



## Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : <http://oatao.univ-toulouse.fr/>  
Eprints ID : 17365

**To cite this version :**

Sarniguet, Camille. *Étude de l'effet co-initiateur du fer héminique et du 4-hydroxynonénal, un produit d'oxydation des lipides insaturés, sur la cancérogenèse colorectale chez le rat : dénombrement des foyers de cryptes aberrantes*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2016, 118 p.

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: [staff-oatao@listes-diff.inp-toulouse.fr](mailto:staff-oatao@listes-diff.inp-toulouse.fr)

# ETUDE DE L'EFFET CO-INITIATEUR DU FER HÉMINIQUE ET DU 4-HYDROXYNONÉNAL, UN PRODUIT D'OXYDATION DES LIPIDES INSATURES, SUR LA CANCÉROGENÈSE COLORECTALE CHEZ LE RAT : DÉNOMBREMENT DES FOYERS DE CRYPTES ABERRANTES

---

THESE  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement  
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

*par*

**SARNIGUET Camille**

Née, le 26/12/1991 à FONTAINEBLEAU (77)

---

**Directeur de thèse : Mme Nathalie PRIYMENKO**

---

## JURY

PRESIDENT :

**M. Claude MOULIS**

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

**Mme Nathalie PRIYMENKO**

**Mme Nathalie BOURGES-ABELLA**

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE



*Répartition des Enseignants-Chercheurs par Département.*

Mise à jour : 06/09/2016

**DIRECTRICE : ISABELLE CHMITELIN**

ELEVAGE ET PRODUITS/SANTÉ PUBLIQUE VÉTÉRINAIRE	SCIENCES BIOLOGIQUES ET FONCTIONNELLES	SCIENCES CLINIQUES DES ANIMAUX DE COMPAGNIE, DE SPORT ET DE LOISIRS
<p><b>Responsable : M. SANS</b></p> <p><u>ALIMENTATION ANIMALE :</u> M. ENJALBERT Francis, PR Mme PRIYMENKO Nathalie, MC Mme MEYNADIER Annabelle, MC</p> <p><u>EPIDEMIOLOGIE :</u> Mme Mathilde PAUL, MC</p> <p><u>MALADIES REGLEMENTEES-ZOONOSES-MEDECINE PREVENTIVE DES CARNIVORES DOMESTIQUES-DROIT VETERINAIRE :</u> M. PICAUVET Dominique, PR</p> <p><u>PARASITOLOGIE-ZOOLOGIE :</u> M. FRANC Michel, PR M. JACQUIET Philippe, PR M. LIENARD Emmanuel, MC Mme BOUHSIRA Emilie, MC</p> <p><u>HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS :</u> M. BRUGERE Hubert, PR M. BAILLY Jean-Denis, PR Mme BIBBAL Delphine, MC Mme COSTES Laura, AERC Mme DAVID Laure, MCC</p> <p><u>PATHOLOGIE DE LA REPRODUCTION :</u> M. BERTHELOT Xavier, PR M. BERGONIER Dominique, MC Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, PR Mme HAGEN-PICARD Nicole, PR M. NOUVEL Laurent-Xavier, MC Mme MILA Hanna, MC</p> <p><u>PATHOLOGIE DES RUMINANTS :</u> M. SCHELCHER François, PR M. FOUCRAS Gilles, PR M. CORBIERE Fabien, MC M. MAILLARD Renaud, MC M. MEYER Gilles, PR</p> <p><u>PRODUCTION ET PATHOLOGIE AVIAIRE ET PORCINE :</u> Mme WARET-SZKUTA Agnès, MC M. JOUGLAR Jean-Yves, MC M. GUERIN Jean-Luc, PR M. LE LOC'H Guillaume, MC</p> <p><u>PRODUCTIONS ANIMALES AMELIORATION GENETIQUE ECONOMIE :</u> M. DUCOS Alain, PR M. SANS Pierre, PR M. RABOISSON Didier, MC</p>	<p><b>Responsable : Mme GAYRARD</b></p> <p><u>ANATOMIE :</u> M. MOGICATO Giovanni, MC M. LIGNEREUX Yves, PR Mme DEVIERS Alexandra, MC</p> <p><u>ANATOMIE PATHOLOGIQUE - HISTOLOGIE :</u> M. DELVERDIER Maxence, PR Mme LETRON-RAYMOND Isabelle, MC Mme BOURGES-ABELLA Nathalie, PR Mme LACROUX Caroline, PR</p> <p><u>BIOLOGIE MOLECULAIRE :</u> Mme BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle, MC</p> <p><u>MICROBIOLOGIE – IMMUNOLOGIE - MALADIES INFECTIEUSES :</u> M. MILON Alain, PR M. BERTAGNOLI Stéphane, PR M. VOLMER Romain, MC Mme BOULLIER Séverine, MC Mme DANIELS Héléne, MC</p> <p><u>BIOSTATISTIQUES :</u> M. CONCORDET Didier, PR M. LYAZRHI Faouzi, MC</p> <p><u>PHARMACIE-TOXICOLOGIE :</u> M. PETIT Claude, PR Mme CLAUW Martine, PR M. GUERRE Philippe, PR M. JAEG Philippe, MC</p> <p><u>PHYSIOLOGIE –PHARMACOLOGIE THERAPEUTIQUE :</u> M. BOUSQUET-MELOU Alain, PR Mme GAYRARD-TROY Véronique, PR Mme FERRAN Aude, MC M. LEFEBVRE Hervé, PR</p> <p><u>BIOCHIMIE :</u> Mme BENNIS-BRET Lydie, MC</p> <p><u>ANGLAIS :</u> M. SEVERAC Benoît, PLPA Mme MICHAUD Françoise, PCEA</p>	<p><b>Responsable : Mme CADIERGUES</b></p> <p><u>ANESTHESIOLOGIE</u> M. VERWAERDE Patrick, MC</p> <p><u>CHIRURGIE :</u> M. AUTEFAGE André, PR M. ASIMUS Erik, MC M. MATHON Didier, MC Mme MEYNAUD-COLLARD Patricia, MC Mme PALIERNE Sophie, MC</p> <p><u>MEDECINE INTERNE :</u> Mme DIQUELOU Armelle, MC M. DOSSIN Olivier, MC Mme LAVOUE Rachel, MC Mme GAILLARD-THOMAS Elodie, MCC</p> <p><u>OPHTALMOLOGIE :</u> M. DOUET Jean-Yves, MC</p> <p><u>DERMATOLOGIE :</u> Mme CADIERGUES Marie-Christine, PR</p> <p><u>IMAGERIE MEDICALE</u> M. CONCHOU Fabrice, MC</p> <p><u>BIOLOGIE MOLECULAIRE :</u> Mme TRUMEL Catherine, PR</p> <p><u>PATHOLOGIE DES EQUIDES :</u> M. CUEVAS RAMOS Gabriel, MC Mme PRADIER Sophie, MC Mme LALLEMAND Elodie, AERC</p>



# REMERCIEMENTS

Aux membres du jury de thèse,

**Monsieur le Professeur Claude MOULIS**

Professeur des Universités,  
Praticien hospitalier,  
*Biodiversité végétale et substances naturelles,*

Qui m'a fait l'honneur de présider la soutenance de ma thèse d'exercice vétérinaire.

*Hommages respectueux.*

**Madame le Docteur Nathalie PRIYMENKO**

Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,  
*Alimentation,*

Pour son encadrement et son aide à la réalisation de ma thèse.

*Veillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.*

**Madame la Professeure Nathalie BOURGES-ABELLA**

Professeure de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,  
*Histologie, Anatomie pathologique,*

Qui a aimablement accepté de faire partie du jury de thèse.

*Sincères remerciements.*

**A l'équipe de l'INRA Toxalim,**

Un grand merci à tous pour votre accueil et votre gentillesse. Une pensée particulière au Dr GUERAUD Françoise et à Julia KELLER qui m'ont incluse dans ce projet ainsi qu'accompagnée et aidée dans toutes les étapes de cette thèse.

# TABLE DES MATIERES

<b>TABLE DES MATIERES.....</b>	<b>1</b>
<b>LISTE DES ANNEXES.....</b>	<b>4</b>
<b>LISTE DES ILLUSTRATIONS.....</b>	<b>5</b>
Liste des figures.....	5
Liste des tableaux.....	6
<b>LISTE DES ABREVIATIONS.....</b>	<b>8</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>10</b>
<b>1<sup>ère</sup> PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>11</b>
<b>I. LE CANCER COLORECTAL CHEZ L'HOMME.....</b>	<b>12</b>
1. Incidence et mortalité.....	12
1) Le cancer colorectal dans le monde.....	12
2) Le cancer colorectal en France.....	14
2. Symptômes cliniques.....	15
3. Pathogénie.....	15
1) Lésions du tissu sain au carcinome.....	15
2) Anomalies génétiques.....	17
4. Différentes circonstances d'apparition.....	23
1) Apparition de type sporadique.....	23
2) Apparition de plusieurs cas dans la même famille.....	24
3) Maladies inflammatoires chroniques.....	27
5. Facteurs de risque.....	28
1) Antécédents médicaux familiaux et personnels.....	28
2) Mode de vie.....	28
3) Taux de survie.....	30
4) Recommandations.....	30
<b>II. CANCEROGENESE COLORECTALE, VIANDES ROUGES ET CHARCUTERIES : HYPOTHESES MECANISTIQUES ET BILAN DES CONNAISSANCES.....</b>	<b>32</b>
1. Promotion de la cancérogénèse colorectale par la viande rouge et/ou transformée.....	32
1) La viande rouge et effet de l'hème.....	32

2) Les viandes transformées.....	33
2. L'hème et le fer héminique .....	34
1) Généralités.....	34
2) Forme et quantité d'hème dans les différentes viandes.....	35
3) Fer héminique, digestion et absorption.....	37
4) Mécanismes d'action .....	38
3. Les amines hétérocycliques et hydrocarbures aromatiques polycycliques .....	50
4. Les graisses .....	51
5. Les protéines .....	52
6. Les molécules protectrices .....	52
1) Calcium .....	52
2) Chlorophylle .....	53
3) Antioxydants.....	54
7. Bilan.....	55
<b>III. ANATOMIE, HISTOLOGIE COLIQUE ET LESIONS PRE-NEOPLASIQUES.....</b>	<b>57</b>
1. Anatomie du côlon chez l'Homme .....	57
1) Morphologie externe .....	57
2) Vascularisation et innervation .....	58
2. Histologie du côlon .....	59
1) La muqueuse.....	60
2) La sous-muqueuse.....	61
3) La musculuse.....	61
4) La séreuse .....	61
3. Particularités du rectum.....	63
4. Rôle physiologique du côlon .....	64
5. Envahissement des différentes couches histologiques du côlon par un processus tumoral et dissémination dans l'organisme .....	64
6. Les lésions pré-néoplasiques.....	65
1) Différentes lésions pré-néoplasiques .....	65
2) Les foyers de cryptes aberrantes.....	67

3) Les foyers appauvris en mucines, les cryptes accumulant la $\beta$ -caténine et les foyers de cryptes aberrantes plats.....	73
<b>2<sup>ème</sup> PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE .....</b>	<b>76</b>
<b>I. PROTOCOLE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>77</b>
1. Choix du modèle animal.....	77
1) Modèle choisi : Rats chimio induits .....	77
2) Modèles génétiques possibles .....	79
2. Etudes préliminaires.....	79
1) Exposition colique au 4-HNE.....	79
2) Choix des doses de 4-HNE.....	80
3) Choix des doses de fer.....	80
4) Etude préliminaire « génotoxicité » de l'hème et du 4-HNE sur court terme.	81
3. Protocole de l'étude long terme « co-initiation ».....	81
1) Animaux .....	81
2) Groupes expérimentaux.....	81
3) Mesures et récoltes .....	83
4) Finalités de l'étude <i>in vivo</i> « co-initiation ».....	83
4. Coloration des ACF et méthode de comptage.....	84
1) Protocole de coloration .....	85
2) Lecture des foyers de cryptes aberrantes.....	86
3) Expression des résultats .....	89
4) Intervenants .....	89
<b>II. RESULTATS.....</b>	<b>90</b>
1. Résultats du dénombrement et de la taille des ACF de l'étude « co-initiation » avec l'AOM .....	90
1) Méthode d'analyse.....	90
2) Résultats : effet du 4-HNE sur les foyers de cryptes aberrantes.....	90
3) Résultats : effet du fer héminique sur les foyers de cryptes aberrantes.....	92

4) Résultats : effet du 4-HNE et du fer héminique sur le nombre et la taille des tumeurs.....	93
5) Remarques .....	94
2. Conclusions : lésions pré-néoplasiques ACF de l'étude « co-initiation » .....	94
3. Autres résultats de l'étude « co-initiation » et de l'étude préliminaire « génotoxicité ».....	95
1) Résultats du groupe « 4-HNE ».....	95
2) Résultats du groupe « fer héminique ».....	97
3) Autres résultats .....	98
<b>III. DISCUSSION .....</b>	<b>99</b>
1. Effet du fer héminique sur l'initiation de la cancérogenèse colorectale .....	99
2. Effet du 4-HNE sur l'initiation de la cancérogenèse colorectale.....	102
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>105</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>106</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>116</b>

## **LISTE DES ANNEXES**

<b>Annexe 1</b> : Exemple d'une fiche utilisée pour le dénombrement selon la taille des ACF et des tumeurs sur un côlon de rat .....	116
<b>Annexe 2</b> : Tableau récapitulatif du dénombrement et la taille des ACF et des tumeurs pour les 100 côlons de rats étudiés.....	117

# LISTE DES ILLUSTRATIONS

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Incidence et mortalité du cancer colorectal chez l'homme et la femme dans le monde en 2012. ....	13
<b>Figure 2</b> : Evolution de l'incidence du cancer colorectal chez l'homme (A) et la femme (B) de 1975 à 2010. ....	14
<b>Figure 3</b> : Modèle génétique du cancer colorectal. ....	17
<b>Figure 4</b> : Régulation de la fonction des $\beta$ -caténines par la protéine Apc et la voie Wnt. ....	21
<b>Figure 5</b> : Effets relatifs des mutations germinales sur l'initiation et la progression des tumeurs. ....	23
<b>Figure 6</b> : Muqueuse colique d'un homme de 24 ans atteint d'adénomatose polypeuse familiale après colectomie totale. ....	24
<b>Figure 7</b> : Structure de l'hème (A), de l'hème nitrosylé (B) et de l'oxyhémoglobine (C). ....	35
<b>Figure 8</b> : Structure de l'hémoglobine. ....	36
<b>Figure 9</b> : Peroxydation lipidique d'acides gras polyinsaturés issus de l'alimentation ou d'origine endogène. ....	40
<b>Figure 10</b> : Formation d'adduits sur les protéines en présence de 4-hydroxynonanal... ....	46
<b>Figure 11</b> : Formules topologiques des composés N-nitrosés. ....	47
<b>Figure 12</b> : Formules topologiques du 2-amino-1-méthyl-6-phénylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) et du benzo[a]pyrène (BaP). ....	50
<b>Figure 13</b> : Schéma représentant les effets catalytiques de l'hème sur la formation de composés N-nitrosés, la peroxydation lipidique et leur inhibition ainsi que les conséquences sur le développement du cancer colorectal. ....	56
<b>Figure 14</b> : Morphologie externe du côlon. ....	58
<b>Figure 15</b> : Structure de la paroi digestive. ....	59
<b>Figure 16</b> : Histologie de la muqueuse colique. ....	60
<b>Figure 17</b> : Observation des différentes structures histologiques du côlon de rat en coupe transversale, au microscope optique x 400 après coloration à l'Hémalun Eosine. ....	62
<b>Figure 18</b> : Observation des différentes cellules de la muqueuse colique et d'amas de cellules lymphoïdes dans la sous muqueuse colique sur une coupe transversale côlon de rat au microscope optique x 400 après coloration à l'Hémalun Eosine. ....	62
<b>Figure 19</b> : Histologie du rectum et du canal anal. ....	63
<b>Figure 20</b> : Stades TNM (Tumeur-Nœud lymphatique-Métastase) du cancer colorectal et histologie du côlon. ....	65
<b>Figure 21</b> : Les lésions pré-néoplasiques. ....	66
<b>Figure 22</b> : Les différentes lésions néoplasiques après coloration. ....	67
<b>Figure 23</b> : Cryptes intestinales colorées à l'HID-AB puis à l'HE montrant la perte en mucine des ACF dysplasiques. ....	70
<b>Figure 24</b> : Coupes histologiques d'ACF légèrement et moyennement dysplasiques. ....	71
<b>Figure 25</b> : Coupes histologiques d'ACF sévèrement dysplasiques. ....	72
<b>Figure 26</b> : MDF colorés à l'HID-AB. ....	74
<b>Figure 27</b> : ACF observés au microscope électronique de souris Min/+ après traitement à l'AOM. ....	75
<b>Figure 28</b> : Protocole, régimes expérimentaux. ....	82

<b>Figure 29</b> : Photographies de muqueuses coliques avant et après coloration. ....	85
<b>Figure 30</b> : Muqueuses coliques normales observées au microscope optique (A) x100, (B) et (C) x 40 après coloration au bleu de méthylène. ....	87
<b>Figure 31</b> : ACF observés au microscope optique x100 après coloration au bleu de méthylène. ....	88
<b>Figure 32</b> : (H) Tumeur colique de 3mm de diamètre observée au microscope optique x40 (visible aussi à l'œil nu) après coloration au bleu de méthylène. ....	88
<b>Figure 33</b> : Tableau récapitulatif du nombre, la taille des ACF ainsi que les tumeurs par côlon. ....	89
<b>Figure 34</b> : Nombre total d'ACF et nombre total de cryptes aberrantes après 2 semaines de régimes expérimentaux suivies d'une chimio-induction et de 60 jours de régime témoin chez le rat. ....	91
<b>Figure 35</b> : Taille des ACF et nombre d'ACF de plus de 3, 5 et 7 cryptes/ACF après 2 semaines de régimes expérimentaux suivies d'une chimio-induction et de 60 jours de régime témoin chez le rat. ....	91
<b>Figure 36</b> : Nombre total d'ACF et nombre total de cryptes aberrantes après 2 semaines de régimes expérimentaux suivies d'une chimio-induction et de 60 jours de régime témoin chez le rat. ....	92
<b>Figure 37</b> : Taille des ACF et nombre d'ACF de plus de 3, 5 et 7 cryptes/ACF après 2 semaines de régimes expérimentaux suivies d'une chimio-induction et de 60 jours de régime témoin chez le rat. ....	93
<b>Figure 38</b> : Nombre de tumeurs observées après 2 semaines de régimes expérimentaux suivies d'une chimio-induction et de 60 jours de régime témoin chez le rat. ....	93
<b>Figure 39</b> : Nombre et taille des tumeurs observées après 2 semaines de régimes expérimentaux suivies d'une chimio-induction et de 60 jours de régime témoin chez le rat. ....	94
<b>Figure 40</b> : Teneur en 4-HNE des eaux fécales (A), DHNA-MA urinaire (B) et TBARS des eaux fécales (C) après 2 semaines de régimes expérimentaux chez le rat. ....	95
<b>Figure 41</b> : Induction de $\gamma$ H2AX <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> lors des études de « co-initiation » et préliminaire de « génotoxicité » sur le groupe « 4-HNE ». ....	96
<b>Figure 42</b> : Teneur en 4-HNE dans les eaux fécales (A), DHNA-MA urinaire (B) et TBARS dans les eaux fécales (C) après 2 semaines de régimes expérimentaux chez le rat. ....	97
<b>Figure 43</b> : Induction de $\gamma$ H2Ax <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> lors des études de « co-initiation » et préliminaire de « génotoxicité » sur le groupe « fer ». ....	98

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Bilan des cancers colorectaux familiaux. ....	26
<b>Tableau 2</b> : Niveau de risque d'apparition du cancer colorectal en fonction de l'âge et des antécédents médicaux. ....	28
<b>Tableau 3</b> : Taux de survie à 5 ans basé sur la classification TNM (Tumeur- Nœud lymphatique- Métastase) en l'absence de traitement. ....	30
<b>Tableau 4</b> : Teneur en fer héminique de différentes viandes et charcuteries. ....	37
<b>Tableau 5</b> : Quantité de 4-hydroxynonanal dans différents aliments. ....	42
<b>Tableau 6</b> : Caractéristiques générales et histologiques des ACF chez les rongeurs. ....	69

<b>Tableau 7</b> : Avantages et inconvénients des principaux modèles de cancérogenèse colorectale.....	77
<b>Tableau 8</b> : Doses de 4-HNE testées et équivalence dans l'alimentation.....	80
<b>Tableau 9</b> : Constitution des régimes des différents groupes expérimentaux. ....	83

## LISTE DES ABREVIATIONS

**ACF** : « Aberrant crypt foci » ou foyer de cryptes aberrantes

**AGPI** : Acides gras polyinsaturés

**AOM** : Azoxyméthane

**APC** : « Adenomatous polyposis coli » ou Polypose adénomateuse colique

**BaP** : Benzo[a]pyrène

**BCAC** : « Beta-catenin-accumulated crypts » ou Cryptes accumulant la  $\beta$ -caténine

**BM** : Bleu de méthylène

**CRC** : Cancer colorectal

**DHN-MA** : 1,4-Dihydroxynonane mercapturic acid

**DMH** : Diméthylhydrazine

**DL 50** : Dose létale 50

**GI** : Gros intestin

**HB** : Hémoglobine

**HCA** : « Heterocyclic Amines » ou Amines hétérocycliques

**HEM** : Hémine

**HID-AB** : « High-iron diamine alcian blue »

**HNPCC** : Cancer du côlon héréditaire sans polypose

**MDA** : Malondialdéhyde

**MDF** : « Mucin depleted foci » ou Foyer appauvri en mucines

**MMR** : « Mismatch repair » ou Réparation des mésappariements

**MSI** : Instabilité des microsattellites

**NOAEL** : « No observable adverse effect level » ou Dose maximale sans effet néfaste observable

**NOCs** : Composés *N*-nitrosés

**PAF** : Polypose adénomateuse familiale

**PHA** : « Polycyclic aromatic hydrocarbons » ou Hydrocarbures aromatiques polycycliques

**PhIP** : 2-amino-1-méthyl-6-phénylimidazo[4,5-*b*]pyridine

**ROS** : « Reactive oxygen species » ou Espèces réactives à l'oxygène

**TBARS** : « Thiobarbituric acid reactive substances » ou Substances réagissant à l'acide thiobarbiturique

**TFC** : Témoin fer citraté

**TSF** : Témoin sans fer

**4-HNE** : 4-hydroxynonéanal

**4-HHE** : 4-hydroxyhexéanal

## INTRODUCTION

Il existe un lien épidémiologique entre le cancer colorectal et la consommation de viande rouge et/ou de viandes transformées. Des études ont déjà montré le rôle central du fer héminique contenu en grande quantité dans ces viandes, dans la promotion de la cancérogenèse colorectale. En effet, il a été expérimentalement démontré que le fer héminique augmente l'incidence des lésions pré-néoplasiques dans des modèles animaux. De plus, l'hème catalyse des réactions de peroxydation lipidique, formant des produits secondaires dont l'un des principaux est un aldéhyde, le 4-hydroxynonéal (4-HNE), qui est cytotoxique et génotoxique *in vitro*. Le rôle promoteur de la cancérogenèse colorectale du fer héminique pourrait donc être en partie dû au 4-HNE.

Ma thèse a pour but de déterminer si le fer héminique et le 4-HNE peuvent initier la cancérogenèse colorectale grâce au dénombrement des lésions pré-néoplasiques de type foyers de cryptes aberrantes (ACF). Mon travail s'inscrit dans le projet de thèse universitaire de Julia KELLER qui étudie le métabolisme et le rôle du 4-HNE dans l'inflammation et la cancérogenèse colorectale. Sa thèse fait partie du projet de recherche NeoMeaTox financé par l'INSERM et le Plan Cancer et Environnement. Le but du projet NeoMeaTox est de déterminer sur deux modèles d'animaux de cancer colorectal le rôle individuel et synergique des produits de peroxydation lipidique, des amines hétérocycliques et des hydrocarbures aromatiques polycycliques, en étudiant respectivement le 4-HNE, la 2-amino-1-méthyl-6-phénylimidazo[4,5-b]pyridine (PhiP) et le Benzo[*a*]pyrène (BaP), donnés dans des concentrations correspondant à l'exposition dans l'alimentation humaine.

La première partie de mon travail est une étude bibliographique présentant l'épidémiologie, la pathogénie et les causes du cancer colorectal. Après un rappel de l'anatomie et de l'histologie normales du côlon, nous verrons les modifications histologiques coliques associées à la cancérogenèse colorectale en décrivant les différentes lésions pré-néoplasiques. La deuxième partie présente l'étude expérimentale étudiant le rôle du fer héminique, sous forme d'hémine et d'hémoglobine, et du 4-HNE dans l'initiation de la cancérogenèse colorectale.

# **1<sup>ère</sup> PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

# I. LE CANCER COLORECTAL CHEZ L'HOMME

Dans cette 1<sup>ère</sup> partie, nous aborderons dans un premier temps l'épidémiologie du cancer colorectal (CRC) dans le monde et en France. Nous verrons ensuite les symptômes cliniques, la pathogénie et les circonstances d'apparition du CRC chez l'Homme. Enfin, nous détaillerons les facteurs de risque associés à ce cancer ainsi que les recommandations proposées pour diminuer le risque de développer un CRC.

## 1. Incidence et mortalité

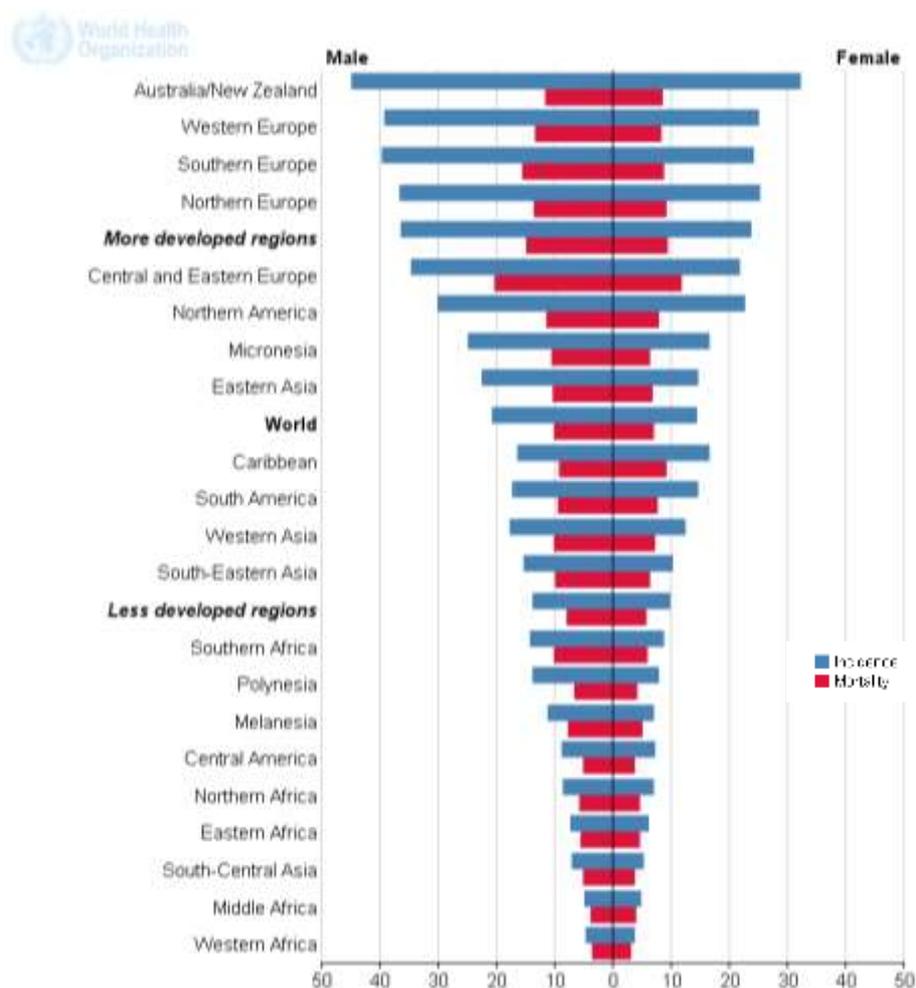
### 1) Le cancer colorectal dans le monde

D'après le **World Cancer Report (2014)**, le CRC représentait 10% de l'incidence des cancers dans le monde en 2012. Chez l'homme, il est le 3<sup>ème</sup> cancer le plus commun (avec 746 000 cas rapportés soit 10% du total des cancers), derrière le cancer de la prostate et des poumons en 2<sup>ème</sup> et 1<sup>ère</sup> positions respectivement. Chez la femme, il est le 2<sup>ème</sup> cancer le plus commun (avec 614 000 cas soit 9,2% du total des cancers), derrière le cancer du sein. Il est la 4<sup>ème</sup> cause de mortalité consécutive à un cancer dans le monde.

Environ 55% des cas de CRC se produisent dans les pays les plus développés. On constate une grande variabilité d'incidence en fonction des pays. Les pays les plus riches comme l'Australie, la Nouvelle-Zélande, l'Europe et l'Amérique du Nord ont l'incidence du CRC la plus élevée, avec en tête l'Australie et la Nouvelle-Zélande (44,8 cas/100 000 individus chez l'homme et 32,2 cas/100 000 individus chez la femme). Les pays ayant l'incidence la plus basse sont les moins développés, avec les pays d'Afrique, d'Asie du Sud, d'Amérique Centrale et certains pays d'Amérique du Sud, la plus faible incidence se trouvant en Afrique de l'Ouest (avec 4,5 cas/100 000 individus chez l'homme et 3,8 cas/100 000 individus chez la femme). A l'échelle mondiale, les femmes sont moins touchées que les hommes (**Globocan, 2012**).

La mortalité causée par le CRC est plus élevée dans les pays développés avec en tête l'Europe Centrale et de l'Est (avec 20,3 morts/100 000 individus chez l'homme et 11,7 morts/100 000 individus chez la femme), contrairement à l'Afrique de l'Ouest (avec 4,5

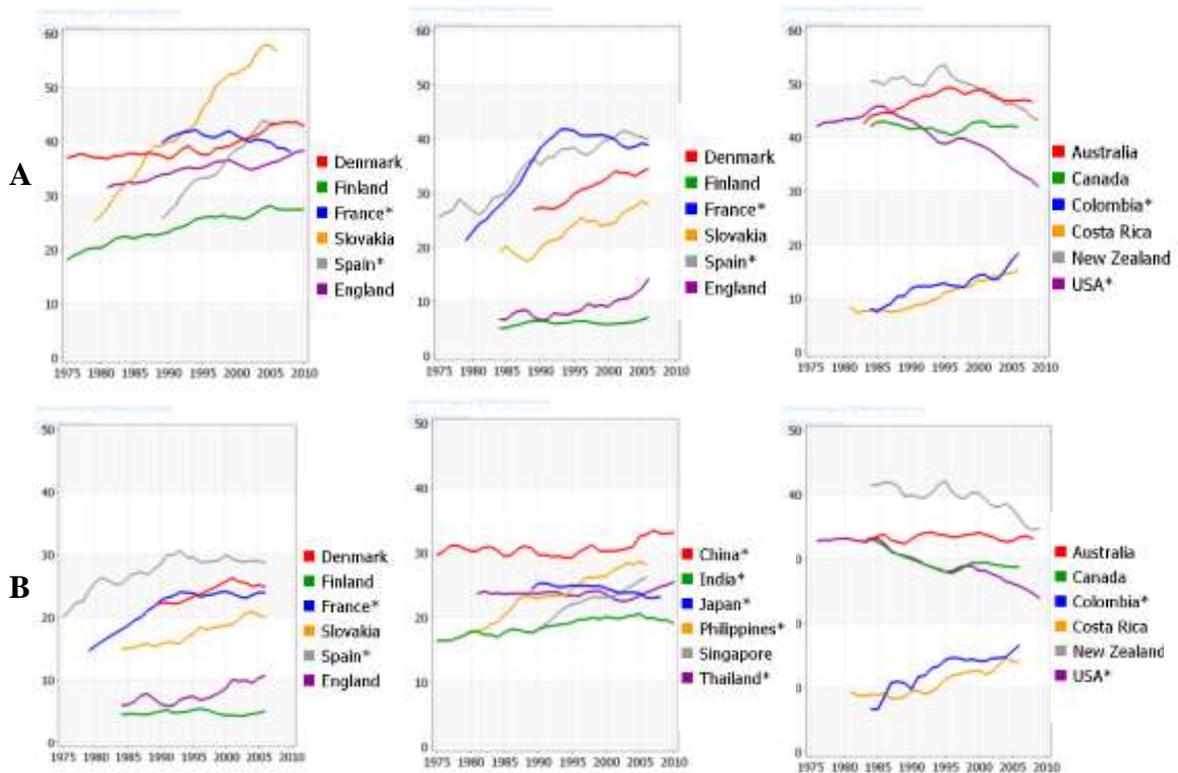
morts/100 000 individus chez l'homme et 3,8 morts/100 000 individus chez la femme) (**Figure 1**). Cependant, même si moins de personnes meurent du CRC dans les pays peu développés, la létalité y est plus importante avec 52% (**Globocan, 2012**).



**Figure 1 : Incidence et mortalité du cancer colorectal chez l'homme et la femme dans le monde en 2012**

Taux estimés pour 100 000 (standardisé sur l'âge).  
Globocan, 2012.

Depuis les 25 dernières années, l'incidence du CRC dans le monde a évolué dans le même sens chez l'homme et la femme. Les pays les plus développés ont une incidence variable. L'incidence est plutôt stable en Australie et en Europe (sauf en Slovaquie et en Espagne), diminue aux Etats Unis et en Nouvelle Zélande et augmente dans les pays les plus riches d'Asie (Japon, Chine, Singapour). Elle reste plus élevée que les pays moins développés, bien que pour ces derniers, l'incidence augmente continuellement depuis 1975 (Philippines, Thaïlande, Colombie, Costa Rica, Slovaquie) (**Figure 2**).



**Figure 2 : Evolution de l'incidence du cancer colorectal chez l'homme (A) et la femme (B) de 1975 à 2010**  
 Taux estimés pour 100 000 (standardisé sur l'âge).  
 Globocan, 2012.

## 2) Le cancer colorectal en France

D'après le rapport de la **Haute autorité de santé (2013)**, le cancer CRC a compté 40 500 nouveaux cas en 2011 en France, soit 110 cas par jour (21 500 cas chez l'homme et 19 000 cas chez la femme). Il se place chez l'homme à la 3<sup>ème</sup> place derrière le cancer de la prostate (71 000 nouveaux cas) et des poumons (27 500 nouveaux cas) en 2<sup>ème</sup> et 1<sup>ère</sup> positions respectivement. Chez la femme, il se place à la 2<sup>ème</sup> place derrière le cancer du sein (avec 53 000 nouveaux cas) et devant le cancer des poumons (12 000 nouveaux cas). En 25 ans, de 1980 à 2005, l'incidence a légèrement augmenté de 0,5%/an chez l'homme, de 0,3%/an chez la femme, puis s'est stabilisée à 37,7 cas/100 000 individus chez l'homme et 24,5 cas/100 000 individus chez la femme.

Le CRC est la 2<sup>ème</sup> cause de mortalité sur l'ensemble des cancers, et devient la 1<sup>ère</sup> cause au-delà de 85 ans. En 2011, 9 200 hommes et 8 300 femmes sont décédés suite à un CRC. Depuis 20 ans, la létalité diminue de 23% chez l'homme (de 18,6 à 14,4

morts/100 000 individus) et de 25% chez la femme (de 11 à 8,3 morts/100 000 individus).

L'incidence du CRC augmente avec l'âge, il est en moyenne diagnostiqué à 69,5 ans chez l'homme et 72,8 ans chez la femme. L'âge médian au décès est de 75 ans chez l'homme et 80 ans chez la femme.

## **2. Symptômes cliniques**

Dans la majorité des cas, le CRC se développe sans apparition de symptôme avant-coureur. Cependant, des signes cliniques et/ou fonctionnels peuvent constituer des signes d'appels, c'est le cas de la présence de troubles digestifs comme une modification du transit intestinal (diarrhée et/ou constipation en alternance) ne répondant pas aux traitements symptomatiques, d'une occlusion intestinale, de rectorragies (sang en nature dans les selles) et/ou méléna (sang digéré dans les selles). Une douleur digestive comme un syndrome rectal avec ténesme et/ou épreintes ainsi que des douleurs abdominales doivent laisser suspecter un CRC. D'autres symptômes généraux peuvent y être aussi associés, c'est le cas notamment d'un amaigrissement inexplicable, d'une anémie ferriprive sans autre étiologie (liée aux pertes sanguines chroniques des tumeurs colorectales), de la présence d'une ou plusieurs masses abdominales (**Astin *et al.*, 2011**).

## **3. Pathogénie**

La cancérogenèse colorectale fait intervenir une succession d'anomalies morphologiques et fonctionnelles des cellules du côlon qui ont pour origine des anomalies génétiques somatiques ou germinales.

### **1) Lésions du tissu sain au carcinome**

L'épithélium colique se renouvelle constamment selon un équilibre régulé entre prolifération et différenciation cellulaire. Cependant, des défauts dans la régulation de ces mécanismes conduisent à l'accumulation d'anomalies pouvant aboutir à un CRC.

Du tissu sain au carcinome, on décrit des lésions de différents stades. Il y a d'abord formation de lésions pré-néoplasiques, puis de polypes et d'adénomes pouvant évoluer en adénocarcinomes et métastaser.

Les lésions pré-néoplasiques constituent la première anomalie décelable. Les lésions les plus étudiées sont les foyers de cryptes aberrantes (ACF) et les foyers appauvris en mucine (MDF) **(Suzui et al., 2013)**.

Un polype est une excroissance faisant saillie sur la muqueuse intestinale, ayant une forme pédonculée, sessile ou plate. Il existe différents types de polypes bénins : les polypes hyperplasiques, adénomateux, inflammatoires ou lymphoïdes. Les polypes hyperplasiques sont les plus fréquents, et ils sont retrouvés chez 20 à 35% des individus de plus de 50 ans. Ils ne sont généralement pas des précurseurs de cancer contrairement aux polypes adénomateux appelés aussi adénomes.

Les adénomes résultent de la prolifération des cellules des cryptes intestinales et peuvent être de trois natures : tubuleux (si population de cryptes villoses <25%), tubulo-villose (entre 25 et 75%) ou villose (>75%). Les adénomes ont le potentiel d'évoluer en tumeurs malignes, passant par différents degrés de dysplasie (caractérisés selon le degré d'atypies cytonucléaires et la perte de différenciation des cellules épithéliales **(voir III.6.2)c.) (Fleming et al., 2012)**). Un adénome a 10 à 15% de risque de devenir un carcinome sur une période de 10 ans **(Fearon, 2011)**.

Dans 60 à 80% des cas, le CRC se développe à partir d'un adénome et prend la forme d'un adénocarcinome. Le risque de transformation d'un adénome en cancer varie en fonction de sa taille, de l'importance de sa population de cryptes villoses et de son degré de dysplasie. Les adénomes dits avancés sont des adénomes présentant des dysplasies de haut grade ou une nature villositaire ou une taille > 1 cm de diamètre **(Fleming et al., 2012)**. Au début l'adénocarcinome est dit *in situ*, il se développe en surface, d'abord intra-épithélial. Puis, lorsque l'adénocarcinome dépasse la musculature muqueuse on parle d'adénocarcinome infiltrant. Le carcinome s'étend ensuite progressivement en profondeur dans la paroi colique, dans la sous-muqueuse, dans la musculature, puis dans la sous-séreuse et la séreuse **(Voir III, 5.)**. Le carcinome envahit ensuite la paroi intestinale et peut métastaser dans les nœuds lymphatiques, dans les organes régionaux puis gagner l'ensemble du corps.

## 2) Anomalies génétiques

Les anomalies génétiques survenant lors de la cancérogenèse colorectale sont multiples. Des pertes d'allèles voire de chromosomes, des mutations multiples, des erreurs de lecture de l'ADN polymérase sur des séquences hautement répétitives de l'ADN ainsi que des modifications épigénétiques se produisent tout au long de la cancérogenèse colorectale.

### a. Modèle génétique du cancer colorectal

Dans 85% des cas de CRC, des mutations héréditaires ou somatiques sont à l'origine de la cancérogenèse colorectale et semblent être rattachées à certaines étapes précises, que l'on peut décomposer en initiation, promotion, progression et invasion (Fearon and Vogelstein, 1990 et Fearon, 2011 Figure 3).

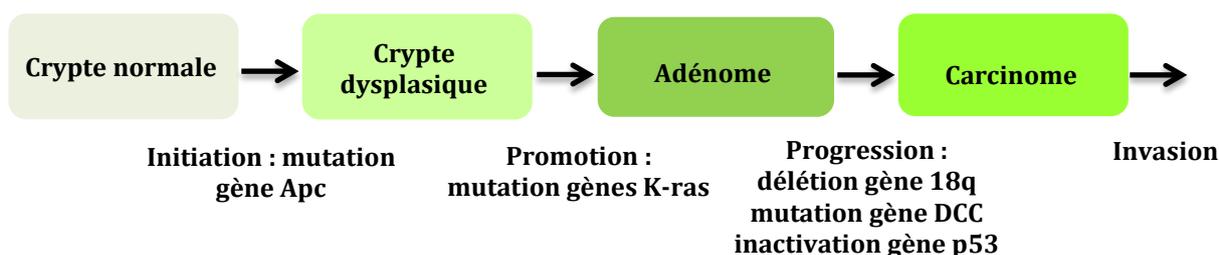


Figure 3 : Modèle génétique du cancer colorectal.

D'après Fearon, 2011.

La plupart des carcinomes colorectaux proviennent du développement de polypes adénomateux eux-mêmes formés à partir de cryptes intestinales dysplasiques. L'accumulation de mutations aux stades initiation, promotion, progression et invasion sont la cause de la cancérogenèse colorectale.

Lors de l'initiation, au niveau de l'épithélium colique normal, des mutations du gène Apc sont à l'origine de l'apparition de cryptes dysplasiques.

Au cours de la promotion, les cellules du tiers supérieur des cryptes coliques se divisent normalement, mais ne sont pas éliminées suffisamment rapidement. La mutation du gène K-ras, dont la fonction est essentielle à la signalisation cellulaire dans son état normal, devient oncogène lorsqu'il est muté et entraîne une surexpression de la cyclo-oxygénase COX-2. Cette enzyme synthétise des prostaglandines déclenchant une réaction inflammatoire conduisant à la formation de lésions précancéreuses réversibles. Pendant la progression, plusieurs étapes mènent à la formation d'une tumeur maligne irréversible : l'instabilité chromosomique, le manque d'enzymes de réparation de l'ADN

fonctionnelles, et surtout une délétion sur le gène 18q entraînant la perte d'expression du gène suppresseur de tumeur DCC (« Deleted in Colorectal Carcinoma »). Une mutation du gène p53 entraîne ensuite l'inactivation de la protéine p53, élément central de la régulation de la division cellulaire, ce qui mène à un processus dysplasique non contrôlé. Les cellules cancéreuses n'entrent plus en apoptose et en se multipliant, génèrent un amas de cellules anormales désordonné et hypervascularisé.

Finally, au cours de l'invasion, les cellules tumorales deviennent capables de sécréter des enzymes comme des métalloprotéases matricielles, qui digèrent les membranes et permettent ainsi l'invasion des tissus adjacents. Il y a alors dissémination des cellules tumorales par la voie sanguine et par le système lymphatique, puis formation de métastases.

D'autres mutations somatiques que celles présentées précédemment peuvent survenir de façon sporadique ou secondairement à des mutations héréditaires.

### **b. Instabilité chromosomique**

Dans 85% des cancers colorectaux, on constate une perte d'hétérozygotie (soit une perte d'allèle sur un chromosome d'une paire de chromosomes homologues). Elle est due à un dysfonctionnement des gènes responsables de la migration et de l'alignement des chromosomes pendant la mitose. Les pertes en allèles se retrouvent la plupart du temps sur les chromosomes 8p, 17p et 18q (les lettres p et q désignant respectivement le bras court et le bras long d'un chromosome). La perte d'un chromosome entier peut survenir, les chromosomes les plus touchés étant le 17p et le 18q. Inversement, certains chromosomes peuvent gagner des allèles, c'est le cas notamment des chromosomes 8q, 13 et 20q, et parfois un chromosome entier peut se rajouter, surtout les chromosomes 13 et 20 (**Fearon, 2011**). Parmi les gènes touchés par une perte d'hétérozygotie on trouve les gènes Mad2, BubR1, Bub3, CENPE et Apc.

### **c. Rôles des différents gènes impliqués dans la cancérogénèse colorectale**

Les principaux gènes touchés sont les gènes Apc, Ras, B-Raf et p53 et les gènes exprimant les protéines de la voie des TGF- $\beta$ .

Le gène Apc est un gène suppresseur de tumeur. Différentes mutations autosomales dominantes du gène Apc sont décrites et sont à l'origine d'un codon stop, entraînant la formation de protéines tronquées. Par la suite, l'allèle Apc du chromosome homologue subit à son tour une mutation dépendant de la mutation déjà présente.

Les gènes de la famille Ras (avec les gènes K-Ras et N-Ras) codent pour des protéines modifiant l'expression des facteurs de croissance. La mutation K-Ras est retrouvée dans environ 40% des cancers colorectaux tandis que certains CRC présentent une mutation N-Ras. La mutation K-Ras est fréquemment observée dans les ACF, dans les polypes hyperplasiques et adénomateux. Elle contribue donc à la cancérogénèse mais n'est pas nécessaire à l'initiation des adénomes. Les protéines Ras activent le gène B-Raf qui code pour une protéine régulant les MAPK (« Mitogen-Activated Protein Kinases »). Le gène B-Raf est muté dans 5 à 10% des CRC.

Le gène p53 code pour la protéine p53 qui régule la transcription de gènes codant pour des protéines intervenant dans les points de contrôle de la mitose des phases G1/S et G2/M, mais aussi régulant les mécanismes d'apoptose et d'angiogénèse. En cas d'agression, une cellule non mutée ne se divise plus, l'apoptose est lancée et l'angiogénèse s'arrête. A l'inverse, les cellules mutées continuent de se développer et échappent à l'apoptose.

Les gènes SMAD ou BMPR1A TSGs codent pour des protéines impliquées dans la voie de signalisation activée par le facteur de croissance transformant TGF- $\beta$ . Suite à sa fixation sur son récepteur, le TGF- $\beta$  inhibe la croissance cellulaire. Une mutation de ces gènes supprime l'effet inhibiteur du facteur TGF- $\beta$  et par conséquent la croissance cellulaire n'est plus correctement régulée. Dans 10 à 15% des cas de CRC, une mutation sur le gène SMAD4 est présente, 5% sur les gènes SMAD2 et SMAD3 respectivement. Dans 25% des cas, on a une mutation du gène exprimant le récepteur au facteur TGF- $\beta$  (TGF $\beta$ IIR).

D'autres mutations peuvent survenir sur des gènes responsables de la régulation de la croissance cellulaire (comme le gène EGFR, codant pour un facteur de croissance),

mais aussi sur des gènes régulant le cycle cellulaire (comme les gènes *Cmyc*, *CCNE1* (Gène Cycline E), *FBXW7* et *CDK2*), la prolifération cellulaire (comme le gène *ACVR2*, récepteur à l'activine de type 2) et enfin l'apoptose (comme *BAX* et *Caspase-5*) (**Fearon, 2011**).

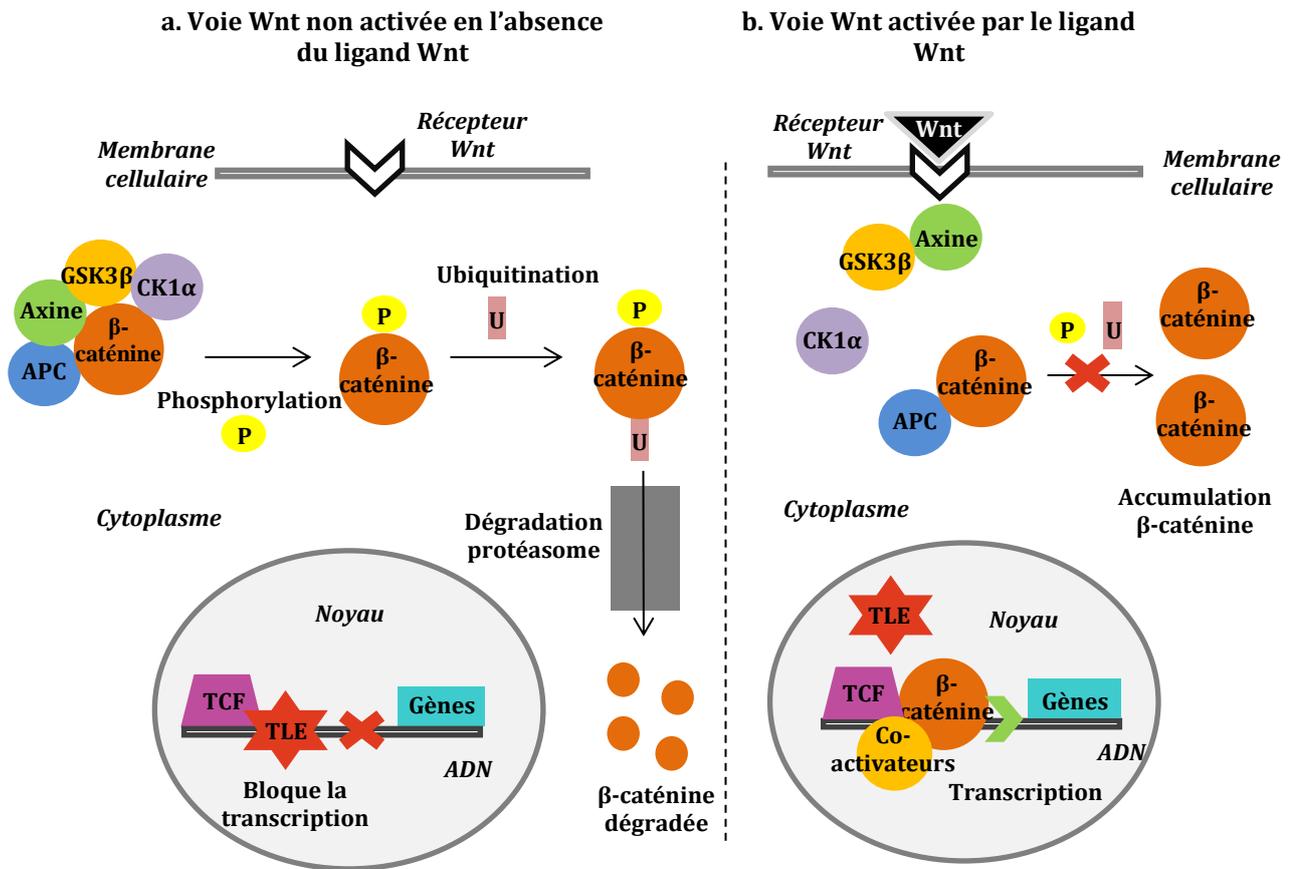
#### **d. Mutation Apc et voie Wnt**

La mutation du gène *Apc* (« Adenomatous polyposis coli ») intervient dans la totalité des cas de polypose adénomateuse familiale (PAF) (**voir I.4.2)a.**) et dans 70 à 80% des tumeurs colorectales sporadiques. Elle est considérée comme l'un des événements précoces de la cancérogénèse colorectale.

La mutation du gène *Apc* mime la voie Wnt (**Figure 4**). Elle cause la troncature de la protéine APC, empêchant la formation du complexe de phosphorylation de la  $\beta$ -caténine. Il en résulte une accumulation de  $\beta$ -caténine entraînant une activation permanente de la transcription des gènes cibles tels que *c-myc*, impliqués dans la prolifération cellulaire, ou la cycline D1, impliquée dans la régulation du cycle cellulaire. Cela va ainsi favoriser la prolifération incontrôlée de la cellule.

Le gène *Apc* jouerait aussi un rôle dans la migration cellulaire : une surexpression serait à l'origine d'une dérégulation de la migration cellulaire, alors qu'une sous-expression abrogerait la migration des cellules le long des villosités intestinales. En effet, la protéine APC est impliquée dans le contrôle de la multiplication et de la prolifération cellulaire lors de la mitose ainsi que dans la stabilisation des microtubules en se liant avec la protéine EB1 (« microtubule binding protein »).

Dans certains cancers colorectaux, il n'y a pas de mutation *Apc*, mais par exemple une mutation du gène *CTNNB1* touchant l'extrémité N-terminale des  $\beta$ -caténines qui est le site de liaison avec la protéine APC. Sa mutation empêche la liaison correcte entre les  $\beta$ -caténines et la protéine APC et donc la dégradation des  $\beta$ -caténines. D'autres mutations touchent les gènes d'expression de l'axine (*AXIN1* et *AXIN2*) mais aussi certains gènes à l'origine de la régulation du facteur de transcription TCF4 (**Fearon, 2011**).



**Figure 4 : Régulation de la fonction des β-caténines par la protéine Apc et la voie Wnt.**

D'après Fearon, 2011.

**a.** En l'absence du ligand Wnt, la protéine APC forme un complexe protéique avec l'axine, la GSK3β (glycogène synthase-3β) et la CK1α (caséine kinase 1α). Ce complexe phosphoryle la β-caténine ce qui permet son ubiquitination, c'est-à-dire la fixation d'une chaîne protéique d'ubiquitine permettant la reconnaissance de la β-caténine par le protéasome et sa dégradation. Au sein du noyau, le facteur de transcription TCF est inhibé par le facteur répresseur de transcription TLE (« transducin like enhancer of split »), empêchant la transcription des gènes.

**b.** En présence du ligand Wnt, la voie Wnt est activée, le complexe de phosphorylation de la β-caténine ne se forme pas. La β-caténine n'est pas dégradée et s'accumule dans le cytoplasme. Elle peut pénétrer dans le noyau et activer le facteur de transcription TCF, permettant la transcription de gènes cibles en déplaçant les facteurs répresseurs comme TLE et en recrutant des co-activateurs.

### e. Microsatellites

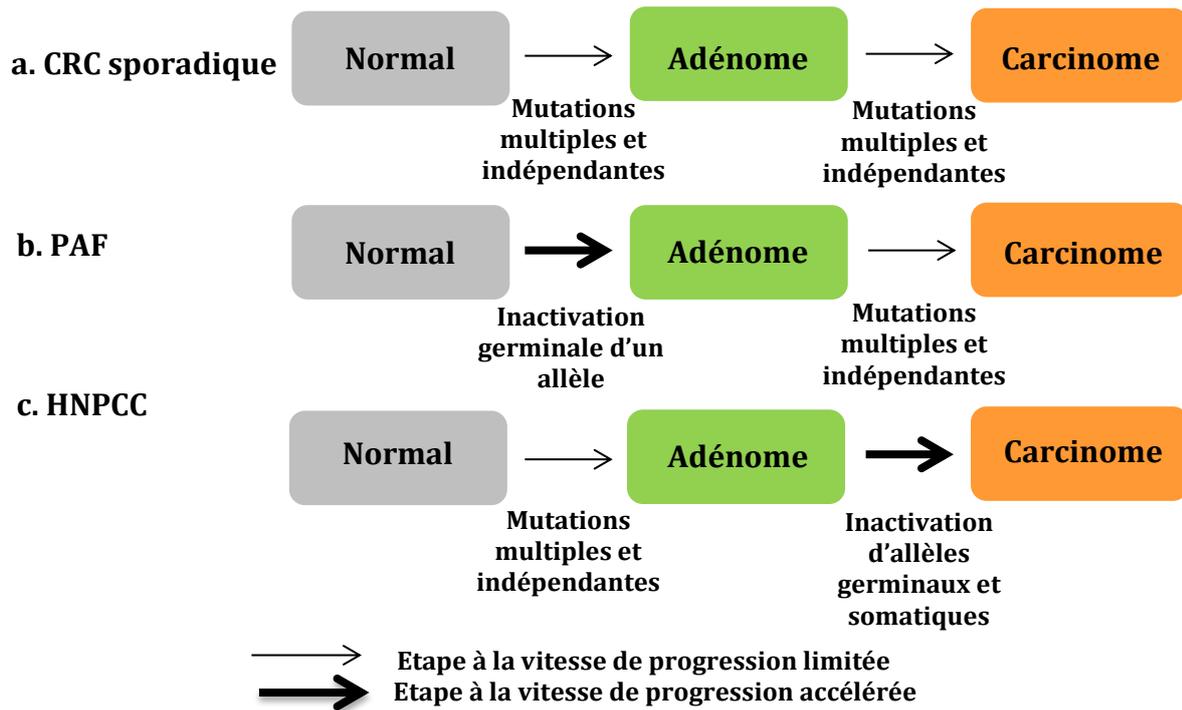
Les microsatellites sont des régions hautement répétitives de l'ADN. On parle d'instabilité des microsatellites (MSI) quand l'ADN polymérase ne lit pas certains nucléotides lors la réplication des microsatellites entraînant l'addition ou la délétion de nucléotides. On distingue les cancers colorectaux MSI-H, associés à une haute fréquence d'instabilité des microsatellites, des MSI-L associés à une faible fréquence. Normalement, des protéines de réparation des mésappariements (MMR) réparent ces erreurs. Cependant, certains gènes codant pour ces protéines peuvent être mutés, c'est le cas des gènes hMSH2, hMLH1, hMSH6, PMS1, PMS2, notamment dans 90% des cas de syndrome de Lynch **(I.4.2)b.)**. Les MSI sont aussi présents dans 15 à 40% des cancers sporadiques du côlon et dans d'autres cancers. Ainsi, les protéines de réparation ne sont pas produites ou ne sont pas fonctionnelles et ne permettent pas de réparer les mésappariements de l'ADN polymérase entraînant l'accumulation de mutations favorisant donc la tumorigenèse. De plus, les protéines MMR sont nécessaires pour réguler les étapes clés de la mitose ainsi que l'apoptose cellulaire en cas de dommage causé à l'ADN. Une déficience des gènes MMR entraîne une résistance des cellules mutées à l'apoptose, leur conférant un avantage sélectif sur les cellules saines **(Fearon, 2011 et World Cancer Report, 2014)**.

### f. Modifications épigénétiques : méthylation des îlots CpG

Les îlots CpG sont des régions de l'ADN où l'on retrouve beaucoup de séquences CpG (ou nucléotides Cytosine et Guanine à la suite sur un même brin d'ADN). Elles appartiennent à la séquence promotrice de 50% des gènes. Chez les cellules cancéreuses dans le cas du CRC, on constate plutôt une hypométhylation générale de l'ADN sauf au niveau de certaines zones promotrices dont les îlots CpG sont hyperméthylées. Cette hyperméthylation empêche la transcription correcte du gène, aboutissant à la formation de protéines tronquées, peu ou pas fonctionnelles et contribue à la survenue et à l'accumulation de mutations. La méthylation des îlots CpG touche des gènes spécifiques du CRC, comme les gènes MMR, le gène B-RAF, le gène SFRP (« Secreted Frizzled Related Proteins 1 »), antagoniste de la voie Wnt **(Fearon, 2011 et World Cancer Report, 2014)**.

## 4. Différentes circonstances d'apparition

Le CRC sporadique survient à la suite à de multiples mutations indépendantes se produisant au cours de la vie d'un individu. En ce qui concerne les cancers colorectaux familiaux comme la PAF ou le syndrome de Lynch, des mutations germinales sont à l'origine de l'initiation de la cancérogenèse, suivies par d'autres mutations indépendantes des cellules somatiques au cours de la vie. **(Figure 5)**.



**Figure 5 : Effets relatifs des mutations germinales sur l'initiation et la progression des tumeurs.**  
D'après Fearon, 2011.

- a.** Dans le CRC sporadique, la cancérogenèse dépend de la survenue de multiples mutations somatiques indépendantes et présente une rapidité de progression limitée.
- b.** Dans la PAF, l'inactivation du gène *Apc* entraîne rapidement la formation d'adénomes. Cependant, l'évolution des adénomes en carcinomes dépend de la génération de multiples mutations indépendantes supplémentaires dont la rapidité de survenue est limitée.
- c.** Dans le cas de l'HNPCC, l'inactivation des gènes *MMR* couplée aux mutations somatiques indépendantes augmente nettement la vitesse de progression des adénomes en carcinomes.

### 1) Apparition de type sporadique

Le CRC d'apparition sporadique représente la majorité des cancers colorectaux. Dans 70 à 80% des cas, une mutation sur le gène *Apc* est à l'origine du cancer, alors que la mutation des gènes *MMR* ne se retrouve que dans environ 15 à 40% des cas. Des mutations somatiques supplémentaires détermineront le développement et la progression du cancer **(Fearon 2011)**.

## 2) Apparition de plusieurs cas dans la même famille

### a. La polypose adénomateuse familiale

La polypose adénomateuse familiale (PAF) représente moins d'1% des cancers colorectaux, mais est l'une des formes héréditaires les plus fréquentes (**World Cancer Report, 2014**). La PAF est associée à une mutation autosomale dominante du gène *Apc*, gène suppresseur de tumeur. Elle est caractérisée par le développement précoce entre 20 et 40 ans de plus de 100 polypes adénomateux tapissant le côlon et le rectum (**Figure 6**). La plupart ne dépasseront jamais 0,5 cm de diamètre, mais en l'absence de colectomie, les individus touchés ont 100% de risques qu'un des adénomes évolue en adénocarcinome. Des lésions peuvent aussi être retrouvées dans d'autres organes du tractus digestif comme l'intestin grêle, l'estomac, le foie et les voies biliaires. Des manifestations extra-intestinales sont possibles avec des ostéomes, une hypertrophie congénitale de l'épithélium pigmentaire de la rétine, des kystes épidermoïdes, des fibromes, des anomalies dentaires et des tumeurs desmoïdes (**Jasperson *et al.*, 2011**). Il existe néanmoins une forme atténuée de cette maladie dans environ 10% des cas, qui se caractérise par un nombre de polypes inférieur à 100, une apparition plus tardive du cancer et moins de manifestations extra-coliques. La position de la mutation sur le gène *Apc* déterminerait la sévérité de la maladie (**Fearon, 2011**).



**Figure 6 : Muqueuse colique d'un homme de 24 ans atteint d'adénomatose polypeuse familiale après colectomie totale.**

World Cancer Report, 2014.

Il existe des variantes de la PAF, définies par le développement de lésions plus spécifiques supplémentaires. Le syndrome de Gardner est associé au développement d'ostéomes, de kystes épidermoïdes, de fibromes de la peau, de fibromatose méésentérique et d'anomalies dentaires. Le syndrome de Turcot est associé à des cancers du système nerveux central, particulièrement au médulloblastome **(Heinen, 2010)**.

Enfin, d'autres cancers familiaux présentent un phénotype PAF ou atténué, mais sont associés à d'autres mutations comme celle du gène MUTYH, à l'origine de la polypose associée au gène MUTYH. En général, 10 à 100 adénomes colorectaux se développent, et souvent le CRC est diagnostiqué vers 46-47ans. Des manifestations extra-coliques sont aussi possibles **(Poulsen et Bisgaard, 2008)**.

### **b. Syndrome de Lynch**

Le syndrome de Lynch ou cancer du côlon héréditaire sans polypose (HNPCC) représente 2 à 7% des cancers colorectaux. Les tumeurs associées surviennent en moyenne vers 44 ans, en général dans le côlon proximal. Les patients atteints ont un risque supérieur de développer des cancers du reste du tractus digestif : au niveau de l'intestin grêle, de l'estomac, du tractus hépato-biliaire et du pancréas, mais aussi des cancers du cerveau et du tractus uro-génital. Un patient atteint de ce syndrome répond aux critères suivants : au moins trois membres de sa famille ont été atteints par le syndrome de Lynch avec preuve histologique, dont un diagnostiqué avant l'âge de 50 ans. Ces sujets doivent être unis deux à deux par un lien de parenté au 1<sup>er</sup> degré sur deux générations **(Jasperson et al., 2011)**. Le syndrome de Lynch est caractérisé par des mutations autosomales dominantes sur les gènes de réparation des mésappariements de l'ADN ou gènes MMR. Les mutations des gènes MSH2, MLH1 surviennent dans 70% des cas tandis que les mutations des gènes PMS1, PMS2 et GTBP/MSH6 sont plus rares **(Fearon, 2011)**.

**c. Bilan : Les cancers colorectaux héréditaires et mutations associées**

Le **tableau 1** ci-après présente un résumé des différents cancers colorectaux héréditaires, leurs caractéristiques et les mutations principales associées (**Fearon, 2011**).

Syndrome	Caractéristiques	Gènes mutés
<b>PAF</b>	Polypes adénomateux multiples (> 100) et carcinomes du côlon et du rectum. Polypes et carcinomes de l'estomac et du duodénum. Hypertrophie pigmentaire de l'épithélium rétinien.	Apc (>90%)
<b>Syndrome de Garner</b>	Comme la PAF. Tumeurs desmoïdes et ostéomes mandibulaires.	Apc
<b>Syndrome de Turcot</b>	Polypose et CRC. Tumeurs du cerveau (médulloblastome, glioblastome)	Apc, MLH1, PMS2
<b>Polypose colique adénomateuse atténuée</b>	Comme la PAF mais moins de 100 polypes et moins de manifestations extra-coliques	Apc
<b>HNPCC</b>	CRC sans polypose extensive. Autres cancers : endomètre, ovaire, estomac. Occasionnellement urètre, tractus hépatobiliaire, cerveau.	MSH2, MLH1, PMS2, GTBP, MSH6
<b>Syndrome de Peutz-Jeghers</b>	Polypes hamartomateux* du gros intestin (GI). Pigmentation de la peau et des muqueuses. Augmentation du risque de cancer du GI et hors GI.	LKB1, STK11
<b>Maladie de Cowden</b>	Hamartomes* multiples : sein, thyroïde, peau, système nerveux central, GI. Augmentation du risque de cancer : sein, utérus, thyroïde, suspecté pour GI	PTEN (85%)
<b>Syndrome de polypose juvénile</b>	Polypes hamartomateux prédominants dans le côlon et l'estomac. Augmentation du risque de CRC et de l'estomac. Modifications faciales.	DPC4 (15%), BMPR1a (25%), PTEN (5%)
<b>MAP</b>	Polypes adénomateux multiples du GI. Parfois mutation somatique K-Ras associée.	MYH

**Tableau 1 : Bilan des cancers colorectaux familiaux.**

D'après Fearon, 2011.

\* Hamartome : Malformation tissulaire bénigne d'aspect tumoral causée par une croissance excessive de cellules normales.

### 3) Maladies inflammatoires chroniques

La maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique sont des maladies inflammatoires chroniques du tube digestif. Ces maladies touchent 5 personnes/100 000 à un âge compris entre 20 et 30 ans. Elles sembleraient être secondaires à une anomalie de la réponse immunitaire de l'intestin vis-à-vis de composants de la flore intestinale chez des sujets génétiquement prédisposés, sous l'influence de facteurs environnementaux. La Maladie de Crohn se manifeste par des douleurs abdominales et/ou un syndrome dysentérique, souvent muco-hémorragique, une inflammation de la région ano-périnéale, avec parfois des signes généraux. Elle est caractérisée par une inflammation chronique pouvant se localiser sur l'ensemble du tractus digestif, mais l'iléon, le côlon et l'anus sont les segments les plus souvent atteints. La rectocolite hémorragique se manifeste par de la diarrhée et/ou syndrome dysentérique, le plus souvent muco-hémorragique. Elle est caractérisée par une inflammation chronique de la muqueuse et de la sous muqueuse restreinte au côlon-rectum **(Inserm, 2016)**.

Plus généralement, un contexte inflammatoire chronique prédispose au développement de tumeurs, notamment aux carcinomes. Les patients atteints d'une maladie inflammatoire chronique de l'intestin ont cinq à sept fois plus de risques de développer un carcinome colorectal. Une durée d'au moins 8 ans serait nécessaire pour augmenter significativement le risque de cancer. L'exposition chronique aux médiateurs de l'inflammation entraîne l'activation d'oncogènes, une augmentation de la mutagenèse, de la prolifération cellulaire et de l'angiogenèse. Des cellules dysplasiques prolifèrent, formant ensuite des polypes adénomateux, pouvant potentiellement évoluer en adénocarcinomes **(Shacter et Weitzman, 2002)**.

## 5. Facteurs de risque

### 1) Antécédents médicaux familiaux et personnels

Le **tableau 2** présente le niveau de risque de développer un CRC en fonction des différents facteurs de risque liés aux antécédents médicaux familiaux et personnels (**Haute autorité de santé de 2013**).

Niveau de risque	Facteurs de risque
Modéré	Âge entre 50 et 74 ans
Elevé	<b>Antécédents personnels et familiaux :</b> <ul style="list-style-type: none"><li>- <b>Maladie inflammatoire :</b> en cas de maladie de Crohn ou de rectocolite hémorragique, après 8 à 10 ans le risque de développer un CRC est multiplié par 2 à 2,5 (<b>Söderlund et al., 2010</b>)</li><li>- <b>Antécédents personnels de CRC ou d'adénome &gt; 1cm ou si un parent au 1<sup>er</sup> degré a eu un CRC :</b> multiplication du risque par 2 à 3 (<b>Inserm, 2005</b>)</li><li>- <b>Cancer colorectal</b> déjà diagnostiqué, risque de CRC plus élevé sous 5 ans après traitement</li><li>- <b>Acromégalie</b></li></ul>
Très élevé	<b>Antécédents familiaux de PAF, de syndrome de Lynch :</b> Si un individu est atteint de PAF ou du syndrome de Lynch : 100% ( <b>Jasperson et al., 2011</b> ) ou 50-80% ( <b>Stoffel et al., 2009</b> ) respectivement de risques de développer un CRC sans traitement.

**Tableau 2 : Niveau de risque d'apparition du cancer colorectal en fonction de l'âge et des antécédents médicaux.**

D'après la Haute autorité de santé, 2013.

### 2) Mode de vie

#### a. Alcool et cigarette

De nombreuses études mettent en évidence un lien entre consommation d'alcool, tabagisme et augmentation du risque de développer un CRC.

L'alcool fait partie du Groupe 1 des agents cancérigènes pour l'homme d'après le **Centre international de recherche sur le cancer**. La consommation de plus de 30 g d'alcool par jour est un facteur de risque de développement de CRC. Même la consommation d'une faible dose d'alcool, entre 10 et 40 g par jour, multiplie par 1,5 le risque de développer un CRC (**Scheppach et al., 1999**).

La cigarette contient de nombreuses substances chimiques cancérigènes et 21% des cancers colorectaux seraient attribuables à la cigarette (**Giovannucci, 1994**).

### **b. Viande rouge et charcuteries**

Dans le cadre du Continuous Update Project (CUP) mené par le **WCRF (2011)**, le risque relatif à la consommation de viande a été évalué à 1,17 [IC 95 % : 1,05-1,31] pour 100 g de viande rouge consommés par jour (WCRF/AICR 2010) et à 1,18 [IC 95 % : 1,10-1,28] pour 50 g de charcuterie consommés par jour. Soit une augmentation de 17% du risque de CRC pour 100 g de viande rouge consommés par jour et de 18% pour 50 g de produits à base de viandes transformées consommés par jour. Sont concernés le bœuf, veau, mouton, agneau, porc ainsi que les charcuteries et viandes transformées c'est-à-dire les viandes conservées par fumaison, séchage, salage ou addition de conservateurs (**Chan et al., 2011**).

### **c. Surpoids et obésité**

En Europe, 11% des cancers colorectaux sont associés au surpoids ou à l'obésité qui entraînent aussi une augmentation de 30 à 70% du risque de développer un CRC (**Bardou et al., 2013**).

### **d. Facteurs de risque cumulés**

Dans une étude portant sur une cohorte de 83 767 infirmières, 701 cas de CRC ont été rapportés. Les femmes en réel surpoids, pratiquant peu d'activité physique, consommant de la viande rouge et/ou de la viande transformée tous les jours, mangeant peu de fruits et légumes ont 4 fois plus de risques de développer un CRC avant 70 ans (**Rosner, 2009**). Au Royaume-Uni, une étude portant sur la prévention du CRC a

montré qu'en augmentant sa consommation de fruits et légumes, sa pratique d'activités physiques, en limitant la consommation d'alcool et en ayant un poids normal on pouvait réduire de 31,5% le risque de développer un CRC chez l'homme, et de 18,4% chez la femme (**Parkin *et al.*, 2009**).

### 3) Taux de survie

Le taux de survie dépend du stade du cancer c'est à dire de son envahissement dans les couches du côlon, de son extension aux nœuds lymphatiques et aux organes environnants, de la présence de métastases, de leur localisation ainsi que de la précocité de la mise en place d'un traitement (**Tableau 3**)( **Inserm, 2005**).

Stade diagnostic du CRC	Caractéristiques	Taux de survie à 5 ans
1	Tumeur envahissant la sous muqueuse et possiblement la musculuse	93,9%
2	Stade 1 + tumeur envahissant la séreuse et pouvant envahir le péritoine et d'autres organes	73,5%
3	Stade 2 + tumeur ayant métastasé dans les nœuds lymphatiques régionaux	47,5%
4	Stade 3 + avec tumeur ayant métastasé à d'autres organes et à n'importe quels nœuds lymphatiques	4,4%

**Tableau 3 : Taux de survie à 5 ans basé sur la classification TNM (Tumeur- Nœud lymphatique- Métastase) en l'absence de traitement.**

D'après le World Cancer Report, 2014 et Inserm, 2005.

### 4) Recommandations

Il est recommandé de réduire la consommation de boissons alcoolisées et d'arrêter de fumer. Il faudrait limiter la consommation de viande rouge à moins de 500 g/semaine et éviter la consommation de viandes transformées pour diminuer le risque de développer un CRC. Il est conseillé de compléter les apports en protéines avec des viandes blanches, du poisson, des œufs et des légumineuses. La consommation de

céréales complètes, fruits, légumes, légumineuses mais aussi de produits laitiers est encouragée car probablement associée à une diminution du risque de développer un CRC. La pratique d'activité physique est associée à une diminution du risque de développer un CRC de 18 à 29% si l'activité est modérée, 50% si elle est intense. Il est aussi conseillé de maintenir un Indice de Masse Corporel (IMC) entre 18,5 et 25 kg/m<sup>2</sup>.

Un dépistage systématique entre 50 et 74 ans ou ciblé en fonction des antécédents personnels et familiaux est réalisé par recherche de sang dans les selles. En cas de résultats positif, des examens supplémentaires sont réalisés (coloscopie...)  
**(WRCF/AIRC, 2011).**

## II. CANCEROGENESE COLORECTALE, VIANDES ROUGES ET CHARCUTERIES : HYPOTHESES MECANISTIQUES ET BILAN DES CONNAISSANCES

Les études épidémiologiques montrent qu'il existe une association entre la consommation de viande rouge, de charcuterie et l'augmentation du risque de CRC. Les nouvelles recommandations préconisent de limiter la consommation de viande rouge et d'éviter les viandes transformées (**WCRF, 2011**).

Trois hypothèses majeures pourraient expliquer la promotion du CRC par la viande. Le fer héminique contenu dans la viande rouge ou dans les viandes transformées, serait soit directement cytotoxique et cancérigène pour les cellules de la muqueuse intestinale soit agirait comme catalyseur des réactions de peroxydation lipidique et de nitrosation d'amines et d'amides, entraînant la formation de composés oxydants et *N*-nitrosés, potentiellement cytotoxiques et cancérigènes. Enfin, la formation d'amines hétérocycliques et d'hydrocarbures aromatiques polycycliques carcinogènes lors de la cuisson à haute température des viandes pourrait aussi avoir un rôle dans la cancérogenèse colorectale (**Bastide *et al.*, 2015**).

### 1. Promotion de la cancérogenèse colorectale par la viande rouge et/ou transformée

#### 1) La viande rouge et effet de l'hème

L'étude de **Pierre *et al.* (2004)** a montré qu'il existe un lien entre la consommation de viande rouge et la promotion du CRC chez le rat. Des régimes à base de différentes viandes rouges à la richesse en hème variable (boudin très riche en hème, bœuf moyennement, poulet très pauvre en hème) ont été comparés à un régime sans hème complémenté en fer inorganique (fer citraté) sur 100 jours. L'ensemble des régimes ont été conçus pour être pauvres en calcium car il masque les effets d'une alimentation riche en hème (**voir II.6.1**). La quantité d'hème dans les eaux fécales (ou extrait aqueux biodisponible des fèces utilisé comme modèle du contenu colique) s'est révélée proportionnelle à celle contenue dans la viande du régime. Plus la viande était

riche en hème, plus la quantité de produits de peroxydation lipidique était importante, et plus les eaux fécales étaient cytotoxiques pour des cellules épithéliales coliques. Le poulet, pauvre en hème et le régime contrôle n'ont montré aucune cytotoxicité. Des lésions pré-néoplasiques de type foyers de cryptes aberrantes (ACF) et de type foyers appauvris en mucines (MDF) se sont formées dans tous les régimes étudiés, consécutivement à une injection d'un agent carcinogène permettant l'initiation de la cancérogénèse chez le rat, mais ont été retrouvées en quantité significativement plus importante dans le régime de viande rouge le plus riche en hème (**voir III.6.**). A quantité d'hème équivalente, en remplaçant la viande par de l'hémoglobine **Pierre et al.** ont obtenu les mêmes effets qu'un régime à base de bœuf. A quantité de fer équivalente, le fer inorganique (fer citaté) n'a pas entraîné de modification de la formation de produits de peroxydation lipidique, ni de formation de composés *N*-nitrosés ni de variation du nombre de lésions pré-néoplasiques.

La promotion de la carcinogénèse mise en évidence par les lésions pré-néoplasiques ACF et MDF est donc causée par la consommation de viande rouge, plus précisément du fer héminique, notamment sous forme d'hémoglobine. La consommation de viande rouge entrainerait la formation de produits de peroxydation lipidique, aurait une action cytotoxique sur les cellules de la muqueuse du côlon, et pourrait sélectionner des lignées cellulaires mutantes (**Pierre et al., 2004, 2007 et Bastide et al., 2012, 2015 et Cross et al., 2003**).

## **2) Les viandes transformées**

Les viandes transformées sont pour la plupart cuisinées à partir de viandes rouges dont la consommation est déjà associée à la promotion de la cancérogénèse colorectale. Elles subissent des transformations particulières pour acquérir leurs caractéristiques finales : salaison, séchage, fumaison, cuisson, ajout d'additifs....

Une étude récente de **Santarelli et al. (2013)** a cherché à comparer l'impact de la consommation de différentes viandes transformées sur la cancérogénèse colorectale chez le rat. Différentes charcuteries ayant des concentrations variables en hème mais aussi en nitrate, nitrite et autres additifs ont été incluses dans cette étude. La consommation de ces viandes a entraîné la formation de deux à trois fois plus de produits de peroxydation lipidique qu'une alimentation à base de caséine. L'excrétion

urinaire de 1,4-dihydroxynonane mercapturic acid (DHN-MA), produit de dégradation du 4-hydroxynonanal (4-HNE, produit de la peroxydation lipidique), a été majorée de sept à quinze fois en fonction de la viande transformée consommée. Les eaux fécales obtenues chez les rats nourris avec les régimes à base de viandes transformées ont été plus toxiques pour les cellules coliques que celles du régime contrôle. Un comptage des lésions pré-néoplasiques de type MDF a été réalisé suite à la consommation de régimes à base de saucisson et de hot-dog et a montré l'augmentation du nombre de MDF par côlon.

En conclusion, les viandes transformées sont aussi associées à l'augmentation de la formation de produits de peroxydation lipidique, de la toxicité des eaux fécales sur les cellules coliques ainsi qu'à la formation de lésions pré-néoplasiques de type MDF. Cependant, cette augmentation est variable suivant les viandes et le processus de fabrication utilisé, les quantités en hème, nitrites, nitrates et autres additifs étant différents.

## 2. L'hème et le fer héminique

### 1) Généralités

L'hème est composé d'un noyau porphyrine renfermant en son centre un atome de fer (**Figure 7A**). La capacité de l'atome de fer à changer d'état d'oxydation en fait un catalyseur biologique polyvalent qui peut être impliqué dans les réactions d'oxydation, de transfert d'électrons et qui peut fournir de l'oxygène aux cellules. Chez les mammifères, l'hème est inclus dans les hémoprotéines comme l'hémoglobine ou la myoglobine. Ces hémoprotéines sont indispensables au stockage et au transport de l'oxygène dans l'organisme. Outre son importance physiologique, la molécule d'hème peut s'avérer dangereuse, lorsqu'elle est libérée des hémoprotéines, en raison de sa capacité à oxyder les lipides, les protéines et à causer des dommages à l'ADN (**Dutra et Booza, 2014**). L'hème semble être impliqué dans un certain nombre de maladies telles que le cancer (colorectal, pancréatique, gastro-intestinal, endométrial, pulmonaire), le diabète de type-2 et les maladies cardio-vasculaires (**Hooda et al., 2014**).

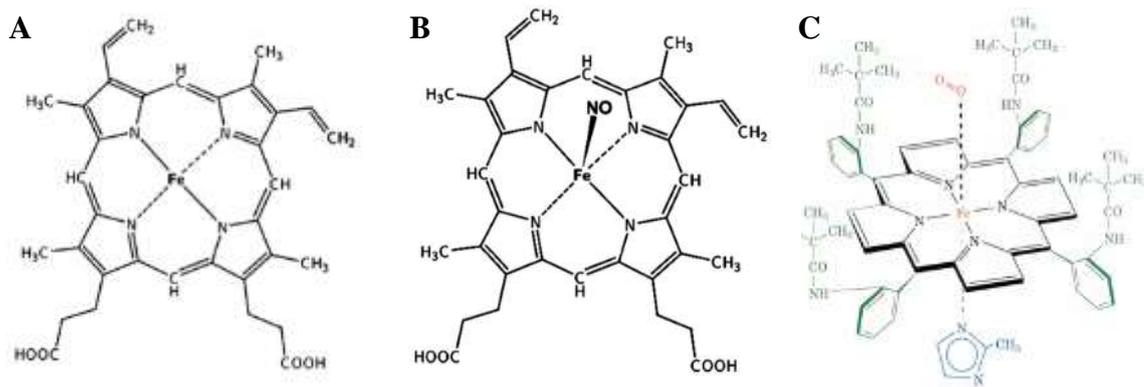
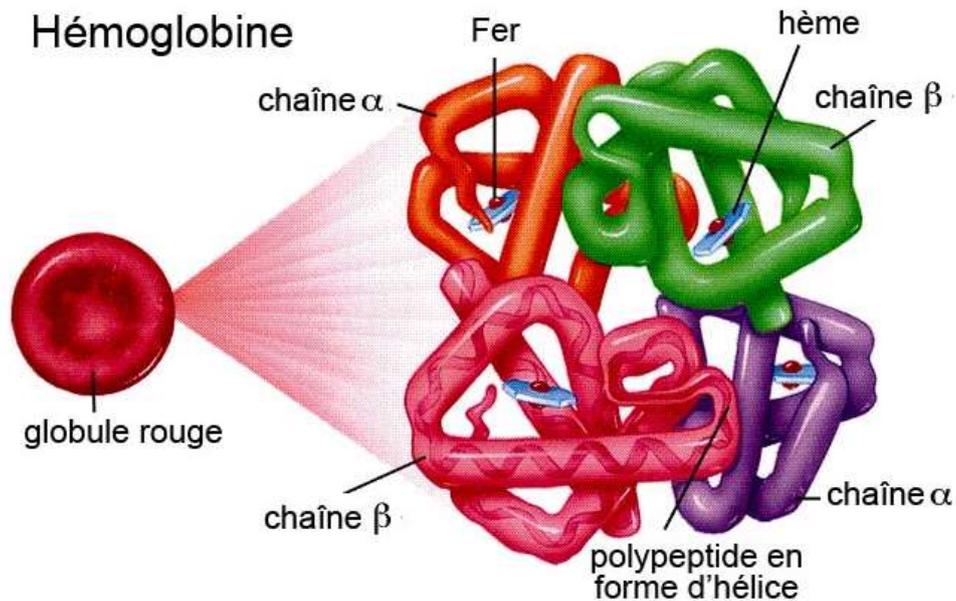


Figure 7 : Structure de l'hème (A), de l'hème nitrosylé (B) et de l'oxyhémoglobine (C)  
Bastide *et al.*, 2011 (A et B), analyticaltoxycology.com (C)

## 2) Forme et quantité d'hème dans les différentes viandes

Le fer héminique est présent essentiellement dans les protéines animales sous forme de fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) complexé à l'hémoglobine et à la myoglobine (viande, foie, poisson). L'atome de fer établit quatre liaisons avec les atomes d'azote de l'hème (deux covalentes et deux de coordination), une liaison covalente avec l'azote de l'histidine d'une chaîne polypeptidique et possiblement une autre avec un ligand. Le fer non héminique, en majorité à l'état ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ), est présent principalement dans les œufs et certaines plantes (riz, maïs, épinards) (Omar *et al.*, 2006). La viande rouge est la source alimentaire la plus riche en fer héminique, lequel est mieux absorbé que le fer non héminique et contribue en majorité aux apports en fer de l'organisme (Carpenter et Mahoney, 1992).

Dans la viande rouge, l'hème est retrouvé en grande quantité sous forme d'hémoglobine et de myoglobine (Hooda *et al.*, 2014). L'hémoglobine est une protéine majoritairement retrouvée au sein des globules rouges, elle est composée de 4 chaînes d'acides aminés renfermant chacune une molécule d'hème. La myoglobine est une protéine responsable du transport de l'oxygène dans les muscles, elle contient une molécule unique d'hème (Figure 8).



**Figure 8 : Structure de l'hémoglobine.**  
Cabasse 2014

L'intensité de la couleur rouge de la viande renseigne sur sa teneur en pigment héminique. Ainsi, plus la viande est rouge, plus elle renferme de fer héminique. La viande rouge crue se trouvant à la surface du muscle est riche en oxymyoglobine et en oxyhémoglobine (**Figure 7C**) (formes oxygénées respectives de la myoglobine et de l'hémoglobine) et l'intérieur du muscle est riche en deoxymyoglobine et en déoxyhémoglobine (formes respectives de la myoglobine et de l'hémoglobine ou le fer n'est lié à aucun ligand). Dans la viande rouge cuite, la myoglobine et l'hémoglobine sont dénaturées et forment les hémichromes et les hémochromes. Les hémichromes sont les formes oxydées des hémoprotéines dénaturées et sont responsables de la couleur brune des viandes cuites et des viandes transformées. Les hémochromes sont les formes réduites des hémoprotéines dénaturées et sont responsables de la couleur rose de l'intérieur des viandes rouges et des viandes transformées (**Tappel, 2007**). Dans les charcuteries auxquelles des nitrites ont été ajoutés, l'hème est sous forme nitrosylée, c'est-à-dire que le fer héminique est lié avec le monoxyde de carbone NO, formé à partir d'acide nitreux (**Figure 7B**) (**Honickel, 2008**).

En 2012, **Cross et al.** ont mis au point une base de données sur les quantités de fer héminique présentes dans les produits à base de viande (**Tableau 4**). Comme nous pouvons le voir dans ce tableau, la viande de porc, considérée dans les études

épidémiologiques comme viande rouge est, selon les morceaux, moins riche en fer héminique que le poulet, considéré lui comme une viande blanche.

Type de viande	Teneur en fer héminique (µg/g)
Steak de bœuf (longe)	9,3
Rôti de bœuf (rond de gîte)	8,3
Steak haché (15% de matière grasse)	10,3
Porc (cotelette)	3,5
Poulet (cuisse)	5,1
Poulet (blanc)	2,4
Jambon blanc	7,6
Hot dog	6,0
Bacon	4,9

**Tableau 4 : Teneur en fer héminique de différentes viandes et charcuteries**  
D'après Cross *et al.*, 2012

### 3) Fer héminique, digestion et absorption

Lors de l'ingestion de viande, le fer héminique contenu dans l'hémoglobine ou la myoglobine est libéré des hémoprotéines au niveau de l'estomac grâce au pH bas et à l'action des enzymes protéolytiques. Au pH intestinal, le fer héminique est soluble et son absorption au niveau des entérocytes de l'intestin grêle proximal n'est pas influencée par la nature des composés alimentaires, contrairement au fer inorganique (non héminique). En effet, le fer inorganique doit être solubilisé par certaines substances d'origine alimentaire (acides aminés, sucres, amines et amides) mais aussi par des mucines intestinales afin d'éviter qu'il précipite dans l'estomac et pour qu'il puisse être absorbé au niveau du duodénum (**Conrad et Umbreit, 2002**).

Le fer héminique représente le tiers du fer présent dans l'alimentation mais il couvre les deux tiers des besoins en fer du corps car est plus absorbable que le fer non héminique (30% versus 5%) (**Omar *et al.*, 2006**). Sur la totalité du fer héminique ingérée, seulement 10% est réellement absorbée, le reste est retrouvé au niveau du côlon et des fèces (**West et Oates, 2008**). En effet, pour un apport de 10 à 20 mg de fer par jour seulement 1 à 2 mg sont absorbés lors de la digestion pour compenser les

pertes quotidiennes (desquamation des cellules de la peau, du tractus digestif, du tractus urinaire et perte de sang chez les femmes cyclées) (**Conrad et Umbreit, 2002**).

#### **4) Mécanismes d'action**

Les données épidémiologiques et expérimentales mettent clairement en avant l'implication du fer héminique dans la cancérogenèse colorectale induite par la consommation de produits à base de viande, cependant les mécanismes d'actions restent mal compris. L'hème pourrait avoir une action directe sur les cellules de la muqueuse colique. Cependant, l'hème catalyse deux types de réactions dans la lumière intestinale : la lipoperoxydation et les réactions de nitrosation et de nitrosylation, dont les produits auraient une implication dans la cancérogenèse colorectale (**Bastide et al., 2011**).

##### **a. Effet de l'hème**

Des études réalisées *in vitro* montrent 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 et l'hémine (forme oxydée de l'hème).

L'hème pourrait avoir des effets génotoxiques, comme le montrent plusieurs études réalisées après exposition de cellules tumorales ou de colonocytes en culture primaire à l'hémoglobine ou à l'hémine. 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., 2012**).

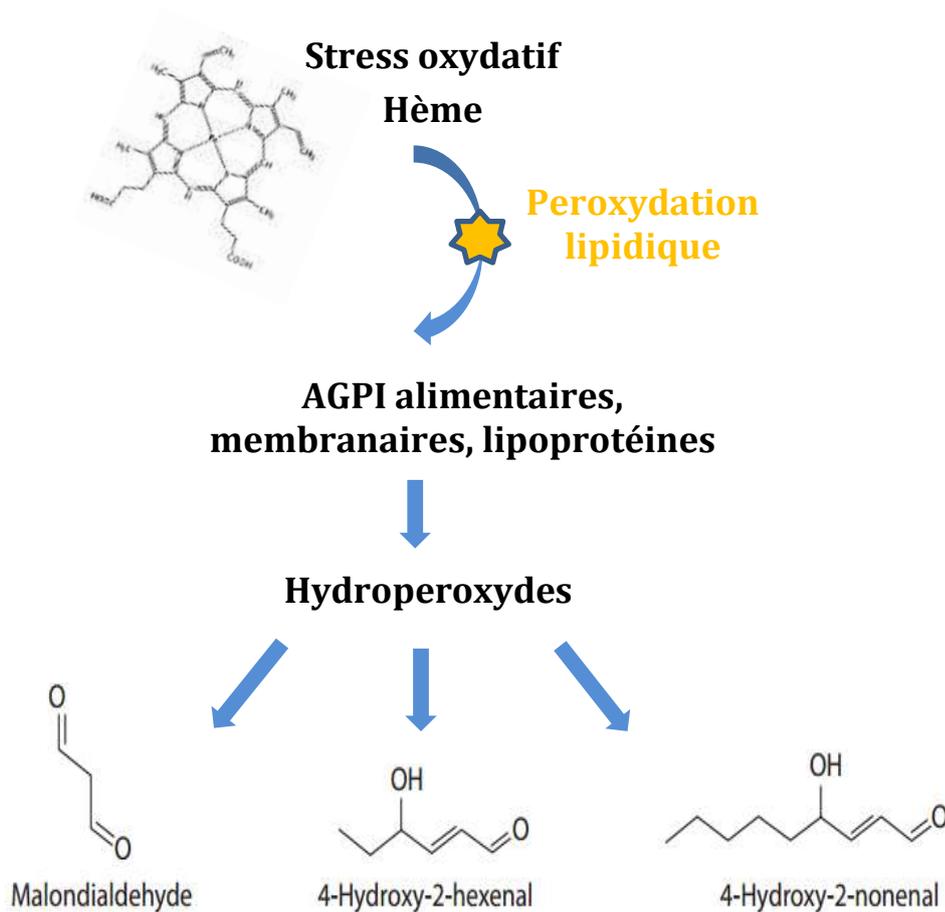
De plus, plusieurs articles évoquent le lien entre formation de radicaux libres et génotoxicité de l'hème. Les radicaux libres sont des espèces chimiques possédant un électron célibataire les rendant très réactives et impliquées dans de nombreux processus pathologiques et notamment dans le vieillissement de l'organisme. En **2006**,

**Glei et al.** ont montré que l'exposition *in vitro* à l'hémoglobine entraînait la formation de radicaux libres. En **2010**, **Ishikawa et al.** ont proposé un mécanisme pouvant expliquer le lien entre hème et cancérogénèse impliquant des radicaux libres : les espèces réactives à l'oxygène (ROS ou « Reactive Oxygen Species ») qui sont dérivées de l'O<sub>2</sub>. L'hème est dégradé par l'hème oxygénase qui libère l'atome de fer sous forme Fe<sup>2+</sup> et entraîne la libération massive de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (cette réaction forme également du monoxyde de carbone (CO) et de la biliverdine) (**Noguchi et al., 1983**). Le peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et le fer sous forme Fe<sup>2+</sup> s'engagent dans la réaction de Fenton (qui est une réaction d'oxydation avancée), aboutissant à la production de ROS (dont le radical libre hydroxyle OH°) qui sont responsables de dommages à l'ADN, participant donc à l'initiation de la cancérogénèse. La production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lors de la dégradation de l'hème provoquerait aussi une inflammation et une hyperprolifération de la muqueuse colique et participerait à la formation de signaux anti-apoptotiques et donc à la promotion de la cancérogénèse (**Ishikawa et al., 2010**).

## **b. La peroxydation lipidique**

### *i. L'oxydation des acides gras polyinsaturés lors de la digestion*

Lors de la consommation de produits à base de viande, l'hème favorise l'oxydation des acides gras polyinsaturés (AGPI) (**Tappel, 2007**). Les produits initiaux de la lipoperoxydation des AGPI sont des hydroperoxydes lipidiques qui vont être rapidement réduits par la glutathion peroxydase en composés non réactifs, ou réagir avec des métaux pour produire des composés très réactifs comme des époxydes ou des aldéhydes. Les principaux aldéhydes produits sont le malondialdéhyde (MDA), produit de peroxydation des acides gras polyinsaturés ayant au moins 3 doubles liaisons, le 4-hydroxynonéal (4-HNE), produit de peroxydation des acides gras polyinsaturés ω-6, et le 4-hydroxyhexonéal (4-HHE) produit de peroxydation des acides gras polyinsaturés ω-3 (**Figure 9**) (**Bastide et al., 2011 et 2012**).



**Figure 9 : Peroxydation lipidique d'acides gras polyinsaturés issus de l'alimentation ou d'origine endogène.**

Sarniguet C, 2016.

Formules topologiques du Malondialdehyde, 4-Hydroxy-2-hexenal et du 4-Hydroxy-2-nonenal d'après Guéraud, 2014.

Chez l'homme, comme chez les rongeurs, la consommation de viande rouge conduit à l'augmentation des substances fécales réagissant à l'acide thiobarbiturique (TBARs) (Pierre *et al.*, 2008, 2010, et 2013). Le dosage des TBARs est couramment utilisé comme biomarqueur de lipoperoxydation et de stress oxydatif (Lefèvre *et al.*, 1998). Ce dosage permet de mettre en évidence le MDA préexistant lié ou non aux molécules biologiques, les peroxydes lipidiques, les produits d'auto-oxydation des acides gras mais aussi toutes les substances pouvant réagir avec l'acide thiobarbiturique (sucres, acides aminés, bilirubine). Dans le même sens, la consommation de viande rouge conduit à l'augmentation de la formation de 4-HNE dans les fèces et de DHN-MA dans les urines. Le 4-HNE est un biomarqueur de lipoperoxydation mais il est difficilement mesurable de façon non invasive car il n'est pas stable dans les eaux

fécales. En revanche, son principal métabolite le DHN-MA, est stable dans les urines et peut être utilisé comme un biomarqueur de lipoperoxydation (**Pierre et al., 2008, 2010 et 2013**). Le DHN-MA reflète la peroxydation lipidique du régime alimentaire et celle consécutive à la digestion (**Guéraud et al., 2010, Pierre et al., 2006**).

Ainsi, la consommation d'hémoglobine entraîne l'augmentation des TBARS, donc la formation de produits de peroxydation lipidique mais aussi l'excrétion urinaire de DHN-MA (**Bastide et al., 2012**).

L'homme peut être exposé aux produits de peroxydation lipidique autrement que par voie alimentaire (ou voie exogène). La formation notamment de 4-HNE est possible suite à sa formation endogène, à partir des acides gras  $\omega$ -6 cellulaires en conditions physiologiques ou pathologiques de stress oxydatif (**Grune et al., 2010**).

*ii. Le 4-hydroxynonenal : taux physiologiques chez l'homme et doses pathologiques chez les rongeurs*

La concentration du 4-HNE dans le sérum humain dans des conditions basales semble se situer entre 0,05 et 0,15 $\mu$ M, avec un maximum observé à 0,5 $\mu$ M. La valeur moyenne de la concentration en 4-HNE dans le plasma est de 0,074 $\mu$ M dans cette étude et une tendance vers de déséquilibre oxydatif a été observé avec le vieillissement (**Poli et al., 2008**).

Quelques études se sont penchées sur la toxicité *in vivo* du 4-HNE. En **1977**, **Schauenstein et al.** ont établi la dose létale 50 (DL50, dose pour laquelle 50% des individus expérimentaux meurent). Chez la souris, la DL50 du 4-HNE est de 68 mg/kg suite à une injection intra-péritonéale. En **1993**, **Nishikawa et al.** ont administré du 4-HNE par voie orale à des rats avec des doses allant de 10 à 1000 mg/kg. La dose maximale a entraîné une nécrose aigue rénale et la mort de certains animaux en quelques heures. A plus faible dose, les rats ont présenté 14 jours après une nécrose diffuse du foie dose-dépendante (**Nishikawa et al., 1992**). Enfin, **Kang et al.** ont montré en **2011** qu'une administration de 4-HNE à des rats par gavage pendant 28 jours, permettant de modéliser une exposition chronique, causait une toxicité hépatique et rénale. Les doses utilisées dans cette étude étaient comprises entre 0,5 et 12,5

mg/kg/jour, et la dose maximale sans effet (NOAEL, « No Observable Adverse Effect Level » ou dose maximale sans effet néfaste observable) du 4-HNE a été évaluée à moins de 0,5 mg/kg/jour.

### iii. 4-hydroxynonenal et nutrition

Plusieurs études se sont intéressées à la présence de 4-HNE dans différents types d'aliments et montrent que sa quantité varie suivant l'aliment en question (**Tableau 5**).

Aliment	Quantité de 4-HNE (mg/kg d'aliment)
Huile de friture	575
Viande	2
Plats préparés	5
Lait maternisé 1 semaine après ouverture	0,8
Mozzarella	0,9
Poisson	1,4

**Tableau 5 : Quantité de 4-hydroxynonenal dans différents aliments**  
D'après Keller, 2016.

D'autre part, une étude a estimé l'exposition quotidienne au 4-HNE et au 4-HHE de la population Coréenne, montrant une exposition journalière à hauteur de 2,7 µg de 4-HNE et 1,6 µg de 4-HHE. En cas de consommation d'aliments frits, l'exposition pourrait monter à plus de 11,8 µg/jour de 4-HNE et 4-HNE cumulés. Combinées, l'exposition journalière et consécutive à une alimentation très riche en 4-HNE et 4-HHE pourrait monter à 16,1 µg/jour, soit 0,3 µg/kg pour un adulte de 60kg. Cependant, malgré les données sur la toxicité biologique de ces composés, le risque pour l'homme ne peut pas être quantifié, du fait du manque de données (**Surh and Kwon, 2005**).

### iv. Cytotoxicité

*In vitro*, il a été montré que sur des lignées de cellules humaines de carcinome colique, les composants des eaux fécales comme le MDA, 4-HNE ou les hydroperoxydes, peuvent induire l'apoptose et la nécrose des cellules épithéliales coliques (**Awasthi et**

**al., 2003**). La cytotoxicité de régimes alimentaires expérimentaux donnés à des rats a été évaluée grâce à l'utilisation de souches de cellules intestinales dérivées de souris C57BL/6J normales (Apc +/+) et portant une mutation du gène Apc (Apc -/+). Les eaux fécales issues des rats nourris avec différents régimes ont été mises en contact avec ces cellules qui, en cas de toxicité trop importante, meurent par apoptose. Ainsi, la cytotoxicité des eaux fécales de rat a été reliée à la quantité d'hème présente dans le régime alimentaire, ainsi qu'avec la quantité de produits de peroxydation lipidique (mesurée par les TBARS). Comme après exposition des cellules intestinales à des eaux fécales de rats nourris avec un régime riche en hème, lors d'exposition au 4-HNE seul, on a constaté une surmortalité des cellules intestinales de souris Apc (+/+) par rapport aux cellules mutées Apc (-/+). Les cellules mutées Apc (-/+) résistent donc mieux à l'apoptose en présence d'eaux fécales cytotoxiques ce qui leur donne un avantage sélectif comparé aux cellules normales, ce qui pourrait expliquer, au moins en partie l'effet promoteur du fer héminique. En effet, leur mutation les rend résistantes à l'induction de l'apoptose en résistant à l'induction des caspases 3, qui sont des protéases impliquées dans la régulation de l'apoptose cellulaire (**Pierre et al., 2007**).

La consommation d'hème est le facteur principal de cytotoxicité, devant les composés *N*-nitrosé, les amines hétérocycliques et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (**Bastide et al., 2012**). En effet, un régime riche en hème entraîne la formation de produits de peroxydation lipidique générant un stress oxydatif important pouvant déclencher l'apoptose des cellules et sélectionner des populations cellulaires mutantes résistantes à un environnement oxydant.

#### v. *Génotoxicité, mutagénicité et lésions pré-néoplasiques*

Les aldéhydes issus de la peroxydation lipidique induisent des dommages sur l'ADN. Le MDA est un agent mutagène pour les bactéries (*Salmonella typhimurium* notamment), provoquant des substitutions de paires de base mais aussi des délétions et des additions de nucléotides modifiant les codons. Comme le 4-HNE, le MDA est génotoxique pour les cellules de mammifères, entraînant des micronuclei (petits noyaux se formant lorsqu'un chromosome ou un fragment n'est pas incorporé dans une cellule fille au cours de la mitose) et des aberrations chromosomales (nombre ou structure des chromosomes anormal) (**Guéraud et al., 2010**). Le MDA forme des adduits sur l'ADN,

ces composés appelés résidus guanine notés M<sub>1</sub>G sont mutagènes chez les bactéries, les mammifères et les cellules humaines (**Niedernhofer et al., 2003**). Des adduits exocycliques hautement mutagènes composés d'un cycle à 5 ou 6 atomes, peuvent se fixer à l'ADN lors d'exposition à des produits d'oxydation lipidique. Deux types d'adduits exocycliques sont retrouvés et peuvent se former à partir de 4-HNE : les propano-adduits et les éthéno-adduits. Le 4-HNE peut se fixer sur le nucléoside guanosine pour donner l'adduit HNE-déoxyguanosine, qui est un propano-adduit qui peut inhiber la synthèse de l'ADN à cause de sa structure encombrante. L'oxydation du 4-HNE peut aussi entraîner la formation d'un époxyde réagissant avec les acides nucléiques cytosine, adénine et guanine engendrant des éthéno-adduits. Ces adduits sont responsables de transversions (remplacement d'un nucléotide purique A ou T par un nucléotide pyrimidique C ou G ou inversement) et de transitions (remplacement d'un nucléotide purique par l'autre nucléotide purique ou d'un nucléotide pyrimidique par l'autre nucléotide pyrimidique) de l'ADN (**Guéraud, 2014**).

Le 4-HNE et le 4-HHE sont génotoxiques pour les cellules de souris normales Apc +/+ et mutées Apc -/+, ils ont donc un effet promoteur. Cependant, la génotoxicité observée chez les cellules normales laisse suspecter un effet initiateur du 4-HNE et du 4-HHE (**Bastide et al., 2012**).

Le DHN-MA, produit majeur de dégradation du 4-HNE est corrélé positivement avec la formation de lésions pré-néoplasiques de type MDF (**Pierre et al., 2006**). Chez la souris, on constate une corrélation entre la consommation d'hémoglobine, l'augmentation des biomarqueurs du stress oxydatif, la cytotoxicité et l'apparition de tumeurs (**Bastide et al., 2012**).

#### *vi. Stress oxydatif, réactivité des aldéhydes et conséquences sur l'organisme*

Le stress oxydatif et la peroxydation lipidique sont impliqués dans divers troubles pathologiques comme l'inflammation, l'athérosclérose, les maladies neurodégénératives et le cancer. Cependant, il peut également exercer des effets physiologiques bénéfiques, selon la concentration intracellulaire. Par exemple, à des concentrations basses (<2 µM) le 4-HNE promeut la survie et la prolifération cellulaire, ou encore participe à l'homéostasie du calcium dans la cellule (**Shoeb et al., 2014**). Les

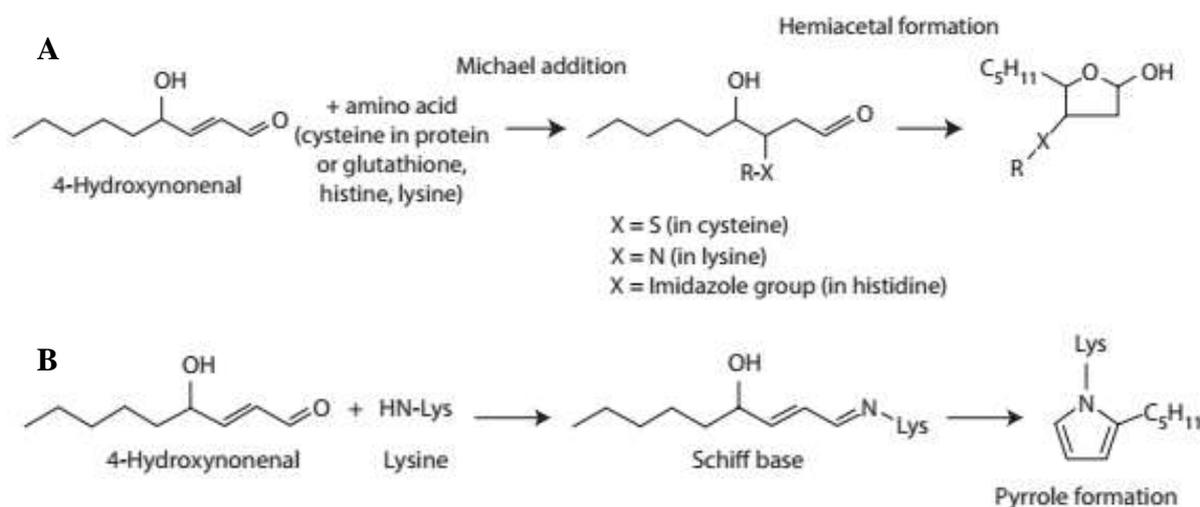
radicaux libres produits pendant la peroxydation lipidique ont des effets locaux à cause de leur courte durée de vie, mais leurs produits secondaires peuvent servir de « messagers » du stress oxydatif, car ils ont une plus longue durée de vie et la capacité à être transportés ailleurs qu'au site de formation. Le MDA, 4-HNE et 4-HHE sont très réactifs et peuvent former des liaisons covalentes avec des macromolécules exercer des effets biologiques, en plus d'être simples biomarqueurs du stress oxydatif. La peroxydation lipidique causée par l'hème touche à la fois les AGPI issus de l'alimentation mais aussi ceux situés dans les membranes biologiques, entrant dans la composition des phospholipides et lipoprotéines membranaires (**Figure 9, Guéraud *et al.*, 2010**).

Les membranes cellulaires et mitochondriales sont des structures organisées et fonctionnelles. Leur modification à la suite de la peroxydation lipidique peut modifier leur fluidité jusqu'à distorsion et rupture membranaire, provoquant l'apoptose cellulaire. Les aldéhydes ont aussi pour cibles les membranes mitochondriales, altérant les complexes respiratoires, diminuant la synthèse d'ATP et modifiant la capacité de la cellule à lutter contre l'apoptose (**Guéraud *et al.*, 2010**).

Les fonctions cellulaires peuvent être affectées par la liaison d'aldéhydes aux lipides, aux protéines membranaires, cytosquelettiques et plasmiques mais aussi en se fixant sur les acides nucléiques, perturbant les voies de signalisations, le fonctionnement cellulaire et l'expression de l'ADN. Les sites catalytiques ou de régulation des protéines sont riches en cystéine, histidine et lysine, acides aminés sur lesquels les produits d'oxydation lipidique forment des préférentiellement des résidus. En présence de 4-hydroxy-2-alcènes, des résidus hémiacétals et pyrroles se forment sur les protéines suite à la réaction de Michael et à la formation de base Schiff respectivement (**Figure 10**).

Les protéines modifiées sont impliquées dans différentes voies de régulation cellulaires. La voie Nrf2/keap1-ARE (« Nuclear factor E2-related factor 2/Antioxydant Responsive Element ») est impliquée dans la régulation de la réponse au stress oxydatif cellulaire en initiant la transcription de gènes impliqués dans les réponses antioxydantes et détoxifiantes. Cependant, une suractivation par le 4-HNE de ce système donne un avantage aux cellules tumorales car il peut promouvoir la croissance et la prolifération cellulaire et diminuer l'apoptose. D'autres voies cellulaires sont touchées, notamment la voie des Nf- $\kappa$ B (« Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells ») qui est une famille de facteurs de transcription impliquée dans la réponse inflammatoire,

immunitaire ainsi que dans la réponse au stress oxydatif. Cette voie régule la prolifération cellulaire et une dérégulation est impliquée dans le développement du cancer. Les voies des Protéines kinases C et des MAPK (« Mitogen-Activated Protein Kinases ») sont régulent dans la transduction intracellulaire de signaux impliqués dans la différenciation, prolifération et l'apoptose cellulaire. La voie des Protéines kinases C peut notamment activer la voie des Nrf2/keap1-ARE (**Guéraud *et al.*, 2014**).



**Figure 10 : Formation d'adduits sur les protéines en présence de 4-hydroxynonanal.**

Guéraud *et al.*, 2014.

**(A)** L'addition de Michael permet la formation d'adduits hémiacétals sur les acides aminés cystéine, histidine ou lysine à partir de 4-HNE.

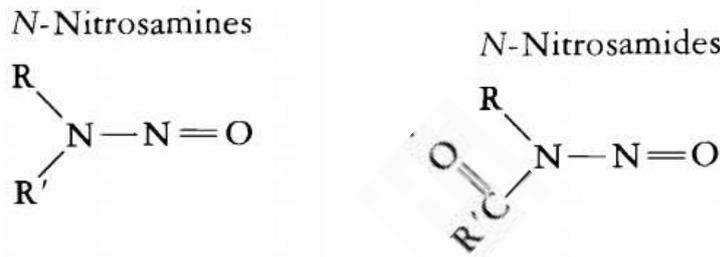
**(B)** La formation de bases Schiff à partir de 4-HNE et de lysine permet la formation d'adduits pyrroles sur les protéines.

### c. Les composés *N*-nitrosés dans les viandes transformées

Des nitrites et des nitrates sont ajoutés dans les viandes transformées et dans les charcuteries pour leur rôle dans la formation de la couleur, dans le développement du goût, et surtout pour leur effet bactériostatique. D'un point de vue microbiologique, ces composés inhibent la croissance et la germination des spores de *Clostridium botulinum*, bactérie responsable du botulisme (**IFIP, 2010**). Cependant, la présence de nitrites peut favoriser deux types de réactions : les réactions de nitrosation et de nitrosylation.

*i. Les réactions de nitrosation et de nitrosylation*

Les réactions de nitrosation correspondent à l'ajout d'ions nitrosonium  $\text{NO}^+$  sur une amine ou une amide, formant des nitrosamines ou des nitrosamides (**Figure 11**). Plusieurs facteurs interviennent dans ces réactions : le pH, la température, le caractère basique de l'amine (**Santarelli, 2010**). L'hème serait un catalyseur cette réaction (**Cross et al., 2003**).



**Figure 11 : Formules topologiques des composés N-nitrosés.**

R, R' = radicaux alkyle ou aryle.

Douglas *et al.*, 1978.

Les réactions de nitrosylation correspondent à l'ajout d'un ion nitrosyl  $\text{NO}^-$  sur des métaux ou des groupements thiols, menant à la formation de S-nitrosothiols de formule générale R-SNO (R groupement organique ou atome d'hydrogène) ou de fer nitrosylé de formule  $\text{FeNO}$  (**Figure 7B**) (**Massion et al., 2002**).

*ii. Dans les viandes transformées*

Dans les viandes transformées, les nitrites ajoutés sous forme d'acide nitreux, peuvent soit former de l'oxyde d'azote et favoriser la formation d'hème nitrosylé, soit à pH bas, entrer dans des réactions de nitrosation, formant alors des nitrosamines ou nitrosamides. Dans les charcuteries au pH moyen de 5,5, l'hème est sous forme nitrosylée, contrairement à la viande rouge. Les réactions de nitrosation sont donc limitées, d'autant plus que, pour prévenir la formation de nitrosamines, les industriels ajoutent à toutes les charcuteries de l'acide ascorbique, de l'ascorbate de sodium ou de l'érythorbate (isomère de l'ascorbate), afin de limiter les réactions de nitrosation (**Honickel et al., 2008**).

### *iii. Dans le tube digestif*

Dans l'estomac, les nitrites issus de l'alimentation ou formés à partir de nitrates, sont présents dans l'estomac, dont le pH est très acide (pH = 2). Ces conditions favorisent les réactions de nitrosation catalysées par le fer héminique pour former des nitrosamines et des nitrosamides. Par ailleurs, des réactions de nitrosylation sur les groupements thiols ont aussi lieu dans l'estomac, conduisant à la formation de composés *S*-nitrosothiols. Dans l'intestin grêle, les conditions anaérobies et l'augmentation du pH conduisent à une dissociation des composés *S*-nitrosothiols et favorisent les réactions de nitrosylation de l'hème. De l'iléum au côlon, la proportion en fer nitrosylé et en *S*-nitrosothiols ne change pas : le fer nitrosylé reste le composé nitrosé le plus présent dans les fèces (**Kuhnle, 2007b**). Le pH du côlon, qui est voisin de la neutralité, ne permet pas de réaction de nitrosation. La flore bactérienne est responsable d'une partie de ces réactions. Comme elle est variable selon les individus, elle est à l'origine de variations importantes dans la formation de résidus azotés (**Cross et al., 2003**).

### *iv. Rôle dans la cancérogénèse colorectale*

La plupart des molécules formées par les réactions de nitrosation et de nitrosylation sont cancérogènes. Il a été montré chez des volontaires humains que la consommation de viandes rouges et de charcuteries augmentait la formation de composés *N*-Nitrosés (NOCs) dans les fèces. Chez le rat, leur formation est proportionnelle à la quantité de viande rouge dans l'alimentation. Un régime sans viande rouge (à base de poulet, poisson) ou végétarien n'entraîne pas de formation des NOCs (**Bingham, 1996, Cross et al., 2003**). Chez le rat, un régime riche en fer héminique est à l'origine de l'augmentation des NOCs dans les fèces, alors que le fer inorganique est sans effet. Le fer héminique est donc l'un des composés majeurs à l'origine de la formation et de l'excrétion de NOCs (**Cross et al., 2003**).

Les NOCs sont des agents alkylants aux propriétés mutagènes et carcinogènes. Ils peuvent notamment former des adduits O6-méthylguanine et O6-carboxyméthylguanine sur l'ADN (**Lewin et al., 2006**). Ils sont à l'origine de mutations du gène K-ras dans 30% des rats présentant un carcinome du côlon (**Bastide et al., 2011**). Ils peuvent aussi causer une inflammation colique associée au CRC (**Mirvish et**

*al., 2003*). Chez la souris, l'ingestion de composés *N*-nitrosés formés à partir de dérivés de hot-dogs augmente significativement le nombre de lésions pré-néoplasiques de type ACF dans le côlon (**Davis *et al.*, 2012**).

#### **d. Inflammation, perméabilité membranaire**

Un régime riche en hème entraîne une inflammation de la muqueuse colique en augmentant l'activité enzymatique des myeloperoxydases, qui reflète le recrutement des neutrophiles sur le site inflammatoire. Les neutrophiles stimulent la production de cytokines pro-inflammatoires (comme l'interleukine 1 $\beta$  (IL1 $\beta$ )), tout en diminuant la production de certaines cytokines anti-inflammatoires (comme l'interleukine 10 (IL10)). Le régime riche en hème est aussi associé à une augmentation de la perméabilité intestinale expliquée par une altération des jonctions serrées des entérocytes (consécutivement à la sous expression de molécules d'adhérences comme la molécule d'adhérence jonctionnelle-A (JAM-A)). Cette protéine serait aussi impliquée dans les mécanismes inflammatoires et prolifératifs (**Martin *et al.*, 2015**). L'inflammation et la perméabilité de l'intestin sont liées, en effet chez l'Homme, l'augmentation de la perméabilité intestinale est aussi associée aux maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (**Camilleri *et al.*, 2012**).

#### **e. Microbiote**

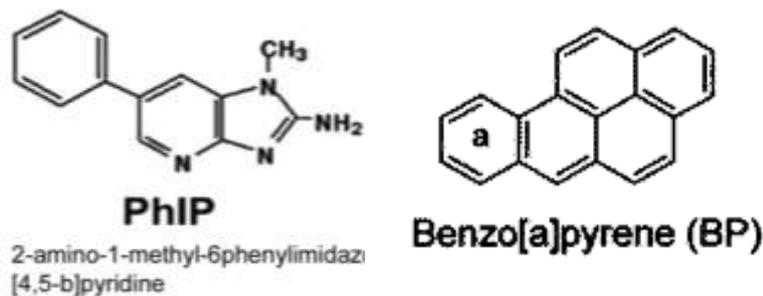
L'ajout d'antibiotiques dans un régime riche en hémoglobine diminue à la fois la densité de la flore intestinale mais aussi les produits de peroxydation lipidique (**Martin *et al.*, 2015**). L'hémoglobine pourrait donc favoriser la multiplication d'une flore particulière, aux propriétés lipoperoxydantes, qui pourrait participer à l'effet promoteur de l'hème. La flore intestinale pourrait aussi jouer un rôle dans la biodisponibilité de l'hème dans les eaux fécales : pour un même régime, on retrouve moins d'hème soluble dans les eaux fécales des rats traités aux antibiotiques alors que la quantité totale dans les fèces reste la même.

### 3. Les amines hétérocycliques et hydrocarbures aromatiques polycycliques

Les amines hétérocycliques et les hydrocarbures aromatiques polycycliques sont formés pendant la cuisson à haute température des viandes et des poissons.

Les amines aromatiques hétérocycliques (HCA) sont formées par pyrolyse de la créatine et des acides aminés. Une haute température est nécessaire, ainsi surtout les viandes frites, grillées ou cuites au barbecue sont concernées. Les HCA sont divisées en deux groupes selon la classification du **CIRC** classant les agents suivant leur degré de cancérogénéité : le groupe 2A avec les HCA probablement carcinogènes pour l'Homme et le groupe 2B, avec les HCA possiblement carcinogènes pour l'Homme. Lors de la cuisson de viande ou de poisson à haute température, on retrouve principalement des HCA du groupe 2B : la 2-amino-3,8-diméthylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx), la 2-amino-3,4,9-triméthylimidazo[4,5-f]quinoxaline (DiMeIQx) et la 2-amino-1-méthyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) (**Figure 12**) mais aussi la 2-amino-3-méthylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) appartenant au groupe 2A.

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (PAH) sont produits par combustion incomplète des composés organiques des viandes et des poissons fumés et cuisinés, notamment au barbecue ou exposés à la fumée (**Santarelli et al., 2008**). En tête de liste, on retrouve le benzo[*a*]pyrène (BaP) (**Figure 12**) qui est carcinogène et mutagène (groupe 1 selon le **CIRC**).



**Figure 12 : Formules topologiques du 2-amino-1-méthyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) et du benzo[*a*]pyrène (BaP).**

Figure PhIP d'après Rawat et Zaidi, 2014 et Figure BaP d'après *thehealthscience.com*

Les PAH sont associés à une augmentation du risque de développer un adénome colorectal chez l'Homme (**Gunter et al., 2005, Sinha et al., 2005**). De plus, d'après

**Sugimura et al. (2004)**, les HCA peuvent provoquer des tumeurs à la localisation variable chez les rats et les souris (côlon, glandes mammaires, prostate, foie, poumons, peau...). Les HCA sont aussi mutagènes pour *Salmonella typhimurium* et des adduits sur l'ADN ont été mis en évidence chez des animaux nourris de façon chronique avec des HCA (**Takayama et al., 1989**), laissant suspecter des effets mutagènes et carcinogènes chez l'Homme.

Cependant, les doses d'HCA auxquelles les rongeurs et les singes ont été exposés dans les études *in vivo* sont 1000 à 100 000 fois supérieures à l'exposition réelle de l'Homme (**Santarelli et al., 2008**). La quantité ingérée d'HAC et d'PAH par l'Homme est donc minime et n'explique pas seule le CRC. Cependant, on suspecte que les HCA et les PAH jouent un rôle dans la cancérogenèse notamment s'ils sont en association avec d'autres substances carcinogènes ou mutagènes. Il reste donc plus prudent de les éviter ou de prévenir leur effet par l'ajout d'antioxydants comme les extraits de thé vert, de  $\beta$ -carotène et de vitamine E, qui inhibent la formation des HCA (**voir II.6.**) (**Sugimura et al., 2004**).

#### **4. Les graisses**

Les graisses des viandes et plus précisément leurs acides gras, sont soupçonnées de jouer un rôle promoteur dans le CRC. Un excès de graisse ingéré pourrait entraîner une augmentation de la sécrétion d'acides biliaires, agressifs pour la muqueuse et qui augmenterait la mort et la prolifération cellulaire. De plus, leur dégradation par la flore bactérienne permet la production d'acides biliaires secondaires (acides désoxycholiques et lithocholiques) susceptibles de promouvoir le CRC dans certains modèles animaux. Ces derniers sont en effet retrouvés en plus grande quantité chez des personnes dont l'alimentation est riche en matières grasses (**Santarelli et al., 2008**). Un excès d'énergie favorise aussi l'obésité entraînant une résistance à l'insuline, des modifications des paramètres sanguins (une hyperglycémie, une augmentation des cytokines inflammatoires IGF1, une modification du profil des acides gras libres) ayant pour conséquence une augmentation de la prolifération cellulaire et une diminution de l'apoptose, conduisant ainsi à la promotion de la cancérogenèse colorectale chez les animaux (**Parnaud et Corpet, 1997**). En 2007, le rapport du **WCRF/AICR** a montré une

association possible entre le surpoids ou l'obésité et le CRC. En revanche, le lien entre consommation de graisse et CRC n'a pas été rapporté, ce qui est cohérent avec la méta-analyse d'**Alexander et al. (2006)** regroupant 6 études de cohortes. Cependant, les études sur le sujet se contredisent et ne permettent pas à l'heure actuelle de conclure.

## **5. Les protéines**

Un excès de protéines (animales ou non) dans l'alimentation pourrait entraîner une arrivée importante de protéines dans le côlon générant une augmentation de la fermentation bactérienne. Les molécules azotées (principalement les acides aminés) sont alors métabolisées en ammoniac par la flore colique. L'ammoniac peut être soit réabsorbé et converti en urée dans le foie, soit utilisé dans la synthèse protéique bactérienne, soit retenu dans le contenu colique. Une concentration élevée en ammoniac est toxique pour les cellules de la muqueuse colique, causant des altérations dans la synthèse de l'ADN, une interruption du métabolisme intermédiaire et une augmentation du renouvellement des cellules du côlon. Tous ces dommages cellulaires prédisposent à la croissance néoplasique. Les protéines peuvent être aussi transformées en métabolites potentiellement toxiques tels que des amines, des phénols et des indoles. Cependant, une augmentation d'un facteur 10 à 100 des concentrations intestinales de ces métabolites n'a pas montré d'effet promoteur de carcinogenèse colorectale chez le rat (**Corpet et al., 1995**). D'après la méta-analyse d'**Alexander et al. (2009)**, la consommation de protéines n'est pas associée à une augmentation significative du risque de développer un CRC. Cependant, comme pour les graisses, les résultats des études divergent et ne permettent pas de mettre en évidence un impact significatif de la consommation excessive de protéines sur la cancérogenèse colorectale.

## **6. Les molécules protectrices**

### **1) Calcium**

Dans l'alimentation, le calcium est sous forme complexée avec les composés alimentaires. Au cours de la digestion, les enzymes digestives ainsi que les acides

biliaires contribuent à la libération du calcium sous forme ionique soluble ( $\text{Ca}^{2+}$ ) avant d'être absorbé dans l'intestin (**Allen, 1982**). Une fois libre, le calcium intestinal peut aussi précipiter les composés amphiphiles comme les acides biliaires ou les acides gras. Par conséquent, ils ne sont plus biodisponibles dans les eaux fécales. *In vitro*, l'hème aux propriétés amphiphiles proches de celles de la bilirubine, est précipité par le calcium. *In vivo*, en présence de calcium dans l'alimentation, l'hème est présent en plus grande quantité dans les fèces mais se retrouve en faible quantité dans les eaux fécales en raison de sa relative insolubilité. Il est donc moins métabolisable et moins disponible au contact de la muqueuse intestinale (**Sesink et al., 2001**). De plus, dans une étude chez le rat de **Santarelli et al. (2013)**, l'ajout de calcium dans un régime riche en hème à raison de 1.5g/100g d'aliment dans le régime complétement contre 0.27g/100g dans le régime témoin, a permis de diminuer significativement les TBARS dans les eaux fécales, donc les composés issus de la peroxydation lipidique, ainsi que les composés *N*-nitrosés. La complémentation en calcium a aussi diminué le nombre de lésions pré-néoplasiques de type MDF par côlon, sans modifier leur taille, et n'a pas eu d'effet significatif sur le nombre d'ACF. Cependant, cet effet serait variable selon le type de viande consommée et suivant le processus de fabrication utilisé.

Par conséquent, la cytotoxicité des eaux fécales, l'hyperprolifération cellulaire et la formation de lésions pré-néoplasiques sont diminuées à normalisées avec une alimentation riche en hème complétement en carbonate de calcium. Cependant, le calcium inhibe l'absorption intestinale du fer sous forme héminique et non héminique. Ainsi, la complémentation en calcium ne peut être systématisée car pourrait être à l'origine d'une carence en fer (**Hallberg et al., 1991**).

## 2) Chlorophylle

D'après le **WCRF(2011)** la consommation de légumes verts est associée à une diminution du risque de développer un CRC. L'étude de **Balder et al. (2006)** a montré qu'une alimentation riche en hème mais pauvre en chlorophylle était associée à une augmentation du risque de CRC chez l'Homme. Chez le rat, l'ajout de chlorophylle à un régime riche en hème a permis d'inhiber la prolifération et la cytotoxicité cellulaire causée par l'hème et son catabolisme et de diminuer les TBARS. De plus, en présence de chlorophylle, l'hème parcourt l'intestin et rejoint les fèces sans être dégradé (**Vogel et**

*al.*, 2005). Ainsi, la chlorophylle piège l'hème, empêche sa métabolisation et donc les effets liés à la peroxydation lipidique et à la formation de composés *N*-nitrosés.

### 3) Antioxydants

Les viandes transformées cumulent différentes caractéristiques associées à une augmentation du risque de CRC comme la richesse en hème ou les différents procédés de fabrication à risque (ajout de nitrite, sel, cuisson, fumaison...).

D'après une étude de **Pierre *et al.* (2013)**, l'ajout d'additifs antioxydants à du jambon comme l' $\alpha$ -tocophérol (vitamine E), l'acide ascorbique (vitamine C), la rutine, le carnosol, l'inuline, le trisodium pyrophosphate dans l'alimentation de rats, a entraîné la diminution des TBARS, ainsi qu'une diminution de la concentration urinaire de DHN-MA. *In vitro*, l'ajout de carbonate de calcium et d' $\alpha$ -tocophérol a réduit l'avantage sélectif des cellules Apc -/+ mutées réduisant la cytotoxicité des eaux fécales sur les cellules Apc +/+, et a permis de diminuer le nombre de lésions pré-néoplasiques MDF chez le rat. Chez l'Homme, l' $\alpha$ -tocophérol diminue à la fois les TBARS et les composés *N*-nitrosés.

Parmi les antioxydants on retrouve les polyphénols. Ils constituent une famille de molécules organiques hydrosolubles largement présente dans le règne végétal, et sont caractérisés par la présence de plusieurs groupements phénoliques associés en structures plus ou moins complexes généralement de haut poids moléculaire. Il existe plusieurs familles dont les plus connues sont les flavonoïdes et les tanins.

Dans son étude, **Bastide (2012)** étudie les polyphénols suivants : les extraits de grenade, de vin rouge, de raisin blanc, de thé vert ainsi que l'acide carnosique (retrouvé dans la sauge et le romarin) et l' $\alpha$ -tocophérol. Seuls les extraits de grenade, de vin rouge, de raisin blanc et l' $\alpha$ -tocophérol ont montré une diminution significative de la production de produits de peroxydation lipidique. L' $\alpha$ -tocophérol ainsi que les extraits de vin rouge et de grenade ont permis de diminuer le nombre de lésions pré-néoplasiques de type MDF une fois ajoutés à un régime riche en hème. De plus, les rats nourris avec ces régimes n'ont pas excrété de fer nitrosylé. En effet, certains antioxydants ont la capacité de chélater l'hème, rendant impossible la formation de fer nitrosylé ainsi que les réactions de nitrosation/nitrosylation et de peroxydation lipidique. C'est notamment le cas de la vitamine E, des polyphénols contenus dans le vin rouge et dans la grenade, contrairement à ceux du raisin blanc et de l'acide carnosique

qui ne chélatent pas l'hème mais qui ont des propriétés inhibitrices de ces réactions ainsi que des radicaux libres.

Ainsi, plus généralement, l'ajout d'antioxydants et de calcium lors de la fabrication des viandes transformées permet d'atténuer voire de normaliser les biomarqueurs de peroxydation lipidique et les composés *N*-nitrosés ainsi que de diminuer les lésions pré-néoplasiques de type MDF chez l'Homme et chez le rat. **(Bastide, 2012, Santarelli *et al.*, 2013).**

## 7. Bilan

L'hème contenu dans la viande rouge est le principal responsable de la promotion de la cancérogenèse colorectale constatée lors de la consommation de viande rouge et/ou transformée. L'hème seul a des effets génotoxiques et cytotoxiques mais il peut aussi catalyser, grâce au fer héminique, des réactions de nitrosation/nitrosylation et de peroxydation lipidique. Les produits finaux majeurs issus de ces réactions sont des composés *N*-nitrosés (NOCs) ainsi que des aldéhydes comme le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonéal (4-HNE). Ces composés sont génotoxiques et cytotoxiques pour les cellules coliques, entraînant des mutations et des adduits sur l'ADN et sélectionnant les cellules pré-cancéreuses. Ces voies peuvent donc expliquer, au moins en partie, l'effet promoteur des viandes rouges et transformées sur le CRC. Un effet initiateur de la cancérogenèse des aldéhydes est aussi suspecté puisqu'ils pourraient être à l'origine de mutations chez des cellules normales.

Les effets catalytiques du fer héminique peuvent être inhibés par certains constituants alimentaires. Le calcium, la chlorophylle et certains polyphénols ont la capacité de chélater l'hème, empêchant les réactions de nitrosation/nitrosylation et de peroxydation lipidique de se produire, et prévenant les effets délétères directs de l'hème sur la muqueuse colique ainsi que les effets liés aux produits de catalyse. D'autres composés issus de l'alimentation visent les réactions catalysées par l'hème. En présence d'antioxydants comme les vitamines C et E, la formation endogène des composés *N*-nitrosés est inhibée alors que les polyphénols peuvent inhiber la peroxydation lipidique et/ou la nitrosation/nitrosylation **(Figure 13, Bastide *et al.*, 2011).**

Il est donc possible de prévenir les effets cytotoxiques et génotoxiques du CRC de l'hème en ajoutant au régime alimentaire une complémentation en calcium, en antioxydants, notamment au cours des processus de fabrication des viandes transformées. Ainsi une alternative est possible aux dernières recommandations du **WCRF de 2011** qui préconise de limiter voire d'éviter de consommer de la viande rouge ou transformée. Cependant, une complémentation n'est pas à systématiser et nécessite des études plus approfondies car elle peut être à l'origine d'autres effets délétères comme c'est le cas pour le calcium, qui peut être à l'origine d'une carence en fer.

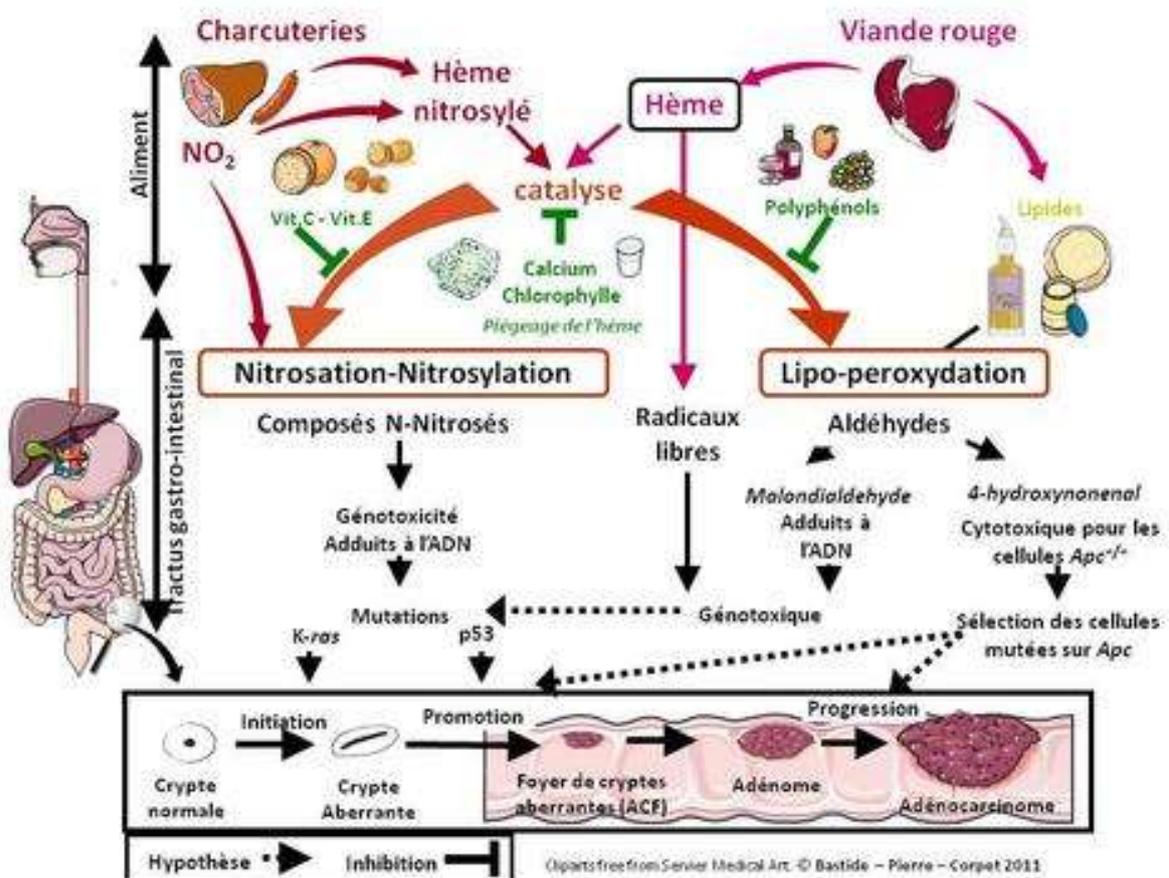


Figure 13 : Schéma représentant les effets catalytiques de l'hème sur la formation de composés N-nitrosés, la peroxydation lipidique et leur inhibition ainsi que les conséquences sur le développement du cancer colorectal.

Bastide *et al.*, 2011.

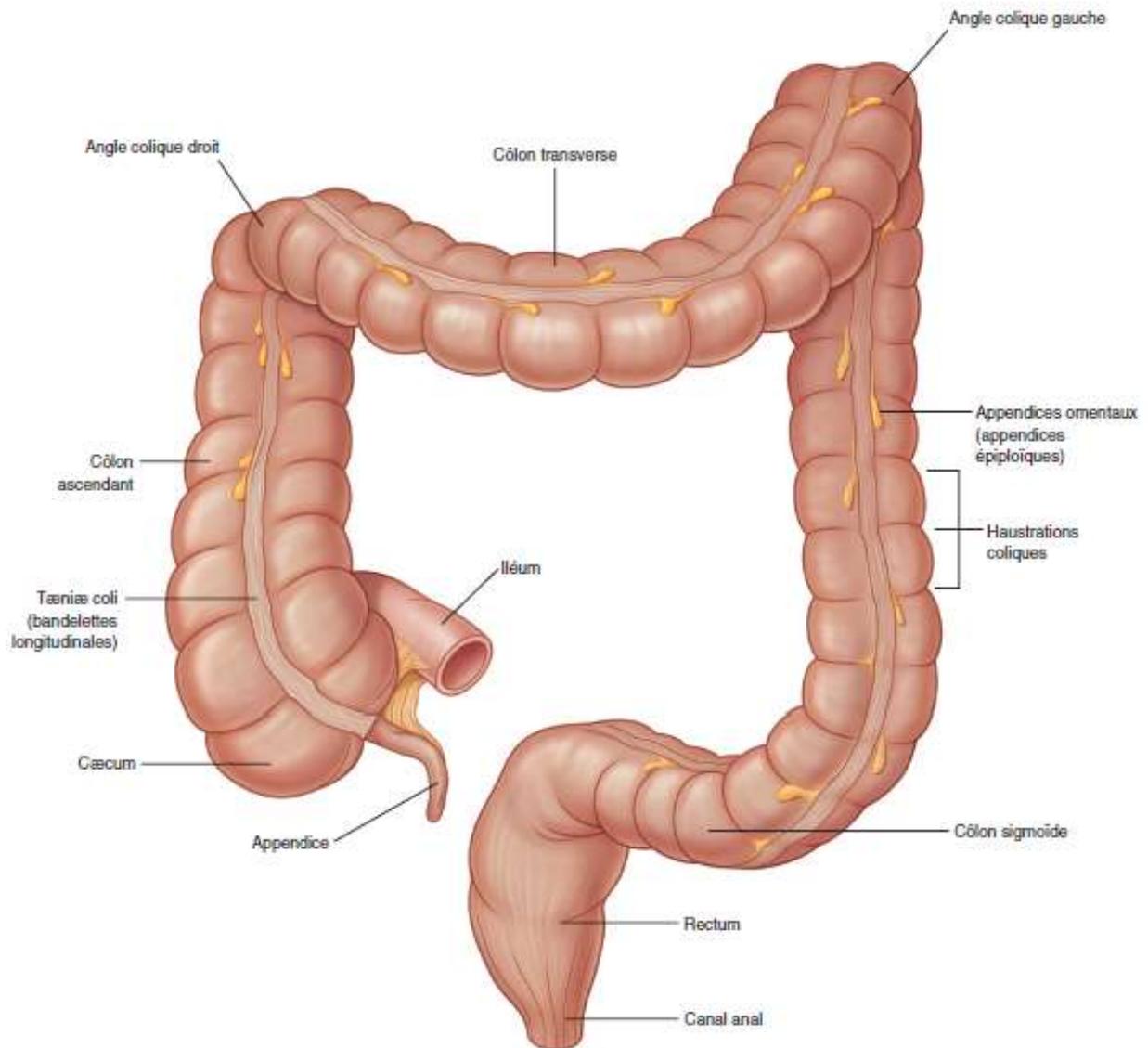
### **III. ANATOMIE, HISTOLOGIE COLIQUE ET LESIONS PRE-NEOPLASIQUES**

Dans cette 2<sup>ème</sup> partie, nous verrons l'anatomie, l'histologie et la physiologie normales du côlon et du rectum. Puis nous aborderons le développement des lésions néoplasiques lors de la cancérogenèse colorectale.

#### **1. Anatomie du côlon chez l'Homme**

##### **1) Morphologie externe**

Le côlon forme un cadre qui entoure le jéjunum et l'iléon. Commençant dans la fosse iliaque droite par le cæcum et l'appendice, il se poursuit par le côlon ascendant, qui va du flanc droit à l'hypochondre droit. Juste sous le foie, il tourne vers la gauche, formant l'angle colique droit, puis traverse l'abdomen jusqu'à l'hypochondre gauche, devenant le côlon transverse. À ce niveau, juste sous la rate, le côlon tourne vers le bas, formant l'angle colique gauche et se poursuit par le côlon descendant à travers le flanc gauche jusqu'à la fosse iliaque gauche. Il devient le côlon sigmoïde et pénètre dans la partie supérieure de la cavité pelvienne, puis se prolonge le long de la paroi postérieure du pelvis par le rectum. Le diamètre interne du côlon est plus grand que celui de l'intestin grêle. Le diamètre interne du côlon droit, en particulier le côlon sigmoïde, est plus grand que celui du côlon gauche. La surface externe du côlon est parsemée de petits amas graisseux, les appendices omentaux (**Figure 14, CDU-HGE, 2014a**).



**Figure 14 : Morphologie externe du côlon.**

Drake *et al.*, 2011 traduit de Gray's Anatomy for Students dans CDU-HGE, 2014a.

## 2) Vascularisation et innervation

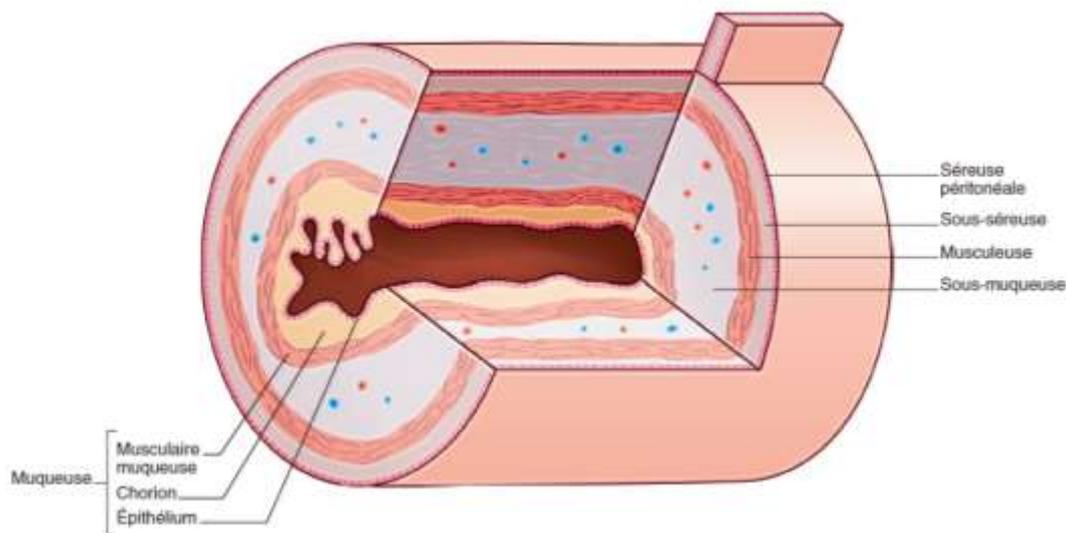
Les artères à destinée colique sont issues des artères mésentériques supérieure et inférieure. Les veines, satellites des artères, se jettent dans les veines mésentériques inférieure et supérieure, puis dans la veine porte. Le drainage lymphatique se fait par des nœuds lymphatiques le long des artères jusqu'à leur origine.

L'innervation du côlon est double : intrinsèque et extrinsèque. L'innervation intrinsèque est assurée par le plexus myentérique ou d'Auerbach et par le plexus sous-muqueux ou de Meissner. Ils régulent la motricité intestinale et les sécrétions des

glandes intestinales respectivement. L'innervation extrinsèque parasympathique et sympathique contrôle l'innervation intrinsèque. Le système parasympathique stimule la motricité intestinale et les sécrétions tandis que le système sympathique a une action inhibitrice (Toutain, 2008).

## 2. Histologie du côlon

La structure du gros intestin présente une remarquable uniformité et ceci quelle que soit l'espèce. On y retrouve les quatre tuniques du tube digestif qui sont spécifiquement dans son cas, de l'intérieur vers l'extérieur : une muqueuse, une sous muqueuse, une musculuse et une séreuse (Figure 15) (CDU-HGE, 2014b et Bourges-Abella, 2008).



**Figure 15 : Structure de la paroi digestive.**  
Carole Fumat, dans CDU-HGE, 2014b

La muqueuse (*Tunica mucosa*) se divise histologiquement en trois couches : un épithélium de revêtement (*Epithelium mucosae*), un chorion (*Lamina propria mucosae*) et une musculaire muqueuse (*Lamina muscularis mucosae*) (Figures 15, 16 et 17).

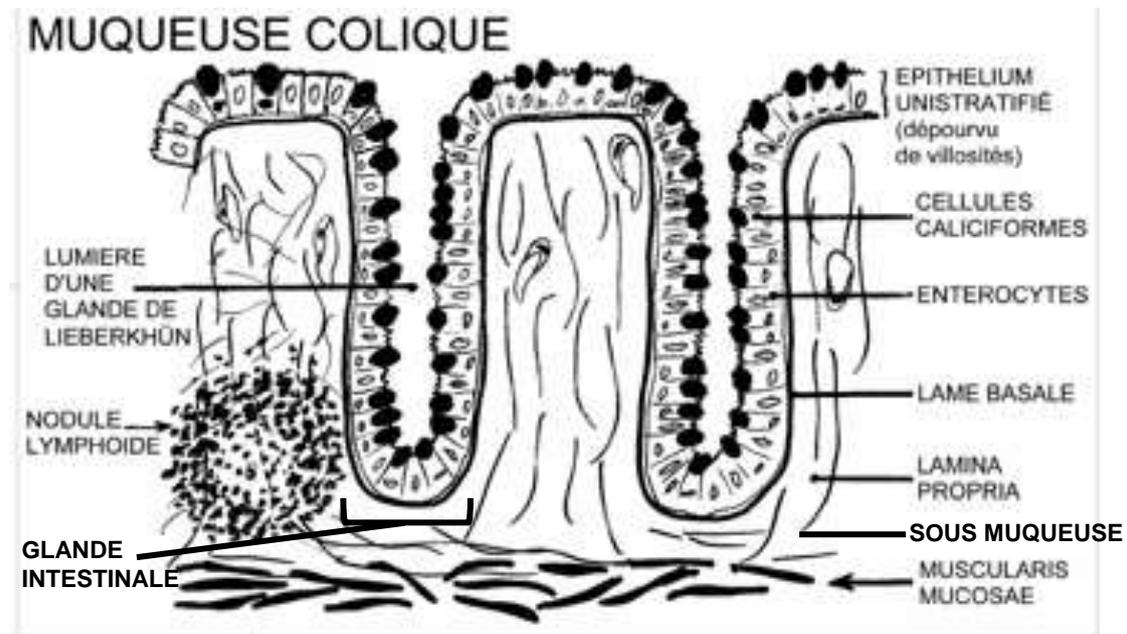


Figure 16 : Histologie de la muqueuse colique  
Pr. Daniel Balas, 2010.

## 1) La muqueuse

L'épithélium colique est simple (c'est-à-dire qu'il n'a qu'une couche de cellules) et cylindrique. Il s'invagine pour former les cryptes qui forment les glandes intestinales tubuleuses simples à bifurquées (ou glandes de Lieberkühn) et il est complètement dépourvu de villosités contrairement à l'intestin grêle. Cet épithélium est formé de différentes cellules : les cellules caliciformes, les épithéliocytes colonnaires, les cellules souches et les cellules argentaffines. Les cellules caliciformes (*Exocrinocyti califormes*), également appelées cellules à mucus, produisent une grande quantité de mucines protégeant la surface de l'épithélium intestinal des pathogènes et permettent la lubrification des parois. Les épithéliocytes colonnaires (*Epitheliocyti columnares villi*) ou colonocytes, sont les cellules les plus abondantes. Elles absorbent l'eau, les électrolytes et les produits alimentaires non digérés au niveau de l'intestin grêle. Les cellules souches sont peu nombreuses et se retrouvent principalement au fond des cryptes et permettent le renouvellement cellulaire. Le fonds des cryptes étant rempli de mucus, la localisation des cellules souches semble être un moyen de les protéger contre la toxicité du contenu intestinal. Les cellules argentaffines ou endocrinocytes gastro-intestinaux sont rares et visibles après imprégnation argentique. Elles sont situées entre la membrane basale et les cellules principales et produisent des hormones gastro-intestinales.

Le chorion est une couche de tissu conjonctif lâche infiltrée de nombreux lymphocytes et de nodules lymphatiques appartenant au tissu lymphoïde associé à la muqueuse digestive. La musculaire muqueuse présente des fibres musculaires lisses qui s'orientent en un plan superficiel longitudinal et un plan profond circulaire.

## 2) La sous-muqueuse

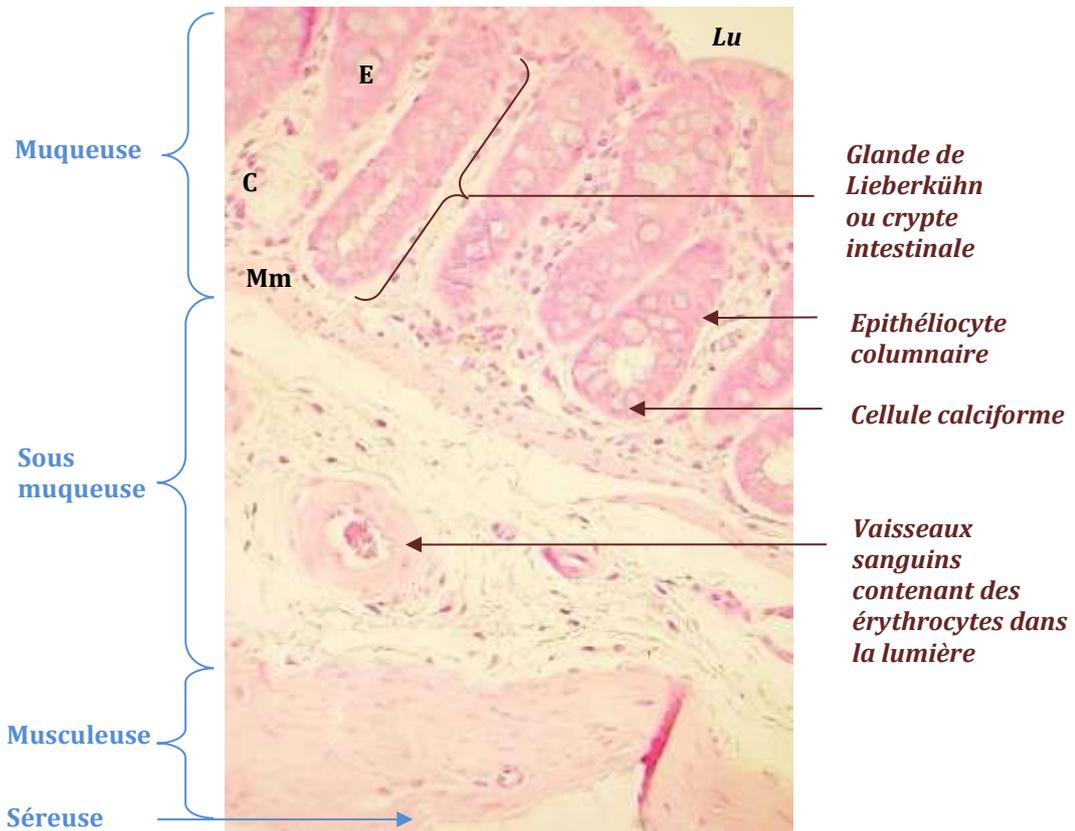
La sous-muqueuse (*Tela submucosa*) est une couche de tissu conjonctif plus dense que celle du chorion et contient les gros vaisseaux sanguins, des vaisseaux lymphatiques et le plexus sous muqueux. Des formations lymphoïdes appelées nodules lymphatiques se développent à ce niveau, ils appartiennent au tissu lymphoïde associé à la muqueuse digestive (**Figures 16 et 18**).

## 3) La musculuse

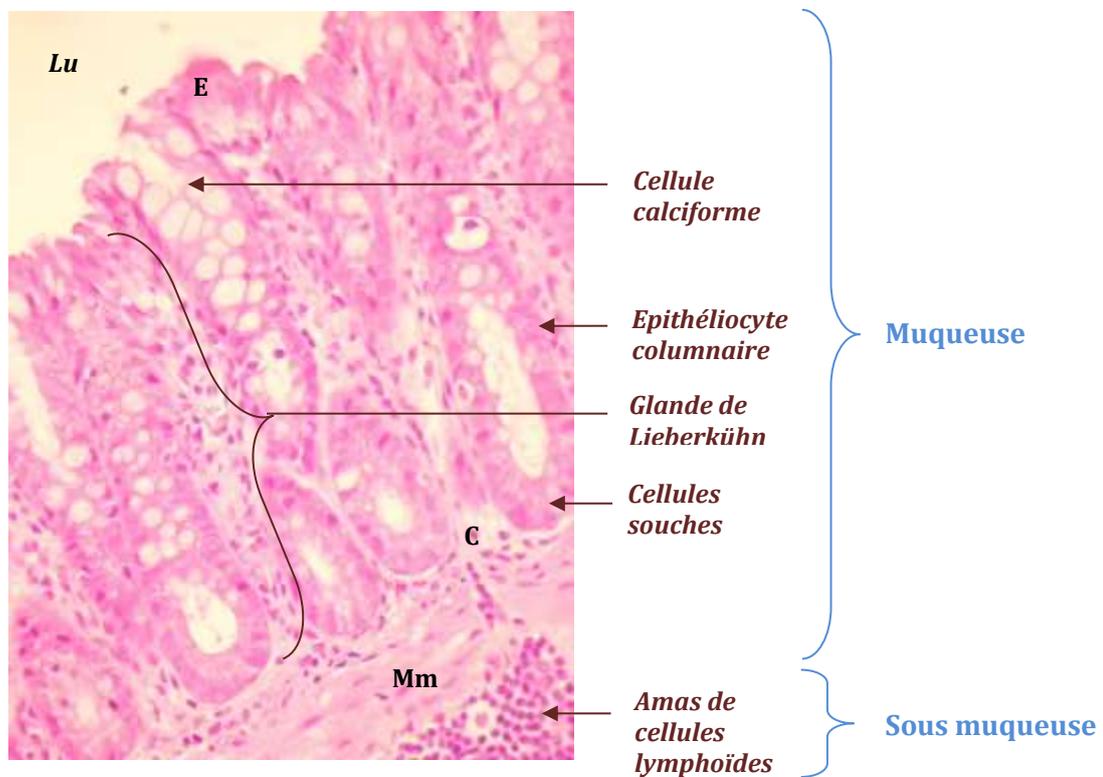
La musculuse (*Tunica muscularis*) est une couche de tissu musculaire lisse composée de deux couches distinctes de fibres caractérisées par leur orientation (**Figures 16 et 17**). La couche longitudinale externe de la musculuse est discontinue et est composée de trois bandes épaisses, les *Tænia coli*, alors qu'entre ces bandes, la musculuse longitudinale est quasi inexistante, seulement réduite à quelques fibres. Ces trois bandes, équidistantes, existent du cæcum jusqu'à la charnière recto-sigmoïdienne où elles fusionnent. La musculuse circulaire, interne, comporte des épaississements réguliers, les haustrations, qui délimitent entre les bandelettes longitudinales une succession de petites chambres séparées (**Figure 14**). Au niveau du rectum, ces deux couches sont complètes et épaisses et leur orientation devient spiroïde. Entre les deux couches se situe le plexus nerveux myentérique.

## 4) La séreuse

Comme les organes qui bordent les cavités pleurales, péricardiques et péritonéales, le côlon est revêtu d'une séreuse (*Tunica serosae*) (**Figures 16 et 17**). Elle est constituée d'une couche de tissu conjonctif bordée par un mésothélium d'aspect endothélial.



**Figure 17 : Observation des différentes structures histologiques du côlon de rat en coupe transversale, au microscope optique x 400 après coloration à l'Hémalun Eosine. Sarniguet C, 2016.**  
*Lu : lumière intestinale, E : épithélium, C : chorion, Mm : musculaire muqueuse*



**Figure 18 : Observation des différentes cellules de la muqueuse colique et d'amas de cellules lymphoïdes dans la sous muqueuse colique sur une coupe transversale côlon de rat au microscope optique x 400 après coloration à l'Hémalun Eosine. Sarniguet C, 2016.**  
*Lu : lumière intestinale, E : épithélium, C : chorion, Mm : musculaire muqueuse*

### 3. Particularités du rectum

Au niveau de la zone rectale, les glandes de Lieberkühn se raréfient, les cellules épithéliales deviennent cubiques et font place à un épithélium pavimenteux pluristratifié non kératinisé au niveau de la zone ano-rectale du canal anal, puis kératinisé au niveau de la zone ano-cutanée du canal anal et des glandes pilo-sébacées apparaissent (**Figure 19**).

La musculaire-muqueuse se termine progressivement au niveau du canal anal et ses faisceaux résiduels forment des soulèvements ou replis verticaux nommés « colonnes rectales de Morgagni » (**Figure 19**).

La musculature sphinctérienne comprend deux groupes de sphincters : le sphincter interne lisse, en renforcement des faisceaux musculaires lisses du prolongement de la tunique musculuse rectale. Le sphincter externe est strié, à la motricité « volontaire », formé de trois faisceaux musculaires (profond, longitudinal et sous cutané) (**Figure 19**) (CDU-HGE, 2014b).

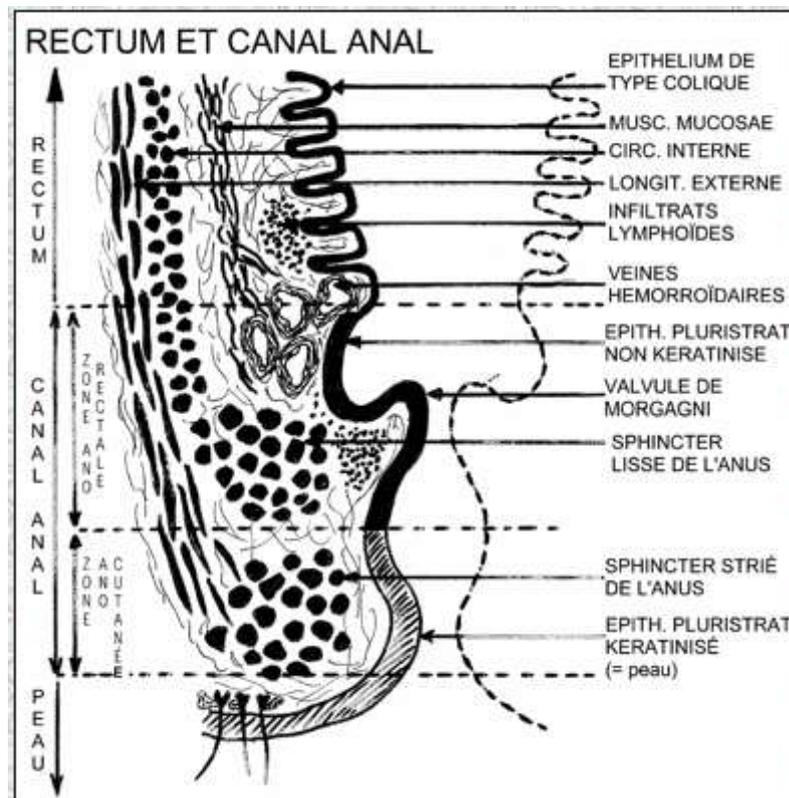


Figure 19 : Histologie du rectum et du canal anal  
Pr. Daniel Balas, 2010.

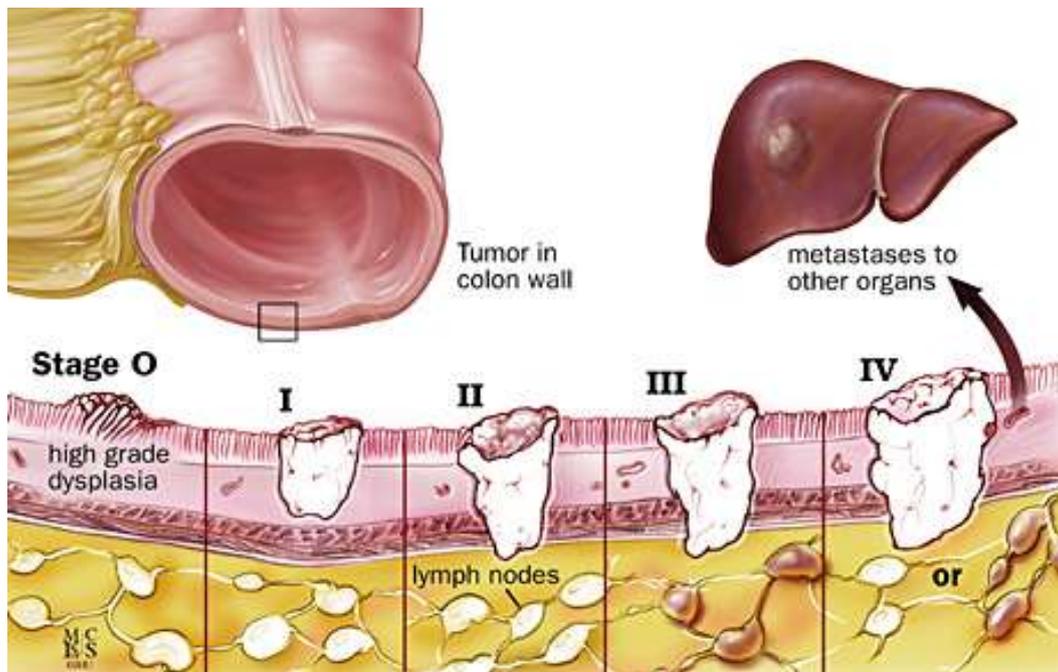
#### **4. Rôle physiologique du côlon**

Le côlon assure plusieurs fonctions : la transformation du bol intestinal, la progression et l'évacuation du bol fécal, la fermentation et la digestion colique.

Au niveau du côlon, les résidus liquides de l'intestin grêle sont transformés en matières solides non digestibles appelées fèces. Cette transformation fait intervenir la réabsorption d'eau et d'électrolytes qui a lieu pour 90% dans sa portion droite et transverse. Cette absorption d'eau est liée à l'absorption active de sodium. La progression et l'évacuation du bol fécal sont rendues possibles par un brassage du contenu réalisé par les contractions de la musculature et par sa propulsion vers le rectum grâce à des ondes péristaltiques irrégulières. La progression est facilitée par une importante sécrétion de mucus. La masse bactérienne du microbiote colique, par son abondance et sa diversité, génère un métabolisme bactérien qui permet de récupérer de l'énergie, notamment à partir des glucides non absorbés dans l'intestin grêle qui sont fermentés en acides gras volatils (acide butyrique C4) qui seront ensuite intégrés à la muqueuse ou participeront au métabolisme de l'organisme. En parallèle, les protéines non digérées dans l'intestin grêle sont transformées par le microbiote en acides aminés, amines, polyamines, ammoniac, acides gras et gaz. Le restant des lipides n'est ni digéré ni absorbé au niveau du côlon (CDU-HGE, 2014a).

#### **5. Envahissement des différentes couches histologiques du côlon par un processus tumoral et dissémination dans l'organisme**

Les carcinomes coliques proviennent dans la majorité des cas d'adénomes. Ils se développent d'abord au sein de la paroi colique en envahissant progressivement les différentes couches (de la muqueuse à la séreuse), puis métastasent vers les organes environnants (Figure 20).



**Figure 20 : Stades TNM (Tumeur-Nœud lymphatique-Métastase) du cancer colorectal et histologie du côlon.**

JHSPS, 2016.

Chaque stade est caractérisé par les éléments du stade précédent auxquels s'ajoutent de nouvelles caractéristiques :

Au stade 0, un carcinome se développe dans la muqueuse et envahit l'épithélium et possiblement le chorion.

Au stade I, une tumeur a envahi la muqueuse, la sous muqueuse et possiblement la musculuse.

Au stade II, la tumeur progresse et envahit la séreuse. Elle peut avoir envahi et pénétré le péritoine ou d'autres organes.

Au stade III, la tumeur a métastasé dans les nœuds lymphatiques régionaux.

Au stade IV, les métastases de la tumeur initiale disséminent dans n'importe quels nœuds lymphatiques et organes.

## 6. Les lésions pré-néoplasiques

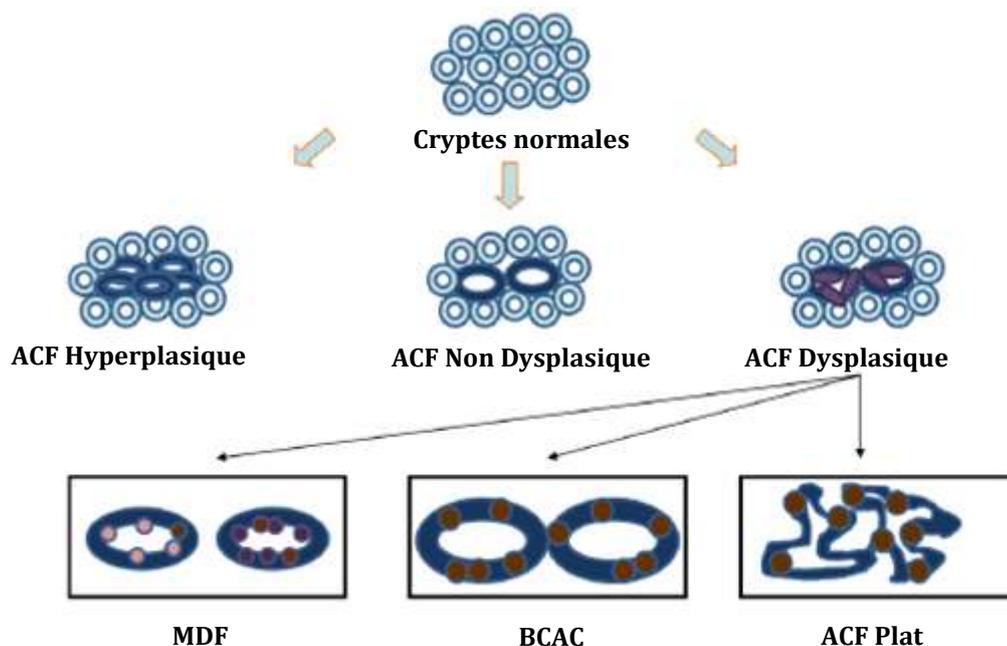
Nous allons d'abord présenter les différentes lésions pré-néoplasiques intervenant lors de la cancérogenèse colorectale en insistant sur les foyers de cryptes aberrantes qui sont utilisés dans le cadre de cette thèse.

### 1) Différentes lésions pré-néoplasiques

#### a. Généralités

Il existe 4 types de lésions pré-néoplasiques : les ACF (foyers de cryptes aberrantes), les MDF (foyers appauvris de mucines), les BCAC (cryptes accumulant de la

$\beta$ -caténine) et les ACF plats. Ces lésions sont surtout présentes chez les patients atteints de CRC. Elles peuvent être induites chez les rongeurs de laboratoire suite à l'injection d'agents carcinogènes comme l'azoxyméthane (AOM) afin d'étudier la promotion de la cancérogenèse colorectale. À l'origine, les ACF peuvent être de trois types : hyperplasique, non dysplasique ou dysplasique. Parmi les ACF dysplasiques on distingue les MDF, les BCAC et les ACF plats (**Figure 21**) (Wargovich *et al.*, 2010).

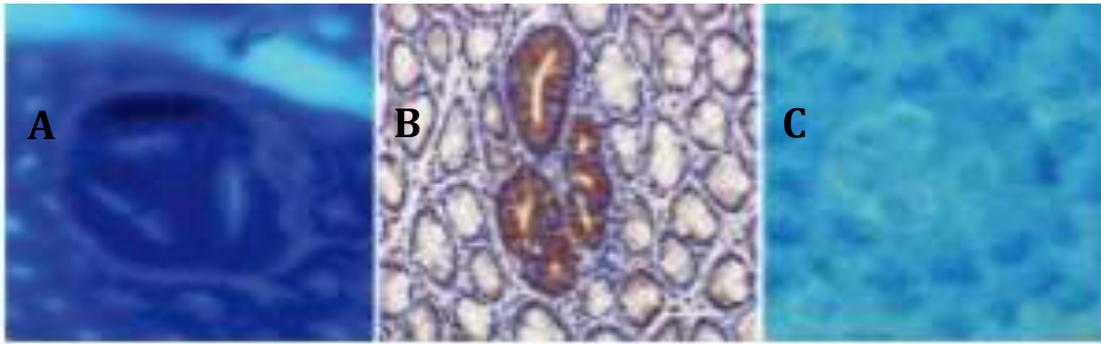


**Figure 21 : Les lésions pré-néoplasiques**

Wargovich *et al.*, 2010.

MDF : les cellules à mucus (rose) sont perdues et remplacées par des noyaux stratifiés (violet), accumulation possible de  $\beta$ -caténine (marron), BCAC : accumulation de  $\beta$ -caténine, ACF plat : accumulation de  $\beta$ -caténine avec cryptes pléomorphes hautement dysplasiques.

Les différentes lésions sont observables grâce à des colorations spécifiques (**Figure 22**). La coloration au bleu de méthylène (BM) permet la visualisation des trois types d'ACF qui présentent un épithélium bleu plus foncé et plus épais que les cryptes environnantes, une forme modifiée et la zone en périphérie du foyer augmentée. La coloration « high-iron diamine alcian blue » (HID-AB) colore les mucines des cryptes normales. Les cryptes non colorées donc appauvries en mucines correspondent aux MDF. Enfin, l'immunohistochimie sur coupes histologiques permet de mettre en évidence l'accumulation de  $\beta$ -caténine dans les BCAC.



**Figure 22 : Les différentes lésions néoplasiques après coloration.**

**(A)** ACF à 3 cryptes après coloration au BM. **(B)** BCAC avec accumulation cytoplasmique de  $\beta$ -caténine après coloration immunohistochimique. **(C)** MDF focal avec absence ou faible production de mucine (légère coloration bleue des cryptes) après coloration à l'HID-AB.

Suzui *et al.*, 2013.

## 2) Les foyers de cryptes aberrantes

### a. Biomarqueurs de cancérogenèse colorectale

Les Foyers de cryptes aberrantes (ACF) sont les manifestations histopathologiques les plus précoces du CRC. Chez l'animal, les ACF ont été découverts pour la 1<sup>ère</sup> fois chez l'oiseau par **Bird** en **1987**, puis ils ont été mis en évidence dans le côlon de rats suite à un traitement carcinogène spécifique du côlon. Chez l'Homme, les ACF sont présents à la fois chez les patients atteints de CRC mais aussi chez des personnes saines ou présentant des adénomes (**Takayama *et al.*, 2001**).

Leur morphologie et génotype sont similaires chez l'homme et l'animal. Leur nombre et leur croissance sont influencés par les modulateurs de la carcinogénèse du côlon et ils prédisent la survenue de tumeurs dans diverses études chez les rongeurs. Suivant les espèces, la taille et le nombre de cryptes par foyer augmente avec la dose d'agent carcinogène. Chez le rat et la souris, un traitement carcinogène d'azoxyméthane (AOM) à 5 mg/kg provoque la croissance d'ACF dès 2 semaines après traitement. Les ACF de petite taille sont généralement prédominants mais certains ACF présentent des critères de dysplasie, c'est-à-dire un développement et une morphologie anormaux, caractéristiques des lésions pré-néoplasiques (**Mc. Lellan et Bird, 1988**).

Chez l'Homme sain, avant 40 ans, le nombre d'ACF coliques est très bas mais augmente entre 40 et 50 ans, sans dépasser 5 ACF. Les patients atteints de CRC ont un nombre d'ACF coliques très augmenté sans rapport avec l'âge. Pour les patients atteints d'adénomes, le nombre d'ACF coliques est intermédiaire. Le nombre, la taille, le

caractère dysplasique des ACF coliques est corrélé au nombre de polypes chez les patients présentant des adénomes (**Takayama *et al.*, 1998, 2001**).

La localisation des ACF est variable suivant les espèces. Chez les souris traitées à l'AOM, 67% des ACF sont situés dans le segment rectal, 29% dans le segment moyen, et 4% dans le segment caecal. Chez le rat, les ACF sont principalement retrouvés dans le côlon moyen et distal après induction à l'AOM (**Mc Lellan et Bird, 1988**). Chez l'Homme, les ACF sont plus nombreux dans le côlon distal et le rectum contrairement au côlon proximal (**Shpitz *et al.*, 1998**).

### **b. Mutations génétiques associées**

Il existe deux séquences d'évolution des ACF en lésions néoplasiques. Selon la séquence « adénome à carcinome exophytique », le CRC se développe à partir de polypes adénomateux bénins qui, en accumulant les altérations génétiques après des années d'évolution, développent des caractéristiques malignes. Cela représenterait les 2/3 des cas de cancer. Selon la séquence « adénome plat à carcinome », le cancer se forme à partir d'adénomes plats de moins d'1 cm de diamètre. Ces lésions de petite taille sont malignes plus tôt et se répandent en général de façon plus agressive. Environ 30% des lésions colorectales sont des adénomes plats, dont 40% auraient un potentiel agressif malin avec un haut grade de dysplasie (**voir III.2.c.) (Alrawi *et al.*, 2006)**).

Le CRC est un processus pathologique impliquant de multiples gènes et modifications moléculaires. Les ACF peuvent présenter des mutations des gènes Apc, K-ras, p53 ainsi que des altérations épigénétiques et des déficiences des gènes de réparation des mésappariements de l'ADN. L'activité enzymatique de COX-2 (cyclooxygénase 2), de iNOS (« inductible nitricoxide synthase ») ainsi que l'expression des cadhérines (P-cadhérine et E-cadhérine, glycoprotéines impliquées dans l'adhésion cellulaire) sont augmentées comme c'est aussi le cas pour les carcinomes colorectaux. La répartition cellulaire des  $\beta$ -caténines et des CEA (« carcinoembryonic antigen », glycoprotéine impliquée dans l'adhésion cellulaire) est modifiée par rapport aux cellules des cryptes normales et correspond à celle des cellules des carcinomes. Les ACF présentent donc des caractéristiques génétiques et moléculaires similaires à celles des lésions néoplasiques, montrant qu'ils sont les stades précoces de la cancérogenèse

colorectale et que leur développement peut mener à la formation de carcinomes. (**Cheng et al., 2003**).

Différentes voies sont possibles lors de la cancérogenèse colorectale. En effet, les mutations K-ras et Apc ne sont pas présentes dans tous les ACF ni dans tous les adénomes et carcinomes chez l'Homme (**Yuan et al., 2001**). L'origine du CRC aurait aussi une influence sur le type de mutations génétiques et d'ACF rencontrés. Dans l'étude de **Takayama et al. (2001)**, les Hommes atteints de PAF présentaient 93,6% d'ACF dysplasiques alors que les patients atteints de CRC d'origine sporadique avaient 93% d'ACF non dysplasiques. La mutation du gène Apc était majoritaire chez les patients atteints de PAF, contrairement aux patients atteints de CRC d'origine sporadique chez qui la mutation des gènes K-ras était majoritaire (**Takayama et al., 2001**).

### c. Classification morphologique et histologique

#### i. Classification des ACF

Les ACF sont classés en trois catégories : les ACF non dysplasiques, hyperplasiques et enfin dysplasiques (**Tableau 6**).

Caractéristiques	ACF non dysplasique	ACF hyperplasique	ACF dysplasique
<b>Coloration</b>	Plus sombre		
<b>Taille</b>	Augmentée		
<b>Topographie</b>	En surélévation par rapport aux autres cryptes		
<b>Diamètre</b>	Augmenté		
<b>Lumière</b>	Dilatée	Mixte	Crantée à fermée
<b>Quantité de mucines</b>	Normale	Diminuée	Absence
<b>Polarité nucléaire</b>	Normale, noyaux en position basale	Normale à anormale	Perte de polarité, noyaux en position apicale
<b>Morphologie nucléaire</b>	Noyaux ronds et non stratifiés	Mixtes	Noyaux allongés et stratifiés
<b>Prolifération</b>	Dans les 2/3 inférieurs des cryptes	Progression vers le haut des cryptes	Progression dans l'ensemble des cryptes

**Tableau 6 : Caractéristiques générales et histologiques des ACF chez les rongeurs.**

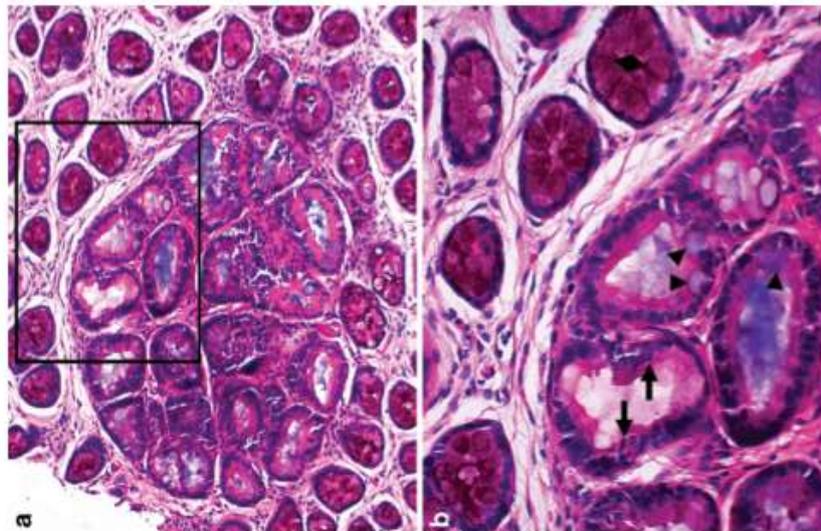
D'après Wargovich et al., 2010

Les ACF non-dysplasiques présentent des cryptes plus grosses (au moins de taille multipliée par 1,5), une hypercellularité, des noyaux orientés en position basale, peu à non modifiés (élongation et élargissement faible), non stratifiés (une seule assise de noyaux) et des mucines en position apicale. C'est au fond des cryptes que se trouvent les cellules prolifératives.

Les ACF hyperplasiques ont une structure histologique analogue à celle des polypes hyperplasiques du côlon. Les cryptes qui les composent sont surélevées par rapport à la muqueuse environnante, plus longues, peuvent être ramifiées et présenter une lumière crénelée. Les noyaux peuvent être plus gros, rassemblés sans stratification observable. Une diminution des mucines est possible. La prolifération cellulaire est étendue à mi-hauteur de crypte.

Les ACF dysplasiques sont assimilés à des microadénomes et certains sont associés à la présence de carcinomes. Ils sont crantés, hypercellulaires, leurs noyaux sont plus gros, rassemblés, peuvent être stratifiés (c'est-à-dire présenter plusieurs assises de noyaux) et migrer en zone apicale. Une diminution des mucines est présente (**Figure 23**). La prolifération cellulaire progresse jusqu'à la surface de la crypte.

Certains ACF présentent des caractéristiques d'ACF hyperplasiques et dysplasiques et sont considérés comme mixtes. (**Suzui *et al.*, 2013, Cheng *et al.*, 2003**).



**Figure 23 : Cryptes intestinales colorées à l'HID-AB puis à l'HE montrant la perte en mucine des ACF dysplasiques.**

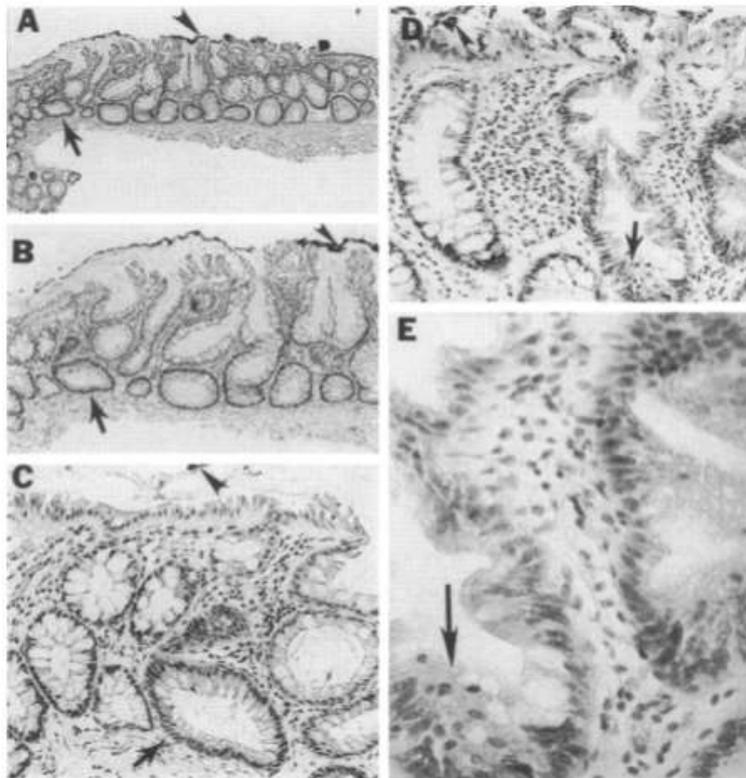
Flèches : noyaux allongés. Coloration HID (sulfomucine) visible sur les cryptes environnantes (losange), contrairement aux ACF environnants. La coloration AB (sialomucine) est visible dans les cellules à mucus (triangle). Les ACF dysplasiques ne prennent aucune des colorations. **a.** microscope x100, **b.** x400  
McGinley *et al.*, 2010.

## ii. Classification des ACF dysplasiques

Les ACF dysplasiques peuvent être classés suivant différents critères de dysplasie (Siu *et al.*, 1997).

Les ACF légèrement dysplasiques ont des noyaux élargis et peu stratifiés. La perte de mucines est supérieure à celle des ACF hyperplasiques et non dysplasiques. La **Figure 24** (de A à C) montre des noyaux de taille augmentée (flèches) et une faible stratification nucléaire.

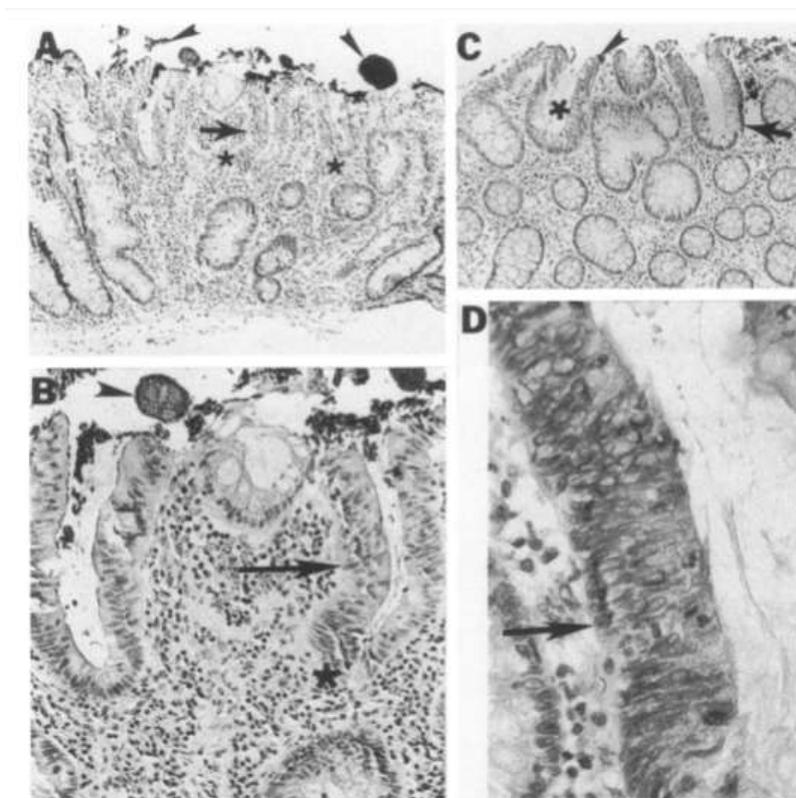
Les ACF moyennement dysplasiques ont des noyaux pléomorphes (à la taille et forme variées), plus stratifiés et présentent une perte de mucines plus importante. La **Figure 24** (de D et E) montre des noyaux pléomorphes et de taille augmentée (flèches) dont certains ont migré en position apicale ou deviennent stratifiés.



**Figure 24 : Coupes histologiques d'ACF légèrement et moyennement dysplasiques.**  
Têtes de flèches : ACF. Observés au microscope optique avec les grossissements Ax34, Bx65, C et Dx165 et Ex260.  
Siu *et al.*, 1997.

Les ACF sévèrement dysplasiques, marqués par une tête de flèche sur la **Figure 25**, ont des noyaux hautement pléomorphes et stratifiés, dont certains ont migré en position apicale (marqués d'une flèche). Une augmentation conséquente de l'activité mitotique

est associée. La perte de mucines est encore plus marquée que dans les ACF moyennement dysplasiques. Des carcinomes peuvent être mis en évidence dans ces ACF.



**Figure 25 : Coupes histologiques d'ACF sévèrement dysplasiques.**

Têtes de flèches : ACF. Observés au microscope optique avec les grossissements A et C x65, Bx165, Dx260.  
Siu *et al.*, 1997.

La plupart des ACF dysplasiques sont légèrement dysplasiques, on retrouve peu d'ACF dans les grades de dysplasie les plus élevés. Ainsi, sur l'ensemble des ACF, seulement très peu ont la capacité de progresser en cancer.

#### **d. Mise en évidence des ACF chez l'Homme**

Les études sur les ACF se font surtout sur des échantillons chirurgicaux ou nécropsiques observés au microscope. Il est maintenant possible de les observer par endoscopie (« high-magnification-chromoscopic-colonoscopy ») après coloration. Cette technique permet un grossissement d'un facteur 13 à 150, et les ACF et d'autres lésions précancéreuses et cancéreuses sont visualisés après coloration au Bleu de Méthylène, à l'Indigo Carmine ou occasionnellement au Crystal Violet qui, bien que toxique *in vitro*, peut être utilisé dans certaines circonstances (Alrawi *et al.*, 2006).

### e. Controverse

Les ACF sont utilisés depuis plusieurs années comme lésions pré-néoplasiques de référence lors d'étude de la cancérogenèse colorectale à court terme. Dans plusieurs études, les ACF sont induits par un agent carcinogène et évoluent de façon cohérente en fonction de la présence d'agents inhibant ou promouvant la cancérogenèse (**McLellan et Bird, 1988 et Caderni et al., 2003**). Cependant, certaines études rapportent le manque de corrélation entre l'induction des ACF et le développement de tumeurs. En effet, les études de **Magnusson et al., 1993** et **Femia et al., 2004** ont montré qu'après traitement de rats à l'acide cholique, un agent promoteur de la cancérogenèse colorectale, le nombre d'ACF a diminué alors qu'une augmentation était attendue.

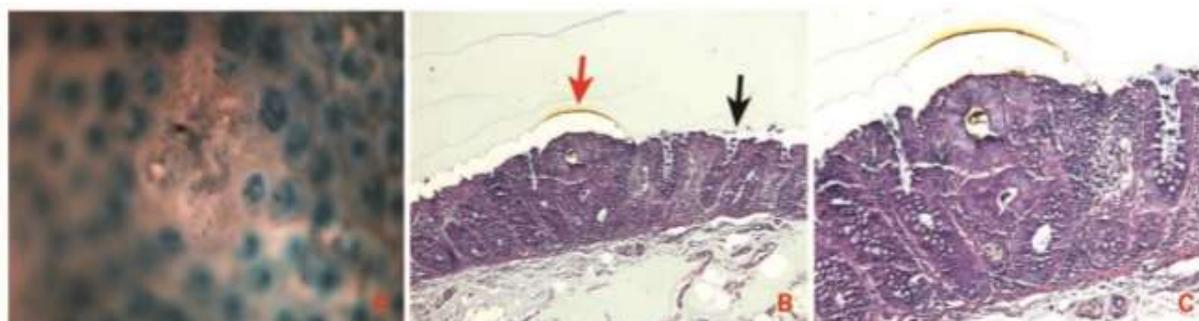
D'autres lésions comme les BCAC ont été décrites et pourraient être utilisées comme biomarqueurs additionnels, mais leur identification, qui n'est possible qu'après marquage immunohistochimique de coupes de côlon, est un inconvénient majeur. Les MDF, lésions caractérisées par l'absence ou la diminution de production de mucines, seraient des biomarqueurs plus intéressants et plus fiables de la cancérogenèse, mais aussi plus faciles à mettre en évidence que les BCAC. L'étude de **Femia et al., 2004** citée précédemment a montré qu'après induction de la cancérogenèse avec l'AOM chez des rats traités par de l'acide cholique, le nombre d'ACF a diminué alors que le nombre de MDF a augmenté. Il n'y a donc pas toujours une bonne corrélation du nombre de MDF et d'ACF et dans ce cas, seuls les MDF seraient marqueurs de la cancérogenèse colorectale. De plus, leur nombre est mieux corrélé avec le nombre de tumeurs que le sont les ACF. Dans cette étude, une injection d'AOM à 20mg/kg a induit 200 ACF par côlon contre moins de 10 MDF par côlon soit le même ordre de grandeur que le nombre de tumeurs (**Suzui et al., 2013**).

### 3) Les foyers appauvris en mucines, les cryptes accumulant la $\beta$ -caténine et les foyers de cryptes aberrantes plats

#### a. Les foyers appauvris en mucines

Les foyers appauvris en mucines (MDF) sont des cryptes dysplasiques produisant peu ou pas de mucines (**Figure 26**). Ils sont corrélés avec la carcinogenèse et peuvent

servir de biomarqueur de CRC. Les MDF partagent des mutations communes avec des lésions plus avancées, c'est le cas des mutations des gènes Apc et K-ras mais aussi de la mutation du gène exprimant la  $\beta$ -caténine qui mime l'activation de la voie des Wnt comme lors de mutations sur le gène Apc (**Femia et al., 2004**). Chez le rat, la quantité et la taille des MDF sont corrélées à la dose d'agent carcinogène injectée, mais aussi au temps écoulé. Suite à 2 injections sous cutanées à 15 mg/kg d'AOM chez le rat, 7 semaines après le 1<sup>er</sup> traitement, 4 MDF et 271 ACF ont été comptabilisés et 15 semaines après le 1<sup>er</sup> traitement, 8 MDF et 289 ACF ont été dénombrés (**Suzui et al., 2013**). De plus, le manque de mucus entraîne une inflammation locale contribuant à la croissance des MDF (**Sakai et al., 2012**). Les MDF sont présents chez l'Homme, surtout chez les individus présentant un risque élevé de CRC comme les patients atteints de PAF, et à un moindre niveau chez les individus présentant un CRC sporadique.



**Figure 26 : MDF colorés à l'HID-AB.**

Caderni et al., 2003.

(A) MDF de 6 cryptes d'un patient atteint de PAF observé au microscope x10.

(B) et (C) Coupes histologiques de (A) observées au microscope x10 et x20 respectivement, représentant un microadénome de bas grade de dysplasie, Flèche rouge : MDF, Flèche noire : crypte normale.

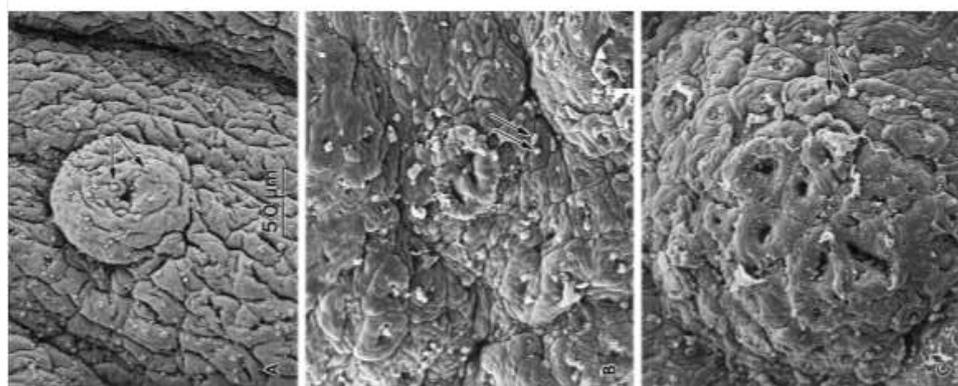
Les MDF sont identifiés après coloration à l'high-iron diamine alcian blue (HID-AB). Le diméthyl-phénylènediamine (HID) colore spécifiquement les sulfomucines en brun-noir et le bleu alcian (AB) colore les sialomucines en bleu cyan. Les cellules à mucus des MDF produisent des mucines différentes de celles produites par les cryptes normales. Les MDF ont plus de sialomucines et moins de sulfomucines. Ce sont des lésions focales, distinctes et en surélévation par rapport aux cryptes environnantes, caractérisées par l'absence ou la production limitée de mucines en comparaison avec les cryptes environnantes. Certains MDF sont aussi classés comme des ACF dysplasiques appauvris en mucines. Histologiquement, ils correspondent à des microadénomes de grade de dysplasie faible à modéré (**Caderni et al., 2003, Femia et al., 2004**).

### b. Les cryptes accumulant de la $\beta$ -caténine

Les cryptes accumulant de la  $\beta$ -caténine sont des lésions focales des cryptes caractérisées par une accumulation de  $\beta$ -caténine visible après coloration immunohistochimique de coupes histologiques de côlon. Chez des rats ayant été traités avec de l'AOM, des BCAC ont été observées 10 semaines après le 1<sup>er</sup> traitement. Les cryptes étaient macroscopiquement normales mais histologiquement elles présentaient une hypercellularité ainsi que d'autres anomalies. Dans 86% des cas, une mutation sur le gène codant pour la  $\beta$ -caténine a été mise en évidence, entraînant l'accumulation de  $\beta$ -caténine dans ces cryptes anormales (Suzui *et al.*, 2013).

### c. Les foyers de cryptes aberrantes plats

Les ACF plats ou ACF min ont d'abord été mis en évidence chez les souris min/+. Ils présentent des cryptes petites ou élargies, non surélevées par rapport aux cryptes environnantes, une ouverture luminale ronde ou allongée et ont des caractéristiques de dysplasie. Les ACF plats peuvent évoluer rapidement d'une simple crypte à un adénome. Leur détection est possible avec le bleu de méthylène (taille augmentée, apparence plate et cachée par la muqueuse environnante) mais aussi par microscopie électronique à transmission. Ces ACF sur-expriment la  $\beta$ -caténine, présentent surtout une mutation des gènes K-ras plutôt que du gène Apc (Figure 27) (Paulsen *et al.*, 2001 et Suzui *et al.*, 2013).



**Figure 27 : ACF observés au microscope électronique de souris Min/+ après traitement à l'AOM.**  
Paulsen *et al.*, 2001.

**(A)** ACF classique : surélevé, **(B)** Petit ACF min reconnaissable à des cryptes élargies plates, **(C)** ACF min plus gros reconnaissable à ces cryptes élargies, plus épaisses mais d'apparence plate, associé à une perte des cellules à mucus. Flèches : cellules à mucus

## **2<sup>ème</sup> PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE**

# I. PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Ma thèse a pour but de rechercher un effet co-initiateur du 4-HNE et du fer héminique, sous la forme d'hémine ou d'hémoglobine, sur la cancérogenèse colorectale, à partir du dénombrement et de la taille des lésions pré-néoplasiques de type ACF. Mon travail faisant partie d'une étude de la thèse universitaire de Julia Keller, mes résultats seront confrontés avec ceux de l'ensemble de l'étude.

## 1. Choix du modèle animal

Les modèles d'animaux et cellulaires sont nécessaires pour compléter les données épidémiologiques qui montrent surtout des effets d'associations de composés issus de l'alimentation et non des relations directes de causalité. Ces modèles permettent donc d'étudier l'effet de constituants précis de l'alimentation sur l'initiation et la promotion du CRC, mais aussi de tester l'efficacité de certains agents préventifs. Cependant, l'apparition de tumeurs colorectales spontanées chez les rongeurs reste relativement rare et nécessite une durée d'expérimentation longue, qui d'un point de vue éthique est discutable (**Tableau 7**).

	Avantages	Inconvénients
<b>Rats chimio-induits</b>	Cancérogenèse similaire à celle de l'Homme Cancers principalement dans le côlon comme chez l'Homme Lésions pré-néoplasiques quantifiables	Usage de cancérigènes auxquels l'Homme n'est pas exposé
<b>Souris Min</b>	Cancérogenèse spontanée Mutation Apc clé de la cancérogenèse chez l'Homme	Cancers principalement dans l'intestin grêle

**Tableau 7 : Avantages et inconvénients des principaux modèles de cancérogenèse colorectale.**  
D'après Femia et Caderni, 2008.

### 1) Modèle choisi : Rats chimio induits

Les études ayant pour but de définir les effets d'un agent nutritionnel sur l'initiation de la cancérogenèse présentent une forte contrainte temporelle. En effet, le temps nécessaire à l'apparition de lésions pré-néoplasiques ou tumorales approche les

deux années d'exposition chez la souris (**Yang et al., 2008**). Pour éviter cette importante contrainte de temps, il est nécessaire de co-initier la cancérogénèse avec un agent chimique. Si un composé testé est donné avant chimio-induction, on recherche alors un effet initiateur ou éventuellement co-initiateur. Si l'agent est donné après chimio-induction, on recherche alors un effet promoteur ou éventuellement co-promoteur. La comparaison du nombre de lésions pré-néoplasiques 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.

Les deux cancérigènes coliques les plus utilisés sont la diméthylhydrazine (DMH) et son métabolite l'azoxyméthane (AOM). L'AOM est utilisé pour sa capacité à initier la cancérogénèse colorectale, mais joue aussi un rôle promoteur. Comme chez l'Homme, la cancérogénèse débute par des lésions précancéreuses visibles dès 8 à 12 semaines après traitement cancérigène, et évolue avec le développement de tumeurs visibles dès 40 semaines (**Perse et Cerar, 2011**). Les tumeurs colorectales induites chez le rat par ces agents cancérigènes ont beaucoup de caractéristiques histopathologiques communes avec les tumeurs colorectales humaines. Le développement des lésions préneoplasiques et des carcinomes est similaire, et présentent dans 30 à 60% des cas une mutation sur les gènes K-ras. Comme dans les tumeurs humaines mutées sur Apc, ces tumeurs accumulent la  $\beta$ -caténine dans le noyau, même si contrairement à ces dernières, elles présentent rarement une mutation du gène Apc (8%), et jamais de mutation du gène p53 (**Corpet et Pierre, 2005**).

Il existe différents protocoles d'utilisation de l'AOM où il est administré en une ou plusieurs injections sous cutanées ou intra-péritonéales à des doses variables. Les premières lésions néoplasiques apparaissent dès 2 semaines après le traitement et leur comptage peut être réalisé dès 4 à 10 semaines. **Suzui et al. (2013)** utilisent différents protocoles efficaces : 2 injections à 20 mg/kg provoquent 93-139 ACF/côlon, 2 injections à 40 mg/kg provoquent 175-200 ACF/côlon 5 à 8 semaines après le début du traitement et 3 injections à 15 mg/kg induisent 240 ACF/côlon 11 semaines après le début du traitement. Nous avons choisi d'injecter par voie intra-péritonéale à des rats F344 une dose unique d'azoxyméthane à 20 mg/kg comme dans l'étude de **Femia et al., (2004)**, qui avait permis d'induire 200 ACF/côlon 10 semaines après traitement.

## 2) Modèles génétiques possibles

Le 1<sup>er</sup> modèle génétique est apparu dans les années 1990 avec la découverte par **Moser *et al.* (1990)** de la souris Min (« Multiple Intestinal Neoplasia ») mutée sur le gène Apc. Ces souris de souche C57BL6/J développent spontanément des adénomes en 10 à 12 semaines, principalement au niveau de l'intestin grêle (**Su *et al.*, 1992**). Elles présentent une mutation du gène Apc similaire à celle observée chez les patients atteints de PAF, et dans de nombreux cancers colorectaux sporadiques. En revanche, les mutations des gènes K-ras et de p53 n'ont pas été détectées chez la souris Min, contrairement à ce que l'on observe chez l'Homme. La majorité des tumeurs sont retrouvées dans l'intestin grêle et non au niveau du côlon comme chez l'Homme. Pour certains composés qui nécessitent un métabolisme colique, comme les fibres alimentaires, ou lorsque l'on veut étudier l'effet du microbiote, la localisation préférentiellement grêle est une limite. De plus, les ACF utilisés comme biomarqueurs de la cancérogenèse et les adénocarcinomes sont rarement retrouvés dans ce modèle (**Corpet et Pierre, 2005**).

D'autres modèles génétiques ont été développés pour mimer la mutation du gène Apc comme les rats Pirc (**Irving *et al.*, 2014**), mais aussi pour mimer d'autres maladies colorectales familiales comme le syndrome de Lynch, avec des souris mutées pour les gènes Msh2 et Mlh1.

## 2. Etudes préliminaires

### 1) Exposition colique au 4-HNE

Afin de mieux étudier les effets de l'exposition du côlon au 4-HNE, l'équipe avait pour objectif de faire parvenir le 4-HNE en concentration connue jusqu'au côlon sans dégradation en amont. Des microcapsules ou microbilles à dégradation lente ont été utilisées mais n'ont pas donné de résultats satisfaisants. L'administration par voie orale via la supplémentation dans l'alimentation a montré une bonne corrélation entre la quantité de 4-HNE ingérée et sa concentration dans les eaux fécales. L'ingestion de 2 mg/jour de 4-HNE engendre une concentration de 1,4  $\mu$ M dans les eaux fécales, ce qui

correspond à l'exposition du côlon au 4-HNE après consommation d'un régime riche en viande rouge chez le rat.

## 2) Choix des doses de 4-HNE

Les différentes doses de 4-HNE testées ont confirmé l'efficacité de l'administration par voie orale du 4-HNE pour exposer le côlon. Les doses suivantes ont été utilisées (**Tableau 8**) :

Dose de 4-HNE	Aliment équivalent
2 mg/20g de régime (100 mg/kg)	Régime contenant une huile fortement oxydée représentant 15% du régime
0,2 mg/20g de régime (10 mg/kg)	Viande (approximation)
0,02 mg/20g de régime (1 mg/kg)	Aliments faiblement contaminés

**Tableau 8 : Doses de 4-HNE testées et équivalence dans l'alimentation.**  
Keller, 2016.

Dans l'étude de co-initiation, la forte dose de 4-HNE (100 mg/kg) a été choisie dans le but de tester l'exposition à une dose maximale de 4-HNE possible dans l'alimentation sur une courte durée de 15 jours.

## 3) Choix des doses de fer

Dans l'étude de **Guéraud *et al.* (2014)**, le régime expérimental utilisé à base d'hémine à 0,94 g/kg d'aliment et le régime témoin complémenté en fer citraté à 0,36 g/kg d'aliment ont été préparés afin d'obtenir une quantité similaire en fer soit 80 mg/kg. A cette dose, les eaux fécales du régime riche en hémine étaient cytotoxiques pour les cellules coliques de souris. Dans l'étude co-initiation, les mêmes quantités en hémine et en fer citraté ont été utilisées. La quantité d'hémoglobine a été ajustée à 25 g/kg d'aliment pour obtenir la même quantité de fer dans le régime hémoglobine. A cette dose, **Bastide *et al.* (2015)** ont montré qu'un régime hémoglobine est associé à l'augmentation du nombre de tumeurs chez la souris Min.

#### **4) Etude préliminaire « génotoxicité » de l'hème et du 4-HNE sur court terme**

La manipulation « co-initiation » s'est déroulée en 2 études : une étude préliminaire a été réalisée afin de voir si des effets génotoxiques étaient possibles après seulement 2 semaines d'exposition de la muqueuse colique à l'hémine ou au 4-HNE avant de mettre en place une expérience longue et coûteuse.

### **3. Protocole de l'étude long terme « co-initiation »**

#### **1) Animaux**

Les expérimentations animales de l'étude co-initiation ont été prises en charge avant mon arrivée par mesdames Françoise GUERAUD (Directrice de Recherche), Julia KELLER. (Doctorante), Nathalie NAUD (Technicienne) et Edwige-Marie PRALET (CDD, Ingénieur d'Etude).

100 rats mâles Fischer de 4 semaines (F344/IcoCrl) ont été achetés chez Charles Rivers et placés dans l'animalerie de l'INRA Toxalim, dans une salle climatisée à 22°C avec un cycle jour/nuit de 12h (8h-20h). À leur arrivée, les animaux ont été répartis dans des cages grillagées en randomisant leur répartition dans les groupes de traitement selon leur portée si possible, sinon selon leur carton d'envoi (correspondant à leur cage d'hébergement chez le fournisseur). Une seconde randomisation a été faite 5 jours après dans le but d'équilibrer les poids entre les groupes (à +/-2g), en s'efforçant de conserver la répartition homogène des portées entre les groupes.

#### **2) Groupes expérimentaux**

Les animaux ont été placés 7 jours en période d'adaptation dans les cages grillagées, avec le régime témoin AIN76 sans citrate de fer (TSF) sous forme de poudre.

Les régimes expérimentaux ont été distribués quotidiennement *ad libitum* pendant 14 jours avant une injection intra-péritonéale d'azoxyméthane (AOM) à 20 mg/kg (**Tableau 9**).

Ces régimes sont répartis en deux lots différents : le lot « HNE » et le lot « fer ».

Les régimes du lot « HNE » sont composés du régime témoin sans fer TSF et du régime complétement en 4-HNE. L'absence de complémentation en fer permet de s'affranchir de son rôle éventuel dans la co-initiation du CRC et d'étudier seulement l'impact du 4-HNE.

Les régimes du lot « fer » sont composés du régime témoin TCF, complétement en fer citraté (source de fer non héminique), du régime « hémine » (c'est-à-dire la forme oxydée de l'hème) et du régime « hémoglobine » dont la source de fer est héminique. La comparaison avec le régime TSF permettra de conclure à un effet co-initiateur du fer peu importe sa forme. De plus, on cherchera à savoir si la source de fer héminique a une importance en comparant un régime à base d'hémine et un régime à base d'hémoglobine.

Suite à l'induction, les animaux ont reçu le régime témoin correspondant à leur lot pendant 60 jours, distribué tous les 2 à 3 jours *ad libitum*. Lors de cette période, les animaux ont été transférés en cage sur litière par groupe de 2 animaux du même groupe lors des 46 premiers jours, avant de retourner en cages grillagées individuelles pour les 14 derniers jours, dans le but de récolter les fèces quotidiennement et individuellement (Figure 28).

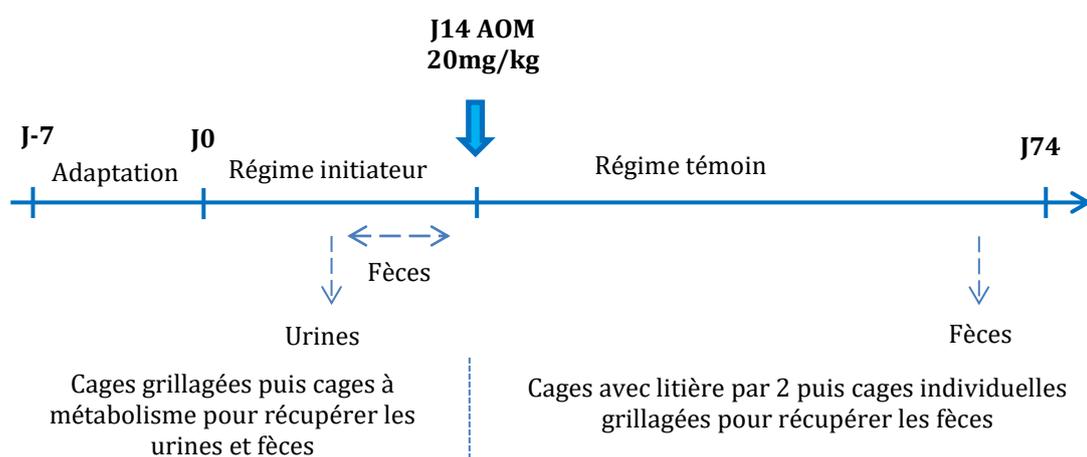


Figure 28 : Protocole, régimes expérimentaux

Régime : Groupes N=20	TSF	HNE	TFC	HEM	HB
	Témoin sans fer citraté	HNE 'forte dose'	Témoins avec fer citraté	hémine	hémoglobine
Base AIN76 modifiée	95%		92.5%		
Huile de carthame	5%				
HNE	/	2mg/20g de régime	/	/	/
Hémine	/	/	/	0.094% Soit 1.44µmol/g de régime	
Hémoglobine	/	/	/	/	2.5% du régime
Fer citraté	/	/	0.036%	/	/
Caséine	/		2.5%		

**Tableau 9 : Constitution des régimes des différents groupes expérimentaux**

Le régime de base AIN76 est composé de (g/100g) : Caséine purifiée pauvre en calcium 21, C.starch 15,74, Sucrose 52,5, Cellulose 5.25, Methionine 0,31, Mélange minéral sans calcium 3,67, Vitamine type AIN76 1,05, Phosphate de calcium 0,28, Choline bitartrate 0,21.

### 3) Mesures et récoltes

Les rats ont été pesés à la réception (J-7), à J-2, J5, J12, J19 puis toutes les 2 semaines. La consommation d'aliments a été évaluée afin d'ajuster la distribution *ad libitum* des régimes expérimentaux à J-2, J6, J7, J8 et J13.

Les fèces de 24h ont été récoltées de J12 à J14 et à J72. Les urines de 24h ont été recueillies à J6, J7 et J8. L'euthanasie des rats a eu lieu à J75 et J76. Les dénombrements de lésions pré-néoplasiques dans le côlon et les dosages sur la muqueuse colique ont été réalisés suite à la mise à mort des animaux.

### 4) Finalités de l'étude *in vivo* « co-initiation »

Les effets co-initiateurs des régimes riches en 4-HNE et en fer héminique avec l'AOM ont été étudiés grâce au dénombrement des lésions pré-néoplasiques de type ACF

et MDF, à l'aide du dosage du 4-HNE, des TBARS, du DHN-MA et de l'hème dans les eaux fécales et par des mesures de génotoxicité des eaux fécales.

L'initiation de la cancérogenèse colorectale a été estimée par le dénombrement et la mesure de la taille des lésions pré-néoplasiques de type ACF que j'ai réalisés. Le même travail sera fait ultérieurement pour les MDF.

Les autres manipulations ont été réalisées par Françoise GUERAUD, Julia KELLER, Nathalie NAUD, Edwige-Marie PRALET.

Le dosage du 4-HNE dans les eaux fécales a permis de mesurer l'exposition directe du côlon au 4-HNE ou secondairement à sa formation à partir de l'alimentation peroxydante du lot « fer ». L'exposition du côlon au 4-HNE a aussi été estimée par le dosage du DHN-MA urinaire et des TBARS dans les eaux fécales, marqueurs de lipoperoxydation. Le dosage de l'hème fécal dans les groupes du lot « fer » a été réalisé dans le but de vérifier l'équivalence des doses en fer héminique administrées entre les groupes hémine et hémoglobine.

La génotoxicité du 4-HNE, de l'hème et de l'hémoglobine a été étudiée avec plusieurs mesures de génotoxicité  $\gamma$ H2AX réalisées sur la muqueuse colique de rat après abattage, mais aussi *in vitro* sur une lignée de cellules épithéliales coliques de souris normale immortalisée (APC+/+), après une exposition de 24h aux eaux fécales récoltées à la fin de la période d'administration des régimes expérimentaux et avant l'injection d'AOM. Cette technique repose sur le marquage spécifique de l'histone H2AX phosphorylée,  $\gamma$ H2AX, qui reflète les cassures double-brin de l'ADN.

#### **4. Coloration des ACF et méthode de comptage**

Lors des autopsies, les côlons ont été ouverts longitudinalement, coupés en deux morceaux par une coupe transversale et fixés entiers et à plat dans de la formaline à 10%. À chaque côlon a été attribué un code composé de deux lettres. Les côlons ont ensuite été stockés par ordre aléatoire dans la formaline à 10%. Les codes ont été répertoriés dans un fichier dont l'accès n'a été possible qu'une fois tous les colons lus.

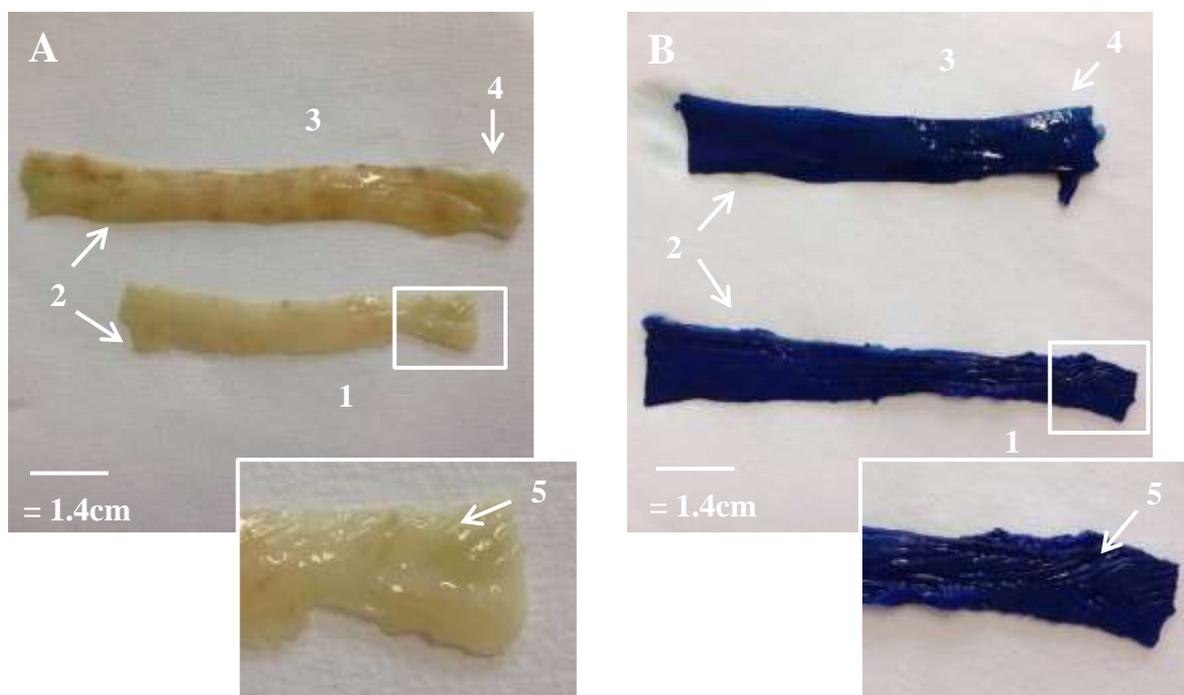
## 1) Protocole de coloration

### a. Préparation des solutions de coloration au Bleu de Méthylène

Une solution mère de bleu de méthylène (BM) à 2% est préparée dans un 1<sup>er</sup> temps (0,4 g de BM dans un flacon opaque + 20 mL d'eau distillée sous agitation magnétique). Cette solution est ensuite diluée afin d'obtenir une solution de BM à 0,05% (1 mL de solution mère dans 39 mL d'eau distillée puis la solution est filtrée).

### b. Coloration : sous hotte aspirante

La coloration des deux morceaux de côlon d'un même rat est réalisée simultanément (**Figure 29**). Le côlon est d'abord rincé dans de l'eau distillée afin d'éliminer la formaline. Il est ensuite plongé muqueuse vers le haut dans un bain de BM à 0,05%, le tout sur un plateau agitant pendant 6 à 7 minutes pour les premiers côlons puis 10 minutes pour les suivants, le BM se diluant au fur et à mesure des colorations (une préparation colore environ 4 à 5 côlons).



**Figure 29 : Photographies de muqueuses coliques avant et après coloration.** Sarniguet C, 2016.  
**(A)** Muqueuse colique conservée dans la Formaline à 10% puis rincée à l'eau distillée  
**(B)** Muqueuse colique après coloration au Bleu de Méthylène 0,05%  
1. Portion proximale du côlon. 2. Portion moyenne du côlon. 3. Portion distale du côlon. 4. Zone rectale.  
5. Muqueuse colique proximale plissée

## **2) Lecture des foyers de cryptes aberrantes**

### **a. Observation au microscope**

Afin de s'affranchir d'un biais d'ordre et d'expérience de lecture, l'ordre de lecture des côlons est aléatoire, la lecture est dite en « aveugle » car les côlons sont codés (2 lettres).

Le côlon est disposé sur une lame striée (7,5x2,5 cm), visualisé au microscope optique au grossissement x40 (x100 si nécessaire), muqueuse vers le haut et l'éclairage est ajusté en fonction de la zone de lecture. Les côlons sont toujours lus de la partie la plus distale à la partie la plus proximale (**Figure 29**).

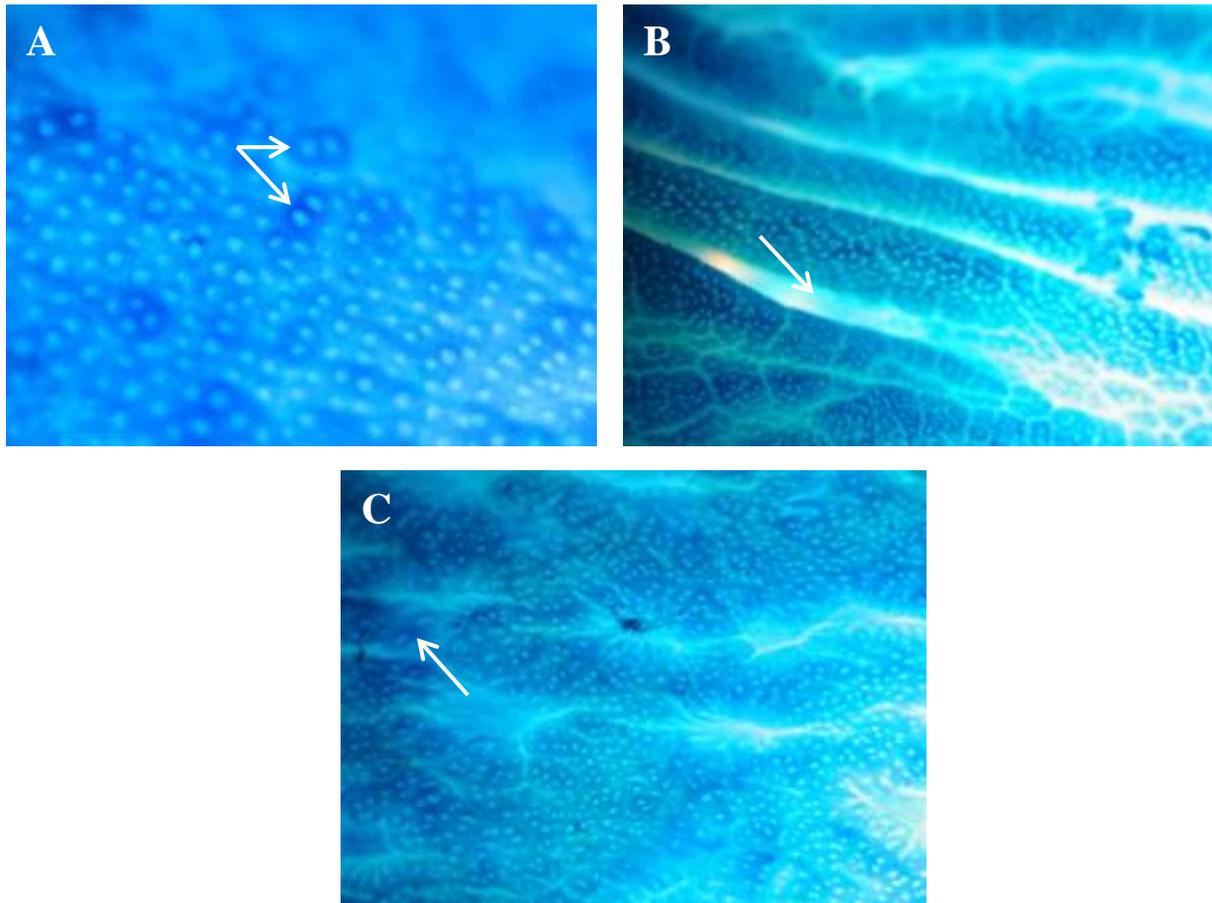
### **b. Critères de sélection des ACF par rapport aux cryptes normales**

Les ACF peuvent présenter différentes caractéristiques. Ils sont composés d'une ou plusieurs cryptes regroupées en foyer. Ils ont généralement une coloration plus foncée, une paroi plus épaisse, une taille 2 à 3 fois supérieure aux cryptes environnantes normales, une forme allongée (lumière des cryptes dilatée parfois tortueuse), une structure surélevée par rapport au reste des cryptes.

On décide de classer des cryptes comme ACF si elles possèdent au moins deux critères parmi les trois principaux suivants : une coloration plus foncée, une structure surélevée et une ouverture allongée. Au cours de l'observation, les tumeurs ont été relevées et mesurées.

**c. Photographies de muqueuses coliques normales, de foyers de cryptes aberrantes et de tumeurs coliques chez le rat**

La **Figure 30** représente plusieurs photographies de muqueuses coliques normales chez le rat. La **Figure 31** montre différents types d'ACF et la **Figure 32** montre un exemple de tumeur colique.



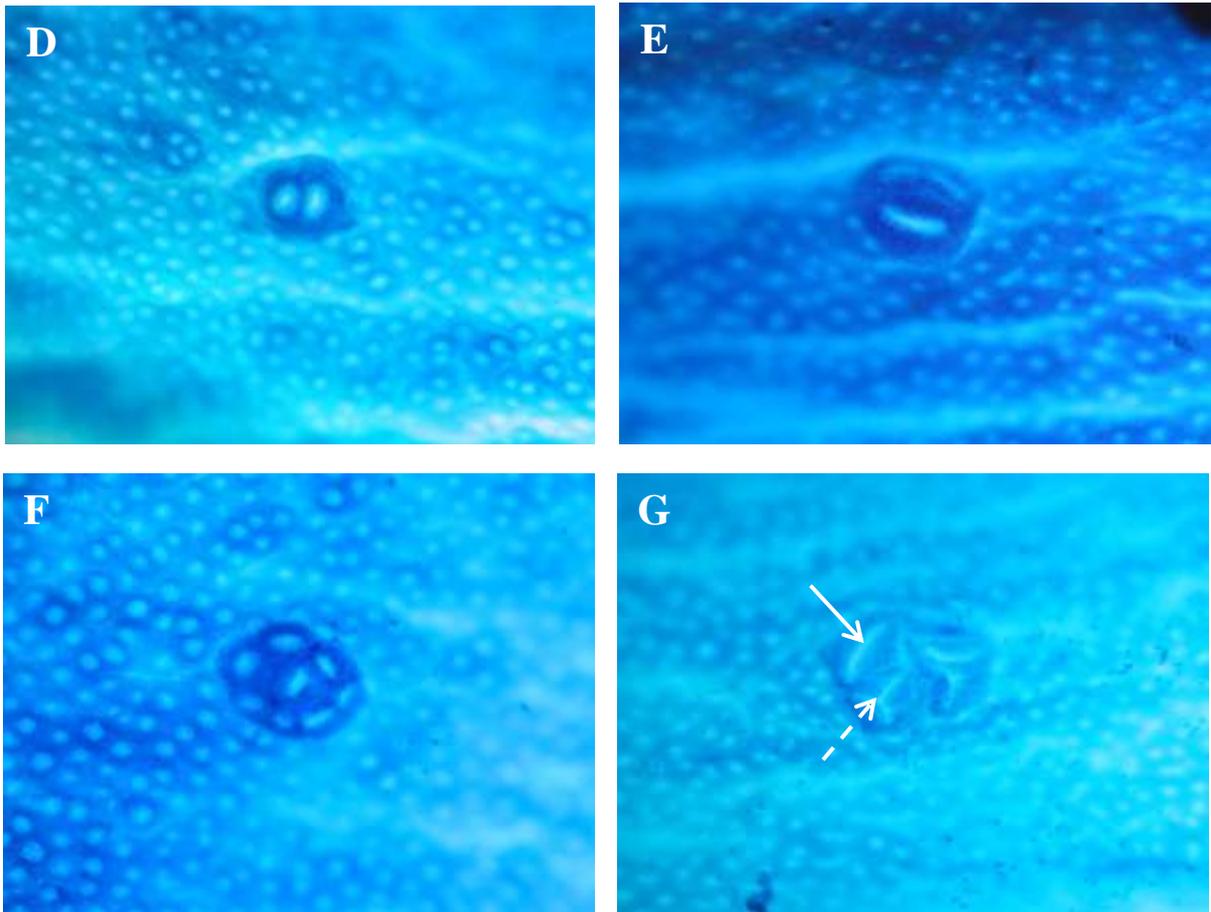
**Figure 30 : Muqueuses coliques normales observées au microscope optique (A) x100, (B) et (C) x 40 après coloration au bleu de méthylène.**

Sarniguet C, 2016.

**(A)** Muqueuse colique avec des cryptes intestinales normales. Flèches : Cryptes plus foncées mais non comptées comme ACF car 1 seul critère est insuffisant.

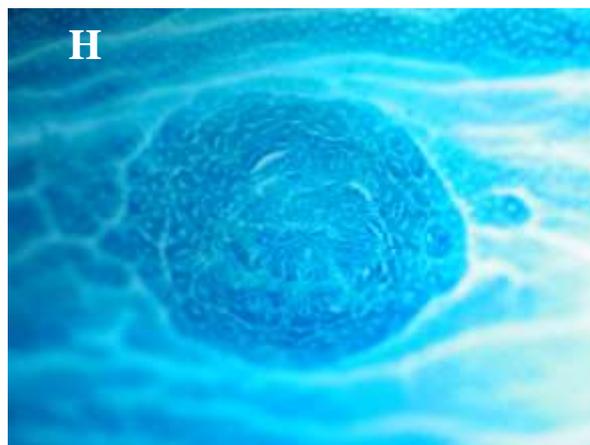
**(B)** Muqueuse colique proximale plissée. Flèche : zone en dépression, comptage des ACF impossible.

**(C)** Zone aberrante : cryptes normales situées dans une zone riche en formations lymphoïdes perturbant la structure du côlon. Les cryptes peuvent être plus foncées ou avoir une lumière légèrement allongée (flèche) mais ne sont pas classifiées comme étant des ACF.



**Figure 31 : ACF observés au microscope optique x100 après coloration au bleu de méthylène.**  
Sarniguet C, 2016.

- (D)** ACF 2 cryptes : cryptes de taille augmentée, cellules plus colorées, lumières rondes à ovales, dilatées, zone péricryptale augmentée.  
**(E)** ACF 3 cryptes : cryptes de taille augmentée, cellules plus colorées, lumières très allongées et dilatées.  
**(F)** ACF 8 cryptes : cryptes de taille augmentée, cellules plus colorées, lumières allongées et dilatées.  
**(G)** ACF hyperplasique ou dysplasique: cryptes de taille augmentée, cellules plus colorées, lumières très allongée (flèche pleine) à crantées (flèche pointillés), dilatées, zone péricryptale augmentée.



**Figure 32 : (H) Tumeur colique de 3mm de diamètre observée au microscope optique x40 (visible aussi à l'œil nu) après coloration au bleu de méthylène.**  
Sarniguet C, 2016.

### 3) Expression des résultats

Au cours de la lecture d'un côlon, pour chaque champ observé j'ai répertorié le nombre d'ACF, le nombre de cryptes par ACF, le nombre et la taille des tumeurs. En fin de lecture, les ACF ont été totalisés et les ACF ayant le même nombre de cryptes ont été comptabilisés (**voir annexe 1**).

Ces informations ont été ensuite reportées dans un fichier Excel regroupant les résultats de l'ensemble des côlons. Ce fichier a permis de calculer le nombre de cryptes aberrantes par côlon, de classer le nombre de gros ACF suivant différentes catégories de taille (>3, 5 ou 7 cryptes aberrantes/foyer) (**voir Figure 33 et Annexe 2**).

ordre let	n°lot	code	Nombre d'ACF constitués de (1-23 - 21 cryptes)																												n°lot	n°lot	total ACF	total crypte	taille ACF	gros ACF			tumeur										
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28						29	30	(≥3)		(≥5)	>7								
1		BD	12	31	20	17	10	8	1																														100	310	3.16	37	10	1	1 (2,16mm)				
2		GV	8	16	7	7	6	1	1																													46	134	2.91	15	2	1						
3		CQ	38	89	43	22	15	7	2																														196	534	2.67	46	9	0					
4		CT	19	42	52	39	25	9	4	3	2																												195	671	3.44	52	10	5					
5		EU	26	56	37	31	27	14	8	3	1	1																												207	712	3.44	88	30	5				
6		LU	14	41	33	27	17	8	4	1	1																														148	481	3.25	58	14	2	1 (1,84mm)		
7		MP	12	42	33	21	19	12	8	1	1																															161	522	3.23	54	24	2	1 (2,16mm)	
8		LD	33	75	40	23	7	9	2	1	1																																192	602	2.72	44	14	2	2 (2,26 et 0,52mm)

Figure 33 : Tableau récapitulatif du nombre, de la taille des ACF ainsi que des tumeurs par côlon Sarniguet C, 2016.

### 4) Intervenants

J'ai été formée à la lecture des ACF par le Dr. Françoise GUERAUD. Nous avons d'abord lu les 2 premiers côlons ensemble en détaillant chaque ACF puis les 3 suivants séparément en comparant nos résultats pour s'assurer que ma lecture était correcte. J'ai ensuite lu les côlons suivants seule. À la fin de la 1<sup>ère</sup> lecture de l'ensemble des côlons, j'ai relu les 5 premiers côlons pour voir si ma lecture n'avait pas été trop modifiée par rapport aux premiers côlons. Cette seconde lecture nécessitait une deuxième coloration, de moins bonne qualité que la première (reliefs moins bien dessinés, contrastes moins nets, côlons parfois détériorés). Sur les 5 relectures, j'ai relevé moins d'ACF sur l'ensemble des lames, ce qui peut correspondre à la perte d'informations causée par la seconde coloration ou à une dérive de la lecture, qui reste donc difficilement objectivable.

## II. RESULTATS

Dans cette partie, nous présenterons d'abord les résultats du dénombrement, de la caractérisation des foyers de cryptes aberrantes et des tumeurs de l'étude « co-initiation ». Ils seront ensuite complétés par les autres résultats de l'étude.

### 1. Résultats du dénombrement et de la taille des ACF de l'étude « co-initiation » avec l'AOM

#### 1) Méthode d'analyse

Les résultats ont été analysés par le logiciel GraphPad Prism 6 pour Windows. Les données pour les groupes « fer » ont été exploitées par une analyse de variance paramétrique ANOVA à un facteur suivie d'un test de Tukey pour réaliser des comparaisons multiples.

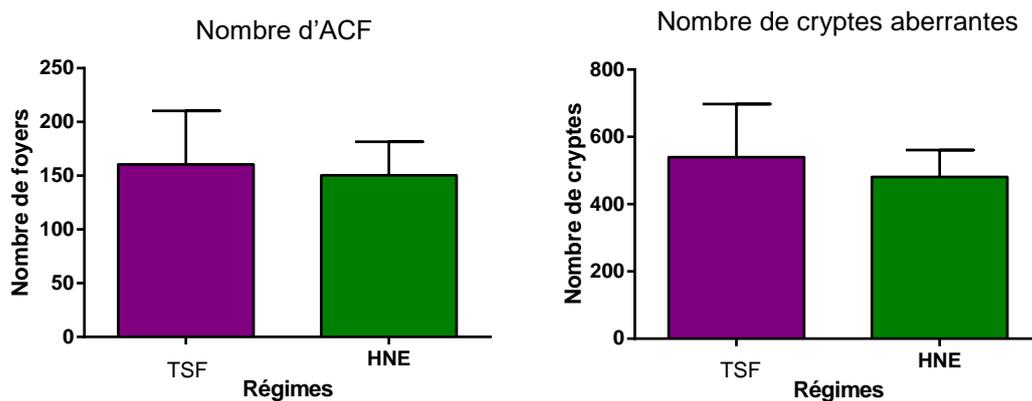
Les données des groupes du lot « HNE » ont été exploitées par un test t de Student paramétrique.

Toutes les représentations graphiques représentent l'écart-type SD (Standard déviation).

#### 2) Résultats : effet du 4-HNE sur les foyers de cryptes aberrantes

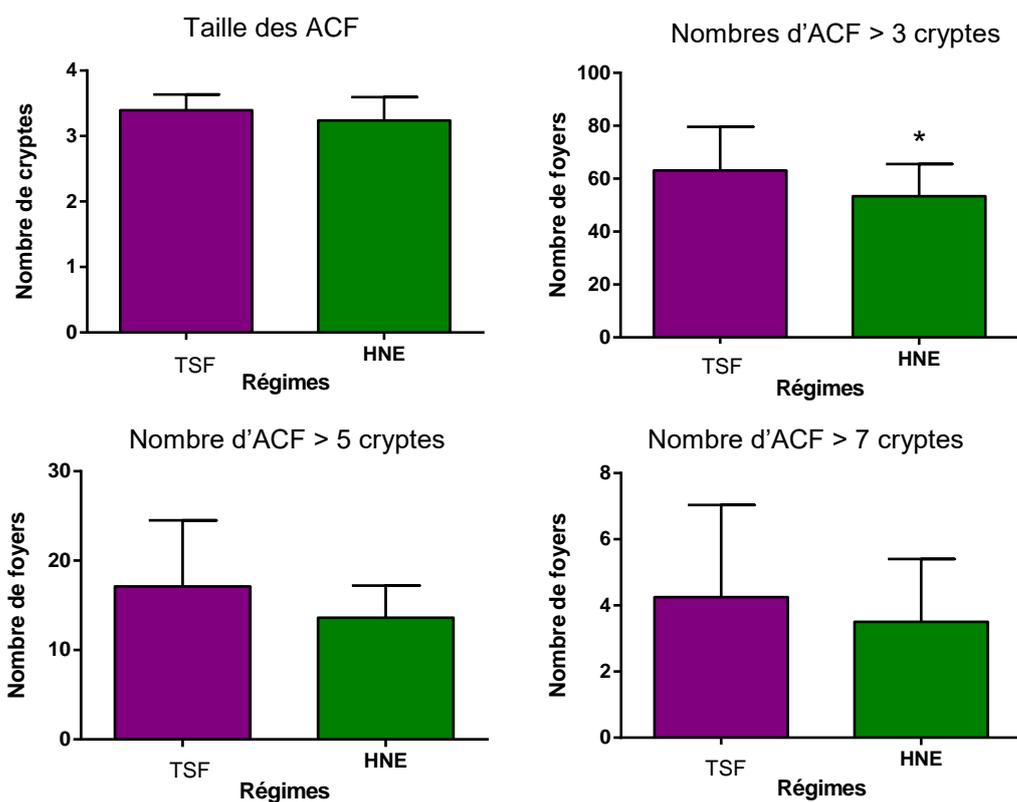
Il n'y a pas de différence significative du nombre total d'ACF et du nombre total de cryptes aberrantes après exposition au 4-HNE (**Figure 34**).

Le 4-HNE diminue de façon significative le nombre de gros ACF de taille supérieure à 3 cryptes (**Figure 35**).



**Figure 34 : Nombre total d'ACF et nombre total de cryptes aberrantes après 2 semaines de régimes expérimentaux suivies d'une chimio-induction et de 60 jours de régime témoin chez le rat.**

(Moyenne  $\pm$  SD, n=20, aucune différence significative avec le t-test)



**Figure 35 : Taille des ACF et nombre d'ACF de plus de 3, 5 et 7 cryptes/ACF après 2 semaines de régimes expérimentaux suivies d'une chimio-induction et de 60 jours de régime témoin chez le rat.**

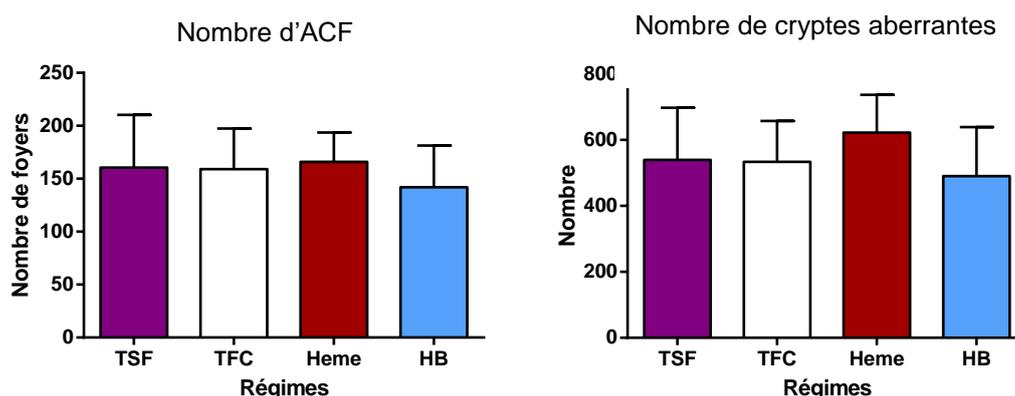
(Moyenne  $\pm$  SD, n=20, t-test \* p<0,05)

### 3) Résultats : effet du fer héminique sur les foyers de cryptes aberrantes

Il n'y a pas de différence significative du nombre total d'ACF et du nombre total de cryptes aberrantes après exposition au fer héminique (**Figure 36**).

Après exposition au fer héminique sous forme d'hémine, on observe une augmentation significative de la taille des ACF ainsi que du nombre des gros ACF (foyers de plus de 3, 5 et 7 cryptes). En revanche, l'exposition à l'hémoglobine n'a pas montré d'effet significatif sur la taille ACF et le nombre de gros ACF.

Les deux régimes témoins ne présentent pas de différence significative entre eux, la présence de fer sous forme citraté n'a pas donc pas d'effet significatif sur le dénombrement et la taille des ACF (**Figure 37**).



**Figure 36 : Nombre total d'ACF et nombre total de cryptes aberrantes après 2 semaines de régimes expérimentaux suivies d'une chimio-induction et de 60 jours de régime témoin chez le rat.**

(Moyenne ± SD, n=20, aucune différence significative avec l'ANOVA)

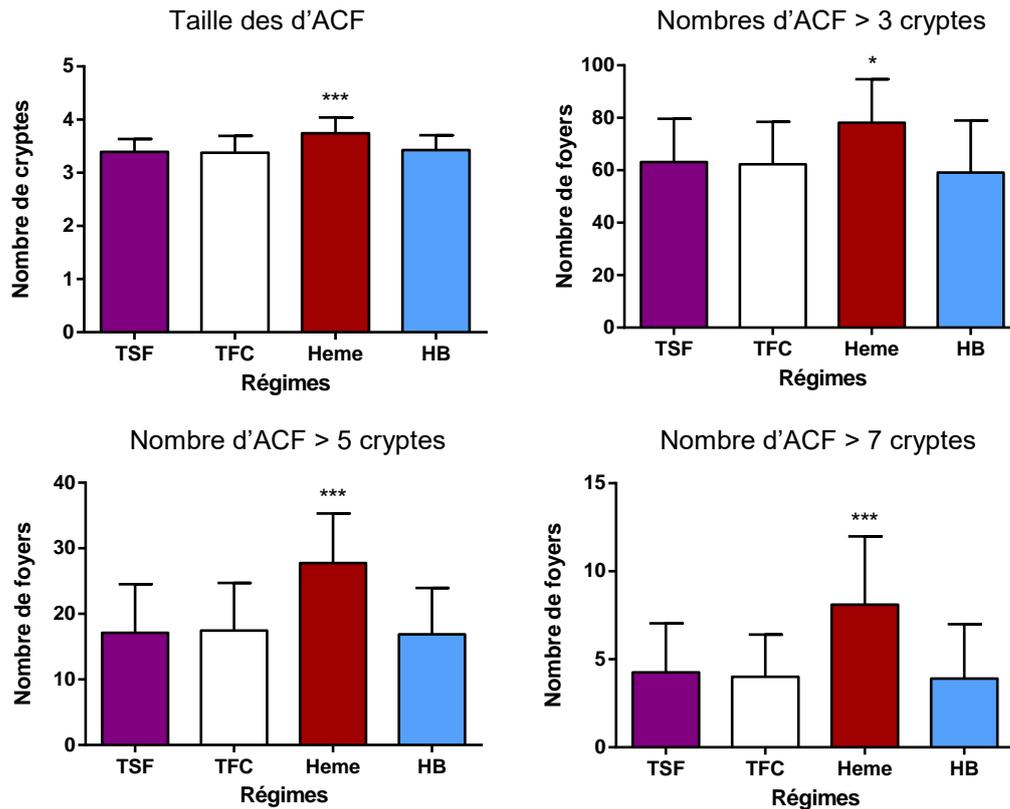


Figure 37 : Taille des ACF et nombre d'ACF de plus de 3, 5 et 7 cryptes/ACF après 2 semaines de régimes expérimentaux suivies d'une chimio-induction et de 60 jours de régime témoin chez le rat.

(Moyenne  $\pm$  SD, n=20, ANOVA \*p<0,05; \*\*\*p<0,001)

#### 4) Résultats : effet du 4-HNE et du fer héminique sur le nombre et la taille des tumeurs

Il n'y a pas d'influence significative des régimes sur le nombre de tumeurs ni sur leur taille (Figures 38 et 39).

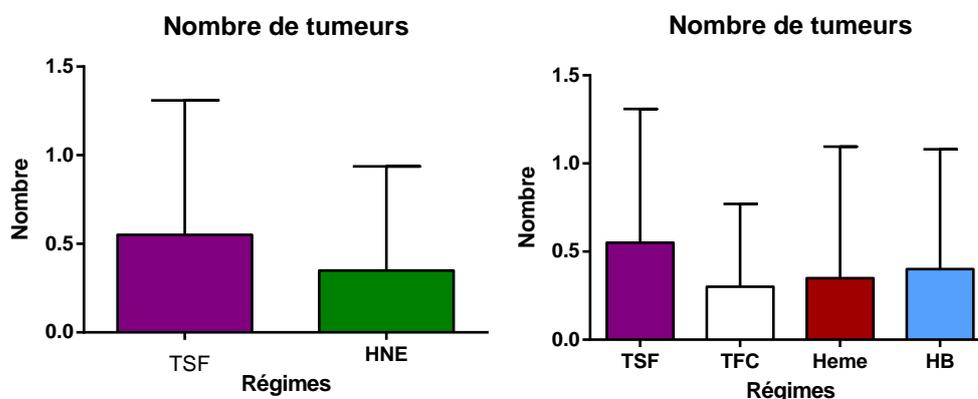
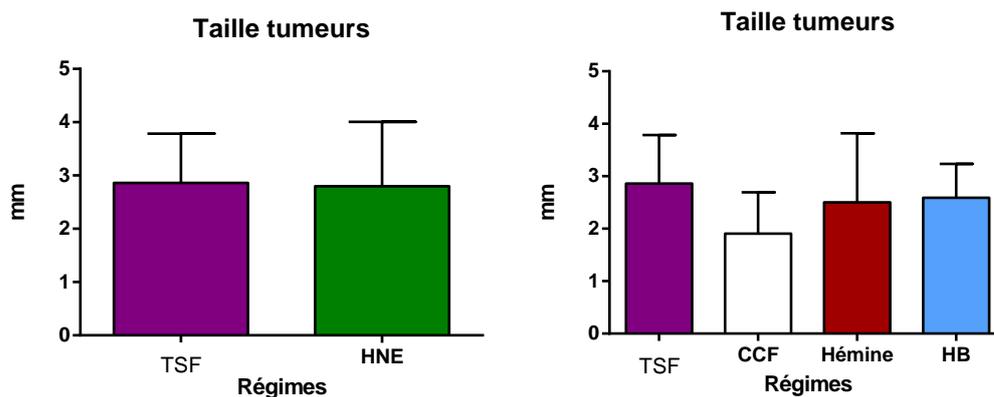


Figure 38 : Nombre de tumeurs observées après 2 semaines de régimes expérimentaux suivies d'une chimio-induction et de 60 jours de régime témoin chez le rat.

(Moyenne  $\pm$  SD, n=20, aucune différence significative avec le t-test pour les groupes TSF et HNE ni avec l'ANOVA pour les groupes TSF, TFC, Hème et HB)



**Figure 39 : Nombre et taille des tumeurs observées après 2 semaines de régimes expérimentaux suivies d'une chimio-induction et de 60 jours de régime témoin chez le rat.**  
(Moyenne  $\pm$  SD, n=20, aucune différence significative avec le t-test pour les groupes TSF et HNE ni avec l'ANOVA pour les groupes TSF, TFC, Hème et HB)

## 5) Remarques

On remarque que le 4-HNE a tendance à diminuer le nombre total d'ACF, le nombre total de cryptes aberrantes, la taille des ACF (globale et catégories >5 et >7 cryptes) mais aussi le nombre de tumeurs, même si cela n'est pas statistiquement significatif (sauf pour les ACF > 3 cryptes).

On remarque aussi que l'hème a tendance à augmenter le nombre total d'ACF, le nombre total de cryptes aberrantes et le nombre de tumeurs par rapport à son témoin mais de façon non significative.

## 2. Conclusions : lésions pré-néoplasiques ACF de l'étude « co-initiation »

Dans ce modèle de co-initiation avec l'AOM chez le rat, nous montrons pour la 1<sup>ère</sup> fois que la consommation de fer héminique sous forme d'hémine entraîne une augmentation de la taille moyenne des ACF et du nombre de gros ACF (> à 3, 5 et 7 cryptes) et que la consommation 4-HNE entraîne une diminution du nombre de gros ACF (> à 3 cryptes).

Aucun effet des régimes n'a pu être montré sur le nombre total d'ACF et sur le nombre total de cryptes aberrantes par côlon ni sur le nombre et la taille des tumeurs.

Une complémentation en fer citraté n'entraîne pas de modification significative des paramètres étudiés par rapport à un régime sans fer ou complétement en hémoglobine.

### 3. Autres résultats de l'étude « co-initiation » et de l'étude préliminaire « génotoxicité »

#### 1) Résultats du groupe « 4-HNE »

Les TBARS n'ont pas été significativement augmentés contrairement au 4-HNE et au DHN-MA (Figure 40).

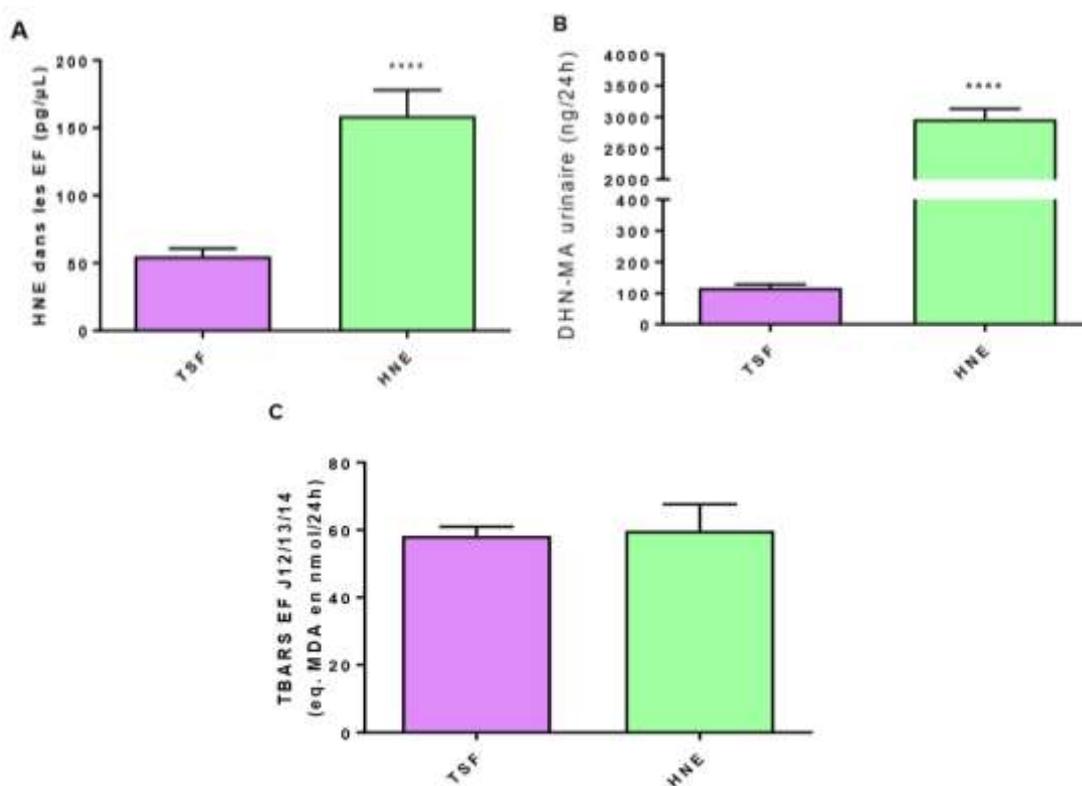


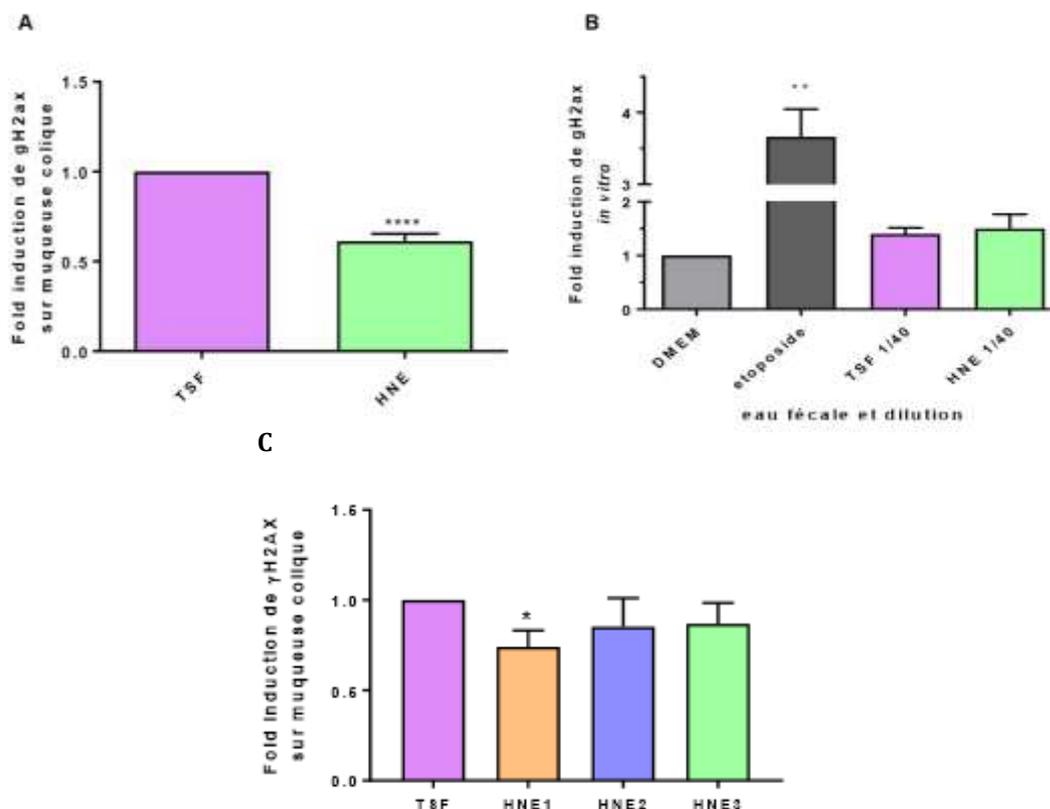
Figure 40 : Teneur en 4-HNE des eaux fécales (A), DHNA-MA urinaire (B) et TBARS des eaux fécales (C) après 2 semaines de régimes expérimentaux chez le rat.

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

Keller, 2016.

Lors de l'étude « co-initiation », le dosage des  $\gamma$ H2ax a montré une diminution de la phosphorylation des histones pour le régime 4-HNE sur muqueuse colique. Lors de l'étude préliminaire sur la génotoxicité du 4-HNE, une dose plus faible de 4-HNE a aussi montré une diminution de la phosphorylation des histones. Aucun effet significatif sur

lignée cellulaire n'a été mis en évidence après une exposition de 24h aux eaux fécales (Figure 41).



**Figure 41 : Induction de  $\gamma$ H2AX *in vivo* et *in vitro* lors des études de « co-initiation » et préliminaire de « génotoxicité » sur le groupe « 4-HNE ».**

Keller, 2016.

**(A) Induction de  $\gamma$ H2AX sur muqueuse colique après 14 jours de régimes expérimentaux suivis d'une chimio-induction et de 60 jours de régime témoin chez le rat lors de l'étude « co-initiation ».** (Moyenne  $\pm$  SEM, n=20, t-test \*\*\*\*p<0,0001)

**(B) Induction de  $\gamma$ H2AX *in vitro* sur cellules normales Apc+/+ après exposition aux eaux fécales de J12/13/14 pendant 24h lors de l'étude « co-initiation ».** Dilutions des eaux fécales = 1/40e. (Moyenne  $\pm$  SEM, n=20, t-test \*\*p<0,01)

Ectoposide : agent génotoxique, témoin positif.

**(C) Induction de  $\gamma$ H2AX sur la muqueuse colique après 2 semaines de régimes expérimentaux lors de l'étude préliminaire de « génotoxicité » du 4-HNE.**

(Moyenne  $\pm$  SEM, n=8, t-test \* p<0,05)

Doses 4-HNE : HNE1 à 0.02mg/20g de régime, HNE2 0.2mg/20g et HNE3 2mg/20g.

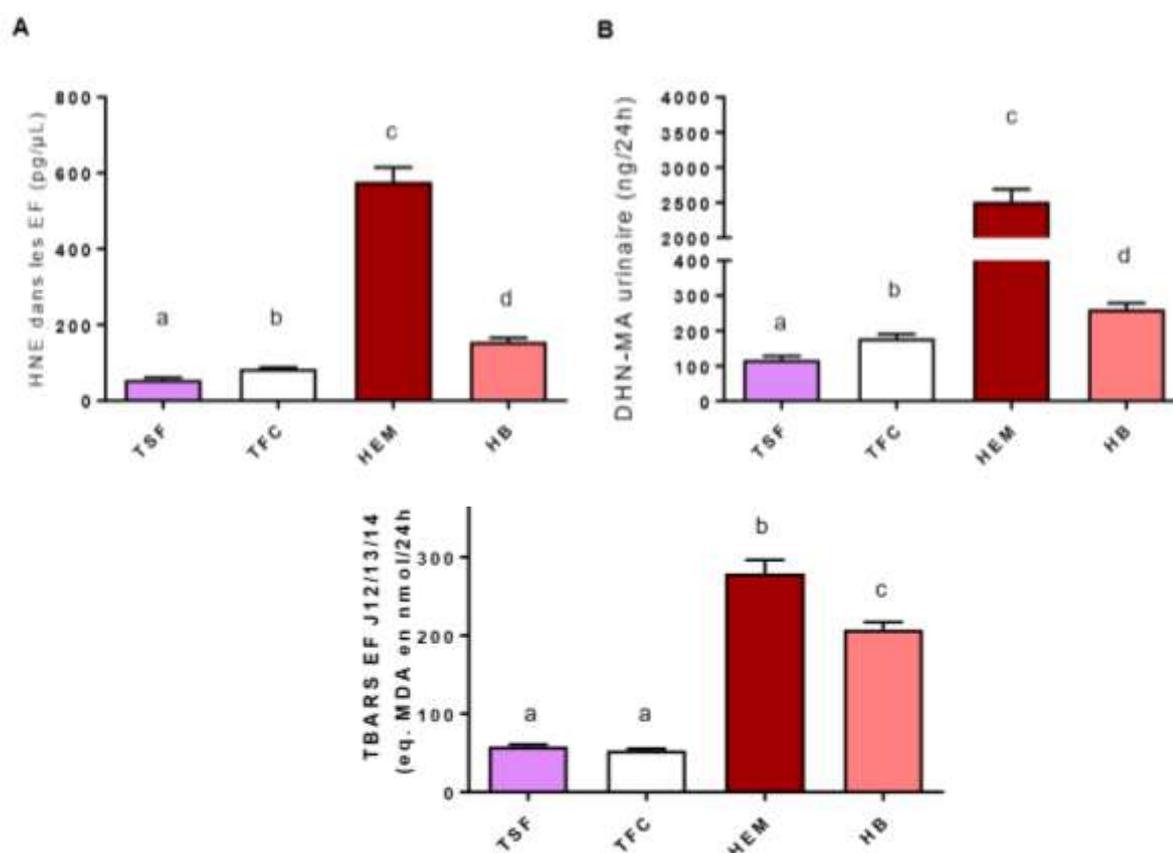
Afin de préciser ces résultats, un test des comètes a été réalisé à partir des muqueuses coliques provenant de 10 rats de l'expérience préliminaire de génotoxicité du 4-HNE nourris avec un régime TSF ou un régime 4-HNE. Ce test permet de mesurer les cassures induites directement par un agent génotoxique. Après lyse cellulaire, les fragments d'ADN sont discriminés par électrophorèse. Plus l'ADN est endommagé, plus il y a une migration hétérogène des fragments d'ADN le long du gel. Ici, ce test n'a montré aucune différence de répartition et de pourcentage de l'ADN ayant migré. Deux

semaines de régime 4-HNE ou TSF ne sont donc pas associées à une différence significative de génotoxicité.

## 2) Résultats du groupe « fer héminique »

Les TBARS et le 4-HNE des eaux fécales et le DHN-MA urinaire ont été significativement augmentés dans les régimes riches en fer héminique, avec une différence plus marquée pour le régime riche en hémine.

Une légère augmentation du DHN-MA urinaire et du 4-HNE a été constatée dans les eaux fécales issues du régime complétement en fer citraté TFC mais beaucoup moins importante que pour les régimes comprenant du fer héminique (**Figure 42**).



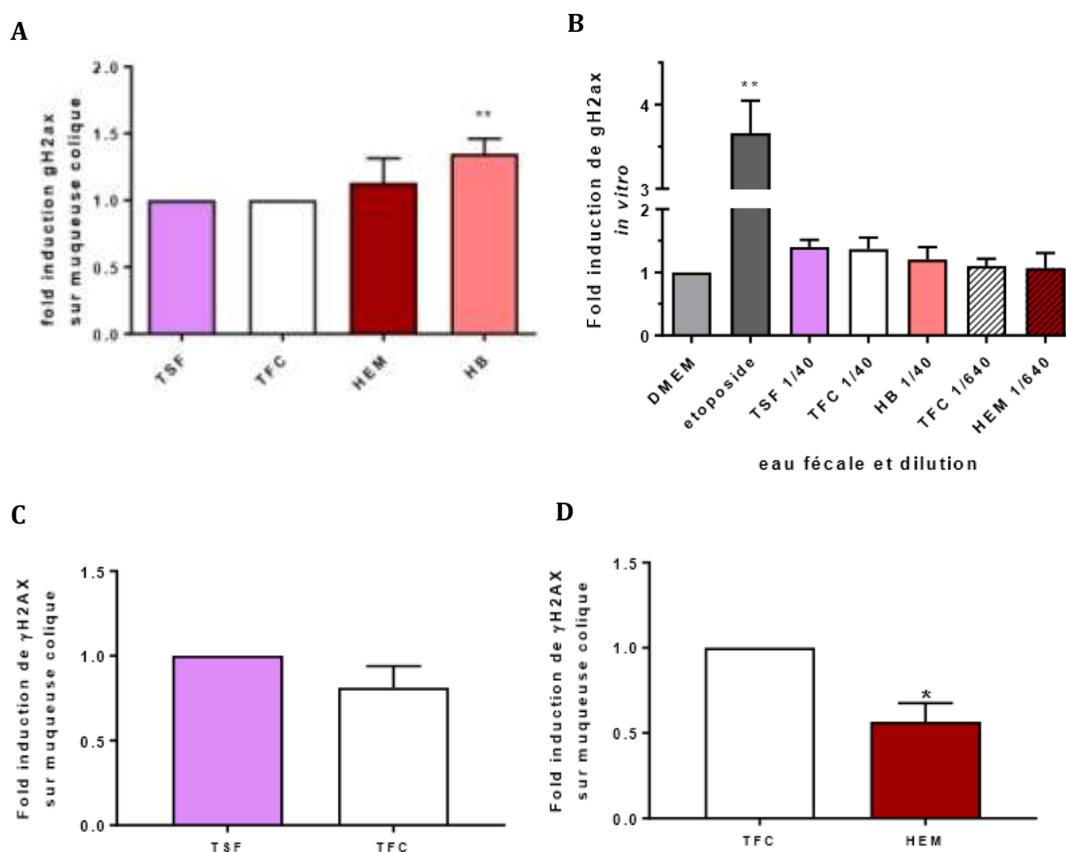
**Figure 42 : Teneur en 4-HNE dans les eaux fécales (A), DHNA-MA urinaire (B) et TBARS dans les eaux fécales (C) après 2 semaines de régimes expérimentaux chez le rat.**

Keller, 2016.

(Moyenne  $\pm$  SD, n=20, une lettre différente indique une différence significative d'après une ANOVA)

Le dosage des  $\gamma$ H2AX lors de l'étude « co-initiation » a montré une augmentation de la phosphorylation des histones pour le régime hémoglobine sur muqueuse colique. Lors de l'étude préliminaire « génotoxicité » la muqueuse colique a montré une

diminution significative de l'induction de  $\gamma$ H2AX dans le groupe hémine par rapport au groupe témoin TFC. Aucun effet significatif sur lignée cellulaire après une exposition de 24h aux eaux fécales des régimes riches en hémoglobine ou en hémine n'a été mis en évidence (**Figure 43**).



**Figure 43 : Induction de  $\gamma$ H2Ax in vivo et in vitro lors des études de « co-initiation » et préliminaire de « génotoxicité » sur le groupe « fer ».**

Keller, 2016.

**(A) Induction de  $\gamma$ H2Ax sur muqueuse colique après 14 jours de régimes expérimentaux suivis d'une chimio-induction et de 60 jours de régime témoin chez le rat lors de l'étude « co-initiation ».** (Moyenne  $\pm$  SEM, n=20, t-test \*\* p<0,01)

**(B) Induction de  $\gamma$ H2Ax in vitro sur cellules normales Apc+/+ après exposition aux eaux fécales de J12/13/14 pendant 24h lors de l'étude « co-initiation ».** Eaux fécales en pool par groupe, diluées 1/40 ou 1/640, (Moyenne  $\pm$  SEM, n=4, t-test \*\* p<0,01)

Ectoposide : agent génotoxique, témoin positif.

**(C et D) Induction de  $\gamma$ H2AX sur muqueuse colique après 2 semaines de régimes expérimentaux lors de l'étude préliminaire « génotoxicité » de l'hème.** (Moyenne  $\pm$  SEM, n=8, t-test \* p<0,05)

### 3) Autres résultats

Les lésions pré-néoplasiques MDF n'ont pas encore pu être dénombrées. Les différents régimes n'ont pas eu d'influence sur le poids des rats.

### III. DISCUSSION

Dans cette étude, nous avons cherché à déterminer pour la 1<sup>ère</sup> fois si le 4-HNE et le fer héminique peuvent initier la cancérogenèse colorectale. A cause des contraintes de temps qu'impose une étude d'initiation seule, une étude de co-initiation l'AOM a été réalisée.

#### 1. Effet du fer héminique sur l'initiation de la cancérogenèse colorectale

Dans ce modèle de co-initiation de la cancérogenèse colorectale par le fer héminique chez le rat, suite à un régime riche en hémine distribué pendant quinze jours suivi d'une injection d'azoxyméthane, nous avons montré une augmentation significative de la taille des ACF et du nombre de gros ACF par côlon. C'est la 1<sup>ère</sup> fois qu'un effet co-initiateur du fer héminique est montré sur la cancérogenèse colorectale. Bien qu'il aurait été plus pertinent de conclure à partir du nombre total d'ACF, il est possible de conclure à partir de l'augmentation significative du nombre de gros ACF et de la taille globale des ACF. En effet, il est supposé que les ACF les plus gros sont ceux supposés à l'origine de tumeurs (**Takayama *et al.*, 1998**). Cependant, il a été montré que les résultats obtenus après lecture des ACF n'étaient pas toujours correctement corrélés à la cancérogenèse colorectale. L'effet initiateur de l'hémine serait donc à confirmer avec une lecture des MDF qui n'a pas encore pu être réalisée ici. Elle pourrait aussi permettre de conclure quant à l'absence d'effet de l'hémoglobine.

Un effet co-initiateur de l'hémoglobine pouvait aussi être attendu, son effet promoteur ayant déjà été démontré suite au comptage des MDF par **Bastide *et al.* (2015)** à une dose plus faible que celle utilisée ici (1g/100g d'aliment contre 2.5g/100g ici). Cependant, après dénombrement des ACF sur une étude de promotion, **Pierre *et al.* (2003)** ont montré que l'hémoglobine augmentait significativement moins le nombre d'ACF/côlon que l'hémine, et n'avait pas d'effet sur la taille des ACF. L'hémoglobine était donc un moins bon promoteur de cancérogenèse colorectale que l'hémine, ce qui peut être cohérent avec nos résultats. Néanmoins, l'hémoglobine ne montrant pas d'effet sur

l'initiation contrairement à l'hémine, on peut aussi penser que la forme du fer héminique est responsable de l'effet observé via un mécanisme d'action différent.

L'effet initiateur de l'hémine pourrait avoir deux origines différentes : l'effet propre de l'hémine sur les cellules du côlon ou l'effet des produits de peroxydation lipidique comme le 4-HNE.

D'après **Glei et al. (2006)**, *in vitro*, le fer héminique sous forme d'hémoglobine ou d'hémine au contact des cellules coliques humaines a des effets génotoxiques et cytotoxiques. Ils ont montré qu'une exposition de 24h à de l'hémine était plus cytotoxique que l'exposition à de l'hémoglobine pour les cellules humaines (80%, 49% et 16% de viabilité cellulaire à 10µM, 100µM et 1000µM respectivement pour l'hémine et 86% et 54% de viabilité à 100µM et 1000µM respectivement pour l'hémoglobine). De plus, une exposition sur 15 minutes à de l'hémoglobine entraîne des effets génotoxiques sur des cellules coliques humaines dès 10µM contre 500µM suite à une exposition à de l'hémine. Les doses physiologiques d'hémoglobine et d'hémine auxquelles les cellules coliques humaines sont exposées avoisinent 10µM. A cette dose, l'hémoglobine est donc génotoxique sans entraîner la mort cellulaire, alors que l'hémine est faiblement cytotoxique et non génotoxique. Dans notre étude « co-initiation », la génotoxicité du fer héminique a été analysée en mesurant la phosphorylation de l'histone H2Ax *in vivo*, et les résultats sont en accord avec les résultats obtenus avec les lésions pré-néoplasiques et ceux de **Glei et al. (2006)**. Cependant, lors de l'étude préliminaire « génotoxicité », l'hémoglobine n'est pas associée à une augmentation de la génotoxicité et l'hémine est quant à elle associée à une diminution de la génotoxicité. Ces résultats contradictoires empêchent vraisemblablement de conclure. *In vitro*, aucun effet génotoxique du fer héminique n'a été mis en évidence. Il est possible que dans le cadre de cette expérience, les doses utilisées ne soient pas adaptées à la mise en évidence de génotoxicité. En effet, il est nécessaire de travailler à des doses non cytotoxiques pour pouvoir observer une génotoxicité. Un dosage de l'hème dans les eaux fécales des rats de cette étude qui n'a pas encore été réalisé, permettrait quant à lui de confronter nos résultats avec ceux de **Glei et al. (2006)**, bien que les lignées cellulaires utilisées ici ne soient pas les mêmes. Cependant, les eaux fécales utilisées dans les expérimentations de Julia KELLER comportent de multiples molécules pouvant avoir un effet génotoxique ou cytotoxique, et pas seulement de l'hémine ou de l'hémoglobine.

**Bastide et al. (2015)** ont montré que les eaux fécales de rats nourris avec du fer héminique étaient cytotoxiques pour les cellules coliques et que le 4-HNE (dès 5µmol/L), produit de peroxydation lipidique pouvait à lui seul être cytotoxique. En parallèle du comptage des lésions pré-néoplasiques, les marqueurs de lipoperoxydation que sont les TBARS, le 4-HNE fécaux et le DHN-MA urinaire ont été mesurés et sont augmentés dans les régimes hémine et hémoglobine. Un effet des produits de peroxydation lipidique est donc possible et attendu dans cette étude. 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.

Nous pourrions avancer que l'effet observé résulterait d'un effet promoteur de l'hémine après initiation à l'AOM. En effet, au moment de l'injection d'AOM, la muqueuse colique pourrait encore être en contact avec l'hémine.

Nous avons aussi montré l'absence d'effet de la supplémentation en citrate de fer sur les ACF. Cela renforce d'autant plus l'argument selon lequel les effets observés ici ou lors d'études précédentes sont bien dus au fer sous forme héminique et non simplement à une teneur en fer augmentée par rapport au régime AIN76 de base. Un effet génotoxique du fer citraté avait été mis en évidence lors de l'expérience préliminaire « génotoxicité », mais n'avait pas été retrouvé lors de l'étude « co-initiation », ce qui empêche vraisemblablement de conclure. Nous observons cependant une modeste augmentation du DHN-MA urinaire et du 4-HNE dans les eaux fécales mais pas des TBARS en présence de citrate de fer par rapport au régime non supplémenté en fer. Cette observation peut s'expliquer par un faible effet oxydant du citrate de fer. Cependant, cette augmentation n'est pas retrouvée dans l'étude préliminaire, ce qui est probablement dû à un nombre d'animaux plus grand dans l'étude long terme et donc une puissance statistique plus élevée.

Pour finir, 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 de l'agent pendant plusieurs années, comme le font **Newmark et al. (2009)** et **Yang et al. (2008)** lors de leurs études respectives du cancer colorectal sur souris et rats.

## 2. Effet du 4-HNE sur l'initiation de la cancérogenèse colorectale

Dans ce modèle de co-initiation de la cancérogenèse colorectale par le 4-HNE chez le rat, suite à un régime riche en 4-HNE à 100mg/kg d'aliment (100 ppm) distribué pendant quinze jours suivi d'une injection d'azoxyméthane, nous avons observé une diminution du nombre de gros ACF de plus de 3 cryptes aberrantes. Le 4-HNE à cette dose aurait donc un effet protecteur lors de l'initiation de la cancérogenèse colorectale par l'AOM. Ici, la discussion s'oriente dans le même sens que pour les ACF du groupe fer héminique, pour une interprétation sur l'initiation *stricto sensu*, il serait préférable d'avoir aussi une diminution du nombre total des lésions pré-néoplasiques. Étant donné l'effet co-initiateur du régime riche en hémine, le résultat montrant un effet protecteur du 4-HNE sur l'initiation n'était pas attendu car un rôle des produits de peroxydation lipidique dont le 4-HNE était jusque-là soupçonné. Les mêmes réserves quant à la pertinence des ACF sont émises, une lecture des MDF pourrait permettre d'appuyer ce résultat inattendu. Cependant, dans la thèse de Julia KELLER, l'effet promoteur du 4-HNE a été testé à une dose de 10mg/kg (10 ppm) de régime par jour pendant 100jours, dose moins importante que celle utilisée lors de l'étude initiation, mais permettant de modéliser une exposition chronique. Aucun effet promoteur du 4-HNE sur le cancer colorectal n'a pu être montré alors que l'effet promoteur du fer héminique a déjà été largement démontré dans d'autres études. et qu'il est associé à une augmentation des marqueurs de lipoperoxydation dont le 4-HNE (**Pierre *et al.*, 2007 et Bastide *et al.*, 2011**). De même, lors d'une autre étude visant à montrer le rôle inflammatoire du 4-HNE, l'exposition du côlon à des doses de 4-HNE de 10 à 100 ppm n'a pas permis de mettre en évidence d'inflammation colique.

Parallèlement au comptage des lésions pré-néoplasiques, la génotoxicité *in vivo* a été mesurée et nous avons observé une diminution de l'induction de la phosphorylation de l'histone H2AX sur les muqueuses coliques des animaux ayant consommé du 4-HNE, ce qui pourrait soutenir l'effet protecteur du 4-HNE. Le test des comètes sur des individus ayant reçu les régimes TSF et 4-HNE n'a quant à lui pas montré de différence de génotoxicité 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 4-HNE selon le test  $\gamma$ H2AX, et aucun effet selon le test des comètes. Cette différence peut s'expliquer par le fait que le test  $\gamma$ H2AX ne reflète que la présence de cassures double brins, tandis que le test des comètes met en évidence davantage de lésions de l'ADN comme les cassures simple brin, double brin, les sites abasiques ainsi que les dommages oxydatifs. Par ailleurs, *in vitro*, nous n'avons observé aucun effet génotoxique suite à une exposition aux eaux fécales 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 aiguë (24h *in vitro* vs 2 semaines *in vivo*).

Le dosage du 4-HNE fécal et du DHN-MA urinaire se sont révélés augmentés lors d'ingestion de 4-HNE, ce qui n'est pas le cas des TBARS qui ne varient pas. Nous pouvons émettre l'hypothèse que le dosage des TBARS ne mesure pas le 4-HNE, comme le proposait déjà **Esterbauer *et al.* (1982)**.

Étant donné l'effet co-initiateur du régime riche en fer héminique, le résultat montrant un effet protecteur du 4-HNE sur l'initiation n'était pas attendu. Il peut s'expliquer par l'hypothèse suivante : à la dose de 4-HNE à laquelle les cellules épithéliales coliques sont exposées, le 4-HNE n'a pas d'effet délétère. On peut penser que le 4-HNE 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 (ex : GST ou Gluthation-S-transférase) que celles chargées de l'élimination du 4-HNE (**Columbus, 2007**), ce qui expliquerait pourquoi les animaux ayant reçu le régime 4-HNE présentent des lésions pré-néoplasiques moins grosses que les animaux témoins.

Contrairement à nos attentes, le 4-HNE ne semble pas être co-initiateur de cancérogenèse colorectale comme il n'est pas promoteur ni agent pro-inflammatoire dans les études menées par Julia KELLER, mais au contraire protecteur. Cependant, le 4-HNE ne reflète pas l'ensemble des produits de peroxydation lipidique qui pourraient avoir un effet cumulatif initiateur de cancérogenèse colorectale. On pourrait donc

imaginer d'utiliser un mélange d'autres aldéhydes comme le 4-hydroxyhexenal ou le 4-oxononanal (**Guéraud *et al.*,2010**), ou bien approcher l'action conjuguée de l'ensemble des composés en augmentant la dose de 4-HNE. Cependant, d'après les études de toxicologie menées par **Nishikawa *et al.* (1992)** et **Kang *et al.* (2011)**, une augmentation de la dose de 4-HNE au-delà de 0,5 mg/kg/jour présente un risque important d'exposer les animaux à des dommages hépatiques et rénaux.

La réalisation d'expérimentations de cancérogénèse sans chimio-induction permettrait de répondre précisément quant à l'effet initiateur du 4-HNE ou des aldéhydes issus de la lipoperoxydation. Cependant, ce type d'expérimentations est rarement mené, du fait du temps nécessaire à leur réalisation, mais pourrait compléter les travaux présentés dans ce manuscrit, et nous permettre de mieux comprendre l'implication potentielle du 4-HNE dans la cancérogénèse colorectale (**Newmark *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2008**).



## CONCLUSION

Le but de mon travail était de déterminer si le fer héminique et le 4-HNE peuvent initier la cancérogenèse colorectale. Pour cela, une étude de co-initiation impliquant un régime alimentaire contenant du fer héminique ou du 4-HNE, pendant 15 jours suivi d'une initiation chimique par l'azoxyméthane a été menée. Une dose de fer héminique proche des doses nutritionnelles et une dose de 4-HNE représentative d'une alimentation fortement peroxydée ont été utilisées. Grâce au dénombrement des lésions pré-néoplasiques de type foyers de cryptes aberrantes, nous avons montré pour la première fois un effet co-initiateur du fer héminique sous forme d'hémine avec l'azoxyméthane et un effet protecteur du 4-HNE sur l'initiation de la cancérogenèse colorectale par l'azoxyméthane.

Ce travail complète les études précédentes ayant déjà démontré l'effet promoteur du fer héminique. Le 4-HNE étant un produit de peroxydation lipidique catalysée par le fer héminique, un rôle conjoint du 4-HNE et du fer héminique était soupçonné dans l'initiation et la promotion du cancer colorectal. Cependant, nous avons montré que le 4-HNE seul et à la dose testée avait un rôle protecteur de l'initiation du cancer colorectal par l'azoxyméthane, et dans sa thèse, Julia Keller n'a montré aucun effet du 4-HNE dans la promotion du cancer colorectal aux doses proches de celles contenues dans une alimentation riche en viande rouge.

**AGREMENT SCIENTIFIQUE**

**En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire**

Je soussignée, Nathalie PRIYMENKO, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **Camille SARNIGUET** intitulée « **Etude de l'effet co-initiateur du fer héminique et du 4-hydroxynonénal, un produit d'oxydation des lipides insaturés, sur la cancérogenèse colorectale chez le rat : dénombrement des foyers de cryptes aberrantes** » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 10 novembre 2016  
Docteur Nathalie PRIYMENKO  
Enseignant chercheur  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



Vu :  
La Directrice de l'Ecole Nationale  
Vétérinaire de Toulouse  
Isabelle CHMITELIN

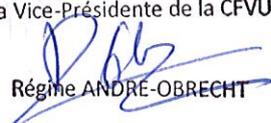


Vu :  
Le Président du jury :  
Professeur Claude MOULIS



Vu et autorisation de l'impression :  
Président de l'Université  
Paul Sabatier

Monsieur Jean-Pierre VINEL  
Le Président de l'Université Paul Sabatier  
par délégation,  
La Vice-Présidente de la CFVU



Régime ANDRÉ-OBRECHT

Melle Camille SARNIGUET  
a été admis(e) sur concours en : 2011  
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 25/06/2015  
a validé son année d'approfondissement le : 03/11/2016  
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

# BIBLIOGRAPHIE

## Articles

- Allen LH (1982). Calcium bioavailability and absorption: a review. *Am J Clin Nutr* 135(4):783-808
- Alrawi SJ, Schiff M, Carroll RE, Dayton M, Gibbs JF, Kulavlatat M, Tan D, Berman K, Stoler DL, Anderson GR (2006). Aberrant Crypt Foci, *Anticancer Res* 26:107-20.
- Alexander DD, Cushing CA, Lowe KA, Scurman B, Roberts MA (2009). Meta-analysis of animal fat or animal protein intake and colorectal cancer. *Am J Clin Nutr* 89(5):1402-9.
- Astin M, Griffin T, Neal RD, Rose P, Hamilton W (2011). The diagnostic value of symptoms for colorectal cancer in primary care: a systematic review. *Br J Gen Pract* 61(586):231-43.
- Awasthi YC, Sharma R, Cheng JZ, Yang Y, Sharma A, Singhal SS, Awasthi S (2003). Role of 4-hydroxynonenal in stress-mediated apoptosis signaling. *Mol Aspects Med* 24:219-30.
- Balder HF, Vogel J, Jansen MC, Weijenberg MP, Van den Brandt PA, Westenbrink S, Van der Meer R, Goldbohm A (2006). Heme and chlorophyll intake and risk of colorectal cancer in the Netherlands cohort study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15:717-25.
- Bardou M, Barkun AN, Martel M (2013). Obesity and colorectal cancer. *Gut* 62:933-47.
- Bastide NM, Pierre FH and Corpet DE (2011). Heme iron from meat and risk of colorectal cancer: a meta-analysis and a review of the mechanisms involved. *Cancer Prev Res (Phila)* 4(2):177-84.
- Bingham SA, Pignatelli B, Pollock JR, Ellul A, Malaveille C, Gross G, Runswick S, Cummings JH, O'Neill IK (1996). Does increased endogenous formation of N-nitroso compounds in the human colon explain the association between red meat and colon cancer? *Carcinogenesis* 17(3): 515-23.
- Bird RP (1987). Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Lett* 37:147-51.
- Bouzourene H, Chaubert P, Seelentag W, Bosman FT, Saraga E (1998). Aberrant crypt foci in patients with neoplastic and nonneoplastic colonic disease. *Hum Pathol* 30(1):66-71.
- Caderni G, Femia AP, Giannini A, Favuzza A, Luceri C, Salvadori M, Dolara P (2003). Identification of mucin-depleted foci in the unsectioned colon of azoxymethane-treated rats: correlation with carcinogenesis. *Cancer Res.* 63(10):2388-92
- Camilleri M, Madsen K, Spiller R, Greenwood-Van Meerveld B, Verne GN (2012). Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease. *Neurogastroenterol Motil* 24(6):503-12.
- Carpenter CE, Mahoney AW (1992). Contributions of heme and nonheme iron to human nutrition. *Crit Rev Food Sci Nutr* 31(4): 333-67.
- Cheng L, Lai MD (2003). Aberrant crypt foci as microscopic precursors of colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 9(12):2642-49.

Conrad ME, Umbreit JN (2002). Pathways of iron absorption. *Blood Cells Mol Dis* 29(3):336–55.

Corpet DE, Yin Y, Zhang XM, Rémésy C, Stamp D, Medline A, Thompson L, Bruce WR, Archer MC (1995). Colonic protein fermentation and promotion of colon carcinogenesis by thermolysed casein. *Nutr Cancer* 23: 271-81.

Corpet DE, Pierre F (2003). Point: From animal models to prevention of colon cancer. Systematic review of chemoprevention in min mice and choice of the model system. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12(5): 391-400.

Corpet DE, 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* 41(13):1911-22.

Cross AJ, Pollock JRA, Bingham SA (2003). Haem: not protein or inorganic iron, is responsible for endogenous intestinal n-nitrosation arising from red meat. *Cancer Res* 63(10):2358-60.

Cross AJ, Harnly JM, Ferrucci LM, Risch A, Mayne ST, Sinha R (2012). Developing a heme iron database for meats according to meat type, cooking method and doneness level. *Food Nutr Sci* 3(7):905-13.

Davis ME, Lisowyj MP, Zhou L, Wisecarver JL, Gulizia JM, Shostrom VK, Naud N, Corpet DE, Mirvis SS (2012). Induction of colonic aberrant crypts in mice by feeding apparent N-nitroso compounds derived from hot dogs. *Nutr Cancer* 64(2):342-9.

Douglass ML, Kabacoff BL, Anderson GA, Cheng MC (1978). The chemistry of nitrosamine formation, inhibition and destruction. *J Soc Cosmet Chem* 29:581-606.

Dutra FF, Bozza MT (2014). Heme on innate immunity and inflammation. *Front Pharmacol* 5:115.

Esterbauer H, Cheeseman KH, Dianzani MU, Poli G, Slater TF (1982). Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by ADP-Fe<sup>2+</sup> in rat liver microsomes. *Biochem J* 208:129–40.

Femia AP, Dolara P, Caderni G (2004). Mucin-depleted foci (MDF) in the colon of rats treated with azoxymethane (AOM) are useful biomarkers for colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 25:277–81.

Femia AP, Bendinelli B, Giannini A, Salvadori M, Pinzani P, Dolara P, Caderni G (2005). Mucin depleted foci have  $\beta$ -catenin gene mutations, altered expression of its protein, and are dose- and time-dependent in the colon of 1,2-dimethylhydrazine-treated rats. *Int J Cancer* 116:9–15.

Femia AP, Dolara P, Giannini A, Salvadori M, Biggeri A, 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(2):445-9.

Femia AP, Caderni G (2008). Rodent models of colon carcinogenesis for the study of chemopreventive activity of natural products. *Planta Med.* 74(13):1602-7.

Fearon ER (2011). Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu Rev Pathol* 6:479-507.

Fearon ER, Vogelstein B (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 6:759-67.

Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL (2012). Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol* 3(3):153-73.

Giovannucci E, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Ascherio A, Kearney J, Willett C (1994). A prospective study of cigarette smoking and risk of colorectal adenoma and colorectal cancer in US men. *J Natl Cancer Inst* 86:183-91.

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

Gregorio CDI, Losi L, Fante F, Modica S, Ghidoni M, Pedroni M, Tamassia MG, Gafa L, Ponz de Leon M, Roncucci L (1997). Histology of aberrant crypt foci in the human colon. *Histopathology* 30:328-34.

Grune T, Zarkovic N, Kostelidou K (2010). Lipid peroxidation research in Europe and the COST B35 action "Lipid Peroxidation Associated Disorders. *Free Radic Res* 44:1095- 97.

Gueraud F, Atalay M, Bresgen N, Cipak A, Eckl PM, Huc L, Jouanin I, Siems W and Uchida W (2010). Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. *Free Radic Res* 44(10): 1098-124.

Gunter MJ, Probst-Hensch NM, Cortessis VK, Kulldorff M, Haile R, Sinha R (2005). Meat intake, cooking-related mutagens and risk of colorectal adenoma in a sigmoidoscopy-based case-control study. *Carcinogenesis* 26 (3):637-42.

Hallberg L, Brune M, Erlandsson M, Sandberg AS, Rossander-Hulten L (1991). Calcium : effect of different amounts on nonheme- and heme-iron absorption in humans. *Am J Clin Nutr* 53(1):112-9.

Heinen CD (2010). Genotype to phenotype : Analyzing the Effects of Inherited Mutations in colorectal Cancer Families. *Mutat Tes* 10;693(1-2):32-45.

Honickel KO (2008). The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. *Meat Sci* 78(1-2):68-76.

Hooda J, Shah A, Zhang L (2014). Heme, an essential nutrient from dietary proteins, critically impacts diverse physiological and pathological processes. *Nutrients* 6(3):1080-102.

Ijssennagger N, Rijnierse A, De Wit N, Jonker-Termont D, Dekker J, Müller M, Van der Meer R (2012). Dietary haem stimulates epithelial cell turnover by downregulating feedback inhibitors of proliferation in murine colon. *Gut* 61:1041-49.

Irving AA, Yoshimi K, Hart M, Parker T, Clipson L, Ford M, Kuramoto T, Dove W, Amos-Landgraf JM (2014). The utility of Apc-mutant rats in modeling human colon cancer. *Dis Model Mech.* 7(11):1215-25.

Ishikawa S, Tamaki S, Ohata M, Arihara K, 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* 54:1182-91.

Jasperson KW, Tuohy MT, Neklason DW, Burt RW (2010). Hereditary and Familial Colon Cancer. *Gastroenterology* 138(6):2044-58.

Kang SC, Kim HW, Kim KB, Kwack SJ, Ahn IY, Bae JY, Lim SK, Lee BM (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 :779–89.

Kuhnle GG, Bingham SA (2007). Dietary meat, endogenous nitrosation and colorectal cancer. *Biochem Soc Trans* 35(Pt 5):1355-7.

Lefèvre G, Beljean-Leymarie M, Beyerle F, Bonnefont-Rousselot D, Cristol JP, Thérond P, Torreilles J (1998). Evaluation de la peroxydation lipidique par le dosage des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique. *Ann Biol Clin* 56(3): 305-319.

Lewin MH, Bailey N, Bandaletova T, Bowman R, Cross AJ, Pollock J, Shuker DE, Bingham SA (2006). Red Meat Enhances the Colonic Formation of the DNA Adduct O6-Carboxymethyl Guanine: Implications for Colorectal Cancer Risk. *Cancer Res* 66(3):1859-65.

Magnuson BA, Carr I, Bird RP (1993). Ability of aberrant crypt foci characteristics to predict colonic tumor incidence in rats fed cholic acid. *Cancer Res* 53(19):4499-504.

Massion P, Preiser JC, Balligand JL (2002). Les espèces réactives de l'azote : bénéfique ou délétères? *Nutr Clin Metab.* 16:248-52.

McGinley JN, Thompson MD, Thompson HJ (2010). A Method for Serial Tissue Processing and Parallel Analysis of Aberrant Crypt Morphology, Mucin Depletion, and Beta-Catenin Staining in an Experimental Model of Colon Carcinogenesis. *Biol Proced Online* 12:118-30.

McLellan EA, Bird RR (1988). Aberrant crypts: potential preneoplastic lesions in the murine colon. *Cancer Res* 48:6187-92.

Mirvish SS, Haorah J, Zhou L, Hartman M, Morris CR, Clapper ML (2003). N-nitroso compounds in the gastrointestinal tract of rats and in the feces of mice with induced colitis or fed hot dogs or beef. *Carcinogenesis* 24(3):595-603.

Moser AR, Pitot HC, Dove WF (1990). A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. *Science* 247:322-4.

Newmark HL, Yang K, Kurihara N, Fan K, Augenlicht LH, 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 LJ, Daniels JS, Rouzer CA, Greene RE, Marnett LJ (2003). Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells. *J Biol Chem* 278(33): 31426-33.

Nishikawa A, Sodum R, Chung FL (1992). Acute toxicity of trans-4-hydroxy-2-nonenal in Fisher 344 rats. *Lipids* 27:54–8.

Noguchi M, Yoshida T, 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* 93:1027–36.

Omar S, Feki M, Kaabachi N (2006). Iron metabolism, overview and recent insights. *Ann Biol Clin* 64(6):523-34.

Parkin DM, Boyd L, Walker LC (2011). The fraction of cancer attributable to lifestyle and environmental actors in the UK in 2010: summary and conclusions. *British Journal of Cancer* 105,S77-S81.

Parkin DM, Olsen AH, Sasieni P (2009). The potential for prevention of colorectal cancer in the UK. *Eur J Cancer Prev* 18: 179–90.

Parnaud G, Corpet DE (1997). Colorectal cancer: controversial role of meat consumption. *Bulletin du Cancer, John Libbey Eurotext* 84 (9):899-911.

Paulsen JE, Steffense IL, Loberg EM, Husey T, Namork E, Alexander J (2001). Qualitative and quantitative relationship between dysplastic aberrant crypt foci and tumorigenesis in the Min/+ mouse colon. *Cancer Res* 61:5010-15.

Perse M, Cerar A (2011). Morphological and molecular alterations in 1,2 dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats. *J Biomed Biotechnol* 2011: 473964. doi: 10.1155/2011/473964.

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

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

Pierre F, Tache S, Gueraud F, Rerole AL, Jourdan ML, Petit C (2007). Apc mutation induces resistance of colonic cells to lipoperoxide-triggered apoptosis induced by faecal water from haemfed rats. *Carcinogenesis* 28(2):321-7.

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

Pierre FH, Santarelli RL, Allam O, Tache S, Naud N, Gueraud F, Corpet DE (2010). Freeze-dried ham promotes azoxymethane-induced mucin-depleted foci and aberrant crypt foci in rat colon. *Nutr Cancer* 62(5): 567-73.

Pierre FH, Martin OC, Santarelli RL, Tache S, Naud N, Gueraud F, Audebert M, Dupuy J, Meunier N, Attaix D, Vendevre JL, Mirvish SS, Kuhnle GC, Cano N, Corpet DE (2013). Calcium and alpha-tocopherol suppress cured-meat promotion of chemically induced colon carcinogenesis in rats and reduce associated biomarkers in human volunteers. *Am J Clin Nutr* 98(5):1255-62.

Poli G, Schaur RJ, Siems WG, Leonarduzzi G (2008). 4-Hydroxynonanal: A membrane lipid oxidation product of medicinal interest. *Med Res Rev* 28:569–631.

Poulsen MLM, Bisgaard ML (2008). MUTYH Associated Polyposis (MAP). *Curr Genomics* 9:420-35.

Rawat PR , Zaidi R (2014). Detection of Food Mutagens in Processed Meat. *Journal of Food and Nutrition Research* 2(9):556-60.

Sakai E, Morioka T, Yamada E, Ohkubo H, Higurashi T, Hoson K, Endo H, Takahashi H, Takamatsu R, Cui C, Shiozawa M., Akaike M, Samura H, Nishimaki T, Nakajima A, Yoshimi

N (2012). Identification of preneoplastic lesions as mucin-depleted foci in patients with sporadic colorectal cancer. *Cancer Sci* 103(1): 144–9.

Santarelli RL, Pierre F, Corpet DE (2008). Processed meat and colorectal cancer: a review of epidemiologic and experimental evidence. *Nutr Cancer* 60(2): 131-44

Santarelli RL, Naud N, Tache S, Gueraud F, Vendeuvre JL, Zhou L, Anwar NN, Mirvish SS, Corpet DE, Pierre FH (2013). Calcium inhibits promotion by hot dog of 1,2-dimethylhydrazine-induced mucin-depleted foci in rat colon. *Int J Cancer* 133(11): 2533-41.

Schauenstein E, Esterbauer H, Zollner H (1977). Aldehydes in biological systems: their natural occurrence and biological activities. *Mol Nut & Food Rea* 22:589-590.

Scheppach W, Bingham S, Boutron-Ruault MC, Gerhardsson de Verdier M, Moreno V, Nagengast FM, Reifen R, Riboli E, Seitz HK, Wahrendorf J (1999). WHO consensus statement on the role of nutrition in colorectal cancer. *Eur J Cancer Prev* 8: 57-62.

Sesink ALA, Termont DSML, Kleibeuker JH, VanDerMeer R (2001). Red meat and colon cancer: dietary haem-induced colonic cytotoxicity and epithelial hyperproliferation are inhibited by calcium. *Carcinogenesis* 22:1653–9.

Shoeb M, Ansari NH, Srivastava SK, Ramana KV (2014). 4-Hydroxynonenal in the pathogenesis and progression of human diseases. *Curr. Med. Chem.* 21:230–7.

Shpitz B, Bomstein Y, Mekori Y, Cohen R, Kaufman Z, Neufeld D, Galkin M, Dbernheim J (1998). Aberrant Crypt Foci in Human Colons: Distribution and Histomorphologic Characteristics. *Hum Pathol* 29(5):469-75.

Sinha R, Kulldorff M, Gunter MJ, Strinckland P, Rothman N (2005). Dietary Benzo[a]Pyrene Intake and Risk of Colorectal Adenoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14(8):2030-4.

Siu IM, Pretlow TG, Amini SB, Pretlow TP (1997) Identification of Dysplasia in Human Colonic Aberrant Crypt Foci. *Am J Pathol*, 150(5):1805-13.

Söderlund S, Granath F, Broström O, Karlén P, Löfberg R, Ekblom A, Askling J (2010). Inflammatory bowel disease confers a lower risk of colorectal cancer to females than to males. *Gastroenterology* 138(5):1697-703.

Stoffel E, Bhramar M, Raymond VM, Tayob N, Kastrinos F, Sparr J, Wang F, Bandipalliam P, Syngal S, Gruber SB (2010). Calculation of risk of colorectal and endometrial cancer among patients with Lynch syndrome. *Gastroenterology*. 137(5):1621–7.

Sugimura T, Wakabayashi K, Nakagama H, Nagao M (2004). Heterocyclic amines: mutagens/carcinogens produced during cooking of meat and fish. *Cancer Sci* 95(4):290-9.

Su LK, Kinzler KW, Vogelstein B, Preisinger AC, Moser AR, Luongo C, Gould KA, Dove WF (1992). Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the APC gene. *Science* 256(5057):668-70

Surh J, 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.* 22:701–8.

Suzui M, Morika T, Yoshimi N (2013). Colon preneoplastic lesions in animal models. *J Toxicol Pathol* 26(4):335-41.

Takayama K, Yamashita K, Wakabayashi K, Sugimura T, Nagao M (1989). DNA Modification by 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine in Rats. *J Cancer Res* 80:1145-48.

Takayama K, Yamashita K, Wakabayashi K, Sugimura T, Nagao M. DNA modification by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine in rats. *Jpn J Cancer Res* 1989; 80: 1145–8.

Takayama K, Yamashita K, Wakabayashi K, Sugimura T, Nagao M. DNA modification by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine in rats. *Jpn J Cancer Res* 1989; 80: 1145–8.

Takayama K, Yamashita K, Wakabayashi K, Sugimura T, Nagao M. DNA modification by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine in rats. *Jpn J Cancer Res* 1989; 80: 1145–Takayama T, Katsuki S, Takahashi Y, Ohi M, Nojiri S, Sakamaki S, Kato J, Kogawa K, Miyake H, Niitsu Y (1998). Aberrant crypt foci of the colon as precursors of adenoma and cancer. *N Engl J Med* 339:1277-84.

Takayama T, Ohi M, Hayashi T, Miyanishi K, Nobuoka A, Nakajima T, Satoh T, Takimoto R, Kato J, Sakamaki S, Niitsu Y (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(3):562-4.

Vogel J, Jonker-Termont DS, Katan MB, 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.

Wargovich MJ, Brown VR, Morris J (2010). Aberrant Crypt Foci: The Case for Inclusion as a Biomarker for Colon Cancer. *Cancers* 2:1705-16.

Wei EK, Colditz GA, Giovannucci EL, Fuchs CS, Rosner BA (2009). Cumulative risk of colon cancer up to age 70 years by risk factor status using data from the Nurses' Health Study. *Am J Epidemiol* 170: 863–72.

West NE, Wise PE, Herline AJ, Muldoon RL, Chopp WV, Schwartz DA (2007). Carcinoid tumors are 15 times more common in patients with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 13:1129–34.

West AR, Oates PS (2008). Mechanisms of heme iron absorption: current questions and controversies. *World J Gastroenterol* 14(26): 4101-10.

WCRF/AICR (2011). WCRF/AICR Systematic Literature Review Continuous Update Project Report - The Associations between Food, Nutrition and Physical Activity and the Risk of Colorectal Cancer.

Yang K, Fard S, Furrer R, Archer MC, Bruce WR, Lip H, Mehta R, O'Brien PJ, Giacca A, Ward WE, Femia AP, Caderni G, Medline A, Banks K (2016) Risk factors for colorectal cancer in man induce aberrant crypt foci in rats: Preliminary findings. *Nutr Cancer* 68(1):94-104.

Yang K, Kurihara N, Fan K, Newmark H, Rigas B, Bancroft L, Corner G, Livote E, Lesser M, Edelmann W, Velcich A, Lipkin M, Augenlicht L (2008). Dietary induction of colonic tumors in a mouse model of sporadic colon cancer. *Cancer Res.* 68, 7803–10.

Yuan P, Sun MH, Zhang JS, Zhu XZ, Shi DR (2001). APC and K-ras gene mutation in aberrant crypt foci of human colon. *World J Gastroenterol* 7(3):352-356

## Cours

Bourgès Abella N (2008). L'appareil digestif.

Toutain PL (2008). L'automatisme intestinal et le contrôle nerveux de la motricité intestinale.

## Livres

Gueraud F (2014). Oxidized Lipid Products and Carcinogenesis (chap. 18) dans *Lipid Oxidation in Health and Disease*. CRC Press Taylor & Francis Group. p387-97.

## Sites Internets

Analytical Toxicology (2016). Méthémoglobinémies et sulfhémoglobinémies. [En ligne] (Consulté le 16.10.16) <

[http://www.analyticaltoxicology.com/methemoglobinemies-et-sulfhemoglobinemies/#Formes\\_de\\_lrsquoemoglobine\\_normale](http://www.analyticaltoxicology.com/methemoglobinemies-et-sulfhemoglobinemies/#Formes_de_lrsquoemoglobine_normale) >

Balas D (2010), Histologie, épithéliums digestifs. [En ligne] (Consulté 09.09.2016) < <http://www.db-gersite.com/HISTOLOGIE/EPITHDIG/intestin/intes3/intes3.htm> >

Cabasse A (2014), Voyages au cœur de la science, la couleur du sang. [En ligne] (Consulté le 09.09.2016) Site internet consulté le 11.09.2016 < <http://www.voyagesaucoeurdelascience.fr/la-couleur-du-sang/> >

Carcinogenesis : Role of Reactive Oxygen and Nitrogen Species (2015). [En ligne] (Consulté le 27.10.2016)

< <https://thehealthscience.com/sites/default/files/Metabolism%20of%20benzo-a-pyrene.gif> >

Collégiale des universitaires en hépato-gastro-entérologie (2014a). Les fondamentaux de la pathologie digestive : Partie I : Les organes - Chapitre 4 : Côlon. Editions Elsevier-Masson. [En ligne] (Consulté le 10.06.16) < [http://www.snfge.org/sites/default/files/SNFGE/Formation/chap-4\\_fondamentaux-pathologie-digestive\\_octobre-2014.pdf](http://www.snfge.org/sites/default/files/SNFGE/Formation/chap-4_fondamentaux-pathologie-digestive_octobre-2014.pdf) >

Collégiale des universitaires en hépato-gastro-entérologie (2014b). Les fondamentaux de la pathologie digestive : Partie II : Chapitre de synthèse - Chapitre 9 : Histologie digestive. Editions Elsevier-Masson. [En ligne] (Consulté le 10.06.16) <

[http://www.snfge.org/sites/default/files/SNFGE/Formation/chap-9\\_fondamentaux-pathologie-digestive\\_octobre-2014.pdf](http://www.snfge.org/sites/default/files/SNFGE/Formation/chap-9_fondamentaux-pathologie-digestive_octobre-2014.pdf) >

Ducreux M (2014). Les symptômes du cancer colorectal. [En ligne] (Consulté le 15.10.16) < <http://www.fondation-arc.org/Le-cancer-colorectal/les-symptomes-du-cancer-colorectal.html> >

GLOBOCAN (2012). Cancer incidence and mortality worldwide, International Agency for Research on Cancer. [En ligne] (Consulté le 04.09.2016) < <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx> >

Haute autorité de santé (2013). Dépistage et prévention du cancer colorectal, Référentiel de pratiques pour la prévention et le dépistage du cancer colorectal. [En ligne] (Consulté le 04.09.2016) < [http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c\\_1623732/fr/depistage-et-prevention-du-cancer-colorectal](http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_1623732/fr/depistage-et-prevention-du-cancer-colorectal) >

International Agency for Research on Cancer, World Health Organization (2016). Monographies du CIRC sur l'évaluation des risques de cancérogénicité pour l'Homme. [En ligne] (consulté le 20.10.2016) <<http://monographs.iarc.fr/FR/Classification/index.php>>

Johns Hopkins Medicine Gastroenterology & Hepatology, Sporadic (nonhereditary) colorectal cancer: diagnosis. [En ligne] (Consulté le 09.09.2016) < [https://gi.jhsp.org/GDL\\_Disease.aspx?CurrentUDV=31&GDL\\_Cat\\_ID=551CDCA7-A3C1-49E5-B6A0-C19DE1F94871&GDL\\_Disease\\_ID=FB4F2BE3-FC13-44E4-BB69-2CCE936A6CD5](https://gi.jhsp.org/GDL_Disease.aspx?CurrentUDV=31&GDL_Cat_ID=551CDCA7-A3C1-49E5-B6A0-C19DE1F94871&GDL_Disease_ID=FB4F2BE3-FC13-44E4-BB69-2CCE936A6CD5) >

Institut national de la santé et de la recherche médicale (2005). Cancers : pronostics à long terme, rapport complet. [En ligne] (Consulté le 15.10.16) < <http://www.ipubli.inserm.fr/handle/10608/69> >

Institut national de la santé et de la recherche médicale (2016) [En ligne] (Consulté le 15.10.16) < <http://www.inserm.fr/thematiques/physiopathologie-metabolisme-nutrition/dossiers-d-information/maladies-inflammatoires-chroniques-de-l-intestin-mici> >

International Federation for Information Processing (2010). Bilan d'activité de l'IFIP-Institut du porc. Vers une recommandation de réduction du taux de nitrites dans les différentes familles de charcuterie. [En ligne] (Consulté le 09.09.2016) < <http://www.ifip.asso.fr/sites/default/files/pdf-documentations/03-74-10-garry.pdf> >

Okamoto K, Takaoka T, Muguruma N, Takayama T (2012). Endoscopy of Aberrant Crypt Foci: The Expert Approach. [En ligne] (Consulté le 02.10.2016) < [http://dx.doi.org/10.1016/S2212-0971\(13\)70156-0](http://dx.doi.org/10.1016/S2212-0971(13)70156-0) >

Shacter E, Weitzman A (2002). Chronic inflammation and cancer, *Oncology Journal*. [En ligne] (Consulté le 04.09.2016) < <http://www.cancernetwork.com/review-article/chronic-inflammation-and-cancer> >

Stewart B, Wild CP 2014. International Agency for Research on Cancer, World Cancer Report 2014. [En ligne] (Consulté le 04.06.2016) < <https://fr.scribd.com/doc/249125578/World-Cancer-Report-2014> >

## Thèses

Bastide N (2012). Fer héminique et cancérogenèse colorectale : étude des mécanismes et recherche de stratégies préventives. Doctorat ED SEVAB: Pathologie, toxicologie génétique et nutrition. Université de Toulouse. 200p.

Keller J (2016). Le 4-hydroxynonénal, un produit d'oxydation des lipides alimentaires : étude du métabolisme et du rôle dans l'inflammation et la cancérogenèse colorectale. ED SEVAB : Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition. Université de Toulouse. 162p.

Martin O (2015). Promotion de la cancérogenèse colorectale par le fer héminique des viandes : Prévention nutritionnelle, rôle du microbiote et de l'inflammation. Doctorat ED SEVAB: Pathologie, toxicologie génétique et nutrition. Université de Toulouse. 213p.

Santarelli R (2010). Charcuteries et cancérogenèse colorectale. Additifs alimentaires et procédés de fabrication inhibant la promotion chez le rat. Doctorat ED SEVAB: Pathologie, toxicologie génétique et nutrition. Université de Toulouse. 187p.

# ANNEXES

**Annexe 1** : Exemple d'une fiche utilisée pour le dénombrement selon la taille des ACF et des tumeurs sur un côlon de rat.

"lecture" des foyers de cryptes aberrantes (ACF)																			
ref protocole :					lecteur :														
coloration bleu de méthylène 0,05% dans eau d ; 6 à 10min - microscope Axiolab : oculaires x10 et objectif : x4 ou x10																			
notation : nombre de cryptes par foyer /tranches correspondant au champ observable avec objectif x4																			
code		n° ordre					date :												
colon distal :		lecture:																	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
rectum																			
colon proximal :																			
cecum																			
Nb d'ACF constitués du nombre de cryptes indiqué ci-dessous, pour l'ensemble du côlon :																			
1cr	6	11	16	coloration:	observations														
2cr	7	12	17	lecture :															
3cr	8	13	18																
4cr	9	14	19																
5cr	10	15	20																



dénombrément des ACF et autres cryptes aberrantes																						dénombrément des ACF et autres cryptes aberrantes											
ordre	lat	n°lat	code	Nombres d'ACF constitués de 1,2,3...21 cryptes																					n°lat	ACF	nb-500	taille	gros ACF		teneur		
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21					(+3)	(+5)		+7	
75			CY	19	48	46	23	21	18	6	3	3	1														188	603	3,52	75	24	7	
76			AU	11	24	34	29	18	13	7	2	4			1	1											144	574	3,99	75	28	8	
77			DW	6	35	54	30	18	6	6	4	1	2														173	671	3,88	78	28	13	
78			KS	20	52	47	35	22	12	7	2																197	652	3,31	78	21	2	
79			MY	17	43	39	31	13	8	4	1	1	1														160	570	3,23	59	15	3 1 1 2mm	
80			KX	3	36	24	23	12	5	4	3																110	387	3,46	47	12	3	
81			DR	25	33	44	26	22	17	2	3	1															173	586	3,39	71	23	4	
82			CS	5	21	34	21	8	10	6	2				1												106	353	3,71	46	18	3	
83			FW	12	38	42	26	12	8		1																120	425	3,13	47	9	1	
84			JT	10	29	45	26	14	8	2	3	2	1	1													139	495	3,53	35	15	7 1 (2mm centre, Zone a-p	
85			BL	5	12	14	15	10	8	1	1	1	1														74	205	3,98	43	12	3 1 (3,8mm)	
86			JY	4	24	24	22	16	4	3	4	1	1	1													104	430	3,65	32	14	7	
87			NR	2	19	30	34	15	14	8	4	1	2	3													126	403	4,43	85	36	10	
88			FZ	8	43	48	30	31	16	8	5	4	1															194	731	3,67	95	34	10
89			LR	6	17	27	23	16	9	1	2	1	1				1										104	403	3,68	54	15	5 1 (2,4mm)	
90			SW	5	15	21	14	7	8	1	1				1												73	203	3,00	32	11	2 2 (3,76 et 3,8mm)	
91			IU	16	38	37	35	22	8	4	1	2	1	2													166	547	3,54	75	18	6	
92			MX	15	39	37	41	27	12	6	3	6	2	1	1	1												191	733	3,94	100	32	14 2 (1 et 2mm)
93			BR	12	18	27	43	17	7	8	4	2	1														139	544	3,91	82	22	7 1 3,04mm	
94			HP	14	24	44	29	18	9	2	5	4	2	1														182	575	3,76	76	23	12
95			KV	12	32	35	30	11	8	1	2				1												138	498	3,44	57	16	3 1 (2,2mm)	
96			JX	17	33	41	31	22	4	3	1	2	1	1													166	538	3,44	85	12	5	
97			CV	11	17	30	20	13	13	2	2	1															109	387	3,64	51	18	3	
98			FD	14	37	41	30	28	9	6	2	3	1	2													176	603	3,77	84	26	8 2 (4,16 et 3,36mm)	
99			HY	19	27	38	26	13	7	3	3				1												139	499	3,37	58	14	4	
100			DJ	15	35	45	22	17	12	6	2				1												188	559	3,52	83	24	4 1 (2mm)	

**NOM : SARNIGUET**

**Prénom : Camille**

**TITRE: Etude de l'effet co-initiateur du fer héminique et du 4-hydroxynonéal, un produit d'oxydation des lipides insaturés, sur la cancérogenèse colorectale chez le rat : dénombrement des foyers de cryptes aberrantes.**

**RESUME:** Il existe un lien épidémiologique entre le cancer colorectal et la consommation de viandes rouges et/ou de viandes transformées. Des études ont déjà montré le rôle central du fer héminique contenu en grande quantité dans ces viandes, dans la promotion de la cancérogenèse colorectale. Il a été expérimentalement démontré qu'il augmente l'incidence des lésions pré-néoplasiques dans des modèles animaux. De plus, l'hème catalyse des réactions de peroxydation lipidique, formant des aldéhydes dont un des principaux est le 4-hydroxynonéal (4-HNE) qui est cytotoxique et génotoxique *in vitro* et qui est supposé jouer un rôle dans la promotion de la cancérogenèse colorectale du fer héminique. Ma thèse a pour but de déterminer si le fer héminique et le 4-HNE peuvent co-initier la cancérogenèse colorectale avec l'azoxyméthane, un agent chimio-inducteur spécifique du côlon, grâce au dénombrement des lésions pré-néoplasiques de type foyers de cryptes aberrantes. Pour la 1<sup>ère</sup> fois, un effet co-initiateur de la cancérogenèse colorectale du fer héminique sous forme d'hème a été montré. De façon inattendue, nous avons montré pour la 1<sup>ère</sup> fois un effet protecteur du 4-HNE lors de l'initiation à l'AOM de la cancérogenèse colorectale.

**MOTS CLEFS:** Foyers de cryptes aberrantes, 4-hydroxynonéal, fer héminique, lipoperoxydation, cancer colorectal.

---

**TITLE: Co-initiating effect of heme iron and 4-hydroxynonenal, a product of polyunsaturated fatty acids peroxidation, on colorectal carcinogenesis in rats: counting of aberrant crypt foci.**

**ABSTRACT:** There is an epidemiological link between colorectal cancer and red meat and/or processed meat consumption. Studies have already shown the central role of heme iron, present in large amounts in those meats, in colorectal carcinogenesis. Experimentally, heme iron increases preneoplastic lesions incidence in animal models. Moreover, heme catalyses lipid peroxidation reactions leading to aldehydes formation whose principal is the 4-hydroxynonenal (4-HNE) that is cytotoxic and genotoxic *in vitro* and that is supposed to play a role in colorectal carcinogenesis promotion by heme iron. My thesis aim is to determine if heme iron and 4-HNE can co-initiate colorectal carcinogenesis with axomymethane, a specific colon carcinogenesis initiator, with the preneoplastic lesion counting of aberrant crypt foci type. For the 1<sup>st</sup> time, a colorectal carcinogenesis co-initiating effect of heme iron under his hemin form as been demonstrated. Surprisingly, we have shown for the 1<sup>st</sup> time that 4-HNE had a protective effect towards colorectal carcinogenesis AOM initiating effect.

**KEY WORDS:** Aberrant crypt foci, 4-hydroxynonenal, heme iron, lipid peroxidation, colorectal cancer.