, the MS/MS fragmentation of this metabolite was quite different to that of Peak 5. Opposite to Peak 5, this peak gave an *m/z* 173 fragment ion characteristic of the elimination of CH_2O from a CH_2OH group present in the terminal position. Accordingly, this peak should then correspond to 8,9-dihydroxy-HNA.

Peak 9 eluted at 29.6 min and represented 5.2% of urinary radioactivity. Exact mass measurements revealed the occurrence of two pairs of twin peaks. The first pair was observed at *m/z* 185.0818/187.0882 ($C_9H_{13}O_4$), as for Peak 3. However, as for Peak 6, the MS/MS spectra of this compound showed a loss of 44 a.m.u. (yielding *the m/z* 141 fragment ion) from *the m/z* 185 precursor ion whereas a loss of 45 a.m.u. (yielding *the m/z* 142 fragment ion) occurred from *the m/z* 187 precursor ion, indicating that these fragment ions originated in a decarboxylation occurring on carbon 1. This metabolite should then correspond to 9-oxo-HNA. However, a structure corresponding to 9-hydroxy-4-oxo-HNA could also be in agreement with the mass spectrometric data. The second pair of twin peaks was observed at *m/z* 348.1109/350.1177 ($C_{14}H_{22}NO_7S$). As for Peak 7, this metabolite gave upon fragmentation the characteristic *m/z* 162 $[B]^-$ ion of a mercapturic acid conjugate. MS/MS fragmentation of *the m/z* 348/350 ions exhibited fragment ions corresponding to a decarboxylation (*m/z* 304/306 ions) indicating that this decarboxylation should take place on the C9 carbon atom (loss of 44 a.m.u. for both *m/z* 348 and 350 precursor ions). These results allowed the identification of this metabolite as 9-carboxy-HNE-MA.

Peak 10 eluted at 30.5 min and represented 2.1% of urinary radioactivity, and presented twin peaks at *m/z* 336.1486/338.1552 ($C_{14}H_{26}NO_6S$). Fragment ions corresponding to $[B-S]^-$ (*m/z* 128) and to $[A+S]^-$ (*m/z* 207/209) were observed in MS/MS, allowing to identify peak 10 as a mercapturic acid conjugate. Consecutive water and alcohol group losses from the 207/209 ions, respectively, led to the 189/191 and 159/160 fragment ions, in accordance with a loss of the labeled alcohol group on the C1 carbon atom. This metabolite was thus identified as hydroxy-DHN-MA, the other alcohol group likely being located on the C9 carbon atom.

Radioactivity between Peak 10 and 12 (named 11 in Fig. 5A) corresponded to 2.3% of urinary radioactivity. Two pairs of twin peaks could be detected at *m/z* 235.1011/237.1077 and 249.0803/251.0867 giving both, upon fragmentation, fragment ions corresponding respectively to a CO_2 loss (-44 a.m.u.) and to a methylthiol group loss (-48 a.m.u.). Both elemental compositions deduced from exact mass measurements and MS/MS fragmentation data allowed us to identify these metabolites as 9-hydroxy-3-thiomethyl-HNA and 3-thiomethyl-carboxy-HNA. Those metabolites were seen only in the 6–24 h urine, indicating either several steps in their formation or the intervention of microbial flora in the distal part of the intestine. This is, to our knowledge, the first report of thiomethyl metabolites of HNE. Their formation could arise from two putative ways. The first one could involve the action of hydrogen sulfide (H_2S) which is known to be a metabolic product of intestinal flora and is present in its free form in the distal parts of the intestine (for a review, see [27]). Hydrogen sulfide has been reported to scavenge HNE in vitro in neuronal cell culture and to prevent HNE adduction to cellular proteins [28]. This thiol compound could then be methylated by thiol S-methyltransferases in the intestine, as colon and cecal mucosa are believed to be major sites of thiol methylation [29]. The second one could involve the so-called mercapturic acid shunt. Most of the time, glutathione conjugates are transformed into mercapturic acids by two subsequent reactions, namely the cleavage of the γ-glutamyl bond of the glutathione moiety, leaving a thioether of cysteine, which is *N*-acetylated, forming a mercapturic acid derivative readily excreted into urine. In the mercapturic acid shunt, the cysteine conjugate is subjected to β-lyase action, giving a thiol compound, which can be methylated by thiol *S*-methyltransferases. β-Lyases from microbiota present in the distal parts of the intestine may play an important role in this process [30].

Peak 12 revealed no interpretable mass spectrometry signal, despite the presence of radioactivity detected at this retention time.

Peak 13 eluted at 38.5 min and represented 1.5% of urinary radioactivity. This peak was also a mixture of two pairs of twin peaks at *m/z* 332.1172/334.1239 and 346.0964/348.1031, respectively. Both pairs presented, upon fragmentation, the $[B]^-$ (*m/z* 162) and $[A+S]^-$ (*m/z* 203/205 and 217/219) ions characteristic of mercapturic acid conjugates. Under MS/MS, *the m/z* 346/348 pair also gave *the m/z* 302/304 fragment ions, corresponding to the elimination of CO_2 from the C9 carbon atom. Those compounds were thus respectively identified as 9-hydroxy-HNA–lactone-MA (although the position of the hydroxyl group on carbon 9 cannot be confirmed), and 9-carboxy-HNA–lactone-MA.

Peak 14 eluted at 41.1 min and represented 1.1% of urinary radioactivity. High resolution MS analysis revealed only one pair of twin peaks at *m/z* 199.0598/201.0667 with a molecular formula of $C_9H_{11}O_5$. Fragment ions corresponding to a decarboxylation on the C9 carbon atom (*m/z* 155/157 ions) were observed, enabling to

hypothesize the presence of 9-carboxy-4-oxo-nonenoic acid. However, as this metabolite should have lost the tritium on carbon 4, the radioactive peak should correspond to another metabolite that could not be characterized by LCMS.

Peak 15 and 16 eluted at 42.1 and 42.7 min and represented 4.38% and 3.9% of urinary radioactivity, respectively. For both of them, MS analysis gave a pair of twin peaks at *m/z* 189.1132(3)/191.1198(9) (Table 1) in agreement with a $C_9H_{17}O_4$ chemical formula. The MS/MS analysis revealed the presence of a fragment ion at *m/z* 129 for both metabolites and both twin peaks, together with the complementary twin fragment ions at *m/z* 59/61, indicating the loss of a CH_3COOH group on carbon 1 (Fig. 8). Taken together, these results indicate the presence of hydroxylated 4-hydroxy-nonanoic acid. The presence of two radioactive peaks suggests the occurrence of two region-isomers bearing the hydroxyl group on two different positions (likely on C9 for one metabolite and on C8 for the other). It is noteworthy that the fragmentation pattern is quite different from the one of hydroxylated-HNA (Peak 6) for which a loss of 44 a.m.u. (CO_2) instead of 60 a.m.u. (CH_3COOH) was observed, probably due to the presence of the double bond between C2 and C3, precluding any fragmentation at this location. Those peaks were thus tentatively identified as 4,8-hydroxy-nonanoic acid and 4,9-hydroxy-nonanoic acid. Those metabolites are the saturated counterparts of hydroxy-HNA. Reduction of the HNE double bond has previously been described by our group in in vitro studies performed on colonocytes. It was followed by an oxidation of the aldehyde function [17]. This saturation pathway could involve NADPH-dependent alkenal/one oxidoreductase as reported by some authors [31]. 4,8-Hydroxy-nonanoic acid and 4,9-hydroxy-nonanoic acid have been reported by Jin et al. [23] and by Laurent et al. [20], as metabolites of HNE.

Peak 17 revealed no interpretable mass spectrometric signal. Radioactivity between peak 17 and peak 18 gave two pairs of twin peaks, at *m/z* 333.1554/335.1621, 347.1346/349.1416 giving either a fragment ion at *m/z* 193 or fragment ions corresponding to a loss of 176 a.m.u. All these features can be considered as characteristic of glucuronidated metabolites [32]. Twin peaks at *m/z* 333/335 and at 347/349 should then correspond to DHN–glucuronide and HNA–glucuronide, respectively, with a respective chemical formula of $C_{15}H_{25}O_8$ and $C_{15}H_{23}O_9$. To our knowledge, this is the first report of glucuronide conjugates as metabolites of HNE.

Peak 18 and 19 eluted at 47.0 and 47.3 min and represented respectively 6.5% and 7% of urinary radioactivity. They both revealed twin peaks at *m/z* 320.1539/322.1603 ($C_{14}H_{26}NO_5S$) upon high resolution MS analysis, with a common fragment ion at *m/z* 128 and twin fragments at 191/193, characteristic of the mercapturic acid of DHN. DHN-MA has been reported by our group to be the major HNE metabolite after intravenous administration [11]. The present study showed that DHN-MA, although being quantitatively an important HNE metabolite, was not the major one after oral administration. This can be attributed to the important oxidative metabolism observed by our group in vitro in intestinal epithelial cells [17]. In Peak 19, we observed the concomitant presence of a twin peak at *m/z* 334.1331/336.1395 ($C_{14}H_{24}NO_6S$) giving in MS/MS a twin fragment of *m/z* 290/292 characteristic of the loss of a carboxylate group (not located on the C1 carbon atom), together with the presence of characteristic fragment ions of a mercapturic acid conjugate, indicating the presence of HNA-MA in this radioactive peak.

Peak 20 eluted at 48.7 min and represented 1.35% of urinary radioactivity. This peak exhibited two pairs of twin peaks at *m/z* 318.1379/320.1445 ($C_{14}H_{24}NO_5S$) and 334.1328/336.1396

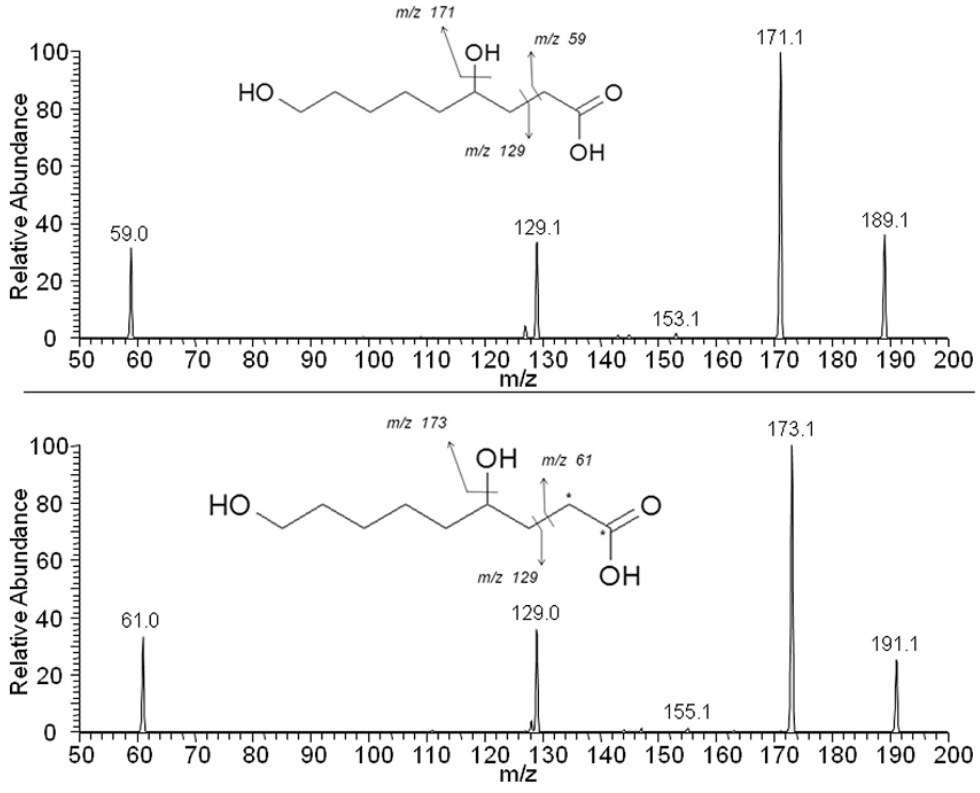


Fig. 8. Fragmentation mass spectra and interpretation for ions 189.1132 (^{12}C-HNE metabolite) and 191.1198 (^{13}C-HNE metabolite).

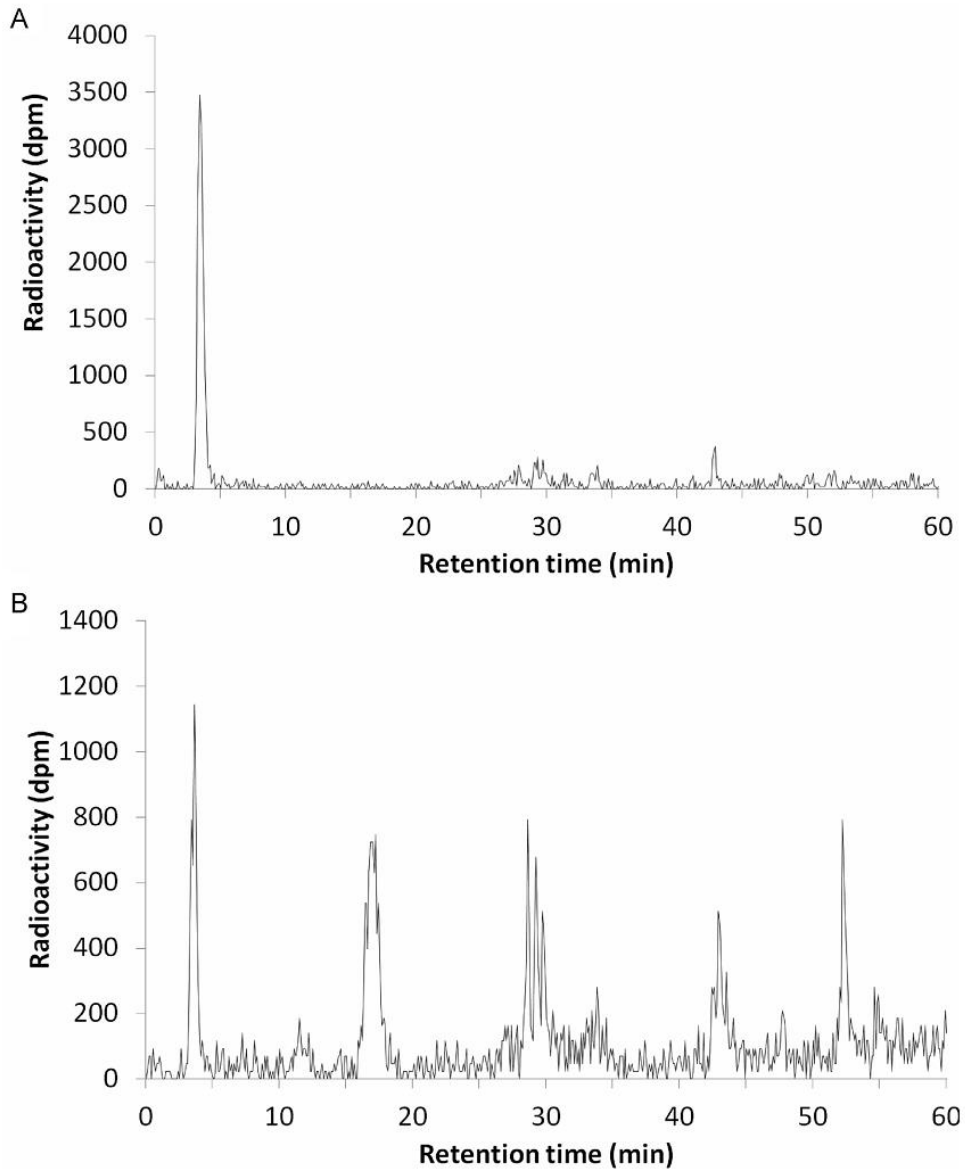


Fig. 9. Cecal radio-HPLC profile at 24 h (A) and fecal 0–24 h radio-HPLC profile (B) of rats treated with HNE.

($C_{14}H_{24}NO_6S$). MS/MS analysis yielded fragment ions at *m/z* 162 and 128 that are characteristic of mercapturic acid conjugates and twin fragment ions at *m/z* 189/191 and *m/z* 205/207, respectively corresponding to the complementary ions of $[HNE+S]^-$ and $[HNA+S]^-$, confirming the presence of HNE-MA and HNA-MA. This peak co-eluted with HNA-MA standard.

Analyses carried out between Peak 20 and 21 revealed the presence of twin peaks at *m/z* 219.1064/221.1130 ($C_{10}H_{19}O_3S$) indicating the presence of a sulfur atom in the molecule. Fragmentation of *the m/z* 219 ion gave daughter ions at *m/z* 175 and *m/z* 171 that were respectively attributed to the loss of a carboxylic group and of a thiomethyl group respectively, indicating that this compound could correspond to a thiomethyl derivative of HNA.

Peak 21 eluted at 52.7 min and represented 4.31% of urinary radioactivity. MS analysis revealed twin peaks at *m/z* 316.1225/318.1285 ($C_{14}H_{22}NO_5S$) both giving upon fragmentation an intense peak at *m/z* 162, characteristic of a mercapturic acid. This fragmentation is in accordance with the presence of HNA–lactone-MA.

DHN-MA, HNE-MA, HNA-MA, HNA–lactone-MA are expected urinary metabolites that have been observed in most in vivo studies done on HNE metabolism [11,13]. Some of them, such as DHN-MA, are used as lipid peroxidation biomarkers [33,34].

Intestinal contents and feces analyses

We also analyzed by radio-HPLC intestinal contents (stomach, small intestine, cecum and colon) and feces.

As well as in 0–24 h and 6–24 h urine analyses, intestinal contents and feces radio-HPLC profiles displayed an important peak with an early retention time. As demonstrated earlier, this peak was identified as tritiated water.

In intestinal contents, it was clearly the major peak, representing between 50% and 71% of the radioactivity in the sample (Fig. 9A).

In contrast, tritiated water represented only 16% of the total radioactivity in feces (Fig. 9B). It could be explained by the fact that an important part of the water present in intestinal contents is reabsorbed in the colon.

Four other groups of peaks could be determined at 17.2 min, 28.6 min, 42.9 min and 52.2 min.

In order to attempt to identify those fecal metabolites, we performed HRMS and MS/MS analyses of radio-HPLC collected fractions. Unfortunately, no twin peaks were identified in those samples, probably because of the necessary concentration/evaporation steps before MS/MS analyses, due to low concentration of metabolites in the samples studied.

Conclusion

The metabolite tracking methodology allowed the specific identification of HNE urinary metabolites and gave valuable insights into chemical function positions. All together these results indicate a prominent role of oxidation pathways, on carbon 1 bearing the aldehyde function and also on the terminal carbon, in the metabolization of HNE after oral administration. These first oxidation steps are most probably followed by β-oxidation steps originating from the carbon 1 and/or 9 of HNA and finally the production of water. Those pathways are quantitatively more important than the mercapturic acid pathway with more than 50% of total urinary radioactivity, while mercapturic conjugates represent around 30% of urinary radioactivity. Those oxidation pathways underline the importance of aldehyde dehydrogenase (ALDH) and of cytochrome P450 4A enzyme families in the respective oxidation of the HNE aldehyde function on carbon 1 and the terminal oxidation on carbon 9. As a consequence of those prominent oxidative pathways involved in HNE metabolization after oral administration, DHN-MA did not represent the major urinary metabolite as reported after intravenous administration [11]. The huge excretion of this metabolite after a heme-iron rich diet in rats, almost 10 μg/24 h, shows that important quantities of HNE can be absorbed and be metabolized, and could also be related to promotion of colon carcinogenesis [33,35].

The metabolite tracking methodology allowed also to specifically detect quantitatively novel minor HNE urinary metabolites such as thiomethyl and glucuronide derivatives. Studies are under progress to determine if those metabolites are specific of an oral administration, and in the case of the HNA-thiomethyl metabolites, if their parent thiol compounds could bear some toxicity.

Conflict of interest

The authors report no potential conflicts of interest.

Acknowledgments

We thank ITMO Cancer (Plan cancer 2009–2013)/INCa/INSERM for financial support for the “NeoMeaTox” project. This work was also supported by COST CM1001.

We also want to thank Florence Blas-y-Estrada for animal care.

References

[1] C.M. Seppanen, A. Saari Csallany, Formation of 4-hydroxynonenal, a toxic aldehyde, in soybean oil at frying temperature, Journal of American Oil Chemists' Society 79 (10) (2002) 1033–1038. http://dx.doi.org/10.1007/s11746-002-0598-z.

[2] C.M. Seppanen, A.S. Csallany, Incorporation of the toxic aldehyde 4-hydroxy-2-trans-nonenal into food fried in thermally oxidized soybean oil, Journal of American Oil Chemists' Society 81 (12) (2004) 1137–1141. http://dx.doi.org/10.1007/s11746-004-1031-3.

[3] T. Sakai, S. Kuwazuru, A lipid peroxidation-derived aldehyde, 4-hydroxy-2-nonenal, contents in several fish meats, Fisheries Sciences 61 (3) (1995) 527–528, http:dx.doi.org/10.2331/fishsci.61.527.

[4] T. Sakai, Y. Shimizu, S. Kawahara, Effect of NaCl on the lipid peroxidation-derived aldehyde, 4-hydroxy-2-nonenal, formation in boiled pork, Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 70 (4) (2006) 815–820. http://dx.doi.org/10.1271/bbb.70.815 16636446.

[5] J. Surh, S. Lee, H. Kwon, 4-Hydroxy-2-alkenals in polyunsaturated fatty acids-fortified infant formulas and other commercial food products, Food Additives and Contaminants 24 (11) (2007) 1209–1218. http://dx.doi.org/10.1080/02652030701422465 17852396.

[6] N. Gasc, S. Taché, E. Rathahao, J. Bertrand-Michel, V. Roques, F. Guéraud, 4-Hydroxynonenal in foodstuffs: heme concentration, fatty acid composition and freeze-drying are determining factors, Redox Report 12 (1) (2007) 40–44. http://dx.doi.org/10.1179/135100007X162257 17263907.

[7] A. Nishikawa, R. Sodum, F.L. Chung, Acute toxicity of trans-4-hydroxy-2-nonenal in Fisher 344 rats [corrected], Lipids 27 (1) (1992) 54–58. http://dx.doi.org/10.1007/BF02537060 1608305.

[8] H.J. Segall, D.W. Wilson, J.L. Dallas, W.F. Haddon, Trans-4-hydroxy-2-hexenal: a reactive metabolite from the macrocyclic pyrrolizidine alkaloid senecionine, Science 229 (4712) (1985) 472–475. http://dx.doi.org/10.1126/science.4012327 4012327.

[9] M. Wacker, P. Wanek, E. Eder, Detection of 1,N2-propanodeoxyguanosine adducts of trans-4-hydroxy-2-nonenal after gavage of trans-4-hydroxy-2-nonenal or induction of lipid peroxidation with carbon tetrachloride in F344 rats, Chemico-Biological Interactions 137 (3) (2001) 269–283. http://dx.doi.org/10.1016/S0009-2797(01)00259-9 11566294.

[10] S.C. Kang, H.-W. Kim, K.B. Kim, S.J. Kwack, I.Y. Ahn, J.Y. Bae, et al., Hepatotoxicity and nephrotoxicity produced by 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) following 4-week oral administration to Sprague-Dawley rats, Journal of Toxicology and Environmental Health A 74 (12) (2011) 779–789. http://dx.doi.org/10.1080/15287394.2011.567952 21541880.

[11] J. Alary, F. Bravais, J.P. Cravedi, L. Debrauwer, D. Rao, G. Bories, Mercapturic acid conjugates as urinary end metabolites of the lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal in the rat, Chemical Research in Toxicology 8 (1) (1995) 34–39. http://dx.doi.org/10.1021/tx00043a004 7703364.

[12] J. Alary, L. Debrauwer, Y. Fernandez, A. Paris, J.P. Cravedi, L. Dolo, et al., Identification of novel urinary metabolites of the lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal in rats, Chemical Research in Toxicology 11 (11) (1998) 1368–1376. http://dx.doi.org/10.1021/tx980068g 9815199.

[13] L.L. De Zwart, R.C.A. Hermanns, J.H.N. Meerman, J.N.M. Commandeur, N.P.E. Vermeulen, Disposition in rat of [2–3H]-trans-4-hydroxy-2,3-nonenal, a product of lipid peroxidation, Xenobiotica 26 (10) (1996) 1087–1100. http://dx.doi.org/10.3109/00498259609167424.

[14] C.K. Winter, H.J. Segall, A.D. Jones, Distribution of trans-4-hydroxy-2-hexenal and tandem mass spectrometric detection of its urinary mercapturic acid in the rat, Drug Metabolism and Disposition 15 (5) (1987) 608–612 2891475.

[15] F. Bravais, D. Rao, J. Alary, R.C. Rao, L. Debrauwer, G. Bories, Synthesis of 4-hydroxy[4-3H]-2(E)-nonen-1-al-diethylacetal, Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals 36 (5) (1995) 471–477. http://dx.doi.org/10.1002/jlcr.2580360511.

[16] I. Jouanin, V. Sreevani, E. Rathahao, F. Guéraud, A. Paris, Synthesis of the lipid peroxidation product 4-hydroxy-2(E)-nonenal with13C stable isotope incorporation, Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals 51 (2) (2008) 87–92. http://dx.doi.org/10.1002/jlcr.1485.

[17] M. Baradat, I. Jouanin, S. Dalleau, S. Taché, M. Gieules, L. Debrauwer, et al., 4-hydroxy-2(E)-nonenal metabolism differs in Apc(+/+) cells and in Apc(Min/+) cells: it may explain colon cancer promotion by heme iron, Chemical Research in Toxicology 24 (11) (2011) 1984–1993. http://dx.doi.org/10.1021/tx2003036 21967605.

[18] I. Jouanin, M. Baradat, M. Gieules, S. Taché, F.H.F. Pierre, F. Guéraud, et al., Liquid chromatography/electrospray ionisation mass spectrometric tracking of 4-hydroxy-2(E)-nonenal biotransformations by mouse colon epithelial cells using [1,2-13C2]-4-hydroxy-2(E)-nonenal as stable isotope tracer, Rapid Communications in Mass Spectrometry 25 (19) (2011) 2675–2681. http://dx.doi.org/10.1002/rcm.5033.

[19] IRSN, Tritium and the Environment. Radionuclide Sheet, , 2012 http://www.irsn.fr/EN/Research/publications-documentation/radionuclides-sheets/environment/Pages/Tritium-environment.aspx..

[20] A. Laurent, E. Perdu-Durand, J. Alary, L. Debrauwer, J.P. Cravedi, Metabolism of 4-hydroxynonenal, a cytotoxic product of lipid peroxidation, in rat precision-cut liver slices, Toxicology Letters 114 (1–3) (2000) 203–214. http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4274(99)00301-X 10713486.

[21] W.G. Siems, H. Zollner, T. Grune, H. Esterbauer, Metabolic fate of 4-hydroxynonenal in hepatocytes: 1,4-dihydroxynonene is not the main product, Journal of Lipid Research 38 (3) (1997) 612–622 9101442.
[22] T. Grune, W.G. Siems, T. Petras, Identification of metabolic pathways of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in situ perfused rat kidney, Journal of Lipid Research 38 (8) (1997) 1660–1665 9300788.
[23] Z. Jin, J.M. Berthiaume, Q. Li, F. Henry, Z. Huang, S. Sadhukhan, et al., Catabolism of (2E)-4-hydroxy-2-nonenal via ω- and ω-1-Oxidation stimulated by ketogenic diet, Journal of Biological Chemistry 289 (46) (2014) 32327–32338. http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M114.602458 25274632.
[24] F. Guéraud, J. Alary, P. Costet, L. Debrauwer, L. Dolo, T. Pineau, et al., In vivo involvement of cytochrome P450 4A family in the oxidative metabolism of the lipid peroxidation product trans-4-hydroxy-2-nonenal, using PPARalpha-deficient mice, Journal of Lipid Research 40 (1) (1999) 152–159 9869661.
[25] T. Aoyama, J.P. Hardwick, S. Imaoka, Y. Funae, H.V. Gelboin, F.J. Gonzalez, Clofibrate-inducible rat hepatic P450s IVA1 and IVA3 catalyze the Omega- and (omega-1)-hydroxylation of fatty acids and the Omega-hydroxylation of prostaglandins E1 and F2 alpha, Journal of Lipid Research 31 (8) (1990) 1477–1482 2280187.
[26] G.J. Mulder, Conjugation Reactions in Drug Metabolism: An Integrated Approach, CRC Press, Taylor and Francis, London, 1990.
[27] F. Blachier, A.-M. Davila, S. Mimoun, P.-H. Benetti, C. Atanasiu, M. Andriamihaja, et al., Luminal sulfide and large intestine mucosa: friend or foe? Amino Acids 39 (2) (2010) 335–347. http://dx.doi.org/10.1007/s00726-009-0445-2 20020161.
[28] S.M. Schreier, M.K. Muellner, H. Steinkellner, M. Hermann, H. Esterbauer, M. Exner, et al., Hydrogen sulfide scavenges the cytotoxic lipid oxidation product 4-HNE, Neurotoxocity Research 17 (3) (2010) 249–256. http://dx.doi.org/10.1007/s12640-009-9099-9 19680736.
[29] R.A. Weisiger, L.M. Pinkus, W.B. Jakoby, Thiol S-methyltransferase: suggested role in detoxication of intestinal hydrogen sulfide, Biochemical Pharmacology 29 (20) (1980) 2885–2887. http://dx.doi.org/10.1016/0006-2952(80)90029-57437088.
[30] I.M. Arias, J.L. Boyer, N. Fausto, Liver: Biology and Pathobiology, 3, Raven Pr, New York, 1994.
[31] R.A. Dick, M.K. Kwak, T.R. Sutter, T.W. Kensler, Antioxidative function and substrate specificity of NAD(P)H-dependent alkenal/one oxidoreductase. A new role for leukotriene B4 12-hydroxydehydrogenase/15-oxoprostaglandin 13-reductase, Journal of Biological Chemistry 276 (44) (2001) 40803–40810. http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M105487200 11524419.
[32] K. Levsen, H.-M. Schiebel, B. Behnke, R. Dötzer, W. Dreher, M. Elend, et al., Structure elucidation of phase II metabolites by tandem mass spectrometry: an overview, Journal of Chromatography A 1067 (1–2) (2005) 55–72. http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.165 15844510.
[33] F. Pierre, G. Peiro, S. Taché, A.J. Cross, S.A. Bingham, N. Gasc, et al., New marker of colon cancer risk associated with heme intake: 1,4-dihydroxynonane mercapturic acid, Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention 15 (11) (2006) 2274–2279. http://dx.doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-06-0085 17119057.
[34] G. Peiro, J. Alary, J.-P. Cravedi, E. Rathahao, J.-P. Steghens, F. Guéraud, Dihydroxynonene mercapturic acid, a urinary metabolite of 4-hydroxynonenal, as a biomarker of lipid peroxidation, Biofactors (Oxford England) 24 (1–4) (2005) 89–96. http://dx.doi.org/10.1002/biof.5520240110 16403967.
[35] F. Pierre, S. Tache, F. Guéraud, A.L. Rerole, M.-L. Jourdan, C. Petit, Apc mutation induces resistance of colonic cells to lipoperoxide-triggered apoptosis induced by faecal water from haem-fed rats, Carcinogenesis 28 (2) (2007) 321–327. http://dx.doi.org/10.1093/carcin/bgl127 16885197.

3. Conclusion

Cette étude de métabolisme, nous a permis de caractériser et de quantifier les métabolites du HNE présents dans l'urine suite à une exposition par voie orale chez le rat grâce à une méthode innovante de suivi isotopique et radioactif. Les voies majeures de métabolisation du HNE ont été identifiées et quantifiées, comme l'oxydation sur les carbones 1 et 9, la β-oxydation et la voie des acides mercapturiques. De plus, de nouveaux métabolites urinaires tel que des conjugués thiométhyles et glucuronides ont été mis en évidence pour la première fois.

Depuis la publication de cet article, de nouvelles analyses ont été effectuées : les adduits entre le ^{12}C-HNE et le ^{13}C-HNE et les protéines ont été détectés dans des organes hors de la sphère digestive (muscle, foie et cœur). L'objectif était de déterminer si le HNE absorbé par voie orale était capable de sortir de la sphère digestive sous forme biologiquement active, pour exercer des effets délétères dans d'autres organes. Cette analyse a été réalisée par la plateforme d'exploration du métabolisme (INRA de Clermont-Theix) et est basée sur un dosage en GCMS après dérivation par silylation. Cette étude a montré que le rapport molaire entre le ^{12}C et le ^{13}C dans les adduits HNE-protéine est supérieur à ce qui est attendu de manière naturelle, prouvant que des adduits ^{13}C-HNE/protéine se retrouvent dans ces organes. Ainsi, les adduits ^{13}C-HNE/protéine représentent en moyenne 10% du total des adduits HNE/protéine retrouvés dans le foie et le cœur. Sachant que dans cette étude, le ^{13}C-HNE administré ne représente que la moitié du HNE total par voie orale, on peut extrapoler à 20% le taux d'adduits HNE/protéine dans ces organes, formé avec du HNE d'origine alimentaire, apporté par gavage à hauteur de 2mg.

Si l'origine alimentaire du HNE engagé dans ces adduits laisse peu de doutes, on peut se demander si le HNE a été transporté libre jusque dans ces tissus périphériques ou s'il a été métabolisé par la sphère digestive, transporté sous forme de conjugué puis déconjugué dans les tissus périphériques. En effet, comme le montre une étude sur des fractions cytosoliques de rein et de foie de rat, la déconjugaison du HNE-GSH est possible (Alary et al., 2003b). Comme décrit au chapitre « Le métabolisme *in vivo »* (p33), ces données permettent de suggérer qu'*in vivo*, après formation du HNE-GSH, celui-ci pourrait être transporté dans l'organisme avant d'être déconjugué, le HNE pouvant ainsi avoir des effets délétères à distance de son lieu de production. Cependant, il est à noter que cette réaction doit se réaliser dans une faible mesure dans des conditions physiologiques.

Ces résultats préliminaires nécessitent un approfondissement mais présentent un grand intérêt. En effet, le fait de trouver, hors de la sphère digestive, des adduits causés par du HNE d'origine alimentaire pourrait mettre en évidence un lien entre consommation de produits riche en HNE (ou à fort pouvoir lipoperoxydant) et pathologies non digestives. Une association épidémiologique entre la consommation de fer héminique et le risque de cancer du sein a par exemple récemment été mise en évidence dans une étude prospective (Diallo et al., 2016). De plus, cette étude montre que le risque est diminué lors de la consommation d'antioxydant, renforçant l'hypothèse selon laquelle le lien de causalité entre fer héminique et cancer du sein passe par la lipoperoxydation.

II. Effet du fer héminique et du HNE sur la cancérogénèse colorectale et l'inflammation

Dans cette deuxième partie, nos objectifs sont d'étudier les effets cancérigène et inflammatoire du fer héminique et du HNE.

1. Faire parvenir une dose cible de HNE dans le côlon

Afin de mimer, chez des rats F344, l'exposition du côlon au HNE suite à une consommation de fer héminique, notre objectif est de faire parvenir du HNE jusque dans la lumière colique, de façon contrôlée, dans le but de pouvoir étudier ses effets sur le côlon.

Plusieurs contraintes se sont imposées à nous :

- Le HNE est un produit très réactif et donc fragile (Schaur, 2003)
- Le mode d'administration doit permettre une exposition quotidienne pendant quelques jours (pour les études de court terme) à plusieurs mois (pour les études de cancérogénèse)
- Le rendement de l'exposition (proportion du HNE administré qui atteint effectivement le côlon par rapport au HNE total administré) doit être optimisé afin de consommer le moins possible de HNE (long et contraignant à synthétiser chimiquement)

Au début du projet, plusieurs stratégies s'offraient à nous afin d'exposer la lumière colique au HNE :

- L'exposition par instillation rectale ne semblait pas envisageable vis à vis de la contrainte de l'exposition quotidienne, du point de vue du bien-être animal
- L'exposition par pose d'un cathéter colique était envisageable sur des expérimentations de courte durée (quelques jours) mais difficile à mettre en place et à maintenir sur des périodes plus longues comme l'exigent les expérimentations de cancérogénèse
- L'administration par voie orale semblait peu envisageable vis-à-vis du rendement très faible que ce mode d'exposition a montré lors de travaux préliminaires de l'équipe (non publié)
- L'administration par voie orale de capsules à libération lente permettant de protéger le HNE jusque dans les parties basses du tube digestif

Il est à noter que du point de vue de l'exposition des différentes parties du tube digestif au HNE, aucune des stratégies proposées ci-dessus ne modélise parfaitement l'exposition de l'intégralité du tube digestif lors d'une consommation de fer héminique. En effet, selon l'hypothèse impliquant le fer héminique dans la catalyse de la formation du HNE dans le tube digestif, on suppose que la formation de HNE est continue tout au long du tube digestif. Ainsi, c'est probablement l'administration directe par voie orale qui mime le mieux l'exposition des parties hautes du tube digestif, mais pas des parties basses du fait d'une absorption probablement importante dans les parties hautes. À l'inverse, les 3 autres stratégies (instillation rectale, cathéter colique, capsules à libération lente) permettent une exposition contrôlée des parties basses du tube digestif. Le côlon étant notre organe d'intérêt, ce sont donc ces 3 stratégies qui semblent les plus adaptées.

La vectorisation d'une molécule d'intérêt dans le but d'exposer spécifiquement le côlon ayant déjà été utilisée chez le rat avec du butyrate (Caderni, 2001), c'est donc cette dernière méthode que nous avons choisi de développer.

a. Les capsules et billes à libération colique

Un partenariat avec une équipe de l'Oniris de Nantes (Denis Poncelet, Unité GEPEA, Génie des Procédés Environnement Agro-alimentaire) a donc été établi afin de travailler à la mise au point de capsules de HNE à libération colique chez le rat.

Les contraintes suivantes ont été établies pour la production des capsules :

- Les capsules doivent être de petite taille (<1mm), de manière à être acceptées par les rats en étant ajoutées à leur ration quotidienne (qui est semi-synthétique sous forme de poudre).
- Les capsules doivent avoir une certaine résistance mécanique afin de pouvoir être intégrées dans la ration des animaux (régime semi-synthétque AIN76 sous forme de poudre) sans être endommagées et de pouvoir être ingérées par les animaux sans libération de leur contenu dans les parties hautes du tube digestif.
- Les capsules doivent libérer leur contenu dans le côlon ou dans les parties basses du tube digestif, elles doivent donc être gastro-résistantes.
- Les capsules doivent avoir un contenu lipidique, bon solvant potentiel pour le HNE étant donné son caractère plutôt lipophile.
- Les températures trop élevées doivent être évitées au cours de la production des capsules afin d'éviter la dégradation du HNE.
- Le stockage des capsules doit pouvoir se faire à une température égale ou inférieure à 4°C afin de permettre leur stockage dans des conditions permettant d'éviter la dégradation du HNE.

i. Capsules

Compte tenu des contraintes définies, l'équipe partenaire à l'Oniris a, dans un premier temps, choisi une technique de gélification externe/co-extrusion en utilisant un appareil d'encapsulation Buchi (ENCAPSULATOR B390) doté d'un système à buses concentriques permettant de produire des capsules à noyau-enveloppe en une seule étape de processus (**Figure 25**). L'enveloppe offrant des propriétés de résistance mécanique, de gastro-résistance et de libération colique et le cœur, composé d'huile, servant de solvant au HNE.

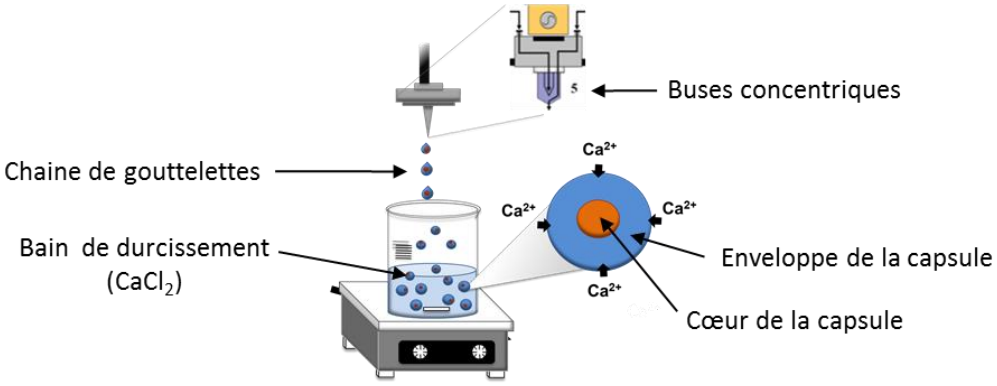


***Figure 25 :** Schéma du dispositif d'encapsulation du HNE*

Suite au choix du procédé, différentes formulations de l'enveloppe ont été testées du point de vue de la production et de la dissolution en milieu acide (dans des tampons mimant la digestion de manière très simplifiée).

Ces tests ont permis de choisir une enveloppe à base d'un mélange d'alginate à 2% et de shellac à 10%. Ces deux produits sont utilisés notamment dans l'industrie agro-alimentaire et pharmaceutique.

L'alginate est un mélange de polysaccharides issus d'algues brunes et confère aux capsules des propriétés de libération retardée en étant dégradée par des enzymes de la flore intestinale. Le shellac est un polymère naturel biodégradable produit par un insecte. Il a une faible perméabilité à l'eau et a de bonnes propriétés pour former des films. Il est utilisé pour former des enrobages protecteurs, comme masqueur de goût et confère également des propriétés de libération prolongée et de gastro-résistance.
Cette formulation a ensuite été optimisée du point de vue de la technique de production (centrage du cœur pour éviter les fuites, homogénéité des lots de production, diamètre des capsules, coating,…).
Dès l'obtention d'un lot satisfaisant en termes de génie des procédés et montrant des résultats satisfaisants sur les tests de non dissolution en milieu acide, nous avons réalisé des tests *in vivo*. Pour chaque lot de capsule testé, un premier test consistait à évaluer l'acceptabilité par les rats des capsules à hauteur de 2% de leur ration d'aliment. Pour cela, les capsules étaient mélangées à la ration sous forme de poudre puis distribuées en début de période d'activité des animaux. La ration non consommée était ensuite récupérée en fin de période d'activité afin d'effectuer un suivi de la consommation (**Figure 26**).

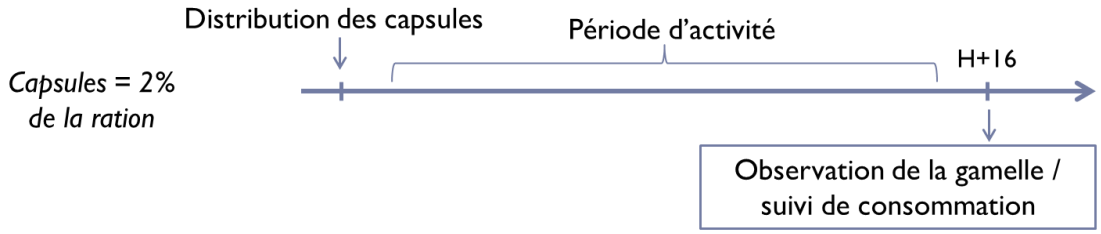


Figure 26 : *Déroulement du protocole expérimental d'acceptabilité des capsules*

Si l'acceptabilité était jugée bonne (plus de 80% de la ration consommée), le lot de capsules était alors testé du point de vue de la gastro-résistance. Dans la littérature, certains auteurs testent la libération retardée de leur produit d'intérêt en utilisant la digestion *in vitro* grâce à des milieux digestifs humains simulés. D'autres travaillent i*n vivo* et dosent le composé encapsulé libéré, soit dans le côlon soit dans le sang s'il est absorbé (Caderni, 2001).

Dans notre étude, nous avons été confrontés à plusieurs contraintes :

- Concernant la digestion *in vitro,* suite à une étude de la littérature, nous avons constaté qu'il existe des différences physiologiques, particulièrement de pH, entre la digestion chez l'homme et chez le rat. Or, à notre connaissance, seuls des milieux digestifs humains sont aujourd'hui simulés, et cet outil n'existe pas encore chez le rat.
- Concernant une étude du relargage du produit *in vivo,* nous avons été confrontés au début de ce projet à l'absence de technique suffisamment sensible permettant de doser le HNE dans les contenus digestifs ou dans les fèces.

Face à ces contraintes, nous avons donc fait le choix d'établir un protocole nous permettant d'estimer la libération des capsules dans le tube digestif par dénombrement à la loupe binoculaire des capsules et définition de leur état (intacte ou vide) dans les différentes parties du tube digestif. Pour permettre une estimation plus facile de l'état des capsules, ces dernières ont été remplies d'huile contenant un colorant rouge, favorisant leur observation. Des mises au point ont été nécessaires afin d'optimiser les conditions d'observation des capsules dans le tube digestif des rats (temps de mise à disposition de la ration contenant les capsules, temps de transit, délai avant observation des contenus des organes digestifs)

✓ *Déterminer si les capsules libèrent leur contenu dans le tube digestif*

Après mise à disposition d'une ration contenant 2% de capsules (composition de l'enveloppe : alginate 2%, shellac 10%) pendant la période d'activité des animaux, nous avons récolté, dénombré et estimé l'état des capsules dans les fèces de J0 à J4.

On retrouve 1% des capsules ingérées pleines dans les fèces, entre t0 et t40h (soit 24h après la dernière ingestion théorique de capsules, si consommation en fin de période d'activité), on peut donc conclure que 99% des capsules libèrent leur contenu dans le tube digestif des rats.

✓ *Estimer la perte de capsules avant le côlon, en suivant un pool de capsules*

Afin d'estimer la perte des capsules avant le côlon, nous avons mis au point un protocole nous permettant de suivre un lot de capsules, consommées sur un temps court. Les rats sont soumis, 24h avant la distribution des capsules, à une diminution de leur ration (65% de leur consommation habituelle), afin de provoquer une consommation rapide de la ration contenant les capsules mises à disposition le lendemain. La ration contenant 2% de capsules est mise à disposition en début de période d'activité pendant un temps court, avant retour à une ration témoin pendant 2h. Après ce temps, les animaux sont mis à mort afin de dénombrer et estimer l'état des capsules dans les différentes parties du tube digestif (**Figure 27**).

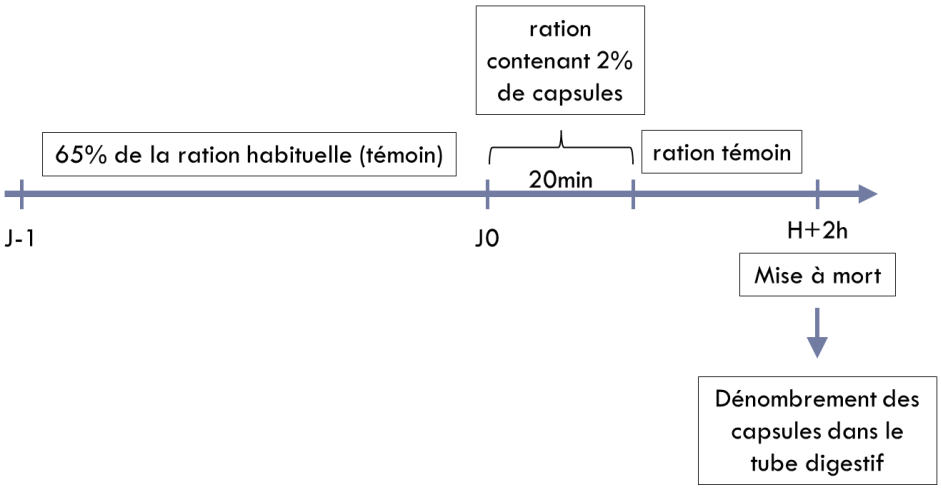


Figure 27 : *Déroulement du protocole expérimental d'estimation de la perte de capsules avant le côlon*

L'enveloppe du lot de capsules le plus performant que nous ayons testé était composée de 2% d'alginate, 10% de shellac et d'un enrobage supplémentaire de shellac (coating). Lors du test *in vivo* réalisé avec ces capsules, nous avons retrouvé 8% des capsules qui avaient été ingérées, pleines dans le tube digestif (entre l'estomac et la partie proximale du côlon), démontrant une perte de près de 90% des capsules avant le côlon.

✓ *Evaluer la perte de capsules au moment de la prise*

Au cours la mise au point, des questions se sont posées sur la perte de capsules lors de la prise alimentaire par les rats. Nous avons donc réalisé une étude nous permettant de répondre à cette question lors de laquelle nous avons comparé l'état des capsules dans l'estomac de rats ayant consommé des capsules mises à disposition avec la poudre du régime ou de rats ayant reçu les capsules *via* l'administration 'forcée' d'une pâte contenant des capsules à l'aide d'une seringue, afin d'éviter une éventuelle destruction des capsules par écrasement entre les dents.

Au cours de cette étude, nous avons disséqué les animaux peu de temps après l'administration des capsules (maximum 25min), dans le but de pouvoir observer les capsules dans l'estomac, avant même

que le transit n'avance. Nous n'avons pas trouvé de différence entre les animaux ayant consommé les capsules dans leur ration et ceux ayant reçu les capsules par administration 'forcée', nous permettant de conclure que les rats ne croquent pas les capsules lors de leur administration *via* la ration.

ii. Billes

Après cette première série d'études sur des capsules d'alginate/shellac ne présentant pas l'efficacité attendue en termes de libération colique, l'équipe partenaire a choisi de changer de processus de fabrication et de travailler à la mise au point de billes poreuses à libération retardée (**Figure 28**). Pour cette technique, des billes de silice (IBERSIL 250, silice de 250µm) sont mélangées pendant 1 heure avec de l'huile contenant du HNE, afin de charger le produit à vectoriser dans la structure interne des billes. Enfin, les billes sont mélangées avec de la cire chaude (Geleol Mono et Diglycerides NF G à 56°C). Cet enrobage de cire confère aux billes des propriétés gastro-résistantes, et leur permet de se dissoudre dans la lumière de l'intestin.

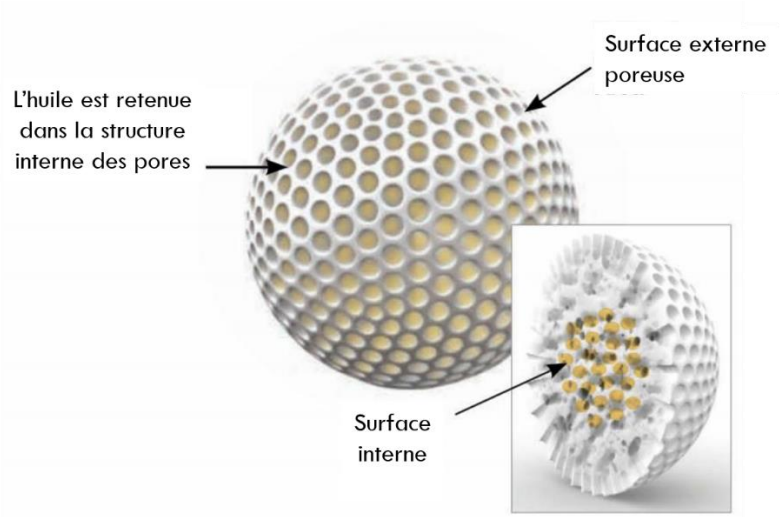


Figure 28 : *Structure des billes de silice poreuses*

Avec ces billes, nous avons été contraints de changer de méthode pour estimer le relargage du contenu des billes car celles-ci sont beaucoup trop petites et beaucoup trop nombreuses pour l'utilisation de la technique de dénombrement à la loupe binoculaire appliquée jusque-là avec les capsules. Le dosage du HNE à partir d'extraits aqueux de fèces ayant était mis au point par la plateforme AXIOM de chimie analytique de ToxAlim, nous avons donc décidé d'utiliser cette fois des billes chargées en HNE pour pouvoir ensuite doser notre composé d'intérêt dans les différents contenus du tube digestif après extraction. Ce dosage est réalisé en HPLC-MS/MS après dérivatisation des groupements carbonyles par un réactif bromé (BBHA). La quantification est effectuée à l'aide d'un standard interne deutéré déjà dérivé et ajouté dans les échantillons avant leur préparation.

Les extraits aqueux de fèces, appelés eaux fécales, représentent la part biodisponible des matières fécales. Il s'agit d'une matrice complexe contenant de nombreuses substances issues d'aliments non digérés, de molécules secrétées durant la digestion ou encore de composés néoformés dans le tractus digestif.

Concernant la dose de HNE, nous avons choisi une administration de HNE de 0,5mg/ jour apportés par les 15g de la ration. Cette dose a été choisie dans le but d'exposer le côlon au HNE et ce de manière non létale. Cette expérimentation étant la première au cours de laquelle le HNE est administré par voie orale en vue d'un dosage dans le côlon, le choix de la dose a été délicat. L'objectif était d'exposer le côlon à des quantités de HNE comparable à celle retrouvée dans le côlon suite à la consommation

d'hème. Surya et al. montrent que suite à une consommation d'un régime riche en viande rouge, la concentration en HNE dans les eaux fécales atteint 1,8µM (Surya et al., 2016). Nous avons donc, pour une première expérimentation, fixé la dose de HNE administrée à 0,5mg/jour soit environ 30mg/kg d'aliment, ce qui correspond environ à 1,5 à 2 fois la dose retrouvée dans de la viande (Gasc et al., 2007; Sakai et al., 1995). On peut noter que cette dose de 0,5mg/jour correspond à une dose de 1,25mg/kg de poids corporel/jour (pour des rats d'environ 400 grammes). Cette dose est à comparer à 2,5mg/kg de poids corporel/jour, qui a été montrée comme étant une dose subaigüe non létale après 28 jours d'administration, mais entrainant des dommages hépatiques et rénaux (Kang et al., 2011).

Ainsi, nous avons mis au point un protocole nous permettant :

- de déterminer le rendement d'efficacité d'exposition du côlon
- de déterminer si les billes de silice contenant du HNE sont plus efficaces pour exposer le côlon au HNE qu'une administration *via* une alimentation riche en HNE non protégé (dilué dans l'huile).

Pour cela, le HNE a été dosé dans les eaux fécales après 1 semaine d'exposition aux régimes expérimentaux (voir composition des régimes au **Tableau 5**).

Groupe **n= 3 ou 4**	**Régime semi synthétique AIN76**	**Apport en HNE**	**Billes d'huile sans HNE**
TEM Régime témoin	+	-	-
TEMB Régime témoin avec billes contenant de l'huile	+	-	+
BIL Régime contenant des billes de HNE	+	Par les billes	-
HNE Régime riche en HNE + billes contenant de l'huile	+	Par le régime	+

Tableau 5 : *Composition des régimes expérimentaux contenant ou non les billes de HNE (expérimentation d'une semaine)*

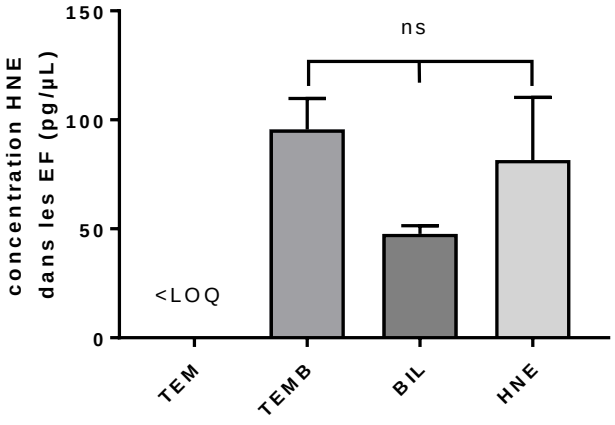


Figure 29 : *Concentration en HNE dans les eaux fécales des animaux ayant reçu pendant 1 semaine des régimes contenant ou non des billes de HNE.*
(moyenne ±SEM, n=3 ou 4, ns = ANOVA non significative entre les groupe TEMB, BIL et HNE)

La concentration en HNE dans les eaux fécales a été dosée après 1 semaine d'exposition aux régimes expérimentaux (**Figure 29**). Le HNE présent dans les eaux fécales du groupe ayant été nourri avec le régime témoin (TEM) n'a pas été dosé car présent à une concentration inférieure au seuil de détection de la technique (LOQ - Limit Of Quantification = 10pg/µL). Les concentrations en HNE dans les eaux fécales des 3 autres groupes ne présentent pas de différences (ANOVA, Analyse de Variance, p=0,2531). C'est le groupe ayant été nourri avec le régime témoin contenant des billes d'huile sans HNE qui présente la concentration la plus élevée en HNE (TEMB = 95,6pg/µL), suivi par les animaux ayant reçu le HNE directement dans le régime (HNE = 81,5pg/µL). Enfin, le groupe ayant reçu le HNE *via* les billes présente la concentration en HNE la plus faible dans les eaux fécales, mis à part le groupe TEM (BIL=47,7pg/µL). D'autre part, le rendement entre le HNE administré et le HNE retrouvé dans les eaux fécales est de 0.07% pour les groupes BIL et HNE.

Dans un premier temps, on peut noter que la concentration en HNE dans les eaux fécales des groupes BIL et HNE est respectivement de 0,31 et 0,52µM, ce qui représente un facteur 7 et un facteur 4 par rapport à la dose cible de 2µM. Ces résultats sont encourageants, malgré le très faible rendement observé (0.07%) entre la quantité administrée et celle retrouvée dans les eaux fécales.

Les résultats ne sont cependant pas ceux attendus, pour plusieurs raisons :

- On retrouve nettement plus de HNE dans les eaux fécales du groupe TEMB par rapport au groupe TEM alors qu'aucun des deux régimes n'est supplémenté en HNE. La seule différence est la vectorisation de l'huile par les billes dans le groupe TEMB. De même, la concentration en HNE dans les eaux fécales du groupe TEMB n'est pas différente de celle des groupes supplémentés en HNE (BIL et HNE).
- De plus, la concentration en HNE dans les eaux fécales des groupes ayant reçu le HNE vectorisé par les billes ou non n'est pas différente. En conclusion, ce dernier résultat montre l'absence d'efficacité des billes à relarguer spécifiquement le HNE dans le côlon mais montre également que le HNE apporté par une supplémentation du régime permet d'exposer le côlon.

Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer la concentration inattendue en HNE dans les eaux fécales du groupe TEMB :

- Le processus de fabrication des billes peut entrainer l'oxydation de l'huile, aboutissant à la présence de HNE dans les billes non supplémentées en HNE
- Le relargage potentiellement retardé de l'huile contenue dans les billes peut entrainer la libération de l'huile dans une zone plus oxydante du tube digestif, ce qui entrainerait la formation de HNE. Cependant, selon cette hypothèse, on peut attendre que la concentration en HNE dans les eaux fécales du groupe BIL soit supérieure au groupe TEMB. En effet dans le groupe BIL, le composé d'intérêt proviendrait à la fois de l'oxydation de l'huile (supposée identique à TEMB) et de la supplémentation en HNE. Or, on constate une tendance inverse, limitant la portée de cette deuxième hypothèse.

iii. Conclusion

En conclusion de ces travaux, nous avons pu montrer :

- L'inefficacité en termes de relargage colique des lots de capsules et de billes testés dans le cadre de notre collaboration avec l'Oniris
- L'efficacité potentielle de la supplémentation du régime en HNE sans vecteur bille. Cette méthode semble être la plus prometteuse mais nécessite une validation : dans l'expérimentation qui vient d'être décrite, la part entre le HNE provenant de la supplémentation du régime et celle provenant des billes contenant de l'huile ne peut pas être faite. Il est donc nécessaire de vérifier qu'une supplémentation du régime en HNE, en l'absence de billes entraine bien une exposition du côlon au HNE.

b. Le HNE par voie orale

Afin de s'assurer de l'effet de la supplémentation directe en HNE dans le régime sur l'exposition du côlon au HNE et de déterminer le rendement de cette voie d'exposition, nous avons mis en place une nouvelle expérimentation.

Des rats ont été nourri pendant 1 semaine avec un régime témoin ou un régime riche en HNE, avant la mesure du DHN-MA dans les urines à J6 et le dosage du HNE dans les contenus intestinaux et les eaux fécales à J7 (voir composition des régimes au **Tableau 6**).

Groupe	n	Base AIN76	Huile de carthame	HNE dans l'aliment
TEM	3	95%	5%	/
HNE HNE dans l'aliment	3	95%	5%	2mg/15g de régime

Tableau 6 : *Composition des régimes expérimentaux contenant ou non du HNE (expérimentation d'une semaine)*

La dose de HNE administrée a été fixée à 2mg/15g de régime (133mg/kg). En s'appuyant sur l'expérimentation précédente au cours de laquelle nous avions constaté qu'un régime à 0,5mg/15g permet de retrouver 0,5µM de HNE dans les eaux fécales, nous avons choisi de multiplier la dose administrée par 4 afin de s'approcher de la concentration cible de 2µM de HNE dans les eaux fécales.

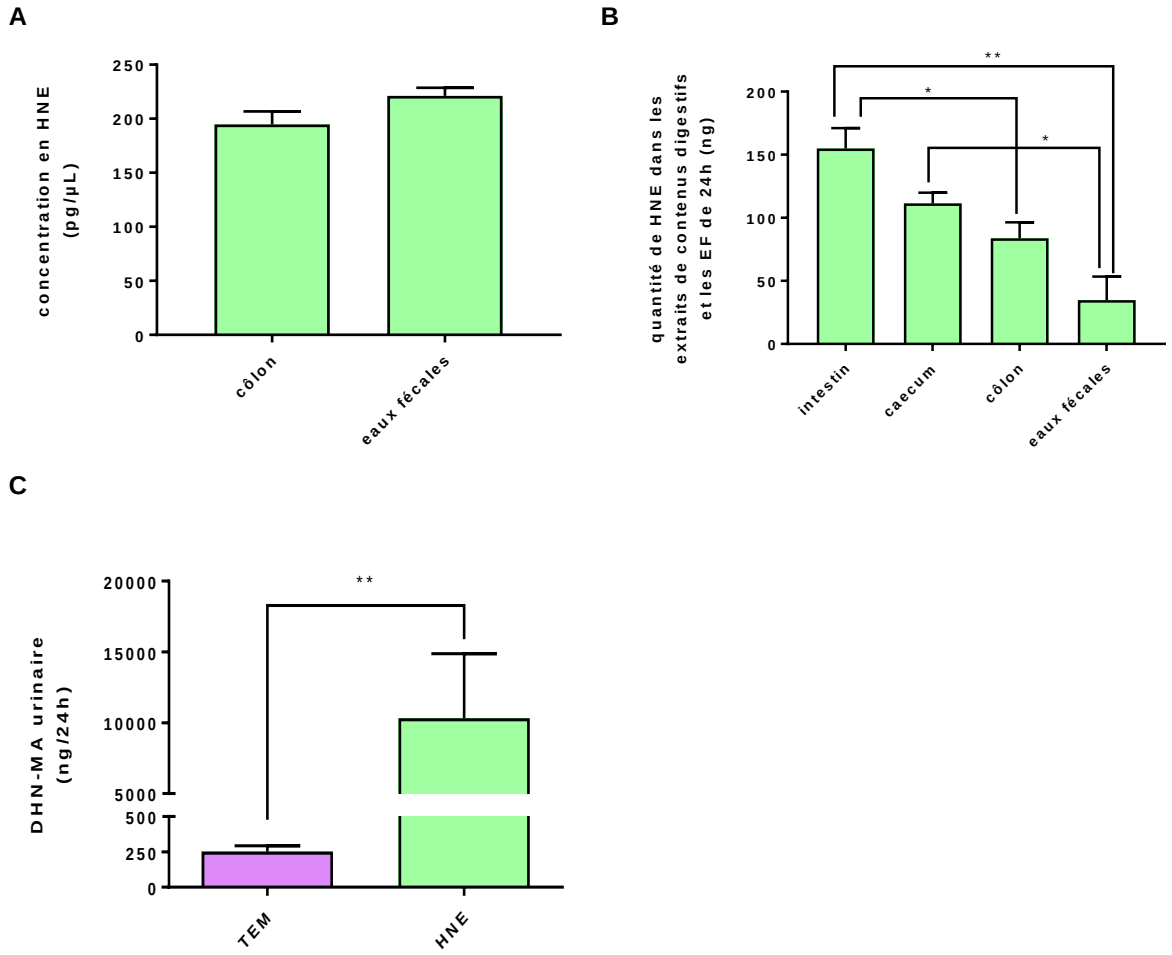


***Figure 30** : Concentration en HNE dans l'extrait colique et les eaux fécales de 24h (**A**), quantité de HNE dans les extraits de contenus digestifs et les eaux fécales de 24h des rats du groupe HNE (**B**) et DHN-MA urinaire (**C**) après 7 jours de régimes expérimentaux.*
*(moyenne ±SEM, n=3, (**B**) ANOVA, (**C**) t-test; *p<0,05 **p<0,005)*

Après une semaine de régime, le HNE est dosé dans les extraits aqueux des contenus du tube digestif et dans les eaux fécales (**Figure 30** A et B). Les valeurs sont inférieures à la limite de quantification dans le groupe témoin car la concentration en HNE présente dans les extraits est inférieure à 10pg/µL. De plus, on peut noter que les concentrations de HNE dans l'extrait colique et dans les eaux fécales sont similaires (195 et 221pg/µL, t-test p=0,1088). Cette donnée permet de définir les eaux fécales comme un bon modèle de l'exposition colique au HNE. Cela implique que, pour les expérimentations présentées dans la suite de ce manuscrit, les dosages de HNE aient été réalisés sur des eaux fécales plutôt que sur des extraits coliques, nécessitant la mise à mort des animaux.

En termes de quantité, on trouve entre 155 et 34ng de HNE dans les extraits aqueux des contenus du tube digestif et dans les eaux fécales de 24h. On constate que la quantité de HNE présente dans les organes diminue progressivement et significativement entre l'intestin et les fèces. Cette observation peut s'expliquer par l'absorption ou la dégradation du HNE au cours du transit intestinal. D'autre part, on retrouve dans les extraits aqueux des contenus digestifs et dans les eaux fécales de 24h, un total de 0.02% du HNE consommé par jour. Dans les eaux fécales, on retrouve 0.002% du HNE consommé. Par cette méthode d'administration, le rendement entre la quantité de HNE administrée et la quantité retrouvée dans les fèces est donc très faible.

Concernant le DHN-MA dans les urines (**Figure 30** C), on trouve un facteur 40 entre le groupe témoin et le groupe qui a consommé du HNE (251 à 10 323ng/24h).

Grâce à cette expérience, on valide l'utilisation de la supplémentation directe du régime en HNE pour exposer le côlon des animaux à ce composé d'intérêt. En effet, la concentration obtenue ici dans les eaux fécales de rats nourris avec 2mg/jour de HNE atteint 1,41µM ce qui est proche de ce qui a été décrit dans un article de Surya et al, où les animaux avaient été nourri avec de la viande de bœuf (1,8µM) (Surya et al., 2016). Cette méthode permet donc une bonne modélisation de l'exposition du côlon au HNE suite à la consommation d'un régime riche en viande rouge.

c. La stabilité du HNE

Le HNE n'ayant jamais été administré par voie orale dans l'aliment, nous avons voulu nous assurer de sa stabilité dans les différentes matrices alimentaires utilisées dans nos expérimentations animales. La stabilité de notre composé d'intérêt a également été testée dans différentes conditions de température : à froid (jusqu'à plusieurs mois à 4°C ou -20°C, sous vide pour modéliser les conditions de stockage des régimes) et à température ambiante (jusqu'à 48h à 21°C pour modéliser les conditions de distribution de l'aliment aux animaux en animalerie).

i. Stabilité du HNE dans l'huile de maïs

Comme il était prévu au départ d'administrer le HNE *via* un vecteur capsule ou bille, nous avions choisi de tester la stabilité du HNE dans l'huile de maïs, qui est l'huile entrant dans la composition du régime AIN76. Étant donné l'abandon de ces techniques pour l'administration du HNE mélangé au régime en poudre, ces données de stabilité n'ont finalement pas été exploitées dans le cadre de la thèse mais sont présentées ici pour leur caractère informatif.

Le plan d'expérience suivant a été suivi : le HNE à 200ng/10mg d'huile a été stocké à 21°C (pour modéliser les conditions d'animalerie pendant 24 et 48h), 4°C et -20°C (pour modéliser les conditions de stockage pendant 1 semaine, deux semaines, 1 mois et deux mois). Le HNE a été dosé par spectrométrie de masse en phase gazeuse, après dérivation et purification de l'échantillon, selon un protocole utilisé pour le dosage du HNE en milieu hydrophobe (Viau et al., 2016). Ce dosage a été effectué par le laboratoire BIA de l'INRA de Nantes (Biopolymères, Interactions Assemblages, équipe Interfaces et Systèmes Dispersés, Claude Genot et Anne Meynier).

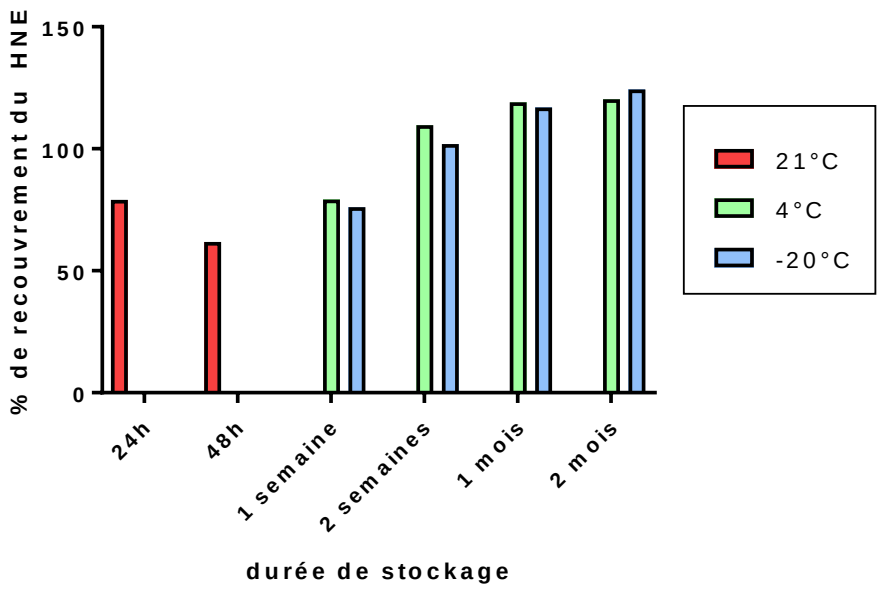


***Figure 31** : Pourcentage de recouvrement du HNE après différentes durées et températures de stockage (n=1)*

Comme le montre la **Figure 31**, le pourcentage de recouvrement du HNE est de 79,1% après 24h et de 61,8% après 48h à 21°C. Après 1 semaine de stockage à 4°C le pourcentage de recouvrement est de 79,2%. Toutes les autres conditions et durées de stockage montrent un pourcentage de recouvrement supérieur à 100%.

Ces résultats nous montrent que le HNE subi une dégradation modeste dans l'huile de maïs lorsqu'elle est stockée pendant 24h en condition d'animalerie (20,9% de perte). La perte est deux fois plus importante après 48h (38,2%).

Après 1 semaine à 4°C ou -20°C, la perte de HNE est de 20,8% ou de 23,9% alors que dans toutes les autres durées et conditions de stockage au froid, le pourcentage de recouvrement est supérieur à 100% (maximum 124,3%). Ceci suggère une légère formation de HNE, certainement par oxydation de l'acide linoléique, un de ses précurseur présent dans l'huile de maïs (Schneider et al., 2001).

En conclusion, ces résultats montrent une dégradation modeste du HNE après 24h en condition d'animalerie, ce qui suggère qu'il est nécessaire de distribuer l'aliment quotidiennement afin d'éviter la dégradation du HNE avant consommation. De même, le stockage d'une durée d'une semaine au froid montre une dégradation de 21 à 24% alors que le stockage à plus long terme (jusqu'à deux mois) montre une néo-formation de 2 à 24%. Ceci suggère que le temps de stockage optimal est de deux semaines mais semble acceptable jusqu'à 2mois.

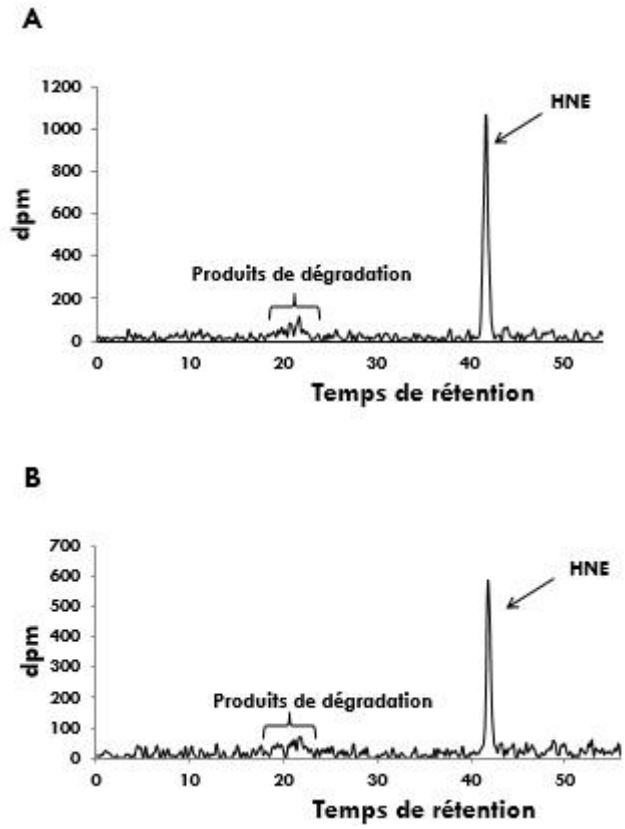
ii. Stabilité du HNE dans l'aliment

La stabilité du HNE dans l'aliment a été étudiée grâce à deux méthodes :

- Par suivi de HNE radiomarqué dans un régime surchargé en HNE froid et en HNE radioactif à hauteur de 25 000 dpm/µg de HNE froid (activité spécifique de 222 Gbq/mmol)
- Par dosage du HNE dans un régime surchargé en HNE à hauteur de 2mg de HNE pour 20g de régime et dans un régime témoin

✓ *Par suivi de HNE radiomarqué*

Le régime surchargé en HNE a été préparé et des extraits réalisés en adaptant un protocole de Papastergiadis et al. (Papastergiadis et al., 2014b) ont été analysés en radio-HPLC à 3 temps : dès la fin de la préparation du régime ainsi que 4h et 12h après stockage à température ambiante, à l'air libre. Le pourcentage de radioactivité du HNE et de ses produits de dégradation a été déterminé. Le gradient utilisé pour l'HPLC est celui présenté dans l'article sur le métabolisme du HNE alimentaire, en p66.



C

	% de radioactivité	
	HNE	Produits de dégradation
T 0	81	19
T 4h	83	17
T 12h	85	15

***Figure 32** : Stabilité du HNE : Suivi de la stabilité du HNE dans l'aliment par radioactivité. Radio-chromatogramme de l'extrait d'aliment à la préparation (**A**) et après 12h à température ambiante (**B**). Tableau résumant le pourcentage de radioactivité représenté par le HNE et par ses produits de dégradation aux 2 temps (**C**).*

Ces résultats (**Figure 32**) mettent en évidence que le HNE semble assez stable dans l'aliment stocké à température ambiante pendant 12h puisque le HNE représente 81% de la radioactivité à T 0 et 85% à 12h. Ces résultats suggèrent qu'une distribution quotidienne de l'aliment permet de s'assurer que l'exposition des animaux par le régime correspond à celle voulue.

✓ *Par dosage du HNE*

Afin de définir plus précisément la stabilité du HNE dans l'aliment, nous avons dosé le HNE dans le régime expérimental à 2mg de HNE pour 20g de régime et dans son régime témoin. Le dosage a été réalisé à 2 temps : dès la fin de la préparation du régime (t0) et après 1 semaine de stockage à -20°C sous vide puis 15h à température ambiante, à l'air libre, pour mimer les conditions de stockage, suivi de la distribution dans la gamelle (t gamelle).

L'extraction (n=3) a été réalisée dans des conditions identiques pour tous les échantillons (n=3) en adaptant un protocole de Papastergiadis et al. (Papastergiadis et al., 2014b).

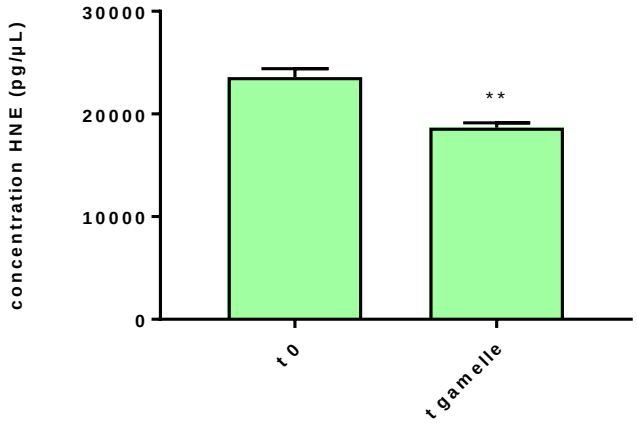


Figure 33 : *Stabilité du HNE : concentration du HNE dans l'extrait d'aliment à la préparation (t0) et après 1 semaine à -20°C sous vide puis 15h à température ambiante (t gamelle). (moyenne±SEM, n=3, t-test **p<0.005)*

La **Figure 33** montre la concentration en HNE dans les extraits d'aliment contenant du HNE. Cette concentration n'a pas pu être déterminée dans les extraits d'aliment témoin car en dessous du seuil de quantification de la technique de dosage utilisée. D'autre part, nous pouvons noter que la concentration en HNE dans l'extrait d'aliment HNE diminue légèrement entre l'extrait préparé à t0 et l'extrait ayant subi le stockage (24ng/µL vs 19ng/µL). Cette perte de 20,9% est significative en t-test (p=0,0065) quoique raisonnable.

Ces données nous amènent à conclure que le HNE est plutôt stable dans l'aliment après 1 semaine de stockage à -20°C sous vide suivi de 15h à température ambiante.

L'ensemble de ces résultats nous a donc amené à prendre les décisions suivantes : pour la suite des expérimentations, les régimes sont préparés toutes les semaines pour les expérimentations courtes et toutes les deux semaines pour les expérimentations longues, stockés sous vide à -20°C et distribués aux animaux sur un rythme quotidien.

2. Effet du HNE sur l'inflammation

a. Protocole

Afin de répondre au premier objectif de la thèse 'tester les effets du HNE sur l'inflammation colique', nous avons construit deux études expérimentales.

- La première étude nous a permis de tester un effet dose du HNE sur différents marqueurs de l'inflammation colique ou systémique
- La deuxième étude nous a permis approfondir les résultats en augmentant la puissance statistique. Cette étude nous a également permis d'élargir l'acquisition de données s'intéressant non seulement à la perméabilité colique mais également à la perméabilité intestinale. En effet, le HNE étant donné par voie alimentaire, des effets potentiels peuvent être observés tout le long du tube digestif, et notamment dans les parties supérieures puisqu'elles sont théoriquement plus exposées que le côlon.

i. Choix des doses de HNE

Le choix des doses de HNE utilisées dans les expérimentations présentées dans la suite de ce manuscrit a été fait en se basant sur les résultats de l'expérimentation préliminaire présentée précédemment

dans ce manuscrit ainsi que sur les dosages de HNE dans des aliments et les études de toxicité par voie orale trouvées dans la littérature et présentés dans l'introduction de ce manuscrit.

L'étude préliminaire nous a montré qu'avec un régime à 2mg de HNE pour 15g de régime (133mg/kg), on obtient une concentration de 1,41µM de HNE dans les eaux fécales, ce qui est proche de la concentration cible visée, correspondant à la concentration en HNE présent dans les eaux fécales de rats ayant consommé un régime riche viande rouge (2µM).

Pour cette expérimentation, nous avons choisi de travailler avec plusieurs doses de HNE : la forte dose sera de 2mg de HNE pour une ration de 20g de régime (100mg/kg), ce qui, en termes d'exposition alimentaire est un apport correspondant à environ 2 fois la dose de HNE retrouvée dans une huile fortement oxydée (Seppanen and Csallany, 2004). À partir de cette dose forte, nous avons décliné la dose moyenne à 0,2mg de HNE pour 20g de régime (10mg/kg), ce qui s'approche de la dose de HNE retrouvé dans de la viande (Gasc et al., 2007; Sakai et al., 1995). Enfin la faible dose a été fixée à 0.02mg de HNE pour 20g de régime (1mg/kg), ce qui modélise l'apport en HNE d'aliments faiblement contaminés (Papastergiadis et al., 2014a) (pour les doses de HNE retrouvées dans l'aliment, se référer au chapitre « *HNE et nutrition* » p30).

ii. Expérimentation animale

✓ *Etude 1 : 2 semaines*

32 rats mâles Fischer F344 âgés de 8 semaines ont été hébergés individuellement dans des cages grillagées, dans une animalerie climatisée avec un cycle jour/nuit de 12h. Après une période d'adaptation d'une semaine, les animaux, répartis en 4 groupes de 8 animaux, ont reçu quotidiennement et *ad libitum* les régimes expérimentaux durant 14 jours.

Les régimes expérimentaux sont composés d'une base commune de régime AIN76 semi-synthétique sous forme poudre, à laquelle s'ajoute 5% d'huile de carthame (**Tableau 7**).

Régime	**TSF**	**HNE 1**	**HNE 2**	**HNE 3**
	Témoin	HNE faible dose	HNE dose moyenne	HNE forte dose
Base AIN76 modifiée (low calcium)	95%			
Huile de carthame	5%			
HNE	-	0.02mg/20g de régime 1ppm	0,2mg/20g de régime 10ppm	2mg/20g de régime 100ppm

Tableau 7 : *Composition des régimes expérimentaux pour l'expérimentation de 2 semaines sur les effets du HNE sur l'inflammation.*

Les paramètres zootechniques suivants ont été mesurés : la croissance par pesée des animaux à J2, J7 et J14 et leur consommation alimentaire à J12. De plus, les fèces ont été récoltées individuellement entre J11 et J13. Les urines ont été récoltées à J7 ou J8.

✓ *Etude 2 : 3 semaines*

36 rats mâles Fischer F344 âgés de 5 semaines ont été hébergés individuellement dans des cages grillagées, dans une animalerie climatisée avec un cycle jour/nuit de 12h. Après une période d'adaptation de 4 jours, les animaux, répartis en 3 groupes de 12 animaux, ont reçu quotidiennement

et *ad libitum* les régimes expérimentaux durant 23 jours. Les animaux ont été gavés avec du ^{51}Cr-EDTA à J15, après avoir été transférés en cage à métabolisme à J14. Les urines ont été récoltées 24h après le gavage. Les animaux ont ensuite été hébergés par groupe de 4 en cage sur litière, permettant une élimination fécale et la décroissance de la radioactivité, afin de se trouver dans des conditions compatibles avec le prélèvement des tissus animaux (**Figure 34**).

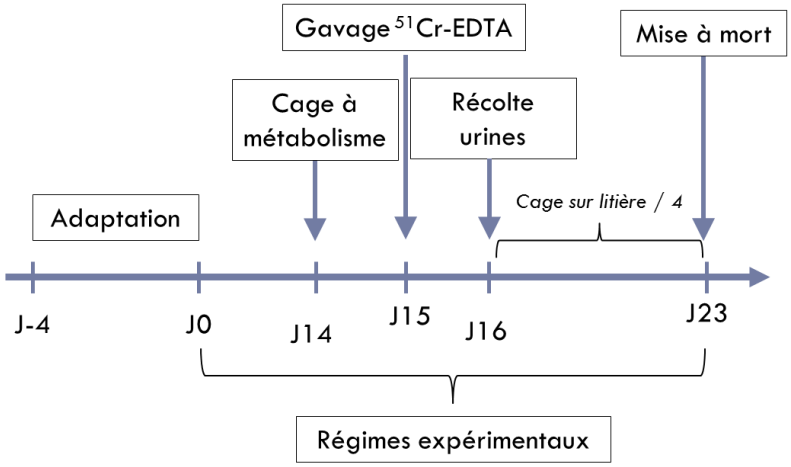


Figure 34 : *Déroulement du protocole expérimental de l'étude de 3 semaines sur les effets inflammatoires du HNE.*

Les régimes expérimentaux sont composés d'une base commune de régime AIN76 sous forme poudre, à laquelle s'ajoute 5% d'huile de carthame (**Tableau 8**).

Régime	**TSF**	**HNE 2**	**HNE 3**
	Témoin	HNE dose moyenne	HNE forte dose
Base AIN76 modifiée (low calcium)	95%		
Huile de carthame	5%		
HNE	-	0,2mg/20g de régime	2mg/20g de régime

Tableau 8 : *Composition des régimes expérimentaux pour l'expérimentation de 3 semaines sur les effets du HNE sur l'inflammation.*

Les paramètres zootechniques suivants ont été mesurés : la croissance par pesée des animaux à J9 et J23 et leur consommation alimentaire à J11. De plus, les urines ont été récoltées à J7 ou J8, et les fèces ont été récoltées entre J11 et J13.

iii. Paramètres suivis

- ✓ *Etude 1 : 2 semaines*

Un suivi du poids et de la consommation des animaux a été réalisé.

Dans un premier temps, l'exposition au HNE a été mesurée individuellement par le dosage du HNE dans un pool d'eaux fécales de J11 à J13 et du DHN-MA dans les urines de J7 ou 8.

Une mesure du ratio GSH/GSSG (glutathion réduit/glutathion oxydé) a été réalisé (équipe SMBSO à l'ICR de Marseille, Dr Silvia Pietri) sur du sang complet prélevé à l'abattage, dans le but d'estimer l'état oxydatif systémique.

Afin de mesurer l'inflammation colique, nous avons dosé l'activité de la myéloperoxidase (MPO, une enzyme exprimée par les neutrophiles) et dosé plusieurs cytokines dans la muqueuse colique (3 cytokines pro-inflammatoires : IL1-beta, IL6 et IL8, ainsi qu'une cytokine anti-inflammatoire : IL10). Nous avons également réalisé un score microscopique sur le côlon. L'inflammation systémique a été estimée par dosage de la protéine C réactive (CRP) dans le sérum.

Concernant la perméabilité de la barrière colique, nous avons effectué en chambre de Ussing des mesures de résistance trans-épithéliale et de perméabilité paracellulaire au FITC sur des explants coliques (**Figure 35**).

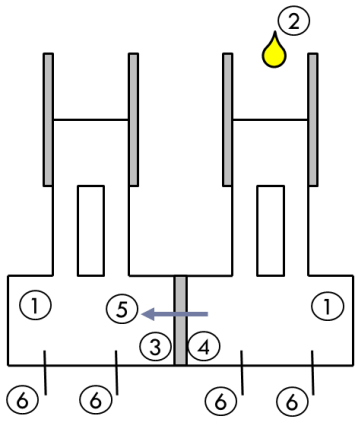


Figure 35 : *Représentation schématique d'une chambre de Ussing*
1 : solution saline à 37°C avec adjonction de carbogène (95% O_2 – 4% CO_2) ; 2 : FITC ; 3 : explant tissulaire côté séreuse ; 4 : explant tissulaire côté muqueuse ; 5 : flux du FITC ; 6 : électrodes mesurant la résistance trans-épithéliale

Enfin, une série de dosages biochimiques sanguins a été réalisée par le plateforme ANEXPLO afin de mettre en évidence d'éventuelles atteintes systémiques. Des anomalies dans les dosages de l'ALT, de l'AST et de l'ALP peuvent témoigner d'atteintes hépatique ou cardiaque, tandis que des anomalies dans les dosages de l'urée ou de la créatinine peuvent mettre en évidence des atteintes rénales.

- ✓ *Etude 2 : 3 semaines*

Un suivi du poids et de la consommation des animaux a été réalisé.

Ici, l'inflammation a été suivie par dosage de l'activité de la MPO au niveau du côlon. La perméabilité paracellulaire globale a été évaluée par le dosage du ^{51}Cr-EDTA dans les urines. Enfin, le montage des tissus en chambre de Ussing a permis de mesurer la résistance trans-épithéliale et la perméabilité au FITC sur explants de côlon et de jéjunum.

iv. Statistiques

Pour les deux études, dans le cas où la normalité est vérifiée, les résultats ont été analysés en test t de Student lorsque deux groupes sont à comparer et par une analyse de variance paramétrique (ANOVA) lorsque le nombre de groupes à comparer est supérieur à deux. Suite à l'ANOVA, le test de Tukey a été utilisé pour réaliser les comparaisons multiples. Lorsque la normalité n'est pas vérifiée, les résultats ont été analysés grâce au test de Mann-Whitney (équivalent non paramétrique du test t de Student) et au test de Kruskal-Wallis (équivalent non paramétrique de l'ANOVA) suivi d'un post-test de Dunn.

Tous les graphiques représentent la moyenne ± SEM. Lorsque des valeurs sont indiquées dans le texte, elles sont exprimées comme la moyenne ± SD.

b. Résultats

✓ *Etude 1 : 2 semaines*

Nous n'avons pas observé de différence de sur les poids des animaux dans les différents groupes à J7, ni à J14/15. Les animaux pèsent en moyenne 246 ±16g à J7 (ANOVA p=0,9868) et 269±17g à J14/15 (p=0,9513). De même, la consommation à J12 ne montre pas de différence entre les groupes (15.1 ±1,7g, ANOVA p=0,9096).

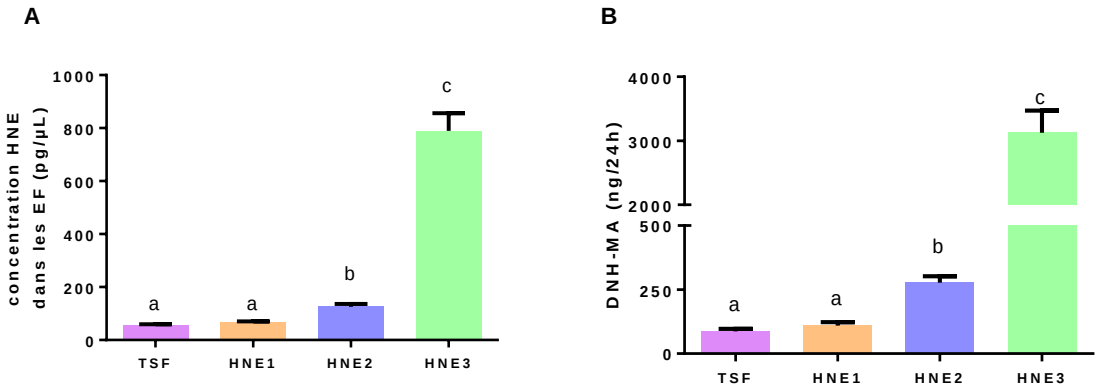


Figure 36 : *Concentration du HNE dans les eaux fécales (**A**) et du DHN-MA urinaire (**B**) des rats ayant été nourris pendant 2 semaines avec les régimes expérimentaux.*
(Moyenne ± SEM, n=8, les lettres indiquent des groupes statistiquement différents d'après une ANOVA).

Nous avons dans un premier temps vérifié l'exposition des animaux au HNE par dosage de ce composé dans les eaux fécales (**Figure 36**). Les concentrations de HNE dans les eaux fécales sont les suivantes : TSF=56,5±8,7 pg/µL ; HNE1=65,7±13.1 pg/µL ; HNE2=125,5±29,7 pg/µL ; HNE3=789,6±187,4 pg/µL). Ces résultats présentent un effet dose significatif à partir de la dose moyenne (ANOVA sur données transformées en log, p<0,001).

Nous avons ensuite vérifié la cohérence de cet effet dose en retranchant des autres groupes la concentration moyenne de HNE retrouvée dans les eaux fécales des animaux ayant consommé le régime TSF (qui correspond à la concentration basale en HNE dans les eaux fécales du groupe témoin). Nous avons ainsi obtenu les concentrations suivantes : HNE1 = 9,2 pg/µL, HNE2 = 69 pg/µL, HNE3 = 733,2 pg/µL. Nous obtenons donc un facteur 7,5 entre les régimes HNE1 et HNE2 et un facteur 10,6 entre HNE2 et HNE3, ce qui est très proche des différences de facteurs entre les doses administrées.

De même que pour le dosage de HNE dans les eaux fécales, le dosage du DHN-MA dans les urines montre un effet dose significatif (**Figure 36**). En effectuant la même opération de soustraction du niveau basal que pour le HNE, nous obtenons les concentrations urinaires de DHN-MA suivantes : HNE1 = 22,5 ng/24h, HNE2 : 190,8 ng/24h, HNE3 : 3040,3 ng/24h. Nous obtenons ainsi un facteur 8,5 entre HNE1 et HNE2, et un facteur 15,9 entre HNE2 et HNE3. Bien que l'on pourrait attendre un facteur 10 entre HNE2 et HNE3 étant donné l'écart entre les doses administrées, le facteur 15,9 observé ici pourrait s'expliquer par une modification du métabolisme du HNE en fonction de la dose administrée. Cependant, notre observation ne va pas dans le même sens que les résultats obtenus dans cette étude sur des slices de foie de rat (Laurent et al., 2000). En effet, cette étude montre que plus la dose de HNE

est élevée, plus le métabolisme s'oriente vers des réactions de type oxydation, ce qui n'est pas le cas ici.

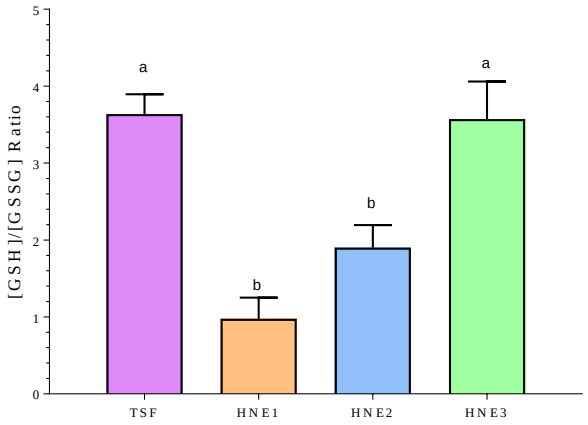


Figure 37 : *Ratio GSH/GSSG dans le sang après 2 semaines de régimes expérimentaux (Moyenne ± SEM, n=8, les lettres indiquent des groupes statistiquement différents d'après une ANOVA).*

La mesure du ratio glutathion réduit/oxydé dans le sang montre une forte diminution du ratio dans les groupes HNE1 et HNE2, ainsi qu'un retour au niveau du témoin pour le groupe HNE3 (**Figure 37**).

Le dosage de l'activité de la MPO colique n'a pas donné de résultats exploitables suite à un dysfonctionnement technique. C'est pourquoi ce dosage a été répété pour les groupes TSF et HNE3 dans l'étude 2 (3 semaines).

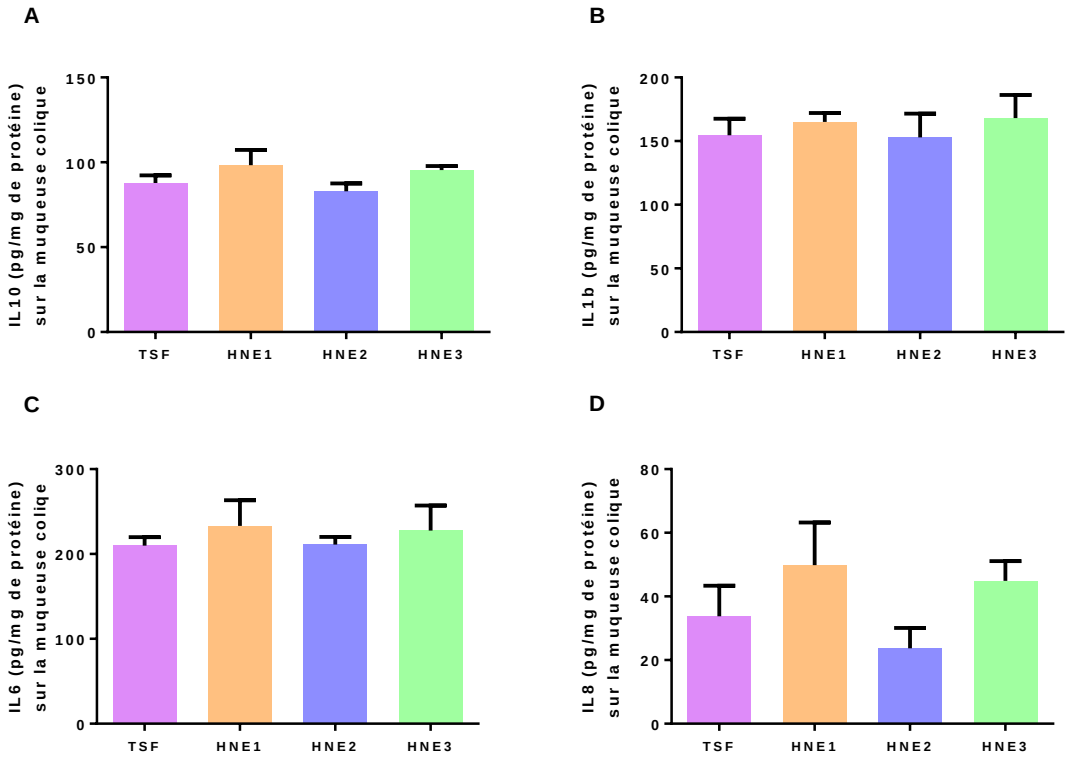


Figure 38 : *Concentration en cytokines sur des extraits de muqueuse colique après 2 semaines de régimes expérimentaux : IL10 (**A**), IL1ß (**B**), IL6 (**C**) et IL8 (**D**).*

(Moyenne ± SEM, n=8, aucune différence significative en ANOVA).

Le dosage par ELISA des cytokines pro et anti-inflammatoires (IL1-beta, IL6, IL8 et IL10) ne montre aucune modulation du niveau de cytokines en fonction de la quantité de HNE dans le régime (ANOVA p>0,2) (**Figure 38**).

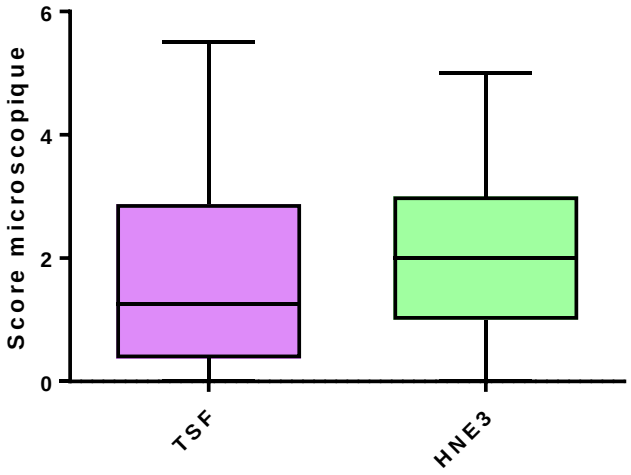


Figure 39 : *Score microscopique sur le côlon après 2 semaines de régimes expérimentaux (Box plots, n=6/7, aucune différence significative en t-test).*

De même, nous n'avons observé aucune différence en comparant le score microscopique au niveau du côlon dans les groupes TSF et HNE3 (t-test p=0,7) (**Figure 39**). De plus, les deux groupes présentent en moyenne un score inférieur à 3, caractérisant une absence d'inflammation (Fabia et al., 1992).

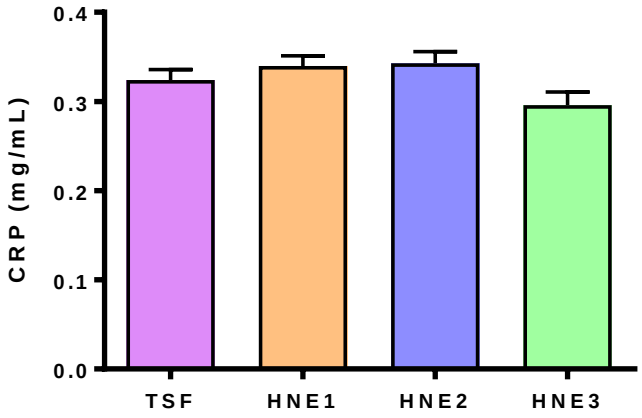


Figure 40 : *Concentration de la CRP sérique après 2 semaines de régimes expérimentaux. (Moyenne ± SEM, n=8, aucune différence significative en ANOVA).*

Le niveau de CRP n'est pas non plus modulé en fonction du régime et présente des niveaux normaux, indiquant une absence d'inflammation systémique (ANOVA p=0,0476 mais absence de différence entre les groupes suite à la comparaison multiple) (**Figure 40**).

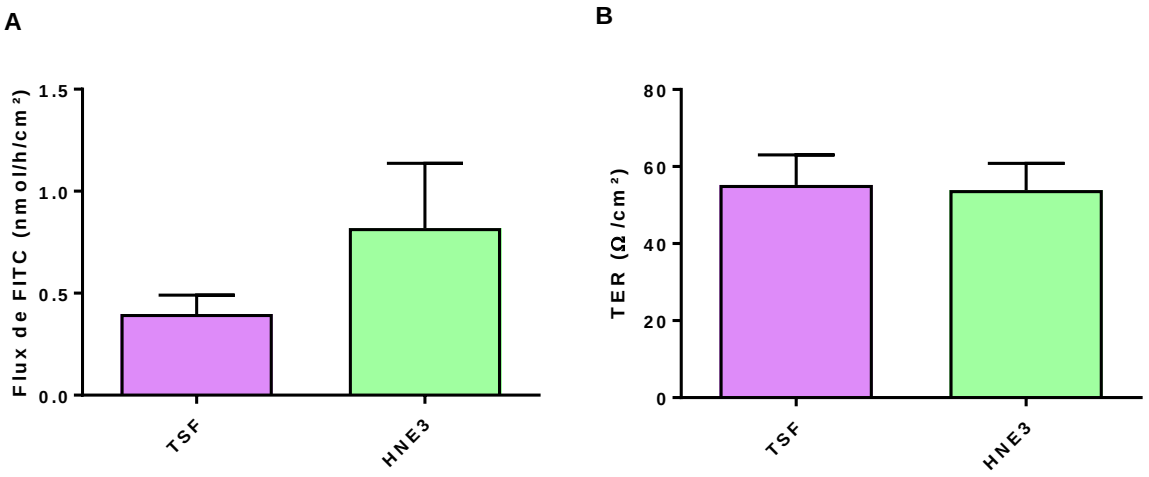


Figure 41 : *Flux de FITC (**A**) et résistance trans-épithéliale (**B**) sur des explants de côlon après 2 semaines de régimes expérimentaux.*
(Moyenne ± SEM, n=5, aucune différence significative en t-test).

Concernant les analyses réalisées en chambre de Ussing sur des explants de côlon des groupes TSF et HNE3, nous avons observé une tendance non significative à l'augmentation de la perméabilité au FITC dans le groupe HNE3 (t-test p=0,7788) tandis que nous n'avons pas observé de différences sur la résistance trans-épithéliale (t-test p=0,9006) (**Figure 41**).

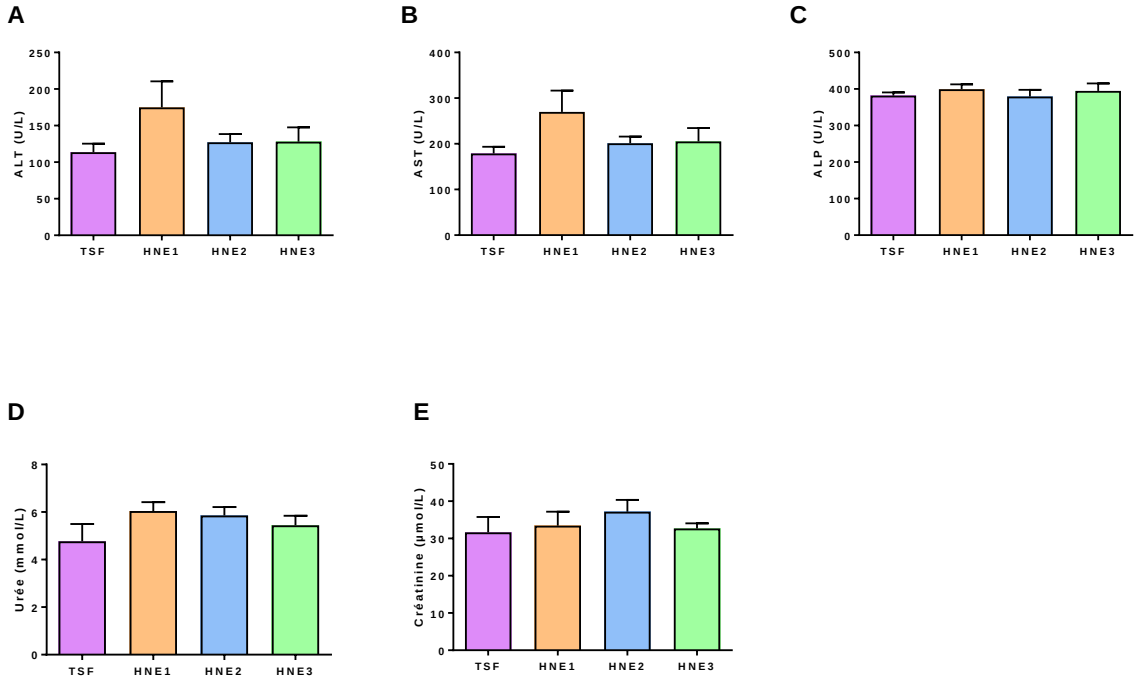


Figure 42 : *Concentrations sanguine d'ALT (**A**), d'AST (**B**), d'ALT (**C**), d'urée (**D**), de Créatinine (**E**) après 2 semaines de régimes expérimentaux.*
(Moyenne ± SEM, n=8, aucune différence significative en ANOVA).

Enfin, une série de dosages biochimiques sanguins a été réalisé afin de mettre en évidence d'éventuelles atteintes systémiques. Les dosages de l'ALT, de l'AST et de l'ALP, l'urée et de la créatinine

ne montrent aucune modulation significative en fonction des différents régimes (ANOVA p>0.1779) et présentent des valeurs normales (**Figure 42**).

✓ *Etude 2 : 3 semaines*

Nous n'avons pas observé de différence sur les poids des animaux dans les différents groupes à J9, ni à J23/24. Les animaux pèsent en moyenne 128 ±13g à J9 (ANOVA p=0,4345) et 197±16g à J23/24 (ANOVA p=0,5523). De même, la consommation à J11 ne montre pas de différence entre les groupes (14,1±1,3g, ANOVA p=0,8182).

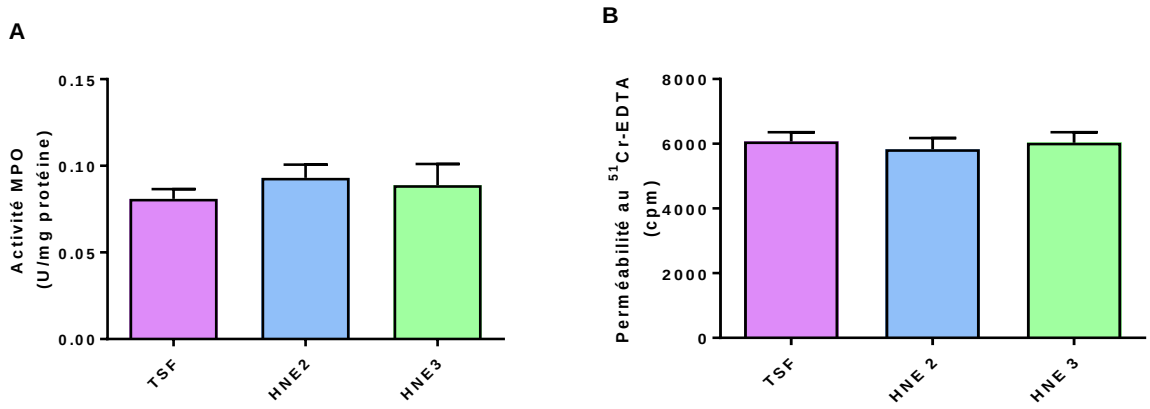


Figure 43 : *Activité MPO (**A**) et perméabilité au ^{51}CR-EDTA (**B**) après respectivement 3 et 2 semaines de régimes expérimentaux.*
(Moyenne ± SEM, n=12, aucune différence significative en ANOVA).

Le dosage de l'activité de la MPO sur le côlon ne montre pas de variation entre les groupes (ANOVA p=0,6312) (**Figure 43**).

De plus, nous n'avons montré aucune différence concernant les analyses de perméabilité globale au ^{51}Cr-EDTA (ANOVA p=0,8506). Cependant, on peut noter que la perméabilité dans le groupe TSF présente une valeur élevée pour un contrôle. Cette valeur basale élevée pourrait expliquer l'absence de différence entre les régimes en masquant un effet modeste éventuel.

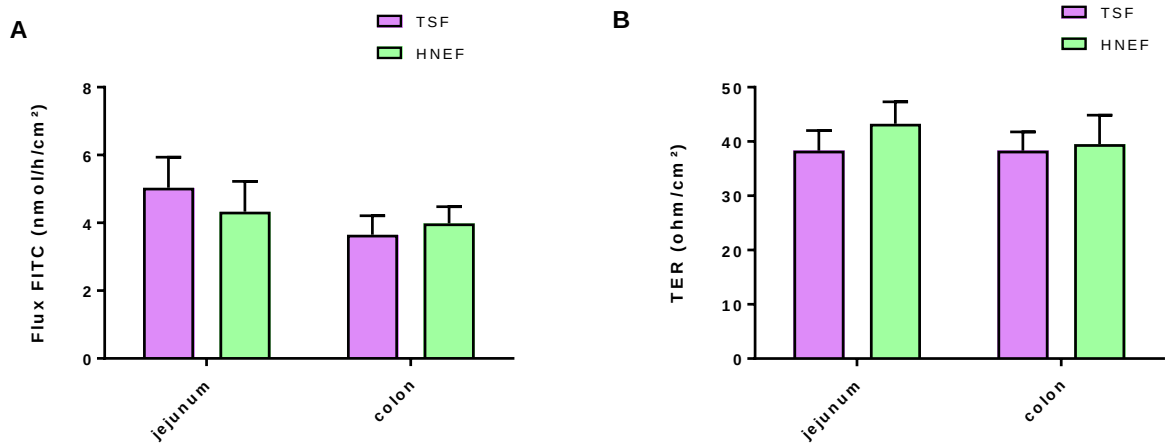


Figure 44 : *Flux de FITC (**A**) et résistance trans-épithéliale (**B**) sur des explants de côlon et de jéjunum après 3 semaines de régimes expérimentaux.*
(Moyenne ± SEM, n=12, aucune différence significative en t-test pour le côlon et en Mann-Whitney pour le jéjunum).

De même, nous n'avons pas observé de différence, ni sur la perméabilité au FITC (côlon t-test p=0,6577, jéjunum Mann-Whitney p=0,4176) ni sur la résistance trans-épithéliale mesurée sur des explants de côlon et de jéjunum en chambre de Ussing (côlon t-test p=0,8557, jéjunum t-test p=0,3792) (**Figure 44**). La tendance à l'augmentation de la perméabilité au FITC observé en chambre de Ussing sur des explants de côlon d'animaux ayant consommé le régime HNE3 dans l'étude 1 n'a pas été confirmée dans l'étude 2. Le nombre d'individus dans l'étude 2 étant nettement supérieur (n=5 vs n=12), la puissance statistique de cette dernière étude est plus grande et appuie l'absence d'effet du régime HNE sur la perméabilité au FITC.

c. Conclusion et discussion

i. Conclusions

En conclusion de l'étude 1, les dosages de HNE dans les eaux fécales et de DHN-MA dans les urines nous montrent que l'exposition des animaux au HNE par voie orale est efficace pour exposer au HNE le tube digestif et notamment le côlon. Il est intéressant de noter que nous retrouvons un effet dose significatif sur ces deux dosages, cohérent avec les doses administrées.

Le ratio GSH/GSSG dans le sang est modulé par la dose de HNE administré : à faible et moyenne dose (HNE1 et HNE2), le ratio est diminué par rapport au témoin, alors qu'il est rétabli par la forte dose.

Les différents dosages permettant d'évaluer l'inflammation colique ou systémique (dosage de cytokines, score microscopique, CRP, résistance trans-épithéliale et perméabilité au paracellulaire FITC en chambre de Ussing et dosages biochimiques sanguins) ne sont aucunement modulés par les différents régimes. Tous les animaux présentent une absence d'inflammation colique ou systémique.

La tendance à l'augmentation de la perméabilité au FITC des explants de côlon d'animaux ayant reçu le régime HNE3 nous a conduit à approfondir l'effet de ce régime sur la perméabilité intestinale. Cet approfondissement a été réalisé au cours de l'étude 2, dans laquelle nous avons tout d'abord confirmé par le dosage de la MPO l'absence d'effet pro-inflammatoire du HNE au niveau du côlon. Nous nous sommes ensuite intéressés à la perméabilité globale et locale (côlon et jéjunum), pour lesquelles nous avons montré une absence d'effet du régime HNE.

ii. Discussion

- ✓ *Absence d'effet du HNE sur la perméabilité intestinale*

L'absence d'effet du HNE sur la perméabilité va à l'encontre de la littérature. En effet, dans une étude sur des cellules Caco-2, Cindric *et al.* ont montré une augmentation (d'un facteur 2,5) de la perméabilité du tapis cellulaire suite à un traitement au HNE pendant 2h à 160µM (Cindric et al., 2013). Cependant, ce résultat a été obtenu *in vitro*, sur des cellules cancéreuses et avec une dose de HNE très supérieure à ce qui est retrouvé dans la lumière colique après la consommation d'un régime peroxydant.

- ✓ *Non reproduction avec le HNE des effets pro-inflammatoires et perméabilisant de l'hémine*

Un élément majeur de discussion lié à cette expérimentation concerne le fait que, d'une manière inattendue, nous n'avons pas reproduit avec le HNE les effets pro-inflammatoires et les effets d'augmentation de la perméabilité globale observés précédemment avec le fer héminique sous forme d'hémine (Martin et al., En préparation). Dans cet article, ces effets sont associés positivement à la lipoperoxydation hème induite (TBARS dans les eaux fécales, DHN-MA dans les urines). Ces résultats suggèrent que l'hème, directement ou *via* la formation d'aldéhydes, est responsable de l'augmentation de l'inflammation et de la perméabilité de la muqueuse colique.

Ici, notre objectif était de tester l'implication du HNE dans l'effet pro-inflammatoire de l'hème. Contrairement à ce qui était attendu, nos conclusions ne vont pas dans le sens de l'implication du HNE seul dans l'effet pro-inflammatoire de l'hème.

Ce point de discussion étant récurrent entre toutes les expérimentations présentées dans ce manuscrit, il fera l'objet d'une discussion élargie dans la partie « *Discussion et Perspectives* » à la fin de ce manuscrit (p129).

- ✓ *Absence d'effet du HNE aux niveaux hépatique et rénal*

Les dosages biochimiques réalisés sur les paramètres hépatiques et rénaux montrent une absence d'effet du HNE à la forte dose (HNE3), correspondant à 8mg/kg de poids corporel/jour à J14. Ce résultat n'est pas en accord avec l'étude de toxicologie menée par Kang *et al.*, qui montre des atteintes hépatiques et rénales après 4 semaines de gavage avec du HNE chez des rats dès 0,5mg/kg de poids corporel/jour (Kang et al., 2011). Deux hypothèses peuvent expliquer cet effet différentiel : le temps d'administration est plus court dans notre étude (2 semaines) et les modes d'administration diffèrent : dans notre étude, le HNE était administré par voie alimentaire, tandis que dans les travaux de Kang, le HNE était administré par gavage. Ces modes d'administration peuvent entraîner des absorptions différentes, et donc des effets périphériques différents.

- ✓ *Effet du HNE sur le ratio glutathion réduit/oxydé dans le sang*

Enfin, il est intéressant de noter que les régimes contenant du HNE ne font varier aucun des paramètres sanguins suivis, sauf le dosage du glutathion réduit/oxydé. De plus, ce dosage révèle un effet-dose du HNE : à faible dose, le HNE entraîne une diminution du ratio glutathion réduit/oxydé, tandis qu'à forte dose ce taux est normalisé par rapport au régime témoin. Cette normalisation pourrait s'expliquer par l'induction des défenses antioxydantes par la forte dose de HNE (Poli et al., 2008), *via* l'induction du facteur de transcription Nrf2, permettant le rétablissement du taux normal de glutathion dans le sang. À l'inverse, le HNE apporté par la faible dose consommerait le glutathion, sans induction des défenses antioxydantes permettant de le re-synthétiser. Afin de valider cette hypothèse, nous pouvons proposer de doser, dans la muqueuse colique, l'expression des gènes sous contrôle du facteur de transcription Nrf2 (un acteur majeur de la défense antioxydante), notamment les gènes de la métabolisation du HNE.

3. Effet du fer héminique et du HNE sur l'initiation de la cancérogénèse colorectale

a. Protocole

Afin de répondre aux objectifs 2 (tester l'effet initiateur du fer héminique) et 3 (tester l'effet initiateur du HNE) de la deuxième partie de cette thèse, nous avons construit deux protocoles expérimentaux :

- ✓ **Etude 1 :** un protocole expérimental à court terme chez le rat nous permettant de déterminer l'effet de 2 semaines régimes expérimentaux sur la génotoxicité dans la muqueuse colique.
- ✓ **Etude 2 :** un protocole expérimental à long terme en co-initiation chez le rat, consistant à l'administration d'un régime pendant une courte durée, en association avec un agent chimio-inducteur. En effet, avant de mettre en place une expérimentation d'initiation, longue et couteuse, nous avons fait le choix d'apporter une preuve de concept de l'effet du fer héminique et du HNE en co-initiant la cancérogénèse par l'injection d'un agent chimio-inducteur, l'AOM (azoxyméthane).

Ces expérimentations ont été construites afin de répondre à plusieurs objectifs :

- La comparaison de 3 ou 4 groupes recevant ou non du fer sous différentes formes permettra de conclure quant aux effets génotoxique et co-initiateur du fer.
- La comparaison des 3 groupes recevant du HNE à dose croissante à un groupe recevant un régime témoin permettra de conclure quant aux effets génotoxique et co-initiateur du HNE.

i. Expérimentation animale

✓ Régimes expérimentaux

Les régimes expérimentaux sont composés d'une base commune de régime semi-synthétique AIN76 sous forme poudre, à laquelle s'ajoute 5% d'huile de carthame (**Tableau 9**).

Régime / Compo.	TSF	HNE 1	HNE 2	HNE 3	TFC	HEM	HB
	Témoin sans citrate de fer ajouté	HNE faible dose	HNE dose moyenne	HNE forte dose	Témoin avec citrate de fer	Hémine	Hémoglobine
Base AIN76 modifiée (low calcium)	95%				92,5% + 2,5% caséine		92,5%
Huile de carthame	5%						
HNE	-	0,02mg/20g de régime 1ppm	0,2mg/20g de régime 10ppm	2mg/20g de régime 100ppm	-	-	-
Citrate de fer	-	-	-	-	0,036%	-	-
Hémine	-	-	-	-	-	0,094%	-
Hémoglobine	-	-	-	-	-	-	2,5%

Tableau 9 : *Composition des régimes expérimentaux pour les expérimentations sur l'initiation de la cancérogénèse colorectale.*

La caséine ajoutée dans les groupes TFC et HEM permet d'équilibrer l'apport supplémentaire en protéine par l'hémoglobine dans le régime HB. L'apport en citrate de fer dans le régime TFC permet d'équilibrer l'apport en fer de l'hème dans les régimes HEM et HB. Les doses de HNE ont été définies dans le but de représenter un apport important mais néanmoins nutritionnel. En effet, nous avons choisi les mêmes doses de HNE que pour les études sur l'inflammation : la forte dose sera de 2mg de HNE pour une ration de 20g de régime (100mg/kg), ce qui, en termes d'exposition alimentaire est un apport correspondant à environ 2 fois la dose de HNE retrouvée dans une huile fortement oxydée. À partir de cette dose forte, nous avons décliné la dose moyenne à 0,2mg de HNE pour 20g de régime (10mg/kg), ce qui s'approche de la dose de HNE retrouvé dans de la viande. Enfin la faible dose a été fixée à 0,02mg de HNE pour 20g de régime (1mg/kg), ce qui modélise l'apport en HNE d'aliments faiblement contaminés (pour les doses de HNE retrouvées dans l'aliment, se référer au chapitre « *HNE et nutrition* » p30).

Concernant l'hémine et l'hémoglobine, les doses choisies permettent d'apporter 1,5µmol de fer héminique/g de régime, ce qui représente une dose environ 40 fois supérieure à l'apport représenté par un régime « normal ».

Ces expérimentations permettant de répondre à la fois quant aux effets génotoxique et initiateur du fer et du HNE, les groupes expérimentaux ont été définis en deux lots :

Les groupes du lot « fer » :

- 2 groupes recevant le fer héminique à la même dose, soit sous la forme hémoglobine à 2,5% du régime (HB), soit sous la forme hémine à 0,094% (HEM).
- Un groupe supplémenté en citrate de fer à 0,036% (Témoin Ferric Citrate, TFC) à la même concentration de fer que dans les deux régimes précédents. Ce groupe sert de témoin pour conclure quant à l'effet de la forme du fer et non de la teneur en fer du régime.
- Un groupe non supplémenté en citrate de fer (Témoin Sans Fer, TSF) qui permet de conclure quant à l'effet de la supplémentation en fer, quelle que soit sa forme.

Le groupes du lot « HNE » :

- 3 groupes recevant du HNE à 0,02 ; 0,2 et 2mg/20g de régime (HNE1, HNE2 et HNE3)
- Un groupe recevant le régime AIN76 de base, servant de témoin à l'effet du HNE (TSF)

En comparant les groupes TFC et TSF, nous pourrons évaluer les effets éventuels de la supplémentation en citrate de fer sur les paramètres suivis. Dans un second temps, en comparant les groupes HB et HEM au groupe TFC, nous pourrons déterminer l'effet du fer sous forme héminique. Enfin, en comparant les groupes HNE et TSF, nous pourrons déterminer les effets du HNE.

- ✓ **Etude 1 : court terme**

48 rats mâles Fischer F344 âgés de 8 semaines ont été hébergés individuellement dans des cages grillagées, dans une animalerie climatisée avec un cycle jour/nuit de 12h. Après une période d'adaptation d'une semaine, les animaux, ont reçu quotidiennement et *ad libitum* les régimes expérimentaux durant 14 jours. Les animaux ont été répartis en 6 groupes de 8 animaux : TSF, HNE1, HNE2, HNE3, TFC et HEM.

Les paramètres zootechniques suivants ont été mesurés : la croissance par pesée des animaux à J2, J7 et J14 et leur consommation alimentaire à J12. De plus, les fèces ont été récoltées individuellement entre J11 et J13. Les urines ont été récoltées à J7 ou J8.

Afin de mettre en application la règle des 3R, pour les groupes TSF, HNE1, HNE2 et HNE3, ce sont des échantillons animaux de l'expérimentation portant sur l'étude de l'inflammation (présentée plus haut dans ce manuscrit) qui ont été exploités ici.

- ✓ **Etude 2 : long terme**

100 rats mâles Fischer F344 âgés de 4 semaines ont été hébergés individuellement dans des cages grillagées, dans une animalerie climatisée avec un cycle jour/nuit de 12h. Après une période d'adaptation d'une semaine, les animaux ont reçu quotidiennement et *ad libitum* les régimes expérimentaux durant 14 jours avant l'injection d'AOM à 20mg/kg. Les animaux ont été répartis en 5 groupes de 20 animaux : TSF, HNE (HNE3), TFC, HEM et HB. Suite à l'injection d'AOM, les animaux ont été nourris pendant 60 jours avec un régime témoin (**Figure 45**).

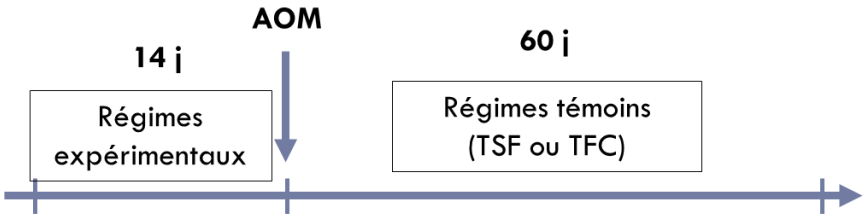


Figure 45 : *Déroulement du protocole de l'expérimentation de co-initiation chez le rat*

Les paramètres zootechniques suivants ont été mesurés : la croissance par pesée des animaux a été suivie de manière hebdomadaire, leur consommation alimentaire a été mesurée à entre J6 et J8 et à J13. De plus, les fèces ont été récoltées individuellement entre J12 et J14 ainsi qu'à J72. Les urines ont été récoltées à J6, J7 ou J8.

ii. Paramètres suivis

✓ **Etude 1 : court terme**

Le dosage du HNE dans les eaux fécales permet de mesurer l'exposition du côlon à cet aldéhyde suite à une alimentation peroxydante pour les groupes du lot 'fer' ou à son administration orale directe pour les groupes HNE.

L'exposition au HNE a également été estimée par le dosage du DHN-MA urinaire, métabolite du HNE. Dans le cadre de cette expérimentation, le dosage du DHN-MA permet, dans les groupes du lot 'fer' de témoigner de la lipoperoxydation ayant pour produit terminal le HNE, alors que dans les groupes du lot 'HNE', ce dosage permet de mesurer l'exposition au HNE par voie alimentaire.

La lipoperoxydation, qui semble associée à la cancérogénèse promue par l'hème, a été mesurée par dosage dans les eaux fécales des TBARS, utilisé comme biomarqueur global et non spécifique de la lipoperoxydation. En effet, ce dosage permet de mettre en évidence le MDA préexistant lié ou non à des molécules biologiques, les peroxydes lipidiques, les produits d'auto-oxydation des acides gras mais aussi toutes autres substances pouvant réagir avec l'acide thiobarbiturique (sucres, acides aminés, bilirubine). Il est cependant couramment utilisé comme biomarqueur de la lipoperoxydation et de stress oxydant en général (Meagher and FitzGerald, 2000).

Enfin, plusieurs dosages de génotoxicité ont été réalisés : une mesure de γH2AX, de p-H_3 (par l'équipe MeX de l'INRA ToxAlim, Marc Audebert et Laure Khoury) et un test des comètes sur la muqueuse colique à J14 H_3 (par l'équipe GS de l'INRA ToxAlim Elisa Boutet et Marianne Chevalier). Une mesure de γH2AX *in vitro* sur une lignée épithéliale colique de souris normale, immortalisée ($Apc^{+/+}$) suite à une exposition de 24h aux eaux fécales a également été effectuée. La mesure de γH2AX met en évidence les cassures double brin de l'ADN, p-H_3 est un biomarqueur du potentiel aneugénique tandis que le test des comètes met en évidence les cassures simple brin, double brin, les sites abasiques ainsi que les dommages oxydatifs.

Les dosages sur les eaux fécales présentés ci-dessus ont été réalisés sur des échantillons individuels (provenant de 3 jours de récoltes : J11 à J13) sauf le dosage de γH2AX *in vitro* qui a été réalisés sur des pools d'eaux fécales par groupe de régime, provenant des mêmes jours de récolte. Les dosages sur les urines ont été réalisés avec des urines de 24h récoltées à J7 ou 8. Enfin, les dosages et tests réalisés sur la muqueuse colique ont été réalisés suite à la mise à mort des animaux à J14.

✓ **Etude 2 : long terme**

L'initiation de la cancérogénèse a été estimée par le dénombrement et la mesure de la taille des lésions prénéoplasiques de type ACF (Aberant Crypt Foci) dans le côlon de chaque individu.

Le dosage du HNE dans les eaux fécales permet de mesurer l'exposition du côlon à cet aldéhyde suite à une alimentation peroxydante pour les groupes du lot 'fer' ou suite à sa consommation directe pour le groupe HNE.

Comme pour l'étude précédente, l'exposition au HNE a également été estimée par le dosage du DHN-MA urinaire et la lipoperoxydation, a été mesurée par dosage des TBARS dans les eaux fécales.

Enfin, plusieurs dosages de génotoxicité ont été réalisés : une mesure de γH2AX et de p-H_3 sur la muqueuse colique à J75 ou 76 ou 77 et une mesure de γH2AX *in vitro* sur une lignée épithéliale colique de souris normale, immortalisée ($Apc^{+/+}$) suite à une exposition de 24h aux eaux fécales de J12/13/14 (soit à la fin de la période d'administration des régimes expérimentaux et avant l'injection d'AOM) et de J72 (soit à la fin de l'expérimentation, après plusieurs semaines de régime témoin).

Les dosages sur les urines ont été réalisés avec des urines de 24h récoltées à J6, 7 ou 8. Tous les dosages sur les eaux fécales ont été réalisés sur échantillons individuels (provenant de 3 jours de récoltes : J12 à J14) et répétés sur des eaux fécales produites en pool par groupe de régime avec des fèces récoltés à J72. Le dosage de l'hème et le dosage de γH2AX *in vitro* ont également été réalisés sur des pools d'eaux fécales par groupe de régime (de J12 à 14). Enfin, les dénombrements de lésions prénéoplasiques dans le côlon et les dosages sur la muqueuse colique ont été réalisés suite à la mise à mort des animaux à J75, 76 ou 77.

iii. Statistiques

Ces expérimentations permettant de répondre à la fois quant à l'effet génotoxique et initiateur du fer et du HNE, deux séries d'analyses statistiques distinctes ont été réalisées :

- **Etude 1 : court terme**
  - Les données des groupes du **lot 'fer'** (TSF, TFC, HEM) ont été exploitées par une analyse de variance paramétrique (ANOVA) ou par un test de Kruskal Wallis dans le cas de l'inégalité des variances vérifiée par le test de Brown-Forsythe. Les tests de Tukey ou de Dunn ont été utilisés comme post-tests pour réaliser des comparaisons multiples, respectivement à la suite de l'ANOVA ou de l'ANOVA non paramétrique.
  - Le même type d'analyse a été réalisé pour les données des groupes du **lot 'HNE'** (TSF, HNE1, HNE2, HNE3)
- **Etude 2 : long terme**
  - Les données des groupes du **lot 'fer'** ont été exploitées par une analyse de variance paramétrique (ANOVA) ou par un test Kruskal Wallis dans le cas de l'inégalité des variances. Les tests de Tukey ou de Dunn ont été utilisés comme post-tests pour réaliser des comparaisons multiples, respectivement à la suite de l'ANOVA ou de l'ANOVA non paramétrique.
  - Les données des groupes du **lot 'HNE'** ont été exploitées par un test t de Student paramétrique ou non (test de Mann-Witney) selon la normalité des distributions.

Toutes les représentations graphiques représentent la moyenne ± SEM. Lorsque les données sont citées dans le texte, les moyennes sont exprimées ± SD.

b. Résultats : effet du fer héminique sur la génotoxicité et l'initiation

✓ **Etude 1 : court terme**

Nous n'avons pas observé de différence sur les poids des animaux dans les différents groupes du lot 'fer' à J7, ni à J14/15. Les animaux pèsent en moyenne 244±19g à J7 (ANOVA p=0,8991) et 266±20g à

J14/15 (ANOVA p=0,9993). De même, la consommation à J12 ne montre pas de différence entre les groupes (15,6 ±1,4g, ANOVA p=0,3995).

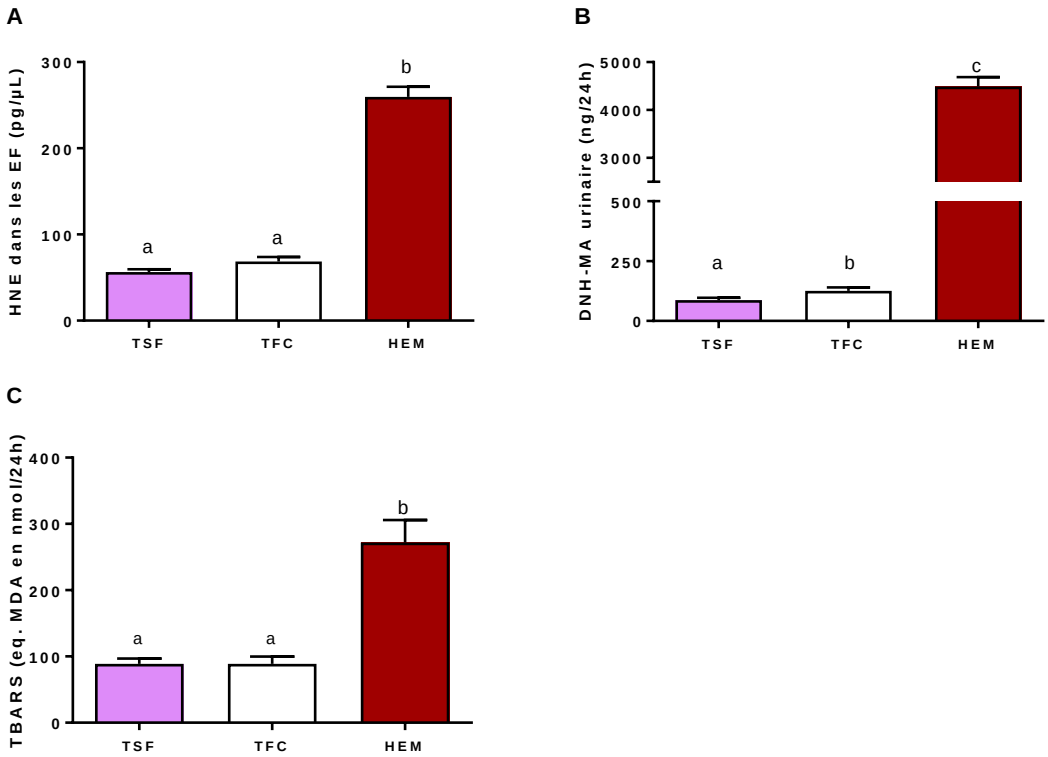


Figure 46 : *Teneur en HNE dans les eaux fécales (**A**), DHN-MA urinaire (**B**) et TBARS dans les eaux fécales (**C**) après 2 semaines de régimes expérimentaux.*
(Moyenne ± SEM, n=8, les lettres indiquent des groupes statistiquement différents d'après une ANOVA).

Le dosage du HNE dans les eaux fécales (**Figure 46**) montre une augmentation significative de la concentration en HNE dans le groupe qui a consommé du fer sous forme héminique alors qu'il n'y a pas de différence entre les deux groupes surchargés ou non en fer sous forme de citrate de fer (ANOVA sur données transformées en log p<0,0001). Les concentrations moyenne en HNE sont les suivantes : pour le groupe TSF 56pg/µL (0,36µM) ; pour le groupe TFC 69pg/µL (0,44µM) et pour le groupe HEM 260pg/µL (1,6µM).

De même, le DHN-MA urinaire est fortement augmenté dans le groupe qui a consommé de l'hémine, mais également légèrement dans le groupe supplémenté en citrate de fer par rapport au groupe non supplémenté (ANOVA sur données transformées en log p<0,0001) (**Figure 46**).

Le dosage des TBARS dans les eaux fécales présente le même profil que le dosage du HNE avec une forte augmentation du signal dans le groupe hémine (ANOVA p<0,0001)

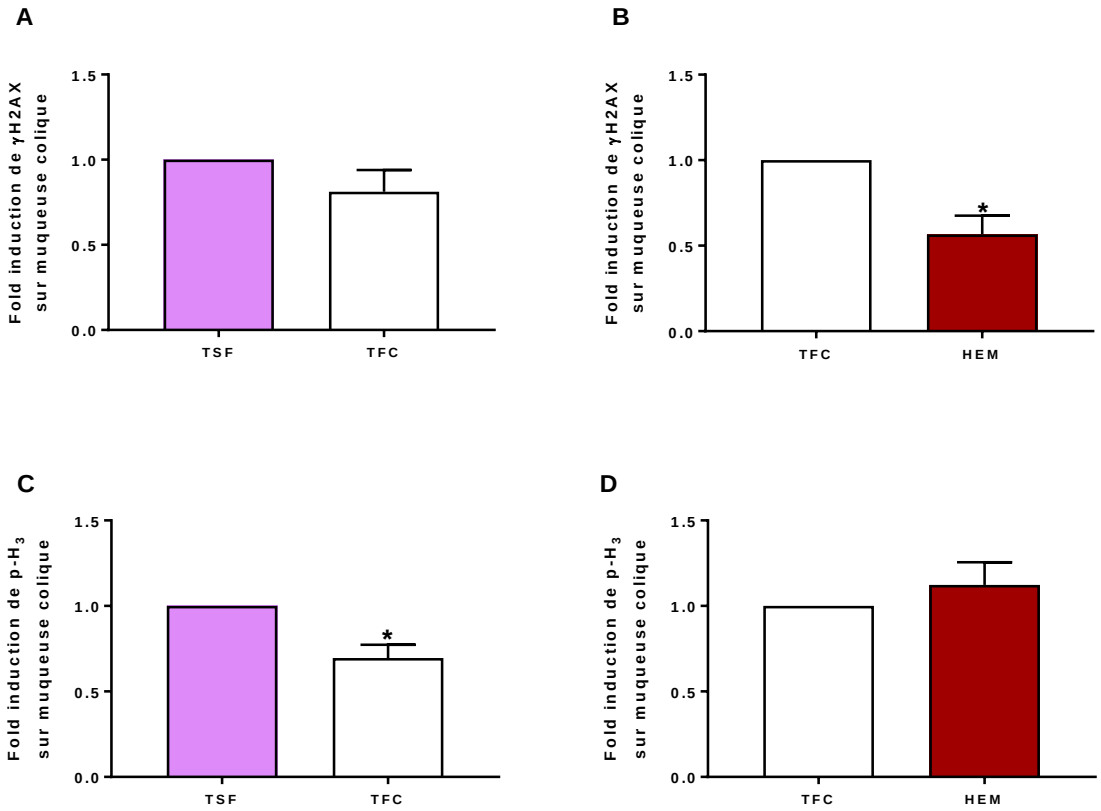


Figure 47 : *Induction de γH2AX* ***(A et C****) et de p-H₃ (****B et D****) sur la muqueuse colique après 2 semaines de régimes expérimentaux*
*(Moyenne ± SEM, n=8, * p<0,05 par one sample t-test vs 1)*

Nous avons ensuite effectué l'analyse de γH2AX et de p-H_3 sur la muqueuse colique (**Figure 47**). Cette analyse repose sur le marquage de ces deux histones phosphorylées, dont le signal est normalisé par la quantité d'ADN présente dans l'échantillon. On calcule ensuite le ratio entre la condition témoin et la condition traitée. Le marquage de l'ADN permet *in vitro* de mesurer la viabilité des cellules. *In vivo*, ce marquage de l'ADN permet de s'assurer de l'homogénéité de la taille (nombre de cellules) des échantillons.

Selon Khoury *et al*., l'effet génotoxique est défini par (Khoury et al., 2016) :

i) une viabilité supérieure à 80%
ii) une différence significative avec le témoin
iii) une induction de γH2AX ou de p-H_3 supérieur à 1,3 ou une diminution de l'induction de p-H_3 inférieure à 0,7

Etant donné que les résultats sont exprimés en ratio, la valeur du témoin se retrouve donc toujours fixée à 1. Ainsi, afin de tester la différence entre un groupe expérimental et son témoin, nous avons réalisé un one sample t-test par rapport à la valeur 1.

Le dosage de γH2AX sur la muqueuse colique montre une diminution significative de l'induction de γH2AX dans le groupe hémine (one sample t-test vs 1, p=0,0112), ainsi qu'une diminution de l'induction de la phosphorylation de H_3 dans le groupe TFC (0,695 ± 0,078, one sample t-test vs 1, p=0,0057). Selon les conditions établies par Khoury et al., on peut donc conclure que 2 semaines de régime TFC entraînent des effets génotoxiques sur la muqueuse colique.

Dans le groupe hémine, l'absence d'induction de γH2AX tend à montrer l'absence d'effet génotoxique de l'hémine sur la muqueuse colique après 2 semaines de régime expérimental. Selon Khoury et al., il est possible de conclure à une cytotoxicité lors d'une diminution concomitante de la phosphorylation des histones H2AX et H_3 *in vitro*. Or, dans notre cas, seule la diminution de la phosphorylation de H2AX est observée, nous empêchant de conclure quant à un effet cytotoxique.

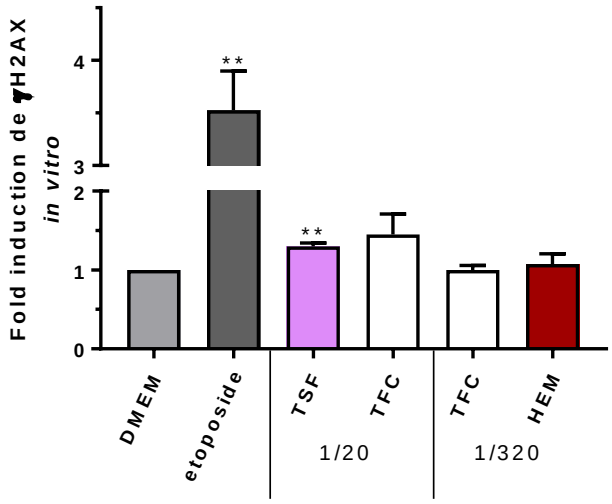


Figure 48 : *Induction de γH2AX in vitro sur des cellules épithéliales coliques normales, après exposition pendant 24h à des eaux fécales de J11 à J13*
*(Moyenne ± SEM, n=4, eaux fécales en pool par groupe, diluées 1/20 ou 1/320, ** p<0,01 par one sample t-test vs 1)*

Enfin, la mesure de γH2AX *in vitro* sur une lignée épithéliale colique de souris normale, immortalisée ($Apc^{+/+}$) suite à une exposition de 24h aux eaux fécales a été effectuée (**Figure 48**). Des tests de cytotoxicité ont été réalisés préalablement sur des dilutions en série des eaux fécales, permettant de déterminer la dilution la moins importante n'ayant pas d'effet cytotoxique. Le traitement à l'étoposide (agent génotoxique) permet d'établir un témoin positif d'induction de γH2AX. Les résultats montrent une augmentation significative de l'induction de γH2AX par les eaux fécales TSF (1,3 ± 0,04, one sample t-test vs 1, p=0,0052). Ce ratio étant de 1,3, nous pouvons conclure à la génotoxicité de cette eau fécale selon les conditions définies par Khoury *et al.*.

- ✓ **Etude 2 : long terme**

Nous n'avons pas observé de différence sur les poids des animaux dans les différents groupes du lot 'fer' à la fin de l'expérimentation : les animaux pèsent en moyenne 287±23g (ANOVA p=0,4616). De même, la consommation à J13 ne montre pas de différence entre les groupes (14,2 ±2,2g, ANOVA p=0.1812).

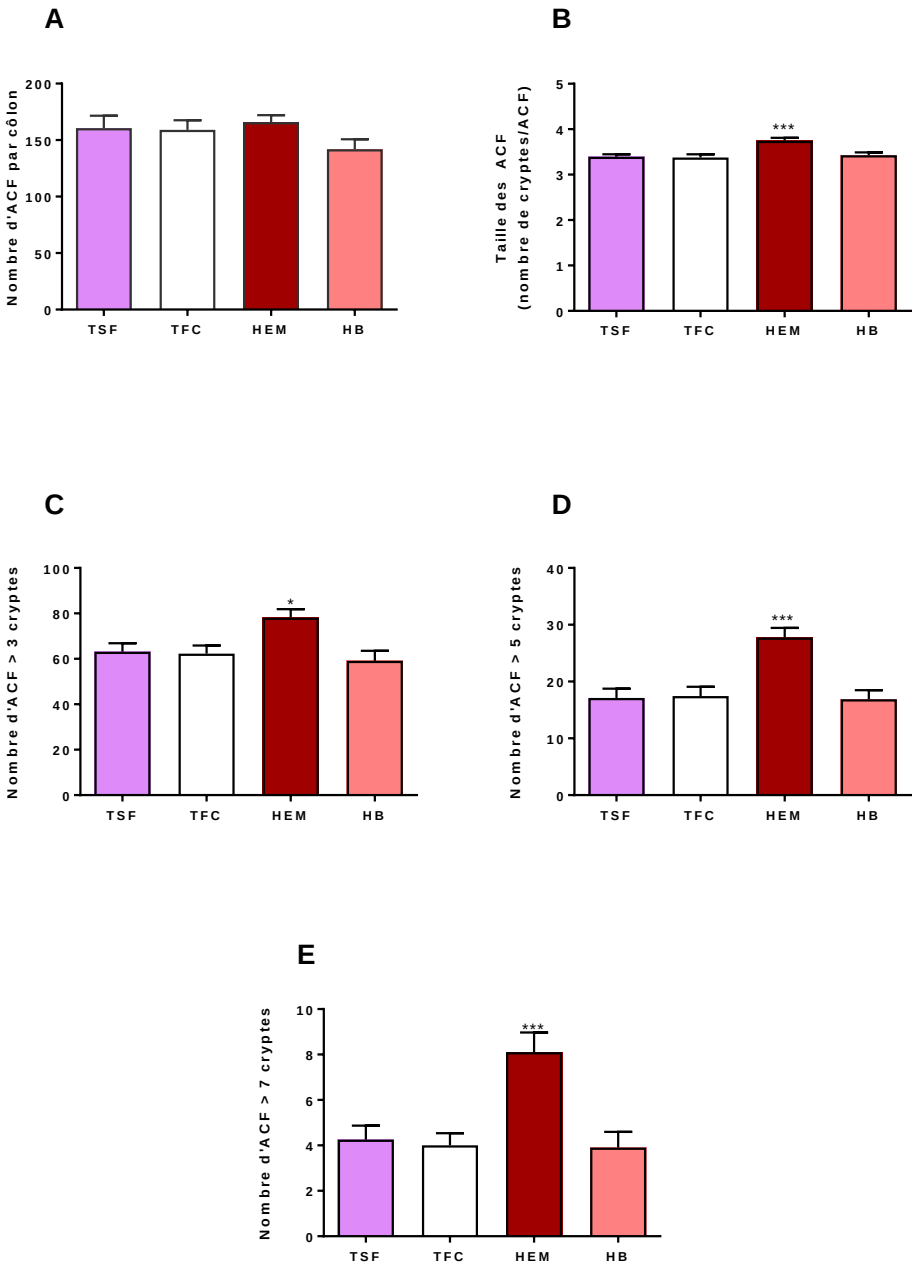


Figure 49 : *Nombre d'ACF par côlon (**A**), taille des ACF (**B**) et nombre d'ACF de plus que 3, 5 et 7 cryptes/ACF (respectivement **C, D et E**) après 2 semaines de régimes expérimentaux suivi d'une chimio-induction et de 60 jours de régime témoin chez le rat.*
*(Moyenne ± SEM, n=20, *p<0,05; ***p<0,001 en ANOVA)*

Le dénombrement des ACF et la mesure de la taille de ces lésions précancéreuses montrent une absence d'effet de la supplémentation en citrate de fer ou en fer héminique sous forme hémoglobine. En revanche, on observe une augmentation significative de la taille des ACF, ainsi que du nombre de gros ACF (foyers de cryptes aberrantes de plus de 3, 5 et 7 cryptes) dans le groupe ayant reçu de l'hémine (**Figure 49**).

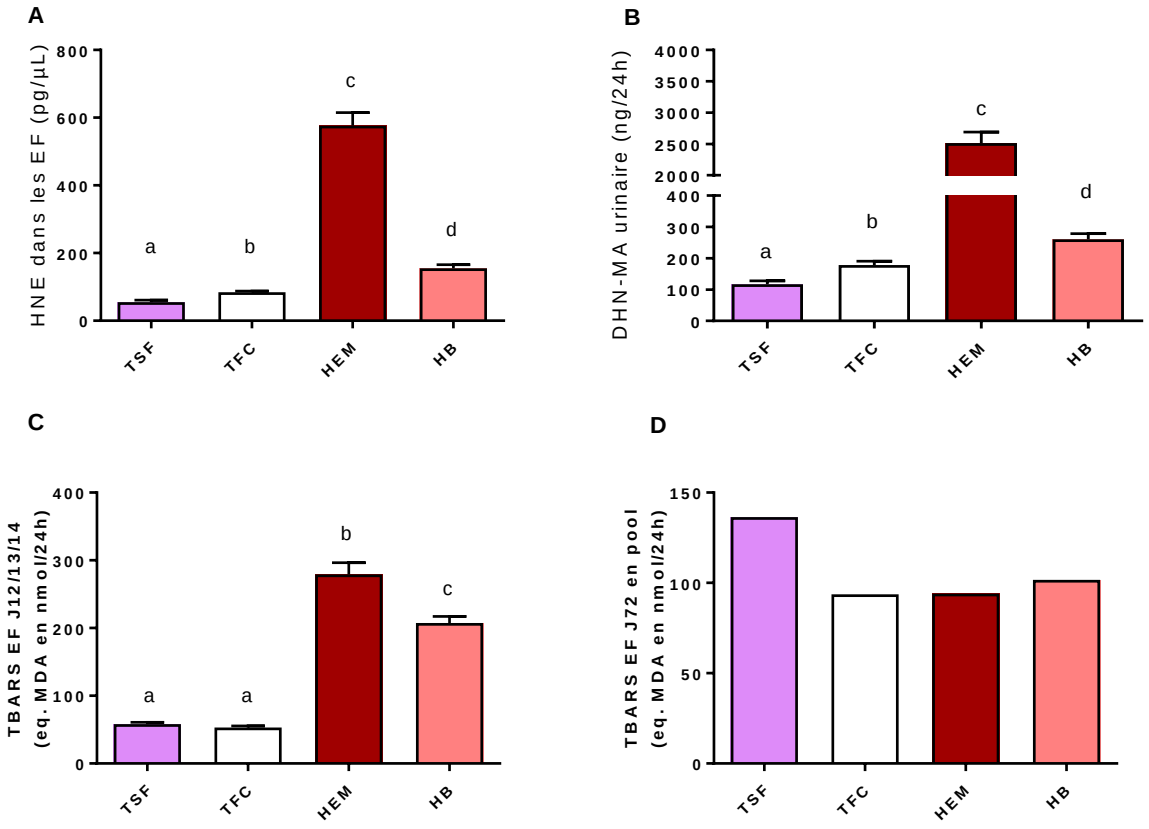


Figure 50 : *Teneur en HNE dans les eaux fécales (**A**), en DHN-MA urinaire (**B**), en TBARS dans les eaux fécales (**C**) après 2 semaines de régimes expérimentaux, et teneur en TBARS dans les eaux fécales à J72 (**D**)*

(Moyenne ± SEM, n=20, une lettre différente indique une différence significative en ANOVA)

Concernant les marqueurs de lipoperoxydation mesurés pendant les régimes expérimentaux, le dosage du DHN-MA urinaire est fortement augmenté suite au régime hémine, et augmenté plus modestement suite aux régimes hémoglobine et supplémenté en citrate de fer. Le dosage du HNE dans les eaux fécales présente le même profil que le dosage du DHN-MA urinaire. Les TBARS quant à eux sont significativement plus élevés dans les eaux fécales des groupes ayant consommé du fer héminique. Comme attendu, à J72, soit plusieurs semaines après la fin des régimes expérimentaux, les TBARS dans les eaux fécales reviennent à un niveau basal (**Figure 50**).

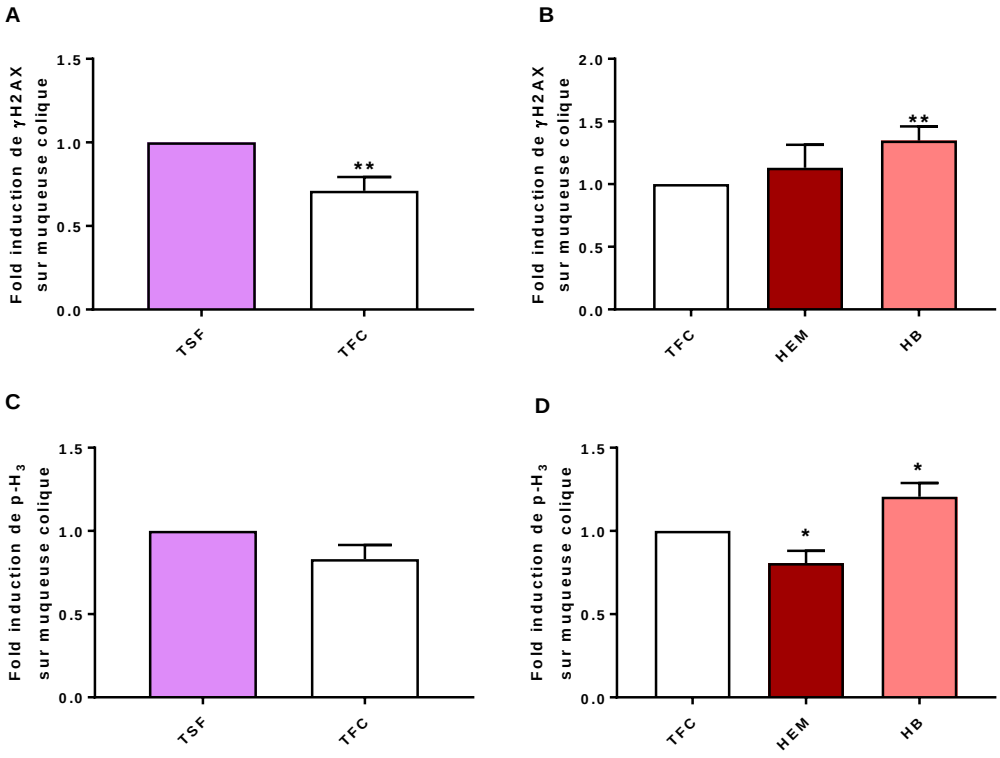


Figure 51 : *Induction de γH2AX (**A et B**) et de p-H_3 (**C et D**) sur la muqueuse colique après 14 jours de régimes expérimentaux suivis d'une chimio-induction et de 60 jours de régime témoin chez le rat (Moyenne ± SEM, n=20, * p<0,05 ; ** p<0,01 par one sample t-test vs 1).*

Le dosage de γH2AX et de p-H_3 sur la muqueuse colique à la fin de l'expérimentation montre une augmentation de l'induction de la phosphorylation de ces histones suite au régime hémoglobine uniquement (**Figure 51**). Cependant, en se basant sur les conditions d'interprétation de Khoury *et al.*, seule l'augmentation de l'induction de γH2AX due au régime hémoglobine permet de conclure à un effet génotoxique de ce régime (1,348, p=0,0066 par one sample t-test vs 1).

Concernant l'hémine, la diminution de la phosphorylation de H_3 est significative (0,807, p=0,170 par one sample t-test vs 1), mais ne descend pas sous le seuil de 0,7, ne permettant donc pas d'interpréter cette observation comme une preuve de génotoxicité, mais seulement comme une tendance.

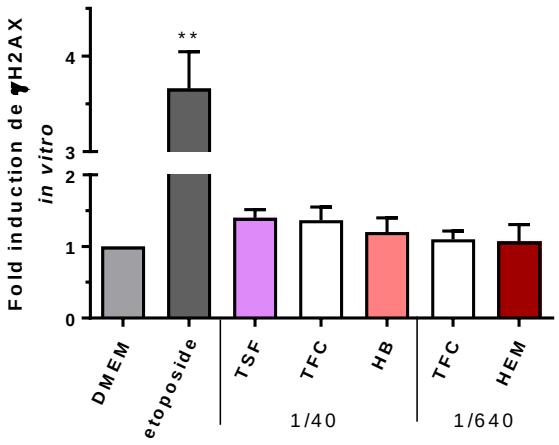


Figure 52 : *Induction de γH2AX in vitro sur des cellules épithéliales coliques normales, après exposition pendant 24h à des eaux fécales de J12 à J14*
*(Moyenne ± SEM, n=4, eaux fécales en pool par groupe, diluées 1/40 ou 1/640, ** p<0,01 par one sample t-test vs 1)*

Enfin, le dosage de γH2AX réalisé *in vitro* sur des cellules épithéliales de côlon normales suite à une exposition de 24h aux eaux fécales de J12 à J14 montre une absence d'effet des eaux fécales diluées au 1/40 des groupes supplémentés ou non en citrate de fer et du groupe ayant consommé de l'hémoglobine (**Figure 52**). On observe également une absence d'effet des eaux fécales diluées au 1/640e des groupes ayant consommés du citrate de fer ou de l'hémine (le dosage de γH2AX exige une absence de cytotoxicité de l'agent testé ; les eaux fécales du groupe hémine présentant une plus grande cytotoxicité que les eaux fécales des autres groupes, nous avons été contraints de travailler à une dilution supérieure). Les mêmes résultats ont été observés après exposition des cellules à des eaux fécales issues de fèces récoltées à J72, soit à la fin de l'expérimentation, après plusieurs semaines de régimes témoins.

c. Résultats : effet du HNE sur la génotoxicité et l'initiation

✓ **Etude 1 : court terme**

Nous n'avons pas observé de différences entre les groupes du 'lot HNE' sur les paramètres zootechniques (poids et consommation alimentaire), comme indiqué plus haut dans ce manuscrit (au chapitre « *Effet du HNE sur l'inflammation, étude 1 : 2 semaines* », en p96). De même, les observations faites sur la teneur en HNE et en TBARS dans les eaux fécales et sur le DHN-MA urinaire sont indiquées dans le chapitre cité plus haut.

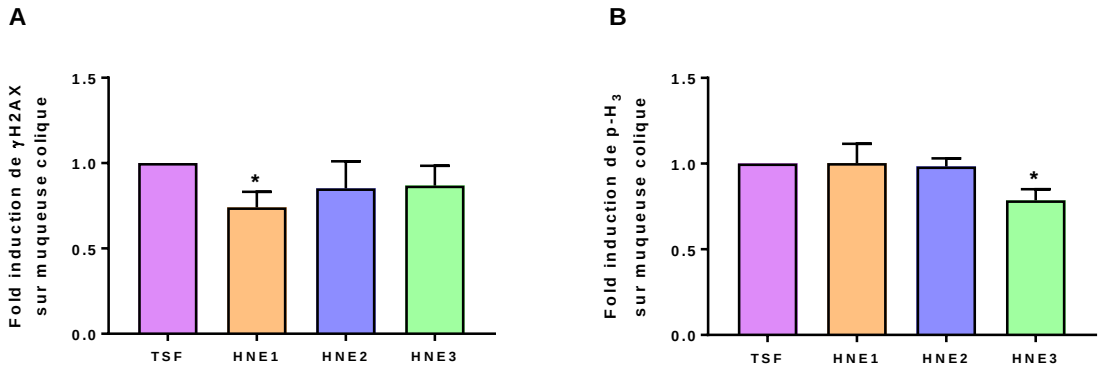


Figure 53 : *Induction de γH2AX (**A**) et de p-H_3 (**B**) sur la muqueuse colique après 2 semaines de régimes expérimentaux.*
*(Moyenne ± SEM, n=8, * p<0,05 par one sample t-test vs 1)*

Le dosage de γH2AX sur la muqueuse colique montre une diminution significative de l'induction de γH2AX pour le groupe HNE1 (one sample t-test vs 1, p=0,0252). Le dosage de p-H_3 révèle une diminution pour le groupe HNE3 (0,785, p=0,0135 en one saple t-test vs 1). On peut donc conclure que le régime HNE3 entraîne une tendance à la génotoxicité sur la muqueuse colique (**Figure 53**).

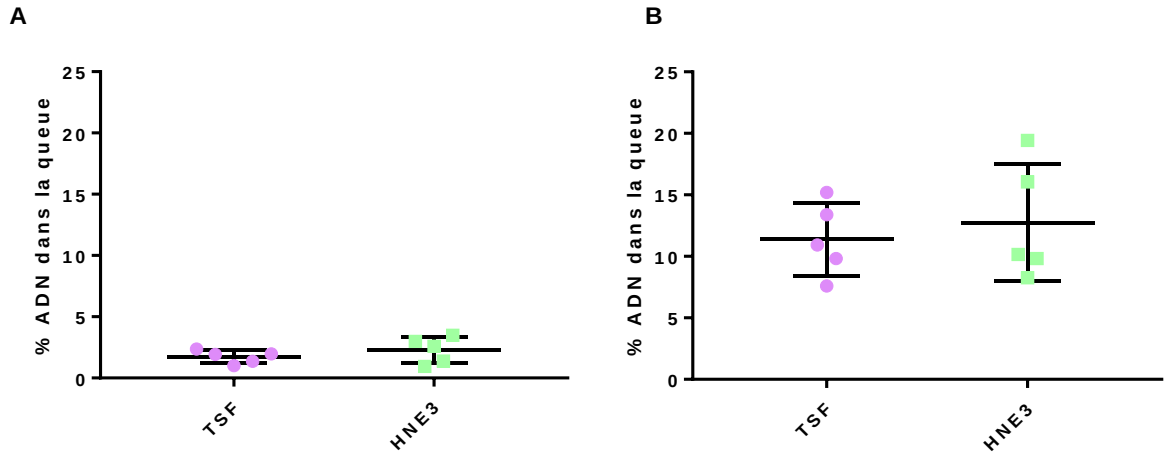


Figure 54 : *Test des comètes sans FPG (**A**) et avec FPG (**B**) sur muqueuse colique après 3 semaines de régimes expérimentaux.*
(n=5, non significatif en t-test)

Afin d'étoffer les résultats obtenus concernant la génotoxicité des régimes HNE sur la muqueuse colique, nous avons réalisé un test des comètes sur des muqueuses coliques provenant de rats ayant été nourris pendant 3 semaines avec un régime TSF et un régime HNE3 (n=5) (**Figure 54**). Ce test nous montre une absence de différence sur le pourcentage d'ADN présent dans la queue des comètes, que le test ait été réalisé en absence ou en présence de FPG (la FPG permettant de révéler les dommages oxydatifs). D'après le test des comètes, 3 semaines de régime HNE3 n'a donc pas d'effet sur la génotoxicité de la muqueuse colique.

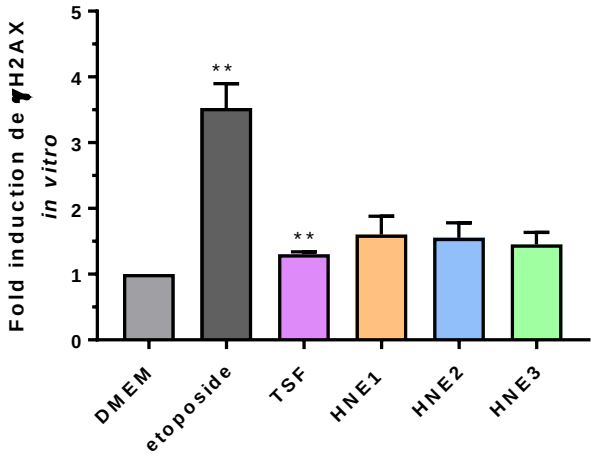


Figure 55 : *Fold induction de γH2AX in vitro sur des cellules coliques épithéliales normales après exposition pendant 24h à des eaux fécales en pool par groupe de régime provenant de J11 à J13 (Moyenne ± SEM, n=4, **p<0,01 en one sample t-test vs 1)*

Enfin, la mesure de γH2AX *in vitro* sur une lignée épithéliale colique de souris normale, immortalisée ($Apc^{+/+}$) suite à une exposition de 24h aux eaux fécales, montre une augmentation significative de l'induction de γH2AX par les eaux fécales TSF (1,3, one sample t-test vs 1, p=0,0052). De plus, le seuil de 1,3 étant atteint, cette valeur permet de conclure sur l'effet génotoxique des eaux fécales TSF tandis que les autres eaux fécales ne montrent qu'une tendance à l'augmentation (**Figure 55**).

- ✓ **Etude 2 : long terme**

Nous n'avons pas observé de différence sur les poids des animaux dans les deux groupes du lot 'HNE' à la fin de l'expérimentation : les animaux pèsent en moyenne 290±19g (Mann Whitney p=0,6346). De même, la consommation à J13 ne montre pas de différence entre les groupes (13,9 ±2,4g, t-test p=0,6637).

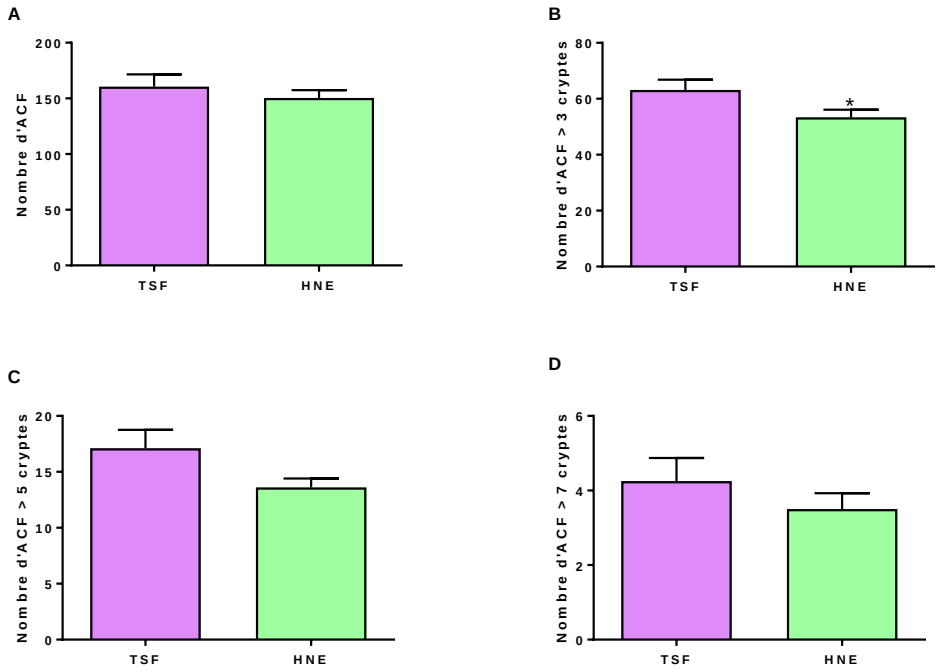


Figure 56 : *Nombre d'ACF totaux (**A**) et nombre ACF de plus que 3, 5 et 7 cryptes/ACF (respectivement **B, C et D**) après 2 semaines de régimes expérimentaux suivi d'une chimio-induction et de 60 jours de régime témoin chez le rat*
*(Moyenne ± SEM, n=20, t-test * p<0,05)*

Le dénombrement des ACF et la mesure de la taille de ces lésions précancéreuses montrent une diminution significative du nombre de gros ACF (foyers de cryptes aberrantes de plus de 3 cryptes) (**Figure 56**).

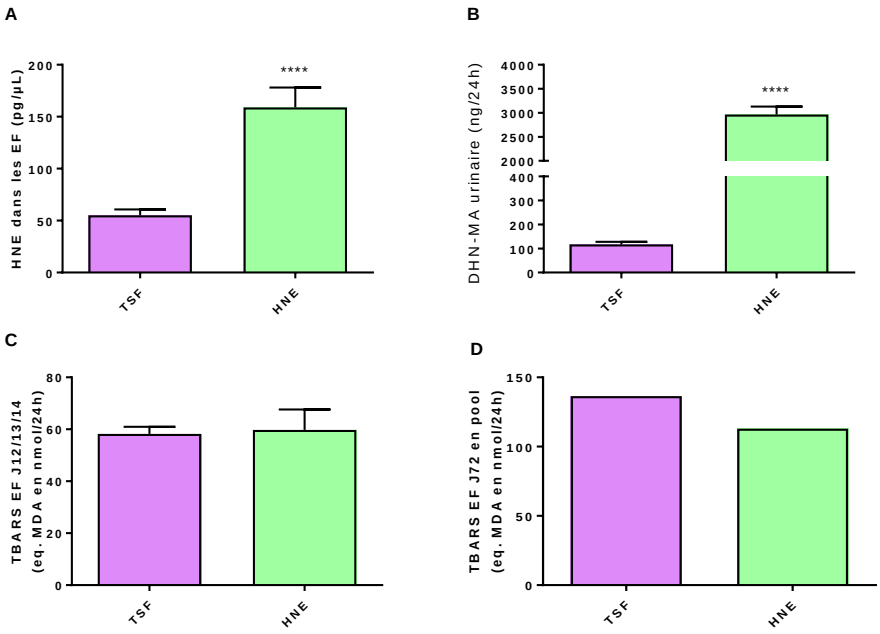


Figure 57 : *Teneur en HNE dans les eaux fécales (**A**), en DHN-MA urinaire (**B**), en TBARS dans les eaux fécales (**C**) après 2 semaines de régimes expérimentaux, et teneur en TBARS dans les eaux fécales à J72 (**D**)*

*(Moyenne ± SEM, n=20, t-test ****p<0,0001)*

Concernant les marqueurs de lipoperoxydation, les TBARS dans les eaux fécales ne sont pas augmentés. En revanche, les marqueurs de l'exposition au HNE que sont le dosage du HNE dans les eaux fécales et le dosage du DHN-MA urinaire augmentent significativement suite à une exposition au HNE par voie orale (**Figure 57**).

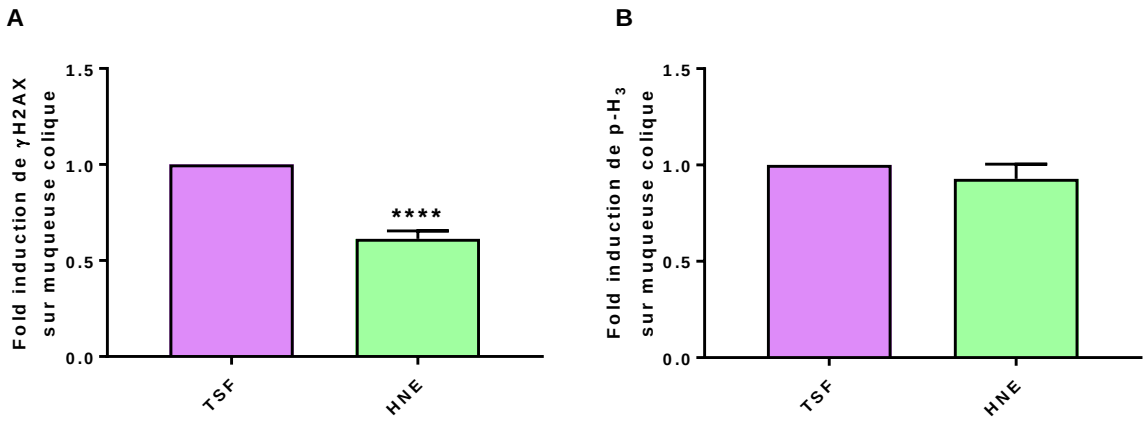


Figure 58 : *Induction de γH2AX (**A**) et p-H₃ (**B**) sur la muqueuse colique après 14 jours de régimes expérimentaux suivis d'une chimio-induction et de 60 jours de régime témoin chez le rat (Moyenne ± SEM, n=20, one sample t-test ****p<0,0001)*

Le dosage de γH2AX sur la muqueuse colique à J75 (soit deux mois après la fin des régimes expérimentaux) montre une diminution de l'induction de la phosphorylation de cette histone suite au régime HNE. En revanche, le régime HNE n'a pas d'effet sur la phosphorylation de l'histone H_3 (**Figure 58**).

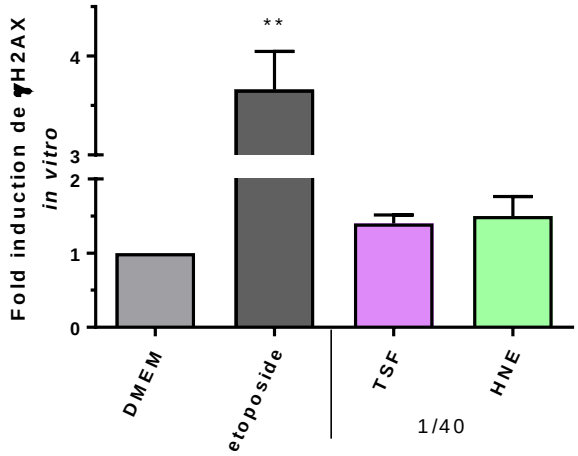


Figure 59 : *Fold induction de γH2AX in vitro sur des cellules coliques épithéliales normales après exposition pendant 24h à des eaux fécales en pool par groupe de régime provenant de J12 à J14 (Moyenne ± SEM, n=3, one sample t-test vs 1 **p<0,01)*

Enfin, le dosage de γH2AX réalisé *in vitro* sur des cellules épithéliales de côlon normales suite à une exposition de 24h aux eaux fécales de J12 à J14 (soit durant l'exposition aux régimes expérimentaux) montre une absence d'effet des eaux fécales des groupes TSF et HNE diluées au 1/40 (**Figure 59**). De

même, les eaux fécales de la fin de l'expérimentation (produites à partir de fèces récoltées pendant l'administration des régimes expérimentaux) ne montrent pas d'effet *in vitro* suite à l'exposition de cellules épithéliales de côlon normales.

d. Conclusion et discussion sur les effets du fer héminique sur la génotoxicité et l'initiation

i. Conclusion

Dans ce modèle de co-initiation chez le rat, nous montrons pour la première fois que la consommation de fer héminique sous forme d'hémine entraine une augmentation de la taille des ACF et du nombre de gros ACF.

Comme attendu dans les deux études, les régimes hémine et hémoglobine augmentent les marqueurs de lipoperoxydation que sont les TBARS fécaux et le DHN-MA urinaire. On observe également une augmentation de la concentration de HNE dans les eaux fécales suite à ces régimes.

La supplémentation en citrate de fer n'entraine aucune modification des paramètres suivis sauf une légère augmentation du DHN-MA urinaire et du HNE dans les eaux fécales pour l'étude de co-initiation mais pas pour l'étude courte, même si le temps d'exposition et les régimes sont les mêmes. Cette différence entre les deux études peut s'expliquer par la différence au niveau de la puissance statistique des deux études : dans l'étude court terme, n=8, tandis que dans l'étude long terme, n=20.

Le dosage de γH2AX sur la muqueuse colique en court terme montre une diminution de l'induction de la phosphorylation de cette histone dans le groupe hémine alors qu'en long terme, on observe une augmentation de l'induction suite au régime hémoglobine. On note en revanche un effet génotoxique du régime TFC (diminution de p-H_3 < 0,7) sur la muqueuse colique en court terme.

Enfin, la mesure de γH2AX *in vitro* sur une lignée épithéliale colique de souris normale, immortalisée ($Apc^{+/+}$) suite à une exposition de 24h aux eaux fécales, montre une augmentation significative de l'induction de γH2AX par les eaux fécales TSF sur l'étude courte mais ne montre aucun effet des eaux fécales issues de l'expérimentation longue.

ii. Discussion

- ✓ *Augmentation de la taille des ACF et effet initiateur*

Dans ce modèle de co-initiation par l'AOM chez le rat, permettant pour la première fois d'observer les effets du fer héminique sur l'initiation, nous observons une augmentation de la taille et du nombre des gros ACF, alors que pour conclure à un effet initiateur, il serait plus correct de conclure vis-à-vis d'un effet sur le nombre des ACF (McLellan and Bird, 1988). Cette liberté par rapport à la théorie est finalement prise par plusieurs auteurs (Cheng et al., 2003; Pierre et al., 2008) et est supportée par le plan expérimental mis en place. Si l'agent testé est donné après la chimio-induction, alors son effet est promoteur ou éventuellement co-initiateur. Si l'agent testé est donné avant la chimio-induction, alors son effet est initiateur ou éventuellement promoteur. Dans le cas de notre étude, le plan expérimental supporte que l'effet de l'hémine observé sur le nombre d'ACF est un effet co-initiateur, puisque l'hémine a été distribuée uniquement avant l'injection de l'AOM.

Cependant, nous pourrions avancer que l'effet observé résulterait en fait d'un effet promoteur de l'hémine. En effet, nous pourrions imaginer que l'hémine n'a pas d'effet initiateur, mais simplement un fort effet promoteur sur les lésions initiées par l'AOM ; cet effet prenant place seulement pendant les quelques heures où l'hémine était présente dans le côlon au moment de l'injection d'AOM et avant la vidange totale de la lumière colique par l'avancée du transit intestinal. Ce fort effet promoteur potentiel pourrait s'expliquer par des effets hyperprolifératrices de l'hème, notamment suggérés par Ishikawa et Ijssennagger (IJssennagger et al., 2013; Ishikawa et al., 2010).

Du reste, un dénombrement des MDF, les foyers déplétés en mucine, est d'ores et déjà prévu et pourrait permettre d'étayer les preuves quant à l'effet initiateur observé.

D'autre part, il semble évident que la manière la plus sûre de conclure quant à l'effet initiateur d'un agent reste de réaliser une expérimentation d'initiation exigeant l'administration courte de l'agent à une dose élevée sans autre agent initiateur, puis d'observer l'évolution pathologique pendant plusieurs années. L'expérimentation proposée ici serait donc une adaptation d'un protocole ayant déjà été mis en place chez la souris, pour tester l'effet cancérigène d'un régime de type « Western Diet » sur 1,5 à 2 ans, sans chimio-induction (Newmark et al., 2009; Yang et al., 2008).

✓ *Effet co-initiateur de l'hémine : effet propre ou effet des produits de lipoperoxydation ?*

Pour la première fois, nous avons montré l'effet co-initiateur de l'hémine. Il est donc intéressant de s'interroger sur le mécanisme d'action de cette forme de fer héminique, d'autant plus que l'hémoglobine n'a montré aucun effet sur l'initiation de la cancérogénèse. Nous avons choisi de discuter cette thématique en la mettant en perspective avec d'autres résultats obtenus durant ces travaux ; cette discussion est ainsi située au chapitre « *Discussion et perspectives* » (p129).

✓ *Différence d'effet sur la co-initiation entre hémine et hémoglobine*

De la même façon, nous discuterons de l'effet différentiel entre hémine et hémoglobine dans la partie « *Discussion et perspectives* » (p129).

✓ *Effet du citrate de fer*

Concernant l'effet du citrate de fer, nous apportons ici une première démonstration de l'absence d'effet de la supplémentation sur les ACF. Cela renforce d'autant plus l'argument selon lequel les effets observés ici, ou lors d'études précédentes (Bastide et al., 2015; Pierre et al., 2003), sont bien dus au fer sous forme héminique et pas simplement à une teneur en fer augmentée par rapport au régime AIN76 de base.

Nous observons cependant une modeste augmentation du DHN-MA urinaire et du HNE dans les eaux fécales mais pas des TBARS en présence de citrate de fer par rapport au régime non supplémenté. Cette observation peut s'expliquer par un faible effet oxydant du citrate de fer, entrainant l'oxydation des acides gras du régime, favorisant une production de HNE, cependant faible, dont témoigne l'augmentation de DHN-MA dans les urines.

✓ *Génotoxicité sur la muqueuse à court terme et à long terme*

Les résultats du dosage de γH2AX sur la muqueuse colique sont étonnants car ils ne sont pas en accord avec les résultats du dénombrement des lésions prénéoplasiques. En effet, nous aurions pu attendre une augmentation des lésions génotoxiques sur la muqueuse, associée à une augmentation des ACF. Cependant, ici, nous observons :

- En court terme : une diminution de l'induction de γH2AX avec le régime hémine et un effet génotoxique significatif du régime TFC ($p\text{-}H_3$ <0,7).

- En long terme : pas de génotoxicité sur la muqueuse suite au régime hémine et une induction de γH2AX suite au régime hémoglobine, ce dernier n' étant pas associé à une augmentation des lésions prénéoplasiques. Cet effet est d'autant plus étonnant que l'effet observé sur la muqueuse des animaux soumis au régime hémoglobine a été dosé 60j après l'arrêt de ce régime expérimental, témoignant d'un effet très persistant.

✓ *Génotoxicité in vitro suite à une exposition aux eaux fécales des études court terme et long terme : absence d'effet du régime hémine*

Concernant l'absence d'effet génotoxique observé *in vitro* suite à une exposition aux eaux fécales, même avec les eaux fécales des animaux ayant consommé de l'hémine, on peut remarquer que

l'exigence du test de travailler à une dilution non cytotoxique biaise potentiellement l'observation. On peut en ce sens imaginer que les effets cytotoxiques et génotoxiques des eaux fécales des animaux du groupe hémine co-existent à une dilution qui ne permet pas d'observer les effets génotoxiques à l'aide du dosage de γH2AX. Malgré les tests réalisés sur une gamme de dilution au ½ à partir du 1/20, il est possible que des effets génotoxiques se révèlent à une dilution non testée entre 1/320 (toxique) et 1/640 (non toxique et non génotoxique).

- ✓ *Génotoxicité in vitro suite à une exposition aux eaux fécales des études court terme et long terme : effet du régime témoin TSF*

Le seul effet régime observé sur l'induction de γH2AX *in vitro* après 24h d'exposition aux eaux fécales est l'effet inducteur du régime TSF sur l'étude court terme. Cet effet est étonnant, d'autant plus qu'on ne le retrouve pas dans l'étude long terme. En effet, dans les deux cas, ce sont des eaux fécales produites après 2 semaines d'exposition aux régimes expérimentaux qui ont été utilisées. Cependant, cette différence peut s'expliquer par le fait que la mesure a été faite avec des eaux fécales à des dilutions différentes (1/20 pour les eaux fécales de l'étude courte, 1/40 pour l'étude longue). En effet, comme ce dosage exige de travailler à une dilution non cytotoxique pour les cellules, il a été nécessaire de diluer davantage les eaux fécales de l'étude longue. Ceci permet donc d'avancer l'hypothèse selon laquelle l'absence d'effet des eaux fécales de l'étude longue serait due au fait que ces dernières sont trop diluées pour mettre en évidence un effet.

Concernant l'effet génotoxique des eaux fécales du groupe TSF, une explication possible concerne la complexité que représente ces extraits. En effet, les eaux fécales représentant un mélange complexe de composés biologiques, il paraît envisageable qu'un ou plusieurs de ces composés possèdent un faible effet génotoxique. Il a par exemple été démontré que les acides biliaires (présents dans les eaux fécales) pouvaient avoir des effets génotoxiques sur des cellules coliques à forte concentration (Venturi et al., 1997).

e. Conclusion et discussion sur les effets du HNE sur la génotoxicité et l'initiation

i. Conclusion

Dans ce modèle de co-initiation chez le rat, nous montrons pour la première fois que la consommation HNE entraine une diminution du nombre de gros ACF.

Dans les deux études, le régime HNE entraine une augmentation du DHN-MA urinaire et du HNE dans les eaux fécales mais pas de modification des TBARS fécaux.

Le dosage de γH2AX sur la muqueuse colique en court terme montre une diminution significative de l'induction de γH2AX pour le groupe HNE1. En revanche, ce même dosage en long terme montre une diminution de l'induction de la phosphorylation de cette histone suite au régime HNE (HNE3).

Le test des comètes, réalisé sur lors d'une étude indépendante de 3 semaines, ne montre pas de différence entre les groupes TSF et HNE3.

Enfin, la mesure de γH2AX *in vitro* sur une lignée épithéliale colique de souris normale, immortalisée ($Apc^{+/+}$) suite à une exposition de 24h aux eaux fécales montre une augmentation significative de l'induction de γH2AX par les eaux fécales TSF (alors que les autres eaux fécales ne montrent qu'une tendance à l'augmentation).

ii. Discussion

- ✓ *HNE et effet protecteur sur les ACF en co-initiation*

Dans ce modèle de co-initiation par l'AOM chez le rat, permettant d'observer pour la première fois les effets du HNE sur la cancérogénèse, nous mettons en évidence une diminution du nombre d'ACF de plus de 3 cryptes aberrantes, soit un effet protecteur du HNE. Ici, la discussion s'oriente dans le même sens que pour les effets du fer héminique : pour une interprétation sur l'initiation *stricto sensu*, il faudrait s'intéresser au nombre et non à la taille des lésions. Or, ici, c'est le nombre des gros ACF qui est significativement diminué : nous observons donc un effet protecteur du HNE sur un potentiel effet promoteur de l'AOM.

Etant donné l'effet initiateur observé en co-initiation avec un régime riche en fer héminique, le résultat montrant un effet protecteur du HNE sur l'initiation n'était pas attendu. Nous discuterons ce point au chapitre « *Discussion et perspectives* » (p129).

- ✓ *Génotoxicité sur la muqueuse à court terme (3 semaines) et à long terme avec le dosage de γH2AX et le test des comètes*

Concernant le dosage de γH2AX sur la muqueuse colique à long terme, nous avons observé une diminution significative de l'induction de la phosphorylation de l'histone sur la muqueuse colique des animaux ayant consommé du HNE. Ce résultat, s'il témoigne d'un effet protecteur, serait en accord avec l'observation faite sur les lésions prénéoplasiques. En revanche, une fois encore, il peut paraitre étonnant que l'effet persiste 60 jours après l'arrêt du régime expérimental.

Le test des comètes, réalisé sur une étude court terme (3 semaines) sur des individus ayant reçu les régimes TSF et HNE, ne montre quant à lui pas de différence entre les groupes.

Il est étonnant que ces deux tests, utilisés pour estimer des effets génotoxiques, présentent des résultats si contrastés : un effet protecteur du régime HNE selon le test γH2AX, et aucun effet selon le test des comètes. Cette différence peut s'expliquer par le fait que le test γH2AX ne reflète que la présence de cassures double brins, tandis que le test des comètes met en évidence les cassures simple brin, double brin, les sites abasiques ainsi que les dommages oxydatifs.

D'autre part, l'absence d'effet génotoxique du HNE, à la dose utilisée ici (2mg/jour soit environ 10mg/kg de poids corporel/jour à la fin de l'exposition), confirme l'étude effectuée par Wacker. Au cours de cette étude, seule un augmentation de 1,5 fois a été observée sur les propano-adduits dans l'estomac entre le groupe de rat témoin et un groupe ayant été gavé avec du HNE, malgré la dose très importante de HNE administrée (500mg/kg de poids corporel) (Wacker et al., 2001).

- ✓ *Génotoxicité in vitro suite à une exposition aux eaux fécales des études court terme et long terme*

Par ailleurs, tout comme sur les groupes ayant reçu du fer héminique, nous n'avons observé aucun effet génotoxique *in vitro* suite à une exposition aux eaux fécales (sauf en court terme pour TSF, voir discussion p118) ce qui semble en désaccord avec le résultat obtenu *via* le même test sur la muqueuse colique. Cette différence entre des résultats obtenus *in vivo* et *in vitro* peut s'expliquer par les limites intrinsèques que présente un modèle *in vitro*, notamment l'absence d'autres acteurs coliques (autres types cellulaires et flore colique notamment) et une exposition aigüe (24h *in vitro* vs 2 semaines *in vivo*).

- ✓ *TBARS et HNE*

Concernant l'absence d'augmentation des TBARS dans les eaux fécales des rats ayant mangé du HNE, nous pouvons émettre l'hypothèse que le dosage des TBARS ne mesure pas le HNE, comme le proposait déjà Esterbauer (Esterbauer et al., 1982).

4. Effet du HNE sur la promotion de la cancérogénèse colorectale

a. Protocole

Afin de répondre au quatrième objectif de cette thèse : « le HNE a-t-il un effet promoteur sur la cancérogénèse colorectale ? », nous avons construit un protocole expérimental permettant de répondre à cette question.

i. Expérimentation animale

20 rats mâles Fischer F344 âgés de 5 semaines ont été hébergés individuellement dans des cages grillagées, dans une animalerie climatisée avec un cycle jour/nuit de 12h. Après une période d'adaptation d'une semaine, les animaux ont subi une injection intrapéritonéale d'AOM. Sept jours après l'injection, les animaux ont été répartis en deux groupes de 10 rats et alimentés *ad libitum* pendant 100 jours avec les régimes expérimentaux (**Figure 60**).

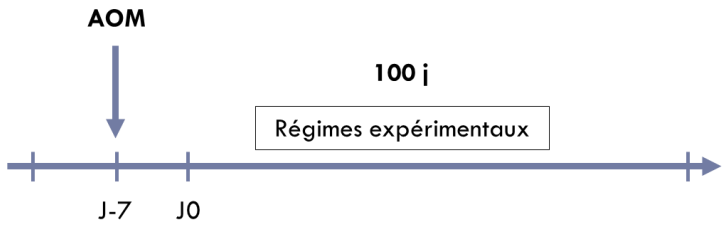


Figure 60 : *Déroulement du protocole de l'expérimentation sur la promotion de la cancérogénèse par le HNE.*

Concernant la composition des régimes, nous avons ici fait le choix de diminuer la dose du HNE par rapport à l'expérimentation d'initiation, afin de pouvoir mener cette expérimentation nutritionnelle sur plusieurs semaines et dans le but de mimer une exposition chronique (**Tableau 10**).

Régime	**TSF**	**HNE**
	Témoin sans ferric citrate ajouté	HNE
Base AIN76 modifiée (low calcium)	95%	
Huile de carthame	5%	
HNE	-	0,2mg/20g de régime

Tableau 10 : *Composition des régimes expérimentaux l'expérimentation sur la promotion de la cancérogénèse par le HNE.*

Les paramètres zootechniques suivants ont été mesurés : la croissance par pesée des animaux et leur consommation alimentaire ont été mesurés sur un rythme hebdomadaire ou bimensuel. De plus, les fèces ont été récoltées individuellement entre J55 et J58. Les urines ont été récoltées entre J47 et J50.

ii. Paramètres suivis

La promotion de la cancérogénèse a été estimée par le dénombrement et la mesure des lésions prénéoplasiques de type ACF (Aberant Crypt Foci) dans le côlon de chaque individu.

La lipoperoxydation, qui semble associée à la cancérogénèse promue par l'hème, a été mesurée par dosage dans les eaux fécales des TBARS, biomarqueur global et non spécifique de la lipoperoxydation. L'exposition au HNE a été estimée par le dosage de cet aldéhyde dans les eaux fécales ainsi que par le dosage du DHN-MA urinaire.

La cytotoxicité des eaux fécales a été mesurée par test MTT sur deux lignées cellulaires : une lignée saine ($Apc^{+/+}$) et une lignée prénéoplasique ($Apc^{min/+}$, mutée sur le gène *Apc*). La comparaison des deux lignées au sein d'un même test permet de s'approcher du système que représente l'épithélium colique, au sein duquel cohabitent des cellules normales et des cellules prénéoplasiques. On peut ainsi comparer les effets, sur des cellules normales et prénéoplasiques, d'agents initiateurs, promoteurs ou encore protecteurs. Nous avons par exemple démontré précédemment que des eaux fécales issues de rats ayant été nourris avec de l'hème (molécule purifiée ou viande) sont plus cytotoxiques pour les cellules normales que pour les cellules prénéoplasiques. Nous émettons l'hypothèse que ceci entraîne la promotion de la cancérogénèse colorectale, par sélection des cellules prénéoplasiques.

Enfin, plusieurs dosages de génotoxicité ont été réalisés : une mesure de γH2AX sur la muqueuse colique et une mesure de γH2AX *in vitro* sur deux lignées épithéliales coliques de souris normale ou prénéoplasiques ($Apc^{+/+}$ et $Apc^{min/+}$) suite à une exposition de 24h aux eaux fécales.

Tous les dosages sur les eaux fécales présentés ci-dessus ont été réalisés individuellement sauf les dosages de γH2AX *in vitro* qui ont été réalisés sur des pools d'eaux fécales par groupe de régime. De plus, les dosages sur les urines ont été réalisés avec des urines de 24h. Enfin, les dénombrements de lésions prénéoplasiques dans le côlon et les dosages sur la muqueuse colique ont été réalisés suite à la mise à mort des animaux à entre J96 et J98.

iii. Statistiques

Les données ont été comparées entre le groupe témoin et le groupe ayant consommé du HNE par un test t de Student paramétrique ou non (test de Mann-Whitney) selon la normalité des distributions. Toutes les représentations graphiques représentent la moyenne ± SEM. Les données indiquées dans le texte sont exprimées en moyenne ± SD.

b. Résultats

Nous n'avons pas observé de différence sur les poids des animaux dans les différents groupes à la fin de l'expérimentation : les animaux pèsent en moyenne 338,3±30,2g (t-test p=0,9651). De même, la consommation d'aliment à J21 et J64 ne montre pas de différence entre les groupes (13.1g± 1,8g à J21, t-test p=0,6688 et 16.1±1,5g à J64 t-test p=0,8413).

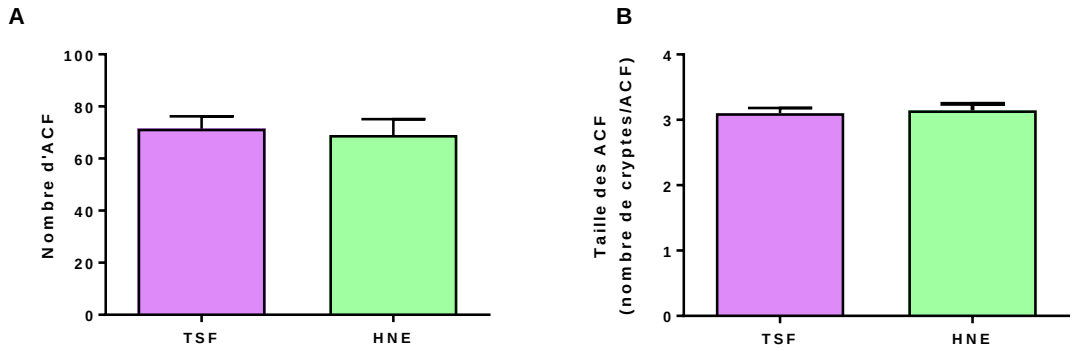


Figure 61 : *Nombre (**A**) et taille (**B**) des ACF dénombrés chez des rats chimio-induits après 100 jours de régimes expérimentaux.*

(Moyenne ± SEM, n=10, pas de différence significative en t-test)

Le dénombrement des ACF et la mesure de la taille de ces lésions précancéreuses montrent une absence d'effet du régime contenant du HNE (respectivement t-test p=0,7517 et p=0,7453) (**Figure 61**).

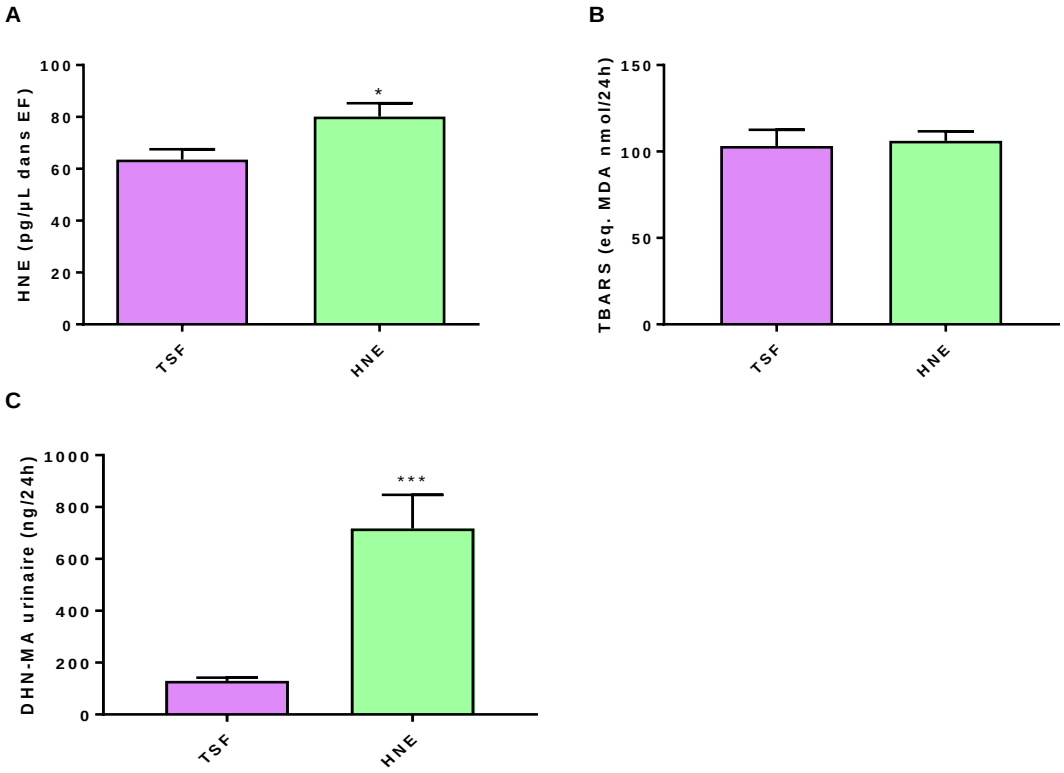


Figure 62 : *Teneur en HNE fécal (**A**), TBARS fécaux (**B**) et en DHN-MA urinaire (**C**) chez des rats chimio-induits après 100 jours de régimes expérimentaux.*
*(Moyenne ± SEM, n=10, t-test *p<0,05 ; ***p<0,001)*

Concernant les marqueurs de lipoperoxydation, les TBARS dans les eaux fécales ne sont pas augmentés (t-test p=0,6177). En revanche, les marqueurs de l'exposition au HNE que sont le dosage du HNE dans les eaux fécales et le dosage du DHN-MA urinaire augmentent suite à une exposition au HNE par voie orale (respectivement, test de Mann-Whitney p=0,0185 et t-test p=0,0003) (**Figure 62**).

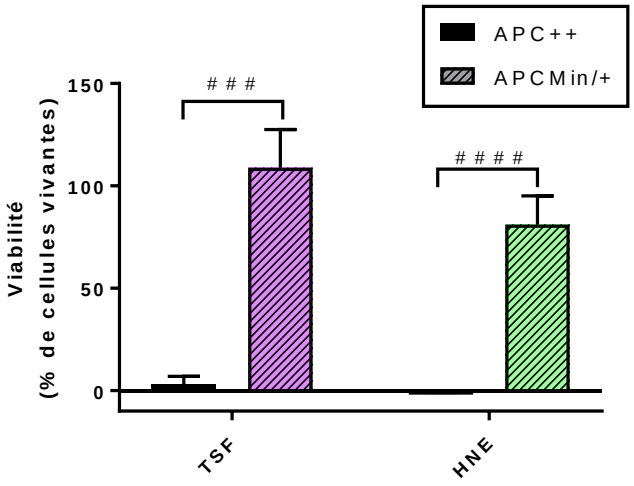


Figure 63 : *Viabilité de la lignée normale Apc$^{+/+}$ et de la lignée précancéreuse Apc$^{Min/+}$ (barres hachurées) après exposition pendant 24h à des eaux fécales issues de rats chimio-induits après 55 jours de régimes expérimentaux.*
(Moyenne ± SEM, n=3, t-test effet régime non significatif ; t-test effet lignée : ### p<0,001 #### p<0,0001)

D'autre part, la cytotoxicité des eaux fécales de J55 à 57, sur les deux lignées cellulaires n'est pas modulée par le régime (t-test effet régime sur les Apc$^{+/+}$ p=0,7469, sur les Apc$^{Min/+}$p=0,2498) (**Figure 63**).

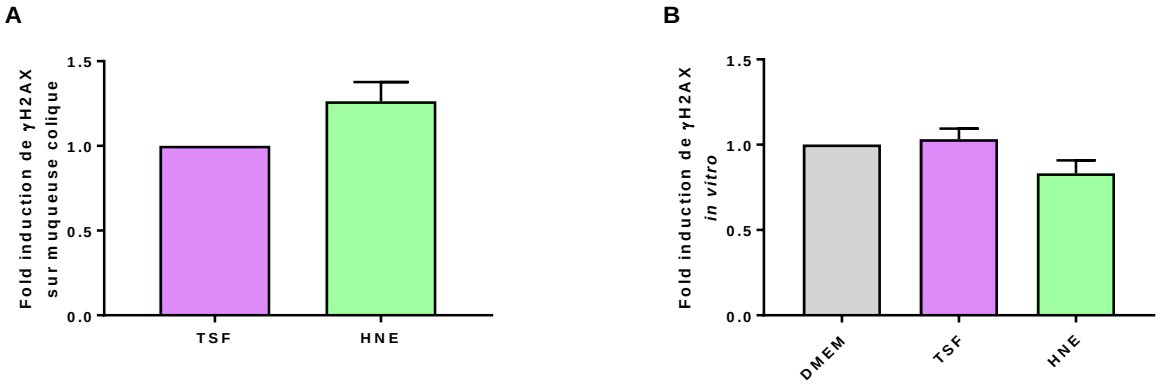


Figure 64 *: Induction de γH2AX sur la muqueuse colique de rats chimio-induits après 100 jours de régimes expérimentaux (**A**) et in vitro sur des cellules normales après exposition à des eaux fécales de J55 à 57 pendant 24h (**B**).*
*(Moyenne ± SEM, n=10 (**A**) et n=3 (**B**), pas de différence significative en one sample t-test vs 1)*

Enfin, le dosage de γH2AX sur la muqueuse colique ne montre pas de modulation de l'induction de la phosphorylation de cette histone suite au régime HNE (one sample t-test p=0,0561). De même, le dosage de γH2AX réalisé *in vitro* sur des cellules épithéliales de côlon normales suite à une exposition de 24h aux eaux fécales de J55 à 57 en pool par groupe montre une absence d'effet des eaux fécales du groupe HNE diluées au 1/160 (**Figure 64**).

c. Conclusion et discussion

i. Conclusion

Dans ce modèle de promotion de la cancérogénèse chez le rat, nous montrons pour la première fois que la consommation HNE n'entraine pas de modification de la taille ou du nombre des lésions précancéreuses à la dose utilisée.

Comme pour les autres expériences, le régime HNE entraine une augmentation du DHN-MA urinaire et du HNE dans les eaux fécales mais pas de modification des TBARS fécaux.

La cytotoxicité ou la génotoxicité des eaux fécales mesurées *in vitro* ne sont pas modulées par le régime riche en HNE.

De même le dosage de γH2AX sur la muqueuse colique ne montre pas de modification en fonction du régime consommé.

ii. Discussion

✓ *Absence d'effet du HNE sur la promotion de la cancérogénèse colorectale*

De même que pour l'étude de co-initiation, l'absence d'effet du régime HNE dans ce modèle de promotion de la cancérogènèse colorectale n'était pas un résultat attendu. En effet, les effets du fer héminique ont déjà été largement démontrés dans ce modèle et cet effet promoteur est associé à une augmentation des marqueurs de lipoperoxydation.

Ce résultat inattendu sera discuté au chapitre « *Discussion et perspectives* » (p129)

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

I. Principaux résultats

Ce travail a eu pour vocation la caractérisation du métabolisme du HNE alimentaire et l'étude de son rôle dans la cancérogénèse colorectale associée à la consommation de viande rouge, car il est suspecté d'être l'un des intermédiaires réactifs entre fer héminique et développement de ce cancer, en ayant probablement des effets pro-inflammatoires et un effet sélectif sur les cellules prénéoplasiques. En parallèle, nous avons démontré expérimentalement l'effet initiateur du fer héminique sur la cancérogénèse colorectale en plus de l'effet promoteur déjà validé antérieurement.

Concernant l'étude de métabolisme, nous avons identifié et caractérisé les métabolites du HNE présents dans l'urine suite à une exposition par voie orale chez le rat grâce à une méthode de suivi isotopique. Les voies majeures de métabolisation du HNE ont été identifiées et quantifiées, comme l'oxydation sur les carbones 1 et 9 (ALDH et CYP P450 4A), la β-oxydation et la voie des acides mercapturiques. De plus, de nouveaux métabolites urinaires tel que des conjugués thiométhyles et glucuronides ont été mis en évidence pour la première fois.

Concernant les études de cancérogenèse, portant sur l'effet co-initiateur ou promoteur des régimes, nous avons utilisé une dose de fer héminique proche des doses nutritionnelles et des doses de HNE représentatives d'une alimentation riche en viande ou fortement peroxydée. De plus, les liens entre l'inflammation et le cancer du côlon étant de plus en plus souvent évoqués dans la littérature, nous avons également testé les effets du HNE sur l'inflammation colique.

Tout d'abord, au cours d'expérimentations nutritionnelles court terme (2 à 3 semaines) chez le rat, nous avons démontré l'absence d'effet du HNE sur l'inflammation et la perméabilité intestinale (jéjunum et côlon).

Dans l'étude de co-initiation impliquant un régime alimentaire contenant du fer héminique ou du HNE pendant 15 jours puis une initiation chimique par l'azoxyméthane, nous avons démontré pour la première fois un effet co-initiateur du fer héminique et un effet protecteur du HNE sur la cancérogénèse colorectale.

Dans l'étude de promotion de la cancérogénèse colorectale sur rats chimio-induits, nous avons également démontré une absence d'effet d'un régime riche en HNE donné pendant 100 jours après la chimio-induction.

En conclusion, cette thèse apporte : (i) une description précise des métabolites urinaires du HNE absorbé par voie orale, (ii) une première démonstration expérimentale de l'effet co-initiateur du fer héminique sous forme hémine, (iii) une démonstration de l'absence d'effet du HNE seul et aux doses testées sur la cancérogénèse colorectale et l'inflammation colique.

II. Discussion et perspectives

✓ *Définition d'un biomarqueur de l'exposition au HNE par voie alimentaire*

L'étude sur le métabolisme du HNE absorbé par voie alimentaire nous a permis de mettre en évidence de nouveaux métabolites, dont les conjugués thiométhyles, jamais identifiés lors des études précédentes. **Ces métabolites pourraient s'avérer spécifiques de l'exposition alimentaire au HNE et plus précisément de l'exposition du côlon au HNE**. En effet, les deux hypothèses de formation que nous proposons pour ces métabolites impliquent la participation de la flore colique : la première voie pourrait impliquer le sulfure d'hydrogène (H_2S), présent sous forme libre dans les parties distales de l'intestin et qui est connu pour être un métabolite issu du microbiote (Blachier et al., 2010) ; la deuxième voie de formation impliquerait le *shunt* des acides mercapturiques, durant lequel la cystéine des métabolites conjugués au glutathion est dégradée par une β-lyase, formant un composé thiol qui est ensuite méthylé. Les β-lyases microbiennes pourraient participer à ce processus (Arias et al., 1994).

Pour confirmer l'hypothèse selon laquelle les conjugués thiométhyles sont métabolisés par la flore colique, nous pouvons proposer de réaliser une expérimentation au cours de laquelle des rats conventionnels ou à flore réduite par antibiothérapie reçoivent par gavage du HNE radiomarqué. Après récolte des urines, l'objectif serait de rechercher par radio-HPLC les pics correspondants aux trois métabolites thiométhyles identifiés. Si l'on constate l'absence ou une forte diminution de ces pics, nous pourrons conclure à l'implication de la flore colique dans la production de ces métabolites.

Aujourd'hui, c'est le dosage du DHN-MA urinaire qui est utilisé comme biomarqueur de l'exposition au HNE (Guéraud et al., 2006). Cependant, ce métabolite qui peut être formé à partir du HNE endogène et du HNE présent dans le tube digestif, rend compte du HNE formé et absorbé tout au long du tube digestif. À l'avenir, les nouveaux métabolites identifiés pourraient présenter un grand intérêt en tant que biomarqueurs urinaires de l'exposition du côlon au HNE et pourraient, dans ce cadre, remplacer le dosage du DHN-MA. Cependant, il est à noter que si ce potentiel biomarqueur est dépendant de la flore, il pourrait donc présenter une variabilité individuelle importante.

✓ *Effet initiateur de l'hémine : effet propre ou effet des produits de lipoperoxydation ?*

Suite à cette première observation de l'effet co-initiateur de l'hémine, nous pouvons discuter du mécanisme d'action de cette forme de fer héminique. Un effet direct peut être envisagé car plusieurs résultats *in vitro* rapportent l'induction de dommages à l'ADN par du fer héminique sur des cultures primaires de colonocytes et sur la lignée tumorale HT29 (Glei et al., 2006), ainsi que sur la lignée CaCo2 (Ishikawa et al., 2010). Ces auteurs attribuent les effets de l'hème à la production de radicaux hydroxyles et de peroxyde d'hydrogène.

D'autre part, il est aujourd'hui connu que la consommation de produits riches en fer héminique entraine l'oxydation des acides gras polyinsaturés du régime, générant des produits secondaires réactifs tel que des aldéhydes ou des époxydes. L'implication de ces produits dans les dommages à l'ADN observés est à envisager. En effet, une étude a montré l'augmentation d'éthéno-adduits à l'ADN spécifiques de la lipoperoxydation dans des cellules SW480, traitées conjointement par de l'hémoglobine et de l'acide linoléique hydroperoxyde, qui est un précurseur du HNE (Angeli et al., 2011). Plus précisément, il a également été démontré par Bastide *et al.* qu'un produit secondaire de lipoperoxydation (ici le HNE) avait des effets génotoxiques sur des cellules saines dès 10µM (Bastide et al., 2015).

L'effet co-initiateur observé peut donc avoir comme origine soit un effet génotoxique direct de l'hémine, soit un effet des produits secondaires de lipoperoxydation dont la formation est catalysée par l'hémine, ou encore une action commune des deux types d'agents.

✓ *Différence d'effet entre hémine et hémoglobine sur la co-initiation*

Nous avons montré que l'hémine présentait des effets co-initiateurs, mais pas l'hémoglobine. On peut rappeler que l'absence d'effet de l'hémoglobine s'accompagne d'une augmentation significativement moindre que celle entraînée par l'hémine sur le HNE et TBARS dans les eaux fécales et sur le DHN-MA urinaire. Les effets plus modestes de l'hémoglobine sur ces biomarqueurs ont déjà été mis en évidence dans des études précédentes de l'équipe PPCA. Si on émet l'hypothèse que l'effet initiateur du fer héminique passe par sa capacité à catalyser la lipoperoxydation, on pourrait expliquer l'absence d'effet de l'hémoglobine.

En revanche, le régime hémoglobine est le seul qui montre une augmentation de l'induction de γH2AX sur la muqueuse colique. Ce dernier résultat est inattendu étant donné que cet effet n'est pas associé à une augmentation des lésions prénéoplasiques. Ce résultat est d'autant plus inattendu que des études précédentes, réalisées *in vitro*, montrent un effet génotoxique de l'hémine et de l'hémoglobine sur des cellules cancéreuses coliques (Angeli et al., 2011; Glei et al., 2006). Dans le même sens, Bastide *et al*. a montré une augmentation des ponts anaphasiques (marqueur de génotoxicité) sur la muqueuse colique de souris ayant été nourris avec un régime riche en hémoglobine (Bastide et al., 2015). En ce sens, pour confirmer (i) l'absence d'effet du régime hémoglobine sur la génotoxicité et (ii) l'effet génotoxique du régime hémine, il pourrait être intéressant de :

- Décompter les ponts anaphasiques sur la muqueuse des rats de l'expérimentation de co-initiation. En cas d'altération génétique, les chromatides sœurs peuvent ne pas se séparer correctement lors de l'anaphase. Ces structures anormales sont les ponts anaphasiques, ce sont des biomarqueurs de l'instabilité chromosomique.
- Tester la capacité des eaux fécales à induire la formation de clones *in vitro*. La mesure de la clonogénicité en agar est un test *in vitro* permettant d'évaluer la transformation maligne de cellules. Ici, les cellules épithéliales coliques normales $Apc^{+/+}$ pourraient être traitées de manière chronique avec des eaux fécales pendant au moins deux semaines, avant ensemencement en soft-agar et dénombrement des colonies 21 jours plus tard (Graillot et al., 2016).

✓ *Absence d'effet du HNE sur l'inflammation et la promotion de la cancérogénèse colorectale*

Ici, notre objectif était de tester l'implication du HNE dans l'effet pro-inflammatoire de l'hème, ainsi que son effet sur la promotion de la cancérogénèse colorectale. Contrairement à ce qui était attendu, nos conclusions ne vont pas dans le sens de l'implication du HNE seul dans ces deux effets de l'hème. Trois hypothèses peuvent expliquer cette observation :

- 1/ Le HNE n'a effectivement pas d'effet sur inflammation et la promotion de la cancérogénèse colorectale, mais seul l'hème est à la fois pro-inflammatoire et promoteur. Comme évoqué plus haut, l'absence d'effet du HNE pourrait être dû à une activation des défenses antioxydantes.
- 2/ Le HNE, à la dose utilisée, n'est pas un bon modèle de l'exposition du côlon aux produits secondaires de lipoperoxydation, mais ces derniers possèdent bien un effet pro-inflammatoire et promoteur. En effet, ces produits étant nombreux et leurs effets probablement additifs, la dose de HNE utilisée ici ne serait alors pas représentative.
- 3/ Le HNE a des effets sur l'épithélium colique, mais seulement en synergie avec l'hème et le microbiote. En effet, il a été montré que les effets délétères de l'hème sur la muqueuse colique sont dépendant de la flore (Ijssennagger et al., 2015). Ainsi, des bactéries dégradant le mucus (comme *Akkermansia*) permettent une meilleure accessibilité de l'épithélium aux produits contenus dans la lumière colique, notamment l'hème et les produits de lipoperoxydation. De plus, il est intéressant de

noter que les bactéries de ce genre font partie de celles dont l'abondance augmente dans le côlon de souris nourris avec de l'hème (IJssennagger et al., 2012b).

Dans l'objectif de tester cette dernière hypothèse, nous pourrions envisager d'étudier les effets de l'hème et du HNE sur les propriétés biophysiques du mucus, en présence ou en absence de flore colique, grâce à l'utilisation d'une antibiothérapie.

Dans l'objectif de tester la deuxième hypothèse, nous pourrions envisager de répéter l'expérience menée dans cette thèse avec du HNE seul mais en administrant cette fois aux animaux :

- **Une dose de HNE plus élevée,** qui permettrait d'utiliser le HNE comme un modèle du mélange d'aldéhydes présents dans le côlon.

Cependant, le HNE étant long et fastidieux à synthétiser, cette option semble difficile à envisager à l'heure actuelle.

- **Un mélange d'aldéhydes,** afin de se rapprocher le plus possible de la situation physiologique.

Cette option est à envisager dans la perspective d'un travail mené actuellement dans l'équipe d'accueil PPCA, qui s'attache à déterminer la nature et la quantité relative des différents produits de lipoperoxydation présents dans les eaux fécales d'animaux ayant consommé des régimes favorisant la lipoperoxydation et la cancérogénèse colorectale. Ce projet utilise une méthode sans « à priori », permettant d'identifier les aldéhydes présents dans un échantillon d'eau fécale. Le principe consiste dans le piégeage des composés présentant une fonction carbonyle, grâce à une sonde spécifique, marquée par un atome de brome, permettant sa détection plus facile en spectrométrie de masse. Les composés piégés sont ensuite analysés par HPLC couplé à de la spectrométrie de masse, permettant leur identification et leur quantification relative.

Ces travaux pourraient permettre de mettre en évidence des produits de lipoperoxydation plus abondants que le HNE, ou d'identifier des composés potentiellement plus réactifs d'après la littérature, et qui seraient potentiellement de meilleurs modèles. On peut citer par exemple le ONE (4-oxononenal), qui d'après une étude *in vitro* est plus réactif et plus toxique que le HNE (McGrath et al., 2011).

- **Un vecteur à libération colique contenant le HNE**

Dans le prolongement des travaux effectués sur la mise au point d'un vecteur à libération colique, en collaboration avec Denis Poncelet (Unité GEPEA, Génie des Procédés Environnement Agro-alimentaire), il serait intéressant de reprendre le développement d'un outil de vectorisation du HNE. Il serait par exemple envisageable d'utiliser les capsules PCcaps proposées par la société Capsugel. Ces capsules adaptées pour des études précliniques chez le rat (7,2mm de long et 2,64mm de diamètre) permettent la libération contrôlée du produit d'intérêt, grâce à leur enrobage gastrorésistant.

✓ *Effet protecteur du HNE sur la co-initiation du cancer colorectal*

Etant donné l'effet initiateur observé en co-initiation avec un régime riche en fer héminique, le résultat montrant un effet protecteur du HNE sur l'initiation n'était pas attendu. Il peut s'expliquer par l'hypothèse suivante : le HNE administré pendant 14 jours active de manière basale les enzymes de détoxication, ce qui permet aux cellules épithéliales d'éliminer plus efficacement l'AOM lors de l'injection. En effet, les colonocytes détoxiquent l'AOM par les mêmes enzymes que celles chargées de l'élimination du HNE, notamment la GST et le cytochrome P450 (Dalleau et al., 2013; Kohno et al., 2002), ce qui expliquerait pourquoi les animaux ayant reçu le régime HNE présentent des lésions prénéoplasiques moins grosses que les animaux témoins. Cet effet protecteur sur la chimio-induction a déjà été décrit par Kohno *et al.*, dans une étude durant laquelle des rats F344 ont été induits par

l'AOM et nourris dans le même temps avec un extrait de chardon-marie (*Silybum marianum*), riche en flavonoïdes (polyphénols antioxydants). Un effet inhibiteur sur les ACF a été observé, et a été associé à l'augmentation de l'activité de la GST dans la muqueuse colique et dans le foie (Kohno et al., 2002).

Du reste, un dénombrement des MDF, les foyers déplétés en mucine, est d'ores et déjà prévu et pourrait permettre d'étayer les preuves quant à l'effet protecteur observé.

- ✓ *Propositions d'expérimentations de cancérogénèse sans chimio-induction*

La réalisation d'expérimentation de cancérogénèse sans chimio-induction permettrait de répondre précisément quant à l'effet initiateur du HNE ou des aldéhydes issus de la lipoperoxydation.

Deux protocoles expérimentaux peuvent être proposés, en se basant ou en adaptant des protocoles long terme déjà mis en place par Newmark et Yang et qui avaient permis de démontrer un effet initiateur sur la cancérogénèse colorectale d'un régime « New Western Diet » (pauvre en fibres, calcium, folate et riche en lipides) après deux ans d'administration du régime chez la souris C57Bl/6 (Newmark et al., 2009; Yang et al., 2008) :

- Afin de savoir si le HNE est initiateur, nous proposons d'administrer à des souris C57Bl/6 une forte dose de HNE, de l'ordre de 25mg/kg de poids corporel/jour (soit le double de la dose utilisée ici pour le protocole de co-initiation (13mg/kg de poids corporel à J13)) durant deux semaines, avant d'administrer durant plusieurs mois le régime témoin. Cela permettrait de répondre précisément quant à l'effet du HNE, sans biais lié à un éventuel effet protecteur du HNE vis-à-vis de l'induction par l'AOM (via la stimulation des défenses antioxydantes, participant à l'élimination de l'AOM).
- Afin de savoir si le HNE est globalement cancérigène, nous proposons d'administrer à des souris C57Bl/6 une dose nutritionnelle de HNE (4mg/kg de poids corporel/jour, soit 0,2ppm dans le régime, proche de la quantité de HNE retrouvée dans la viande) durant un à deux ans, puis de suivre les évolutions pathologiques.

Ces types d'expérimentations sont rarement menés, du fait du temps nécessaire à leur réalisation, mais pourraient compléter les travaux présentés dans ce manuscrit, et nous permettre de mieux comprendre l'implication potentielle du HNE dans la cancérogénèse colorectale.

ANNEXES

I. Annexe 1 : Détails des techniques et des méthodes utilisées pendant la thèse

✓ *Composition de la base AIN76 modifiée pour les régimes*

	g/100g de régime
Caseine*	21
C. starch	15,74
Sucrose	52,5
Cellulose	5,25
Methionine	0,31
Mineral Mix sans calcium*	3,67
Vitamin Mix *	1,05
Ca phosphate	0,28
Choline bitartrate	0,21
Tot	100

* Vitamin Mix : type AIN76

* Mineral mix sans calcium: type AIN76, mais les 500g/kg de calcium phosphate dibasic sont remplacés par du sucrose

* Caséine purifiée (pauvre en calcium)

✓ *Préparation des régimes*

La base AIN76 modifiée est mélangée avec les autres composants du régime sous forme de poudre entrant dans la composition du régime. L'huile est ajoutée à la base avant mélange par un robot pendant 3min. Si du HNE entre dans a composition du régime, il est d'abord dilué dans l'huile avant que celle-ci soit ajoutée à la base. Les régimes sont conservés sous vide à -20°C.

✓ *Préparation des extraits d'aliment*

Le protocole utilisé ici est basé sur une méthode proposée par Papastergiadis *et al.* (Papastergiadis et al., 2014b). 50mg d'aliment a été prélevé puis délipidé à l'aide de 50µL d'hexane (vortex 1min), avant de réaliser une extraction avec 200µL de méthanol/H_2O à 40/60 (vortex 2min). L'échantillon a ensuite été vortexé 2min à 2 000g avant prélèvement de l'extrait (la phase méthanol/H_2O située au centre de l'échantillon).

✓ *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 à 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 en présence de billes de céramique puis à une centrifugation à 5500 g pendant 20 minutes. Le surnageant a été récolté et aliquoté sur glace.

✓ *Préparation des extraits de contenus intestinaux*

Le protocole utilisé pour préparer les extraits des contenus intestinaux est basé sur le protocole utilisé pour préparer les eaux fécales, en adaptant la quantité d'eau ajoutée à l'hydratation du contenu considéré.

Pour l'intestin et le caecum, la totalité du contenu a été récupéré dans un tube de 2mL et additionné de 0,5mL d'eau pour 0,5g de contenu et 33µL de BHT à 0,45M. Les préparations ont été soumises à 3 cycles de 30 secondes au Fast-Prep en présence de 250mg billes céramiques 1,4mm de diamètre et 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.

Pour le côlon la totalité du contenu a été récupéré dans un tube de 2mL et additionné de 1mL d'eau pour 0,5g de contenu et 50µL de BHT à 0,45M.

- ✓ *Dosage du HNE par HPLC-MS/MS dans les extraits d'aliment et dans les eaux fécales*

Le dosage du HNE dans les extraits d'aliment, de contenu digestif ou dans les eaux fécales est réalisé en HPLC-MS/MS après dérivatisation des groupements carbonyls par un réactif bromé (BBHA). La quantification par HPLC-MS/MS se fait à l'aide d'un standard interne deutéré déjà dérivé et ajouté dans les échantillons avant leur préparation. La synthèse du standard deutéré a été réalisée selon la méthode décrite dans cet article (Jouanin et al., 2015), la préparation de l'échantillon par purification en SPE et le dosage en HPLC-MS/MS a été décrit dans cette présentation (Chevolleau et al., 2016).

Ce dosage a été réalisé par la plateforme AXIOM de chimie analytique de ToxAlim à Toulouse.

- ✓ *Dosage des 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 dienes 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, deux essais et deux 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 l'équivalent MDA dans l'eau fécale.

- ✓ *Dosage du DHN-MA urinaire*

L'un des produits finaux de la lipoperoxydation est le 4-hydroxynonénal (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 (Guéraud et al., 2006). 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.

Pour l'analyse des données en test t de Student ou en ANOVA, il est nécessaire de transformer les données en log lorsque la disparité entre les groupes est importante.

✓ *Dosage de la cytotoxicité des eaux fécales sur les cellules Apc+/+ et ApcMin/+*

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. À 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 Bonnesen (Bonnesen 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.

✓ *Comptage histologique des lésions prénéoplasiques (ACF)*

Les ACF sont des lésions pré-néoplasiques présentes en nombre lors de la promotion de la cancérogenèse colorectale chez l'Homme ainsi que chez les modèles rongeurs (Corpet and Pierre, 2005). Les ACF sont visibles au microscope sur les côlons colorés par du bleu de méthylène qui colore préférentiellement les noyaux des cellules. Lors des autopsies des rats, les côlons ont été prélevés puis ouverts longitudinalement et fixés entiers et à plat dans de la formaline à 10% (muqueuse vers le haut). Juste avant la lecture, le côlon est coloré du bleu de méthylène à 0,05% (après un rinçage à l'eau distillée pour éliminer la formaline). Pour la lecture, le côlon est déposé sur une lame de verre striée (muqueuse vers le haut), et est observé au microscope optique (x40). Le nombre d'ACF (petits, gros), le nombre de cryptes par ACF et la taille et le nombre de tumeurs (polypes) sont enregistrés (Bird, 1987).

✓ *Dosage de γH2AX in vitro par In Cell Western*

La génotoxicité a été mesurée par *In Cell Western*, selon la méthode mise au point par Audebert *et al.* (Audebert et al., 2011). Les cellules ont été ensemencées en condition permissive, en plaque 96 puits (noires à fond transparent) afin d'obtenir 80% de confluence pour les deux lignées le jour du traitement. Après 24h à 33°C, les cellules sont passées en conditions non permissives à 37°C pour 24h supplémentaire avant traitement aux eaux fécales. Après 24 heures de traitement, les cellules ont été lavées dans du PBS, puis fixées 20 minutes à température ambiante avec une solution de paraformaldéhyde 4% dans du PBS. Après 5 minutes de rinçage au PBS, le paraformaldéhyde a été neutralisé avec 20 mM de NH_4Cl pendant 2 minutes, puis la plaque a été à nouveau lavée au PBS

pendant 5 minutes. Les cellules ont ensuite été perméabilisées avec 0,2% de triton 100-X dans du PBS pendant 5 minutes, puis lavées dans une solution de PST (PBS, SVF 2%, triton 100-X 0,2%). L'étape suivante est la saturation : les cellules ont été mises en contact pendant une heure à température ambiante avec une solution de saturation du commerce (Maxblock blocking medium 102224, Active motif) à laquelle a été ajouté un inhibiteur de protéase (phosSTOP 10X, Roche) Les cellules ont ensuite été incubées pendant deux heures à température ambiante avec l'anticorps primaire -H2AX (1:200) dilué dans du PST (cell signaling H2AX 9798 Ozyme). Après trois lavages de 5 minutes au PST, la plaque a été mise en contact pendant une heure à température ambiante et à l'abri de la lumière avec un anticorps secondaire (BIOTIUM Intershim SF-770 anti-rabbit) dilué au 1/1000 dans du PST et du TO-PRO 3 iodide (Molecular Probes) dilué au 1/500 dans du PST. L'anticorps secondaire absorbe à 800 nm et le TO-PRO 3 iodide à 700 nm. Ce marqueur de l'ADN permet de quantifier le nombre de cellules se trouvant dans chaque puit. Après trois lavages au PST, la plaque a été lue avec le scanner Odyssey (Li-Cor ScienceTec, Les Ulis, France), à 700 nm (rouge, marqueur de l'ADN) et 800 nm (vert, marqueur de γH2AX). La fluorescence relative de γH2AX par puit a été obtenue en divisant la fluorescence à 800 nm par la fluorescence à 700 nm. Le résultat a ensuite été ramené en pourcentage d'augmentation ou de diminution par rapport au contrôle. Le marquage au TO-PRO 3 permet également d'évaluer un pourcentage de cytotoxicité par rapport à la quantité d'ADN présente dans les puits contrôle.

- ✓ *Dosage de γH2AX sur muqueuse colique par In Cell Western*

Les dosages *in vivo de* γH2AX ont été réalisés par le Dr Marc Audebert et Laure Khoury de l'équipe Métabolisme des Xénobiotiques de l'unité ToxAlim de l'INRA à Toulouse.

A l'autopsie, un échantillon de muqueuse grattée a été prélevée et conservé au froid avant dissociation du tissu et dosage de γH2AX en In Cell Western.

- ✓ *Test des comètes*

La génotoxicité dans la muqueuse colique a été évaluée par le test alcalin des comètes. Les cellules de la muqueuse colique ont été collectées par grattage et stockées dans un tampon HBSS/EDTA 0,02M à pH 7,5 avant une congélation lente à -80°C. Après décongélation, les cellules ont été séparées mécaniquement à l'aide d'un homogénéiseur Dounce et un tampon HBSS/EDTA.

Les cellules ont été comptées et ensemencées dans de l'agarose à 0,7% à bas point de fusion (Sigma), puis déposées sur des films Gelbond en quadruplicat. Les films Gelbond ont été immergés une nuit entière dans une solution de lyse (NaCl 2,5 M/EDTA 0,1 M/Tris 10mM ph 10/DMSO 10%/Triton 1%). En parallèle, une digestion à la FPG, permettant la détection de dommages oxydatifs, a été réalisée selon le protocole décrit par Azqueta (Azqueta et al., 2013). Ensuite, après 40 minutes dans un tampon d'électrophorèse (EDTA 1mM/NaOH 0,3M), les plaques ont été transférées dans une cuve d'éléctrophorèse durant 24 miniutes à 0,8 V/cm, dans un tampon (EDTA 1 mM/NaOH 0,3 M). Enfin, les plaques ont été immergées dans une solution de PBS pour neutralisation, et les cellules ont été fixées à l'éthanol absolu froid.

Pour le marquage de l'ADN, les films ont été réhydratés dans un tampon TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM Na2EDTA pH 8,0) contenant SYBRGold® (Fisher Scientific) dilué 10 000x, durant 20 min. 50 cellules par dépôt et 4 dépôts par échantillon ont été analysés à l'aide d'un microscope à fluorescence Nikon NiE, équipé d'une caméra et du logiciel Lucia Comet Assay. L'étendue des dommages à l'ADN a été évalué pour chaque cellule par la mesure de l'intensité des pixels présents dans la queue divisée par l'intensité totale des pixels de la queue et de la tête de la comète. La médiane de ces 100 valeurs a été calculée et nommée « pourcentage d'ADN dans la queue ».

Ce dosage a été réalisé par le Dr Elisa Boutet et Marianne Chevalier de l'équipe Génotoxicité & Signalisation de l'unité ToxAlim de l'INRA à Toulouse.

✓ *Dosage de la CRP plasmatique*

Le dosage de la CRP a été réalisé à l'aide d'un kit Abcam, selon les recommandations du fournisseur (Rat C Reactive Protein ELISA Kit (PTX1) (ab108827)).

✓ *Dosage des cytokines en ELISA sur la muqueuse colique et le sang*

Pour évaluer la quantité de cytokines pro et anti-inflammatoires (respectivement IL1β, IL6, IL8 et IL10), des protéines tissulaires ont été extraites avec du tampon RIPA (1% d'Igepal, l'acide désoxycholique à 0,5% et 0,1% de dodécylsulfate de sodium dans du tampon Tris salin 1; pH 7,4) avec inhibiteur de protéase cocktail (Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne). Des lysats clairs ont été préparés par centrifugation à 10 000 g pendant 10 minutes, et les concentrations de protéines ont été évaluées en utilisant le kit de dosage BC Uptima (Interchim). Les échantillons ont ensuite été traitées pour ELISA en utilisant des kits commerciaux pour déterminer le contenu colique en cytokines selon les protocoles du fabricant (Duoset ELISA, R & D Systems, Lille, France). Les données ont été exprimées sous forme de concentration par mg de protéine totale.

✓ *Dénombrement du score microscopique sur le côlon*

Le score microscopique a été dénombré sur une coupe de côlon après fixation du tissu dans la formaline et coloration Hémalun-Eosine. Le dénombrement a été réalisé par Christel Cartier de l'équipe DIXIT de l'unité ToxAlim de l'INRA à Toulouse selon le score défini dans cet article (Fabia et al., 1992).

✓ *Dosage de la perméabilité au ^{51}Cr-EDTA*

La perméabilité paracellulaire a été évaluée avec du ^{51}Cr-EDTA (Perkin Elmer LifeSciences, Paris, France). Après 14 jours de régimes expérimentaux, les animaux ont reçu une par gavage 0,5mL de solution saline de ^{51}Cr-EDTA (25.9 kBq). Les rats ont ensuite été placé dans des cages à métabolisme et la radioactivité des urines de 24h a été mesuré avec un compteur gamma (Cobra II;Packard,Meriden, CT, USA). La perméabilité au ^{51}Cr-EDTA est exprimé en cpm dans les urines de 24h.

✓ *Dosage de la TER et de la perméabilité au FITC en chambre de Ussing*

Des mesures de résistance trans-épithéliale (TER) et de perméabilité paracellulaire au FITC ont été réalisées en collaboration avec Laurent Ferrier (de l'équipe NGN de l'unité ToxAlim de l'INRA à Toulouse) sur des explants de côlon et de jéjunum.

Pour résumer, des explants de tissu ont été installés sur des cassettes avant d'être montés dans les chambre de Ussing. Les explants sont maintenus dans une solution saline à 37°C avec adjonction de carbogène (95% O_2 – 4% CO_2) et des électrodes placées à proximité du tissu mesurent en continu la résistance trans-épithéliale. Une adjonction de FITC est réalisée dans l'un des deux compartiments de la chambre de Ussing. Une heure après, un échantillon du milieu présent dans l'autre compartiment est prélevé dans le but de mesurer la concentration de FITC et d'ainsi estimer le flux de perméabilité.

✓ *Dosage de la MPO sur la muqueuse colique*

L'activité de la myéloperoxydase (MPO) côlon de rat a été mesurée comme décrit précédemment. Des échantillons de côlon (1 cm) ont été suspendus dans un tampon phosphate de potassium (50mM, pH 6,0) et homogénéisées sur de la glace. Trois cycles de congélation/décongélation ont été réalisés. Les suspensions ont ensuite été centrifugées à 10 000 g pendant 15 min à 4 ° C. Après élimination des surnageants, les culots ont été remis en suspension dans un tampon de bromure d'hexadécyl triméthylammonium (HTAB à 0,5% p / v dans du tampon phosphate de potassium 50mM, pH 6,0). Ces suspensions ont été soniquées sur la glace, et centrifugées à nouveau à 10 000 g pendant 15 min à 4 ° C. Les surnageants obtenus ont été dilués dans du tampon phosphate de potassium (pH 6,0) contenant 0,167 mg/ml de dichlorhydrate Odianisidin et 0,0005% de peroxyde d'hydrogène. Une myéloperoxydase humaine de neutrophiles (0,1 unités par 100µl) a été utilisé comme étalon. La

cinétique d'absorbance à 450 nm, a été enregistré toutes les 30s pendant 5min, avec un spectrophotomètre. Une unité de MPO est définie comme la quantité de MPO dégradant 1 µmole de peroxyde d'hydrogène/min/mL à 25°C. La concentration en protéine a été déterminée avec un kit commercial en utilisant un procédé modifié de Lowry (Kit protéine de quantification, Interchim, Montluçon, France). L'activité MPO a été exprimée en unités par gramme de protéine.

II. Annexe 2 : Communication, formation et encadrement

1. Communications

a. Publications dans revues à comité de lecture

Publication sur le sujet de thèse :

"Twin peaks": searching for 4-hydroxynonenal urinary metabolites after oral administration in rats.

Keller J[1], Baradat M[1], Jouanin I, Debrauwer L, Guéraud F.

Redox Biol. 2015;4:136-48. doi: 10.1016/j.redox.2014.12.016. Epub 2014 Dec 24.

[1] *these authors contributed equally to this work*

Autre publication :

Antiatherogenic and antitumoral properties of Opuntia cladodes: inhibition of low density lipoprotein oxidation by vascular cells, and protection against the cytotoxicity of lipid oxidation product 4-hydroxynonenal in a colorectal cancer cellular model.

Keller J[1], Camaré C[1], Bernis C, Astello-García M, de la Rosa AP, Rossignol M, del Socorro Santos Díaz M, Salvayre R, Negre-Salvayre A,Guéraud F.

J Physiol Biochem. 2015 Sep;71(3):577-87. doi: 10.1007/s13105-015-0408-x. Epub 2015 Apr 4.

[1] *these authors contributed equally to this work*

b. Communications par poster

Congrès international du HNE club – septembre 2014, Toulouse

"Twin peaks": searching for 4-hydroxynonenal urinary metabolites after oral administration in rats. **Keller J**, Baradat M, Jouanin I, Debrauwer L, Guéraud F.

Congrès du réseau Nacre – octobre 2015, Paris

"Twin peaks": searching for 4-hydroxynonenal urinary metabolites after oral administration in rats. **Keller J**, Baradat M, Jouanin I, Debrauwer L, Guéraud F.

Prix du meilleur poster

2. Formations

2016	**Connaissance des Entreprises et des Organisations**
	Université Fédérale de Toulouse Midi Pyrénées
2016	**Ethique et intégrité scientifique**
	Université Fédérale de Toulouse Midi Pyrénées
2016	**Vendre sa thèse face à un recruteur**
	Cabinet PROGRESS, Toulouse
2014	**Séminaire « Système nerveux et nutrition »**
	Ecole d'été du département Alimentation Humaine de l'INRA, St Brévin les Pins
2014	**Utilisation et protection de l'animal de laboratoire - Niveau I**
	Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

2014 **Initiation à la radioprotection**
INRA ToxAlim, Toulouse

3. Encadrement

2015 **Encadrement d'un stagiaire en 1ère année de BTS** (7 semaines)

RÉFÉRENCES

Abid, Z., Cross, A.J., and Sinha, R. (2014). Meat, dairy, and cancer. Am. J. Clin. Nutr. *100 Suppl 1*, 386S–93S.

Adelstein, B.-A., Macaskill, P., Chan, S.F., Katelaris, P.H., and Irwig, L. (2011). Most bowel cancer symptoms do not indicate colorectal cancer and polyps: a systematic review. BMC Gastroenterol. *11*.

AICR/WCRF (2007). Food, nutrition, physical activity and the prevention of cancer: a global perspective: a project of World Cancer Research Fund International (Washington, D.C: American Institute for Cancer Research).

AICR/WCRF (2011). Continuous Update Project Report. Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Colorectal Cancer (Washington, D.C).

Akude, E., Zherebitskaya, E., Roy Chowdhury, S.K., Girling, K., and Fernyhough, P. (2010). 4-Hydroxy-2-nonenal induces mitochondrial dysfunction and aberrant axonal outgrowth in adult sensory neurons that mimics features of diabetic neuropathy. Neurotox. Res. *17*, 28–38.

Alary, J., Bravais, F., Cravedi, J.P., Debrauwer, L., Rao, D., and Bories, G. (1995). Mercapturic acid conjugates as urinary end metabolites of the lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal in the rat. Chem. Res. Toxicol. *8*, 34–39.

Alary, J., Debrauwer, L., Fernandez, Y., Cravedi, J.P., Rao, D., and Bories, G. (1998a). 1,4-Dihydroxynonene mercapturic acid, the major end metabolite of exogenous 4-hydroxy-2-nonenal, is a physiological component of rat and human urine. Chem. Res. Toxicol. *11*, 130–135.

Alary, J., Debrauwer, L., Fernandez, Y., Paris, A., Cravedi, J.P., Dolo, L., Rao, D., and Bories, G. (1998b). Identification of novel urinary metabolites of the lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal in rats. Chem. Res. Toxicol. *11*, 1368–1376.

Alary, J., Guéraud, F., and Cravedi, J.-P. (2003a). Fate of 4-hydroxynonenal in vivo: disposition and metabolic pathways. Mol. Aspects Med. *24*, 177–187.

Alary, J., Fernandez, Y., Debrauwer, L., Perdu, E., and Guéraud, F. (2003b). Identification of intermediate pathways of 4-hydroxynonenal metabolism in the rat. Chem. Res. Toxicol. *16*, 320–327.

Alexander, D.D., Cushing, C.A., Lowe, K.A., Sceurman, B., and Roberts, M.A. (2009). Meta-analysis of animal fat or animal protein intake and colorectal cancer. Am. J. Clin. Nutr. *89*, 1402–1409.

Alexandrov, K., Rojas, M., Kadlubar, F.F., Lang, N.P., and Bartsch, H. (1996). Evidence of anti-benzo[a]pyrene diolepoxide-DNA adduct formation in human colon mucosa. Carcinogenesis *17*, 2081–2083.

Alrawi, S.J., Schiff, M., Carroll, R.E., Dayton, M., Gibbs, J.F., Kulavlat, M., Tan, D., Berman, K., Stoler, D.L., and Anderson, G.R. (2006). Aberrant crypt foci. Anticancer Res. *26*, 107–119.

Amos-Landgraf, J.M., Kwong, L.N., Kendziorski, C.M., Reichelderfer, M., Torrealba, J., Weichert, J., Haag, J.D., Chen, K.-S., Waller, J.L., Gould, M.N., et al. (2007). A target-selected Apc-mutant rat kindred enhances the modeling of familial human colon cancer. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *104*, 4036–4041.

Anand, P., Kunnumakkara, A.B., Kunnumakara, A.B., Sundaram, C., Harikumar, K.B., Tharakan, S.T., Lai, O.S., Sung, B., and Aggarwal, B.B. (2008). Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. Pharm. Res. *25*, 2097–2116.

Angeli, J.P.F., Garcia, C.C.M., Sena, F., Freitas, F.P., Miyamoto, S., Medeiros, M.H.G., and Di Mascio, P. (2011). Lipid hydroperoxide-induced and hemoglobin-enhanced oxidative damage to colon cancer cells. Free Radic. Biol. Med. *51*, 503–515.

Arakawa, H. (2004). Netrin-1 and its receptors in tumorigenesis. Nat. Rev. Cancer *4*, 978–987.

Arias, I.M., Boyer, J.L., and Fausto, N. (1994). Liver: Biology and Pathobiology (New York: Arias I.M).

Arrieta, M.C., Bistritz, L., and Meddings, J.B. (2006). Alterations in intestinal permeability. Gut *55*, 1512–1520.

Astin, M., Griffin, T., Neal, R.D., Rose, P., and Hamilton, W. (2011). The diagnostic value of symptoms for colorectal cancer in primary care: a systematic review. Br. J. Gen. Pract. J. R. Coll. Gen. Pract. *61*, e231-243.

Audebert, M., Dolo, L., Perdu, E., Cravedi, J.-P., and Zalko, D. (2011). Use of the γH2AX assay for assessing the genotoxicity of bisphenol A and bisphenol F in human cell lines. Arch. Toxicol. *85*, 1463–1473.

Awasthi, Y.C., Sharma, R., Cheng, J.Z., Yang, Y., Sharma, A., Singhal, S.S., and Awasthi, S. (2003). Role of 4-hydroxynonenal in stress-mediated apoptosis signaling. Mol. Aspects Med. *24*, 219–230.

Ayala, A., Muñoz, M.F., and Argüelles, S. (2014). Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. Oxid. Med. Cell. Longev. *2014*, 1–31.

Azadbakht, L., and Esmaillzadeh, A. (2009). Red meat intake is associated with metabolic syndrome and the plasma C-reactive protein concentration in women. J. Nutr. *139*, 335–339.

Azqueta, A., Arbillaga, L., López de Cerain, A., and Collins, A. (2013). Enhancing the sensitivity of the comet assay as a genotoxicity test, by combining it with bacterial repair enzyme FPG. Mutagenesis *28*, 271–277.

Baker, A.-M., Cereser, B., Melton, S., Fletcher, A.G., Rodriguez-Justo, M., Tadrous, P.J., Humphries, A., Elia, G., McDonald, S.A.C., Wright, N.A., et al. (2014). Quantification of crypt and stem cell evolution in the normal and neoplastic human colon. Cell Rep. *8*, 940–947.

Banda, K., Gregg, C.J., Chow, R., Varki, N.M., and Varki, A. (2012). Metabolism of vertebrate amino sugars with N-glycolyl groups: mechanisms underlying gastrointestinal incorporation of the non-human sialic acid xeno-autoantigen N-glycolylneuraminic acid. J. Biol. Chem. *287*, 28852–28864.

Baradat, M., Jouanin, I., Dalleau, S., Taché, S., Gieules, M., Debrauwer, L., Canlet, C., Huc, L., Dupuy, J., Pierre, F.H.F., et al. (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*, 1984–1993.

Bartsch, H., and Nair, J. (2006). Chronic inflammation and oxidative stress in the genesis and perpetuation of cancer: role of lipid peroxidation, DNA damage, and repair. Langenbecks Arch. Surg. Dtsch. Ges. Für Chir. *391*, 499–510.

Bastide, N., Morois, S., Cadeau, C., Kangas, S., Serafini, M., Gusto, G., Dossus, L., Pierre, F.H., Clavel-Chapelon, F., and Boutron-Ruault, M.-C. (2016). Heme Iron Intake, Dietary Antioxidant Capacity, and

Risk of Colorectal Adenomas in a Large Cohort Study of French Women. Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol. *25*, 640–647.

Bastide, N.M., Pierre, F.H.F., and Corpet, D.E. (2011). Heme iron from meat and risk of colorectal cancer: a meta-analysis and a review of the mechanisms involved. Cancer Prev. Res. Phila. Pa *4*, 177–184.

Bastide, N.M., Chenni, F., Audebert, M., Santarelli, R.L., Taché, S., Naud, N., Baradat, M., Jouanin, I., Surya, R., Hobbs, D.A., et al. (2015). A central role for heme iron in colon carcinogenesis associated with red meat intake. Cancer Res. *75*, 870–879.

Basu, A.K., and Marnett, L.J. (1983). Unequivocal demonstration that malondialdehyde is a mutagen. Carcinogenesis *4*, 331–333.

Beauchemin, N. (2011). The colorectal tumor microenvironment: the next decade. Cancer Microenviron. Off. J. Int. Cancer Microenviron. Soc. *4*, 181–185.

Béroud, C., and Soussi, T. (1996). APC gene: database of germline and somatic mutations in human tumors and cell lines. Nucleic Acids Res. *24*, 121–124.

Bielski, B.H., Arudi, R.L., and Sutherland, M.W. (1983). A study of the reactivity of HO2/O2- with unsaturated fatty acids. J. Biol. Chem. *258*, 4759–4761.

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*, 509–524.

Bingham, S.A., Pignatelli, B., Pollock, J.R., Ellul, A., Malaveille, C., Gross, G., Runswick, S., Cummings, J.H., and O'Neill, I.K. (1996). Does increased endogenous formation of N-nitroso compounds in the human colon explain the association between red meat and colon cancer? Carcinogenesis *17*, 515–523.

Bingham, S.A., Hughes, R., and Cross, A.J. (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*, 3522S–3525S.

Bird, R.P. (1987). Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. Cancer Lett. *37*, 147–151.

Blachier, F., Davila, A.-M., Mimoun, S., Benetti, P.-H., Atanasiu, C., Andriamihaja, M., Benamouzig, R., Bouillaud, F., and Tomé, D. (2010). Luminal sulfide and large intestine mucosa: friend or foe? Amino Acids *39*, 335–347.

Bonnesen, C., Eggleston, I.M., and Hayes, J.D. (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 Res. *61*, 6120–6130.

Bounias, M. (1999). Traité de toxicologie générale: du niveau moléculaire à l'échelle planétaire (Paris: Springer).

Bourre, J.-M. (2011). Réintégrer la viande bovine dans l'équilibre alimentaire. Bull. Académique Vét. Fr. - Tome 164 - N°3.

Boyle, P., and Langman, J.S. (2000). ABC of colorectal cancer: Epidemiology. BMJ *321*, 805–808.

Bruce, W.R. (1987). Recent hypotheses for the origin of colon cancer. Cancer Res. *47*, 4237–4242.

Bruce, W.R., and Corpet, D.E. (1996). The Colonic Protein Fermentation and Insulin Resistance Hypotheses for Colon Cancer Etiology: Experimental Tests Using Precursor Lesions. Eur. J Cancer Prev.

Burgess, A.W., Faux, M.C., Layton, M.J., and Ramsay, R.G. (2011). Wnt signaling and colon tumorigenesis--a view from the periphery. Exp. Cell Res. *317*, 2748–2758.

Byres, E., Paton, A.W., Paton, J.C., Löfling, J.C., Smith, D.F., Wilce, M.C.J., Talbot, U.M., Chong, D.C., Yu, H., Huang, S., et al. (2008). Incorporation of a non-human glycan mediates human susceptibility to a bacterial toxin. Nature *456*, 648–652.

Caderni, G. (2001). Slow-release pellets of sodium butyrate do not modify azoxymethane (AOM)-induced intestinal carcinogenesis in F344 rats. Carcinogenesis *22*, 525–527.

Caderni, G., Femia, A.P., Giannini, A., Favuzza, A., Luceri, C., Salvadori, M., and Dolara, P. (2003). Identification of mucin-depleted foci in the unsectioned colon of azoxymethane-treated rats: correlation with carcinogenesis. Cancer Res. *63*, 2388–2392.

Calle, E.E., and Kaaks, R. (2004). Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. Nat. Rev. Cancer *4*, 579–591.

Calle, E.E., and Thun, M.J. (2004). Obesity and cancer. Oncogene *23*, 6365–6378.

Candela, M., Turroni, S., Biagi, E., Carbonero, F., Rampelli, S., Fiorentini, C., and Brigidi, P. (2014). Inflammation and colorectal cancer, when microbiota-host mutualism breaks. World J. Gastroenterol. *20*, 908–922.

Chan, K., and Kan, Y.W. (1999). Nrf2 is essential for protection against acute pulmonary injury in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *96*, 12731–12736.

Chan, D.S.M., Lau, R., Aune, D., Vieira, R., Greenwood, D.C., Kampman, E., and Norat, T. (2011). Red and processed meat and colorectal cancer incidence: meta-analysis of prospective studies. PloS One *6*, e20456.

Chang, L., and Karin, M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. Nature *410*, 37–40.

Cheng, J.L., Futakuchi, M., Ogawa, K., Iwata, T., Kasai, M., Tokudome, S., Hirose, M., and Shirai, T. (2003). Dose response study of conjugated fatty acid derived from safflower oil on mammary and colon carcinogenesis pretreated with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) and 1,2-dimethylhydrazine (DMH) in female Sprague–Dawley rats. Cancer Lett. *196*, 161–168.

Chenni, F.Z., Taché, S., Naud, N., Guéraud, F., Hobbs, D.A., Kunhle, G.G.C., Pierre, F.H., and Corpet, D.E. (2013). Heme-induced biomarkers associated with red meat promotion of colon cancer are not modulated by the intake of nitrite. Nutr. Cancer *65*, 227–233.

Chevolleau, S., Meireles, M.-H., Jouanin, I., Naud, N., Pierre, F.H.F., Guéraud, F., and Debrauwer, L. (2016). Validation of a U-HPLC-ESI-MS/MS method for the quantification of reactive aldehydes produced by lipid peroxidation in the intestinal lumen (Toronto).

Chowdhury, P., and Soulsby, M. (2002). Lipid peroxidation in rat brain is increased by simulated weightlessness and decreased by a soy-protein diet. Ann. Clin. Lab. Sci. *32*, 188–192.

Chung, F.L., Chen, H.J., and Nath, R.G. (1996). Lipid peroxidation as a potential endogenous source for the formation of exocyclic DNA adducts. Carcinogenesis *17*, 2105–2111.

Chung, F.-L., Pan, J., Choudhury, S., Roy, R., Hu, W., and Tang, M. (2003). Formation of trans-4-hydroxy-2-nonenal- and other enal-derived cyclic DNA adducts from ω-3 and ω-6 polyunsaturated fatty acids and their roles in DNA repair and human p53 gene mutation. Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen. *531*, 25–36.

Cindric, M., Cipak, A., Zapletal, E., Jaganjac, M., Milkovic, L., Waeg, G., Stolc, S., Zarkovic, N., and Suzana Borovic, S. (2013). Stobadine attenuates impairment of an intestinal barrier model caused by 4-hydroxynonenal. Toxicol. In Vitro *27*, 426–432.

Collins, D., Hogan, A.M., and Winter, D.C. (2011). Microbial and viral pathogens in colorectal cancer. Lancet Oncol. *12*, 504–512.

Corpet, D. (2011). The Chemoprevention Database.

Corpet, D.E., and Pierre, F. (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 Oxf. Engl. 1990 *41*, 1911–1922.

Coussens, L.M., and Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. Nature *420*, 860–867.

Crosnier, C., Stamataki, D., and Lewis, J. (2006). Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. Nat. Rev. Genet. *7*, 349–359.

Cross, A.J., Pollock, J.R.A., and Bingham, S.A. (2003). Haem, not protein or inorganic iron, is responsible for endogenous intestinal N-nitrosation arising from red meat. Cancer Res. *63*, 2358–2360.

Cross, A.J., Ferrucci, L.M., Risch, A., Graubard, B.I., Ward, M.H., Park, Y., Hollenbeck, A.R., Schatzkin, A., and Sinha, R. (2010). A large prospective study of meat consumption and colorectal cancer risk: an investigation of potential mechanisms underlying this association. Cancer Res. *70*, 2406–2414.

Cui, C., Takamatsu, R., Doguchi, H., Matsuzaki, A., Saio, M., and Yoshimi, N. (2012). Pre-neoplastic lesion, mucin-depleted foci, reveals de novo high-grade dysplasia in rat colon carcinogenesis. Oncol. Rep. *27*, 1365–1370.

Cunningham, D., Atkin, W., Lenz, H.-J., Lynch, H.T., Minsky, B., Nordlinger, B., and Starling, N. (2010). Colorectal cancer. The Lancet *375*, 1030–1047.

Dalleau, S., Baradat, M., Guéraud, F., and Huc, L. (2013). Cell death and diseases related to oxidative stress: 4-hydroxynonenal (HNE) in the balance. Cell Death Differ. *20*, 1615–1630.

Dellavalle, C.T., Xiao, Q., Yang, G., Shu, X.-O., Aschebrook-Kilfoy, B., Zheng, W., Lan Li, H., Ji, B.-T., Rothman, N., Chow, W.-H., et al. (2014). Dietary nitrate and nitrite intake and risk of colorectal cancer in the Shanghai Women's Health Study. Int. J. Cancer *134*, 2917–2926.

Diallo, A., Deschasaux, M., Partula, V., Latino-Martel, P., Srour, B., Hercberg, S., Galan, P., Fassier, P., Guéraud, F., Pierre, F.H., et al. (2016). Dietary iron intake and breast cancer risk: modulation by an antioxidant supplementation. Oncotarget.

Downward, J. (2003). Role of receptor tyrosine kinases in G-protein-coupled receptor regulation of Ras: transactivation or parallel pathways? Biochem. J. *376*, e9–e10.

Drewes, J.L., Housseau, F., and Sears, C.L. (2016). Sporadic colorectal cancer: microbial contributors to disease prevention, development and therapy. Br. J. Cancer *115*, 273–280.

Eckl, P.M. (2003). Genotoxicity of HNE. Mol. Aspects Med. *24*, 161–165.

Eckl, P.M., Ortner, A., and Esterbauer, H. (1993). Genotoxic properties of 4-hydroxyalkenals and analogous aldehydes. Mutat. Res. *290*, 183–192.

Edelblum, K.L., and Turner, J.R. (2009). The tight junction in inflammatory disease: communication breakdown. Curr. Opin. Pharmacol. *9*, 715–720.

Eferl, R., and Wagner, E.F. (2003). AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. Nat. Rev. Cancer *3*, 859–868.

EFSA Scientific Committee (2012). Scientific Opinion on Exploring options for providing advice about possible human health risks based on the concept of Threshold of Toxicological Concern (TTC): Opinion on Threshold of Toxicological Concern. EFSA J. *10*, 2750.

Esterbauer, H., Cheeseman, K.H., Dianzani, M.U., Poli, G., and Slater, T.F. (1982). Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by ADP-Fe2+ in rat liver microsomes. Biochem. J. *208*, 129–140.

Esterbauer, H., Jürgens, G., Quehenberger, O., and Koller, E. (1987). Autoxidation of human low density lipoprotein: loss of polyunsaturated fatty acids and vitamin E and generation of aldehydes. J. Lipid Res. *28*, 495–509.

Esterbauer, H., Schaur, R.J., and Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. Free Radic. Biol. Med. *11*, 81–128.

Ethen, C.M., Reilly, C., Feng, X., Olsen, T.W., and Ferrington, D.A. (2007). Age-related macular degeneration and retinal protein modification by 4-hydroxy-2-nonenal. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. *48*, 3469–3479.

Fabia, R., Willén, R., Ar'Rajab, A., Andersson, R., Ahrén, B., and Bengmark, S. (1992). Acetic acid-induced colitis in the rat: a reproducible experimental model for acute ulcerative colitis. Eur. Surg. Res. Eur. Chir. Forsch. Rech. Chir. Eur. *24*, 211–225.

Fan, Y., Mao, R., and Yang, J. (2013). NF-kappaB and STAT3 signaling pathways collaboratively link inflammation to cancer. Protein Cell *4*, 176–185.

Fearnhead, N.S., Wilding, J.L., and Bodmer, W.F. (2002). Genetics of colorectal cancer: hereditary aspects and overview of colorectal tumorigenesis. Br. Med. Bull. *64*, 27–43.

Fearon, E.R. (2011). Molecular genetics of colorectal cancer. Annu. Rev. Pathol. *6*, 479–507.

Fearon, E.R., and Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell *61*, 759–767.

Femia, A.P., and Caderni, G. (2008). Rodent models of colon carcinogenesis for the study of chemopreventive activity of natural products. Planta Med. *74*, 1602–1607.

Femia, A.P., Dolara, P., and Caderni, G. (2004). Mucin-depleted foci (MDF) in the colon of rats treated with azoxymethane (AOM) are useful biomarkers for colon carcinogenesis. Carcinogenesis *25*, 277–281.

Femia, A.P., Dolara, P., Giannini, A., Salvadori, M., Biggeri, A., and Caderni, G. (2007). Frequent mutation of Apc gene in rat colon tumors and mucin-depleted foci, preneoplastic lesions in experimental colon carcinogenesis. Cancer Res. *67*, 445–449.

Feng, Z., Hu, W., Amin, S., and Tang, M. (2003). Mutational spectrum and genotoxicity of the major lipid peroxidation product, trans-4-hydroxy-2-nonenal, induced DNA adducts in nucleotide excision repair-proficient and -deficient human cells. Biochemistry (Mosc.) *42*, 7848–7854.

Forest, V., Pierre, F., Bassonga, E., Meflah, K., Olivier, C., and Menanteau, J. (2003a). 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*, 70–76.

Forest, V., Clement, M., Pierre, F., Meflah, K., and Menanteau, J. (2003b). Butyrate restores motile function and actin cytoskeletal network integrity in apc mutated mouse colon epithelial cells. Nutr. Cancer *45*, 84–92.

Forman, H.J., Fukuto, J.M., Miller, T., Zhang, H., Rinna, A., and Levy, S. (2008). The chemistry of cell signaling by reactive oxygen and nitrogen species and 4-hydroxynonenal. Arch. Biochem. Biophys. *477*, 183–195.

Gañán-Gómez, I., Wei, Y., Yang, H., Boyano-Adánez, M.C., and García-Manero, G. (2013). Oncogenic functions of the transcription factor Nrf2. Free Radic. Biol. Med. *65*, 750–764.

Gardner, H.W., Simpson, T.D., and Hamberg, M. (1993). Transformation of fatty acid hydroperoxides by alkali and characterization of products. Lipids *28*, 487–495.

Gasc, N., Taché, S., Rathahao, E., Bertrand-Michel, J., Roques, V., and Guéraud, F. (2007). 4-hydroxynonenal in foodstuffs: heme concentration, fatty acid composition and freeze-drying are determining factors. Redox Rep. Commun. Free Radic. Res. *12*, 40–44.

Gil, L., Siems, W., Mazurek, B., Gross, J., Schroeder, P., Voss, P., and Grune, T. (2006). Age-associated analysis of oxidative stress parameters in human plasma and erythrocytes. Free Radic. Res. *40*, 495–505.

Gilsing, A.M.J., Berndt, S.I., Ruder, E.H., Graubard, B.I., Ferrucci, L.M., Burdett, L., Weissfeld, J.L., Cross, A.J., and Sinha, R. (2012). Meat-related mutagen exposure, xenobiotic metabolizing gene polymorphisms and the risk of advanced colorectal adenoma and cancer. Carcinogenesis *33*, 1332–1339.

Glei, M., Klenow, S., Sauer, J., Wegewitz, U., Richter, K., and Pool-Zobel, B.L. (2006). Hemoglobin and hemin induce DNA damage in human colon tumor cells HT29 clone 19A and in primary human colonocytes. Mutat. Res. *594*, 162–171.

Gopalakrishna, R., and Jaken, S. (2000). Protein kinase C signaling and oxidative stress. Free Radic. Biol. Med. *28*, 1349–1361.

Grady, W.M., and Markowitz, S.D. (2002). Genetic and epigenetic alterations in colon cancer. Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. *3*, 101–128.

Graillot, V., Dormoy, I., Dupuy, J., Shay, J.W., Huc, L., Mirey, G., and Vignard, J. (2016). Genotoxicity of Cytolethal Distending Toxin (CDT) on Isogenic Human Colorectal Cell Lines: Potential Promoting Effects for Colorectal Carcinogenesis. Front. Cell. Infect. Microbiol. *6*.

Griesser, M., Boeglin, W.E., Suzuki, T., and Schneider, C. (2009). Convergence of the 5-LOX and COX-2 pathways: heme-catalyzed cleavage of the 5S-HETE-derived di-endoperoxide into aldehyde fragments. J. Lipid Res. *50*, 2455–2462.

Grune, T., and Davies, K.J.A. (2003). The proteasomal system and HNE-modified proteins. Mol. Aspects Med. *24*, 195–204.

Grune, T., Zarkovic, N., and Kostelidou, K. (2010). Lipid peroxidation research in Europe and the COST B35 action "Lipid Peroxidation Associated Disorders." Free Radic. Res. *44*, 1095–1097.

Guéraud, F., Alary, J., Costet, P., Debrauwer, L., Dolo, L., Pineau, T., and Paris, A. (1999). In vivo involvement of cytochrome P450 4A family in the oxidative metabolism of the lipid peroxidation product trans-4-hydroxy-2-nonenal, using PPARalpha-deficient mice. J. Lipid Res. *40*, 152–159.

Guéraud, F., Peiro, G., Bernard, H., Alary, J., Créminon, C., Debrauwer, L., Rathahao, E., Drumare, M.-F., Canlet, C., Wal, J.-M., et al. (2006). Enzyme immunoassay for a urinary metabolite of 4-hydroxynonenal as a marker of lipid peroxidation. Free Radic. Biol. Med. *40*, 54–62.

Guéraud, F., Atalay, M., Bresgen, N., Cipak, A., Eckl, P.M., Huc, L., Jouanin, I., Siems, W., and Uchida, K. (2010). Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. Free Radic. Res. *44*, 1098–1124.

Guzman, J.R., Conlin, V.S., and Jobin, C. (2013). Diet, Microbiome, and the Intestinal Epithelium: An Essential Triumvirate? BioMed Res. Int. *2013*, 1–12.

Haggar, F., and Boushey, R. (2009). Colorectal Cancer Epidemiology: Incidence, Mortality, Survival, and Risk Factors. Clin. Colon Rectal Surg. *22*, 191–197.

Halliwell, B., and Gutteridge, J.M. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. Methods Enzymol. *186*, 1–85.

Hammer, A., Ferro, M., Tillian, H.M., Tatzber, F., Zollner, H., Schauenstein, E., and Schaur, R.J. (1997). Effect of oxidative stress by iron on 4-hydroxynonenal formation and proliferative activity in hepatomas of different degrees of differentiation. Free Radic. Biol. Med. *23*, 26–33.

Hampel, H., Frankel, W.L., Martin, E., Arnold, M., Khanduja, K., Kuebler, P., Clendenning, M., Sotamaa, K., Prior, T., Westman, J.A., et al. (2008). Feasibility of screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. *26*, 5783–5788.

Han, I.H., and Csallany, A.S. (2012). The Toxic Aldehyde, 4-Hydroxy-2-trans-nonenal (HNE) Formation in Natural and Imitation Mozzarella Cheeses: Heat Treatment Effects. J. Am. Oil Chem. Soc. *89*, 1801–1805.

Haorah, J., Zhou, L., Wang, X., Xu, G., and Mirvish, S.S. (2001). Determination of total N-nitroso compounds and their precursors in frankfurters, fresh meat, dried salted fish, sauces, tobacco, and tobacco smoke particulates. J. Agric. Food Chem. *49*, 6068–6078.

Hayes, J.D., and McMahon, M. (2009). NRF2 and KEAP1 mutations: permanent activation of an adaptive response in cancer. Trends Biochem. Sci. *34*, 176–188.

Heddle, J.A., Knize, M.G., Dawod, D., and Zhang, X.B. (2001). A test of the mutagenicity of cooked meats in vivo. Mutagenesis *16*, 103–107.

Hedlund, M., Padler-Karavani, V., Varki, N.M., and Varki, A. (2008). Evidence for a human-specific mechanism for diet and antibody-mediated inflammation in carcinoma progression. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *105*, 18936–18941.

Heinen, C.D. (2010). Genotype to phenotype: analyzing the effects of inherited mutations in colorectal cancer families. Mutat. Res. *693*, 32–45.

Hu, W., Feng, Z., Eveleigh, J., Iyer, G., Pan, J., Amin, S., Chung, F.-L., and Tang, M.-S. (2002). The major lipid peroxidation product, trans-4-hydroxy-2-nonenal, preferentially forms DNA adducts at codon 249 of human p53 gene, a unique mutational hotspot in hepatocellular carcinoma. Carcinogenesis *23*, 1781–1789.

Huang, H.-C., Nguyen, T., and Pickett, C.B. (2002). Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription. J. Biol. Chem. *277*, 42769–42774.

Huang, Y., Li, W., and Kong, A.-N.T. (2012). Anti-oxidative stress regulator NF-E2-related factor 2 mediates the adaptive induction of antioxidant and detoxifying enzymes by lipid peroxidation metabolite 4-hydroxynonenal. Cell Biosci. *2*, 40.

Hughes, R., Cross, A.J., Pollock, J.R., and Bingham, S. (2001). Dose-dependent effect of dietary meat on endogenous colonic N-nitrosation. Carcinogenesis *22*, 199–202.

Humphries, A., and Wright, N.A. (2008). Colonic crypt organization and tumorigenesis. Nat. Rev. Cancer *8*, 415–424.

IARC (2012a). GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and PRevalence Worldwide in 2012.

IARC, W. (2012b). Global Cancer Observatory - Cancer Today.

IFIP (2010). Vers une recommandation de réduction du taux de nitrites dans les différentes familles de charcuterie. Tech. Rev. Tech. IFIP.

IJssennagger, N., Rijnierse, A., de Wit, N., Jonker-Termont, D., Dekker, J., Müller, M., and van der Meer, R. (2012a). Dietary haem stimulates epithelial cell turnover by downregulating feedback inhibitors of proliferation in murine colon. Gut *61*, 1041–1049.

IJssennagger, N., Derrien, M., van Doorn, G.M., Rijnierse, A., van den Bogert, B., Müller, M., Dekker, J., Kleerebezem, M., and van der Meer, R. (2012b). Dietary heme alters microbiota and mucosa of mouse colon without functional changes in host-microbe cross-talk. PloS One *7*, e49868.

IJssennagger, N., Rijnierse, A., de Wit, N.J.W., Boekschoten, M.V., Dekker, J., Schonewille, A., Müller, M., and van der Meer, R. (2013). Dietary heme induces acute oxidative stress, but delayed cytotoxicity and compensatory hyperproliferation in mouse colon. Carcinogenesis *34*, 1628–1635.

Ijssennagger, N., Belzer, C., Hooiveld, G.J., Dekker, J., van Mil, S.W.C., Müller, M., Kleerebezem, M., and van der Meer, R. (2015). Gut microbiota facilitates dietary heme-induced epithelial hyperproliferation by opening the mucus barrier in colon. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *112*, 10038–10043.

Imai, K., and Yamamoto, H. (2008). Carcinogenesis and microsatellite instability: the interrelationship between genetics and epigenetics. Carcinogenesis *29*, 673–680.

INCa (2016). Les cancers en France - Edition 2015.

INCa INCa : Qu'est-ce qu'un cancer.

Ishikawa, S., Tamaki, S., Ohata, M., Arihara, K., and Itoh, M. (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*, 1182–1191.

Issa, J.-P.J., Shen, L., and Toyota, M. (2005). CIMP, at last. Gastroenterology *129*, 1121–1124.

Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I., et al. (1997). An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. Biochem. Biophys. Res. Commun. *236*, 313–322.

Itzkowitz, S.H., and Yio, X. (2004). Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. *287*, G7-17.

Janssen, K.-P., el-Marjou, F., Pinto, D., Sastre, X., Rouillard, D., Fouquet, C., Soussi, T., Louvard, D., and Robine, S. (2002). Targeted expression of oncogenic K-ras in intestinal epithelium causes spontaneous tumorigenesis in mice. Gastroenterology *123*, 492–504.

Jasperson, K.W., Tuohy, T.M., Neklason, D.W., and Burt, R.W. (2010). Hereditary and familial colon cancer. Gastroenterology *138*, 2044–2058.

Jelsig, A., Qvist, N., Brusgaard, K., Nielsen, C., Hansen, T., and Ousager, L. (2014). Hamartomatous polyposis syndromes: A review. Orphanet J. Rare Dis. *9*, 101.

Ji, C., Kozak, K.R., and Marnett, L.J. (2001). IkappaB kinase, a molecular target for inhibition by 4-hydroxy-2-nonenal. J. Biol. Chem. *276*, 18223–18228.

Joosen, A.M.C.P., Kuhnle, G.G.C., Aspinall, S.M., Barrow, T.M., Lecommandeur, E., Azqueta, A., Collins, A.R., and Bingham, S.A. (2009). Effect of processed and red meat on endogenous nitrosation and DNA damage. Carcinogenesis *30*, 1402–1407.

Jouanin, I., Chevolleau, S., Canlet, C., Lorber, C., Pierre, F., Guéraud, F., and Debrauwer, L. (2015). Facile Oxime Ether Synthesis: Free Carbonyl Compound Derivatization by a Brominated *O* -Benzylhydroxylamine. Synth. Commun. *45*, 1585–1591.

Kanazawa, K., and Ashida, H. (1998). Dietary hydroperoxides of linoleic acid decompose to aldehydes in stomach before being absorbed into the body. Biochim. Biophys. Acta *1393*, 349–361.

Kang, S.C., Kim, H.-W., Kim, K.B., Kwack, S.J., Ahn, I.Y., Bae, J.Y., Lim, S.K., and Lee, B.M. (2011). Hepatotoxicity and nephrotoxicity produced by 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) following 4-week oral administration to Sprague-Dawley rats. J. Toxicol. Environ. Health A *74*, 779–789.

Karihtala, P., Kauppila, S., Puistola, U., and Jukkola-Vuorinen, A. (2011). Divergent behaviour of oxidative stress markers 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) and 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) in breast carcinogenesis. Histopathology *58*, 854–862.

Karlhuber, G.., Bauer, H.., and Eckl, P.. (1997). Cytotoxic and genotoxic effects of 4-hydroxynonenal in cerebral endothelial cells. Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen. *381*, 209–216.

Karnoub, A.E., and Weinberg, R.A. (2008). Ras oncogenes: split personalities. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *9*, 517–531.

Kensler, T.W., Egner, P.A., Agyeman, A.S., Visvanathan, K., Groopman, J.D., Chen, J.-G., Chen, T.-Y., Fahey, J.W., and Talalay, P. (2013). Keap1-nrf2 signaling: a target for cancer prevention by sulforaphane. Top. Curr. Chem. *329*, 163–177.

Khor, T.O., Huang, M.-T., Prawan, A., Liu, Y., Hao, X., Yu, S., Cheung, W.K.L., Chan, J.Y., Reddy, B.S., Yang, C.S., et al. (2008). Increased susceptibility of Nrf2 knockout mice to colitis-associated colorectal cancer. Cancer Prev. Res. Phila. Pa *1*, 187–191.

Khoury, L., Zalko, D., and Audebert, M. (2016). Complementarity of phosphorylated histones H2AX and H3 quantification in different cell lines for genotoxicity screening. Arch. Toxicol. *90*, 1983–1995.

Kobayashi, A., Kang, M.-I., Okawa, H., Ohtsuji, M., Zenke, Y., Chiba, T., Igarashi, K., and Yamamoto, M. (2004). Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. Mol. Cell. Biol. *24*, 7130–7139.

Kohno, H., Tanaka, T., Kawabata, K., Hirose, Y., Sugie, S., Tsuda, H., and Mori, H. (2002). Silymarin, a naturally occurring polyphenolic antioxidant flavonoid, inhibits azoxymethane-induced colon carcinogenesis in male F344 rats. Int. J. Cancer *101*, 461–468.

Kreuzer, T., Grube, R., Wutte, A., Zarkovic, N., and Schaur, R.J. (1998). 4-Hydroxynonenal modifies the effects of serum growth factors on the expression of the c-fos proto-oncogene and the proliferation of HeLa carcinoma cells. Free Radic. Biol. Med. *25*, 42–49.

Kristt, D., Bryan, K., and Gal, R. (1999). Colonic aberrant crypts may originate from impaired fissioning: relevance to increased risk of neoplasia. Hum. Pathol. *30*, 1449–1458.

Kuhnle, G.G.C., and Bingham, S.A. (2007). Dietary meat, endogenous nitrosation and colorectal cancer. Biochem. Soc. Trans. *35*, 1355–1357.

Kuhnle, G.G.C., Story, G.W., Reda, T., Mani, A.R., Moore, K.P., Lunn, J.C., and Bingham, S.A. (2007). Diet-induced endogenous formation of nitroso compounds in the GI tract. Free Radic. Biol. Med. *43*, 1040–1047.

van Kuijk, F.J., Thomas, D.W., Stephens, R.J., and Dratz, E.A. (1988). Detection of lipid peroxidation products in lipids and tissues by gas chromatography-mass spectrometry. Basic Life Sci. *49*, 179–183.

van Kuijk, F.J.G.M., Thomas, D.W., Stephens, R.J., and Dratz, E.A. (1986). Occurrence of 4-hydroxyalkenals in rat tissues determined as pentafluorobenzyl oxime derivatives by gas chromatography-mass spectrometry. Biochem. Biophys. Res. Commun. *139*, 144–149.

Kumagai, T., Nakamura, Y., Osawa, T., and Uchida, K. (2002). Role of p38 mitogen-activated protein kinase in the 4-hydroxy-2-nonenal-induced cyclooxygenase-2 expression. Arch. Biochem. Biophys. *397*, 240–245.

Kumano-Kuramochi, M., Shimozu, Y., Wakita, C., Ohnishi-Kameyama, M., Shibata, T., Matsunaga, S., Takano-Ishikawa, Y., Watanabe, J., Goto, M., Xie, Q., et al. (2012). Identification of 4-hydroxy-2-nonenal-histidine adducts that serve as ligands for human lectin-like oxidized LDL receptor-1. Biochem. J. *442*, 171–180.

Larsson, S.C., and Wolk, A. (2006). Meat consumption and risk of colorectal cancer: a meta-analysis of prospective studies. Int. J. Cancer *119*, 2657–2664.

Laurent, A., Alary, J., Debrauwer, L., and Cravedi, J.P. (1999). Analysis in the rat of 4-hydroxynonenal metabolites excreted in bile: evidence of enterohepatic circulation of these byproducts of lipid peroxidation. Chem. Res. Toxicol. *12*, 887–894.

Laurent, A., Perdu-Durand, E., Alary, J., Debrauwer, L., and Cravedi, J.P. (2000). Metabolism of 4-hydroxynonenal, a cytotoxic product of lipid peroxidation, in rat precision-cut liver slices. Toxicol. Lett. *114*, 203–214.

Leiphon, L.J., and Picklo, M.J. (2007). Inhibition of aldehyde detoxification in CNS mitochondria by fungicides. NeuroToxicology *28*, 143–149.

Li, W., and Kong, A.-N. (2009). Molecular mechanisms of Nrf2-mediated antioxidant response. Mol. Carcinog. *48*, 91–104.

Liu, W., Porter, N.A., Schneider, C., Brash, A.R., and Yin, H. (2011). Formation of 4-hydroxynonenal from cardiolipin oxidation: Intramolecular peroxyl radical addition and decomposition. Free Radic. Biol. Med. *50*, 166–178.

Loguercio, C., Federico, A., Tuccillo, C., Terracciano, F., D'Auria, M.V., De Simone, C., and Del Vecchio Blanco, C. (2005). Beneficial effects of a probiotic VSL#3 on parameters of liver dysfunction in chronic liver diseases. J. Clin. Gastroenterol. *39*, 540–543.

Loh, Y.H., Jakszyn, P., Luben, R.N., Mulligan, A.A., Mitrou, P.N., and Khaw, K.-T. (2011). N-Nitroso compounds and cancer incidence: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Norfolk Study. Am. J. Clin. Nutr. *93*, 1053–1061.

Magnuson, B.A., Carr, I., and Bird, R.P. (1993). Ability of aberrant crypt foci characteristics to predict colonic tumor incidence in rats fed cholic acid. Cancer Res. *53*, 4499–4504.

Maier, B.R., Flynn, M.A., Burton, G.C., Tsutakawa, R.K., and Hentges, D.J. (1974). Effects of a high-beef diet on bowel flora: a preliminary report. Am. J. Clin. Nutr. *27*, 1470–1474.

Mariani, F., Sena, P., and Roncucci, L. (2014). Inflammatory pathways in the early steps of colorectal cancer development. World J. Gastroenterol. *20*, 9716–9731.

Mark, R.J., Lovell, M.A., Markesbery, W.R., Uchida, K., and Mattson, M.P. (2002). A Role for 4-Hydroxynonenal, an Aldehydic Product of Lipid Peroxidation, in Disruption of Ion Homeostasis and Neuronal Death Induced by Amyloid β-Peptide. J. Neurochem. *68*, 255–264.

Martin, O.C.B., Graillot, V., Naud, N., Tache, S., Gaultier, E., Tondereau, V., Boutet, E., Guéraud, F., Theodorou, V., Huc, L., et al. (En préparation). Aldehydes from heme-induced lipid peroxidation are responsible for in vivo and in vitro increase of intestinal permeability, mucosal inflammation and genotoxicity.

Masotti, L., Casali, E., and Galeoti, T. (1988). Lipid peroxidation in tumour cells. Free Radic. Biol. Med. *4*, 377–386.

McAfee, A.J., McSorley, E.M., Cuskelly, G.J., Moss, B.W., Wallace, J.M.W., Bonham, M.P., and Fearon, A.M. (2010). Red meat consumption: an overview of the risks and benefits. Meat Sci. *84*, 1–13.

McGrath, C.E., Tallman, K.A., Porter, N.A., and Marnett, L.J. (2011). Structure−Activity Analysis of Diffusible Lipid Electrophiles Associated with Phospholipid Peroxidation: 4-Hydroxynonenal and 4-Oxononenal Analogues. Chem. Res. Toxicol. *24*, 357–370.

McIntosh, G.H., and Le Leu, R.K. (2001). The influence of dietary proteins on colon cancer risk. Nutr. Res. N. Y. N *21*, 1053–1066.

McLellan, E.A., and Bird, R.P. (1988). Aberrant crypts: potential preneoplastic lesions in the murine colon. Cancer Res. *48*, 6187–6192.

Meagher, E.A., and FitzGerald, G.A. (2000). Indices of lipid peroxidation in vivo: strengths and limitations. Free Radic. Biol. Med. *28*, 1745–1750.

Mehlen, P., and Fearon, E.R. (2004). Role of the dependence receptor DCC in colorectal cancer pathogenesis. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. *22*, 3420–3428.

Michel, P., Eggert, W., Albrecht-Nebe, H., and Grune, T. (1997). Increased lipid peroxidation in children with autoimmune diseases. Acta Paediatr. Oslo Nor. 1992 *86*, 609–612.

Miller, P.E., Lazarus, P., Lesko, S.M., Cross, A.J., Sinha, R., Laio, J., Zhu, J., Harper, G., Muscat, J.E., and Hartman, T.J. (2013). Meat-related compounds and colorectal cancer risk by anatomical subsite. Nutr. Cancer *65*, 202–226.

Minamoto, T., Mai, M., and Ronai, Z. (1999). Environmental factors as regulators and effectors of multistep carcinogenesis. Carcinogenesis *20*, 519–527.

Mirvish, S.S., Haorah, J., Zhou, L., Hartman, M., Morris, C.R., and Clapper, M.L. (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*, 595–603.

Mitsuishi, Y., Taguchi, K., Kawatani, Y., Shibata, T., Nukiwa, T., Aburatani, H., Yamamoto, M., and Motohashi, H. (2012). Nrf2 redirects glucose and glutamine into anabolic pathways in metabolic reprogramming. Cancer Cell *22*, 66–79.

Montine, T.J., Amarnath, V., Martin, M.E., Strittmatter, W.J., and Graham, D.G. (1996a). E-4-hydroxy-2-nonenal is cytotoxic and cross-links cytoskeletal proteins in P19 neuroglial cultures. Am. J. Pathol. *148*, 89–93.

Montine, T.J., Huang, D.Y., Valentine, W.M., Amarnath, V., Saunders, A., Weisgraber, K.H., Graham, D.G., and Strittmatter, W.J. (1996b). Crosslinking of apolipoprotein E by products of lipid peroxidation. J. Neuropathol. Exp. Neurol. *55*, 202–210.

Moser, A.R., Pitot, H.C., and Dove, W.F. (1990). A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. Science *247*, 322–324.

Mukhopadhyay, P., Horváth, B., Kechrid, M., Tanchian, G., Rajesh, M., Naura, A.S., Boulares, A.H., and Pacher, P. (2011). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 is a key mediator of cisplatin-induced kidney inflammation and injury. Free Radic. Biol. Med. *51*, 1774–1788.

Narayan, S., and Roy, D. (2003). Role of APC and DNA mismatch repair genes in the development of colorectal cancers. Mol. Cancer *2*, 41.

Näthke, I.S. (2004). The adenomatous polyposis coli protein: the Achilles heel of the gut epithelium. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. *20*, 337–366.

NCI (2015). General Information About Colon Cancer.

Negre-Salvayre, A., Auge, N., Ayala, V., Basaga, H., Boada, J., Brenke, R., Chapple, S., Cohen, G., Feher, J., Grune, T., et al. (2010). Pathological aspects of lipid peroxidation. Free Radic. Res. *44*, 1125–1171.

Newcombe, J., Li, H., and Cuzner, M.L. (1994). Low density lipoprotein uptake by macrophages in multiple sclerosis plaques: implications for pathogenesis. Neuropathol. Appl. Neurobiol. *20*, 152–162.

Newmark, H.L., Yang, K., Kurihara, N., Fan, K., Augenlicht, L.H., and Lipkin, M. (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*, 88–92.

Niedernhofer, L.J., Daniels, J.S., Rouzer, C.A., Greene, R.E., and Marnett, L.J. (2003). Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells. J. Biol. Chem. *278*, 31426–31433.

Niki, E., Yoshida, Y., Saito, Y., and Noguchi, N. (2005). Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. Biochem. Biophys. Res. Commun. *338*, 668–676.

Nishikawa, A., Sodum, R., and Chung, F.L. (1992). Acute toxicity of trans-4-hydroxy-2-nonenal in Fisher 344 rats [corrected]. Lipids *27*, 54–58.

Nitti, M., Domenicotti, C., d'Abramo, C., Assereto, S., Cottalasso, D., Melloni, E., Poli, G., Biasi, F., Marinari, U.M., and Pronzato, M.A. (2002). Activation of PKC-beta isoforms mediates HNE-induced MCP-1 release by macrophages. Biochem. Biophys. Res. Commun. *294*, 547–552.

Noguchi, M., Yoshida, T., and Kikuchi, G. (1983). A stoichiometric study of heme degradation catalyzed by the reconstituted heme oxygenase system with special consideration of the production of hydrogen peroxide during the reaction. J. Biochem. (Tokyo) *93*, 1027–1036.

Norat, T., Lukanova, A., Ferrari, P., and Riboli, E. (2002). Meat consumption and colorectal cancer risk: dose-response meta-analysis of epidemiological studies. Int. J. Cancer *98*, 241–256.

Oberley, T.D., Toyokuni, S., and Szweda, L.I. (1999). Localization of hydroxynonenal protein adducts in normal human kidney and selected human kidney cancers. Free Radic. Biol. Med. *27*, 695–703.

Ohkawa, H., Ohishi, N., and Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal. Biochem. *95*, 351–358.

O'Keefe, S.J.D., Chung, D., Mahmoud, N., Sepulveda, A.R., Manafe, M., Arch, J., Adada, H., and van der Merwe, T. (2007). Why do African Americans get more colon cancer than Native Africans? J. Nutr. *137*, 175S–182S.

de Oliveira Otto, M.C.C., Alonso, A., Lee, D.-H., Delclos, G.L., Jenny, N.S., Jiang, R., Lima, J.A., Symanski, E., Jacobs, D.R., and Nettleton, J.A. (2011). Dietary micronutrient intakes are associated with markers of inflammation but not with markers of subclinical atherosclerosis. J. Nutr. *141*, 1508–1515.

Ollberding, N.J., Wilkens, L.R., Henderson, B.E., Kolonel, L.N., and Le Marchand, L. (2012). Meat consumption, heterocyclic amines and colorectal cancer risk: the Multiethnic Cohort Study. Int. J. Cancer *131*, E1125-1133.

Ordway, G.A., and Garry, D.J. (2004). Myoglobin: an essential hemoprotein in striated muscle. J. Exp. Biol. *207*, 3441–3446.

Osburn, W.O., Karim, B., Dolan, P.M., Liu, G., Yamamoto, M., Huso, D.L., and Kensler, T.W. (2007). Increased colonic inflammatory injury and formation of aberrant crypt foci in Nrf2-deficient mice upon dextran sulfate treatment. Int. J. Cancer *121*, 1883–1891.

Papastergiadis, A., Fatouh, A., Jacxsens, L., Lachat, C., Shrestha, K., Daelman, J., Kolsteren, P., Van Langenhove, H., and De Meulenaer, B. (2014a). Exposure assessment of Malondialdehyde, 4-Hydroxy-2-(E)-Nonenal and 4-Hydroxy-2-(E)-Hexenal through specific foods available in Belgium. Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc. *73*, 51–58.

Papastergiadis, A., Mubiru, E., Van Langenhove, H., and De Meulenaer, B. (2014b). Development of a Sensitive and Accurate Stable Isotope Dilution Assay for the Simultaneous Determination of Free 4-Hydroxy-2-(E)-Nonenal and 4-Hydroxy-2-(E)-Hexenal in Various Food Matrices by Gas Chromatography–Mass Spectrometry. Food Anal. Methods *7*, 836–843.

Parkin, D.M., Boyd, L., and Walker, L.C. (2011). 16. The fraction of cancer attributable to lifestyle and environmental factors in the UK in 2010. Br. J. Cancer *105 Suppl 2*, S77-81.

Parnaud, G., Pignatelli, B., Peiffer, G., Taché, S., and Corpet, D.E. (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*, 74–80.

Parola, M., Robino, G., Marra, F., Pinzani, M., Bellomo, G., Leonarduzzi, G., Chiarugi, P., Camandola, S., Poli, G., Waeg, G., et al. (1998). HNE interacts directly with JNK isoforms in human hepatic stellate cells. J. Clin. Invest. *102*, 1942–1950.

Perše, M., and Cerar, A. (2011). Morphological and Molecular Alterations in 1,2 Dimethylhydrazine and Azoxymethane Induced Colon Carcinogenesis in Rats. J. Biomed. Biotechnol. *2011*, 1–14.

Peterson, L.W., and Artis, D. (2014). Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. Nat. Rev. Immunol. *14*, 141–153.

Phillips, D.H. (1999). Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. Mutat. Res. *443*, 139–147.

Piche, T. (2014). Tight junctions and IBS--the link between epithelial permeability, low-grade inflammation, and symptom generation? Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc. *26*, 296–302.

Pierre, F., Taché, S., Petit, C.R., Van der Meer, R., and Corpet, D.E. (2003). Meat and cancer: haemoglobin and haemin in a low-calcium diet promote colorectal carcinogenesis at the aberrant crypt stage in rats. Carcinogenesis *24*, 1683–1690.

Pierre, F., Freeman, A., Taché, S., Van der Meer, R., and Corpet, D.E. (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*, 2711–2716.

Pierre, F., Peiro, G., Taché, S., Cross, A.J., Bingham, S.A., Gasc, N., Gottardi, G., Corpet, D.E., and Guéraud, F. (2006). New marker of colon cancer risk associated with heme intake: 1,4-dihydroxynonane mercapturic acid. Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol. *15*, 2274–2279.

Pierre, F., Santarelli, R., Taché, S., Guéraud, F., and Corpet, D.E. (2008). Beef meat promotion of dimethylhydrazine-induced colorectal carcinogenesis biomarkers is suppressed by dietary calcium. Br. J. Nutr. *99*, 1000–1006.

Pierre, F.H.F., Santarelli, R.L., Allam, O., Tache, S., Naud, N., Gueraud, F., and Corpet, D.E. (2010). Freeze-dried ham promotes azoxymethane-induced mucin-depleted foci and aberrant crypt foci in rat colon. Nutr. Cancer *62*, 567–573.

Pierre, F.H.F., Martin, O.C.B., Santarelli, R.L., Taché, S., Naud, N., Guéraud, F., Audebert, M., Dupuy, J., Meunier, N., Attaix, D., et al. (2013). Calcium and α-tocopherol suppress cured-meat promotion of chemically induced colon carcinogenesis in rats and reduce associated biomarkers in human volunteers. Am. J. Clin. Nutr. *98*, 1255–1262.

PNNS (2009). Nutrition & prévention des cancers : des connaissances scientifiques aux recommandations, Institution National du Cancer.

Poli, G., Dianzani, M.U., Cheeseman, K.H., Slater, T.F., Lang, J., and Esterbauer, H. (1985). Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by carbon tetrachloride or ADP-iron in isolated rat hepatocytes and rat liver microsomal suspensions. Biochem. J. *227*, 629–638.

Poli, G., Schaur, R.J., Siems, W.G., and Leonarduzzi, G. (2008). 4-Hydroxynonenal: A membrane lipid oxidation product of medicinal interest. Med. Res. Rev. *28*, 569–631.

Pretlow, T.P., Barrow, B.J., Ashton, W.S., O'Riordan, M.A., Pretlow, T.G., Jurcisek, J.A., and Stellato, T.A. (1991). Aberrant crypts: putative preneoplastic foci in human colonic mucosa. Cancer Res. *51*, 1564–1567.

Pryor, W.A., and Porter, N.A. (1990). Suggested mechanisms for the production of 4-hydroxy-2-nonenal from the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. Free Radic. Biol. Med. *8*, 541–543.

Qiao, L., and Feng, Y. (2013). Intakes of heme iron and zinc and colorectal cancer incidence: a meta-analysis of prospective studies. Cancer Causes Control CCC *24*, 1175–1183.

Rada, P., Rojo, A.I., Offergeld, A., Feng, G.J., Velasco-Martín, J.P., González-Sancho, J.M., Valverde, Á.M., Dale, T., Regadera, J., and Cuadrado, A. (2015). WNT-3A regulates an Axin1/NRF2 complex that regulates antioxidant metabolism in hepatocytes. Antioxid. Redox Signal. *22*, 555–571.

Ramkumar, K.M., Sekar, T.V., Foygel, K., Elango, B., and Paulmurugan, R. (2013). Reporter protein complementation imaging assay to screen and study Nrf2 activators in cells and living animals. Anal. Chem. *85*, 7542–7549.

Ramos-Gomez, M., Kwak, M.K., Dolan, P.M., Itoh, K., Yamamoto, M., Talalay, P., and Kensler, T.W. (2001). Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *98*, 3410–3415.

Romeu, M., Aranda, N., Giralt, M., Ribot, B., Nogues, M.R., and Arija, V. (2013). Diet, iron biomarkers and oxidative stress in a representative sample of Mediterranean population. Nutr. J. *12*, 102.

Rossi, M.A., and Cecchini, G. (1983). Lipid peroxidation in hepatomas of different degrees of deviation. Cell Biochem. Funct. *1*, 49–54.

Ruef, J., Moser, M., Bode, C., Kübler, W., and Runge, M.S. (2001). 4-hydroxynonenal induces apoptosis, NF-kappaB-activation and formation of 8-isoprostane in vascular smooth muscle cells. Basic Res. Cardiol. *96*, 143–150.

Rusan, N.M., and Peifer, M. (2008). Original CIN: reviewing roles for APC in chromosome instability. J. Cell Biol. *181*, 719–726.

Sadanandam, A., Lyssiotis, C.A., Homicsko, K., Collisson, E.A., Gibb, W.J., Wullschleger, S., Ostos, L.C.G., Lannon, W.A., Grotzinger, C., Del Rio, M., et al. (2013). A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy. Nat. Med. *19*, 619–625.

Sakai, T., and Kuwazuru, S. (1995). A Lipid Peroxidation-derived Aldehyde, 4-Hydroxy-2-nonenal, Contents in Several Fish Meats. Fish. Sci. *61*.

Sakai, T., Kuwazuru, S., Yamauchi, K., and Uchida, K. (1995). A Lipid Peroxidation-derived Aldehyde, 4-Hydroxy-2-nonenal and ω 6 Fatty Acids Contents in Meats. Biosci. Biotechnol. Biochem. *59*, 1379–1380.

Samraj, A.N., Läubli, H., Varki, N., and Varki, A. (2014). Involvement of a non-human sialic Acid in human cancer. Front. Oncol. *4*, 33.

Samraj, A.N., Pearce, O.M.T., Läubli, H., Crittenden, A.N., Bergfeld, A.K., Banda, K., Gregg, C.J., Bingman, A.E., Secrest, P., Diaz, S.L., et al. (2015). A red meat-derived glycan promotes inflammation and cancer progression. Proc. Natl. Acad. Sci. *112*, 542–547.

Santarelli, R.L., Vendeuvre, J.-L., Naud, N., Taché, S., Guéraud, F., Viau, M., Genot, C., Corpet, D.E., and Pierre, F.H.F. (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. Pa *3*, 852–864.

Santarelli, R.L., Naud, N., Taché, S., Guéraud, F., Vendeuvre, J.-L., Zhou, L., Anwar, M.M., Mirvish, S.S., Corpet, D.E., and Pierre, F.H.F. (2013). Calcium inhibits promotion by hot dog of 1,2-dimethylhydrazine-induced mucin-depleted foci in rat colon. Int. J. Cancer J. Int. Cancer *133*, 2533–2541.

Satoh, H., Moriguchi, T., Taguchi, K., Takai, J., Maher, J.M., Suzuki, T., Winnard, P.T., Raman, V., Ebina, M., Nukiwa, T., et al. (2010). Nrf2-deficiency creates a responsive microenvironment for metastasis to the lung. Carcinogenesis *31*, 1833–1843.

Scanlan, P.D., Shanahan, F., Clune, Y., Collins, J.K., O'Sullivan, G.C., O'Riordan, M., Holmes, E., Wang, Y., and Marchesi, J.R. (2008). Culture-independent analysis of the gut microbiota in colorectal cancer and polyposis. Environ. Microbiol. *10*, 789–798.

Schauenstein, E., Esterbauer, H., and Zollner, H. (1977). Aldehydes in biological systems: their natural occurrence and biological activities (London: Pion).

Schaur, R.J. (2003). Basic aspects of the biochemical reactivity of 4-hydroxynonenal. Mol. Aspects Med. *24*, 149–159.

Schaur, R., Siems, W., Bresgen, N., and Eckl, P. (2015). 4-Hydroxy-nonenal—A Bioactive Lipid Peroxidation Product. Biomolecules *5*, 2247–2337.

Schneider, C., Tallman, K.A., Porter, N.A., and Brash, A.R. (2001). Two distinct pathways of formation of 4-hydroxynonenal. Mechanisms of nonenzymatic transformation of the 9- and 13-hydroperoxides of linoleic acid to 4-hydroxyalkenals. J. Biol. Chem. *276*, 20831–20838.

Schneider, C., Porter, N.A., and Brash, A.R. (2008). Routes to 4-Hydroxynonenal: Fundamental Issues in the Mechanisms of Lipid Peroxidation. J. Biol. Chem. *283*, 15539–15543.

Selley, M.L. (1998). (E)-4-hydroxy-2-nonenal may be involved in the pathogenesis of Parkinson's disease. Free Radic. Biol. Med. *25*, 169–174.

Selley, M.L., Bartlett, M.R., McGuiness, J.A., Hapel, A.J., and Ardlie, N.G. (1989). Determination of the lipid peroxidation product trans-4-hydroxy-2-nonenal in biological samples by high-performance liquid chromatography and combined capillary column gas chromatography-negative-ion chemical ionisation mass spectrometry. J. Chromatogr. *488*, 329–340.

Seppanen, C.M., and Csallany, A.S. (2004). Incorporation of the toxic aldehyde 4-hydroxy-2-trans-nonenal into food fried in thermally oxidized soybean oil. J. Am. Oil Chem. Soc. *81*, 1137–1141.

Sesink, A.L., Termont, D.S., Kleibeuker, J.H., and Van der Meer, R. (2001). Red meat and colon cancer: dietary haem-induced colonic cytotoxicity and epithelial hyperproliferation are inhibited by calcium. Carcinogenesis *22*, 1653–1659.

Sevanian, A., and Hochstein, P. (1985). Mechanisms and Consequences of Lipid Peroxidation in Biological Systems. Annu. Rev. Nutr. *5*, 365–390.

Shacter, E., and Weitzman, S.A. (2002). Chronic inflammation and cancer. Oncol. Williston Park N *16*, 217–226, 229-232.

Sharma, S., and O'Keefe, S.J.D. (2007). Environmental influences on the high mortality from colorectal cancer in African Americans. Postgrad. Med. J. *83*, 583–589.

Shearn, C.T., Smathers, R.L., Backos, D.S., Reigan, P., Orlicky, D.J., and Petersen, D.R. (2013). Increased carbonylation of the lipid phosphatase PTEN contributes to Akt2 activation in a murine model of early alcohol-induced steatosis. Free Radic. Biol. Med. *65*, 680–692.

Shibata, T., Kokubu, A., Gotoh, M., Ojima, H., Ohta, T., Yamamoto, M., and Hirohashi, S. (2008a). Genetic alteration of Keap1 confers constitutive Nrf2 activation and resistance to chemotherapy in gallbladder cancer. Gastroenterology *135*, 1358–1368, 1368-4.

Shibata, T., Ohta, T., Tong, K.I., Kokubu, A., Odogawa, R., Tsuta, K., Asamura, H., Yamamoto, M., and Hirohashi, S. (2008b). Cancer related mutations in NRF2 impair its recognition by Keap1-Cul3 E3 ligase and promote malignancy. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *105*, 13568–13573.

Shoeb, M., Ansari, N.H., Srivastava, S.K., and Ramana, K.V. (2014). 4-Hydroxynonenal in the pathogenesis and progression of human diseases. Curr. Med. Chem. *21*, 230–237.

Siems, W., and Grune, T. (2003). Intracellular metabolism of 4-hydroxynonenal. Mol. Aspects Med. *24*, 167–175.

Siems, W.G., Zollner, H., Grune, T., and Esterbauer, H. (1997). Metabolic fate of 4-hydroxynonenal in hepatocytes: 1,4-dihydroxynonene is not the main product. J. Lipid Res. *38*, 612–622.

Sinha, R., Rothman, N., Salmon, C.P., Knize, M.G., Brown, E.D., Swanson, C.A., Rhodes, D., Rossi, S., Felton, J.S., and Levander, O.A. (1998). Heterocyclic amine content in beef cooked by different methods to varying degrees of doneness and gravy made from meat drippings. Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc. *36*, 279–287.

Skog, K.I., Johansson, M.A., and Jägerstad, M.I. (1998). Carcinogenic heterocyclic amines in model systems and cooked foods: a review on formation, occurrence and intake. Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc. *36*, 879–896.

Skrzydlewska, E., Stankiewicz, A., Sulkowska, M., Sulkowski, S., and Kasacka, I. (2001). Antioxidant status and lipid peroxidation in colorectal cancer. J. Toxicol. Environ. Health A *64*, 213–222.

Sporn, M.B., and Liby, K.T. (2012). NRF2 and cancer: the good, the bad and the importance of context. Nat. Rev. Cancer *12*, 564–571.

Stryker, S.J., Wolff, B.G., Culp, C.E., Libbe, S.D., Ilstrup, D.M., and MacCarty, R.L. (1987). Natural history of untreated colonic polyps. Gastroenterology *93*, 1009–1013.

Su, L.K., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Preisinger, A.C., Moser, A.R., Luongo, C., Gould, K.A., and Dove, W.F. (1992). Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the APC gene. Science *256*, 668–670.

Subramaniam, R., Roediger, F., Jordan, B., Mattson, M.P., Keller, J.N., Waeg, G., and Butterfield, D.A. (1997). The lipid peroxidation product, 4-hydroxy-2-trans-nonenal, alters the conformation of cortical synaptosomal membrane proteins. J. Neurochem. *69*, 1161–1169.

Sun, Z., Liu, L., Wang, P.P., Roebothan, B., Zhao, J., Dicks, E., Cotterchio, M., Buehler, S., Campbell, P.T., McLaughlin, J.R., et al. (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.

Surh, J., and Kwon, H. (2005). Estimation of daily exposure to 4-hydroxy-2-alkenals in Korean foods containing n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. Food Addit. Contam. *22*, 701–708.

Surh, J., Lee, S., and Kwon, H. (2007). 4-Hydroxy-2-alkenals in polyunsaturated fatty acids-fortified infant formulas and other commercial food products. Food Addit. Contam. *24*, 1209–1218.

Surya, R., Héliès-Toussaint, C., Martin, O.C., Gauthier, T., Guéraud, F., Taché, S., Naud, N., Jouanin, I., Chantelauze, C., Durand, D., et al. (2016). Red meat and colorectal cancer: Nrf2-dependent antioxidant response contributes to the resistance of preneoplastic colon cells to fecal water of hemoglobin- and beef-fed rats. Carcinogenesis *37*, 635–645.

Suzui, M., Morioka, T., and Yoshimi, N. (2013). Colon preneoplastic lesions in animal models. J. Toxicol. Pathol. *26*, 335–341.

Tabatabaei, S.M., Heyworth, J.S., Knuiman, M.W., and Fritschi, L. (2010). Dietary benzo[a]pyrene intake from meat and the risk of colorectal cancer. Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol. *19*, 3182–3184.

Takayama, T., Katsuki, S., Takahashi, Y., Ohi, M., Nojiri, S., Sakamaki, S., Kato, J., Kogawa, K., Miyake, H., and Niitsu, Y. (1998). Aberrant crypt foci of the colon as precursors of adenoma and cancer. N. Engl. J. Med. *339*, 1277–1284.

Takayama, T., Ohi, M., Hayashi, T., Miyanishi, K., Nobuoka, A., Nakajima, T., Satoh, T., Takimoto, R., Kato, J., Sakamaki, S., et al. (2001). Analysis of K-ras, APC, and beta-catenin in aberrant crypt foci in sporadic adenoma, cancer, and familial adenomatous polyposis. Gastroenterology *121*, 599–611.

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*, 562–564.

Terzić, J., Grivennikov, S., Karin, E., and Karin, M. (2010). Inflammation and colon cancer. Gastroenterology *138*, 2101–2114.e5.

Tibbles, L.A., and Woodgett, J.R. (1999). The stress-activated protein kinase pathways. Cell. Mol. Life Sci. CMLS *55*, 1230–1254.

Tjalkens, R.B., Luckey, S.W., Kroll, D.J., and Petersen, D.R. (1998). Alpha,beta-unsaturated aldehydes increase glutathione S-transferase mRNA and protein: correlation with activation of the antioxidant response element. Arch. Biochem. Biophys. *359*, 42–50.

Tomasetti, C., and Vogelstein, B. (2015). Cancer etiology. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. Science *347*, 78–81.

Torlakovic, E., Skovlund, E., Snover, D.C., Torlakovic, G., and Nesland, J.M. (2003). Morphologic reappraisal of serrated colorectal polyps. Am. J. Surg. Pathol. *27*, 65–81.

Triantafillidis, J.K., Nasioulas, G., and Kosmidis, P.A. (2009). Colorectal cancer and inflammatory bowel disease: epidemiology, risk factors, mechanisms of carcinogenesis and prevention strategies. Anticancer Res. *29*, 2727–2737.

Turesky, R.J. (2007). Formation and biochemistry of carcinogenic heterocyclic aromatic amines in cooked meats. Toxicol. Lett. *168*, 219–227.

Turner, J.R. (2009). Intestinal mucosal barrier function in health and disease. Nat. Rev. Immunol. *9*, 799–809.

Van Hecke, T., Vanden Bussche, J., Vanhaecke, L., Vossen, E., Van Camp, J., and De Smet, S. (2014). 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*, 1980–1988.

Vatsyayan, R., Lelsani, P.C.R., Chaudhary, P., Kumar, S., Awasthi, S., and Awasthi, Y.C. (2012). The expression and function of vascular endothelial growth factor in retinal pigment epithelial (RPE) cells is regulated by 4-hydroxynonenal (HNE) and glutathione S-transferaseA4-4. Biochem. Biophys. Res. Commun. *417*, 346–351.

Venturi, M., Hambly, R.J., Glinghammar, B., Rafter, J.J., and Rowland, I.R. (1997). Genotoxic activity in human faecal water and the role of bile acids: a study using the alkaline comet assay. Carcinogenesis *18*, 2353–2359.

Viau, M., Genot, C., Ribourg, L., and Meynier, A. (2016). Amounts of the reactive aldehydes, malonaldehyde, 4-hydroxy-2-hexenal, and 4-hydroxy-2-nonenal in fresh and oxidized edible oils do not necessary reflect their peroxide and anisidine values: 4-HHE, 4-HNE, and MDA in fresh and oxidized oils. Eur. J. Lipid Sci. Technol. *118*, 435–444.

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

Vogelstein, B., Fearon, E.R., Hamilton, S.R., Kern, S.E., Preisinger, A.C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A.M., and Bos, J.L. (1988). Genetic alterations during colorectal-tumor development. N. Engl. J. Med. *319*, 525–532.

Wacker, M., Wanek, P., and Eder, E. (2001). Detection of 1,N2-propanodeoxyguanosine adducts of trans-4-hydroxy-2-nonenal after gavage of trans-4-hydroxy-2-nonenal or induction of lipid peroxidation with carbon tetrachloride in F344 rats. Chem. Biol. Interact. *137*, 269–283.

Wang, J., Joshi, A.D., Corral, R., Siegmund, K.D., Marchand, L.L., Martinez, M.E., Haile, R.W., Ahnen, D.J., Sandler, R.S., Lance, P., et al. (2012). Carcinogen metabolism genes, red meat and poultry intake, and colorectal cancer risk. Int. J. Cancer *130*, 1898–1907.

WCRF/AICR (2010). WCRF/AICR Systematic Literature Review Continuous Update Project Report - The Associations between Food, Nutrition and Physical Activity and the Risk of Colorectal Cancer.

Winczura, A., Zdżalik, D., and Tudek, B. (2012). Damage of DNA and proteins by major lipid peroxidation products in genome stability. Free Radic. Res. *46*, 442–459.

Windey, K., De Preter, V., and Verbeke, K. (2012). Relevance of protein fermentation to gut health. Mol. Nutr. Food Res. *56*, 184–196.

Wu, K.C., Cui, J.Y., and Klaassen, C.D. (2012). Effect of graded Nrf2 activation on phase-I and -II drug metabolizing enzymes and transporters in mouse liver. PloS One *7*, e39006.

Wu, S., Powers, S., Zhu, W., and Hannun, Y.A. (2015). Substantial contribution of extrinsic risk factors to cancer development. Nature *529*, 43–47.

Yamadori, T., Ishii, Y., Homma, S., Morishima, Y., Kurishima, K., Itoh, K., Yamamoto, M., Minami, Y., Noguchi, M., and Hizawa, N. (2012). Molecular mechanisms for the regulation of Nrf2-mediated cell proliferation in non-small-cell lung cancers. Oncogene *31*, 4768–4777.

Yang, K., Kurihara, N., Fan, K., Newmark, H., Rigas, B., Bancroft, L., Corner, G., Livote, E., Lesser, M., Edelmann, W., et al. (2008). Dietary induction of colonic tumors in a mouse model of sporadic colon cancer. Cancer Res. *68*, 7803–7810.

Yin, H., Xu, L., and Porter, N.A. (2011). Free Radical Lipid Peroxidation: Mechanisms and Analysis. Chem. Rev. *111*, 5944–5972.

Yoshino, K., Matsuura, T., Sano, M., Saito, S.-I., and Tomita, I. (1986). Fluorometric liquid chromatographic determination of aliphatic aldehydes arising from lipid peroxides. Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) *34*, 1694–1700.

You, A., Nam, C.-W., Wakabayashi, N., Yamamoto, M., Kensler, T.W., and Kwak, M.-K. (2011). Transcription factor Nrf2 maintains the basal expression of Mdm2: An implication of the regulation of p53 signaling by Nrf2. Arch. Biochem. Biophys. *507*, 356–364.

Yu, M.K., Moos, P.J., Cassidy, P., Wade, M., and Fitzpatrick, F.A. (2004). Conditional expression of 15-lipoxygenase-1 inhibits the selenoenzyme thioredoxin reductase: modulation of selenoproteins by lipoxygenase enzymes. J. Biol. Chem. *279*, 28028–28035.

Zarate, R., Boni, V., Bandres, E., and Garcia-Foncillas, J. (2012). MiRNAs and LincRNAs: Could they be considered as biomarkers in colorectal cancer? Int. J. Mol. Sci. *13*, 840–865.

Zarkovic, N. (2003). 4-Hydroxynonenal as a bioactive marker of pathophysiological processes. Mol. Aspects Med. *24*, 281–291.

Zhang, H., Court, N., and Forman, H.J. (2007). Submicromolar concentrations of 4-hydroxynonenal induce glutamate cysteine ligase expression in HBE1 cells. Redox Rep *12*, 101–106.

Zheng, W., and Lee, S.-A. (2009). Well-Done Meat Intake, Heterocyclic Amine Exposure, and Cancer Risk. Nutr. Cancer *61*, 437–446.

Zheng, Y., Kramer, P.M., Lubet, R.A., Steele, V.E., Kelloff, G.J., and Pereira, M.A. (1999). Effect of retinoids on AOM-induced colon cancer in rats: modulation of cell proliferation, apoptosis and aberrant crypt foci. Carcinogenesis *20*, 255–260.

Zhong, X., Fang, Y.-J., Pan, Z.-Z., Li, B., Wang, L., Zheng, M.-C., Chen, Y.-M., and Zhang, C.-X. (2013). Dietary fat, fatty acid intakes and colorectal cancer risk in Chinese adults: a case-control study. Eur. J. Cancer Prev. Off. J. Eur. Cancer Prev. Organ. ECP *22*, 438–447.

Zhu, Q., Gao, R., Wu, W., and Qin, H. (2013). The role of gut microbiota in the pathogenesis of colorectal cancer. Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med. *34*, 1285–1300.

de Zwart, L.L., Hermanns, R.C., Meerman, J.H., Commandeur, J.N., and Vermeulen, N.P. (1996). Disposition in rat of [2-3H]-trans-4-hydroxy-2,3-nonenal, a product of lipid peroxidation. Xenobiotica Fate Foreign Compd. Biol. Syst. *26*, 1087–1100.