



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 : 9605](http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints/ID/9605)

To cite this version :

Malric, Auréline. *Viandes et cancérogenèse colorectale chez le Rat chimio-induit et la Souris Min : effet de l'hème*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2013, 114 p.

Any correspondance concerning this service should be sent to the repository administrator: staff-oatao@inp-toulouse.fr.

VIANDES ET CANCÉROGENÈSE COLORECTALE CHEZ LE RAT CHIMIO-INDUIT ET LA SOURIS MIN : EFFET DE L'HÈME

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

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

par

MALRIC Auréline
Née, le 7 janvier 1989 à Nice (06)

Directeur de thèse : M. Denis CORPET

JURY

PRESIDENT :
M. Roland BUGAT

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :
M. Denis CORPET
M. Giovanni MOGICATO

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

VIANDES ET CANCÉROGENÈSE COLORECTALE CHEZ LE RAT CHIMIO-INDUIT ET LA SOURIS MIN : EFFET DE L'HÈME

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

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

par

MALRIC Auréline
Née, le 7 janvier 1989 à Nice (06)

Directeur de thèse : M. Denis CORPET

JURY

PRESIDENT :
M. Roland BUGAT

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :
M. Denis CORPET
M. Giovanni MOGICATO

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

**Ministère de l'Agriculture et de la Pêche
ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE**

Directeur : M. A. MILON

Directeurs honoraires : M. G. VAN HAVERBEKE.
M. P. DESNOYERS

Professeurs honoraires :

| | | |
|---------------|---------------|---------------------------------|
| M. L. FALIU | M. J. CHANTAL | M. BODIN ROZAT DE MENDRES NEGRE |
| M. C. LABIE | M. JF. GUELFY | M. DORCHIES (émérite) |
| M. C. PAVAU | M. EECKHOUTTE | M. BRAUN (émérite) |
| M. F. LESCURE | M. D.GRIESS | M. TOUTAIN (émérite) |
| M. A. RICO | M. CABANIE | |
| M. A. CAZIEUX | M. DARRE | |
| Mme V. BURGAT | M. HENROTEAUX | |

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les Industries agro-alimentaires*
M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 1° CLASSE

M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*

PROFESSEURS 2° CLASSE

Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*

- M. **DUCOS Alain**, *Zootechne*
- M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*
- M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

- Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
- M. **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
- M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
- M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*

MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
- Mlle **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
- Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*
- M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
- M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
- M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Equine*
- M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
- Mlle **FERRAN Aude**, *Physiologie*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Elevage et Santé avicoles et cunicoles*
- M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mlle **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*
- M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
- Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
- M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*
- Mlle **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- Mlle **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
- Mme **PRADIER Sophie**, *Médecine interne des équidés*

M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*
Mme **TROGELER-MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie (disponibilité à cpt du 01/09/10)*
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

MAITRES DE CONFERENCES et AGENTS CONTRACTUELS

M. **BOURRET Vincent**, *Microbiologie et infectiologie*
Mme **FERNANDEZ Laura**, *Pathologie de la reproduction*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

Mlle **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie*
Mlle **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
Mlle **PASTOR Mélanie**, *Médecine Interne*
M **VERSET Michaël**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
Mme **WARET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

A notre Président de thèse,

A Monsieur le Professeur Roland BUGAT

Professeur des Universités

Professeur de Médecine et Praticien Hospitalier en Cancérologie

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse
Hommage respectueux.

A notre jury de thèse,

A Monsieur le Professeur Denis CORPET

Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale

En remerciement de tous ses précieux conseils et de sa grande disponibilité.
Qu'il trouve ici la marque de toute ma reconnaissance.

A Monsieur Le Docteur Giovanni MOGICATO

Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Anatomie et Imagerie Médicale

Qui nous a fait l'honneur d'accepter de faire partie de notre jury de thèse.
Avec toute notre gratitude.

REMERCIEMENTS

A Monsieur Fabrice Pierre, à Mesdames Sylviane Taché et Nathalie Naud

Pour leur disponibilité, leur aide et leur gentillesse. Merci de m'avoir acceptée au sein de l'équipe, de m'avoir formée aux techniques de laboratoire et de m'avoir supervisée et conseillée afin d'améliorer mon travail.

A Océane Martin,

Merci pour ta présence, ton écoute, tes nombreux et précieux conseils qui m'ont permis de mieux comprendre l'ensemble des résultats et de les interpréter correctement. Sans ton aide, ce travail n'aurait jamais pu aboutir...

A toute l'équipe Toxalim,

Merci de m'avoir acceptée dans votre équipe, de m'avoir fait découvrir le monde de la recherche et de m'avoir fait assez confiance pour participer aux expériences.

A Mesdames Nhan, Noel et Dailcroix,

Pour m'avoir aidée dans l'organisation de la soutenance de cette thèse.

A tous ceux et celles qui souffrent du cancer du côlon...

A mon grand-père paternel.

REMERCIEMENTS

A mon Père, à ma Mère,

Sans qui tout cela serait resté un rêve de petite fille... Merci de m'avoir soutenue durant toutes ces années, de m'avoir écoutée dans les moments de doute comme dans les moments de joie, d'avoir supporté mes incertitudes et de m'avoir conseillée dans mes choix.

Merci d'être là et de m'avoir permis de devenir ce que je suis : une femme et une vétérinaire accomplie...

A mon grand frère,

Mon modèle, mon ami, mon confident, mon frère adoré. Merci d'être là et de me rappeler, à chaque instant, à quel point la famille est importante.

A mes grands-parents paternels et maternels,

A qui je dédie cette thèse. D'où vous êtes, j'espère que vous êtes fiers de voir votre petite-fille soigner les animaux...

A Marc,

Pour avoir autant appris l'un de l'autre, pour ton soutien et ton réconfort tout au long de ces années et pour avoir partagé ces quelques années de vie ensemble...

A Barbara, Arthur, Edouard, Aurélien,

Pour votre amitié. Pour ces années à travailler, à rire, à papoter ensemble... Pour tous les repas et les soirées partagés et pour tous ceux qu'on partagera encore !

Barbara, pour ta présence, nos échanges, nos moments entre filles, nos rires, notre complicité

Arthur, pour ton humour, ton grand sourire et ton goût pour les animaux bizarres !

Edouard, pour tes listes interminables, tes blagues et ton air grognon tout mimi.

Aurélien, pour ton sang froid, ta maturité et ton infinie gentillesse.

A Alex,

Pour m'avoir écoutée pendant sept ans, conseillée, motivée dans tous les moments de ma vie...Merci d'avoir toujours été là pour moi et, en espérant que tu seras là les quelques centaines d'années à venir.

A Mathilde,

Pour tes sourires, ton entrain, ta joie de vivre, ta force de caractère et l'amitié que tu me portes depuis si longtemps. En espérant que notre complicité traversera les années et nous verra vieillir ensemble.

REMERCIEMENTS

A Maëlle,

Pour toutes nos discussions sur tous les sujets possibles, du sérieux à la télé réalité, avec notre café à la main, assises par terre. Pour ton soutien, ta présence sans faille et ton amitié qui ont transformé ces quatre années de quasi vie commune en vrais moments de bonheur. En espérant t'avoir toujours dans ma vie.

A Marielle, Lisou, Audrey C., Thibault, Elo, Yo ; Ben, Antoine, Audrey G.,

Aux premiers pour avoir été des Docs géniaux, m'avoir soutenue dans tous les moments et continuer de le faire encore... Aux seconds pour être des Poulots merveilleux qui m'ont fait passer d'excellents moments et des pauses café-commérages extra !
Que notre métier-passion commun et notre amitié nous gardent toujours liés.

A tous les amis de l'école,

Katy pour ton sens de l'humour, accordé au mien, et ta joie constante, à tous nos bons moments et aux nombreux futurs autres...

Anne-K, merci pour tous les délires et les fous rires que tu m'as offerts. En attente des prochains !

Tiffany pour ton sourire et ta créativité.

Modo pour ton amitié qui reste toujours là, dans mon cœur, et avec qui j'ai tant partagé et appris.

Bla pour tes photos magnifiques et ton écoute quand j'en ai besoin.

Léa, P-E, Loïc, Julia, Max, Vick, Virginie, Amandine P., Isa, Amélie, Audrey B., Elsa, François L., Auréline, Fifou, Nico, Justine, BiBo, Marion L., Sandra, Ambre

Vous tous avec qui j'ai passé d'excellents moments et qui ont fait de ces cinq années de superbes années

et tous ceux que j'oublie sur le papier seulement...

A mes Amours à Quatre pattes,

Baluchon, Nuts, Titou, Inouchka, Fripon, Totoche... mon petit Bichon adoré.

So-6, Saucisson, Monsieur Chat, Chaton, Sonic... mon compagnon félin boulimique.

« *Quand l'appétit va, tout va !* »

SOMMAIRE

| | |
|--|-----------|
| INTRODUCTION | 14 |
| PARTIE A : Etude Bibliographique | 16 |
| I.Côlon et Développement du cancer du côlon | 16 |
| 1. Morphologie et renouvellement cellulaire de l'épithélium d'un côlon sain..... | 16 |
| a. Structure et rôle de l'ensemble côlon-rectum..... | 16 |
| b. Renouvellement cellulaire | 18 |
| 2. Développement du cancer du côlon | 19 |
| a. Etapes de la cancérogénèse | 19 |
| b. Lésions cancéreuses..... | 20 |
| c. Influence du génome sur le cancer colorectal | 21 |
| d. Le gène <i>Apc</i> | 23 |
| e. Facteurs prédisposant à l'apparition de lésions cancéreuses | 25 |
| II.Cancérogénèse et Alimentation | 26 |
| 1. L'influence de l'alimentation globale dans le risque d'apparition du cancer du côlon..... | 26 |
| 2. Les recommandations du WCRF et de l'AICR | 27 |
| a. Les recommandations concernant l'alimentation globale | 27 |
| b. Les recommandations spécifiques au cancer colorectal | 28 |
| 3. Consommation de viandes et cancer du côlon : Epidémiologie | 29 |
| 4. Viande rouge et cancer du côlon: de nombreuses hypothèses..... | 29 |
| a. Les graisses..... | 30 |
| b. Les protéines..... | 31 |
| c. Les amines hétérocycliques et les hydrocarbures aromatiques polycycliques | 32 |
| d. Les composés N-nitrosés | 33 |
| e. Le fer héminique..... | 35 |
| 5. Une hypothèse privilégiée : l'hème | 36 |
| a. Structure de l'hème..... | 36 |
| b. Alimentation et hème | 37 |
| c. Les effets directs de l'hème | 37 |
| d. Les effets indirects de l'hème | 38 |

SOMMAIRE

| | |
|--|-----------|
| III.Prévention de la cancérogénèse hème-induite..... | 41 |
| 1. L'impact de certaines molécules dans la prévention du cancer du côlon..... | 41 |
| 2. L'inhibition des effets directs de l'hème par le Calcium..... | 41 |
| a. Effets protecteurs du calcium | 41 |
| b. Aliments riches en calcium | 43 |
| 3. L'inhibition de la lipoperoxydation par les anti-oxydants..... | 43 |
| a. Qu'est ce qu'un antioxydant ?..... | 43 |
| b. Les rôles des antioxydants..... | 44 |
| c. Quelques exemples..... | 45 |
| 4. L'inhibition de la formation de composés N-nitrosés | 47 |
| IV.Description des principaux modèles expérimentaux..... | 48 |
| 1. Description des modèles rongeurs utilisés | 48 |
| a. Le modèle Rats chimio-induits..... | 48 |
| b. Le modèle Souris <i>Min/apc</i> | 50 |
| c. La combinaison des deux modèles | 51 |
| 2. Description des lésions prénéoplasiques utilisées comme biomarqueurs..... | 51 |
| a. Les Foyers de Cryptes Aberrantes (<i>Aberrant Crypt Foci</i>) | 51 |
| b. Les Foyers de Cryptes Pauvres en Mucine (<i>Mucin Depleted Foci</i>)..... | 53 |
| OBJECTIFS de cette étude | 55 |
| PARTIE B : Expérimentation | 56 |
| I.Le Projet SécuriViande | 56 |
| 1. L'étude SécuriViande..... | 56 |
| a. Etude préalable | 56 |
| b. Etude actuelle | 58 |
| 2. Matériel et méthodes | 59 |
| a. Expérimentation animale..... | 59 |
| b. Protocole nutritionnel et régimes expérimentaux..... | 59 |
| c. Données zootechniques et échantillons | 62 |
| d. Analyses statistiques..... | 63 |

SOMMAIRE

| | |
|--|------------|
| II. La Cancérogénèse hème-induite..... | 64 |
| 1. Matériel et méthodes : Dosage d'un biomarqueur fécal : l'hème..... | 64 |
| a. Préparation des eaux fécales..... | 64 |
| b. Dosage de l'hème | 65 |
| 2. Résultats du dosage de l'hème fécal..... | 67 |
| a. Chez les rats..... | 67 |
| b. Chez les souris..... | 69 |
| III. Effet des viandes sur les lésions (pré)cancéreuses des rongeurs | 72 |
| 1. Matériel et méthodes : Comptage des lésions cancéreuses | 72 |
| a. Comptage des lésions précancéreuses chez les rats..... | 72 |
| b. Comptage des tumeurs chez les souris | 72 |
| 2. Résultats du comptage des lésions précancéreuses | 73 |
| a. Chez les rats..... | 73 |
| b. Chez les souris..... | 76 |
| PARTIE C : Discussion..... | 80 |
| 1. Un régime riche en hème apporté par de la viande rouge conduit-il à des eaux fécales riches en hème ?..... | 81 |
| 2. Un régime riche en hème conduit-il à l'apparition de lésions (pré)cancéreuses des muqueuses colique et intestinale ? | 83 |
| 3. Existe-t-il une relation entre concentration en hème des eaux fécales et apparition de lésions précancéreuses ? Quels sont les mécanismes mis en jeu ?..... | 85 |
| 4. Des stratégies préventives de l'excès de cancer du côlon lié à la consommation de viande sont-elles envisageables ?..... | 89 |
| 5. Ces stratégies de prévention sont-elles réellement possibles dans notre société ?..... | 91 |
| 6. Nos modèles expérimentaux sont-ils adaptés ? En existe-t-il d'autres ?..... | 92 |
| REFERENCES | 100 |
| TABLE DES ILLUSTRATIONS..... | 105 |

SOMMAIRE

| | |
|--|------------|
| ANNEXES | 107 |
| ANNEXE 1 : Aliments riches en vitamine E ou alpha-tocophérol | 107 |
| ANNEXE 2 : Plaque de Fluorimétrie à 96 puits | 107 |
| ANNEXE 3 : Consommation en aliments et en eau chez les rats soumis aux viandes bovines.. | 108 |
| ANNEXE 4 : Suivi du poids des rats et des souris..... | 108 |
| ANNEXE 5 : Dosage de l'hème dans les eaux fécales des rats ayant consommé des charcuteries..... | 109 |
| ANNEXE 6 : Dosage de l'hème dans les eaux fécales des souris ayant consommé des charcuteries..... | 110 |
| ANNEXE 7 : Lésions préneoplasiques coliques dénombrées chez les rats suite à la consommation de charcuteries | 110 |
| ANNEXE 8 : Tumeurs intestinales dénombrées chez les souris suite à la consommation de charcuteries..... | 112 |
| ANNEXE 9 : Tumeurs coliques dénombrées chez les souris suite à la consommation de charcuteries..... | 113 |

INTRODUCTION

En France, on dénombre environ 100 nouveaux cas de cancer colorectal chaque jour. Chaque année, ce sont pratiquement 35 000 nouveaux cas qui sont détectés et près de 16 000 personnes qui en meurent. Le cancer colorectal représente environ 10% des cancers totaux dans le monde et se place en deuxième position chez la femme, après le cancer du sein, et en troisième position chez l'Homme, après le cancer du poumon et celui de la prostate [14]. Seuls les individus d'âge mûr sont affectés par ce type de cancer : près de 85% des cas survenant après l'âge de 65 ans. Les femmes sont moins touchées que les hommes avec un taux d'incidence de 27 individus pour 100 000 contre 40 individus de sexe masculin sur 100 000. Plus particulièrement, les populations d'Europe du Nord et d'Amérique du Nord sont les plus affectées par ce cancer. Les populations d'Afrique et d'Asie ont une fréquence vingt fois moindre de cancer colorectal que les populations d'Europe et d'Amérique du Nord [14].

Bien qu'il existe des formes dites héréditaires, ce type de cancer est majoritairement de forme sporadique, autrement dit, cette maladie n'affecte que quelques personnes de manière isolée. Le mode de vie semble avoir une grande influence sur l'apparition du cancer colorectal. On sait, par exemple, que la fumée de tabac augmente de manière significative le risque de cancer du côlon tout comme la consommation d'alcool. Le manque d'exercice et l'excès de masse corporelle accroissent le risque d'apparition de ce cancer [105].

De nombreux arguments suggèrent une influence notable de l'alimentation. En effet, les pays dont la consommation de viande, et notamment de viande rouge, fait partie des habitudes alimentaires tels que l'Amérique du Nord, la France, l'Angleterre, l'Allemagne ou encore l'Australie, présentent une incidence de cancer colorectal plus élevée que les pays consommateurs de chair de poissons tels que les pays asiatiques [17].

Pour expliquer cette interaction entre environnement et cancer et, plus particulièrement, entre alimentation et cancer, l'épidémiologie ne suffit pas et les modèles expérimentaux sont nécessaires.

INTRODUCTION

De nombreuses études, basées sur la cancérogénèse chez le rat notamment, ont montré l'effet promoteur de la consommation de viande sur l'apparition de cancers colorectaux. De même, des régimes alimentaires enrichis en fibres, en calcium ou en molécules au pouvoir antioxydant ont exposé leur effet protecteur en diminuant de manière plus ou moins significative le risque de cancer du côlon et du rectum. La modification des habitudes alimentaires est donc une des voies d'avenir pour protéger notre organisme du développement de ce type de cancer.

C'est pourquoi nous avons étudié l'effet d'une consommation de viandes bovines modèles sur des rats chimio-induits et des souris mutées *Min/apc*, deux modèles animaux proches, par certains aspects, de l'Homme. Ces effets ont été observés dans notre étude par l'apparition de lésions précancéreuses : les ACF (*Aberrant Crypt Foci*) et les MDF (*Mucin Depleted Foci*) chez le rat et par l'apparition de lésions tumorales chez la souris.

Parallèlement, nous avons quantifié le taux d'hème, molécule mise en cause dans le risque de développement du cancer du côlon, dans les eaux fécales des rongeurs afin de déterminer s'il existait une corrélation entre la concentration en hème des eaux fécales et le développement de lésions cancéreuses.

Enfin, nous avons testé l'effet protecteur de différentes stratégies : antioxydants ajoutés aux régimes et modes de cuisson variés.

PARTIE A : Etude Bibliographique

I. Côlon et Développement du cancer du côlon

1. Morphologie et renouvellement cellulaire de l'épithélium d'un côlon sain

a. Structure et rôle de l'ensemble côlon-rectum

Le tractus intestinal est constitué de l'intestin grêle d'une part et du gros intestin d'autre part. Ce dernier regroupe le caecum, les différentes parties du côlon (ascendant, transverse et descendant) et le rectum (figure 1, [1]).

Le rôle principal du gros intestin est d'éliminer les déchets et de réabsorber une partie des ions et de l'eau présents dans la lumière intestinale. La plupart des nutriments ont été absorbés en amont dans l'intestin grêle. Le chyle, liquide résultant de la digestion intestinale, se mélange, dans le côlon, au mucus produit par les cellules et aux bactéries intestinales afin de créer la matière fécale.

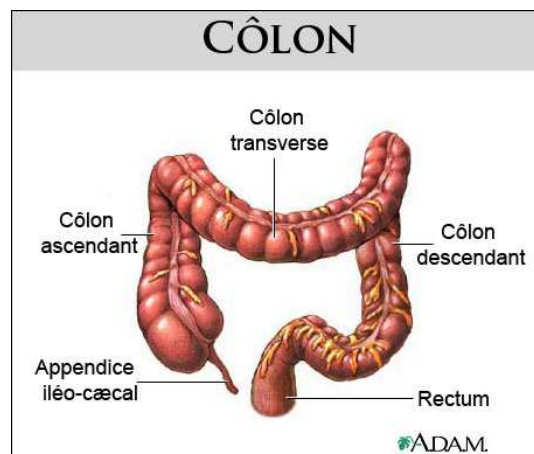


Figure 1 : Organisation du côlon [1]

Le pH du gros intestin de l'Homme est compris entre 4.5 et 7.5. Le côlon mesure de 1 à 1.5 m de long. Il est composé de quatre couches organisées de manière concentrique.

PARTIE A : Etude Bibliographique

Côlon et Développement du Cancer du Côlon

De l'intérieur vers l'extérieur, on note une muqueuse, une sous-muqueuse, une couche musculaire et enfin une séreuse.

La muqueuse colique est en contact direct avec la lumière intestinale. Contrairement à la muqueuse de l'intestin grêle, elle ne possède aucune villosité mais présente de très nombreuses cryptes. L'épithélium colique présente une quantité de cellules dites « en coupe », cellules productrices de mucus, plus importante que dans l'intestin grêle. Ces cellules sont intercalées entre les cellules dont le rôle est d'absorber ions et eau. On peut trouver des tissus lymphoïdes au sein de cet épithélium bien qu'ils soient situés généralement plus en amont, dans l'appendice (figure 3).

La sous-muqueuse est la couche la plus vascularisée et la plus innervée des quatre. La couche musculaire, constituée de fibres musculaires lisses et de fibres musculaires striées, permet la contraction de la paroi colorectale. Quant à la séreuse, elle correspond à une enveloppe protégeant les trois autres structures (figures 2 et 3).

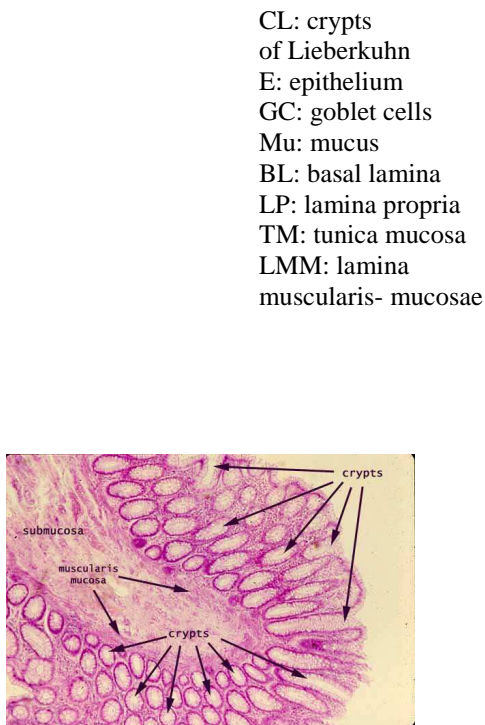


Figure 2 : Coupe histologique du côlon

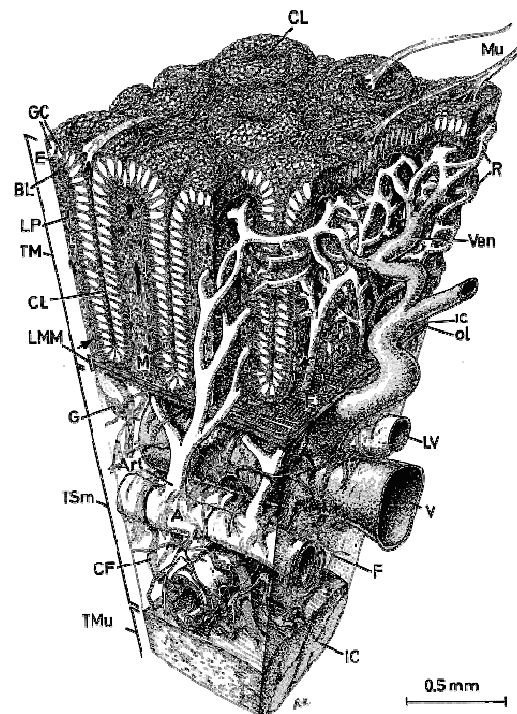


Figure 3 : La structure du côlon

b. Renouvellement cellulaire

La muqueuse, composée de nombreuses cryptes, est le siège du renouvellement cellulaire. Les autres couches ont des rôles bien différents et ne participent à la synthèse de nouvelles cellules que secondairement.

Le sommet des cryptes est en contact direct avec la lumière intestinale. De la base des cryptes à leur sommet, une migration constante de cellules a lieu. Les cellules souches, situées à la base des cryptes, sont des cellules indifférenciées. Elles migrent vers le sommet en subissant de nombreuses divisions qui permettent la synthèse de cellules en grande quantité afin de peupler la crypte.

Au cours de leur migration, elles perdent la capacité à se répliquer et se différencient en cellules muqueuses caliciformes ou en cellules épithéliales qui absorbent ions et eau. Ces cellules différenciées arrivent ensuite au sommet et sont détruites par apoptose ou nécrose et emportées dans la lumière intestinale (figure 4).

Ce cycle de renouvellement cellulaire de la muqueuse dure environ 4 à 8 jours.

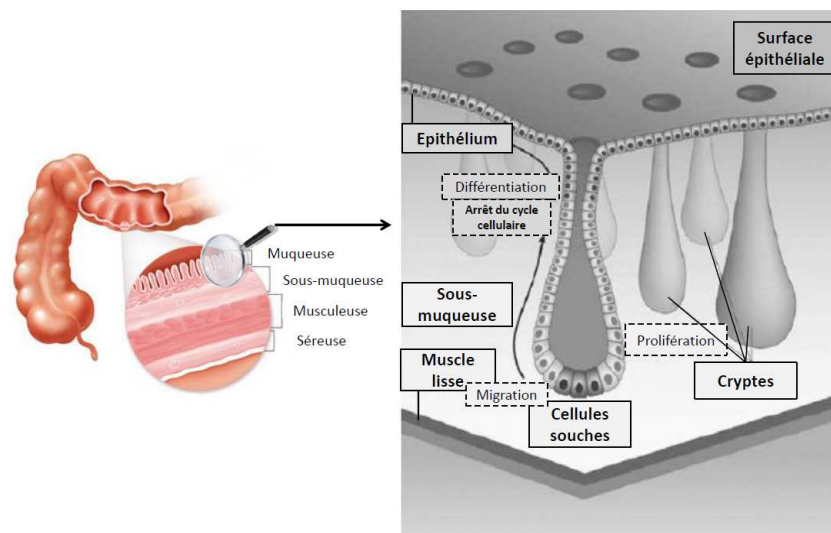


Figure 4 : Cycle de renouvellement cellulaire
Source : <http://www.e-cancer.fr/cancerinfo/les-cancers/> (INCA)

Lorsqu'une cellule est mal dupliquée, autrement dit lorsque son ADN est endommagé ou présente des anomalies, ladite cellule est détruite par apoptose. Ce système de régulation de l'organisme permet l'équilibre ou homéostasie cellulaire. Lorsqu'il est lui-même absent ou

altéré, les cellules ne sont plus ou mal contrôlées et on voit apparaître une prolifération anormale de cellules néfastes. Cette prolifération mal régulée est l'une des caractéristiques des cellules cancéreuses.

2. Développement du cancer du côlon

a. Etapes de la cancérogénèse

La cancérogénèse est définie comme la succession de plusieurs mécanismes responsables de l'apparition et du développement d'une tumeur.

On dénombre quatre phases (figure 5) :

- la phase d'initiation : Elle résulte d'une interaction entre un agent cancérigène et le matériel génétique de la cellule. Suite à cette interaction, une lésion de l'ADN se forme et induit une mutation consécutive à l'absence de réparation de l'ADN ou à une réparation incomplète ou non efficace. Certains gènes, dits « suppresseurs » de tumeurs, permettent de limiter l'apparition des tumeurs. Cependant, lorsqu'ils sont mutés, ils deviennent des oncogènes : sans leur action limitative, les cellules anormales se multiplient.

- la phase de promotion : Elle résulte de la prolifération des cellules anormales sous l'action d'un agent promoteur. Lorsque l'action de ce dernier disparaît, ses effets disparaissent.

- la phase de progression : Les cellules tumorales se développent sous l'effet de mécanismes mal connus et envahissent les tissus adjacents.

- la phase d'invasion : Les cellules tumorales disséminent dans le sang ou la lymphe et forment des métastases qui vont atteindre d'autres organes.

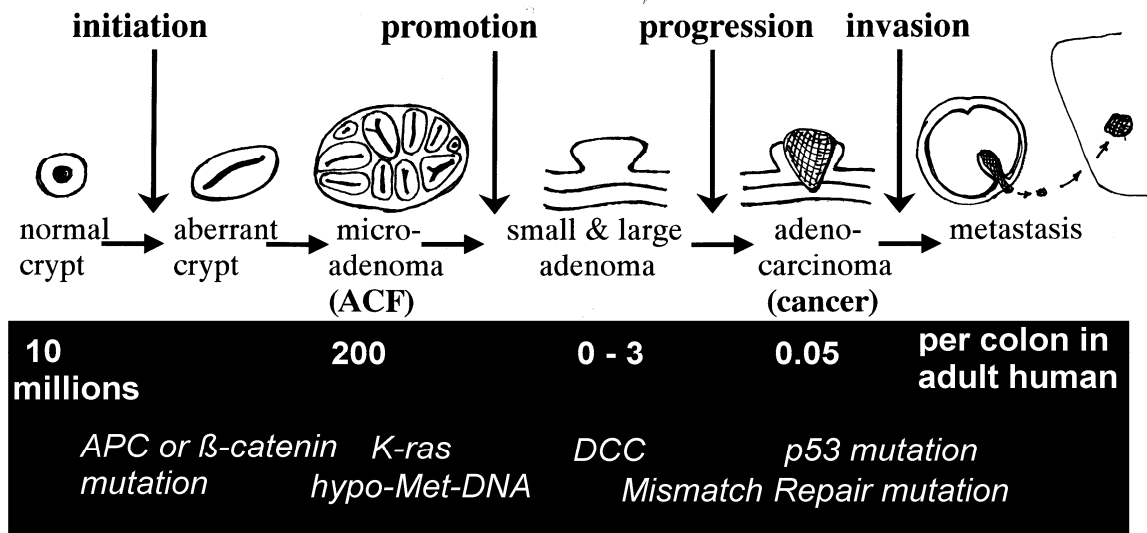


Figure 5 : Modèle du développement de lésions cancéreuses du côlon [24]

b. Lésions cancéreuses

Le cancer du côlon regroupe plusieurs types de tumeurs, bénignes et malignes. Seules les tumeurs épithéliales nous intéressent ici.

On distingue les tumeurs bénignes, adénomes ou plus couramment appelés polypes, et les tumeurs malignes ou adénocarcinomes.

i. Les polypes adénomateux

Les adénomes se présentent sous la forme d'amas de cellules souvent hémorragiques et de taille variable. Leur surface est souvent irrégulière et ulcérée et on note une infiltration par des cellules inflammatoires. Ces tumeurs respectent la lame basale et n'atteignent jamais la couche musculaire. Les cellules ne présentent pas de modification de l'architecture [26].

Ce sont la plupart du temps des polypes adénomateux. Ils sont bénins et, lorsqu'ils sont détectés chez un individu, ils sont retirés par coloscopie et chirurgie minimalement invasive (figures 6 et 7).

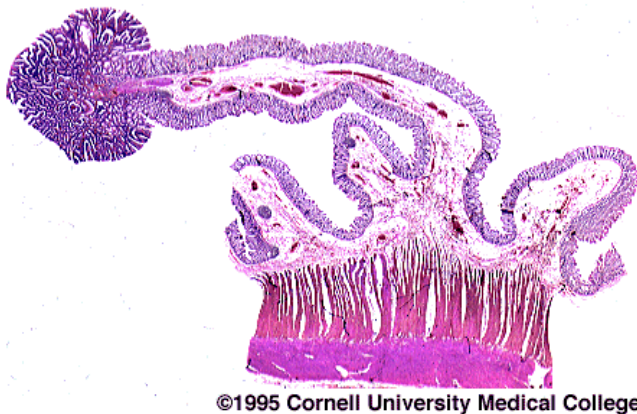


Figure 6 : Coupe histologique d'un polype colorectal

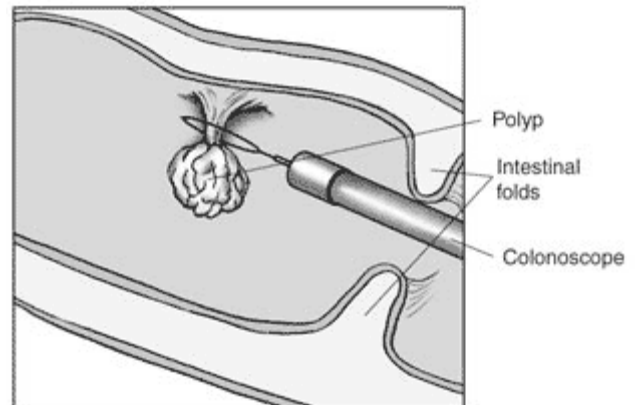


Figure 7 : Chirurgie mini-invasive d'un polype par coloscopie

ii. Les adénocarcinomes

Les adénocarcinomes, quant à eux, présentent macroscopiquement l'apparence générale d'un adénome : ils peuvent prendre la forme d'amas de cellules hémorragiques ou bien de plages ulcéraires plus ou moins larges. Microscopiquement, l'architecture des cellules est modifiée : on parle de dysplasies cellulaires. Selon le degré de ces dysplasies, la tumeur est considérée comme plus ou moins maligne. Ces tumeurs franchissent la lame basale et infiltrent généralement les autres couches du côlon.

c. Influence du génome sur le cancer colorectal

L'apparition du cancer du côlon résulte d'une interaction entre environnement et génétique. Il existe des prédispositions génétiques, dites familiales, qui représentent 5 à 15% des cas de cancers colorectaux [96].

On distingue deux formes : la Polypose Adénomateuse Familiale (PAF) et le syndrome de Lynch ou syndrome HNPCC (*Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer*).

PARTIE A : Etude Bibliographique

Côlon et Développement du Cancer du Côlon

i. Le syndrome de Lynch ou syndrome HNPCC

Le syndrome de Lynch ou syndrome HNPCC (*Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer* ou Cancer Colorectal Héritaire Sans Polypose) représente 2 à 7 % des cancers totaux. Les personnes atteintes de ce syndrome portent une mutation sur les gènes codant pour des enzymes de réparation de l'ADN (les gènes *MMR* ou *Mismatch Repair system*). La mutation de ces gènes accélère le processus néoplasique et favorise l'apparition de tumeurs dans le côlon proximal ainsi que dans d'autres organes (intestin grêle, appareil génital, appareil urinaire) [83].

Trois conditions doivent être réunies pour parler de famille à syndrome de Lynch ou HNPCC :

- Trois parents atteints de cancer colorectal (hors PAF) ou de cancer de l'un des organes cités ci-dessus, dont un lien de parenté au premier degré
- Au moins deux générations successives souffrant de ce syndrome
- L'un des diagnostics effectué avant l'âge de 50 ans.

ii. La Polypose Adénomateuse Familiale

Les formes sporadiques de cancer colorectal représentent environ 90% des cancers colorectaux. 70 à 80% d'entre elles présentent une mutation sur le gène *Apc* alors que la mutation des gènes *MMR* ne concerne que 15% des cas environ [42].

La mutation sur le gène *Apc* conduit à une malformation de la protéine *Apc* : protéine plus courte, protéine mal organisée... et à son inactivation. Cette mutation peut subvenir de manière aléatoire chez n'importe quel individu ou bien faire partie du bagage génétique d'une même famille. C'est le cas des familles PAF (*Polyposis Adenomatous Family* ou Polypose Adénomateuse Familiale) due à une affection héréditaire causée par une mutation génétique de type autosomique dominante du gène *Apc*.

Plus de 800 mutations délétères du gène *Apc* ont été identifiées [16]. La polypose adénomateuse colique familiale est caractérisée par le développement de très nombreux polypes dans la paroi du côlon et du rectum dès l'adolescence. Elle se présente sous différentes formes :

PARTIE A : Etude Bibliographique

Côlon et Développement du Cancer du Côlon

- La forme classique : > 100 adénomes
- La forme atténuée : 10-100 adénomes (mutation région proximale 5', exon 9 et partie distale 3' du gène *Apc*)
- La forme profuse

Ces deux types de mutation sont transmises selon un mode autosomal dominant ce qui signifie que si l'un des parents présente la mutation sur l'un de ces gènes, elle sera d'emblée transmise à l'enfant qui présentera à son tour un risque majoré de développer un cancer du côlon.

Etant en grand nombre, le risque que l'un de ces polypes devienne cancéreux est plus important que chez un individu n'en présentant que quelques uns. Cette maladie demande donc un suivi strict et des contrôles réguliers. Elle ne représente que 1% des cancers colorectaux.

d. Le gène *Apc*

La majorité des individus présentent des cancers colorectaux de type sporadique. Cependant, la mutation du gène *Apc* est l'un des événements-clé de l'apparition de lésions tumorales dans la muqueuse colorectale.

Le gène *Apc* est un gène suppresseur de tumeurs localisé sur le chromosome 5. Il code pour une protéine de 300 kDa, la protéine *Apc*, constituée de 2 843 acides aminés. Cette protéine comporte dans sa partie N-terminale, un domaine capable de s'associer avec le réseau d'actine de la cellule. Dans sa partie centrale, elle possède un domaine portant un site de fixation à la bêta-caténine et des sites de liaison à l'axine et dans sa partie C-terminale, un domaine de liaisons aux microtubules, armatures de chaque cellule.

Grâce à ces trois types de domaines et à ses liaisons avec les protéines du cytosquelette, la protéine *Apc* participe au contrôle de la division cellulaire, de l'organisation des cellules entre elles afin de former un tissu ainsi qu'à la différenciation cellulaire et à la migration des cellules [71].

PARTIE A : Etude Bibliographique

Côlon et Développement du Cancer du Côlon

i. Rôle de la protéine *Apc*

L'activité de la beta-caténine est régulée par la protéine *Apc*. Or, la beta-caténine est une protéine qui stimule la division cellulaire.

La béta-caténine en excès dans le cytoplasme peut passer la paroi du noyau et devenir intranucléaire. Elle peut alors se lier à un facteur de transcription cellulaire qui stimule la division cellulaire. Une trop grande quantité de cette protéine conduit à une prolifération cellulaire exagérée.

La protéine *Apc* peut se lier à la béta-caténine au sein d'un complexe constitué de ces deux protéines associées à l'axine qui rend la béta-caténine phosphorylable. Ce complexe conduit à la dégradation de la béta-caténine dans le cytoplasme de la cellule.

La protéine *Apc* et l'axine permettent donc la dégradation de la béta-caténine et, de ce fait, la régulation de la division cellulaire.

ii. Localisation et mutation du gène *Apc*

Le gène *Apc* est localisé sur le chromosome 5 chez l'Homme, depuis les paires de base 112, 118, 468 jusqu'aux paires de base 112, 209, 532. La plupart de ses mutations conduisent à la formation d'une protéine de taille anormale ou non fonctionnelle. Il s'agit souvent d'une protéine trop petite qui ne peut plus jouer son rôle d'inhibition de la croissance cellulaire. De ce fait, les cellules se multiplient et conduisent à la formation de polypes qui peuvent évoluer en cancer colorectal.

La principale mutation que l'on retrouve chez les individus souffrant de PAF concerne une délétion de cinq bases au sein du gène *Apc*. Cette délétion modifie la séquence d'acides aminés et produit une protéine anormale.

e. Facteurs prédisposant à l'apparition de lésions cancéreuses

La cancérogénèse des cellules du côlon et du rectum dépend donc de plusieurs facteurs. La génétique des populations est un des facteurs qui expliquent l'apparition de cancers colorectaux au sein de certaines familles.

Cependant, ces familles représentent une minorité de la population chez laquelle les cancers colorectaux sont détectés. Il existe donc d'autres facteurs favorisant ou prédisposant à l'apparition de telles tumeurs.

Premièrement, les cellules intestinales sont des cellules dont le taux de renouvellement cellulaire est important. Elles sont régulièrement détruites et cela impose la synthèse de nouvelles cellules. Cependant, lors de prolifération cellulaire rapide et intense, il n'est pas rare de voir apparaître des anomalies de l'ADN en quantité plus importante contrairement à ce que l'on pourrait observer chez des cellules à division lente comme les neurones. Les systèmes de régulation et de contrôle de l'intégrité génomique sont mis à rude épreuve, ce qui explique un taux de malformations augmenté.

Deuxièmement, situées sur le trajet du chyle, les cellules intestinales sont soumises à un décapage important par le contenu luminal. C'est le cas, par exemple, de composés irritants tels que les acides biliaires ou les radicaux libres produits par le métabolisme de certains composés lors de la digestion. Ce processus endogène perturbe à son tour le renouvellement cellulaire et induit une hyperprolifération cellulaire.

Enfin, dans cette même lumière intestinale, circulent des composés appelés mutagènes. Ces derniers sont des composés chimiques qui augmentent le nombre de mutations génétiques. Ils seraient l'un des principaux facteurs de la cancérogénèse colorectale. Particulièrement, les amines hétérocycliques ainsi que les composés N-nitrosés seraient à l'origine de nombreuses mutations de l'ADN.

II. Cancérogénèse et Alimentation

1. L'influence de l'alimentation globale dans le risque d'apparition du cancer du côlon

Plusieurs études de population ont montré une incidence plus forte de cancers colorectaux dans les pays de l'Europe du Nord et aux Etats-Unis que dans les pays d'Afrique [103] (figure 8). Or, lorsqu'on se penche sur les populations migrantes d'un pays à faible incidence vers un pays à forte incidence de cancers colorectaux, on s'aperçoit que le risque de développer un cancer colorectal augmente de manière significative dès la première génération de migrants.

La part génétique vue précédemment existe mais n'est donc pas primordiale dans l'apparition de ce cancer. L'environnement et les habitudes alimentaires présentent une importance bien plus capitale [17].

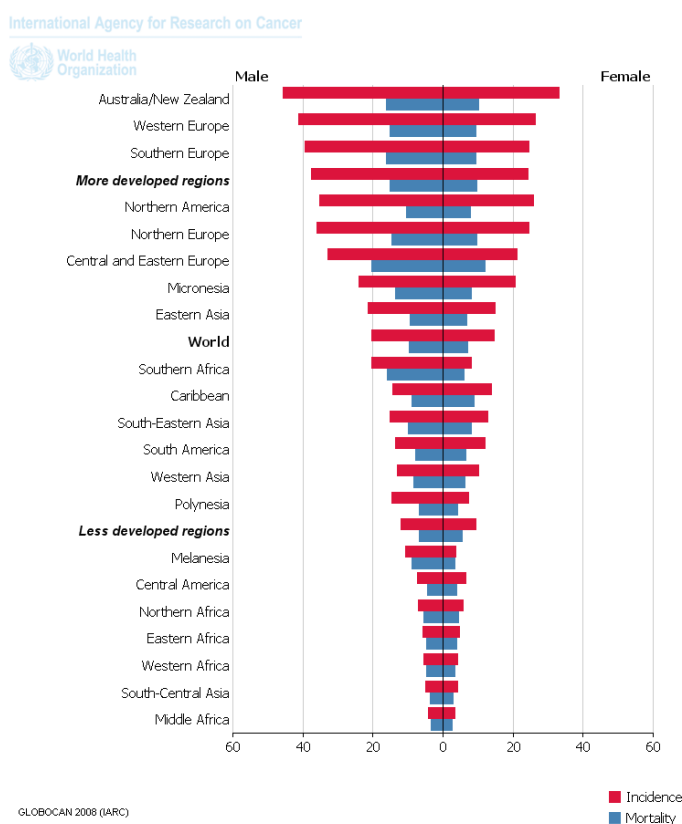


Figure 8 : Incidence du cancer colorectal à travers le monde

PARTIE A : Etude Bibliographique

Cancérogénèse et Alimentation

L'EPIC, ou European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition, a développé une étude sur 500 000 personnes à travers 10 pays européens. Grâce à son étude basée sur un questionnaire récapitulant le style de vie et les habitudes alimentaires, l'EPIC a montré que l'alimentation était un des facteurs les plus importants dans l'apparition de cancers avec une influence de 35 % sur la totalité des cancers voire une influence de 80% sur l'apparition de cancers colorectaux plus particulièrement [40], [104].

2. Les recommandations du WCRF et de l'AICR

a. Les recommandations concernant l'alimentation globale

Afin de souligner l'influence de l'alimentation et des habitudes alimentaires dans l'apparition de cancers, deux associations, le WCRF (World Cancer Research Fund International) et l'AICR (American Institute for Cancer Research) ont financé des programmes de recherche dont le rapport synthétique montre les liens de causalité entre alimentation et cancer.

Leur dernier rapport mis à jour date de 2011 et énonce dix recommandations [101], [102], [103] :

- Soyez aussi mince que possible tout en évitant l'insuffisance pondérale.
- Pratiquez une activité physique au moins trente minutes par jour.
- Évitez les boissons sucrées. Limitez la consommation d'aliments à forte densité calorique (en particulier les produits à teneur élevée en sucres ajoutés ou faibles en fibre ou riches en matières grasses).
- Augmentez et variez la consommation de légumes, fruits, céréales complètes et légumes secs.
- Limitez la consommation de viande rouge (comme le bœuf, le porc ou l'agneau) et évitez de consommer de la charcuterie.
- En cas de consommation d'alcool, limitez-vous à une boisson par jour pour les femmes et à deux pour les hommes.
- Limitez la consommation d'aliments salés et de produits contenant du sel ajouté.
- Ne prenez pas de compléments alimentaires pour vous protéger du cancer.

PARTIE A : Etude Bibliographique

Cancérogénèse et Alimentation

- De préférence, les mères devraient exclusivement allaiter pendant les six premiers mois avant d'introduire d'autres liquides et aliments.
- Après le traitement d'un cancer, les patients devraient suivre l'ensemble de ces recommandations.

b. Les recommandations spécifiques au cancer colorectal

Concernant le cancer du côlon et du rectum, ces mêmes associations ont défini une liste d'aliments supposés protecteurs et d'autres supposés promoteurs du risque de cancer colorectal [103] (tableau 1).

| | Diminution du risque | Augmentation du risque |
|-------------|--|---|
| Convaincant | Activité physique Aliments contenant des fibres alimentaires | Viande rouge Charcuteries Boissons alcoolisées Obésité |
| Probable | Ail Lait Calcium | |
| Limité | Légumes sans amidon Fruits Aliments contenant de la vitamine D | Aliments contenant du fer Fromage Aliments contenant des graisses animales Aliments contenant du sucre |

Tableau 1 : Facteurs influençant le risque de cancer colorectal « Convincing and probable conclusions from the Continuous Update Project report on Colorectal cancer » d'après le rapport du WCRF 2010

Les preuves scientifiques sont convaincantes pour dire que la consommation de viandes augmente le risque d'apparition du cancer colorectal. Tout comme la consommation de fibres diminue le risque d'en développer un.

Ceci explique l'apparition de slogans tels que « manger au moins 5 fruits et légumes par jour », c'est-à-dire 20 g de fibres par jour. L'effet protecteur des fibres diminuerait de 40% le risque de cancer colorectal.

L'alimentation a donc un effet considérable sur le risque d'apparition du cancer colorectal.

3. Consommation de viandes et cancer du côlon : Epidémiologie

Afin d'évaluer la part environnementale et, plus particulièrement, l'influence de l'alimentation sur la survenue des cancers colorectaux, il est nécessaire de dénombrer, au sein des populations, les populations à risque ainsi que les risques eux-mêmes. Cela est permis par les études de cohorte, les études cas-témoins et les méta-analyses qui synthétisent l'ensemble de ces données.

On dénombre trois méta-analyses d'ordre majeur : celle de Larsson et Wolk, celle de Norat et celle du WCRF. Leurs auteurs sont en accord pour dire que la consommation de viande, toutes viandes confondues, ne semble associée à aucune augmentation de risque de cancer colorectal.

Lorsqu'on se penche sur la consommation de viande rouge, Larsson et Wolk montrent un risque relatif de 1.28 (IC 95% [1.15-1.42]) lorsqu'un individu consomme 120 g de viande rouge par jour [59]. Norat et al. montrent un risque relatif de 1.35 (IC 95% [1.21-1.51]) lorsqu'un individu consomme 120 g de viande rouge par jour [73]. La WCRF 2011 présente un constat identique avec un risque relatif de 1.29 (IC 95% [1.04-1.60]) pour 120 g/jour de viande rouge [30].

Les charcuteries présentent des résultats similaires au sein des trois méta-analyses.

Enfin, la consommation de viande blanche n'est associée à aucun risque de cancer colorectal [59], [73], [103].

La consommation de viande rouge et de charcuteries multiplie par 1.3 le risque de développer un cancer colorectal.

4. Viande rouge et cancer du côlon: de nombreuses hypothèses

D'après de nombreuses études épidémiologiques, il semble qu'il y ait un lien fort entre viande rouge et charcuteries d'une part et cancer colorectal d'autre part. Les mécanismes sont encore mal connus. Cependant, l'une des publications de l'étude EPIC montre que les cas de cancers colorectaux associés à la mutation du gène *Apc* sont corrélés aux personnes consommant des viandes rouges et charcuteries en grande quantité ($p = 0.007$) [47].

PARTIE A : Etude Bibliographique

Cancérogénèse et Alimentation

De nombreuses hypothèses ont été posées et exploitées afin de comprendre le lien mis en évidence par les enquêtes épidémiologiques entre viandes rouges, charcuteries et cancérogénèse colorectale. Les études expérimentales réalisées jusqu'à ce jour n'ont pas encore permis d'expliquer avec précision les mécanismes mais on sait que plusieurs composés des viandes rouges et des charcuteries sont potentiellement pro-cancérogènes.

Des études se sont intéressées aux graisses animales contenues dans les viandes, aux protéines, aux amines hétérocycliques et aux hydrocarbures aromatiques polycycliques, produits notamment lorsqu'on cuit la viande, aux composés N-nitrosés ou encore au fer hémique présent en grande quantité dans les cellules musculaires.

a. Les graisses

i. Formation de composés irritants

La digestion des viandes de bœuf et de porc, aliments riches en graisse, stimule la production d'acides biliaires. Or, ces derniers sont normalement réabsorbés à 90% par la muqueuse de l'intestin grêle. Une partie cependant poursuit son chemin jusqu'à la lumière colique. Arrivés dans le côlon, les acides biliaires qui n'ont pas été réabsorbés dans l'intestin grêle sont déconjugués et déhydroxylés par la flore du côlon en deoxycholate et lithocholate, acides biliaires beaucoup plus lipophiles. Les graisses présentes dans la lumière colique vont s'associer à ces derniers et former des composés très irritants pour la muqueuse [50], [65] augmentant ainsi la destruction cellulaire [23].

Les viandes grasses augmenteraient donc le risque de cancer colorectal par leur composition en lipides cytotoxiques couplés aux acides biliaires.

ii. Risque d'obésité

Les lipides alimentaires sont aussi source d'obésité chez les individus qui en consomment en trop grande quantité. Or, le rapport du WCRF précise que l'obésité est un des facteurs de risque dans le cancer colorectal [103].

iii. Risque d'insulino-résistance

De même, ce rapport énonce qu'une surconsommation de lipides est à l'origine d'une insulino-résistance chez le consommateur. L'insulino-résistance correspond à un organisme au sein duquel l'insuline voit son efficacité diminuer. De ce fait, la glycémie augmente et, avec elle, le taux d'acides gras libres, le taux d'insuline ainsi que le taux de molécules pro-inflammatoires telles que les immunoglobulines de type IgF1. Ce déséquilibre est source de prolifération cellulaire et conduit à l'apparition de lésions précancéreuses [28].

iv. Etudes expérimentales

La synthèse d'une centaine d'études expérimentales réalisée par l'équipe du Professeur Corpet à Toulouse, a montré une augmentation du nombre de tumeurs chez des rats chimio-induits et chez des souris mutées *Min/apc* suite à un régime riche en graisses par rapport à des individus témoins [34].

Cependant, même si quelques unes de ces études suggèrent que certaines graisses alimentaires sont promotrices des tumeurs expérimentales dans certains modèles rongeurs, le consensus actuel n'est pas en faveur de cette hypothèse. En effet, les essais cliniques randomisés en double aveugle chez des volontaires n'ont pas fait baisser le nombre de polypes du côlon chez ceux qui mangeaient un régime maigre. L'épidémiologie ne semble pas non plus en faveur de cette hypothèse.

Enfin, aucune association entre un régime gras et l'augmentation du risque de cancer colorectal chez l'Homme n'a pu être prouvée et aucune étude n'a réussi à montrer une augmentation du taux d'acides biliaires à la suite d'un repas riche en graisses [88].

Les graisses animales n'auraient donc pas un rôle majeur dans le développement du cancer colorectal [7].

b. Les protéines

La présence de protéines en quantité non négligeable dans la viande ne semble pas non plus être une piste. Bien qu'un excès de protéines dans le côlon entraîne la formation

d'amines, de phénols et de sulfures d'hydrogènes qui sont tous trois des composés toxiques pour la muqueuse, cet excès reste rare car la plupart des protéines est absorbée à travers la muqueuse de l'intestin grêle, bien en amont [97].

De plus, un surplus de protéines dans la lumière colique conduirait à leur fermentation par la flore bactérienne du gros intestin, fermentation qui n'a pas montré de lien avec l'apparition d'adénocarcinomes colorectaux chez les rongeurs [35]. Enfin, la méta-analyse réalisée par la WCRF n'a pas montré d'association entre le taux de protéines et le risque de cancer colorectal [103].

c. Les amines hétérocycliques et les hydrocarbures aromatiques polycycliques

Les amines hétérocycliques et les hydrocarbures aromatiques polycycliques sont des composés reconnus hautement cancérigènes chez les rongeurs, modèles expérimentaux de l'Homme, et chez les singes [93]. Leur présence dans la pièce de viande consommée augmente sous l'effet de la chaleur : des cuissons par grillades ou plancha entraînent la formation d'une grande quantité de ces composés. De nombreuses études épidémiologiques ont établi un lien entre ces derniers et le cancer colorectal [28], [93], [107].

Cependant, la présence d'amines hétérocycliques n'est pas spécifique de la cuisson du bœuf. On en retrouve dans la peau du poulet bien croustillante en assez grande quantité. Or, comme on l'a dit précédemment, la consommation de viande de poulet n'est pas associée à un risque de cancer colorectal [25]. De même, on retrouve dans les céréales des hydrocarbures aromatiques polycycliques. Ils en sont d'ailleurs la première source. Là encore, aucune étude ou enquête épidémiologique n'a émis un lien entre ces composés et le risque de cancer colorectal [76].

Actuellement, des études sont menées et tendent à mettre en évidence un lien entre amines, hydrocarbures et cancer colorectal chez certaines familles génétiques [48].

d. Les composés N-nitrosés

i. Intérêt des composés N-nitrosés dans l'alimentation

Les composés N-nitrosés ou nitrosamines sont issus des nitrates. Ces derniers ont un grand intérêt dans la fabrication des charcuteries. On les retrouve principalement sous forme de sels nitrités utilisés en tant que conservateurs et permettant de lutter contre les agents bactériens tout en fixant la couleur rouge des viandes. Ce sont des composés issus de la réaction entre nitrites, issus de la transformation des nitrates par la salive et amines, composés de l'organisme.

Le tableau 2 ci-dessous présente les aliments riches en composés N-nitrosés [61].

| Composés N-nitrosés détectés | Produits analysés en ppb (1µg/kg de produit) |
|------------------------------|---|
| Diméthyl-nitrosamine | Bière, vin, fromages, poissons salés (400 à 1000 poissons), mollusques et crustacés, viandes, charcuterie fumée |
| Diéthyl-nitrosamine | Poissons, fromages, viandes , bière, whisky |
| Nitrosopipéridine | Viande et produits carnés épicés |
| Nitrososarcosine | Viandes et charcuterie |
| Nitrosopyrrolidine | Viandes , fromages, bacon et bacon frit (4 fois plus), foie de porc cru et cuit, poissons, graisse cuite |
| Nitrosoproline | Produits carnés, bacon frit |

Tableau 2 : Composés N-nitrosés dans les aliments [61]

Ce tableau montre l'importance majeure de ces molécules dans la composition des viandes et charcuteries et explique les études qui ont été menées afin de tester l'influence potentielle de ces dernières en tant que facteur cancérigène du côlon.

PARTIE A : Etude Bibliographique

Cancérogénèse et Alimentation

ii. Les réactions de nitrosation et de nitrosylation

Les nitrates utilisés dans la fabrication des produits transformés vont conduire à des réactions de nitrosation ou de nitrosylation en fonction du pH.

Les réactions de nitrosation conduisent à la formation de nitrosamines ou de nitrosamides selon qu'il s'agit de l'ajout d'ions nitrosonium NO^+ sur une amine ou une amide [57]. La plupart des composés formés sont des composés instables. L'hème, contenu dans les viandes rouges, est un cofacteur qui catalyserait cette réaction [18], [19], [36].

Les réactions de nitrosylation conduisent à la formation de S-nitrosothiols ou de fer nitrosylé FeNO suite à l'ajout d'un ion nitrosyl NO^- sur des métaux ou des groupements thiols [63].

Dans la viande rouge, on retrouve des nitrosamines ou des nitrosamides car le pH est acide [55] alors que les charcuteries, qui présentent un pH plus élevé que la viande rouge, vont être un support de réactions de nitrosylation. Les nitrites, utilisés sous forme d'acide nitreux, favorisent ce type de réaction et conduisent à la formation d'oxyde d'azote et d'hème nitrosylé [75].

iii. Etudes expérimentales

La consommation de charcuteries ou de viande rouge augmenterait de manière significative la production de composés N-nitrosés dans les selles [19], [58]. Il semble que la majeure partie de ces composés soit des S-nitrosothiols, de l'hème nitrosylé et des nitrosamines au niveau colique, après ingestion de viandes rouges et de charcuteries [58]. Quelle que soit la nature précise de ces composés, ils sont pour la plupart reconnus cancérigènes : ils peuvent induire la formation d'adduits à l'ADN et conduire à des anomalies lors des duplications [51], [60]. Or, ces dernières conduisent à leur tour à un dérèglement de la mort cellulaire et donc du cycle de renouvellement cellulaire.

L'équipe de Mirvish a mis en évidence une augmentation des composés N-nitrosés dans les selles de souris nourries exclusivement avec de la saucisse fumée (hot-dog) [67], [68]. Elle a aussi montré qu'un régime à base de saucisses fumées (hot dog) entraînait une augmentation des lésions cancéreuses dans la muqueuse de souris soumises à une injection

d'azoxyméthane (une molécule pro-cancérogène utilisée pour induire des cancers colorectaux chez les rats et les souris) par rapport à des souris témoins [39].

On voit ainsi un lien entre la présence de ces composés dans les régimes et dans les selles et l'apparition de lésions précancéreuses concomitantes.

e. Le fer héminique

Le fer héminique, contenu en grande quantité dans les fibres musculaires de la viande rouge, est l'une des hypothèses qui expliquent le mieux le lien entre l'alimentation et la cancérogénèse colorectale. L'hème des viandes rouges et l'hème nitrosylé des charcuteries joueraient un rôle important dans la promotion tumorale.

Le fer héminique induit la formation de radicaux libres dans la lumière intestinale. Or, les radicaux libres sont des molécules instables qui interagissent avec les molécules présentes dans un milieu afin de retrouver un état de stabilité. Ces réactions chimiques peuvent donc être à l'origine d'une altération des composés de la lumière colique et entraîner la production de composés toxiques pour les cellules [72]. De plus, le fer héminique conduit à la synthèse de composés N-nitrosés tels que des N-nitrosamines cancérogènes [19] vus précédemment.

Un régime riche en hème entraînerait une cytotoxicité fécale (autrement dit une cytotoxicité du contenu luminal du côlon) et une hyperprolifération de la muqueuse du côlon chez le rat. Comme nous l'avons vu précédemment, la consommation de viande rouge est liée à un risque de cancer colorectal plus élevé que ne l'est la consommation de viande blanche [59], [73], [103]. Or, le taux d'hème dans la viande blanche est presque inexistant. On peut donc supposer que le lien entre consommation de viande rouge et cancer colorectal pourrait être la présence d'hème en partie [87].

Cette hypothèse est mise en avant grâce aux méta-analyses des dernières études épidémiologiques qui suggèrent une réelle association entre hème et cancer colorectal [15]. La dernière méta-analyse en date a analysé les informations provenant des études Nurses'Health Studies et Health Professionals Follow-up Study, deux études épidémiologiques américaines regroupant plus de 200 000 personnes, hommes et femmes. Cette dernière a montré que le risque de cancer colique augmente de 15% chez les individus consommant beaucoup de fer héminique par rapport aux individus en consommant peu [106].

D'un point de vue épidémiologique et expérimental, il semble donc que l'hème, contenu dans les viandes rouges et les charcuteries, responsable de la couleur rouge de la viande lorsqu'elle est crue puis de sa couleur brune lorsqu'elle est cuite, puisse être l'un des agents les plus impliqués dans l'apparition de cancers colorectaux.

5. Une hypothèse privilégiée : l'hème

a. Structure de l'hème

L'hème est constitué d'un noyau porphyrine contenant un atome de fer Fe^{2+} et représente 65% du fer de notre organisme (figure 9). C'est un élément constitutif de l'hémoglobine et de la myoglobine, hémoprotéines responsables de la couleur rouge de la viande et de certaines enzymes. Le métabolisme du fer par notre organisme est particulier : il est économisé au maximum et fonctionne en « circuit fermé ». Pour un apport alimentaire de 10 à 20 mg de fer par jour, seuls 1 à 2 mg sont absorbés au niveau du tractus intestinal. Dans le côlon et les fèces, on retrouve donc la quasi-totalité du fer ingéré qui est ensuite excrété. Les quelques milligrammes absorbés jouent un rôle très important dans notre métabolisme général.

Normalement, une alimentation saine et équilibrée apporte la quantité de fer nécessaire. Ces apports se font sous deux formes : le fer héminique contenu dans les poissons et les viandes et le fer non héminique contenu dans les végétaux dont la biodisponibilité est plus faible (5%) que pour le fer héminique (25%) [74].

L'hème est donc indispensable à notre alimentation puisqu'il apporte avec lui le fer dont nous avons besoin.

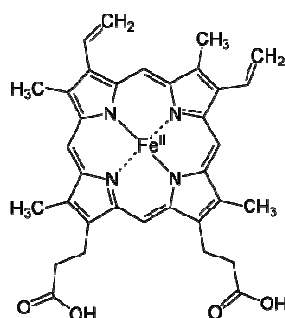


Figure 9 : Structure de l'hème *b*

PARTIE A : Etude Bibliographique

Cancérogénèse et Alimentation

L'hème possède des propriétés catalytiques et oxydatives, c'est un cofacteur, c'est-à-dire une structure non protéique liée à une protéine et qui permet l'activité biologique de cette dernière. Il peut donc catalyser ou favoriser la peroxydation des acides gras insaturés ainsi que des réactions de nitrosation et nitrosylation, augmentant les composés nitrosés et notamment les composés N-nitrosés (nitrosation des amines et des amides –N-NO). Cela pourrait expliquer son rôle dans la cancérogénèse colorectale.

b. Alimentation et hème

L'hème, indispensable à notre alimentation, est suspecté de promouvoir la cancérogénèse colorectale. Plusieurs points sont en faveur de cette hypothèse.

Premièrement, le taux d'hème dans la viande rouge est bien supérieur au taux d'hème dans la viande blanche (0.25-0.5 $\mu\text{mol/g}$ dans un morceau de bœuf contre 0.02-0.05 $\mu\text{mol/g}$ dans une cuisse de poulet soit près de dix fois moins [29]). Or, la viande blanche, contrairement à la viande rouge, n'est pas incriminée dans le risque de cancer colorectal d'après le WCRF.

Deuxièmement, des études expérimentales ont montré que l'hémine, hème chloré utilisé *in vitro* pour modéliser l'hème libre, conduisait à la prolifération des cellules épithéliales coliques du rat [87].

Enfin, des études basées sur la consommation de repas riches en viande rouge par des rats induits à l'azoxyméthane montrent une augmentation de la concentration en hème dans les eaux fécales de ces rats [85] et un effet promoteur sur les lésions préneoplasiques en fonction de la teneur en hème du régime : le boudin noir est plus promoteur que la viande de bœuf elle-même plus promotrice que la viande de poulet [77].

c. Les effets directs de l'hème

L'hème est un composé chimique ayant un effet direct sur les cellules coliques. L'hémoglobine, constituée d'hème, ou l'hémine mis en contact avec des cellules coliques en culture ont un effet génotoxique [49]. Cet effet serait en partie dû à la formation de radicaux libres qui sont irritants pour la muqueuse du côlon. L'hème induit une cytotoxicité qui

endommage la surface épithéliale colique et conduit au développement anarchique de cellules ce qui majore le risque de cancer colorectal [70].

De plus, molécule amphiphile, l'hème peut être métabolisé par l'activité oxygénase de l'épithélium intestinal. En effet, l'hème oxygénase, enzyme présente dans la muqueuse intestinale, détruit l'hème, ce qui correspond à un mécanisme de défense. Cependant, cette destruction conduit à la formation de biliverdine, substance irritante pour l'épithélium par son activité lytique d'une part, et à du peroxyde d'hydrogène, plus connu sous le nom d'eau oxygénée, ainsi qu'à des ions ferreux d'autre part. Or, ces deux derniers composés peuvent, à leur tour, participer à des réactions et produire des radicaux hydroxyles capables de se fixer à l'ADN des cellules, d'entraîner des dommages irréparables lorsque les systèmes de réparation sont eux-mêmes endommagés et initiés, de ce fait, l'apparition de lésions précancéreuses [56].

d. Les effets indirects de l'hème

L'hème agirait par le biais de deux mécanismes : la peroxydation endogène des lipides ou lipoperoxydation et la formation de composés N-nitrosés cancérigènes.

i. La lipoperoxydation

La lipoperoxydation est en fait une peroxydation endogène, autrement dit une oxydation des lipides alimentaires insaturés à l'intérieur de la lumière intestinale. Elle explique surtout la cancérogénèse due à la consommation de viande rouge.

Ce mécanisme a été mis en évidence par l'analyse des urines de rongeurs ayant consommé des viandes rouges. En effet, on retrouve, excrété dans les urines, un marqueur de lipoperoxydation, l'acide 1,4-dihydroxynonane-mercapturique (DHN-MA).

L'équipe de Pierre et al. a montré qu'un régime à base de boudin noir, très riche en sang et donc en hème, conduisait à un taux de DHN-MA très important dans les urines des souris consommatrices [77].

On peut aussi rechercher dans les selles, les TBARs, un ensemble de composés aldéhydes signant un mécanisme de lipoperoxydation. La lipoperoxydation entraîne la formation de deux aldéhydes principalement : le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonanal (4-HNE). Le MDA est toxique pour les cellules car il peut s'y infiltrer et se fixer, par liaison covalente,

PARTIE A : Etude Bibliographique

Cancérogénèse et Alimentation

sur l'ADN. Le 4-HNE, quant à lui, possède des effets cytotoxiques qui induisent l'apoptose de cellules normales mais les cellules anormales, généralement mutées sur le gène *Apc* sont résistantes à l'apoptose et ne sont donc pas détruites. Le 4-HNE favorise donc la survie des cellules mutées et donc la prolifération de cellules tumorales [13].

ii. Les composés N-nitrosés

Ils expliquent surtout l'apparition de cancers colorectaux suite à la consommation de charcuteries.

Les selles de rats nourris avec un régime riche en viande (bacon frit ou saucisse fumée) contiennent 5 à 20 fois plus de composés N-nitrosés que les selles de rats nourris avec un régime riche en caséine, protéine animale issue du lait [68].

Le taux de composés N-nitrosés dans les selles est élevé suite à un régime à base de charcuteries chez le rat. Chez ces mêmes rats, on trouve, après sacrifice, un nombre de lésions précancéreuses sur la muqueuse du côlon plus important que sur la muqueuse des rats témoins ce qui démontre un effet promoteur de la consommation de charcuteries [84].

Les charcuteries demandent des étapes de fabrication au cours desquelles les fabricants ne peuvent s'abstenir d'utiliser des nitrites. Or, lors de la cuisson des dites charcuteries, l'hème est libéré de la globine. La présence de nitrites dans les charcuteries cuites conduit à la formation d'hème nitrosylé (figure 10), promoteur possible de lésions précancéreuses du côlon.

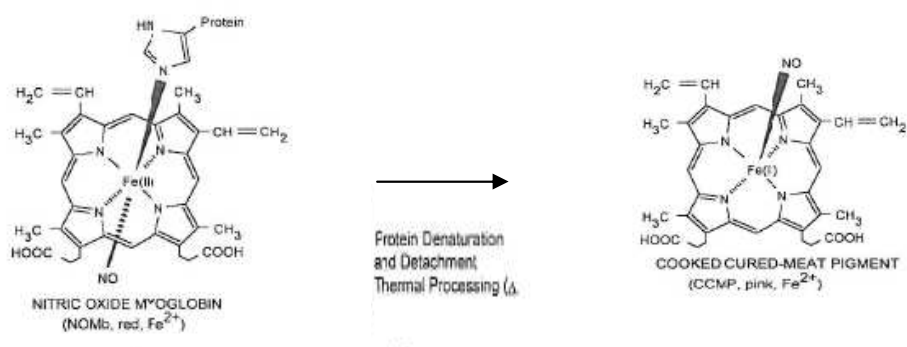


Figure 10 : Transformation de l'hème en hème nitrosylé

PARTIE A : Etude Bibliographique

Cancérogénèse et Alimentation

iii. Effets des composés N-nitrosés

Les composés N-nitrosés formés sont reconnus cancérigènes chez les rongeurs, modèle expérimental de l'Homme. En effet, ils agissent sur l'ADN par alkylation, c'est-à-dire transfert d'un groupement alkyle d'une molécule à une autre. Autrement dit, les composés N-nitrosés transfèrent une partie de leur structure sur l'ADN lui-même, entraînant de ce fait des dommages sur l'ADN [60].

Par ses différentes actions et l'influence des nombreuses molécules qui découlent de son activité, l'hème serait le principal agent « pro-cancérigène » qui expliquerait l'apparition de lésions précancéreuses sur la muqueuse du côlon suite à la consommation de viandes rouges et charcuteries.

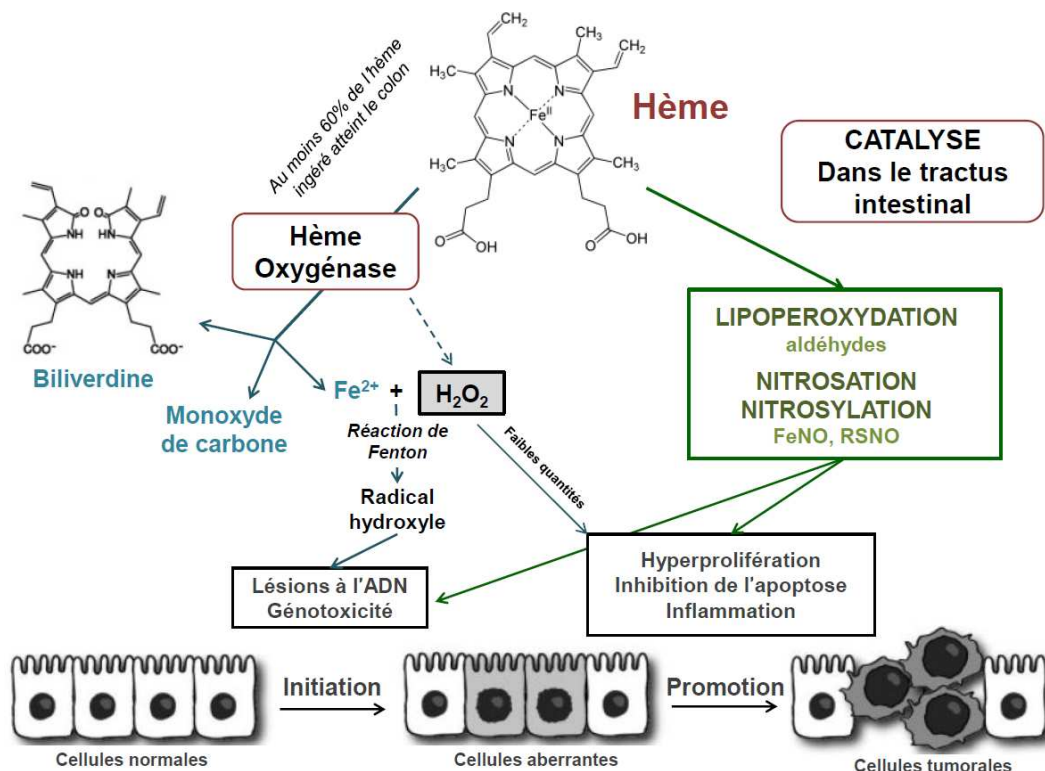


Figure 11 : Les différentes voies potentiellement actrices dans le développement du cancer colorectal, dans lesquelles l'hème est impliqué après son ingestion
D'après [29, 49, 56, 100]

III. Prévention de la cancérogénèse hème-induite

1. L'impact de certaines molécules dans la prévention du cancer du côlon

Le fer héminique a un effet promoteur sur la cancérogénèse colorectale. Les mécanismes de lipoperoxydation et de formation de composés N-nitrosés ainsi que les effets directs de l'hème sur la cytotoxicité des eaux fécales sont fortement mis en cause.

Des études épidémiologiques suggèrent que deux cancers sur trois pourraient être évités en modifiant nos habitudes alimentaires [37]. La WCRF a élaboré la liste des aliments ayant un effet protecteur convaincant telle qu'une alimentation riche en fibre ou seulement probable tels que l'ail ou le lait. Cela explique l'apparition de conseils nutritionnels, initiés par la WCRF, qui proposent de :

- Manger 300g de viande rouge par semaine au maximum
- Manger au moins cinq fruits et légumes par jour

Pierre et al. ont montré que l'effet promoteur du fer héminique était fortement corrélé avec un rôle d'inducteur de lipoperoxydation des acides gras contenus dans les aliments ingérés [80]. Des stratégies de prévention ont alors été testées et ont conduit aux résultats suivants :

- L'ajout d'antioxydants empêche, par différentes modalités d'action, les effets néfastes de l'hème en inhibant les mécanismes de lipoperoxydation
- L'ajout de calcium dans le régime permet de capter l'hème et inhibe ainsi son effet promoteur [89] et donc ses effets indirects

2. L'inhibition des effets directs de l'hème par le Calcium

a. Effets protecteurs du calcium

Le Calcium, contenu dans de nombreux produits laitiers, peut précipiter avec l'hème, molécule amphiphile composée de chaînes polarisées et ainsi créer un complexe dans la lumière colique [89], [95]. Ces complexes conduisent à la diminution de la concentration en hème libre dans le contenu de la lumière colique et donc à la diminution de la concentration en hème libre des eaux fécales. De ce fait, les eaux fécales étant moins riches en hème, leur pouvoir cytotoxique diminue. Le contenu de la lumière colique perd une partie de son pouvoir

PARTIE A : Etude Bibliographique

Prévention de la cancérogénèse hème-induite

irritant au contact de la muqueuse et entraîne, par conséquent, moins de destruction cellulaire et donc moins d'hyperprolifération cellulaire en retour ce qui limite les possibles erreurs ou dommages de l'ADN [78].

L'hème étant en moindre quantité, outre son effet direct diminué, ses effets sur la lipoperoxydation ainsi que la formation de composés N-nitrosés diminuent aussi (figure 12).

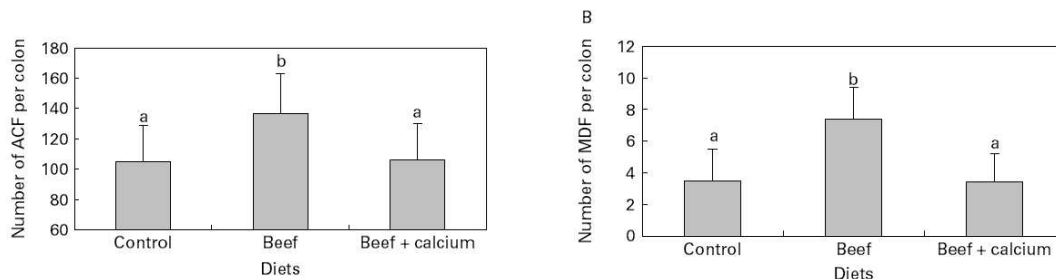


Figure 12 : Effet protecteur du calcium sur la concentration en hème des eaux fécales

L'effet protecteur du Calcium s'explique par le mécanisme d'action suivant :

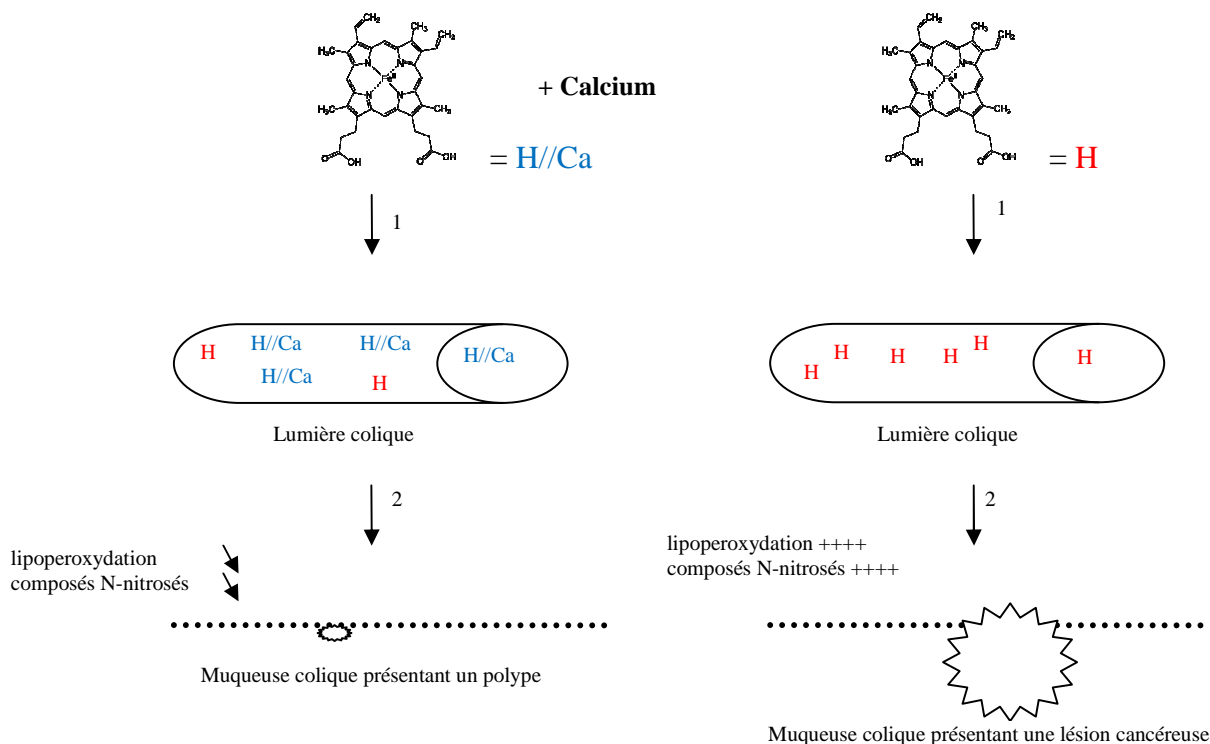


Figure 13 : Effet protecteur du calcium sur le cancer colorectal : **1/** Le calcium précipite avec l'hème et diminue la concentration en hème libre des eaux fécales, **2/** Diminution de la cytotoxicité des eaux fécales et des effets irritants direct et indirect de l'hème sur la muqueuse colique

Le Calcium semble donc protéger la muqueuse des effets de l'hème et diminuer le risque de cancer colorectal.

b. Aliments riches en Calcium

Le Calcium est présent dans de nombreux aliments. Les produits laitiers représentant la principale source de Calcium en France, offrent une bonne biodisponibilité du Calcium dans l'organisme ainsi qu'une bonne absorption (près de 30%). On retrouve aussi du Calcium dans les amandes, les pistaches, les dattes, les figues, les oranges, le chou, le brocoli...

Les apports journaliers recommandés sont de 900 mg/jour pour un individu adulte ayant une alimentation équilibrée.

3. L'inhibition de la lipoperoxydation par les anti-oxydants

a. Qu'est ce qu'un antioxydant ?

Un antioxydant permet de prévenir l'oxydation des lipides alimentaires en cédant des ions H⁺ capables d'interrompre la propagation de radicaux libres. Il existe des antioxydants de synthèse et des antioxydants d'origine naturelle. Actuellement, on déconseille l'utilisation d'antioxydants chimiques suspectés d'être cancérigènes et moins stables que les antioxydants d'origine naturelle [9].

Parmi les antioxydants d'origine naturelle, on note les épices, les plantes et les fruits, produits très riches en acides phénoliques, tels que :

- L'olive riche en hydroxytyrosol
- Le raisin riche en resveratrol
- La grenade riche en acide ellagique

On peut aussi retrouver des antioxydants sous la forme de vitamines ; c'est le cas de la vitamine E ou alpha-tocophérol, antioxydant appartenant à la famille des acides phénoliques.

b. Les rôles des antioxydants

Outre leur action préventive, les antioxydants améliorent :

- les qualités organoleptiques des viandes telles que la couleur rouge de la viande de bœuf, par exemple, grâce à un effet protecteur du pigment myoglobine
- les qualités microbiologiques telles que l'inhibition de la croissance de bactéries (*Listeria monocytogenes*) offrant au consommateur un allongement de la durée de vie des produits
- les qualités nutritionnelles en empêchant le phénomène de rancissement.

Les polyphénols, qui représentent une grande partie des antioxydants, ont été étudiés pour leurs propriétés anti-oxydantes et ont démontré un effet positif sur la prévention de certaines maladies, notamment les maladies cardiaques et les cancers [11], [98]. On sait qu'ils empêchent la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Or, le développement d'une tumeur ne peut se faire qu'avec la présence de vaisseaux sanguins apportant molécules inflammatoires et composés nécessaires à la prolifération cellulaire.

Les polyphénols permettent donc de limiter la propagation tumorale.

Leur action est possible grâce à leur fort pouvoir antioxydant : ils sont capables de donner un électron ou un atome d'hydrogène à un radical libre afin de le neutraliser et de stopper ainsi les réactions de lipoperoxydation [94].

Ces réactions se composent de trois étapes : une molécule initiatrice perd un hydrogène et conduit à la formation d'un radical libre ($RH \rightarrow R^\bullet$). Ce radical libre réagit avec une molécule d'oxygène pour créer un radical peroxyde ($R^\bullet + O_2 \rightarrow ROO^\bullet$) qui prélève un hydrogène à un lipide voisin ($ROO^\bullet + RH \rightarrow ROOH + R^\bullet$).

La présence constante d'oxygène permet ces réactions en chaîne d'oxydation des lipides qui ne peuvent être arrêtées que par la réaction de deux radicaux libres entre eux ou d'un radical libre et d'un antioxydant tel qu'un polyphénol ou la vitamine E [53], [82].

Des études expérimentales ont d'ailleurs montré les effets positifs de ces molécules. Dans un modèle *in vitro* mimant l'environnement gastrique, la vitamine E inhibait la lipoperoxydation initiée par du fer héminique [62], [99]. Dans un modèle *in vivo*, l'huile

PARTIE A : Etude Bibliographique

Prévention de la cancérogénèse hème-induite

d'olive inhibait l'induction de lésions préneoplasiques induites par l'hémine chez le rat chimio-induit [81].

Enfin, la mesure des TBARS (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*), marqueur de l'oxydation des lipides, reflète l'effet neutralisant des antioxydants sur la peroxydation des lipides. L'ajout d'extrait de romarin, composé riche en acides phénoliques, à une viande hachée de bœuf, permet de diminuer les TBARS de 60% et donc de diminuer fortement l'oxydation lipidique de la viande, ce qu'on appelle communément le rancissement.

c. Quelques exemples

i. Le tocophérol

L'alpha-tocophérol, l'un des isomères du tocophérol, plus connu sous le nom de vitamine E, porte dans sa structure un radical capable de réagir avec un autre radical et ainsi créer une molécule neutre et stable.

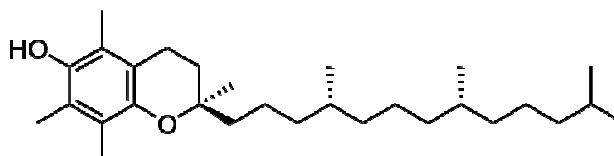


Figure 14 : Structure de la Vitamine E

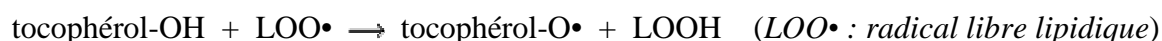


Figure 15 : Réaction chimique entre la vitamine E (tocophérol) et un radical libre

La vitamine E est présente dans de nombreux aliments dont les huiles (Annexe 1): l'huile de tournesol (48.7 mg pour 100g), l'huile d'olive (5.1 mg pour 100g), l'avocat (3.2 mg pour 100g).

PARTIE A : Etude Bibliographique

Prévention de la cancérogénèse hème-induite

La vitamine E agit en inhibant la propagation de la formation de radicaux libres par la perte d'une molécule d'hydrogène captée par le radical libre [52]. Ce dernier gagne ainsi en stabilité et perd son action oxydante et irritante sur la muqueuse du côlon.

ii. La grenade

La grenade est un fruit riche en fibres alimentaires, en folate (vitamine B9) et en vitamine C. Elle est le plus souvent consommée sous forme de jus obtenus en pressant le fruit entier avec sa peau. Les arilles, enveloppes charnues comestibles entourant la graine, contiennent des flavanols ; la peau contient des acides ellagique et gallagique et la couleur rouge du fruit est due à la présence d'anthocyanes.

L'ensemble de ces composés offre à la grenade un pouvoir antioxydant très important (d'après la Base USDA d'indice ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*), valeurs moyennes d'ORAC [2]).

Plus de 250 études ont mis en évidence l'effet positif du pouvoir antioxydant de la grenade sur de nombreuses maladies dont le cancer [3], [6], [12], [54].

Cependant, ces études ne concernent que des cultures cellulaires ou des modèles animaux et sont principalement basées sur le cancer du sein et de la prostate. Le mode d'action de la grenade semble plus complexe que celui de l'alpha-tocophérol ou des polyphénols et reste méconnu.

Dans le cadre du cancer colorectal, nous savons que les radicaux libres ont un rôle dans la cancérogénèse. Il est donc intéressant de voir si les propriétés reconnues de la grenade pourraient avoir un effet protecteur sur la cancérogénèse colorectale.

4. L'inhibition de la formation de composés N-nitrosés

Les polyphénols, tels que l'hydroxytyrosol contenu dans l'huile d'olive, l'acide ellagique contenu dans la grenade ou le resvératrol contenu dans le raisin, et la vitamine E sont capables d'inhiber la formation de composés N-nitrosés [41], [66].

Cependant, les mécanismes impliqués sont complexes et dépendent de la présence ou non de lipides à proximité.

Pour éviter la formation d'hème nitrosylé et de nitrosamines, le retrait des nitrites dans les charcuteries paraît être une meilleure solution. En effet, une viande de porc non traitée avec des nitrites conduit à une absence de cancérogénèse colique chez les rats et les souris qui consomment un tel régime. Au contraire, lorsqu'on utilise des nitrites dans la transformation, on voit apparaître des lésions précancéreuses sur la muqueuse colique des rongeurs [84].

Cependant, supprimer l'utilisation des nitrites dans la fabrication des charcuteries semble difficile dans notre pays connu pour ses salaisons. Cela demanderait aux consommateurs de conserver leurs produits au réfrigérateur afin d'empêcher le développement de *Clostridium botulinum*.

Autre alternative cette fois envisageable, les filières pourraient diminuer le taux de nitrites de 150 ppm à 80 ppm. Une conservation adéquate dans un endroit sec ou au réfrigérateur suffiraient alors à limiter le développement de bactéries dans ces charcuteries « faibles en nitrites ».

Afin de limiter la formation de composés N-nitrosés, diminuer la quantité de nitrites dans la lumière colique reste une des solutions les mieux adaptées. L'utilisation de molécules anti-nitrosantes telles que l'alpha-tocophérol ou la vitamine E semble aussi apporter de bons résultats [38].

IV. Description des principaux modèles expérimentaux

1. Description des modèles rongeurs utilisés

Les études cas-témoins ainsi que les études de cohorte ne sont pas suffisantes pour étudier les effets de certains aliments sur le développement de cancer colorectal. Elles apportent de nombreuses informations mais dépendent, pour la plupart, d'enquêtes basées sur des questionnaires qui sont souvent sources de biais : mauvaise mémoire, réponses peu précises... Elles permettent d'obtenir des informations suite à de simples observations qui ne peuvent pas prouver de lien de cause à effet.

Un modèle expérimental est donc nécessaire pour apporter des preuves directes et améliorer la compréhension des effets et des mécanismes de certains agents protecteurs ou, au contraire, promoteurs. Les rongeurs constituent un modèle animal fondamental utilisé depuis de nombreuses années afin d'étudier les causes et de tester les hypothèses d'apparition du cancer colorectal.

Pour être un bon modèle expérimental, il est nécessaire que les rongeurs, notamment rats et souris, puissent développer, comme l'Homme, des lésions précancéreuses ou cancéreuses au niveau de la muqueuse intestinale et cela de manière spontanée et rapide. Or, bien que la première condition soit remplie, la deuxième nécessite d'attendre plusieurs mois pour voir apparaître de telles lésions. De plus, outre la contrainte temporelle, une contrainte financière s'ajoute : garder de tels animaux suppose l'utilisation de cages, la mise en place d'une atmosphère spéciale, l'alimentation des individus... autant de paramètres qui ont un coût non négligeable. Nous avons donc recours à des modèles « modifiés » de rongeurs qui développent des lésions cancéreuses dans des contraintes de temps réduites.

a. Le modèle Rats chimio-induits

Les rats utilisés en tant que modèle animal du cancer colorectal sont des rats appartenant à une lignée pure. Il s'agit le plus souvent de rats Fischer 344 mâles qui reçoivent, une semaine avant la mise en place des différents régimes alimentaires, une injection intra-péritonéale d'azoxyméthane (AOM), un agent chimique initiateur de la cancérogénèse colorectale.

PARTIE A : Etude Bibliographique

Description des principaux modèles expérimentaux

Dans l'organisme, l'azoxyméthane se transforme en méthylazoxyméthanol qui donne des ions pouvant passer la barrière nucléaire et agir ensuite au niveau de l'ADN en créant de mauvais appariements entre les bases de l'ADN [44].

Des lésions de type ACF (*Aberrant Crypt Foci*), précurseurs d'adénocarcinomes dans certains cas, se forment en deux semaines environ. Des lésions de type MDF (*Mucin Depleted Foci*) centrées sur des cryptes qui tapissent le côlon et dont les cellules sont presque toutes des cellules à mucus, apparaissent au bout de sept semaines environ. Elles sont caractérisées par des foyers de cryptes devenus dysplasiques ou ayant perdu leur capacité de production de mucus, foyers précurseurs de cancer colorectal. Des tumeurs de type adénocarcinome peuvent être visibles au-delà de trente semaines [22].

Sans initiateur, ces tumeurs n'apparaîtraient pas avant plusieurs années...

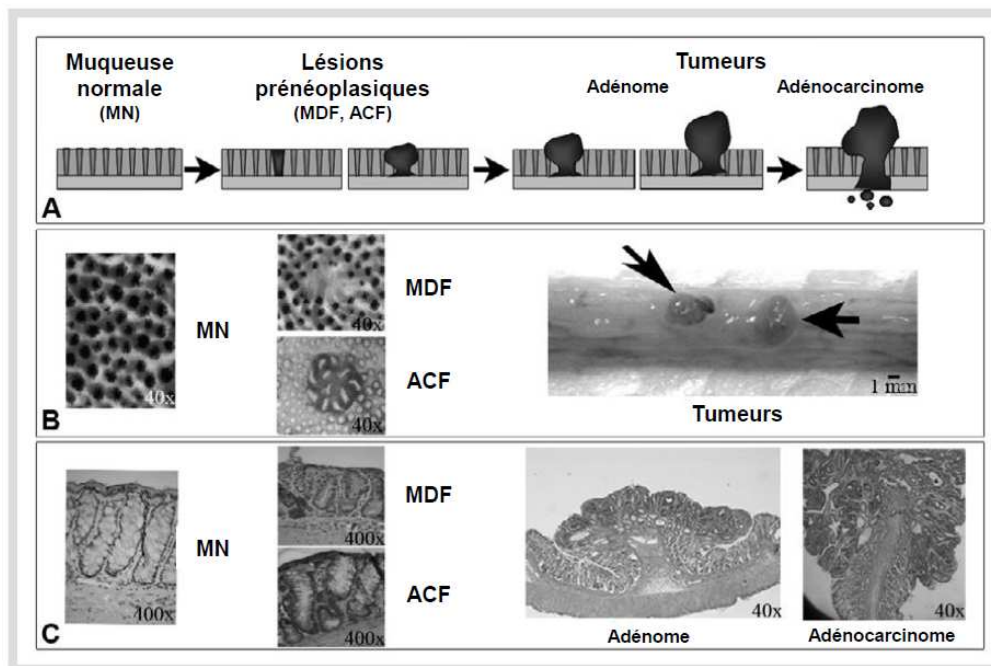


Figure 16 : les étapes de la cancérogénèse colorectale observée chez les rats F344 induits à l'AOM/DMH [44]

Ce modèle est intéressant pour plusieurs raisons [33] :

- les lésions cancéreuses se situent dans le côlon et le rectum (comme chez l'Homme)
- le recto-côlon des rats est sensiblement équivalent d'un point de vue histologique au recto-côlon de l'Homme

PARTIE A : Etude Bibliographique

Description des principaux modèles expérimentaux

- on observe un développement assez similaire des adénocarcinomes chez le rat Fischer 344 et chez l'Homme (figure 16)
- l'interaction entre la bêta-caténine et l'ADN au sein du noyau est présente chez les deux espèces.

Le point critique qui différencie ce modèle animal du modèle humain est l'absence de mutation du gène *Apc* qui ne représente que 8% chez le Rat Fischer 344 alors qu'elle est retrouvée quasi systématiquement chez l'Homme.

b. Le modèle Souris *Min/apc*

Contrairement aux rats décrits précédemment, les souris *Min/apc* (souche C57BL6/J) possèdent un matériel génétique modifié par rapport à d'autres lignées de souris pures. En effet, ces souris sont mutées sur le gène *Apc*. On parle de souris Min (Multiple Intestinal Neoplasia) car elles développent de manière spontanée des adénomes en dix à douze semaines (contre plusieurs mois à années chez des souris « normales »).

Une étude approfondie de ce modèle a permis de comprendre que la mutation du gène *Apc* était similaire à celle observée chez les personnes appartenant à des familles PAF ou chez de nombreux individus souffrant de cancers colorectaux d'apparition sporadique [33], [92].

Les souris *Min/apc* représentent donc un bon modèle pour comprendre le lien entre génétique et cancer du côlon :

- Comme chez l'Homme, la mutation du gène *Apc* est présente et constitue le point de départ de l'apparition de lésions cancéreuses
- Les souris sont génétiquement modifiées et ne demandent aucune injection comme c'est le cas chez les rats.

Les lésions cancéreuses observées chez les souris *Min/apc* se situent préférentiellement sur la muqueuse de l'intestin grêle, contrairement à l'Homme, chez qui elles se situent sur le côlon. Cependant, l'intestin grêle des souris et le recto-côlon du rat et de l'Homme présentent la même origine embryonnaire. Le recto-côlon de la souris possède une autre origine

PARTIE A : Etude Bibliographique

Description des principaux modèles expérimentaux

embryonnaire moins bien connue. De ce fait, l'intestin grêle de la souris est histologiquement plus proche du recto-côlon de l'Homme et du rat que ne l'est le recto-côlon lui-même.

c. La combinaison des deux modèles

Dans notre étude, nous avons utilisé conjointement les deux modèles : rat chimio-induit et souris *Min/apc*. Chacun de ces modèles apporte des avantages et se rapproche sur certains points de l'Homme. Une méta-analyse basée sur l'étude de la consommation d'aspirine, de bêta-carotène, de calcium ou de blé chez 6 714 volontaires, 3 911 rats et 458 souris a montré que ces deux modèles sont de bons prédicteurs de la cancérogénèse humaine, qui diffèrent seulement selon les agents étudiés [33].

De ce fait, il est utile et nécessaire d'associer les deux modèles afin d'optimiser les résultats et de se rapprocher au mieux de la situation humaine.

2. Description des lésions préneoplasiques utilisées comme biomarqueurs

a. Les Foyers de Cryptes Aberrantes (*Aberrant Crypt Foci*)

Chez l'Homme, le dépistage du cancer du côlon passe par un examen coloscopique durant lequel sont recherchées des lésions de la muqueuse de type polypes adénomateux ou polypes hyperplasiques. Outre ces lésions, il en existe certaines dites précancéreuses et que l'on observe plus difficilement [4]. C'est le cas des foyers de cryptes aberrantes retrouvées chez les modèles animaux expérimentaux choisis.

Les foyers de cryptes aberrantes (ou ACF) sont des groupes de cryptes au diamètre élargi entourés d'un épithélium épaissi et associés à une diminution de la sécrétion de mucus. Ces anomalies de la muqueuse colique sont généralement plus facilement observables après coloration au bleu de méthylène à 0.2% (figure 17).

De nombreuses images de mitoses sont observées dans les deux tiers inférieurs des cryptes [4] ce qui signe une intense activité de division cellulaire au niveau de ces cryptes (figure 18).

PARTIE A : Etude Bibliographique

Description des principaux modèles expérimentaux

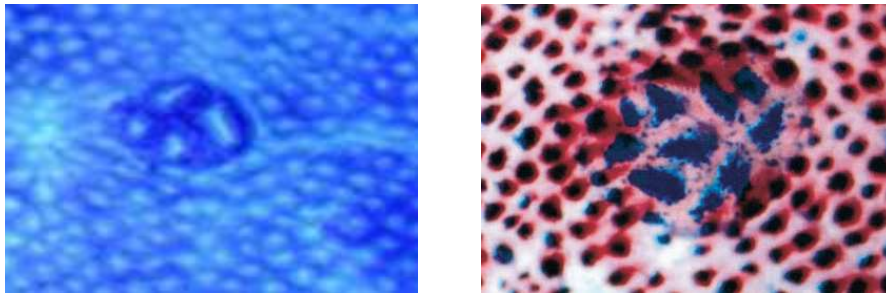


Figure 17 : Deux foyers de cryptes aberrantes : coloré au bleu de méthylène à gauche et au HIDAB à droite

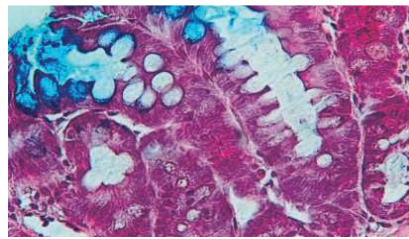


Figure 18 : Structure histologique du foyer de cryptes aberrantes précédant coloré au HIDAB

Les foyers de cryptes aberrantes sont généralement composés de plusieurs cryptes aberrantes (jusqu'à 20) qui se différencient des cryptes normales par [20] :

- Un aspect surélevé
- Une taille plus importante, en largeur comme en profondeur
- Une lumière en forme de fente contrairement à une lumière ronde pour les cryptes normales
- Un assemblage groupé : les cryptes d'un même foyer sont groupées entre elles et séparées des cryptes normales par un espace péri-cryptal épais
- Une coloration au bleu de méthylène 0.2% plus intense

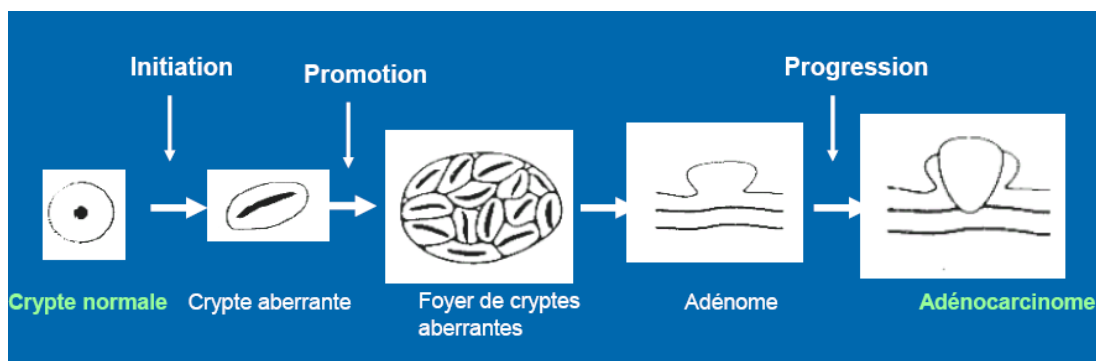


Figure 19 : Formation d'un adénocarcinome

PARTIE A : Etude Bibliographique

Description des principaux modèles expérimentaux

Ces ACF sont visibles 15 jours après initiation à l'AOM chez le rat Fischer 344 ou spontanément chez la souris *Min/apc*.

Ils sont ensuite promus par les facteurs alimentaires tels que la consommation de viande rouge ou inhibés par l'effet de certaines molécules telles qu'un régime enrichi en calcium [21].

Leur détection au microscope optique représente donc un intérêt dans notre étude.

Enfin, il peut être utile de préciser que le nombre d'ACF dépend de la dose de cancérigène administrée. Par contre, leur taille, c'est-à-dire le nombre de cryptes contenues dans un foyer, exprime la vitesse de croissance et de duplication des cryptes aberrantes [64].

Le nombre d'ACF chez un individu reflète donc l'effet initiateur du cancer colorectal. Le nombre de cryptes par foyer, c'est-à-dire la taille de la lésion reflète, quant à elle, l'effet promoteur d'un facteur testé [32].

b. Les Foyers de Cryptes Pauvres en Mucine (*Mucin Depleted Foci*)

Les foyers pauvres en mucine sont des lésions précancéreuses prédictives du cancer du côlon. Ils sont observables après coloration au HIDAB (high-iron diamine alcian blue).

Les cryptes sont plus petites que des cryptes normales et leur lumière est aplatie et allongée au lieu d'être ronde [27]. Elles sont reconnaissables par une production de mucus faible voire nulle (figure 20).

Les MDF sont visibles sept semaines après injection de cancérigène, soit beaucoup plus tardivement que les ACF. Ils sont moins nombreux que ces derniers.

Ils sont représentatifs d'une forte inflammation de la muqueuse (présence de nombreux marqueurs inflammatoires). En effet, le dextrane sulfate de sodium, composé inducteur de l'inflammation, conduit à la formation de MDF de manière dose-dépendante. La présence de ces foyers dans la muqueuse colique semble indiquer l'influence d'un phénomène inflammatoire dans l'apparition du cancer colorectal [5].

PARTIE A : Etude Bibliographique

Description des principaux modèles expérimentaux

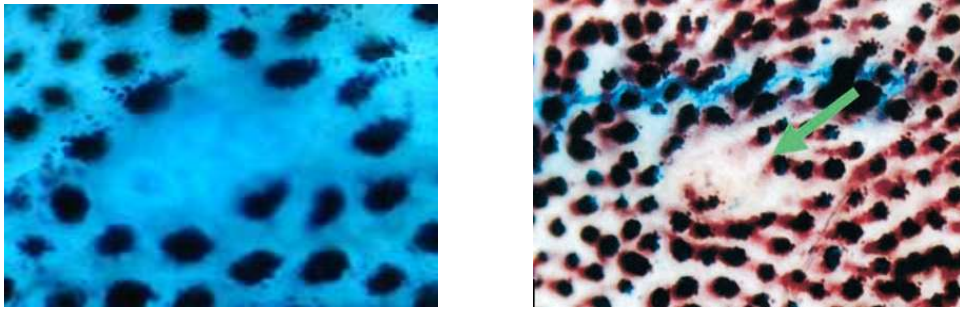


Figure 20 : Deux foyers déplétés en mucine : coloré au bleu de méthylène à gauche et au HIDAB à droite

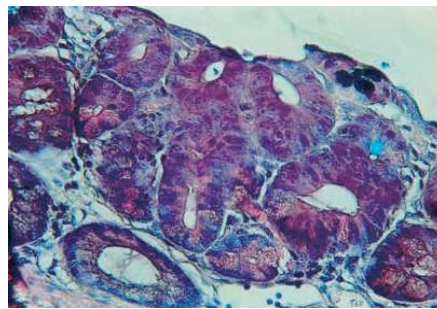


Figure 21 : Structure histologique du foyer déplété en mucine précédant coloré au HIDAB

De plus, les MDF apparaissent comme plus prédictifs que les ACF. En effet, ils sont plus dysplasiques que ces derniers et présentent des mutations plus proches des tumeurs macroscopiques que celles rencontrées au sein des ACF. Peu d'ACF conduisent réellement à des adénocarcinomes : cela dépend de leur degré de dysplasie alors que les MDF conduisent à des lésions malignes dans tous les cas [27].

OBJECTIFS de cette étude

Les objectifs de l'étude SécuritéViande à laquelle j'ai participé modestement étaient :

- 1- De démontrer les effets promoteurs de la consommation de viandes bovines plus ou moins cuites et de charcuteries expérimentales chez des rats chimio-induits (lésions précancéreuses : ACF et MDF) et chez des souris Min (tumeurs intestinales).
- 2- De chercher des additifs ou traitements des viandes qui diminuent ces effets promoteurs.

L'objectif de mon travail de thèse était :

- 3- De mesurer le taux d'hème dans les eaux fécales des rats et des souris et de chercher la corrélation entre ces mesures et la cancérogénèse évaluée par les autres membres de l'équipe. Les mêmes mesures ont été effectuées pour les groupes « charcuteries » ou les groupes « viandes » mais j'ai décidé de présenter seulement les résultats concernant les viandes rouges.

PARTIE B : Expérimentation

I. Le Projet SécuriViande

1. L'étude SécuriViande

a. Etude préalable

L'incidence du cancer colorectal ne cesse de progresser. Au cours des dernières années, de nombreux chercheurs ont mis en évidence le rôle non négligeable de l'alimentation dans le risque d'apparition de lésions précancéreuses en regard de la muqueuse colique.

L'étude SécuriViande a pour objectif de déterminer des stratégies de prévention de la cancérogénèse colorectale suite à des régimes composés de viandes rouges ou de charcuteries en limitant les effets directs et indirects de l'hème. Cette étude a deux enjeux : un enjeu scientifique qui est de mieux comprendre les mécanismes de promotion du cancer colorectal induite par les viandes rouges et charcuteries et un enjeu de santé publique qui est de déterminer des aliments protecteurs et des recommandations afin de limiter l'incidence de ce cancer.

Ce projet, basé sur une coopération internationale, est financé par l'ANR, coordonné par Fabrice Pierre et s'étend sur quatre années de recherche. Une dizaine d'équipes travaillent ensemble sur ce projet qui est composé de 7 tâches (figure 21). Pour plus d'informations, vous pouvez visiter le site internet du projet : <http://securiviande.free.fr>.

Au cours des études préalables, différentes viandes ont été sélectionnées ainsi que différents agents antioxydants.

PARTIE B : Expérimentation Le Projet SécuriViande



Figure 22 : Projet SécuriViande, diagramme présentant les différentes tâches du projet

La tâche qui précède cette étude a testé douze marinades différentes, composées de molécules anti-oxydantes seules ou en synergie. Plusieurs classes d'antioxydants ont été testées : Acides et terpènes phénoliques, Flavonoïdes, Stilbènes, Vitamines, Antioxydants de synthèse. Le potentiel antioxydant de ces molécules a été évalué par la méthode de DPPH (1,1 Diphényl 2 Pycril Hydrazil, radical libre stable).

La structure de ces composés explique leur action anti-oxydante : plus il y a de groupes hydroxyles présents sur les groupes aromatiques, plus l'effet antioxydant est fort. L'étude précédente montre un fort pouvoir antioxydant pour le complexe raisin-olive qui présente six groupes hydroxyles (trois pour chaque molécule).

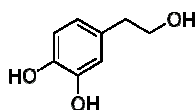


Figure 23 : Hydroxytyrosol (olive)

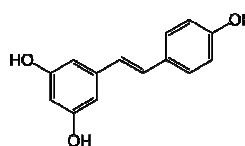


Figure 24 : Resveratrol (raisin)

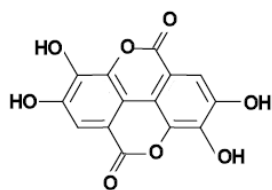


Figure 25 : Acide ellagique (grenade)

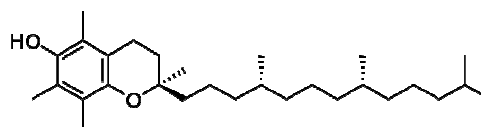


Figure 26 : Alpha-tocophérol (= vitamine E)

L'alpha-tocophérol montre un seul groupement hydroxyle. La grenade quant à elle possède quatre groupements hydroxyles et offre un pouvoir antioxydant non négligeable.

Suite à leur pouvoir antioxydant, trois marinades (« alpha-tocophérol », « marinade raisin-olive », « grenade ») ont été sélectionnées pour cette étude afin de tester leur efficacité contre la lipoperoxydation dans des conditions expérimentales sur rongeurs.

b. Etude actuelle

L'étude que j'ai menée au sein de l'équipe « Toxalim-E9 PPCA : Prévention et Promotion de la Cancérogénèse par l'Alimentation » correspond à la tâche numéro quatre intitulée : « Modulation de la cancérogénèse hème-induite par des viandes rouges et des charcuteries sur deux animaux modèles de cancérogénèse : le rat chimio-induit et la souris Min ».

Le but de cette tâche est de déterminer l'effet de modifications de procédés de fabrication des charcuteries et des viandes bovines sur la promotion de la cancérogénèse colorectale hème-induite qui se traduit par l'apparition de lésions précancéreuses de type ACF (*Aberrant Crypt Foci*) et MDF (*Mucin Depleted Foci*) du côlon et les tumeurs polypoides du grêle chez deux rongeurs : le rat chimio-induit à l'AOM et la souris mutée *Min/apc*.

Cette étude se compose de deux étapes :

- La première étape consiste à évaluer si la modification des procédés de fabrication de viandes bovines et de charcuteries influence la capacité des viandes à moduler des biomarqueurs biochimiques tels que l'hème corrélés à la cancérogénèse colorectale.

- La deuxième étape consiste à évaluer si ces mêmes viandes sont capables de moduler la cancérogenèse colorectale chez deux espèces de rongeurs : le rat chimio-induit et la souris Min.

2. Matériel et méthodes

a. Expérimentation animale

Le protocole d'expérimentation a été divisé en deux groupes en fonction de l'espèce animale. D'une part, 166 rats Fischer mâles, âgés de 3 à 4 semaines, ont été répartis, individuellement et aléatoirement dans 166 cages à métabolisme grillagées et situées dans l'animalerie INRA du bâtiment A de Toxalim.

D'autre part, 187 souris mâles et femelles C57B16 Min/*Apc*, âgées de 5 à 10 semaines ont été réparties dans 41 cages, par groupe de 2 à 5 souris de même sexe par cage, soumises à un même régime. Elles ont été réparties de manière à ce qu'il y ait tous les âges représentés pour un même régime. Les cages ont été disposées dans une animalerie différente de celle des rats pour éviter la transmission de germes inter-espèces.

Rats et souris ont évolué dans des salles climatisées (22°C) et ont été soumis à un cycle jour/nuit de 12h.

b. Protocole nutritionnel et régimes expérimentaux

i. Les rats Fischer 344

Les rats Fischer 344, contrairement aux souris Min/*apc*, ne présentent pas de cancérogenèse colorectale spontanée. Afin d'initier cette dernière, deux jours après leur réception, les rats ont été traités par une injection d'AOM (azoxyméthane, molécule initiatrice de cancérogenèse colorectale chez les rongeurs) à la dose de 20 mg/kg par voie intrapéritonéale.

PARTIE B : Expérimentation

Le Projet SécuriViande

Les rats ont été nourris avec un régime AIN-76 durant les neuf premiers jours d'adaptation à leur nouvel environnement. Ils ont reçu une injection d'AOM deux jours après leur arrivée.

Les régimes expérimentaux ont ensuite été distribués quotidiennement pendant 100 jours à heure fixe (17h ± 1h).

La base AIN-76 (fabriqué par l'UPAE de Jouy, voir tableau 3) [8] est un mélange apportant glucides, minéraux, vitamines et fibres. Ce mélange a été élaboré de manière à ce que le taux de calcium soit bas (20 µmol de calcium phosphate/g d'aliment sec) car, comme nous l'avons vu précédemment, le calcium a un effet protecteur sur la muqueuse colique et diminue considérablement le risque de cancer colorectal.

| Diet formulations | |
|-------------------|--------|
| Ingredients | AIN-76 |
| Casein | 20 |
| DL-Methionine | 0.3 |
| Corn starch | 15 |
| Sucrose | 50 |
| Fiber | 5 |
| Corn oil | 5 |
| Mineral mixture | 3.5 |
| Vitamin mixture | 1 |
| Choline | 0.2 |

Tableau 3 : Formulation de la base AIN-76

La ration quotidienne proposée aux rats était composée de :

- 50% de base AIN-76 (environ 6g) complétée d'huile de carthame (5%), très riche en acides gras polyinsaturés, disposée dans un ramequin. Cette base apportait un mélange de vitamines, minéraux et fibres.
- 50% de viande modèle disposée dans un ramequin ou sur la grille.
- D'eau *ad libitum* (biberons pour rongeurs).

Le régime « témoin » était, quant à lui, composé de:

- 100% de base AIN-76 (environ 16 g par rat) complétée d'huile de carthame (5%) et de sucrose (6%).
- D'eau *ad libitum* (biberons pour rongeurs).

Six régimes à base de viandes bovines modèles, présentés dans le tableau 4, ont été proposés et ont permis de tester plusieurs paramètres : l'effet de la marinade et de la cuisson à plusieurs niveaux (viande crue, bleue ou bien cuite).

PARTIE B : Expérimentation

Le Projet SécuriViande

| GROUPE | REGIME | NBRE RAT |
|--------|---|----------|
| TEM | Base témoin AIN76 modifiée | 20 |
| SUMF | Faux filet, sous film, non mariné, cru | 12 |
| SCMF | Faux filet, sous film, non mariné, bleu | 12 |
| SDMF | Faux filet, sous film, non mariné, bien cuit | 12 |
| SUGF | Faux filet, sous film, mariné raisin-olive, cru | 12 |
| SCGF | Faux filet, sous film, mariné raisin-olive, bleu | 12 |
| SDGF | Faux filet, sous film, mariné raisin-olive, bien cuit | 12 |

Tableau 4 : Régimes expérimentaux distribués aux rats durant 100 jours.

ii. Les Souris *Min/apc*

Les souris *Min/apc* sont des souris modifiées génétiquement qui présentent, de manière spontanée, des tumeurs de la muqueuse intestinale (notamment dans le grêle) dans les 90 à 100 jours de vie. Elles sont mutées sur le gène *Apc* (*Adenomatous Polyposis Coli*) et, comme chez l'Homme, cette mutation entraîne l'apparition de polypes sur la muqueuse, lésions qui conduisent souvent à l'apparition de tumeurs.

A leur arrivée, les souris ont été réparties en 9 groupes de 18 à 36 souris. Puis, comme pour les rats, elles ont été nourries avec la base AIN-76 durant une semaine afin qu'elles s'adaptent à leur nouvel environnement. Les régimes expérimentaux ont ensuite été distribués, quotidiennement, à heure fixe, pendant 49 jours.

Contrairement aux rats, les souris ont reçu leur ration sous forme d'un mélange de base AIN-76 et de viande choisie. Nous avons remarqué, lors des premières distributions d'aliments, que les souris gaspillaient la poudre dans leur litière en une quinzaine de minutes. Leur consommation en poudre AIN-76 était donc faussée par ces pertes. Nous avons donc choisi de faire un mélange entre poudre et viande broyée, mélange plus épais et soumis à une peroxydation des viandes plus importante mais beaucoup moins gaspillé. Ce mélange a été réalisé chaque semaine avec 60% de poudre AIN-76 enrichie en huile de carthame (5%) et de 40% de viande bovine modèle broyée. L'eau était proposée *ad libitum* (biberons pour rongeurs).

PARTIE B : Expérimentation

Le Projet SécuriViande

Le régime « témoin » était, quant à lui, composé de:

- 100% de base AIN-76 complétée d'huile de carthame (5%) et de sucrose (6%) *ad libitum*
- Eau *ad libitum* (biberons pour rongeurs).

Quatre régimes et un régime témoin ont été proposés aux souris et sont présentés dans le tableau 5.

| GROUPE | REGIME | NBRE SOURIS |
|--------|--|-------------|
| TEM | Base témoin AIN76 modifiée | 25 |
| SUMF | Faux filet, sous film, non mariné, cru | 18 |
| SCMF | Faux filet, sous film, non mariné, bleu | 18 |
| SUGF | Faux filet, sous film, mariné raisin-olive, cru | 18 |
| SCGF | Faux filet, sous film, mariné raisin-olive, bleu | 18 |

Tableau 5 : Régimes expérimentaux distribués aux souris durant 49 jours

c. Données zootechniques et échantillons

i. Les Rats Fischer 344

Les rats ont été pesés à leur arrivée (J0) puis une fois par semaine les deux premières semaines (J7 et J14) puis toutes les deux semaines (J28, J42, J54, J70 et J84) afin de contrôler leur croissance.

La consommation d'aliments et d'eau a été mesurée deux fois sur deux jours (J18-20 et J81-83). Les rations ont été distribuées après pesée minutieuse. 24h après, les excédents et gaspillages ont été récupérés et séchés pendant une nuit au four afin d'évaluer leur proportion en matière sèche.

Les fèces ont été récoltées sur 5 cycles de 4 jours : J24-J28, J60-J63, J74-J77, J81-J84, J88-J91 et conservées à -80°C. Les urines ont été mesurées sur 24h grâce à des cages à métabolisme dans lesquelles les rats ont été placés la veille (J67-J70). Le volume urinaire de chaque rat a été évalué et les urines ont été conservées à -20°C.

PARTIE B : Expérimentation

Le Projet SécuriViande

Après 100 jours de distribution quotidienne, les rats ont été sacrifiés (CO₂ + élongation cervicale). Le côlon a été prélevé, vidé par injection de tampon de Kreb's Ringer, une solution physiologique, puis ouvert longitudinalement et fixé entre deux lamelles de papier filtre et conservé dans du formol tamponné (10%) (Sigma Chemical).

ii. Les souris Min/apc

Les souris ont été pesées à leur arrivée (J0) puis à J7, J16 et J32 et avant d'être sacrifiées à J49, J50 ou J51. Les fèces ont été récoltées sur deux cycles : J28-J32 et J37-J39 et conservées à - 80°C. Les urines ont été récupérées à J44 par pression vésicale et conservées à -20°C.

Après 49 à 51 jours de distribution quotidienne des régimes, les souris ont été sacrifiées (CO₂), leur intestin grêle et leur côlon ont été prélevés et préparés de la même manière que pour les rats.

d. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPad InStat 3 et sont basées sur différents tests statistiques : analyse de variance (ANOVA), test de Student, correction de Bonferroni, test de Tukey et corrélation de Pearson.

II. La Cancérogénèse hème-induite

Le dosage de l'hème a été réalisé par mes propres soins avec les conseils d'Océane Martin, de Sylviane Taché et de Nathalie Naud. Ce dosage a été effectué dans les eaux fécales des rongeurs de tous les groupes, charcuteries et viandes rouges.

Une étude préalable conduite sur des rats chimio-induits nourris avec de l'hémoglobine, des amines hétérocycliques et des nitrites et nitrates dans l'eau a montré que seul l'hème était promoteur du nombre de MDF [15]. Les charcuteries étant suspectées d'être promotrices de la cancérogénèse colorectale par le biais des nitrites qu'elles contiennent et qui interagissent avec l'hème, les résultats leur correspondant ne sont donc pas présentés ici.

Seuls les résultats des dosages de l'hème présent dans les eaux fécales des rongeurs ayant consommé des viandes rouges (ainsi que les témoins) sont présentés et discutés par la suite afin de répondre à la problématique « Viandes et cancérogénèse colorectale : effet de l'hème ».

1. Matériel et méthodes : Dosage d'un biomarqueur fécal : l'hème

a. Préparation des eaux fécales

Les fèces des rats ont été récoltées individuellement. Les fèces des souris ont été récoltées par pool, c'est-à-dire que les selles des souris appartenant aux mêmes cages et soumises aux mêmes régimes ont été récoltées simultanément sans distinction.

Les eaux fécales ont été préparées dans des tubes de 15 mL. Pour chaque individu (rats) ou pool (souris), nous avons pesé les fèces puis ajouté 1 mL d'eau pour 0.4 g de fèces. Nous avons également ajouté trois billes en céramique pour améliorer le broyage ainsi que 50 μ L de BHT 0.45 M (Sigma Chemical) par mL d'eau ajouté. Les tubes ont ensuite été agités sur 3 cycles de 30 secondes au Fast-Prep puis centrifugés à 5 500 g pendant 20 minutes à 4°C. Le surnageant a ensuite été récolté et aliquoté sur glace puis conservé à -80°C jusqu'au dosage.

b. Dosage de l'hème

Le dosage de l'hème a pour but de déterminer la quantité d'hème présente dans les eaux fécales par mesure spectrofluorimétrique. Ce dosage est basé sur la méthode de Sesink et al, 2000.

Pour chaque échantillon de fèces, quatre microtubes ont été préparés : deux microtubes dits « blancs » et deux microtubes dits « essais ».

2x25 µL d'eaux fécales préparées et décongelées préalablement ont été dilués dans 2x125 µL du mélange isopropanol/HCl 1M (5:1) (Sigma Chemical 54896BK/Fluka SZBB0480V), agités 1 minute au carrousel puis centrifugés 10 min à 10 000g. Cette étape a pour but de précipiter les protéines.

2x25 µL du surnageant obtenu ont été déposés dans un microtube dit « blanc » et un microtube dit « essai ». A chacun de ces 25 µL, 500 µL d'acide acétique glacial (pur) (Sigma Chemical) ont été ajoutés puis 25 µL d'une solution FeSO₄, 7H₂O à 0.12 mol/L (Sigma Chemical 80K1350) et de HCl à 4.5 mol/L (Fluka SZBB0480V). Cette étape permet la transformation de l'hème en porphyrine fluorescente qui sera ultérieurement lue par spectrofluorimétrie.

Après agitation au carrousel, les microtubes dits « essais » sont mis à incuber à 60°C pendant 30 minutes. A la fin de l'incubation pour les microtubes dits « essais » ou consécutivement à l'ajout de la solution ferreuse pour les microtubes dits « blancs », 1 mL d'une solution d'isopropanol/eau (1:1) (Sigma Chemical 54896BK) a été ajouté. Le but de cette étape est d'arrêter la réaction.

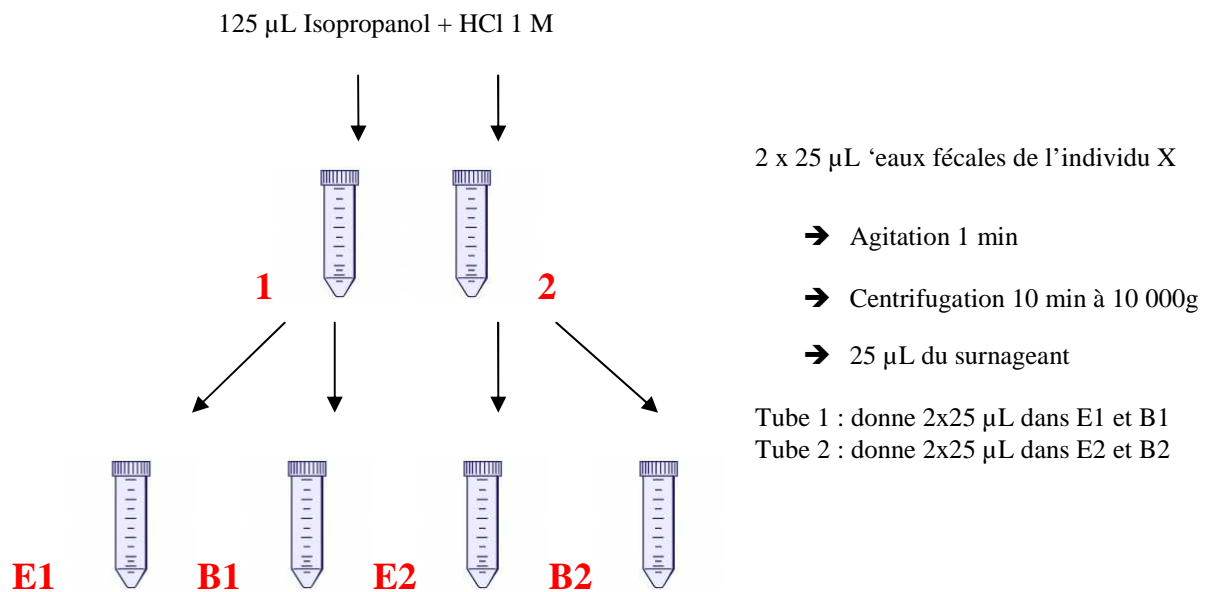
En parallèle, une gamme étalon a été préparée avec de l'hémoglobine de bœuf à différentes concentrations : 0, 4.35, 8.75, 17.5, 35, 70, 140 µM. Elle a été obtenue par dilutions successives d'un mélange initial de 119 mg d'hémoglobine de bovin (Sigma Chemical 098K7023) dilués dans 400 µL d'isopropanol/HCl 1M (Sigma Chemical 54896BK et Fluka SZBB0480V). 100 µL de ce mélange ont été prélevés et mélangés avec 200 µL d'isopropanol/HCl 1M (Sigma Chemical 54896BK et Fluka SZBB0480V).

PARTIE B : Expérimentation

La Cancérogénèse hème-induite

Après agitation manuelle, 200 μL de ce deuxième mélange ont été prélevés et mélangés avec 200 μL d'isopropanol/HCl 1M (Sigma Chemical 54896BK et Fluka SZBB0480V). Et ainsi de suite, par dilution en cascade jusqu'à obtention de la gamme complète.

Cette gamme permet d'estimer la quantité d'hème présente dans chaque échantillon testé. Elle est, elle aussi, constituée de microtubes dits « blancs » non soumis à l'incubation et de microtubes dits « essais » incubés pendant 30 minutes.



- Ajout de 500 μL d'acide acétique pur dans chacun des 4 tubes
- Ajout de 25 μL de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dans chacun des 4 tubes
- Agitation 1 min et incubation de E1 et E2 à 60°C pendant 30 minutes.

Au bout de 30 min,

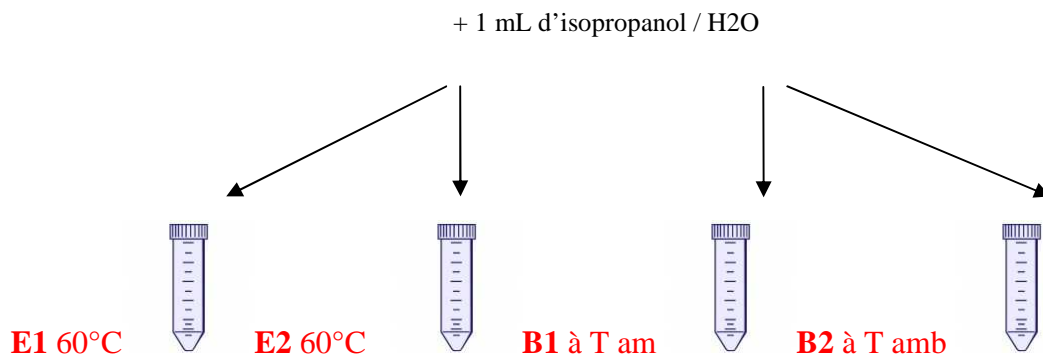


Figure 27 : Protocole de préparation des eaux fécales

PARTIE B : Expérimentation

La Cancérogénèse hème-induite

100 µL de chacun des microtubes réalisés ont ensuite été prélevés et déposés dans la cupule d'une plaque noire pour la lecture par spectrofluorimétrie de 96 puits (Annexe 2).

Après dépôt sur la plaque, la fluorescence des échantillons a été mesurée par spectrofluorimétrie, à une longueur d'onde d'excitation de 405 nm et une longueur d'onde d'émission de 609 nm à l'aide d'un spectrofluorimètre TECAN.

Les résultats ont ensuite été exprimés en µM d'hème dans les eaux fécales, après estimation de la quantité d'hème de chaque échantillon grâce à la gamme étalon.

2. Résultats du dosage de l'hème fécal

a. Chez les rats

i. Consommation d'eau et d'aliment

La consommation d'eau et d'aliment a été mesurée aux soixante-et-un et soixante deuxième jours (Annexe 3). Le groupe témoin a consommé en moyenne 16.5 ± 2.1 g de poudre. Les groupes soumis à une viande bovine ont consommé en moyenne 6.2 ± 0.2 g de poudre (soit $52.7\% \pm 6$) et 5.7 ± 1.3 g de viande bovine (soit $47.3\% \pm 6$).

Les analyses statistiques montrent que les rats ayant consommé des régimes à base de viandes ont consommé moins d'aliment que les rats soumis à un régime à base de poudre seulement ($p < 0.0001$).

Il n'existe pas de différence significative pour la consommation d'eau.

ii. Croissance

Le poids de chaque rat a été évalué à J0, J7, J14, J28, J42, J54, J70, J84 et J96. Il était de 87.0 ± 1.0 g à J0, de 200.0 ± 6.0 g à J28 et de 335.0 ± 10.0 g à J96.

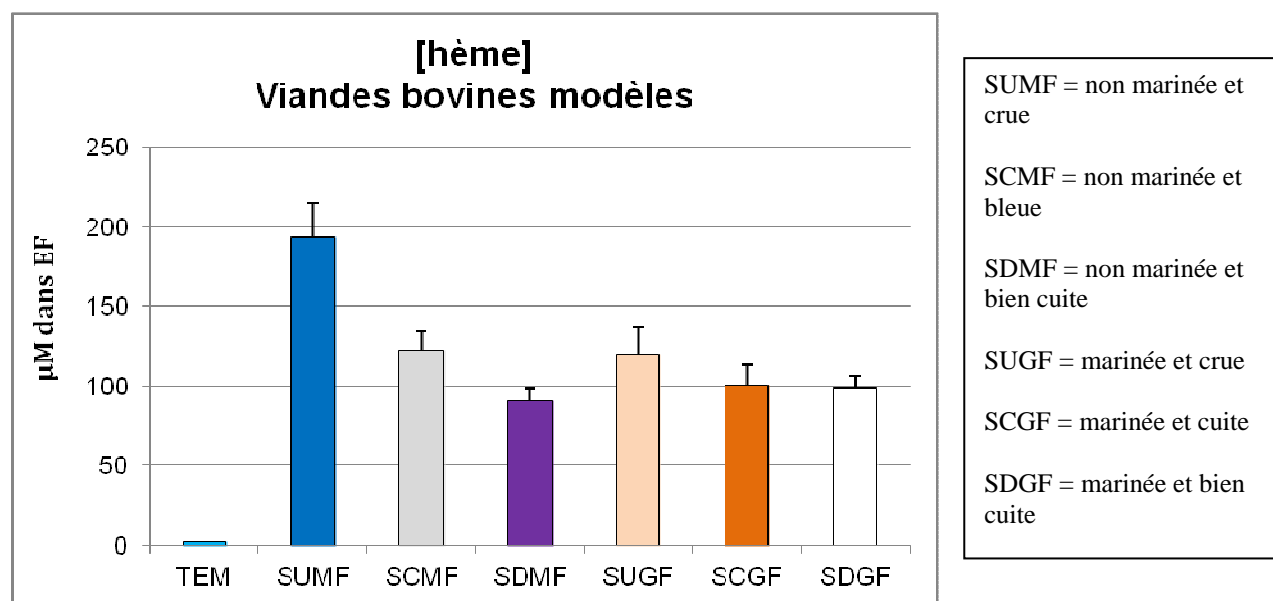
Malgré la croissance apparemment plus rapide des rats témoins qui pourrait s'expliquer par une consommation d'aliment plus importante, il n'existe pas de différence significative entre les groupes (Annexe 4).

PARTIE B : Expérimentation

La Cancérogénèse hème-induite

iii. Dosage de l'hème

La concentration en hème, en μM , dans les eaux fécales des rats ayant consommé un régime témoin ou des viandes bovines est présentée dans le graphe 1.



Graphe 1: Concentration en hème dans les eaux fécales des rats après consommation de viandes bovines (écart-types en mode SEM)

Les eaux fécales des rats ayant consommé les viandes bovines modèles présentent une teneur en hème significativement supérieure au groupe témoin ($p < 0.0001$). On note donc un effet viande.

La consommation de viande crue (SU) conduit à des eaux fécales significativement plus riches en hème que la consommation de viande bleue (SC) voire bien cuite (SD) ($p < 0.001$).

La consommation de viande marinée (GF) diminue la concentration en hème dans les eaux fécales ($p = 0.044$), notamment lorsqu'on compare les viandes crues, marinée (SUGF) ou pas (SUMF).

Il semble qu'à travers ces résultats, on puisse dire que :

- Il y a un effet viande : la consommation de viandes bovines, riches en hème, conduit à une concentration en hème dans les eaux fécales importante.
- Il n'y a pas d'effet groupe : quel que soit le régime, comparé au groupe témoin, il présente une teneur en hème significativement supérieure ($p < 0.0001$) mais comparés entre eux, pour un même facteur de variation, aucun groupe n'est significativement différent de l'autre.
- La cuisson diminue la concentration en hème des eaux fécales.
- La marinade diminue la concentration en hème des eaux fécales. Son effet est significatif mais limité selon le mode de cuisson de la viande.

b. Chez les souris

i. Consommation d'eau et d'aliments

La consommation d'eau et d'aliments n'a pu être comptabilisée pour les raisons suivantes :

- Plusieurs souris évoluaient dans une même cage et la consommation par souris est, de ce fait, biaisée. En effet, il est possible de déterminer la consommation par jour pour x souris et d'en déduire une consommation par souris mais cela reste approximatif et ne prend pas en compte la hiérarchie à l'intérieur du groupe.
- La méthode de distribution du régime pour les souris diffère de celle des rats. Dès le début des expériences, il s'est avéré que les souris mangeaient préférentiellement la poudre plutôt que les viandes. Il a donc été décidé de broyer les viandes et de les mélanger, de manière homogène, à la poudre. Cette méthode a conduit à une consommation du mélange par les souris plus adéquate mais aussi à beaucoup de pertes dans les litières, pertes qui n'ont pu être comptabilisées.

Pour ces deux raisons principales, il a été impossible de construire des courbes de consommation d'aliments et d'eau par les souris.

ii. Croissance

Le poids de chaque souris a été estimé à J0, J7, J16, J32 et J45 (Annexe 4). Un ralentissement de la croissance des souris du groupe témoin s'observe à J32. Cela s'explique par le fait que les souris ont été placées sur des grilles afin de récolter plus facilement les fèces. Un gaspillage plus important de la poudre a été noté et, de ce fait, un accès plus limité au régime. Ce problème ne s'est pas retrouvé pour les autres groupes.

A J32, les souris ayant consommé des viandes bovines ont un poids significativement plus important que les souris soumises au régime sans viande ($p < 0.0001$).

A la fin de l'expérimentation, il n'y a aucune différence significative entre les groupes de viandes bovines et le groupe sans viande témoin.

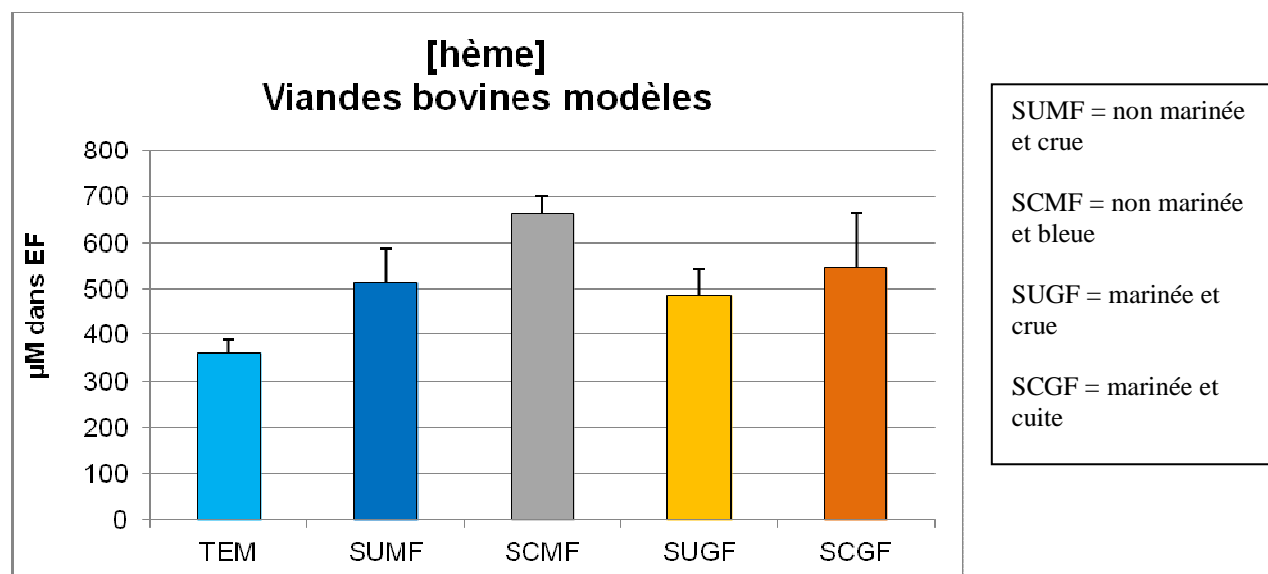
- Remarque concernant la mortalité des individus

Contrairement aux rats qui étaient en cage individuelle, la mortalité des souris a été évaluée chaque jour. Une souris est morte avant la fin de l'expérimentation. Il s'agissait d'un individu du groupe « viande marinée crue ». Nous n'avons pas d'explication précise ; nous savons seulement que ces souris sont des souris mutantes, porteuses de nombreux polypes, et exposées de ce fait, à une anémie précoce. Cependant, cette mortalité est unique et non significative. Il pourrait s'agir d'un événement aléatoire.

iii. Dosage de l'hème

La concentration en hème, en μM , dans les eaux fécales des souris ayant consommé un régime témoin ou des viandes bovines est présentée dans le graphe 2.

Les eaux fécales des souris soumises à un régime sans viande présentent une concentration en hème importante. Les eaux fécales des rats ayant consommé le même régime sans viande contiennent très peu d'hème. Ce résultat très étonnant chez les souris sera discuté plus loin.



Graph 2 : Concentration en hème dans les eaux fécales des souris après consommation de viandes bovines modèles (écart-types en mode SEM)

Cependant, on observe un effet viande : les eaux fécales des souris ayant consommé des viandes bovines sont plus riches en hème que les eaux fécales de souris n'ayant pas consommé de viande ($p = 0.015$).

Lorsqu'on compare les groupes entre eux, on note une différence significative de la concentration en hème des eaux fécales entre les souris ayant consommé des viandes cuites (bleues = SC) et les souris n'ayant consommé aucune viande ($p = 0.023$).

Chez les autres groupes comparés, il n'y a pas de différence significative.

La consommation de viandes bovines augmente le taux d'hème dans les eaux fécales.

La consommation de viandes cuites semble augmenter de manière significative le taux d'hème dans les eaux fécales.

La marinade ne semble avoir aucun effet sur la concentration en hème des eaux fécales.

III. Effet des viandes sur les lésions (pré)cancéreuses des rongeurs

1. Matériel et méthodes : Comptage des lésions cancéreuses

a. Comptage des lésions précancéreuses chez les rats

Après sacrifice des rats au CO₂ (J100), les côlons ont été prélevés, vidés par injection de tampon Krebs's Ringer, ouverts longitudinalement et fixés entre deux feuilles de papier filtre dans du formol tamponné à 10%.

Afin d'observer les ACF (*Aberrant Crypt Foci*), les côlons ont été colorés au bleu de méthylène (0.05% dans de l'eau distillée) pendant 10 minutes. La lecture a été effectuée à l'aide d'un microscope au grossissement x40 par deux opérateurs. Les côlons soumis à la lecture par chacun des opérateurs sont codés ; les opérateurs ne connaissent pas l'origine de l'échantillon. Le nombre et la taille des ACF (nombre de cryptes aberrantes par ACF) ont été notés.

La lecture des MDF (*Mucin Depleted Foci*) est plus complexe et repose sur l'observation de plusieurs paramètres : la production de mucine, une lumière irrégulière, la surélévation des foyers par rapport à la muqueuse colique et le nombre de cryptes supérieures à deux [27]. Les côlons ont été colorés selon la méthode HIDAB (high-iron diamine Alcian blue) [27]. La lecture a été effectuée sous microscope par deux opérateurs. Le nombre et la taille des MDF ont été notés.

b. Comptage des tumeurs chez les souris

Contrairement aux rats, les côlons et les intestins grêles des souris ont été prélevés. Les intestins grêles ont été déposés dans une solution de bleu de méthylène 0.0009 ppm dans la formaline (1.8 mL de bleu de méthylène à 0,05% dans 100 mL de formaline) pendant plusieurs jours. Les côlons ont été déposés dans une solution de bleu de méthylène 0.0012 ppm dans la formaline (2,4 mL de bleu de méthylène à 0,05% dans 100 mL de formaline) pendant plusieurs jours.

PARTIE B : Expérimentation

Effet des viandes sur les lésions (pré)cancéreuses des rongeurs

Sous coloration, les tumeurs sont plus faciles à observer. Elles ont des villosités déformées et grossies, bleutées au bout mais le centre de la tumeur reste clair tandis que les follicules apparaissent en structure arrondie de couleur bleu cyan homogène et entourée de villosités normales.

Les comptages ont été effectués par deux opérateurs. Les côlons et intestins des souris soumis à la lecture par chacun des opérateurs ont été codés au préalable empêchant ainsi aux opérateurs de savoir à quel groupe appartient l'échantillon.

Les tumeurs intestinales ont été évaluées à la loupe à un grossissement x120 et classifiées en trois tailles distinctes : petites (< 1mm), moyennes (1 à 2 mm) et grosses (> 2mm).

Les tumeurs coliques ont été évaluées à la loupe à un grossissement x250 ou sous microscope à un grossissement x40.

Les souris Min présentent des lésions tumorales au niveau de la muqueuse de l'intestin grêle principalement, muqueuse dont la structure et l'origine histologiques se rapprochent de la muqueuse colique de l'Homme.

2. Résultats du comptage des lésions précancéreuses

a. Chez les rats

i. Dénombrement des lésions préneoplasiques

- Nombre et taille des ACF (*Aberrant Crypt Foci*)

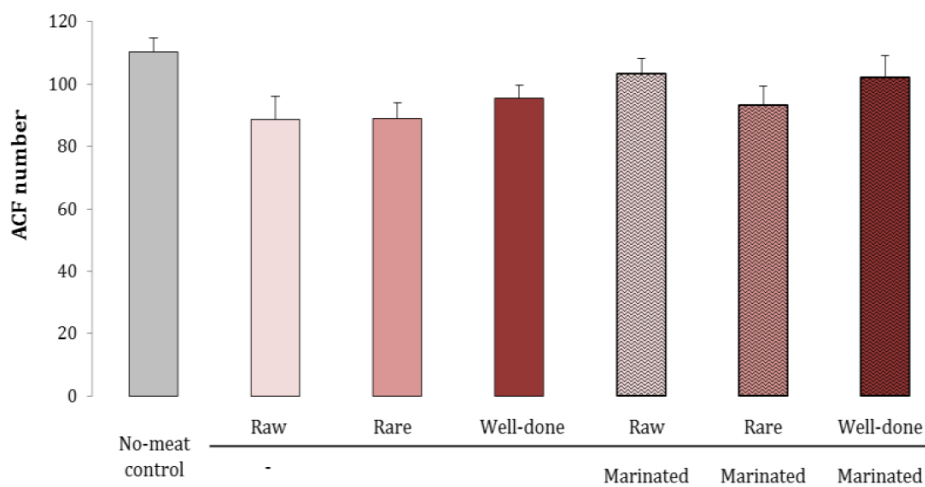
Les côlons des rats ont été prélevés après sacrifice soit à J100, fixés et colorés. Le nombre et la taille des ACF ont par la suite été dénombrés par deux opérateurs en aveugle. Les résultats sont présentés dans le graphe 3.

Les rats ayant consommé des viandes ont significativement moins d'ACF que les rats n'en ayant pas consommé ($p=0,006$). Nous n'observons pas d'effet de la cuisson ou de la marinade sur le nombre des ACF (effet initiateur).

De la même manière, il ne semble pas y avoir de différence significative entre les groupes concernant le la taille des ACF (effet promoteur): la marinade ou la cuisson n'ont pas d'effet protecteur sur le développement des ACF.

PARTIE B : Expérimentation

Effet des viandes sur les lésions (pré)cancéreuses des rongeurs



Graph 3 : Nombre des ACF présents sur la muqueuse colique des rats après sacrifice

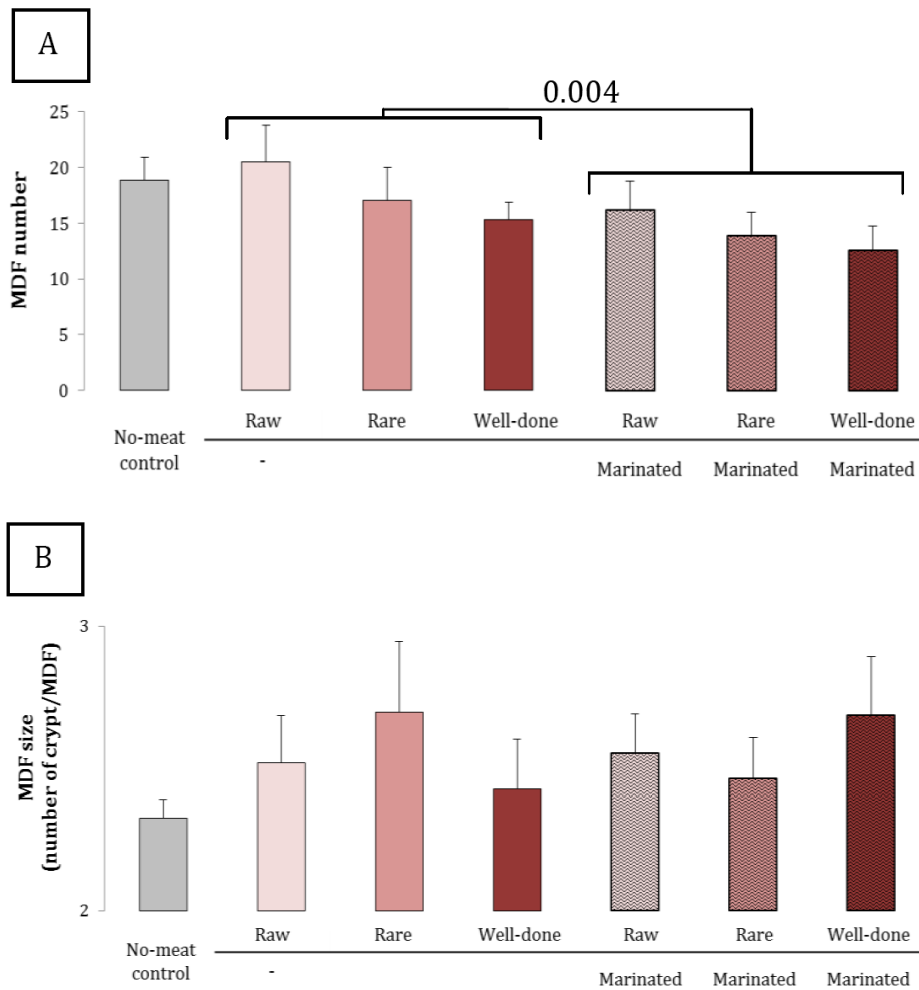
La consommation de viandes bovines ne conduit pas à l'apparition de lésions précancéreuses de type ACF sur la muqueuse colique en quantité plus importante. Quel que soit le régime, il semble que le développement (nombre et taille) des ACF soit assez similaire.

- Nombre et taille des MDF (*Mucin Depleted Foci*)

Les côlons des rats ont été prélevés après sacrifice, à J100, fixés et colorés. Le nombre et la taille des MDF ont par la suite été dénombrés par deux opérateurs. Les côlons ont été codés au préalable. Les résultats sont présentés dans les graphes 4A et 4B suivants.

Les rats ayant consommé des viandes bovines ont significativement des MDF de plus grande taille que les rats n'ayant pas consommé de viandes (graphe B ; $p = 0.028$).

PARTIE B : Expérimentation
Effet des viandes sur les lésions (pré)cancéreuses des rongeurs



Graph 4 : Nombre (A) et taille (B) des MDF présents sur la muqueuse colique des rats après sacrifice

Les rats ayant consommé des viandes bovines bien cuites (« well-done ») présentent moins de MDF sur leur muqueuse colique que les rats ayant consommé des viandes crues (« rare ») (graphe A ; $p = 0.009$). Les rats ayant consommé des viandes bovines marinées présentent moins de MDF sur leur muqueuse colique que les rats ayant consommé des viandes non marinées (graphe A ; $p = 0.004$).

La consommation de viandes bovines a un effet promoteur sur le développement de MDF et sur le volume des MDF.

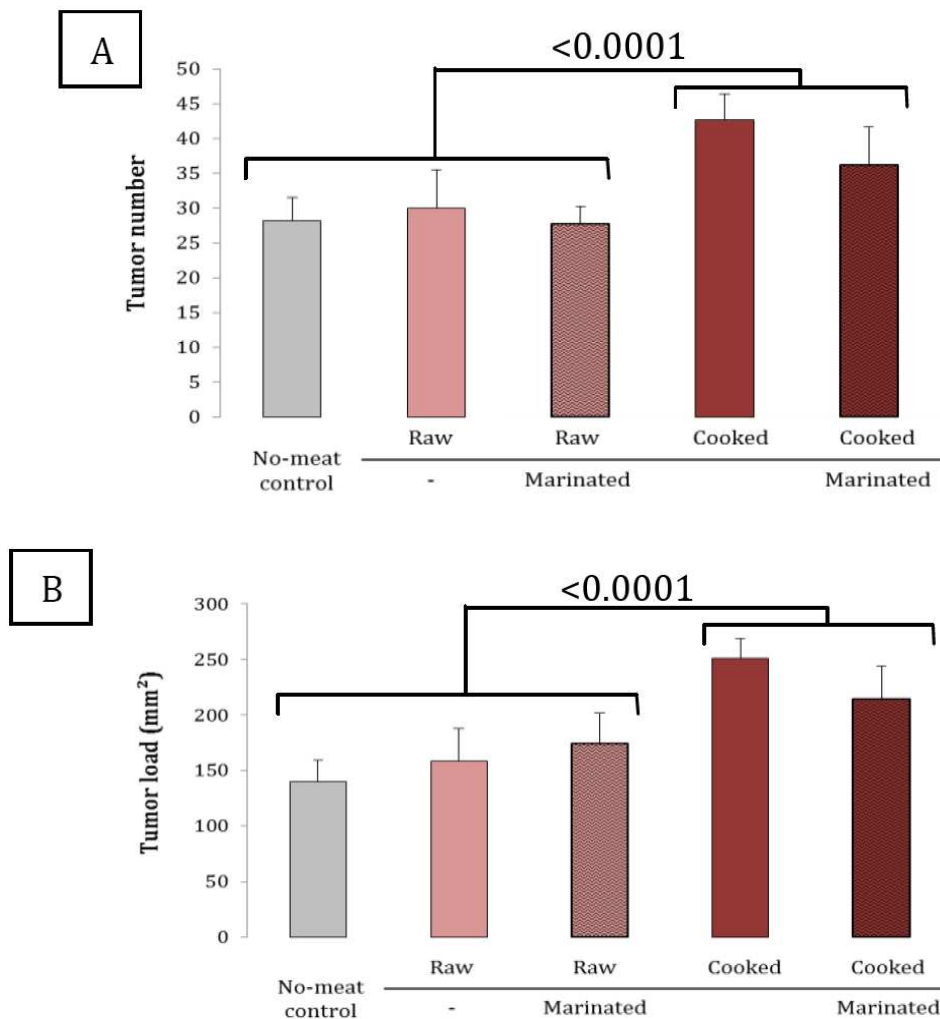
La modification des procédés de fabrication a un effet protecteur sur le développement des MDF (cuisson et marinade).

PARTIE B : Expérimentation
Effet des viandes sur les lésions (pré)cancéreuses des rongeurs

b. Chez les souris

i. Dénombrement des tumeurs de l'intestin grêle

Les côlons et intestins des souris ont été prélevés après sacrifice soit à J49-J50, fixés, colorés et codés. Les tumeurs ont par la suite été dénombrées par deux opérateurs. Les résultats sont présentés dans les graphes 5A et 5B.



Graph 5 : Nombre (A) et surface (B) des tumeurs intestinales dénombrées sur la muqueuse intestinale des souris après sacrifice

Les souris ayant consommé des viandes bovines semblent développer plus de tumeurs que les souris n'en ayant pas consommé ($p = 0.059$). De même, les tumeurs des souris ayant

PARTIE B : Expérimentation

Effet des viandes sur les lésions (pré)cancéreuses des rongeurs

consommé des viandes bovines sont de plus grande surface que les tumeurs des souris soumises au régime témoin ($p = 0.002$). On note donc un effet promoteur des viandes bovines sur l'apparition de lésions tumorales au niveau de la muqueuse de l'intestin grêle.

La consommation de viandes bovines cuites a un effet promoteur sur le nombre ($p < 0.0001$) et la surface ($p < 0.0001$) des lésions tumorales : on observe plus de petites ($p = 0.01$), de moyennes ($p < 0.0001$) et de grosses ($p < 0.0001$) tumeurs que lors de consommation d'un régime sans viandes.

La marinade semble avoir un léger effet protecteur sur le nombre et la taille des tumeurs, notamment lors d'une consommation de viandes cuites, mais cet effet n'est pas significatif.

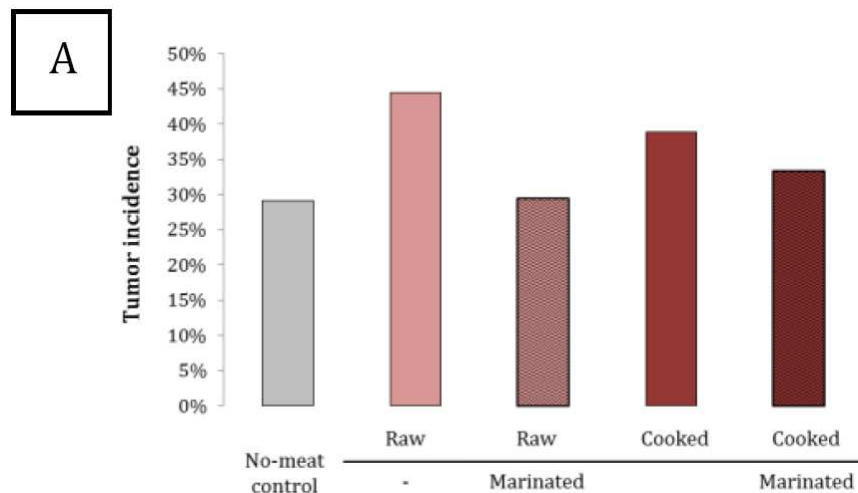
La consommation de viandes bovines a un effet promoteur sur la surface tumorale des lésions de l'intestin grêle et tend à augmenter le nombre de tumeurs.

La cuisson de la viande bovine a un effet promoteur sur le développement de tumeurs de l'intestin grêle et sur leur taille.

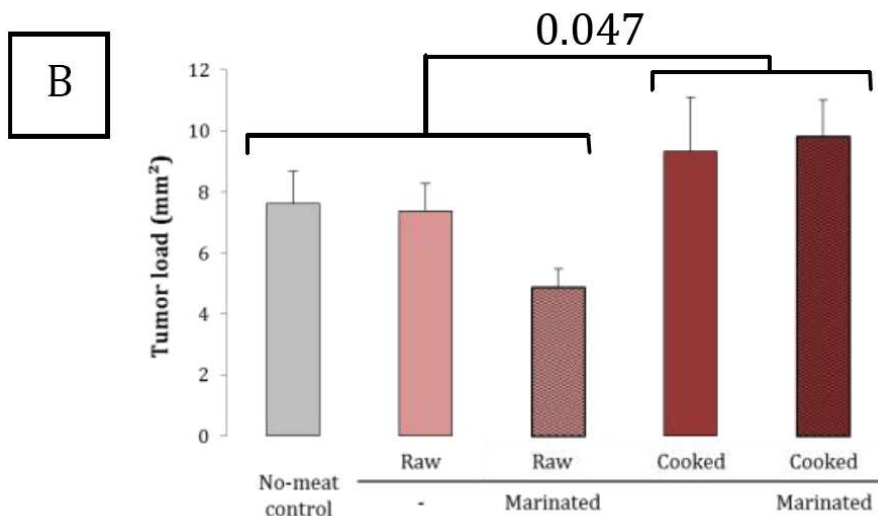
La marinade semble avoir un effet protecteur, notamment sur la viande cuite.

ii. Dénombrement des tumeurs du côlon

Le nombre de tumeurs recensées dans le côlon chez les souris *Min/apc* en fonction du régime consommé est présenté dans le graphe suivant.



PARTIE B : Expérimentation
Effet des viandes sur les lésions (pré)cancéreuses des rongeurs



Graph 6 : Nombre (A) et surface (B) des tumeurs intestinales dénombrées sur la muqueuse colique des souris après sacrifice

La consommation d'une viande crue non marinée semble conduire à une incidence tumorale plus importante que la consommation du régime témoin ; ce résultat reste cependant une tendance et n'est pas significatif. Il n'y a aucune différence significative entre les groupes.

Cependant, la consommation de viandes bovines cuites a un effet promoteur sur la taille et la surface des lésions tumorales ($p = 0.047$) : les souris ayant consommé des viandes bovines cuites ont de plus grosses tumeurs dans le côlon que les souris ayant été soumises au régime sans viande.

La consommation de viandes bovines suggère un nombre de lésions tumorales sur la muqueuse colique plus important (résultat non significatif).

On observe un effet promoteur de la cuisson des viandes bovines sur la surface des tumeurs du côlon chez les souris.

La marinade ne montre aucun effet promoteur ou protecteur.

PARTIE B : Expérimentation
Effet des viandes sur les lésions (pré)cancéreuses des rongeurs

Remarque : Les résultats du dosage de l'hème, du comptage des lésions prénéoplasiques des rats et des lésions tumorales des souris ayant consommé des charcuteries se trouvent dans la partie Annexe.

PARTIE C : Discussion

Le fer héminique, contenu dans la viande rouge, est un nutriment indispensable à l'Homme car il fournit le fer sous une forme cinq fois plus assimilable que le fer contenu dans les végétaux. Cependant, ce même fer héminique est un composé pouvant être néfaste pour la muqueuse colique. Ses effets directs ainsi que ses effets indirects semblent contribuer à modifier la composition du contenu du gros intestin. Le contenu luminal se charge ainsi en molécules qui peuvent être irritantes et abrasives pour la muqueuse et entraîner une cytotoxicité cellulaire à l'origine d'une mort cellulaire exagérée. L'organisme tend à compenser cette destruction par une hyperprolifération cellulaire anarchique favorable à l'apparition de lésions précancéreuses.

Les principales hypothèses envisagées pour expliquer la cancérogénèse colorectale sont au nombre de trois : l'hème aurait un effet direct sur les cellules épithéliales d'une part et il aurait un effet indirect catalytique sur la lipoperoxydation et sur la formation de composés N-nitrosés très irritants d'autre part.

L'objectif de ce travail était de vérifier le rôle promoteur de la cancérogénèse colorectale par les viandes rouges, d'établir une éventuelle corrélation entre la concentration en hème des eaux fécales et l'apparition de lésions précancéreuses et enfin d'évaluer des stratégies de prévention.

L'objectif final de l'étude à laquelle j'ai participé est un objectif de santé publique : diminuer le risque de développer un cancer du côlon chez les consommateurs de viandes rouges et de charcuteries.

Pour répondre à nos objectifs, nous avons utilisé deux modèles qui se rapprochent de l'Homme : le rat Fischer 344 et la Souris Min/*apc*. Bien qu'il s'agisse de deux rongeurs, ces modèles sont très différents. Le rat développe des lésions préneoplasiques alors que la souris développe des lésions tumorales ; la nature histopathologique du côlon du rat est identique à celle de l'espèce humaine [43, 45, 46] tandis que le modèle « souris » présente un contexte

PARTIE C : Discussion

génétique identique à celui de l'Homme [69]. Ces deux modèles sont donc complémentaires pour expliquer la cancérogénèse colorectale chez l'Homme.

Les résultats de cette étude ont conduit à certaines questions : les lésions préneoplasiques ou tumorales peuvent-elles réellement être reliées à la concentration en hème des eaux fécales et de ce fait, à la consommation de viandes riches en hème ? Quels sont exactement les mécanismes mis en jeu ? Existe-t-il des stratégies de prévention de l'apparition du cancer du côlon ? Sont-elles envisageables dans notre société ? Enfin, les modèles expérimentaux sont-ils adaptés ? En existe-t-il d'autres ?

Examinons maintenant quelles réponses apportent notre travail à ces questions.

1. Un régime riche en hème apporté par de la viande rouge conduit-il à des eaux fécales riches en hème ?

Chez les rats chimio-induits à l'azoxyméthane (initiateur chimique de la cancérogénèse colorectale), la consommation de viandes bovines, viandes riches en hème, marinées ou non, crues ou cuites, conduit à une concentration en hème dans les eaux fécales significativement plus importante que la consommation d'un régime dépourvu d'hème (graphe 1). Plus le régime est riche en hème, plus les eaux fécales sont concentrées en hème, ce qui suppose que l'hème retrouvé dans les fèces des rats est lié à l'alimentation et dépend peu ou pas d'une production endogène.

L'ajout de marinade raisin-olive, riche en composés antioxydants, n'a pas d'effet sur la concentration en hème dans les eaux fécales ce qui suppose que s'il existe un effet protecteur, ce dernier concerne plutôt les « sous-produits » de l'hème (composés issus de la lipoperoxydation et composés N-nitrosés). En effet, la marinade a surtout un effet sur les radicaux libres synthétisés en plus grande quantité dans la lumière du côlon lorsqu'une forte concentration en hème est retrouvée dans les eaux fécales.

La cuisson, quant à elle, tend à diminuer la concentration en hème dans les eaux fécales en transformant une part du fer héminique en fer non héminique, moins bien absorbé par l'organisme [86]. La proportion de fer héminique diminue ce qui explique une

PARTIE C : Discussion

concentration en hème des eaux fécales plus faible chez les individus ayant consommé des viandes cuites (graphe 1).

Chez les souris *Min/apc*, les résultats sont bien différents. Les souris soumises au régime témoin présentent une concentration en hème dans les eaux fécales peu différente de celle retrouvée chez les souris soumises à un régime à base de viandes bovines (graphe 2). Lorsqu'on compare deux à deux chacun des groupes, on ne note aucune différence significative ce qui tend à dire qu'il y a peu d'influence du type de régime, de la présence d'antioxydants ou encore de la cuisson sur la concentration en hème dans les eaux fécales des souris (graphe 2).

Ces résultats suggèrent qu'une partie de l'hème retrouvé dans les fèces est d'origine endogène ou exogène mais provenant d'une autre source d'alimentation. Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer une telle concentration en hème dans les eaux fécales des souris et, particulièrement, dans les eaux fécales des souris nourries avec un régime témoin, dépourvu d'hème. Voici les hypothèses envisagées :

- Les souris *Min/apc* développent spontanément des lésions cancéreuses de la muqueuse intestinale (intestin grêle particulièrement). Ces lésions peuvent facilement s'ulcérer. Or, une ulcération de la muqueuse conduit très souvent à des saignements digestifs qui peuvent être dits occultes, autrement dit, invisibles à l'œil nu tant ils sont en petite quantité. Ces saignements pourraient contribuer à une concentration en hème majorée dans les eaux fécales de ces souris.
- Les souris sont des animaux « proie », autrement dit, elles vivent dans un état de stress constant. Ce stress est majoré par la vie en communauté, par le nombre d'individus présents dans une même cage et par les conditions de vie. Il peut se traduire par la formation d'ulcères gastriques ou intestinaux (intestin grêle) et conduire à des saignements occultes, tout comme les tumeurs ulcérées.
- Les souris peuvent avoir tendance, de manière comportementale, à ingérer les fèces de leurs congénères et donc à ingérer de l'hème si ces fèces sont elles-mêmes riches en hème. Elles peuvent aussi, lorsque l'un des individus décède, se montrer cannibales.

PARTIE C : Discussion

- Le métabolisme des souris pourrait être différent de celui des rats chimio-induits et, par des mécanismes de défense et de destruction de l'hème moins efficaces, concourir à une concentration en hème dans les eaux fécales beaucoup plus importante, pour un même régime, que chez les rats chimio-induits.

Le développement spontané de lésions cancéreuses de la muqueuse de l'intestin grêle et les différences de métabolisme entre rat et souris restent les deux hypothèses majeures. Il serait intéressant de suivre d'un point de vue hématologique les souris Min afin de déterminer si elles souffrent de saignements digestifs. Cependant, cette lignée de souris est caractérisée par une anémie normocytaire constante, biaisant ainsi tout suivi hématologique (modèle souris Fabrice Pierre).

Chez les souris, la cuisson ou l'ajout de marinade n'a aucun effet sur la concentration en hème des eaux fécales.

Consommer des viandes rouges augmente la concentration en hème dans les eaux fécales. La cuisson tend à diminuer cette concentration chez les rats.

Contrairement aux rats, les eaux fécales de souris présentent une concentration en hème assez similaire lorsque le régime est riche en hème ou lorsqu'il en est dépourvu ce qui fait des souris Min un modèle peu adapté.

2. Un régime riche en hème conduit-il à l'apparition de lésions (pré)cancéreuses des muqueuses colique et intestinale ?

Chez les rats chimio-induits AOM, la consommation de viandes bovines, viandes riches en hème, conduit à l'apparition de lésions précancéreuses (graphes 3 et 4).

Les rats ayant consommé des viandes ont significativement moins de foyers de cryptes aberrantes (ACF) ($p=0.006$) mais plus de foyers pauvres en mucine (MDF) et des MDF de plus grande taille que les rats n'en ayant pas consommé ($p=0.028$). Il existe donc un effet

PARTIE C : Discussion

viande sur le nombre d'ACF et de MDF. ACF et MDF sont tous deux des lésions traduisant une organisation cellulaire de la muqueuse colique modifiée.

Cependant, il est utile de rappeler deux points caractéristiques des foyers de cryptes aberrantes :

- Les ACF peuvent conduire au développement de polypes adénomateux, détectés en médecine humaine et qui, parfois, évoluent en lésion cancéreuse s'ils ne sont pas contrôlés. Leur présence ne signe donc pas un cancer mais une lésion pouvant évoluer en cancer dans certaines conditions.
- Le nombre d'ACF dépend de la dose de cancérigène administré lors de manipulations expérimentales. Leur taille, quant à elle, exprime la vitesse de croissance et de duplication des cryptes aberrantes [64]. Le nombre ne reflète donc qu'un effet initiateur alors que la taille reflète un effet promoteur [32].

Dans notre étude, il n'existe aucune différence significative concernant la taille des ACF d'un groupe à l'autre.

Les foyers pauvres en mucine (MDF) sont, quant à eux, représentatifs d'une forte inflammation de la muqueuse, or les phénomènes inflammatoires ont une nette influence dans l'apparition du cancer colorectal [5]. Ils apparaissent aussi comme plus prédictifs du cancer du côlon que les ACF car ils présentent des mutations plus proches des mutations observées dans les tumeurs macroscopiques que celles rencontrées au sein des ACF. Contrairement aux ACF, les MDF conduisent dans la très grande majorité des cas à des lésions malignes [27], [84].

La consommation de viandes conduit à un plus grand nombre de MDF et à des MDF de plus grande taille. Notre étude permet donc de confirmer un effet promoteur des viandes sur la taille des MDF et donc sur le risque de développer un cancer du côlon.

Chez les souris Min/apc, la consommation de viandes conduit à une surface tumorale plus importante ($p=0.002$) et à une tendance pour la promotion du nombre de tumeurs ($p=0.0059$) sur la muqueuse intestinale. Ces souris présentent aussi plus de moyennes ($p=0.04$) et grandes tumeurs ($p=0.001$) que les souris soumises au régime témoin.

PARTIE C : Discussion

Au niveau de la muqueuse colique, il n'existe aucune différence significative entre les groupes concernant la taille des tumeurs coliques mais on observe une légère tendance concernant le nombre : un régime à base de viandes semble conduire à une augmentation du nombre de lésions (graphes 5 et 6).

Il est important de rappeler que la muqueuse intestinale des souris provient d'un tissu embryonnaire de même nature que la muqueuse du côlon de l'homme ou du rat. Les résultats concernant le côlon des souris sont donc secondaires. Notre étude permet de confirmer un effet promoteur des viandes sur le développement de lésions tumorales de la muqueuse intestinale des souris.

Consommer des viandes rouges riches en hème augmente le risque d'apparition de lésions précancéreuses ou tumorales pouvant conduire au développement d'un cancer colorectal chez deux modèles expérimentaux proches de l'Homme.

L'hème aurait donc un effet promoteur sur la cancérogénèse colorectale de tout type d'individus (appartenant à une famille PAF ou non).

3. Existe-t-il une relation entre concentration en hème des eaux fécales et apparition de lésions précancéreuses ? Quels sont les mécanismes mis en jeu ?

La consommation de viandes riches en hème conduit à des eaux fécales riches en hème et à l'apparition de lésions cancéreuses en plus grand nombre et/ou de plus grande taille chez les deux modèles étudiés. Il est tentant de dire qu'il semble exister une relation entre la concentration en hème des eaux fécales et l'apparition de ces lésions.

L'hème est un composé qui présente des effets directs et indirects au sein des muqueuses intestinale et colique pouvant conduire à une cytotoxicité plus importante des eaux fécales sur les lignées cellulaires. La lipoperoxydation et la formation de composés N-nitrosés, consécutifs à la présence d'hème dans les eaux fécales, sont deux mécanismes mis en cause.

PARTIE C : Discussion

La lipoperoxydation ou peroxydation des lipides insaturés entraîne la formation de deux aldéhydes principalement : le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonélal (4-HNE). Les aldéhydes sont cytotoxiques et sont impliqués dans la mort cellulaire. Le MDA est toxique pour les cellules car il peut s'y infiltrer et se fixer, par liaison covalente, sur l'ADN et entraîner des anomalies génétiques telles que de mauvais appariements. Ces derniers sont repérés par les systèmes de réparation cellulaire qui conduisent à l'apoptose de la cellule atteinte.

Le 4-HNE, quant à lui, induit l'apoptose de cellules saines. L'équipe Toxalim a étudié les effets de cet aldéhyde. Leur étude a montré que le 4-HNE était plus cytotoxique, génotoxique et pro-apoptotique chez les cellules *Apc* +/+, autrement dit chez les cellules saines que chez les cellules *Apc* *Min*/+, les cellules mutées. Cela suggère un effet initiateur du 4-HNE par l'induction de mutations génétiques ainsi qu'un effet promoteur par la sélection de cellules mutées par rapport aux cellules non mutées [79].

Les cellules anormales sont généralement mutées sur le gène *Apc* et deviennent donc résistantes à l'apoptose. Le 4-HNE favorise donc la survie des cellules mutées, en détruisant les cellules saines, ce qui conduit à la prolifération de cellules tumorales.

Le deuxième mécanisme expliquant la cancérogénèse colorectale concerne la formation de composés N-nitrosés. Ils agissent sur l'ADN par alkylation, c'est-à-dire transfert d'un groupement alkyle d'une molécule à une autre. Autrement dit, les composés nitrosés transfèrent une partie de leur structure sur l'ADN lui-même, entraînant de ce fait des dommages sur l'ADN et conduisant à des cellules anormales qui prolifèrent [60].

Parmi ces composés N-nitrosés, le FeNO semble avoir un rôle majeur. Les régimes dans lesquels la formation de MDF est inhibée ont pour point commun l'absence de FeNO dans les composés N-nitrosés formés [15]. Ce composé est d'ailleurs le principal composé formé en présence d'hème [58]...

Ce qui suggère un lien de cause à effet entre la présence d'hème dans les eaux fécales, celle de FeNO et le développement de lésions préneoplasiques consécutivement. Le FeNO serait l'un des acteurs majeurs responsables du développement de lésions précancéreuses suite à la consommation de viandes bovines.

PARTIE C : Discussion

L'équipe a réalisé des dosages des biomarqueurs biochimiques traduisant la présence d'aldéhydes ou de composés N-nitrosés. Bien que n'y ayant pas participé, je me permets d'utiliser ce complément d'informations.

Dans notre étude, les eaux fécales des rats ayant consommé des viandes sont plus riches en produits de lipoperoxydation (MDA, 4-HNE) que celles des rats ayant mangé un régime sans viande ($p < 0.0001$). Les eaux fécales de ces mêmes rats ayant consommé des viandes sont plus riches en composés nitrosés de tous types (ATNC). Ce résultat ne provient pas d'une analyse statistique et n'est donc qu'une observation. Cependant, on note du FeNO dans les eaux fécales des rats consommateurs de viande...

L'ensemble des radicaux libres, des aldéhydes et des composés nitrosés, secondaires à la présence d'hème dans la lumière intestinale, explique l'importante cytotoxicité des eaux fécales retrouvée lors des dosages effectués par l'équipe et suppose une corrélation entre la consommation de viandes rouges et l'apparition de lésions préneoplasiques.

Chez les souris Min/apc, les eaux fécales des souris présentent une concentration en hème importante quels que soient les groupes. Une forte concentration est retrouvée chez les souris ayant ou non consommé de la viande. Les dosages des produits de lipoperoxydation et des composés nitrosés sont assez similaires aux dosages des rats. Les eaux fécales des souris ayant consommé des viandes sont plus riches en produits de lipoperoxydation que celles des souris ayant mangé un régime sans viande ($p = 0.001$). Les eaux fécales des souris ayant consommé des viandes sont plus riches en composés nitrosés de tous types (ATNC) que celles des souris ayant mangé un régime sans viande. Ce résultat provient aussi d'une observation et non d'une analyse statistique.

Ces composés sont à l'origine, comme chez le rat, d'une cytotoxicité des eaux fécales pouvant expliquer l'apparition de lésions cancéreuses.

PARTIE C : Discussion

Il existe donc une vraie relation entre la concentration en hème des eaux fécales et l'apparition de lésions précancéreuses.

La présence d'hème et la formation de produits de lipoperoxydation et de composés nitrosés, notamment du FeNO, conduisent à une cytotoxicité des eaux fécales à l'origine d'un effet irritant sur la muqueuse, à une fragilité de cette dernière et, consécutivement, à une croissance cellulaire anarchique pouvant évoluer en tumeur.

Afin de mieux comprendre l'ensemble des hypothèses envisagées et leurs conséquences, le schéma suivant récapitule les informations énoncées précédemment.

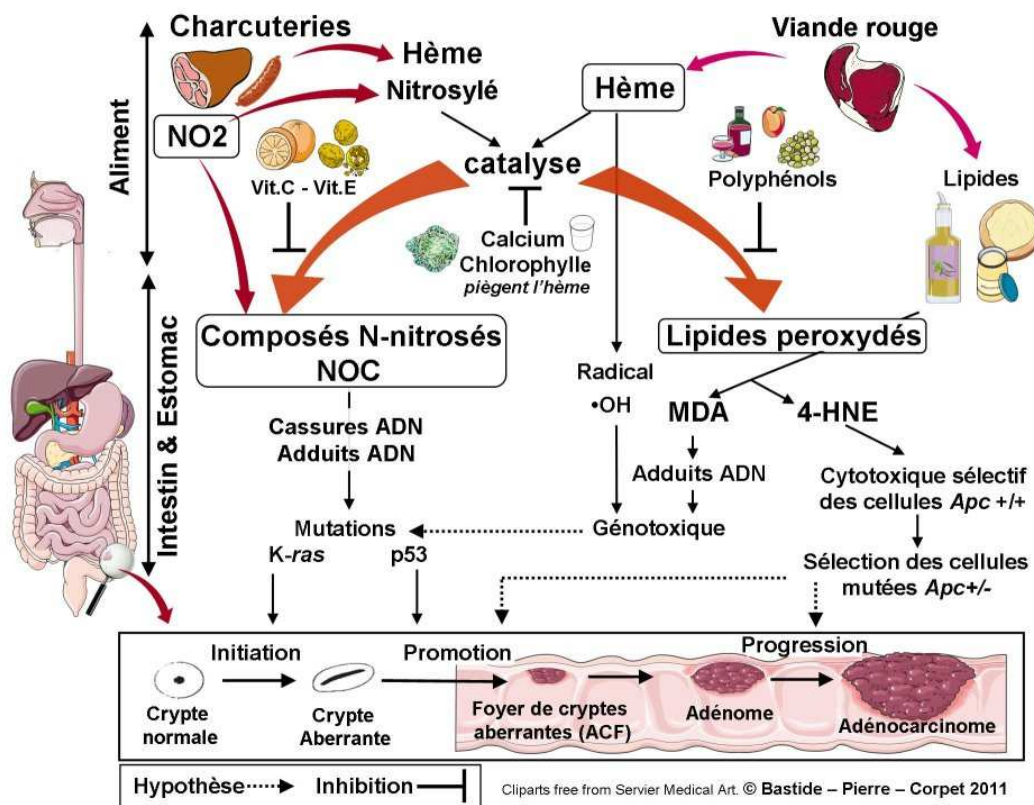


Figure 28 : Mécanismes expliquant l'effet des viandes et charcuteries sur la cancérogenèse colorectale, et les moyens de le prévenir par l'alimentation [31]

La cancérogénèse colorectale s'explique par un ensemble de mécanismes qui interagissent entre eux et qui conduisent à des anomalies génétiques à l'origine de lésions cancéreuses. Connaissant ces mécanismes, il est possible d'envisager des stratégies de prévention.

4. Des stratégies préventives de l'excès de cancer du côlon lié à la consommation de viande sont-elles envisageables ?

Notre étude avait pour but de proposer des stratégies de prévention du cancer colorectal. En effet, les études *in vitro* suggéraient qu'un ajout de marinades riches en antioxydants (tels que le raisin ou l'olive) ou des cuissons modifiées pouvaient diminuer le développement de lésions cancéreuses en inhibant les mécanismes de lipoperoxydation ou de formation de composés N-nitrosés. *In vivo*, les résultats que nous présentons sont un peu plus mitigés.

Chez les rats chimio-induits, les individus ayant consommé des viandes marinées ont moins de MDF que ceux ayant consommé des viandes non marinées ($p = 0.004$). De même, les rats ayant consommé des viandes cuites ont moins de MDF que ceux ayant consommé des viandes crues ($p = 0.009$). La marinade et la cuisson ont un effet protecteur sur le développement des MDF et donc sur l'apparition d'un cancer colorectal.

La marinade raisin-olive est un mélange riche en molécules anti-oxydantes. En effet, l'huile d'olive et le raisin sont composés de molécules présentant des groupements hydroxyles (-OH) capables de donner un atome d'hydrogène à un radical libre afin de le neutraliser et de stopper ainsi les réactions de lipoperoxydation [94]. Les viandes rouges marinées semblent pouvoir diminuer le risque de développer des lésions précancéreuses grâce à l'interaction de la marinade avec les produits de l'hème.

La cuisson montre elle aussi un effet protecteur sur les MDF : plus on cuit la viande, moins on observe de MDF sur la muqueuse colique (graphe 4). La cuisson transforme le fer héminique en fer non héminique et diminue donc la concentration en fer héminique et donc en hème dans les eaux fécales contribuant ainsi à une production moindre de produits de la lipoperoxydation et de composés N-nitrosés. L'hème, ses effets directs et ses effets indirects étant réduits, la cytotoxicité des eaux fécales diminue.

PARTIE C : Discussion

Chez les souris *Min/apc*, les résultats sont assez différents. Les souris ayant consommé des viandes cuites ont plus de lésions tumorales ($p < 0.0001$) et une plus grande surface tumorale ($p < 0.0001$) que les souris ayant consommé un régime sans viande. Les souris ayant consommé des viandes marinées crues ont un nombre de grosses tumeurs ($p = 0.019$) plus important que les souris ayant consommé des viandes non marinées crues. Cependant, les souris ayant consommé des viandes marinées cuites ont moins de tumeurs et de plus petites tumeurs que les souris ayant consommé des viandes marinées cuites (graphe 5).

Contrairement aux rats, la cuisson semble être promotrice de lésions tumorales chez la souris. La marinade, quant à elle, semble avoir un léger effet protecteur sur le développement de tumeurs lors d'une consommation de viandes cuites.

La cuisson des viandes rouges ou blanches conduit à la formation d'amines hétérocycliques et d'hydrocarbures aromatiques polycycliques, mis en cause dans le développement de cancer colorectal mais sans qu'aucune étude ne parvienne à émettre un lien avec celui-ci [25], [76], [93]. Ces composés sont reconnus comme pouvant être hautement cancérigènes. Leur proportion dans une pièce de viande augmente sous l'effet de la chaleur.

Suite à notre étude, la cuisson de la viande rouge semble avoir un effet promoteur du cancer colorectal chez la souris alors qu'elle semble plutôt protectrice chez le rat. On peut envisager une sensibilité de la muqueuse des souris plus importante à ces composés [10]. Les souris *Min/apc* sont des souris modifiées génétiquement. Or, une étude récente a mis en évidence un lien entre amines, hydrocarbures et cancer colorectal chez certaines familles génétiques [48]. On pourrait donc supposer que la cuisson offre réellement une protection contre le cancer du côlon chez des individus « normaux » mais qu'elle pourrait majorer le développement de lésions (pré)cancéreuses chez des individus dont un ou plusieurs gènes d'intérêt auraient muté.

La marinade (raisin-olive) montre un effet protecteur de la cancérogénèse colorectale chez le rat (résultats significatifs) et chez la souris (résultats non significatifs) probablement grâce à son pouvoir antioxydant.

Les antioxydants limitent la lipoperoxydation et donc les effets indirects de l'hème.

La cuisson montre un effet protecteur chez le rat mais un effet promoteur chez la souris. La viande cuite contient moins d'hème que la viande crue ce qui explique l'effet protecteur observé chez le rat, modèle de l'Homme souffrant d'un cancer colorectal sporadique. Par contre, elle contient plus d'amines hétérocycliques que la viande crue, cancérogènes auxquels la souris Min serait plus sensible que le rat, la souris Min étant proposée comme un modèle de l'Homme souffrant de PAF.

Compte tenu d'une meilleure compréhension actuelle des mécanismes qui régulent le cancer colorectal et des résultats chez le rat qui, d'un point de vue histologique, est un modèle adapté pour l'Homme développant un cancer sporadique (majorité de la population), les stratégies envisagées sont de bonnes pistes pour la prévention de la cancérogénèse colorectale.

Sur ce point, les enquêtes épidémiologiques suggèrent d'ailleurs que la consommation d'un régime riche en antioxydants contribue à prévenir le cancer du côlon [103].

5. Ces stratégies de prévention sont-elles réellement possibles dans notre société ?

Pour prévenir le cancer du côlon, la première étape passe par l'alimentation. La consommation de viandes rouges et de charcuteries est promotrice du développement de lésions précancéreuses de la muqueuse colique. Or, dans notre société, ces deux mets sont parmi les plus consommés. Réduire leur présence dans nos supermarchés conduirait à la chute de nombreuses professions : éleveurs, bouchers, charcutiers verraient leurs revenus et leur métier réduits à néant. Cela ne semble pas envisageable, d'autant que les consommateurs ne sont pas prêts à supprimer jambon blanc, saucisson et côte de bœuf de leur alimentation.

PARTIE C : Discussion

Améliorer notre alimentation, l'enrichir en composés protecteurs et bénéfiques pour notre santé semble donc être une meilleure solution. Car, il ne faut pas oublier que, malgré ses effets promoteurs, la viande rouge est nécessaire à l'apport en fer dont notre corps a besoin. Elle a donc aussi des effets bénéfiques non négligeables, notamment chez les femmes cyclées, les femmes enceintes ou les personnes âgées.

Nous avons vu que les antioxydants semblaient avoir un effet protecteur sur la cancérogénèse colorectale. De même, des études ont montré l'intérêt du calcium qui diminue l'apparition de lésions précancéreuses du côlon. Alors plutôt que de se priver de manger viande rouge et charcuteries, il vaut mieux enrichir notre repas d'un verre de vin riche en antioxydants, de brocolis en accompagnement et d'un bon fromage blanc en dessert pour s'offrir à la fois un bon repas et un repas sans risque !

Enfin, les filières bouchères rivalisent de créativité pour offrir des mets sans risque pour le consommateur. On voit en effet apparaître depuis quelques années des pièces de bœuf marinées dans des jus de citron et des huiles d'olive. Les médias participent activement à la lutte contre le cancer en répétant à travers publicités télévisuelles et prospectus qu'il est important de consommer des produits laitiers et des fruits et légumes quotidiennement ainsi que de pratiquer une activité physique régulière.

A nous, consommateurs avertis des risques, d'écouter ces recommandations et de les appliquer...

6. Nos modèles expérimentaux sont-ils adaptés ? En existe-t-il d'autres ?

Notre étude est basée sur deux modèles animaux : le rat chimio-induit à l'azoxyméthane (AOM) et la souris *Min/apc*. La plupart des études ont été réalisées avec pour modèle le rat AOM qui présente des lésions préneoplasiques de types ACF et MDF. Aucune étude n'avait encore montré la promotion de vraies tumeurs par la viande chez les rongeurs. D'où notre étude qui a intégré la souris *Min/apc* en tant que deuxième modèle car elle développe de vraies tumeurs et qu'elle se rapproche de l'Homme d'un point de vue génétique (familles PAF).

PARTIE C : Discussion

Nous voulions prouver que la consommation de viandes rouges avait un effet promoteur sur le développement de lésions tumorales en augmentant le nombre mais surtout la surface des tumeurs intestinales des souris. Les dosages de l'hème n'ont malheureusement pas donné de résultats significativement différents entre le groupe témoin et les groupes « viandes » ce qui limite l'interprétation de nos résultats et remet en question les souris *Min/apc* en tant que modèle de cancérogénèse colorectale chez l'Homme.

Ces souris *Min/apc* sont des souris dont le gène *Apc* a été muté afin que la lignée soit proche, sur les plans génétique et mécanistique, des individus humains souffrant de cancer colorectal. Malgré des dosages de l'hème difficilement interprétables, les souris soumises au régime témoin ont cependant développé des lésions cancéreuses sur la muqueuse de l'intestin grêle et du côlon de plus petite taille que les lésions que l'on observe chez les autres individus ce qui montre un effet promoteur de la viande.

Suite à cette remarque, une question se pose : les lésions apparues spontanément, en abrasant la muqueuse intestinale, ont-elles conduit à des saignements intestinaux et donc à des dosages d'hème similaires à des individus ayant consommé des viandes rouges ? Quelle que soit la réponse, l'hème reste l'élément majeur à l'origine du développement de tumeurs colorectales.

Autre point intéressant, les souris *Min/apc* développent surtout des lésions cancéreuses sur la muqueuse de l'intestin grêle. Or, notre étude a pour objectif de montrer le lien entre un régime particulier et l'apparition de lésions cancéreuses sur la muqueuse du côlon. Et l'on sait que de telles lésions de l'intestin grêle saignent en amont ce qui supposerait que, même sans hème dans le régime, il ait pu y avoir de l'hème dans les fèces des souris témoins et, cela, expliquerait le développement de lésions cancéreuses.

Les souris *Min/apc* sont peut-être un modèle peu adapté à notre étude pour toutes ces raisons ainsi que pour des raisons histologique et de développement embryonnaire [90], [91]. L'histologie de la muqueuse colique du rat est relativement proche de celle de l'Homme ce qui fait de lui un meilleur modèle pour cette étude. Cependant, elles apportent certaines informations concernant les familles PAF.

PARTIE C : Discussion

Les rats Fischer 344 initiés pas des cancérigènes chimiques sont souvent proposés comme modèles des individus chez lesquels surviennent des cancers colorectaux sporadiques sans prédisposition familiale au cancer du côlon.

Chez ces individus, la consommation de viandes rouges est promotrice de la cancérogénèse colorectale. **Un régime enrichi en antioxydants et une bonne cuisson de la viande pourraient, d'après nos résultats, contribuer à prévenir l'apparition de lésions coliques précancéreuses.**

Les souris Min modélisent les individus souffrant de cancer colorectal familial (PAF).

Chez ces individus, **le bagage génétique semble avoir une forte influence** sur la cancérogénèse colorectale, **le régime alimentaire étant un élément secondaire** dans le développement de lésions cancéreuses.

Souris Min/*apc* et rats Fischer, bien qu'étant reconnus pour être de bons modèles expérimentaux de l'Homme, sont des rongeurs et ne présentent pas le même métabolisme intestinal que l'Homme : rôle du caecum différent, fèces sèches et dures partiellement réingérées... Il s'agit en effet de deux groupes très distincts.

Finalement, et il s'agit là du point le plus important, notre étude est une étude *in vivo* où demeurent des points que nous ne pouvons pas contrôler ou même expliquer...

D'autres modèles pourraient être envisagés : les carnivores domestiques.

Le régime alimentaire des chiens et des chats se compose en grande partie de viande. Cependant, comme chez l'Homme, le développement de cancers colorectaux a lieu chez des animaux d'un certain âge.

PARTIE C : Discussion

Chez le chien, les lésions tumorales apparaissent à :

- 6.9 ans pour l'apparition d'adénomes colorectaux
- 8.5 ans pour l'apparition d'adénocarcinomes colorectaux

Les tumeurs colorectales représentent entre 36% et 60% des tumeurs digestives : elles sont donc prédominantes. Contrairement à l'Homme, la majeure partie de ces tumeurs reste bénigne. Généralement, on observe 65% d'adénomes et 30% d'adénocarcinomes.

Chiens et chats sont les compagnons de l'Homme et vivent dans le même environnement que lui, consommant parfois la même alimentation et pourraient donc constituer un bon modèle d'étude. L'inconvénient majeur reste la limite de temps. En effet, il faudrait attendre la fin de vie de tels animaux pour pouvoir prélever leur appareil digestif et l'analyser.

Le modèle le plus adéquat reste donc celui de certains singes mais les expériences conduiraient à des coûts non négligeables et poseraient certainement des problèmes d'éthique.

Finalement, le meilleur modèle reste celui que nous connaissons le mieux, le nôtre...

Pour continuer à faire avancer la recherche et comprendre les mécanismes de la cancérogénèse colorectale, les enquêtes épidémiologiques et les questionnaires de santé présentent une importance capitale. A chacun d'entre nous de se sentir concerner et d'apporter notre part dans cette lutte contre le cancer...

CONCLUSION

La consommation de viandes bovines a un effet promoteur sur le développement de lésions préneoplasiques chez les rats et les souris. On observe plus de lésions de type « foyers pauvres en mucine » (MDF), lésions prédictives du cancer du côlon, et de plus grande taille chez les rats ayant consommé des viandes rouges et plus de lésions tumorales chez les souris ayant consommé les mêmes viandes que chez les individus témoins n'en ayant pas consommé.

L'hème, l'un des composés des viandes bovines, serait le principal facteur expliquant la promotion de ces lésions par la viande. Présent en grande quantité dans les viandes rouges, on le retrouve dans les eaux fécales des rats et des souris ayant consommé ces viandes. Par ses effets directs et ses effets indirects (lipoperoxydation et formation de composés N-nitrosés), il conduirait à une cytotoxicité des eaux fécales à l'origine d'une destruction cellulaire et par conséquent, à un développement cellulaire anarchique. Les mécanismes de ce phénomène étant mieux connus, des stratégies de prévention ont été envisagées et testées *in vitro* puis *in vivo*.

L'ajout de marinade riche en antioxydants ou des modes de cuisson différents sont deux stratégies qui ont montré un effet réellement protecteur du cancer du côlon chez le rat. En effet, les rats ayant consommé des viandes rouges marinées ou cuites ont moins de lésions précancéreuses que ceux ayant consommé des viandes non marinées ou crues. Chez la souris, les résultats sont plus mitigés : on observe un très léger effet protecteur de la marinade et la cuisson semble avoir un effet plutôt promoteur. De plus, on note un biais dans la concentration en hème des eaux fécales : les souris n'ayant pas consommé de viande présentent une concentration en hème des eaux fécales assez similaire à celles en ayant consommé. Ce biais peut être rattaché au modèle lui-même, modèle développant spontanément des lésions tumorales intestinales qui saignent, ce qui fait des souris un modèle moins adapté à l'Homme bien que génétiquement plus proche de l'Homme que le modèle « rat ».

CONCLUSION

Ces stratégies restent des pistes à exploiter afin de prévenir le cancer colorectal et tenter de protéger le consommateur averti ou non des risques...

Comme le disait Paracelse, « rien n'est poison, tout est poison : seule la dose fait le poison ».

Consommer des viandes rouges est néfaste pour l'organisme si cette consommation est excessive. Une alimentation équilibrée basée sur une consommation de viande, dans des proportions modérées, de fruits et légumes riches en antioxydants, de féculents et de produits laitiers riches en calcium reste la meilleure stratégie de prévention face au cancer du côlon...

La prévention de la cancérogénèse colorectale passe par une modification de nos habitudes alimentaires mais aussi par le dépistage précoce des polypes adénomateux, voire des microlésions (ACF visibles en chromo-micro-colonoscopie). Une campagne nationale de dépistage a été lancée par les pouvoirs publics en 2002. Elle a été expérimentée dans 23 départements français avant d'être étendue à tout le territoire en 2009. Ce dépistage concerne les personnes âgées de 50 à 74 ans et repose sur la détection d'éventuels polypes par colonoscopie après une analyse des selles : la présence d'un saignement occulte dans les selles (test Hemoccult II®) peut en effet révéler un polype ou un cancer. Ce dépistage, effectué tous les deux ans auprès de la population d'âge mûr, a permis de diviser par deux la mortalité associée à ce cancer.

Outre les techniques de dépistage sans cesse améliorées, la recherche se poursuit afin d'améliorer le traitement du cancer colorectal. Ce dernier nécessite souvent une exérèse chirurgicale large : la tumeur est retirée avec le minimum de manipulation ainsi que les ganglions qui la drainent. Un traitement adjuvant est toujours associé et repose sur une chimiothérapie qui débute généralement un mois postopératoire.

Dans les étapes précoces de la cancérogénèse, avant le développement d'un cancer dit « invasif », des traitements chimio-préventifs existent et sont utilisés. Cependant, ces agents chimio-préventifs semblent montrer de nombreux effets secondaires chez les patients. Une étude récemment publiée offre une nouvelle approche médicale pour gérer au mieux ces

CONCLUSION

effets. Au sein de ces agents, on retrouve des anti-inflammatoires non stéroïdiens COX-2 connus pour engendrer des problèmes cardiovasculaires, des inhibiteurs aux récepteurs de facteurs de croissance tels que le gefitinib et des inhibiteurs de l'ornithine decarboxylase tels que l' α -difluorométhylornithine qui sont de très bons agents anticancéreux mais qui conduisent à une toxicité cutanée ainsi qu'à une ototoxicité lorsqu'ils sont utilisés indépendamment à la posologie décrite.

Une équipe de chercheurs a donc imaginé combiner ces anticancéreux afin de diminuer leurs doses tout en préservant leurs effets positifs. Les résultats sont prometteurs : la combinaison du gefitinib, du licofelone, de l'atorvastatin, et de l' α -difluorométhylornithine, appelée GLAD n'a montré aucun signe de toxicité chez des souris *Min/apc* et a permis d'inhiber fortement le développement des lésions tumorales (80-83%, $p < 0.0001$) ainsi que leur taille (-70%) chez ces mêmes animaux (1). Des analyses suggèrent que la combinaison GLAD inhiberait la prolifération cellulaire, induirait l'apoptose des cellules tumorales et diminuerait les taux de beta-caténine en limitant les effets secondaires habituellement observés...

Une autre combinaison de deux agents (difluorométhylornithine et sulindac) a été testée avec succès et a montré très peu de toxicité chez l'Homme (2). Après exérèse chirurgicale des adénomes, un groupe de patients a reçu la combinaison de molécules chimiques, un autre a reçu le placebo durant 36 mois. Lors de la coloscopie de contrôle trois ans après le début du traitement, on observait une récurrence des adénomes à 41.1% chez le groupe placebo contre 12.3% chez les autres et cela avec peu d'effets secondaires...

Ces combinaisons de molécules anticancéreuses ouvrent donc une nouvelle piste et un nouvel espoir pour lutter contre le cancer du côlon chez l'Homme.

(1) *Multitargeted Low-Dose GLAD Combination Chemoprevention: A Novel and Promising Approach to Combat Colon Carcinogenesis*, Altaf Mohammed*, Naveena B. Janakiram* et al., *NEOPLASIA*, vol. 15, No 5, 2013).

(2) *Meyskens F.L.Jr., McLaren C.E., Pelot D. et al. Difluoromethylornithine Plus Sulindac for the Prevention of Sporadic Colorectal Adenomas: A Randomized Placebo-Controlled, Double-Blind Trial. Cancer Prevention Research, 1, 32-38, 2008*

AGREMENT



AGREMENT SCIENTIFIQUE

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

Je soussigné, Denis CORPET, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de *MALRIC Auréline* intitulée « *Viandes et cancérogenèse colorectale chez le Rat chimio-induit et la Souris Min : Effet de l'hème* » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Ecole Nationale Vétérinaire
HIDAOA Sciences de l'Aliment
23, CP Denis CORPET
Enseignant chercheur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Denis CORPET

Vu :
Le Directeur de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse
Professeur Alain MILON

Vu :
Le Président du jury :
Professeur Roland BUGAT

Pr. Roland BUGAT
INSTITUT CLAUDIUS REGAUD
20-24 rue du Pont Saint-Pierre
31052 TOULOUSE CEDEX
Finess 31 078 234 7 - RPPS 10002846318
☎ 05 61 42 41 19 - 📠 05 61 42 46 20

Vu et autorisation de l'impression :
Le Président de l'Université
Paul Sabatier
Professeur Bertrand MONTHUBERT

Le Président de l'Université Paul Sabatier
par délégation
Le vice-Président du jury



Arnaud LE PADELLEC

Mlle MALRIC Auréline
a été admis(e) sur concours en : 2008
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 21/06/2012
a validé son année d'approfondissement le : 27/06/2013
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.



REFERENCES

- [1] ADAM (2003). Pictures, accredited by American Accreditation HealthCare Commission
- [2] AGRICULTURE USDO (2010). Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods, Release 2. *Nutrient Data Laboratory*.
- [3] AHMED S, WANG N, HAFEEZ BB, CHERUVU VK, HAQQI TM (2005). Punica granatum L. extract inhibits IL-1beta-induced expression of matrix metalloproteinases by inhibiting the activation of MAP kinases and NF-kappaB in human chondrocytes in vitro. *J Nutr*, **135**, 2096-102.
- [4] AL. HE (2003). Les foyers de cryptes aberrantes (FCA) coliques : une lésion précancéreuse à dépister ? *La lettre de l'hépatogastroentérologue*.
- [5] AL. SE (2010). Charcuteries et cancérogénèse colorectale, additifs alimentaires et procédés de fabrication inhibant la promotion chez le rat. *Thèse de Doctorat Universitaire*.
- [6] ALBRECHT M, JIANG W, KUMI-DIAKA J, LANSKY EP, GOMMERSALL LM, PATEL A, MANSEL RE, NEEMAN I, GELDOLF AA, CAMPBELL MJ (2004). Pomegranate extracts potently suppress proliferation, xenograft growth, and invasion of human prostate cancer cells. *J Med Food*, **7**, 274-83.
- [7] ALEXANDER DD, CUSHING CA, LOWE KA, SCEURMAN B, ROBERTS MA (2009). Meta-analysis of animal fat or animal protein intake and colorectal cancer. *Am J Clin Nutr*, **89**, 1402-9.
- [8] AMERICAN ION (1977). Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Committee on standards for nutritional studies. *J Nutr*, **107**, 1340-1348.
- [9] AMES BN (1983). Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. *Science*, **221**, 1256-64.
- [10] ANDREASSEN A, PAULSEN JE, ALEXANDER J (2001). Genetic alterations in the Apc gene in intestinal tumors from Min mice neonatally exposed to a single dose of PhIP or IQ. *Proc. AACR*, **42**, #3240.
- [11] ASENSI M, ORTEGA A, MENA S, FEDDI F, ESTRELA JM (2011). Natural polyphenols in cancer therapy. *Crit Rev Clin Lab Sci*, **48**, 197-216.
- [12] AVIRAM M, ROSENBLAT M, GAITINI D, NITECKI S, HOFFMAN A, DORNFELD L, VOLKOVA N, PRESSER D, ATTIAS J, LIKER H, HAYEK T (2004). Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intima-media thickness, blood pressure and LDL oxidation. *Clin Nutr*, **23**, 423-33.
- [13] BAIRD L, DINKOVA-KOSTOVA AT (2011). The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway. *Arch Toxicol*, **85**, 241-72.
- [14] BALLINGER AB, ANGGIANSAH C (2007). Colorectal cancer. *BMJ*, **335**, 715-8.
- [15] BASTIDE NM, PIERRE FH, 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**, 177-84.
- [16] BEROUD C, COLLOD-BEROUD G, BOILEAU C, SOUSSI T, JUNIEN C (2000). UMD (Universal mutation database): a generic software to build and analyze locus-specific databases. *Hum Mutat*, **15**, 86-94.
- [17] BINGHAM S, RIBOLI E (2004). Diet and cancer - The European prospective investigation into cancer and nutrition. *Nature Reviews Cancer*, **4**, 206-215.
- [18] BINGHAM SA, HUGHES R, CROSS AJ (2002). Effect of white versus red meat on endogenous N-nitrosation in the human colon and further evidence of a dose response. *J. Nutr*, **132**, 3522S-3525S.
- [19] BINGHAM SA, PIGNATELLI B, POLLOCK JRA, ELLUL A, MALAVEILLE C, GROSS G, RUNSWICK S, CUMMINGS JH, ONEILL 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**, 515-523.
- [20] BIRD RJ ME, BRUCE WR (1989). Aberrant crypts, putative precancerous lesions, in the study of the role of diet in the aetiology of colon cancer. *Cancer Surveys*, **8:189-200**.
- [21] BIRD RP (1995). Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Cancer Letters*, **93**, 55-71.
- [22] BIRD RP, GOOD CK (2000). The significance of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Toxicology Letters*, **112**, 395-402.
- [23] BRUCE WR (1987). Recent hypotheses for the origin of colon cancer. *Cancer Res*, **47**, 4237-4242.

REFERENCES

- [24] BRUCE WR, CORPET DE (1996). The colonic protein fermentation and insulin resistance hypotheses for colon cancer etiology: Experimental tests using precursor lesions. *European Journal of Cancer Prevention*, **5**, 41-47.
- [25] BUTLER LM, SINHA R, MILLIKAN RC, MARTIN CF, NEWMAN B, GAMMON MD, AMMERMAN AS, SANDLER RS (2003). Heterocyclic amines, meat intake, and association with colon cancer in a population-based study. *American Journal of Epidemiology*, **157**, 434-445.
- [26] CACHON T (2004). Les tumeurs colorectales chez le chien. *Thèse vétérinaire, VetAgro Sup*.
- [27] 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 Research*, **63**, 2388-2392.
- [28] CALLE EE, KAAKS R (2004). Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev Cancer*, **4**, 579-91.
- [29] CARPENTER CE, MAHONEY AW (1992). Contributions of heme and nonheme iron to human nutrition. *Crit Rev Food Sci Nutr*, **31**, 333-67.
- [30] CHAN DS, LAU R, AUNE D, VIEIRA R, GREENWOOD DC, KAMPMAN E, NORAT T (2011). Red and processed meat and colorectal cancer incidence: meta-analysis of prospective studies. *PLoS One*, **6**, e20456.
- [31] CORPET DE (2012). Mechanisms of pro-cancer effect of meat consumption: a review. *Revue Méd. Vét.*, **163**, 43-48.
- [32] CORPET DE, CASSAND P (1995). Lack of aberrant crypt promotion and of mutagenicity in extracts of cooked casein, a colon cancer-promoting food. *Nutrition and Cancer*, **24**, 249-256.
- [33] 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**, 1911-22.
- [34] CORPET DE, TACHE S, PIERRE F (2002-2011). Colon cancer prevention: chemoprevention database. <http://www.inra.fr/reseau-nacre/sci-memb/corpet/indexan.html>, **2009**.
- [35] CORPET DE, YIN Y, ZHANG XM, REMESY C, STAMP D, MEDLINE A, THOMPSON L, BRUCE WR, ARCHER MC (1995). Colonic protein fermentation and promotion of colon carcinogenesis by thermolyzed casein. *Nutrition and Cancer - an International Journal*, **23**, 271-281.
- [36] 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 Research*, **63**, 2358-2360.
- [37] CUMMINGS JH, BINGHAM SA (1998). Diet and the prevention of cancer. *Bmj*, **317**, 1636-40.
- [38] D'ISCHIA M, NAPOLITANO A, MANINI P, PANZELLA L (2011). Secondary targets of nitrite-derived reactive nitrogen species: nitrosation/nitration pathways, antioxidant defense mechanisms and toxicological implications. *Chem Res Toxicol*, **24**, 2071-92.
- [39] DAVIS ME, LISOWYJ MP, ZHOU L, WISECARVER JL, GULIZIA JM, SHOSTROM VK, NAUD N, CORPET DE, MIRVISH SS (2012). Induction of colonic aberrant crypts in mice by feeding apparent N-nitroso compounds derived from hot dogs. *Nutr Cancer*, **64**, 342-9.
- [40] DOLL R PR (1981). The causes of cancer. *J Nat Cancer Inst*, **66**: 1191-1308.
- [41] DOUGLASS ML, KABACOFF BL, ANDERSON GA, CHENG MC (1978). The chemistry of nitrosamine formation, inhibition and destruction. *J.Soc.Cosmet.Chem.*, **29**, 581-606.
- [42] FEARON ER (2011). Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu Rev Pathol*, **6**, 479-507.
- [43] 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.
- [44] FEMIA AP, CADERNI G (2008). Rodent models of colon carcinogenesis for the study of chemopreventive activity of natural products. *Planta Med*, **74**, 1602-7.
- [45] FEMIA AP, CADERNI G, BOTTINI C, SALVADORI M, DOLARA P, TESSITORE L (2006). Mucin-depleted foci are modulated by dietary treatments and show deregulation of proliferative activity in carcinogen-treated rodents. *Int J Cancer*, **120**, 2301-2305.
- [46] 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**, 445-9.
- [47] GAY LJ, MITROU PN, KEEN J, BOWMAN R, NAGUIB A, COOKE J, KUHNLE GG, BURNS PA, LUBEN R, LENTJES M, KHAW KT, BALL RY, IBRAHIM AE, ARENDS MJ Dietary, lifestyle and clinicopathological factors associated with APC mutations and promoter methylation in colorectal cancers from the EPIC-Norfolk study. *J Pathol*, **228**, 405-15.

REFERENCES

- [48] GILSING AM, BERNDT SI, RUDER EH, GRAUBARD BI, FERRUCCI LM, BURDETT L, WEISSFELD JL, CROSS AJ, SINHA R Meat-related mutagen exposure, xenobiotic metabolizing gene polymorphisms and the risk of advanced colorectal adenoma and cancer. *Carcinogenesis*, **33**, 1332-9.
- [49] GLEI M, KLENOW S, SAUER J, WEGEWITZ U, RICHTER K, POOL-ZOBEL BL (2006). Hemoglobin and heme induce DNA damage in human colon tumor cells HT29 clone 19A and in primary human colonocytes. *Mutat Res*, **594**, 162-71.
- [50] GOERG KJ, NELL G, RUMMEL W (1983). Effect of deoxycholate on the perfused rat colon. Concentration dependence of the effect on net fluid and electrolyte transfer and the correlation with paracellular permeability. *Digestion*, **26**, 105-13.
- [51] GOTTSCHALG E, SCOTT GB, BURNS PA, SHUKER DE (2007). Potassium diazoacetate-induced p53 mutations in vitro in relation to formation of O6-carboxymethyl- and O6-methyl-2'-deoxyguanosine DNA adducts: relevance for gastrointestinal cancer. *Carcinogenesis*, **28**, 356-62.
- [52] GOUPY P, VULCAIN E, CARIS-VEYRAT C, DANGLES O (2007). Dietary antioxidants as inhibitors of the heme-induced peroxidation of linoleic acid: mechanism of action and synergism. *Free Radic Biol Med*, **43**, 933-46.
- [53] GUO JJ, HSIEH HY, HU CH (2009). Chain-breaking activity of carotenes in lipid peroxidation: a theoretical study. *J Phys Chem B*, **113**, 15699-708.
- [54] HONG MY, SEERAM NP, HEBER D (2008). Pomegranate polyphenols down-regulate expression of androgen-synthesizing genes in human prostate cancer cells overexpressing the androgen receptor. *J Nutr Biochem*, **19**, 848-55.
- [55] HONICKEL KO. (2008). The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. *Meat Sci.*, 78:68.
- [56] 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.
- [57] KLEIN D (1977). Evaluation de l'apport alimentaire de nitrosamines et du risque de synthèse chez l'Homme. *Thèse Doctorat : UER Nancy, Alimentation et Nutrition*.
- [58] KUHNLE GG, STORY GW, REDA T, MANI AR, MOORE KP, LUNN JC, BINGHAM SA (2007). Diet-induced endogenous formation of nitroso compounds in the GI tract. *Free Radic Biol Med*, **43**, 1040-7.
- [59] LARSSON SC, WOLK A (2006). Meat consumption and risk of colorectal cancer: a meta-analysis of prospective studies. *Int J Cancer*, **119**, 2657-64.
- [60] 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**, 1859-65.
- [61] LEYRAL G. VE (2006). Chapitre 6 : risque mutagène et cancérigène. *Microbiologie et toxicologie des aliments: Hygiène et sécurité alimentaires*, 264-265.
- [62] LORRAIN B, DANGLES O, GENOT C, DUFOUR C (2010). Chemical modeling of heme-induced lipid oxidation in gastric conditions and inhibition by dietary polyphenols. *J Agric Food Chem*, **58**, 676-83.
- [63] MASSION P. PJ-C, BALLIGAND JL. (2002). Les espèces réactives de l'azote : bénéfiques ou délétères? *Nutr Clin Metab.*, 16:248-52.
- [64] MCLELLAN EA, BIRD RP (1988). Aberrant crypts: potential preneoplastic lesions in the murine colon. *Cancer Res*, **48**: 6187-6192.
- [65] MEKHJIAN HS, PHILLIPS SF, HOFMANN AF (1979). Colonic absorption of unconjugated bile acids: perfusion studies in man. *Dig Dis Sci*, **24**, 545-50.
- [66] MIRVISH SS (1986). Effects of vitamins C and E on N-nitroso compound formation, carcinogenesis, and cancer. *Cancer*, **58**, 1842-50.
- [67] MIRVISH SS, HAORAH J, ZHOU L, CLAPPER ML, HARRISON KL, POVEY AC (2002). Total N-nitroso compounds and their precursors in hot dogs and in the gastrointestinal tract and feces of rats and mice: possible etiologic agents for colon cancer. *Journal of Nutrition*, **132**, 3526S-3529S.
- [68] 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**, 595-603.
- [69] MOSER AR, PITOT HC, DOVE WF (1990). A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. *Science*, **247**, 322-324.
- [70] N IJ, RIJNIESE A, DE WIT N, JONKER-TERMONT D, DEKKER J, MULLER M, VAN DER MEER R Dietary haem stimulates epithelial cell turnover by downregulating feedback inhibitors of proliferation in murine colon. *Gut*, **61**, 1041-9.

REFERENCES

- [71] NATHKE IS (2004). The adenomatous polyposis coli protein: the Achilles heel of the gut epithelium. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **20**, 337-66.
- [72] NELSON RL (2001). Iron and colorectal cancer risk: human studies. *Nutrition Reviews*, **59**, 140-148.
- [73] NORAT T, LUKANOVA A, FERRARI P, RIBOLI E (2002). Meat consumption and colorectal cancer risk: dose-response meta-analysis of epidemiological studies. *International Journal of Cancer*, **98**, 241-256.
- [74] OATES PS, WEST AR (2006). Heme in intestinal epithelial cell turnover, differentiation, detoxification, inflammation, carcinogenesis, absorption and motility. *World J Gastroenterol*, **12**, 4281-95.
- [75] PEGG RB, SHAHIDI F (2000). Nitrite curing of meat: the N-nitrosamine problem and nitrite alternatives. The color of meat. *Food & Nutrition Press Inc., Trumbull, Connecticut 06611 USA*, 23-66.
- [76] PHILLIPS DH (1999). Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. *Mutat Res*, **443**, 139-47.
- [77] 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. *Journal of Nutrition*, **134**, 2711-2716.
- [78] 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**, 1000-6.
- [79] 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 haem-fed rats. *Carcinogenesis*, **28**, 321-7.
- [80] PIERRE F, TACHE S, PETIT C, VAN DER MEER R, CORPET DE (2003). AACR - Meat and Cancer: Hemoglobin and Hemin Enhance Colorectal Carcinogenesis at the Aberrant Crypt Stage in Rats. *Proc. AACR*, **44**, #4792.
- [81] PIERRE F, TACHE S, PETIT CR, VAN DER MEER R, CORPET DE (2003). Meat and cancer: haemoglobin and haemin in a low-calcium diet promote colorectal carcinogenesis at the aberrant crypt stage in rats. *Carcinogenesis*, **24**, 1683-90.
- [82] PIETTA PG (2000). Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod*, **63**, 1035-42.
- [83] POTTER JD, SLATTERY ML, BOSTICK RM, GAPSTUR SM (1993). Colon cancer - a review of the epidemiology. *Epidemiologic Reviews*, **15**, 499-545.
- [84] SANTARELLI RL, VENDEUVRE JL, NAUD N, TACHE S, GUERAUD F, VIAU M, GENOT C, CORPET DE, PIERRE FH (2010). Meat processing and colon carcinogenesis: cooked, nitrite-treated, and oxidized high-heme cured meat promotes mucin-depleted foci in rats. *Cancer Prev Res (Phila)*, **3**, 852-64.
- [85] SCHWARTZ S, ELLEFSON M (1985). Quantitative fecal recovery of ingested hemoglobin-heme in blood: comparisons by HemoQuant assay with ingested meat and fish. *Gastroenterology*, **89**, 19-26.
- [86] SCISLOWSKI V, GANDEMER G, KONDOYAN A (2011). Changes in heme iron content in beef meat during wet heating. Consequences for human nutrition. *International Congress of Meat Science and Technology, 57th ICoMST, 7-12 august 2011, Ghent, Belgium*.
- [87] SESINK ALA, TERMONT DSML, KLEIBEUKER JH, VANDERMEER R (1999). Red meat and colon cancer: the cytotoxic and hyperproliferative effects of dietary heme. *Cancer Research*, **59**, 5704-5709.
- [88] SESINK ALA, TERMONT DSML, KLEIBEUKER JH, VANDERMEER R (2000). Red meat and colon cancer: dietary haem, but not fat, has cytotoxic and hyperproliferative effects on rat colonic epithelium. *Carcinogenesis*, **21**, 1909-1915.
- [89] 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**, 1653-1659.
- [90] SHAMSUDDIN AK, ELSAYED AM (1986). Ultrastructural features of normal mouse colon epithelium. Unique characteristics of a species. *J Submicrosc Cytol*, **18**, 761-71.
- [91] SHAMSUDDIN AKM (1986). Carcinoma of the large intestine : animal models and human disease. *Human Pathology*, **17**, 451-453.
- [92] 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**, 668-70.
- [93] SUGIMURA T, WAKABAYASHI K, NAKAGAMA H, NAGAO M (2004). Heterocyclic amines: Mutagens/carcinogens produced during cooking of meat and fish. *Cancer Sci*, **95**, 290-9.
- [94] TSAO R (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, **2**, 1231-46.

REFERENCES

- [95] VAN DER VEERE CN, SCHOEMAKER B, VAN DER MEER R, GROEN AK, JANSEN PL, OUDE ELFERINK RP (1995). Rapid association of unconjugated bilirubin with amorphous calcium phosphate. *J Lipid Res*, **36**, 1697-707.
- [96] VERHAEGHE E (2002). Carraghenanes et Cancer du Colon : etude expérimentale chez des rats à flore humaine, Mécanismes d'action.
. *Thèse Vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse*.
- [97] VISEK WJ, CLINTON SK (1991). Dietary Protein and Cancer. *Cancer and Nutrition*, **7**, 103-124.
- [98] VISIOLI F, DAVALOS A (2011). Polyphenols and cardiovascular disease: a critical summary of the evidence. *Mini Rev Med Chem*, **11**, 1186-90.
- [99] VULCAIN E, GOUPY P, CARIS-VEYRAT C, DANGLES O (2005). Inhibition of the metmyoglobin-induced peroxidation of linoleic acid by dietary antioxidants: Action in the aqueous vs. lipid phase. *Free Radic Res*, **39**, 547-63.
- [100] WAGENER FA, VOLK HD, WILLIS D, ABRAHAM NG, SOARES MP, ADEMA GJ, FIGDOR CG (2003). Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation. *Pharmacol Rev*, **55**, 551-71.
- [101] WCRF WCRF (1997). Food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective. *WCRF and American Institute for Cancer Research, Washington DC*, 1-670.
- [102] WCRF WCRF (2007). Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. *WCRF and American Institute for Cancer Research, Washington DC*, 1-537.
- [103] WCRF WCRF, NORAT T, CHAN DS, LAU R, AUNE D, VIEIRA R, GREENWOOD DC, TOUVIER M, CORPET DE (2010). WCRF/AICR Systematic Literature Review. Continuous Update Project Report. The Associations between Food, Nutrition and Physical Activity and the Risk of Colorectal Cancer. *WCRF and AICR, Washington DC*, 1-855.
- [104] WILLETT WC (1995). Polyunsaturated fat and the risk of cancer. *British Medical Journal*, **311**, 1239-1240.
- [105] WORLD CANCER RESEARCH FUND W, AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH A (2007). Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. *WCRF and AICR, Washington DC*, 1-537.
- [106] ZHANG X, GIOVANNUCCI EL, SMITH-WARNER SA, WU K, FUCHS CS, POLLAK M, WILLETT WC, MA J A prospective study of intakes of zinc and heme iron and colorectal cancer risk in men and women. *Cancer Causes Control*, **22**, 1627-37.
- [107] ZHENG W, LEE SA (2009). Well-done meat intake, heterocyclic amine exposure, and cancer risk. *Nutr Cancer*, **61**, 437-46.

Table des Illustrations

Table des Figures

| | |
|---|----|
| <u>Figure 1</u> : Organisation du côlon [1]..... | 12 |
| <u>Figure 2</u> : Coupe histologique du côlon..... | 13 |
| <u>Figure 3</u> : La structure du côlon..... | 13 |
| <u>Figure 4</u> : Cycle de renouvellement cellulaire (Source : http://www.e-cancer.fr/cancerinfo/les-cancers/ (INCA))..... | 14 |
| <u>Figure 5</u> : Modèle du développement de lésions cancéreuses du côlon [24]..... | 16 |
| <u>Figure 6</u> : Coupe histologique d'un polype colorectal..... | 17 |
| <u>Figure 7</u> : Chirurgie mini-invasive d'un polype par colonoscopie..... | 17 |
| <u>Figure 8</u> : Incidence du cancer colorectal à travers le monde..... | 22 |
| <u>Figure 9</u> : Structure de l'hème <i>b</i> | 32 |
| <u>Figure 10</u> : Transformation de l'hème en hème nitrosylé..... | 35 |
| <u>Figure 11</u> : Les différentes voies potentiellement actrices dans le développement du cancer colorectal, dans lesquelles l'hème est impliqué après son ingestion, D'après [29, 49, 56, 100] | 36 |
| <u>Figure 12</u> : Effet protecteur du calcium sur la concentration en hème des eaux fécales..... | 38 |
| <u>Figure 13</u> : Effet protecteur du calcium sur le cancer colorectal..... | 38 |
| <u>Figure 14</u> : Structure de la Vitamine E..... | 41 |
| <u>Figure 15</u> : Réaction chimique entre la vitamine E (tocophérol) et un radical libre..... | 41 |
| <u>Figure 16</u> : les étapes de la cancérogénèse colorectale observée chez les rats F344 induits à l'AOM/DMH [44]..... | 45 |
| <u>Figure 17</u> : Deux foyers de cryptes aberrantes : coloré au bleu de méthylène à gauche et au HIDAB à droite..... | 47 |
| <u>Figure 18</u> : Structure histologique du foyer de cryptes aberrantes précédant coloré au HIDAB..... | 48 |
| <u>Figure 19</u> : Formation d'un adénocarcinome..... | 48 |
| <u>Figure 20</u> : Deux foyers déplétés en mucine : coloré au bleu de méthylène à gauche et au HIDAB à droite..... | 49 |
| <u>Figure 21</u> : Structure histologique du foyer déplété en mucine précédant coloré au HIDAB..... | 50 |
| <u>Figure 22</u> : Projet SécuriViande, diagramme présentant les différentes tâches du projet..... | 53 |
| <u>Figure 23</u> : Hydroxytyrosol (olive)..... | 53 |
| <u>Figure 24</u> : Resveratrol (raisin)..... | 53 |
| <u>Figure 25</u> : Acide ellagique (grenade)..... | 54 |
| <u>Figure 26</u> : Alpha-tocophérol (= vitamine E)..... | 54 |
| <u>Figure 27</u> : Protocole de préparation des eaux fécales..... | 62 |
| <u>Figure 28</u> : Mécanismes expliquant l'effet des viandes et charcuteries sur la cancérogénèse colorectale, et les moyens de le prévenir par l'alimentation [31]..... | 84 |

Table des Tableaux

| | |
|--|----|
| <u>Tableau 1</u> : Facteurs influençant le risque de cancer colorectal « Convincing and probable conclusions from the Continuous Update Project report on Colorectal cancer » d'après le rapport du WCRF 2010..... | 24 |
| <u>Tableau 2</u> : Composés N-nitrosés dans les aliments [61]..... | 29 |
| <u>Tableau 3</u> : Formulation de la base AIN-76..... | 56 |
| <u>Tableau 4</u> : Régimes expérimentaux distribués aux rats durant 100 jours..... | 57 |
| <u>Tableau 5</u> : Régimes expérimentaux distribués aux souris durant 49 jours..... | 58 |

Table des Graphes

| | |
|---|----|
| <u>Graphe 1</u> : Concentration en hème dans les eaux fécales des rats après consommation de viandes bovines (écart-types en mode SEM)..... | 64 |
| <u>Graphe 2</u> : Concentration en hème dans les eaux fécales des souris après consommation de viandes bovines modèles (écart-types en mode SEM)..... | 66 |
| <u>Graphe 3</u> : Nombre des ACF présents sur la muqueuse colique des rats après sacrifice..... | 69 |
| <u>Graphe 4</u> : Nombre (A) et taille (B) des MDF présents sur la muqueuse colique des rats après sacrifice..... | 71 |
| <u>Graphe 5</u> : Nombre (A) et surface (B) des tumeurs intestinales dénombrées sur la muqueuse intestinale des souris après sacrifice..... | 72 |
| <u>Graphe 6</u> : Nombre (A) et surface (B) des tumeurs intestinales dénombrées sur la muqueuse colique des souris après sacrifice..... | 74 |

ANNEXES

ANNEXES

ANNEXE 1 : Aliments riches en vitamine E ou alpha-tocophérol

| Aliment | Teneur en mg pour 100g | Aliment | Teneur en mg pour 100g |
|--|------------------------|--|------------------------|
| Huile de germe de blé | 133,0 | Huile d'olive | 5,1 |
| Huile de palme rouge ^[9] (non raffinée et bio) | 105,0 | | |
| Huile d'argousier ^[10] (argousier bio) | 100 | | |
| Huile d' argan | 90,0 | Mûre | 3,5 |
| Huile de tournesol | 48,7 | Crème fraîche | 3,5 |
| Pollen frais de ciste | 27,8 | Avocat | 3,2 |
| Germe de blé | 27,0 | Asperge | 2,5 |
| Huile de palme (raffinée) | 25,6 | Épinard | 2,0 |
| Margarine | 25,0 | Persil | 1,8 |
| Noisette et amandes sèches | 20,0 | Beurre | 1,5 |
| Huile de colza | 18,4 | Cervelle | 1,2 |
| Germe de maïs et d' orge | 15,0 | Œuf et fromage | 1,0 |
| Huile d' arachide | 13,0 | Tomate et chou | 1,0 |
| Soja | 11,0 | Cassis | 1,0 |
| Soja sec | 8,5 | Farine de blé complète | 1,0 |
| Arachide fraîche | 8,1 | | |
| Thon | 6,3 | | |

Tableau 6 : Teneur en vitamine E de certains aliments de la vie quotidienne (en mg pour 100g)

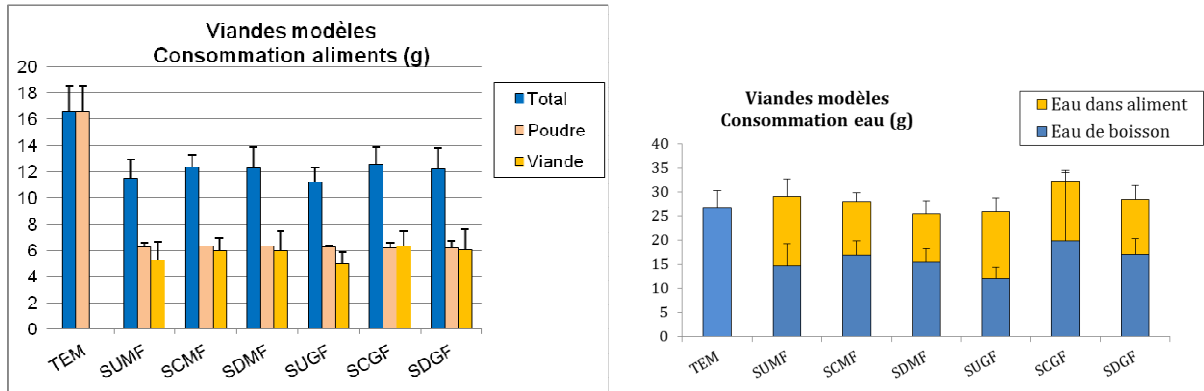
ANNEXE 2 : Plaque de Fluorimétrie à 96 puits

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|-------|-------|-------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| A | 0 a | 35 a | 4,4 a | 70 a | Ech 2 a | Ech 4 a | Ech 6 a | Ech 8 a | Ech 2 a | Ech 4 a | Ech 6 a | Ech 8 a |
| B | 0 b | 35 b | 4,4 b | 70 b | Ech 2 a | Ech 4 a | Ech 6 a | Ech 8 a | Ech 2 a | Ech 4 a | Ech 6 a | Ech 8 a |
| C | 4,4 a | 70 a | 8,8 a | 140 a | Ech 2 b | Ech 4 b | Ech 6 b | Ech 8 b | Ech 2 b | Ech 4 b | Ech 6 b | Ech 8 b |
| D | 4,4 b | 70 b | 8,8 b | 140 b | Ech 2 b | Ech 4 b | Ech 6 b | Ech 8 b | Ech 2 b | Ech 4 b | Ech 6 b | Ech 8 b |
| E | 8,8 a | 140 a | 18 a | Ech 1 a | Ech 3 a | Ech 5 a | Ech 7 a | Ech 1 a | Ech 3 a | Ech 5 a | Ech 7 a | 0 a |
| F | 8,8 b | 140 b | 18 b | Ech 1 a | Ech 3 a | Ech 5 a | Ech 7 a | Ech 1 a | Ech 3 a | Ech 5 a | Ech 7 a | 0 b |
| G | 18 a | 0 a | 35 a | Ech 1 b | Ech 3 b | Ech 5 b | Ech 7 b | Ech 1 b | Ech 3 b | Ech 5 b | Ech 7 b | 0 a |
| H | 18 b | 0 b | 35 b | Ech 1 b | Ech 3 b | Ech 5 b | Ech 7 b | Ech 1 b | Ech 3 b | Ech 5 b | Ech 7 b | 0 b |

| |
|--------------------|
| Gamme essai |
| Gamme blanc |
| Echantillons essai |
| Echantillons blanc |

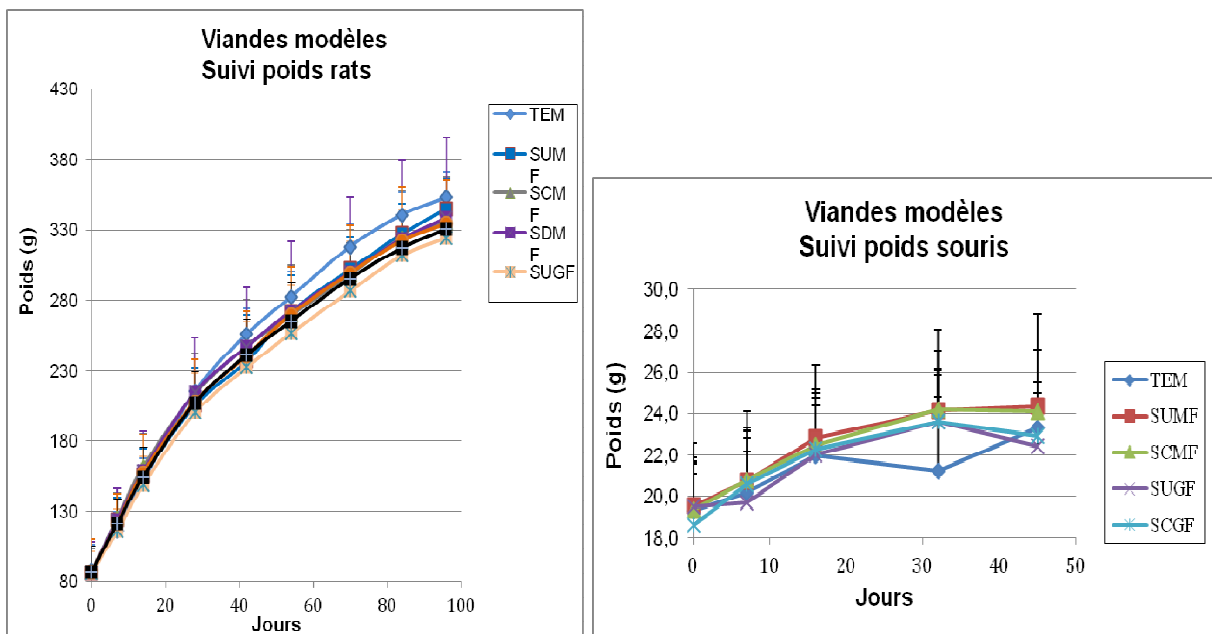
Figure 29 : Plaque de fluorimétrie de 96 puits présentant l'organisation de chaque échantillon

ANNEXE 3 : Consommation en aliments et en eau chez les rats soumis aux viandes bovines



Graph 7 : Consommation journalière en aliment et en eau des rats

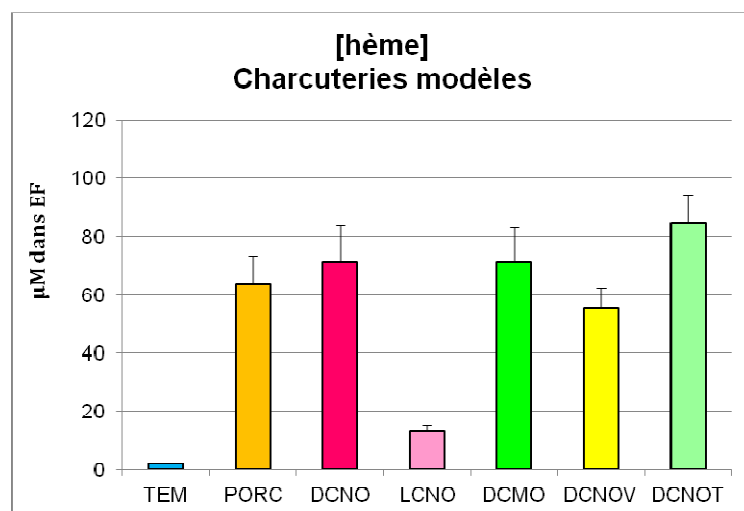
ANNEXE 4 : Suivi du poids des rats et des souris



Graph 8 : Evolution du poids des rats en fonction du temps

Graph 9 : Evolution du poids des souris en fonction du temps

ANNEXE 5 : Dosage de l'hème dans les eaux fécales des rats ayant consommé des charcuteries



Graph 10 : Concentration en hème dans les eaux fécales des rats après consommation de charcuteries modèles (écart-types en mode SEM)

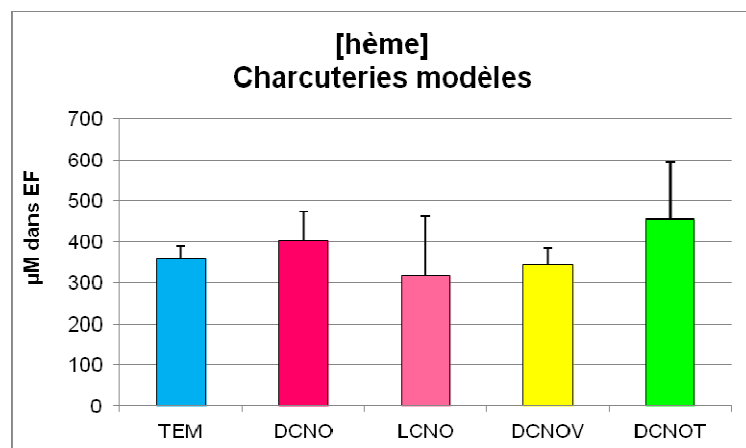
été modifié (diminution de la teneur en nitrites, ajout de t...
présentent pas moins d'hème dans leurs eaux fécales que les rats ayant consommé une charcuterie non modifiée.

Les rats ayant consommé une charcuterie pauvre en hème présentent des eaux fécales dont la teneur en hème est significativement plus faible que les rats ayant consommé une charcuterie riche en hème ($p < 0.0001$) ou une viande de porc non transformée ($p = 0.01$). On note donc un effet groupe. Les rats ayant consommé une charcuterie dont le procédé de fabrication a les rats ayant consommé une

Il semble qu'à travers cette étude, on puisse dire que :

- La consommation d'une charcuterie riche en hème conduit à une teneur en hème des eaux fécales plus importante que la consommation d'une charcuterie pauvre en hème.
- La modification des procédés de transformation n'a pas d'influence sur la teneur en hème des eaux fécales.

ANNEXE 6 : Dosage de l'hème dans les eaux fécales des souris ayant consommé des charcuteries



Graphe 11 : Concentration en hème dans les eaux fécales après consommation de charcuteries modèles chez les souris (écart-types en mode SEM)

Un fort taux d'hème dans les eaux fécales est observable pour le groupe n'ayant pas consommé de charcuterie. Les eaux fécales des rats ayant consommé le même régime sans viande n'ont pas d'hème.

Il n'existe aucune différence significative entre les différents groupes.

La biodisponibilité de l'hème chez les souris Min est difficilement exploitable car les témoins sans charcuteries présentent des eaux fécales très riches en hème bien que n'en ayant pas consommé dans leur régime.

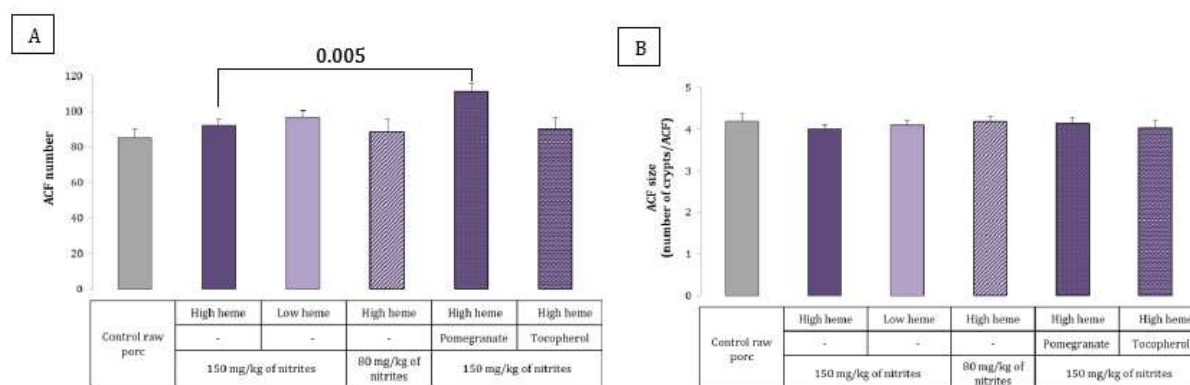
ANNEXE 7 : Lésions préneoplasiques coliques dénombrées chez les rats suite à la consommation de charcuteries

Nombre et taille des ACF (Aberrant Crypt Foci)

Les rats ayant consommé des charcuteries, quelle que soit la teneur en hème, ne présentent pas plus d'ACF que les rats ayant consommé la viande de porc non transformée. Les rats ayant consommé une charcuterie enrichie en grenade ont un nombre d'ACF répartis dans leur muqueuse colique significativement plus important que les rats ayant consommé une charcuterie non enrichie ($p = 0.005$).

Il n'existe aucune différence significative concernant la taille des ACF.

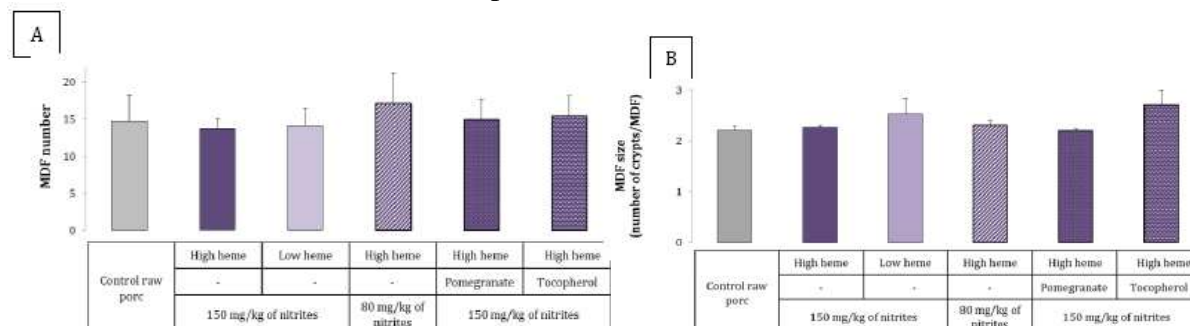
ANNEXES



Graph 12 : Nombre (A) et taille (B) des ACF dénombrés sur la muqueuse colique des rats après sacrifice

Le nombre d'ACF n'est significativement pas plus important chez les individus ayant consommé des charcuteries. L'effet promoteur des charcuteries ne peut donc être confirmé. Une charcuterie riche en grenade aurait un effet promoteur sur le développement d'ACF.

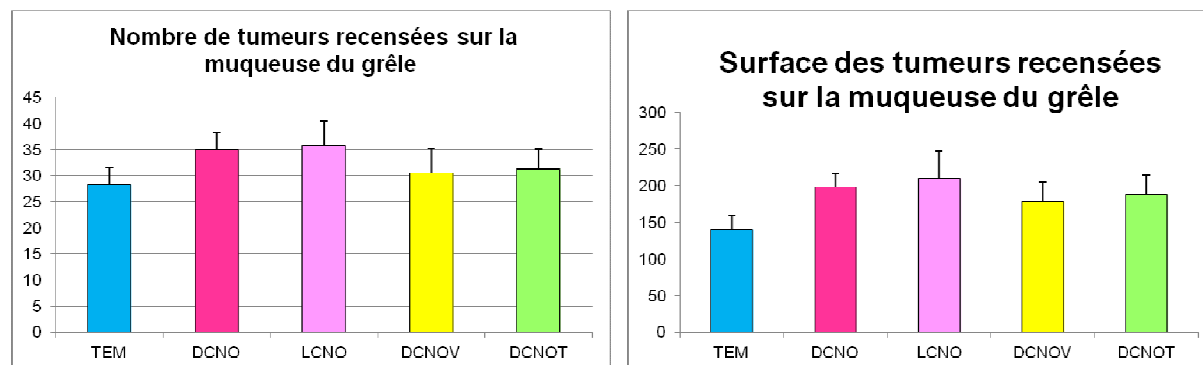
Nombre et taille des MDF (Mucin Depleted Foci)



Graph 13 : Nombre (A) et taille (B) des MDF dénombrés sur la muqueuse colique des rats après sacrifice. Les rats ayant consommé des charcuteries n'ont significativement pas plus de MDF que les rats ayant consommé la viande de porc crue non transformée. Les rats ayant consommé les charcuteries faibles en nitrites ou enrichies en grenade ou tocophérol ne présentent significativement pas moins de MDF que les rats ayant consommé des charcuteries riches en hème non enrichies. La taille des MDF n'est significativement pas différente entre les groupes.

La consommation de charcuteries n'a pas d'effet promoteur sur l'apparition des MDF. La modification des procédés de transformation (faible quantité de nitrites, ajout de grenade ou de tocophérol) ne conduit pas à un plus faible développement de lésions précancéreuses.

ANNEXE 8 : Tumeurs intestinales dénombrées chez les souris suite à la consommation de charcuteries

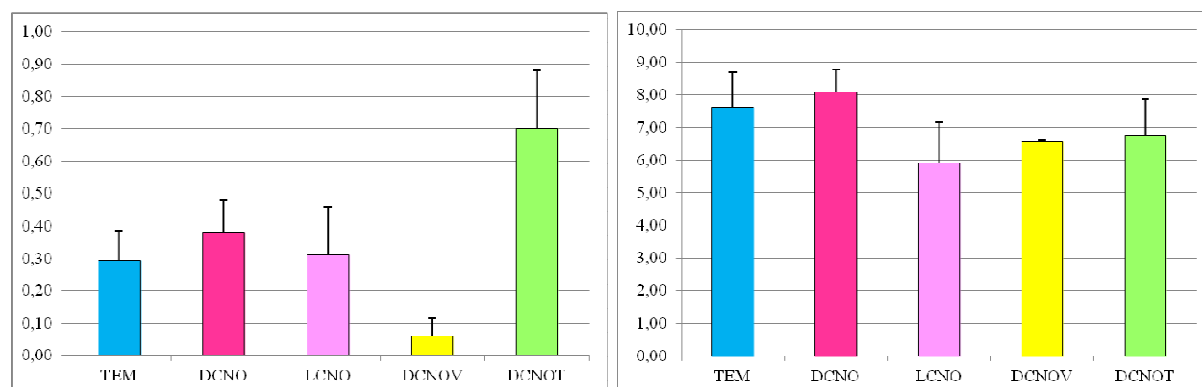


Graph 14 : Nombre et surface des tumeurs intestinales dénombrées sur la muqueuse intestinale des souris après sacrifice

Il n'y a aucune différence significative sur le nombre de tumeurs intestinales entre les groupes soumis aux charcuteries et les groupes soumis à un régime sans charcuterie. Par contre, les souris ayant consommé des charcuteries développent des lésions tumorales de plus grande taille que les souris n'ayant pas consommé de charcuterie (lésions moyennes $p = 0.025$ et grosses lésions $p = 0.007$). Lorsqu'on compare les groupes entre eux et, plus particulièrement, les groupes témoin et les groupes ayant consommé des charcuteries sans ajout de composés à effet antioxydant, on note que les souris ayant consommé une charcuterie riche en hème développent plus de lésions tumorales intestinales ($p = 0.027$) et de plus grande taille ($p = 0.003$) que les souris soumises au régime témoin. De même, les souris ayant consommé une charcuterie issue d'un muscle peu riche en hème développe plus de lésions tumorales intestinales ($p = 0.010$) et de plus grande taille ($p = 0.008$) que les souris soumises au régime témoin.

La consommation de charcuteries a un effet promoteur sur le nombre et la taille des lésions tumorales intestinales.

ANNEXE 9 : Tumeurs coliques dénombrées chez les souris suite à la consommation de charcuteries



Graph 15 : Nombre (A) et surface (B) des tumeurs dénombrées sur la muqueuse colique des souris après sacrifice

Statistiquement, on observe une différence significative entre les souris ayant consommé une charcuterie riche en hème et la même charcuterie additionnée de grenade. Les secondes présentent moins de lésions tumorales coliques que les premières ($p = 0.04$). De plus, il est à noter que le groupe ayant consommé une charcuterie riche en grenade est le seul groupe où il n'y a eu aucun mort. Concernant la taille des lésions tumorales, la comparaison entre les groupes ne montre aucune différence significative.

La modification des procédés de fabrication telle que l'ajout de grenade à la charcuterie a un effet protecteur sur le développement de lésions tumorales au niveau de la muqueuse colique.

Toulouse, 2013

NOM : MALRIC

PRENOM : AURELINE

TITRE : Viandes et cancérogenèse colorectale chez le Rat chimio-induit et la Souris Min : effet de l'hème.

RESUME : Nous avons étudié l'effet co-cancérogène d'un régime à base de viande bovine, riche en hème, sur la muqueuse du côlon de rats chimio-induits par l'azoxyméthane et de souris Min/*apc*. Pour cela, nous avons dosé la concentration en hème des eaux fécales et nous avons déterminé au microscope le nombre et la taille des foyers de cryptes aberrantes (ACF) et des cryptes pauvres en mucine (MDF) sur les muqueuses coliques des rats ainsi que les tumeurs intestinales des souris. Nous avons cherché la corrélation entre l'hème fécal et la cancérogenèse. Enfin, nous avons testé l'effet d'additifs antioxydants et de la cuisson de viandes sur la cancérogenèse.

La consommation de viande rouge a été promotrice de la croissance des MDF ($p=0.028$) et a augmenté la surface tumorale ($p=0.002$), avec un effet non significatif sur le nombre de tumeurs ($p=0.059$) dans l'intestin des souris. Les régimes riches en viande ont augmenté l'hème fécal des rongeurs (rats : $p < 0.0001$; souris : $p=0.015$). Enfin, les rats ayant reçu de la viande marinée ou des viandes bien cuites avaient moins de MDF que les témoins appariés ($p < 0.01$). Inversement chez les souris nous avons observé un effet promoteur de la cuisson ($p < 0.0001$) mais pas d'effet protecteur de la marinade.

Cette étude montre l'effet promoteur de la viande bovine sur le développement de lésions précancéreuses. Cette promotion est corrélée avec la concentration en hème fécal. L'ajout d'antioxydants ou une cuisson adéquate sont protecteurs chez les rats seulement et représentent donc d'éventuelles stratégies de prévention à valider chez l'Homme.

MOTS-CLES : Hème, Viande, Cancérogenèse, Côlon, Lésions précancéreuses, ACF, MDF, Rats, Souris MIN.

ENGLISH TITLE : Meat and colorectal carcinogenesis in chemo-induced rats and Min mice: heme effect.

ABSTRACT : We studied the putative carcinogenic effect of beef meat diet, a heme-enhanced diet, in azoxymethane-chemoinduced rats and in Min/*apc* mice. We measured heme concentration in fecal water and we scored, using a microscope, the colonic aberrant crypt foci (ACF) and the mucin depleted foci (MDF) in rats' colon and tumors on mice intestine. Then, we tried to determine a relation between fecal heme and carcinogenesis. Finally, we tested some preventive strategies such as the addition of antioxidant agents or different cooking.

Meat-based diets promoted the growth MDF in the colon in rats ($p=0.028$) but the effect in Min mice did not reach significance ($p=0.059$). Meat-based diets increased fecal heme in rodents (rats: $p < 0.0001$; mice: $p=0.015$). Marinated meat reduced carcinogenesis promotion in rats ($p < 0.01$), as did well done meat cooking. In contrast, cooked meat was more promoting in Min mice than raw meat ($p < 0.0001$), and marinade did not reduce the effect of meat.

These results confirm meat-based diets promote the growth of tumor lesions depending on fecal heme level and point out antioxidant agents or well-done meat can be protective in rats. These results might be used to design prevention strategies that should be validated in a volunteer trial.

KEY WORDS : Heme, Beef meat, Carcinogenesis, Colon, Precancer lesions, ACF, MDF, Rats, Min mice.