



HAL
open science

Viandes rouges, charcuteries et cancer du côlon: Rôle central du couple fer héminique/ peroxydation lipidique. Vers une prévention par le calcium et les probiotiques des produits laitiers?

Fabrice H.F. Pierre, Gwénaél Jan

► **To cite this version:**

Fabrice H.F. Pierre, Gwénaél Jan. Viandes rouges, charcuteries et cancer du côlon: Rôle central du couple fer héminique/ peroxydation lipidique. Vers une prévention par le calcium et les probiotiques des produits laitiers?. invitation CNIEL, Feb 2019, Paris, France. hal-02051586

HAL Id: hal-02051586

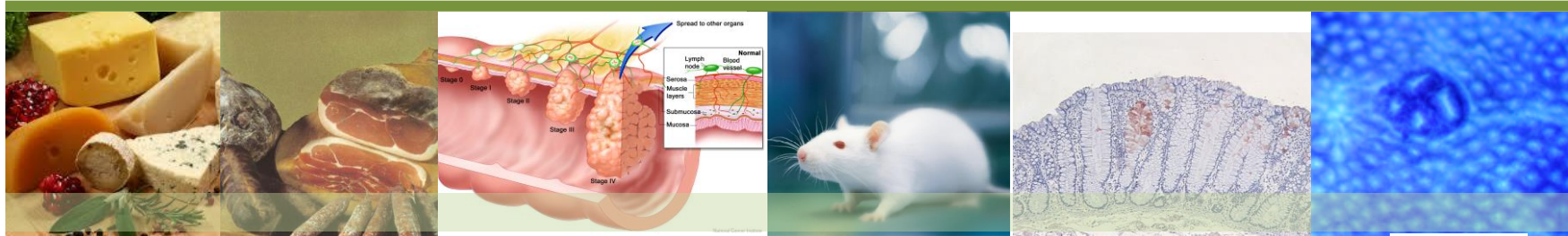
<https://hal.science/hal-02051586v1>

Submitted on 5 Jun 2020

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

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

Viandes rouges, charcuteries et cancer du côlon : rôle central du couple fer héminique/peroxydation lipidique. Vers une prévention par le calcium et les probiotiques des produits laitiers?



Dr. Fabrice PIERRE

UMR 1331 ToxAlim - Centre INRA de Toulouse

Equipe Prévention et Promotion de la Carcinogénèse par les Aliments

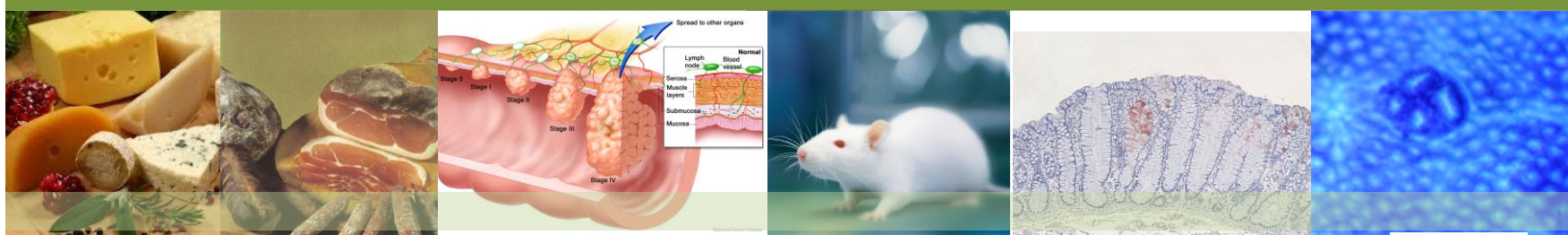
Dr. Gwénaél JAN

UMR 1253 STLO - Centre INRA de Rennes

Equipe Microbiologie



L'UMR Toxalim en quelques mots



UMR 1331 INRA/INPT/ENVT/UPS

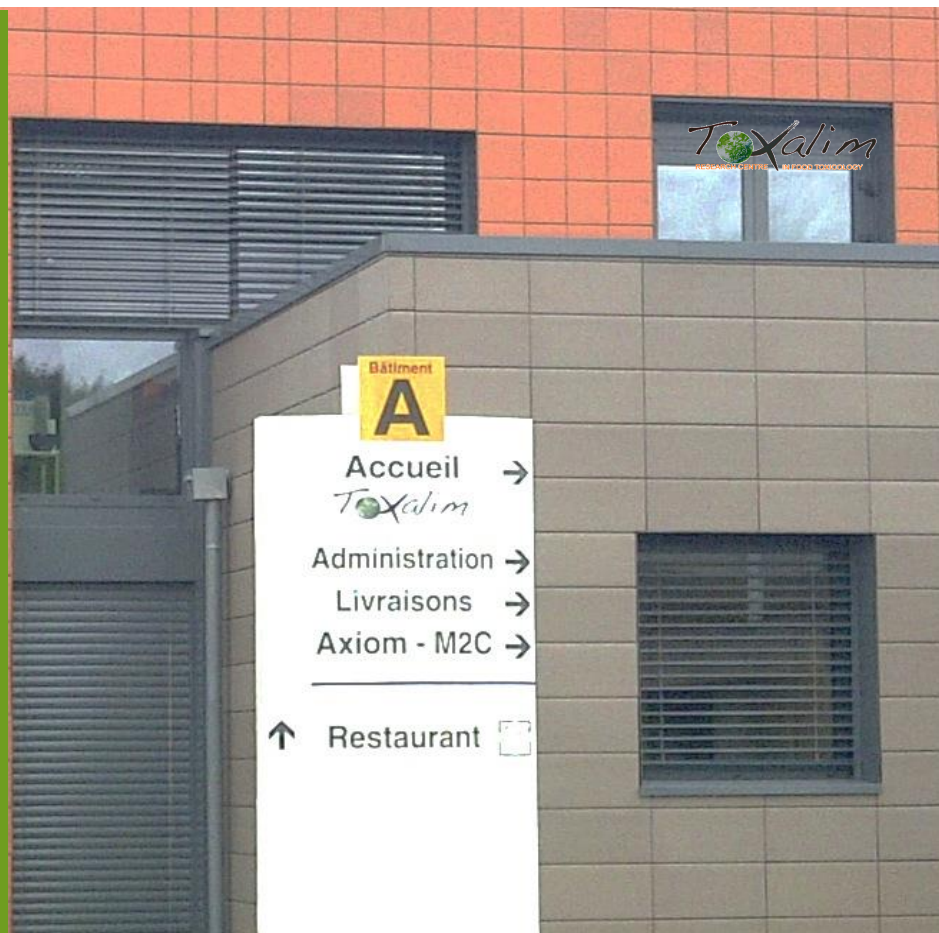
DU

I Oswald



DUA

V Theodorou



Directoire scientifique

H Guillou

F Pierre



10 équipes

Équipes de Recherche

- **TIM: Toxicologie Intégrative & Métabolisme**
Hervé GUILLOU
- **MeX: Métabolisme des Xénobiotiques**
Daniel ZALKO
- **GPE: Gestation & Perturbation Endocrinienne**
Nicole HAGEN-PICARD
- **NGN: Neuro-Gastroentérologie & Nutrition**
Vassilia THEODOROU
- **BioToMyc: Biosynthèse & Toxicité des Mycotoxines** - Isabelle OSWALD
- **GS: Génotoxicité & Signalisation**
Gladys MIREY
- **PPCA: Prévention Promotion de la Cancérogenèse par les Aliments** - Fabrice PIERRE
- **TCMX: Toxicologie Cellulaire & Moléculaire des Xénobiotiques** - Roger RAHMANI
- **ENTeRisk: Endocrinologie & Toxicologie de la barrière intestinale** - Eric HOUDEAU
- **COMICS: Contaminants & Stress Cellulaire**
Laurence HUC

2 plateformes et un plateau



Plateforme de Métabolomique et de Chimie Analytique en Toxicologie (Metatoul-AXIOM)



Plateforme de transcriptomique (GeT - TRiX)



Plateau Zootechnique

Etudier l'impact de l'alimentation, contaminants alimentaires, produits néoformés et additifs sur la santé humaine et animale:

Comprendre, prédire & prévenir

Moyens humains (2017)

102 permanents (52 chercheurs et Enseignants chercheurs)

10 équipes de recherche

1 équipe administrative, 2 plateformes et 1 plateau animalerie

37 doctorants, 7 post-doctorants

Un budget de \approx 11 M€

0,4 M€/an : dotation de base

3,8 M€/an : contrats

7,6 M€/an : salaires permanents et non permanents

Objectifs



Compétences

Comprendre l'exposition des individus et les effets des contaminants alimentaires
Définir/prédire les effets en fonction de la vulnérabilité des populations humaines et animales

Améliorer les systèmes expérimentaux d'analyse

Augmenter les capacités de modélisation pour développer des outils prédictifs

Prévenir les risques sur la base des mécanismes impliqués

Toxicologie
mécanistique

Toxicologie
prédictive

Prévention

Physiopathologie hépato-digestive et étude des modifications cellulaires et moléculaires impliquées dans le développement de maladies chroniques

Développement de modèles pertinents pour les études toxicologiques (animal, cellulaire, moléculaire)

Toxicologie, chimie analytique, omiques, bio-informatique, interface biologie-mathématiques

Carcinogenèse colorectale, aldehydomique, fonction de barrière intestinale, inflammation.

Générer des données fondamentales

Identifier les mécanismes

Proposer des mécanismes d'action (MoA)

Contribuer à la conception des politiques publiques

Equipe PPCA

3 DR
1 CR
1 McD-ENVT
1 IR
1 AI
1 TR
3 thèses en cours
2 CDD en cours (AI et TR)



Collaborations académiques:

INSERM, CEA, facultés ...

Collaborations internationales:

Belgique, Italie, Hollande, USA, Luxembourg, Allemagne

Financements:

H2020, JPI Intimic, ANR, ARC, Ligue, INCa

Partenariat:

IFIP, Fict, ADIV, BBC/Valorex

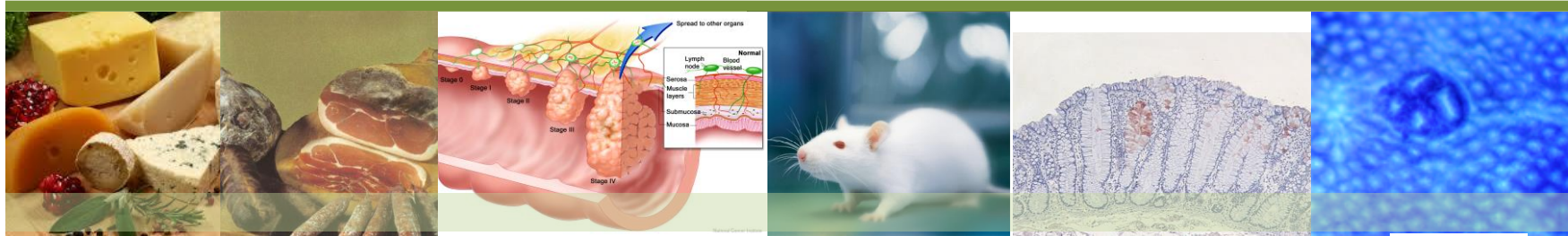
Interactions avec les agences:

ANSES, INCa, ITMO Cancer

-Etude de l'association positive entre produits carnés et risque de carcinogenèse colorectale: Identification des mécanismes d'action (peroxydation lipidique) et proposition de stratégies de prévention (régime du consommateur, reformulation des produits mis sur le marché, modification des conduites d'élevage).

-Approches multidisciplinaires: études in vitro (centrées sur Apc et nrf2), études in vivo (études nutritionnelles et de carcinogenèse), études chez des volontaires sains (CRNH), études épidémiologiques (E3N, Nutrinet santré, Suvimax)

L'UMR STLO en quelques mots



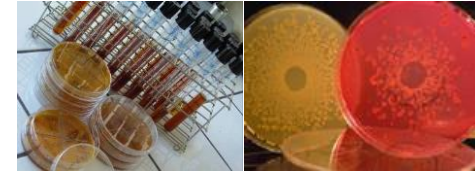


Une approche pluridisciplinaire et multi-échelle, renforcée par deux installations d'envergure :

La plateforme Lait



Un centre de ressources biologiques



- ❑ **Structuration et mécanismes de déstructuration des matrices alimentaires :**
de la caractérisation structurale à la digestion
- ❑ **Procédés de l'industrie laitière et fabrication fromagère :**
vers de systèmes durables
- ❑ **Interactions microbiennes :**
matrice alimentaire et cellules de l'hôte

Pour visiter notre site <http://www6.rennes.inra.fr/stlo>

2 outils technologiques majeurs: Plateforme lait & centre de ressource biologique



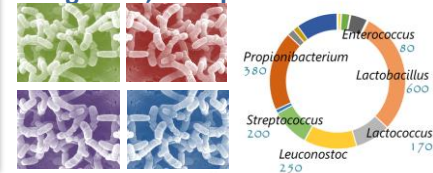
- **Pilote plant** dedicated to dairy technology
- 800 m², fully renewed in 2013 (700 k€)
- Equipements at a pre-industrial scale, which cover **80 % of the processes used in the dairy industry**
 - Continuum over the whole transformation chain for milk treatment
 - Continuum from research to pre-industrial validation
- A tool for students' training



Biological Resource Center for Food

Bacteria (CIRM-BIA)

4 000 strains, of which 2000 are referenced in an online catalogue (<http://collection-cirmbia.fr>)
23 genera, 113 species





Des partenaires industriels

38 contrats de recherche avec des partenaires

industriels

Dairy: BBA members + Ingredia, HCI, UP, Ermitage, Danone...

Equipment suppliers: GEA (Fr & Dk), Tetrapak (NL)

Non-dairy: ADRO Ouest members, DSM, Lesaffre, Vapran (blood), AdroOuest (Oeuf), Standa,

4 contrats avec des partenaires étrangers

Valio, Unilever, Mondelez, Arla Food

16 Contrats de thèse Cifre

Organisations interprofessionnelles

(CA, CS, instance progr.)



Fromageries Bel, Bongrain, CF&R, Entremont Alliance, Eurial, Coopérative d'Isigny-Ste-Mère, Lactalis, Laita, Laiterie de Montaigu, SILL, Maîtres Laitiers du Cotentin

Instituts techniques

Actalia

RMT Listral

RMT Fromages de terroir

Clusters (Pôles de compétitivité)

Commissions thématiques



Cinq équipes de recherche complémentaires



Microbiologie des filières lait et œuf

Nos travaux visent en particulier à :

Développer des aliments sains, sûrs, hédoniques et fonctionnels (bactéries lactiques et propioniques) issus de la fermentation du lait et d'autres matières premières (e.g. mixtes végétaux–lait)

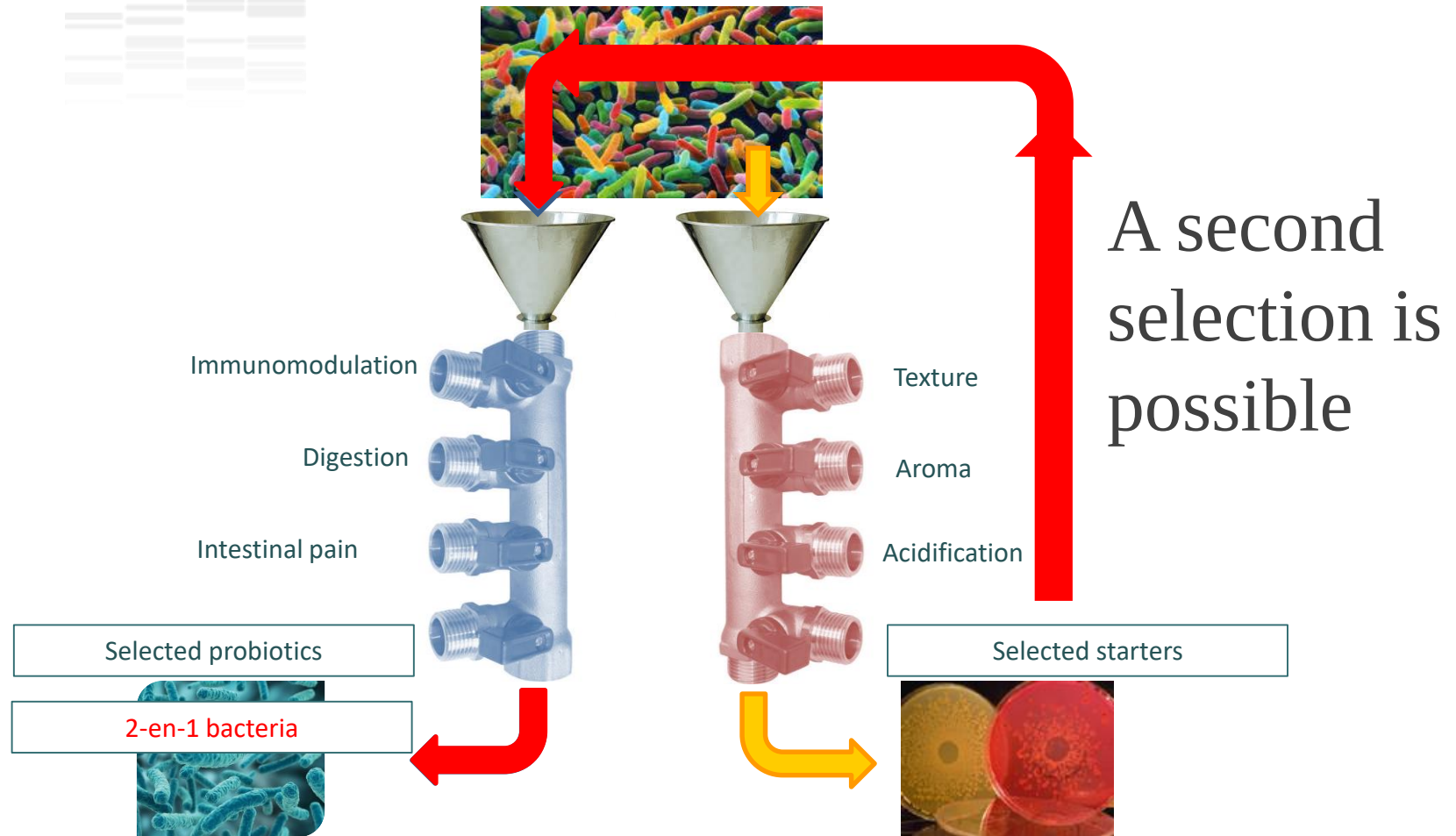
Développer des aliments à effet santé pour l'homme (probiotiques)

Réduire les risques sanitaires et l'altération des œufs et des ovoproduits (e.g.

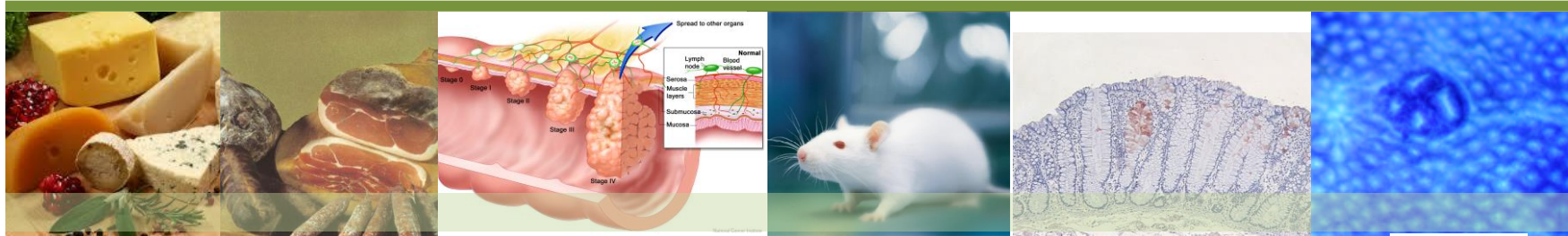
Salmonella enteritidis, *Bacillus cereus*)

Prévenir les mammites en proposant des alternatives aux traitements antibiotiques (e.g. *Staphylococcus aureus*, microbiote mammaire)

Un élément de stratégie : sélection de bactéries « 2-en-1 »



Viande rouge, calcium et cancer



The Lancet Oncology.

Published online October 26, 2015 [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00444-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00444-1)

Carcinogenicity of consumption of red and processed meat

« Overall, the Working Group classified consumption of processed meat as “carcinogenic to humans” (Group 1) on the basis of sufficient evidence for colorectal cancer. The Working Group classified consumption of red meat as “probably carcinogenic to humans” (Group 2A). »

- **Rien de nouveau:** Normal, ce n’est pas une nouvelle étude mais une analyse exhaustive de la littérature épidémiologique expérimentale et mécanistique. (cf WCRF 2010, INCA 2015)
- **Pas d’évaluation du Risque.** Pas objectif du GT
- Mais une **évaluation définitive du Danger.**

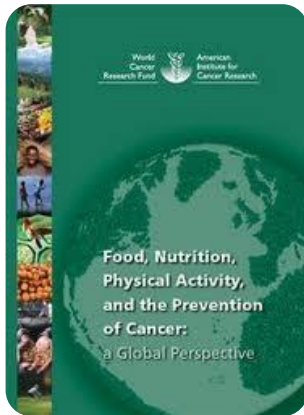
Analyse épidémiologique



Systematic Literature Review:

bilan exhaustif de la littérature épidémiologique

WCRF 1997, 2007, 2011, 2017



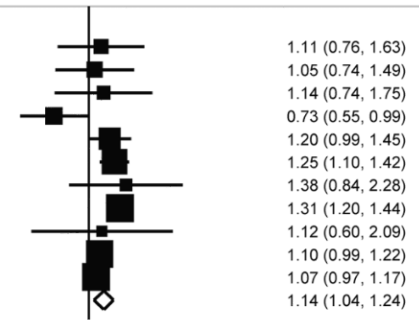
Analysing research on cancer prevention and survival

Imperial College London

Conclusions globale au travers l'utilisation de méta-analyse:

démarche statistique combinant les résultats d'une série d'études indépendantes

| Colorectal cancer | | | |
|---|------|--------|-------------------|
| Chen | 1998 | Male | 1.11 (0.76, 1.63) |
| Pietinen | 1999 | Male | 1.05 (0.74, 1.49) |
| Flood | 2003 | Female | 1.14 (0.74, 1.75) |
| Lin | 2004 | Female | 0.73 (0.55, 0.99) |
| Larsson | 2005 | Female | 1.20 (0.99, 1.45) |
| Norat | 2005 | Mixed | 1.25 (1.10, 1.42) |
| Berndt | 2006 | Mixed | 1.38 (0.84, 2.28) |
| Cross | 2007 | Mixed | 1.31 (1.20, 1.44) |
| Kabat | 2007 | Female | 1.12 (0.60, 2.09) |
| Fung | 2010 | Female | 1.10 (0.99, 1.22) |
| Fung | 2010 | Male | 1.07 (0.97, 1.17) |
| Subtotal (I-squared = 56.2%, p = 0.011) | | | |



Bilan des études épidémiologiques entre consommation de produits carnés et risque de carcinogénèse

-Pas de risque associé à la consommation de viandes blanches.

-La « viande rouge » inclut le boeuf, le porc, l'agneau et le chevreau ainsi que la viande contenue dans les plats préparés.

-La « charcuterie » comprend la viande traitée par fumage, séchage, salaison ou avec ajout d'agents chimiques de conservation ainsi que celle contenue dans les plats préparés.

4 niveaux de preuve

Convaincant

Probable

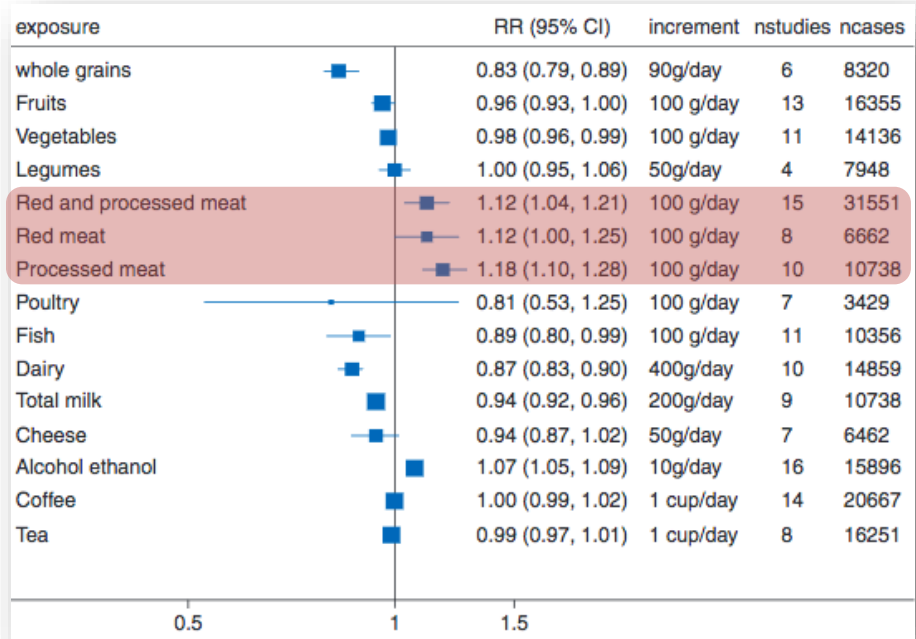
Suggéré

Non concluant

Consommation de viandes, charcuteries et risque de cancer colorectal



| 2017 | DIET, NUTRITION, PHYSICAL ACTIVITY AND COLORECTAL CANCER 2017 | |
|------------------|---|--|
| | DECREASES RISK | INCREASES RISK |
| STRONG EVIDENCE | Convincing Physical activity ^{1,2} | Processed meat ³ Alcoholic drinks ⁴ Body fatness ⁵ Adult attained height ⁶ |
| | Probable Wholegrains Foods containing dietary fibre ⁷ Dairy products ⁸ Calcium supplements ⁹ | Red meat ¹⁰ |
| LIMITED EVIDENCE | Limited – suggestive Foods containing vitamin C ¹¹ Fish Vitamin D ¹² Multivitamin supplements ¹³ | Low intakes of non-starchy vegetables ¹⁴ Low intakes of fruits ¹⁴ Foods containing haem iron ¹⁵ |
| | Limited – no conclusion Cereals (grains) and their products; potatoes; animal fat; poultry; shellfish and other seafood; fatty acid composition; cholesterol; dietary n-3 fatty acid from fish; legumes; garlic; non-dairy sources of calcium; foods containing added sugars; sugar (sucrose); coffee; tea; caffeine; carbohydrate; total fat; starch; glycaemic load; glycaemic index; folate; vitamin A; vitamin B6; vitamin E; selenium; low fat; methionine; beta-carotene; alpha-carotene; lycopene; retinol; energy intake; meal frequency; dietary pattern | |
| STRONG EVIDENCE | Substantial effect on risk unlikely | |



Vieira et al. 2017, Annals of Oncology

15 études sont incluses dans la méta-analyse.

⇒ Augmentation dose-réponse significative avec la consommation de viandes rouges et charcuteries.

⇒ Cette augmentation est de 12 % pour le cancer colorectal, de 19% pour le côlon et 17 % pour le rectum (par incrément de 100g/jour).

Conséquence des conclusions de ces méta-analyses

FOOD, NUTRITION, PHYSICAL ACTIVITY AND CANCERS OF THE COLON AND THE RECTUM 2011

| | DECREASES RISK | INCREASES RISK |
|-------------------|---|---|
| Convincing | Physical activity ^{4,2} Foods containing dietary fibre ³ | Red meat ^{4,5} Processed meat ^{4,6} Alcoholic drinks (men) ⁷ Body fatness |

General recommendations of the 2007 WCRF/AICR Diet and Cancer Report

| |
|--|
| BODY FATNESS Be as lean as possible within the normal range of body weight |
| PHYSICAL ACTIVITY Be physically active as part of everyday life |
| FOODS AND DRINKS THAT PROMOTE WEIGHT GAIN Limit consumption of energy-dense foods Avoid sugary drinks |
| PLANT FOODS Eat mostly foods of plant origin |
| ANIMAL FOODS Limit intake of red meat and avoid processed meat |
| ALCOHOLIC DRINKS Limit alcoholic drinks |
| PRESERVATION, PROCESSING, PREPARATION Limit consumption of salt Avoid mouldy cereals (grains) or pulses (legumes) |
| DIETARY SUPPLEMENTS Aim to meet nutritional needs through diet alone |

| RECOMMENDATION 5 |
|---|
| ANIMAL FOODS Limit intake of red meat ¹ and avoid processed meat ² |
| PUBLIC HEALTH GOAL Population average consumption of red meat to be no more than 300 g (11 oz) a week, very little if any of which to be processed |
| PERSONAL RECOMMENDATION People who eat red meat ¹ to consume less than 500 g (18 oz) a week, very little if any to be processed ² |

Dans le cadre d'un positionnement purement de **santé publique**, cette recommandation est pertinente

MAIS

La consommation moyenne par semaine en France est de 370g de viande, avec une tendance à la diminution ET avec environ 2/3 des Français qui mangent moins de viande que le seuil de 500 g par semaine *reste toutefois 1/3 de « gros consommateurs ».*

Cette recommandation actuelle ne prends pas en compte l'intérêt pour,

- **limiter la carence en fer ou l'anémie ferriprive** (anémie causée par carence en fer): Les femmes en âge de procréer, les enfants, les personnes âgées, les sportifs de haut niveau mais aussi les personnes souffrant de maladies intestinales chroniques ou d'autres affections chroniques appartiennent aux groupes à risque.
- **limiter le risque de carence** en vitamines B12 et sélénium en particulier chez les séniors.
- **limiter le risque de sarcopénie** chez les séniors

Enfin, cette recommandation actuelle ne prends pas en compte l'inégalité face aux recommandations: seul les CSP supérieures intègrent ce type de recommandations

Objectif: une alternative à cette recommandation de limitation et d'éviction est-elle possible?



AGENCE NATIONALE DE LA RECHERCHE



PNRA
ALIA

**HemeCancer
SecuriViande**



Etape 1: identification de l'agent impliqué ... pour limiter nutritionnellement le risque



Identification de l'agent impliqué

Les différentes hypothèses

Protéines

Graisses

Pas d'association

Windey *et al.*, 2012 Sun *et al.*, 2012

Amines Aromatiques Hétérocycliques
(AAH)

Associées au risque

Zheng *et al.*, 2009 Cross *et al.*, 2010

Composés N-Nitrosés
(NOCs)

Semblent être impliqué dans
l'initiation et la **promotion**

Davis *et al.*, 2012

Fer hémunique

Semble être impliqué dans la
promotion

Pierre *et al.*, 2003, 2004

AAH, NOCs, Hème : Qui est le coupable?

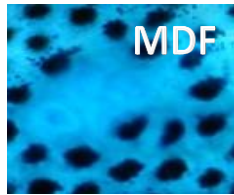
Modèle animal : rats chimio-induits avec protocole 2x2x2

Azoxymethane



| Régimes | Hémoglobine 1% | PhIP 50µg/kg + MeIQx 25µg/kg | Nitrites/Nitrates 0,34g/l |
|-------------------|-------------------|---------------------------------|------------------------------|
| Contrôle | - | - | - |
| | - | - | ✓ |
| AAH | - | ✓ | - |
| | - | ✓ | ✓ |
| Hémoglobine | ✓ | - | - |
| | ✓ | - | ✓ |
| Hémoglobine + AAH | ✓ | ✓ | - |
| | ✓ | ✓ | ✓ |

AAH, NOCs, Hème : Qui est le coupable?



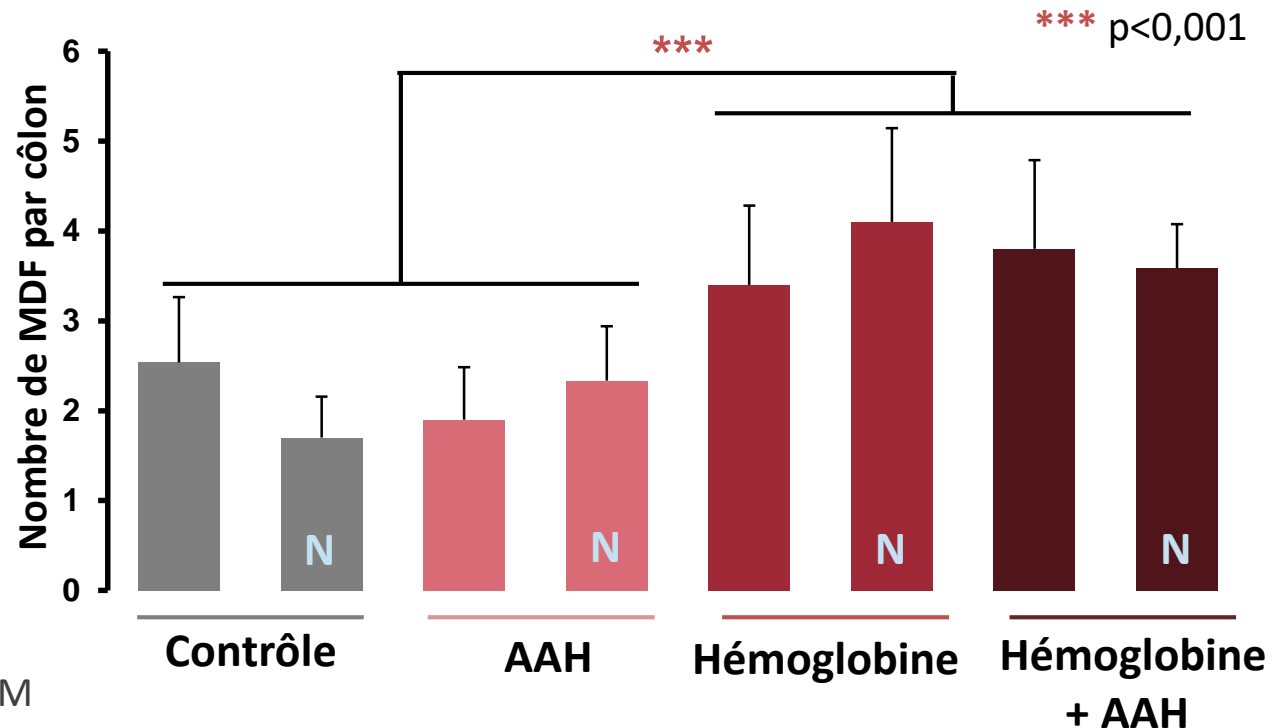
ANOVA par facteur:

Hème $p < 0,001$

AAH ou NOC $p > 0,5$

N = NOCs

Moyenne \pm SEM



Bastide et al, Cancer Research, 2015

Seul le hème augmente significativement
le nombre de **MDF**

Indépendamment de la présence
de **NOCs** et d' **AAH** ... donc de la cuisson

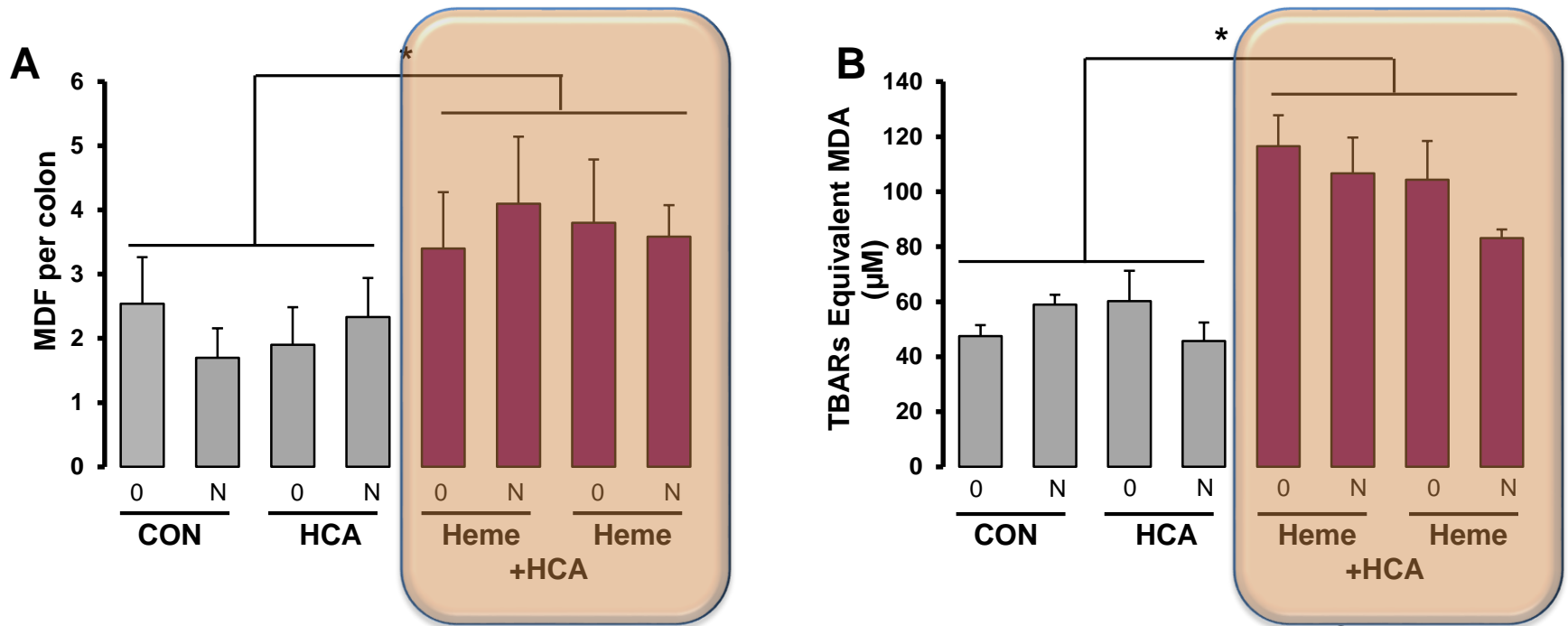
Prevention and Epidemiology

Cancer
Research

A Central Role for Heme Iron in Colon Carcinogenesis Associated with Red Meat Intake

Nadia M. Bastide^{1,2}, Fatima Chenni^{1,5}, Marc Audebert¹, Raphaëlle L. Santarelli¹,
Sylviane Taché¹, Nathalie Naud¹, Maryse Baradat¹, Isabelle Jouanin¹, Reggie Surya¹,
Ditte A. Hobbs², Gunter G. Kuhnle², Isabelle Raymond-Letron⁴, Françoise Gueraud¹,
Denis E. Corpet¹, and Fabrice H.F. Pierre¹

AAH, NOCs, Hème : Qui est le coupable?



Bastide et al, Cancer Research, 2015

L'augmentation significative du nombre de MDF est associée à une augmentation de la peroxydation lumineuse

Etape 2: Premier retour à l'épidémiologie. Hypothèse hème et hème nitrosylé?



Retour à l'épidémiologie

Cohorte E3N

pour Etude Epidémiologique de femmes de la Mutuelle Générale de l'Education Nationale.

Initiée en 1990, par Françoise Clavel, elle avait pour but d'étudier les facteurs de risque de cancer chez la femme.

C'est 98 995 femmes nées entre 1925 et 1955 qui ont reçu des questionnaires alimentaires réguliers et c'est 1 409 cas.

In multivariate analyses, total iron and nitrosylated heme iron were positively associated with the risk of colorectal adenomas,
(HR for the fourth compared with the first quartile)

HR₄ = 1.36, 95% CI 1.13-1.65 for heme iron (>1,44 vs <0,77 mg/j)

HR₄ = 1.28, 95% CI 1.05-1.39 for nitrosylated heme iron (>0,22 vs 0,06 mg/j)

Bastide et al, CEBP 2016

Heme iron intake, total antioxidant capacity, and risk of colorectal adenomas in a large cohort study of French women: a balance risk-benefit?

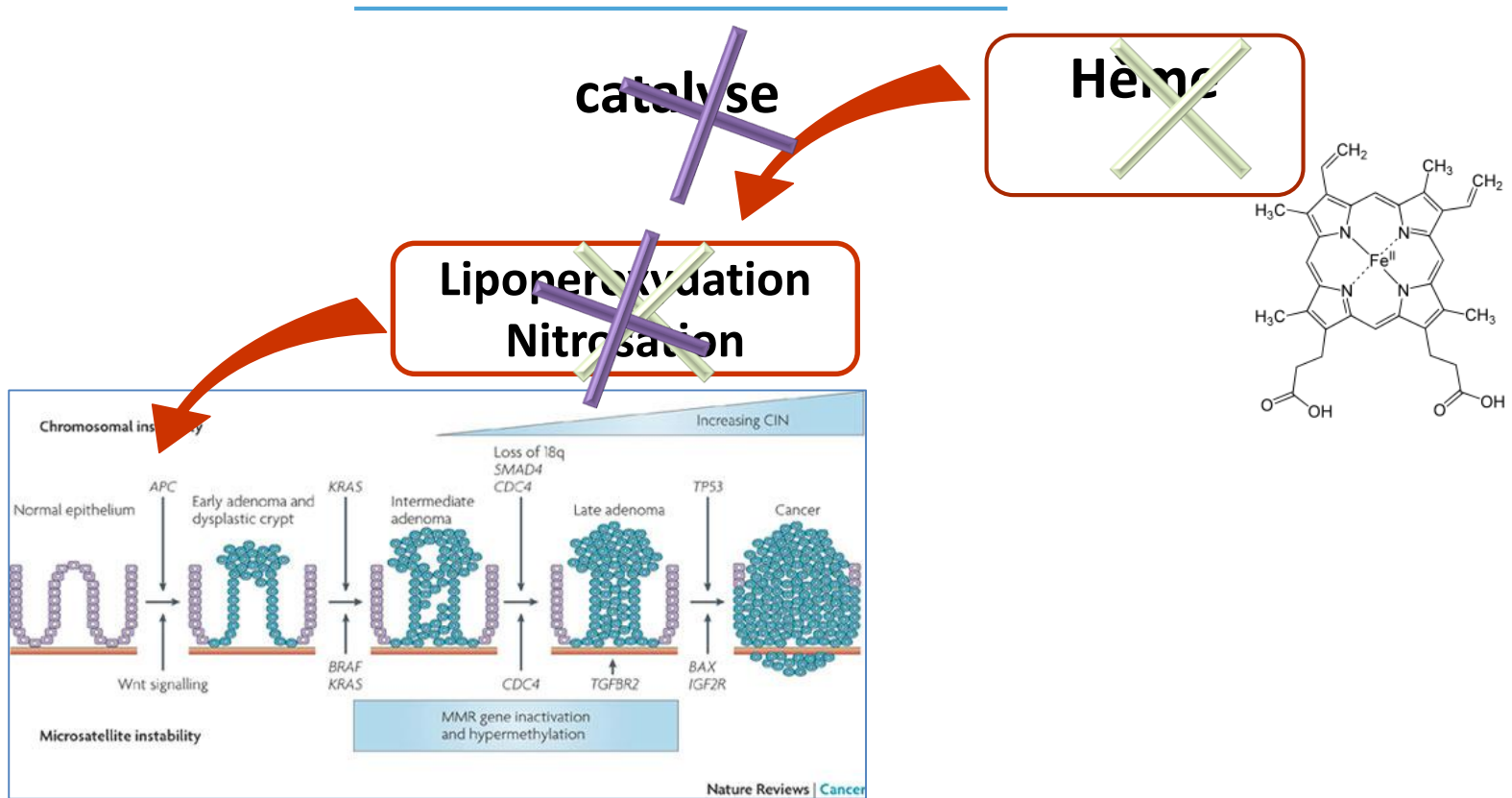
Bastide NM, Morois S, Kangas S, Cadeau C, Revois S, Pierre FH, Clavel-Chapelon F, Serafini M, Boutron-Ruault MC

Cancer
Epidemiology,
Biomarkers
& Prevention

Etape 3: Identification du couple hème /peroxydation et ou nitrosation comme étant central pour expliquer l'effet promoteur des charcuteries: vers la définition d'une prévention nutritionnelle?



Prévention du risque par l'alimentation

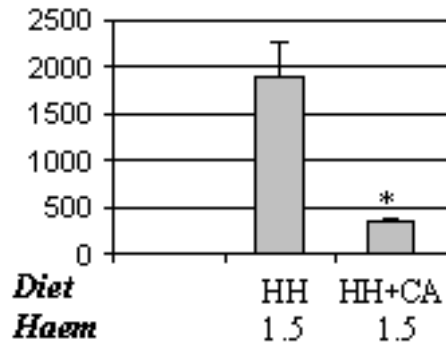


Hypothèse 1: Chélater l'hème, calcium

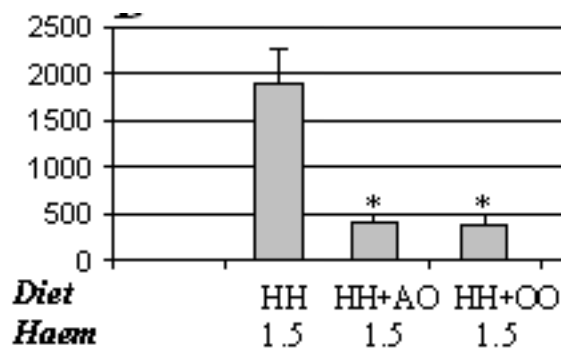
Hypothèse 2: Inhibition de la lipoperoxydation
(Vit E, polyphénols)

Dès 2003, nous avons testé la prévention du risque par modification du régime alimentaire

1- Chélater l'hème avec du calcium dans le régime



2- Limiter la peroxydation avec des antioxydants dans le régime



***Hemecancer et SecuriViande*: Prévention par recommandation alimentaire et modification de fabrication**

Une alternative à recommandation du WCRF est-elle possible?

Deux pistes ont été envisagées:

- recommandation alimentaire:

quoi manger en même temps que la charcuterie?

- modification des procédés de fabrication des charcuteries:

Peut on modifier la fabrication de la charcuterie pour la rendre non promotrice?

Agents testés:

Calcium

Extrait de vin rouge

Tocophérol

Rutine

Anaérobiose

Sans nitrites

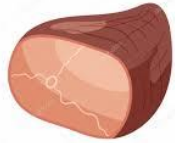
Extrait de grenade

.....



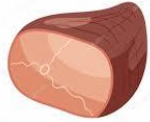
Protocole expérimental

Dans l'aliment
(modification du régime alimentaire)



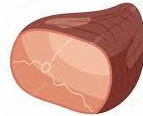
DCNO : viande saumurée promotrice des FDM

DCNO +



carbonate calcium
(150µmol/g)

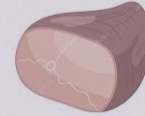
DCNO +



inuline (5%)

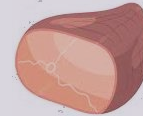
Dans la charcuterie
(modification du procédé de fabrication)

DCNO +



α-tocophérol
(0.05%)

DCNO +



Rutine
(0.1%)

DCNO +



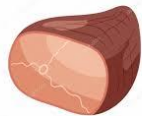
Carnosol
(0.1%)

DCNO +

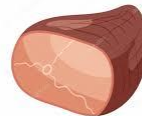


Phosphate
(0.8%)

Capacité à modifier la peroxydation et nitrosation luminale



DCNO : viande saumurée promotrice des FDM



CBCA : DCNO enrichi en carbonate de calcium (150µmol/g) dans le régime



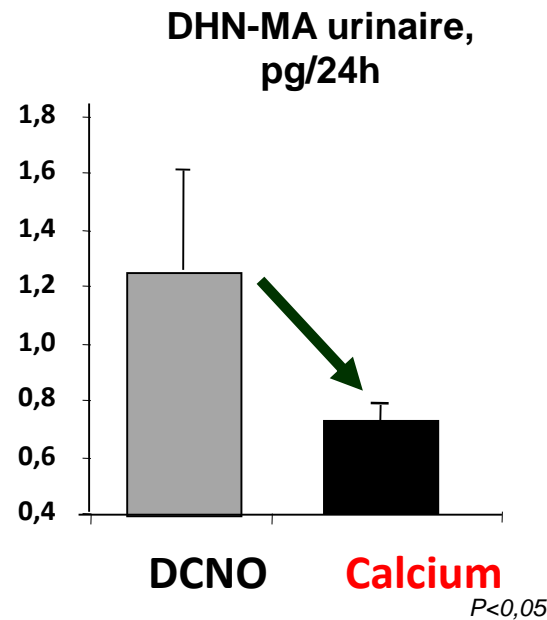
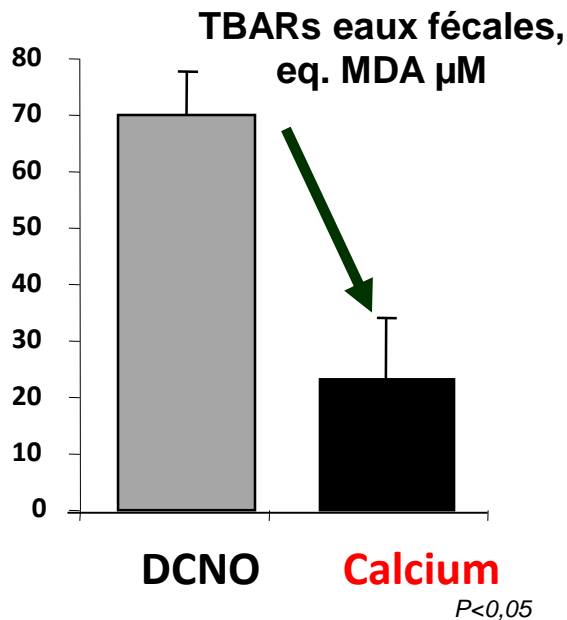
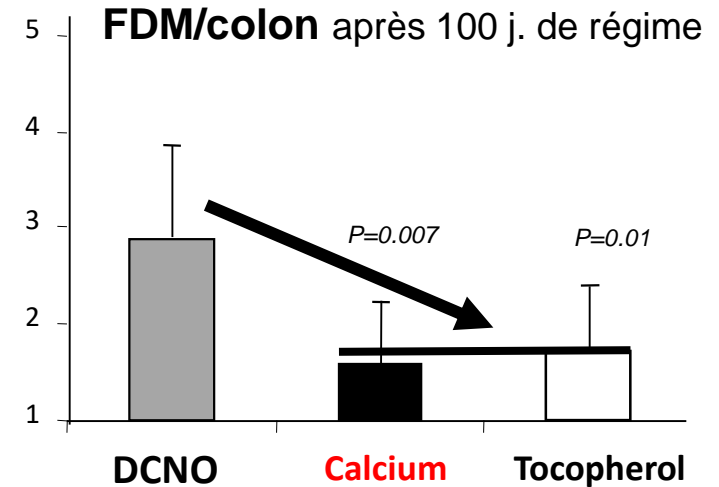
TOCO : DCNO enrichi en α-tocophérol dans la charcuterie (0,05%)

Prévention par recommandation alimentaire et modification de fabrication

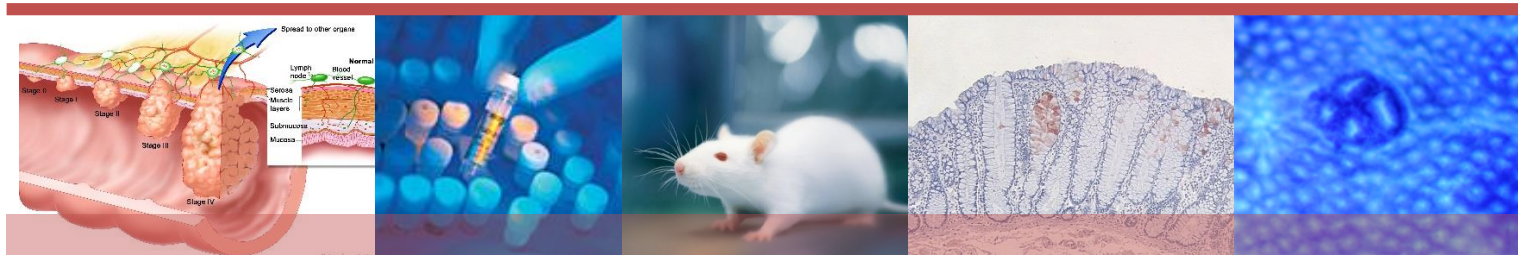
Deux agents efficaces contre

-La promotion induite par la charcuterie modèle

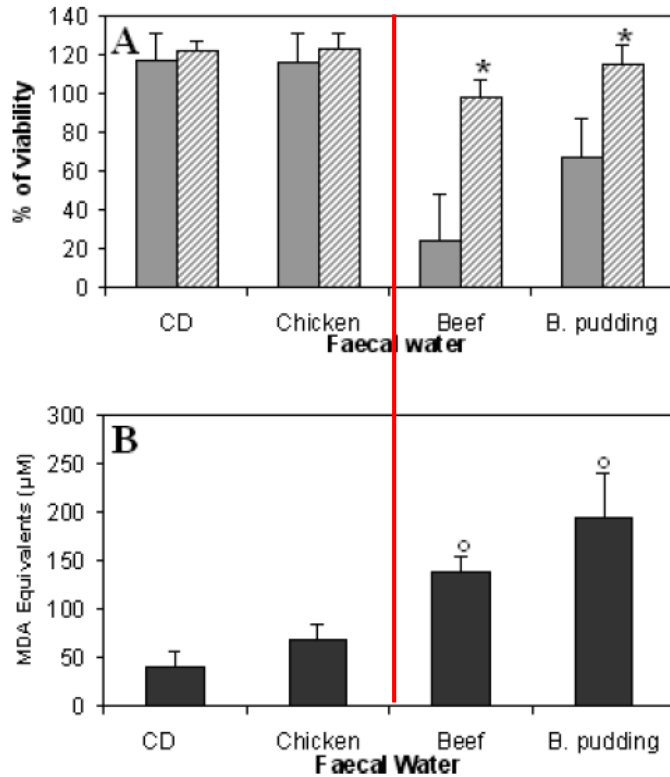
-Les marqueurs de toxicité de la consommation de la charcuterie modèle



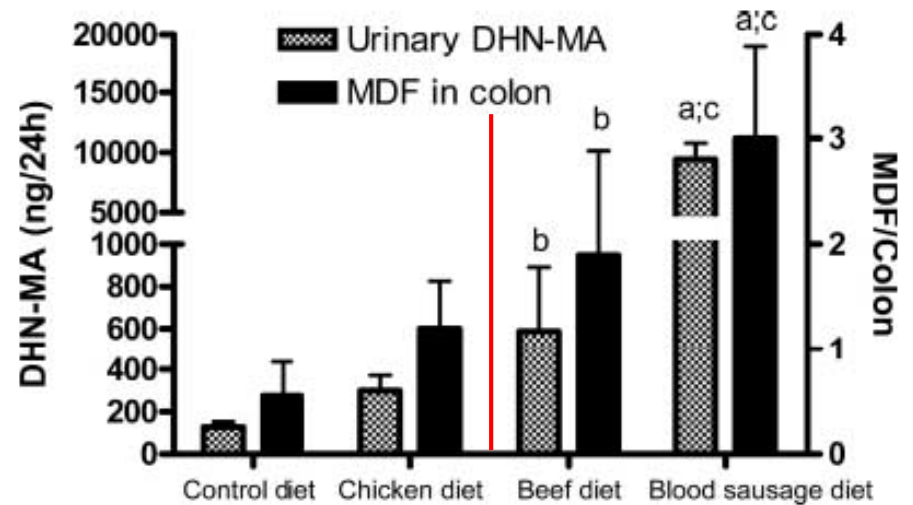
Etape 6 : Etude chez les volontaire sains



Identification de biomarqueurs de risque dans les fèces et l'urine



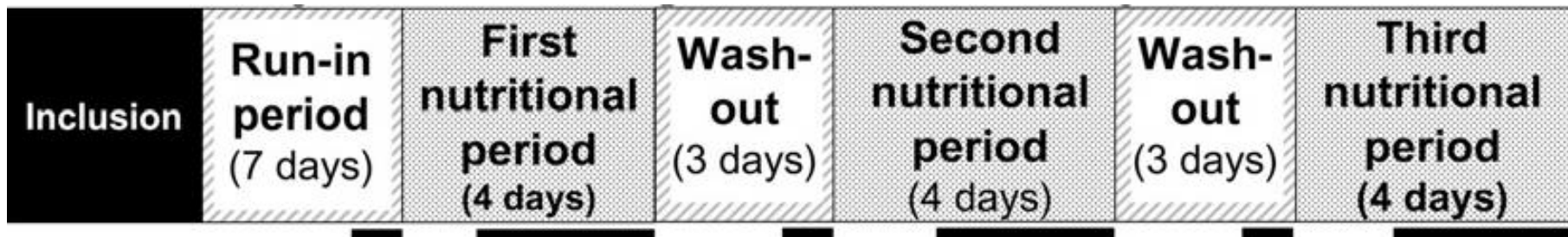
Activité cytotoxique et lipoperoxidation fécale



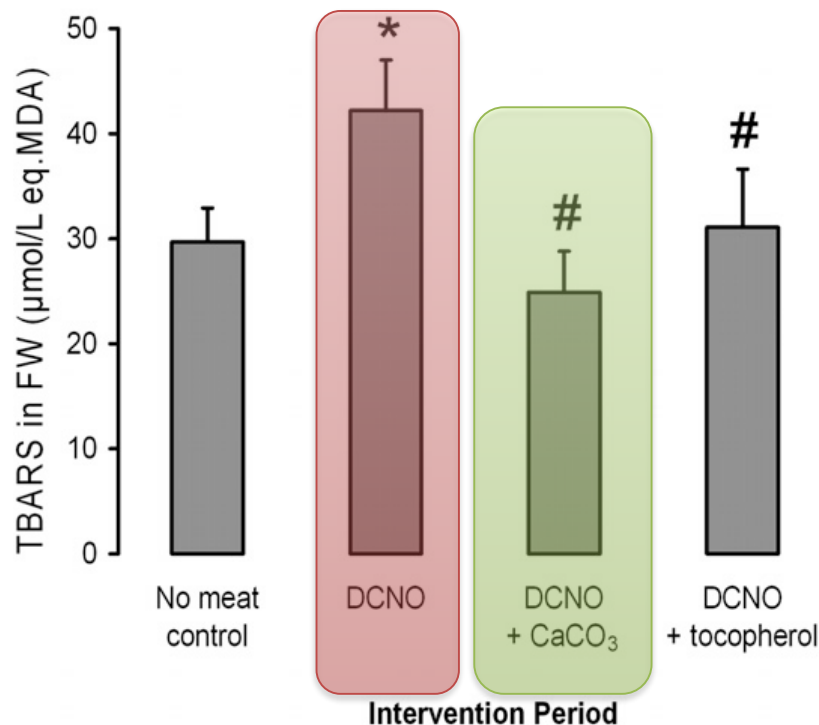
DHN-MA urinaire Pierre et al, *CEBP* 2006

Expérimentation nutritionnelle chez des volontaires sains

(Cross-Over au CRNH de Clermond-Auvergne)



Chez les volontaires sains (n=18), comme dans notre modèle animal,



-la consommation d'une viande riche en hème (DCNO) augmente significativement la peroxydation luminale.

-cette augmentation peut être inhibée par un régime riche en **calcium** ou **tocophérol**

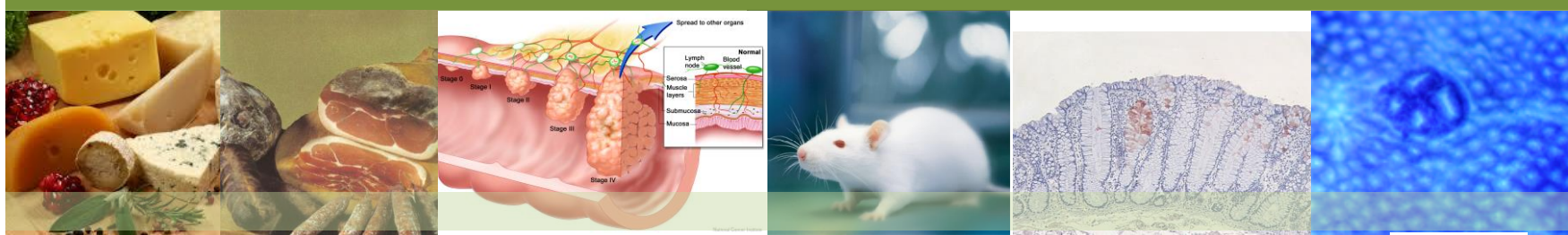
Conclusion

- **Oui**, la consommation importante de viandes et produits à base de viande augmente le risque de cancer du côlon. Ces projets valident les associations proposées par l'épidémiologie (hémoglobine, viande rouge, charcuteries modèles, charcuteries du commerce). Etape indispensable pour comprendre les mécanismes mise en jeux et établir une prévention.
- Ils identifient le rôle central du fer héminique via sa capacité de catalyse de la lipoperoxydation et nitrosation

MAIS,

- Les produits carnés présentent de nombreux intérêts nutritionnels dont le fer héminique (balance bénéfice risque)
- La prévention par **modification du régime** est possible : antioxydants ou calcium=> validée au niveau expérimental et chez des volontaires sains

Bactéries propioniques et cancer



Une bactérie multi-usage

Mangée en grande quantité



Propionibacterium freudenreichii

→ Vitamines



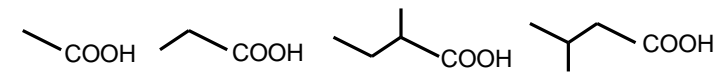
→ Probiotique



→ Conservateur



→ Affinage



AGCC

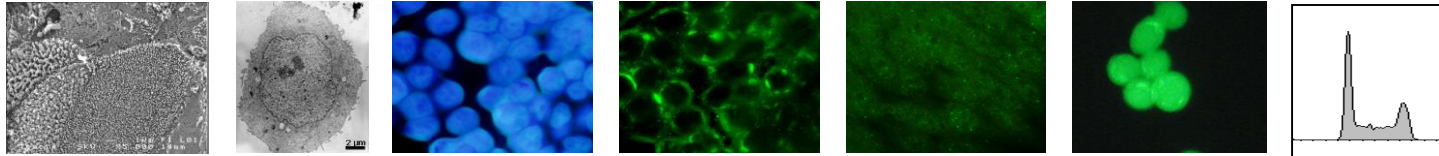
Effets connus sur l'apoptose

- Emmental : 10 g/j/personne en France
- *P. freudenreichii* : 10^{10} CFU/j/personne
- Impact sur la santé?

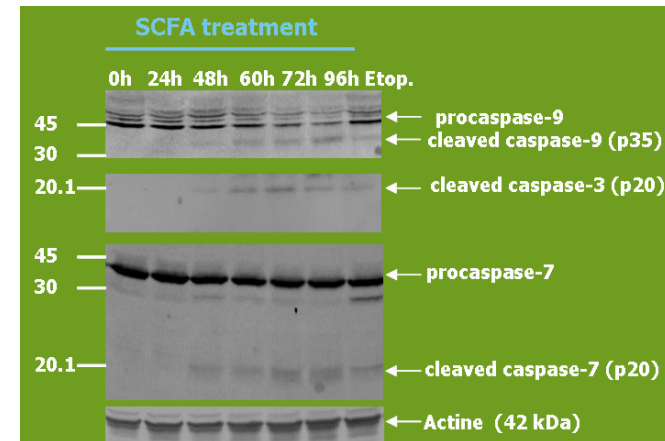
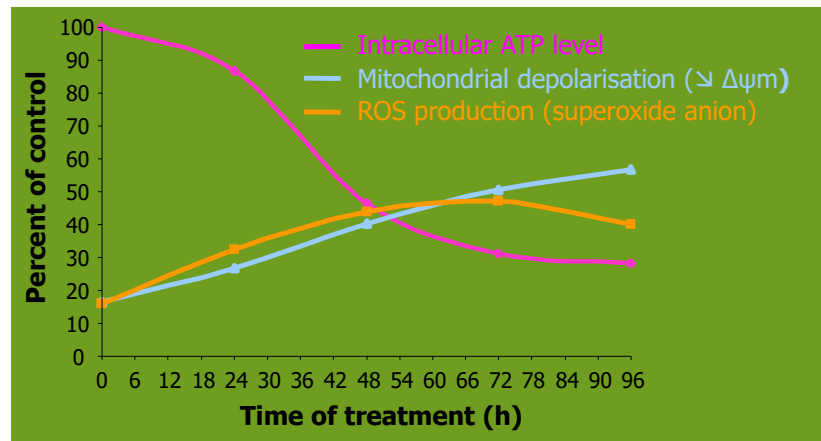
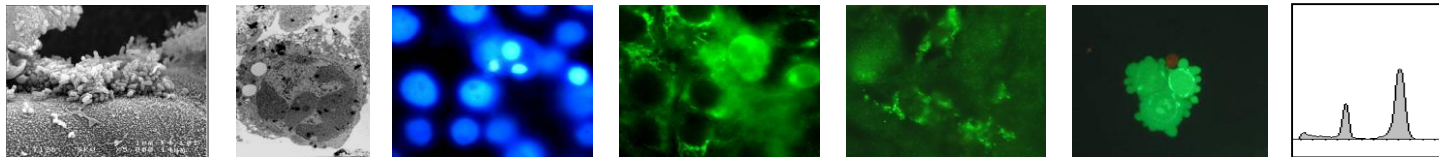
Tue les cellules cancéreuses en culture

Par apoptose

→ Caco2



→ Co-culture



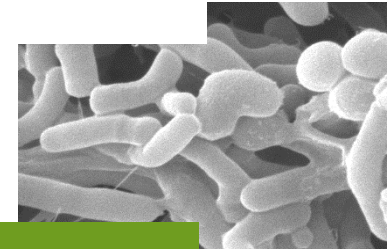
↪ Effets similaires avec acétate & propionate

Tue les cellules cancéreuses en culture

Par apoptose

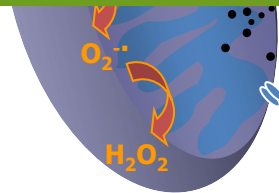


SCFA



OK, mais avec un produit laitier?

Reactive
Oxygen
Species



Caspase 9

Caspase 3 / 7

Nucleus

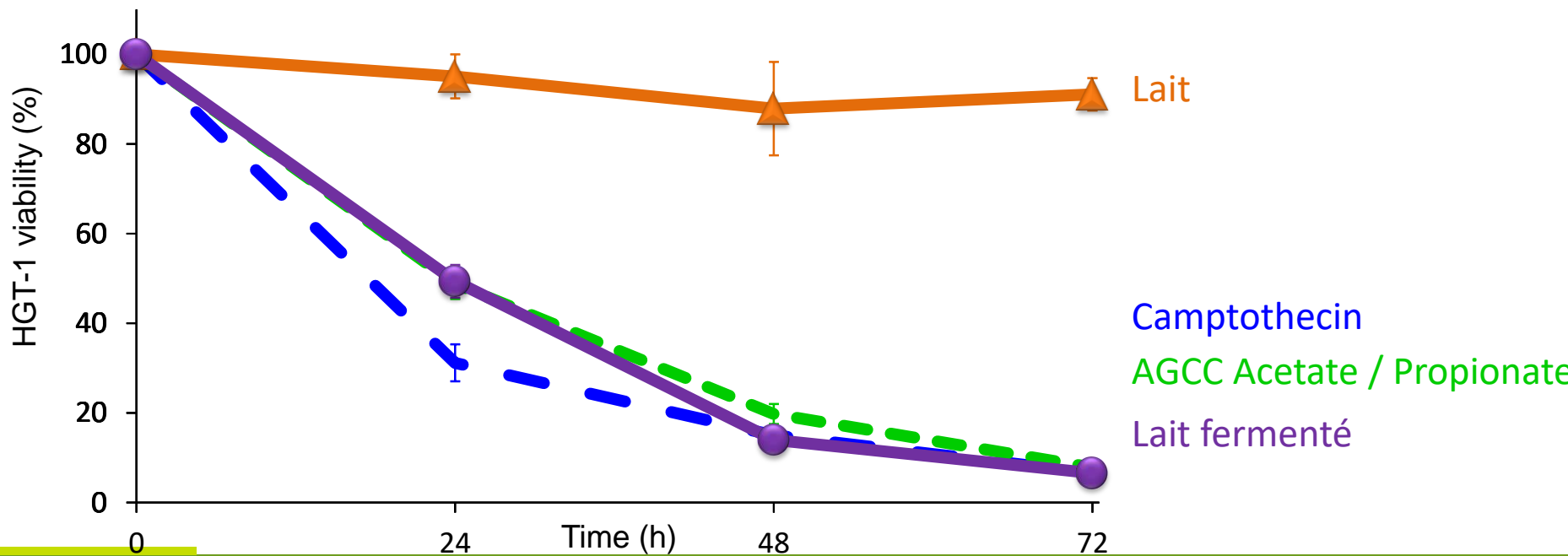
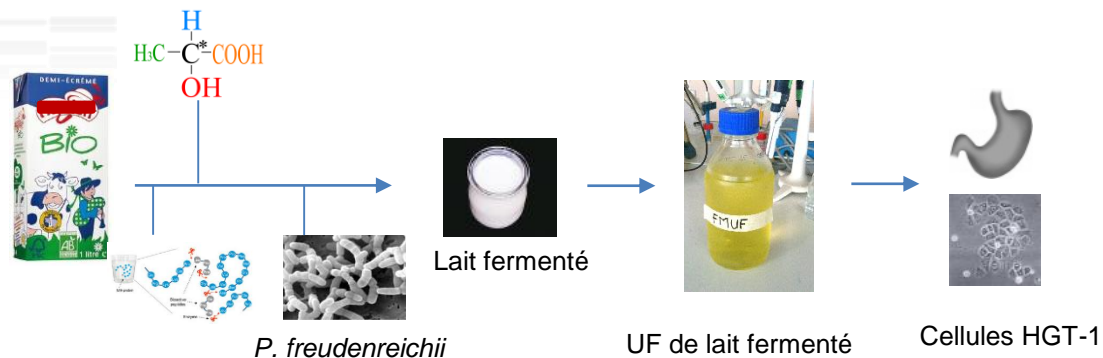


Cell cycle arrest

DNA
Condensation &
Fragmentation

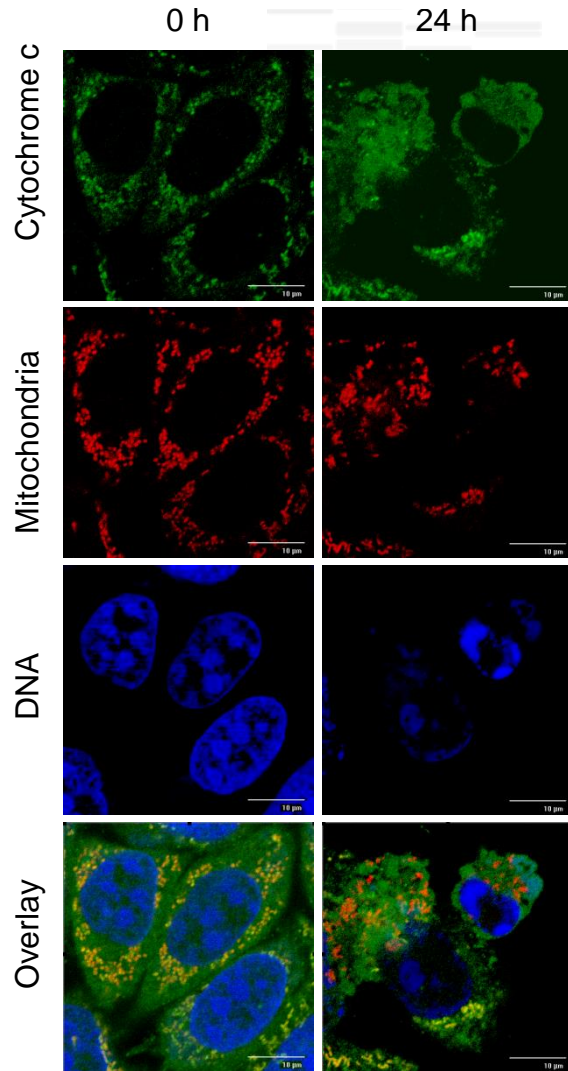
Un nouveau lait fermenté

Effet sur cellules cancéreuses



Un nouveau lait fermenté

Effet sur cellules cancéreuses

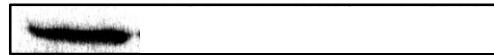


Western Blot /cytoplasm

0 h



Cytochrome c

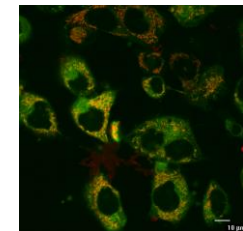
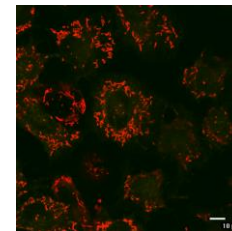


Hsc 70

↪ Fuite du Cytochrome c

Control-JC1

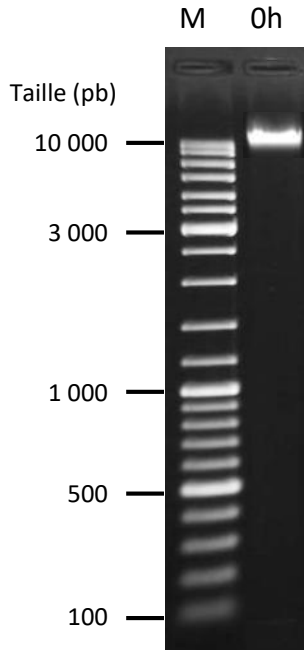
UF fermenté ½ (24 h)



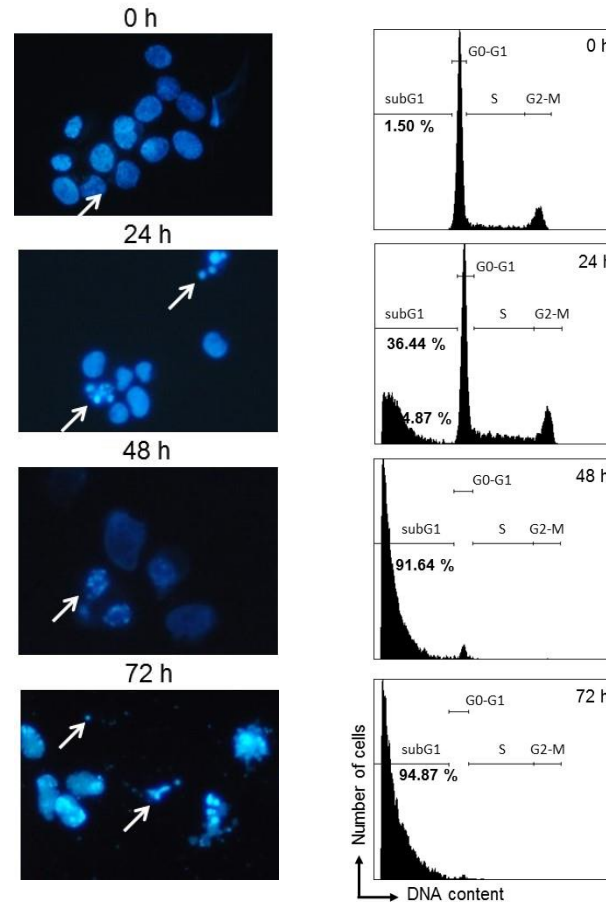
↪ Dépolarisation des mitochondries

Un nouveau lait fermenté

Effet sur cellules cancéreuses : ADN



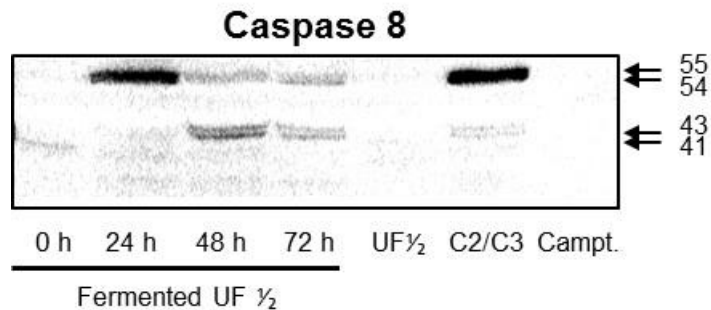
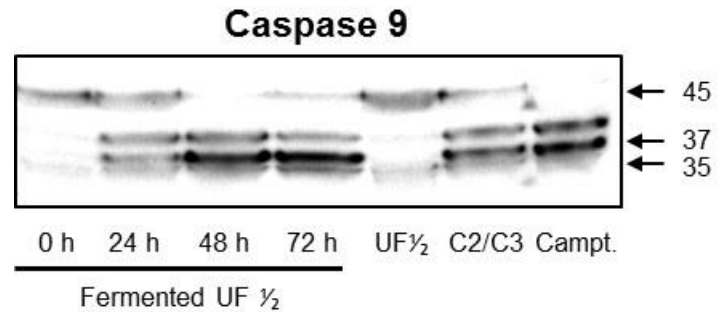
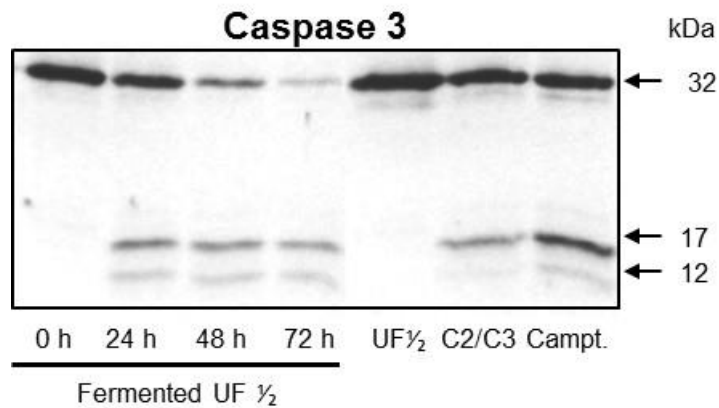
fragmentation de l'ADN



Corps apoptotiques

Un nouveau lait fermenté

Effet sur cellules cancéreuses : caspases



↪ Activation des caspases

Un nouveau lait fermenté

Effet sur cellules cancéreuses : synergie avec chimiothérapie



45
40
35



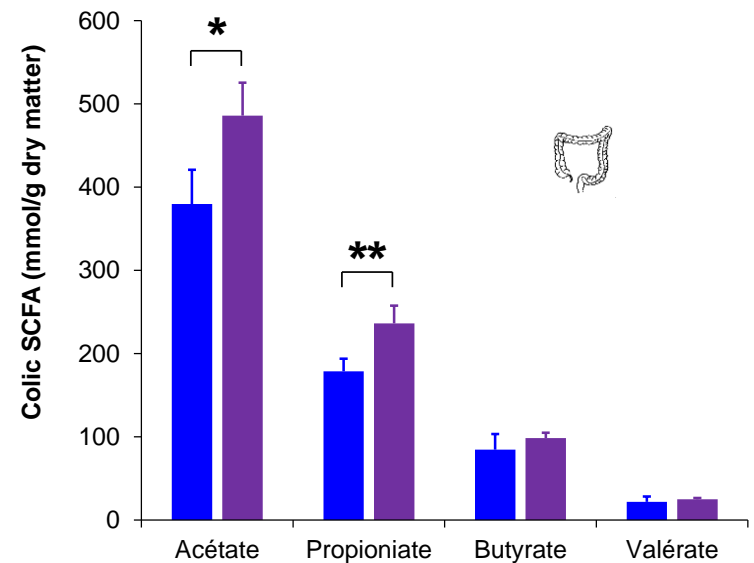
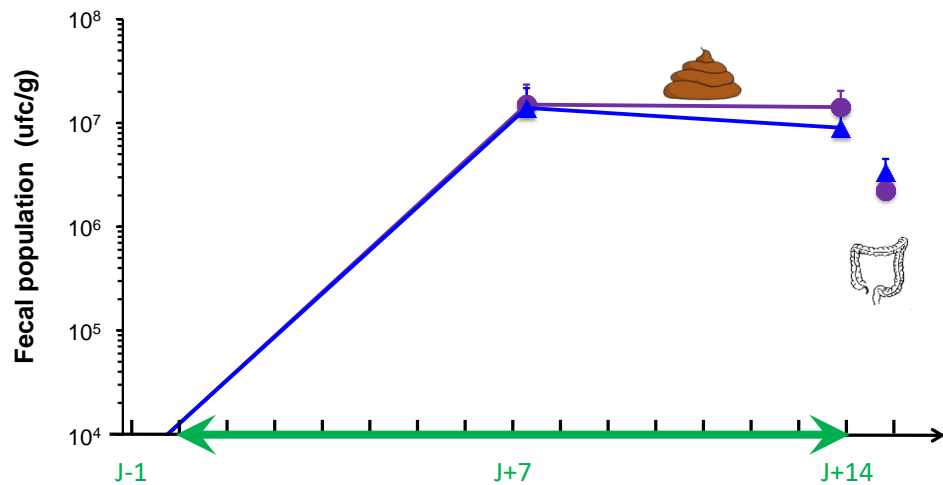
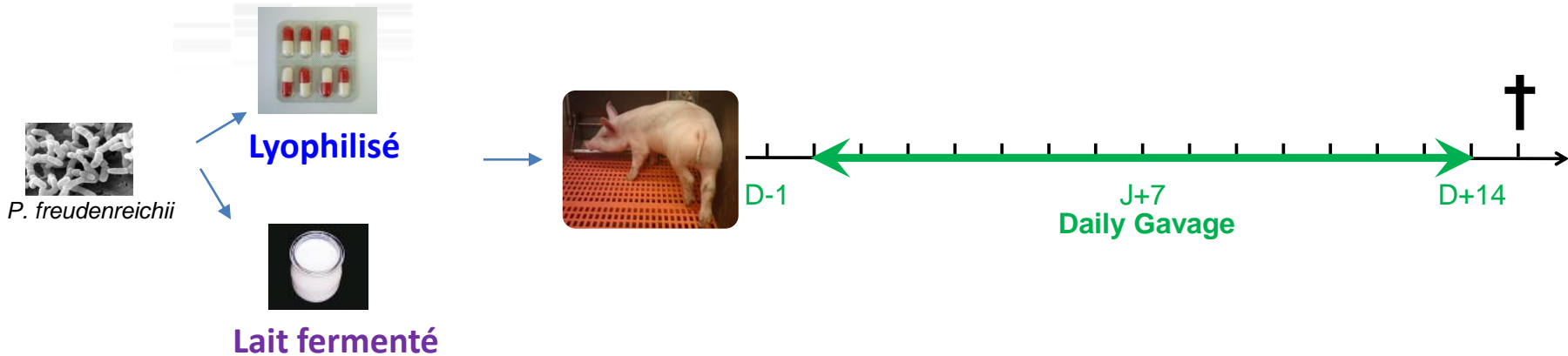
OK, mais les
propionibactéries arrivent-
elles au colon vivantes?

↪ Un effet additif

↪ Effets similaires sur HT-29

Un nouveau lait fermenté

Promeut l'activité métabolique *in vivo*



↳ Cela dépend du vecteur d'apport alimentaire

Un nouveau lait fermenté

Avec un impact sur la physiologie *in vivo*



■ Lait

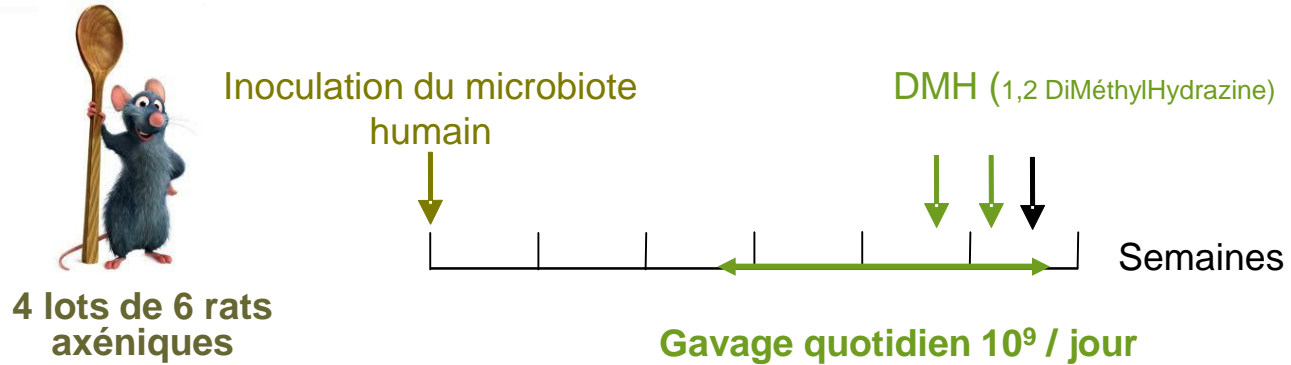
■ Lait fermenté

OK, mais quel est l'impact des
métabolites propionibactériens
sur la carcinogenèse *in vivo*?

↪ Effets sur la physiologie digestive

Rats à microbiote humain (HMA)

Avec carcinogénèse induite : Diméthylhydrazine (DMH)



Apoptose : TUNEL

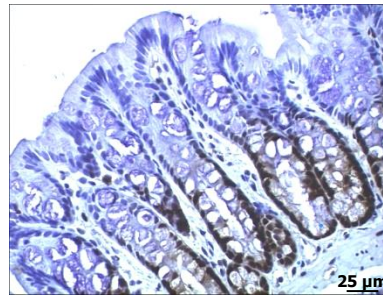
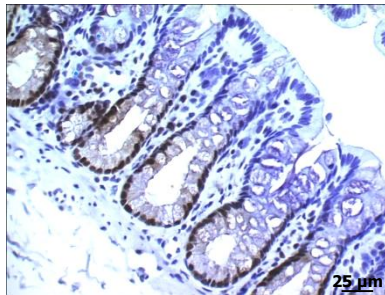
Prolifération : PCNA

Rats à microbiote humain (HMA)

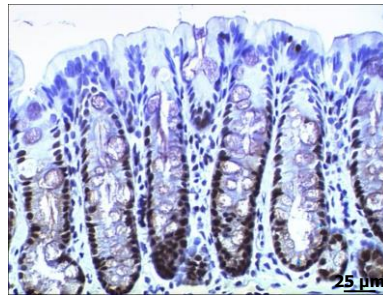
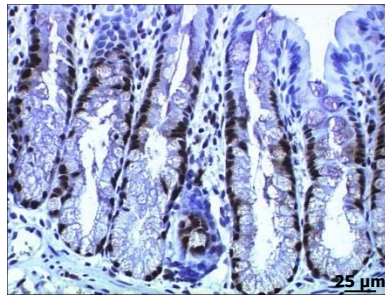
PCNA : prolifération

P. freudenreichii-

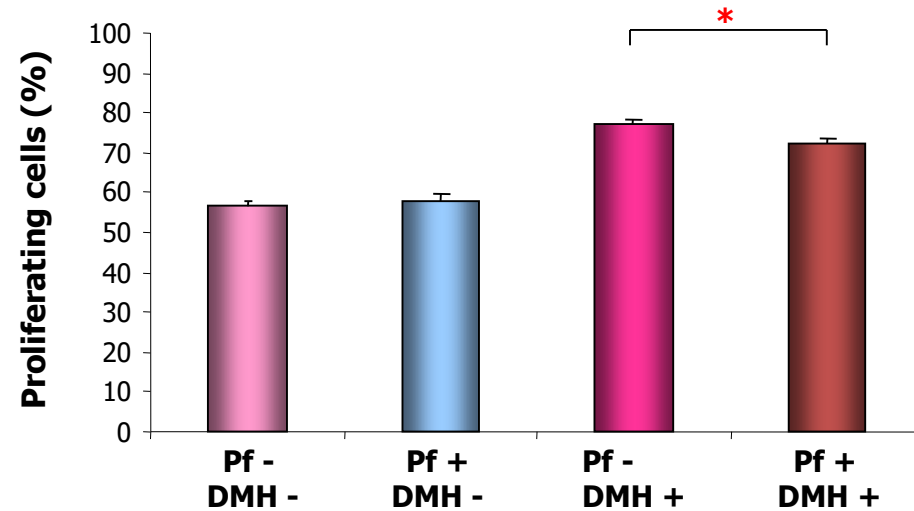
P. freudenreichii+



DMH-



DMH+



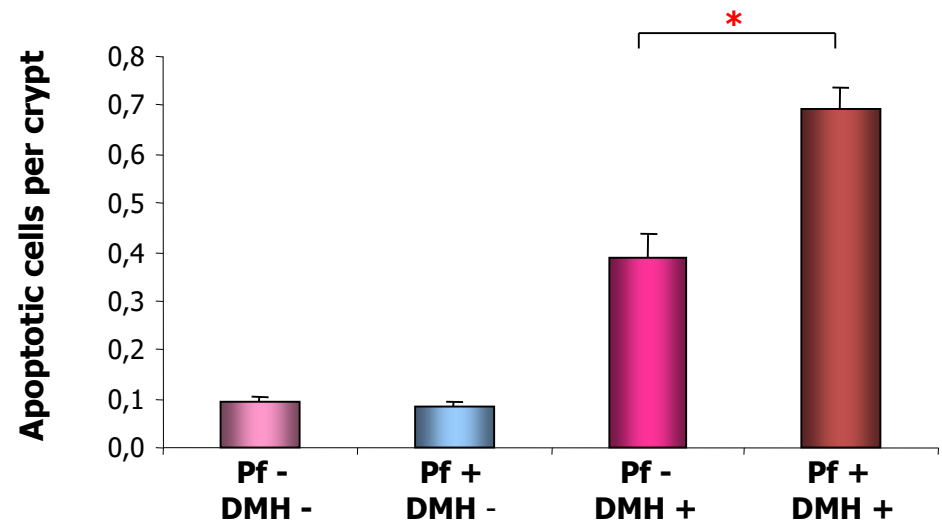
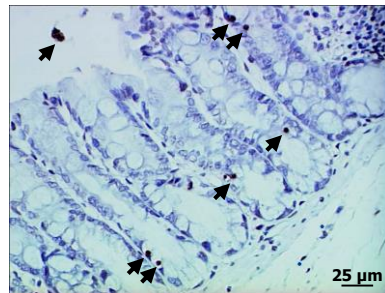
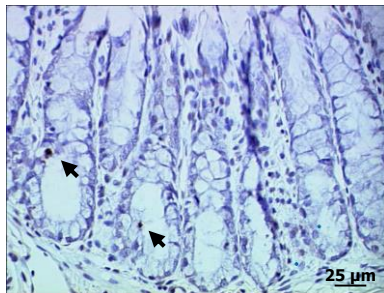
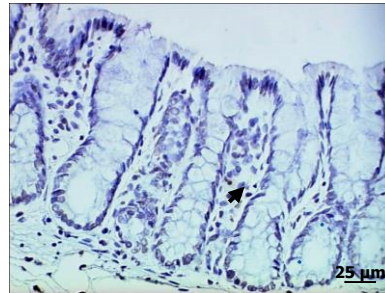
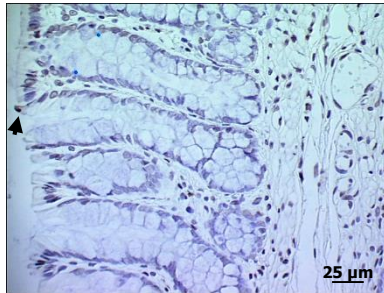
- Pas d'effet de *P. freudenreichii* sur la prolifération chez les rats contrôles
- Peu d'effet de *P. freudenreichii* sur la prolifération chez les rats mutagénisés

Rats à microbiote humain (HMA)

TUNEL : apoptose

P. freudenreichii-

P. freudenreichii+

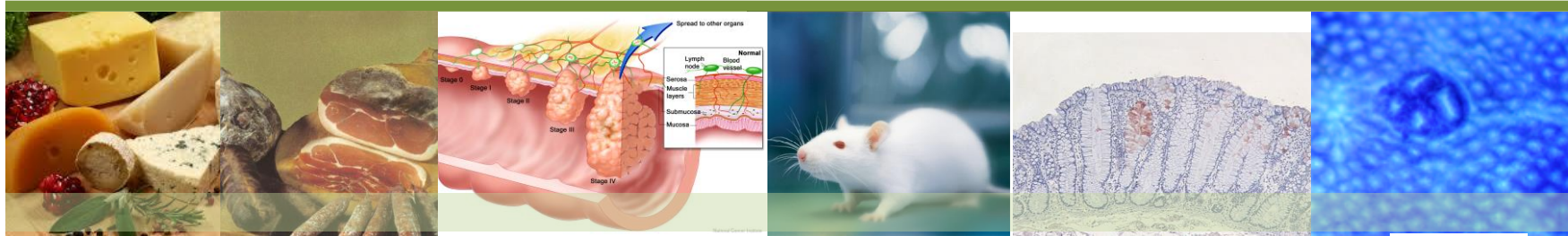


- Pas d'effet de *P. freudenreichii* sur l'apoptose chez les rats contrôles
- *P. freudenreichii* augmente l'apoptose chez les rats mutagénisés

CONCLUSION

- ❖ *Propionibacterium freudenreichii* induit l'apoptose *in vitro*.
 - ❖ Un produit laitier fermenté par *Propionibacterium freudenreichii* induit l'apoptose *in vitro*.
 - ❖ Un produit laitier fermenté par *Propionibacterium freudenreichii* apporte des propionibactéries vivantes au côlon.
 - ❖ *Propionibacterium freudenreichii* , ingéré, favorise l'élimination apoptotique de colonocytes endommagés dans le contexte de la carcinogénèse
- **Un aliment fonctionnel pour prévenir les effets carcinogènes des viandes rouges ?**

Viandes rouges, charcuteries et cancer du côlon : rôle central du couple fer héminique/peroxydation lipidique. Vers une prévention par le calcium et les probiotiques des produits laitiers?



Dr. Fabrice PIERRE

UMR 1331 ToxAlim - Centre INRA de Toulouse

Equipe Prévention et Promotion de la Cancérogénèse par les Aliments

Dr. Gwénaél JAN

UMR 1253 STLO - Centre INRA de Rennes

Equipe Microbiologie



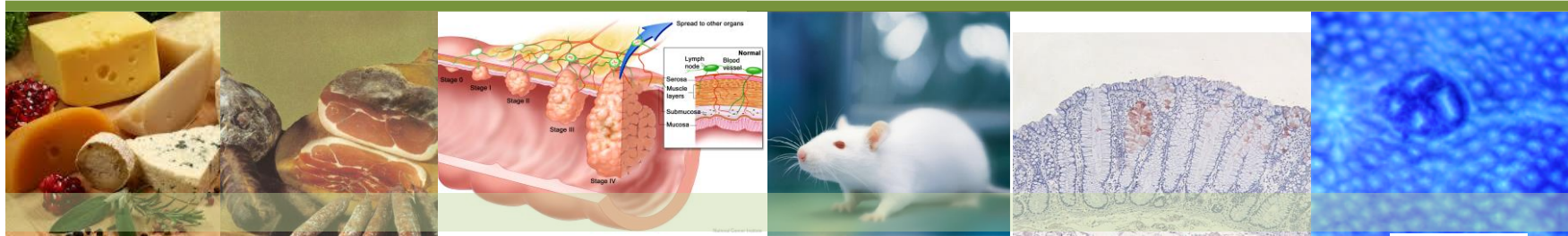
Passer de la preuve de concept de l'effet protecteur des sel de calcium à la démonstration de l'effet protecteur des matrices fromagères

- **Contrat Hemental**

- STLO
- ToxAlim
- CNIEL

=>étudier l'effet du calcium (sous forme de molécule purifiée ET incorporé dans une matrice laitière) en association ou non avec les propionibactéries sur les biomarqueurs fécaux, urinaires et muqueux associés à l'effet promoteur du fer héminique.

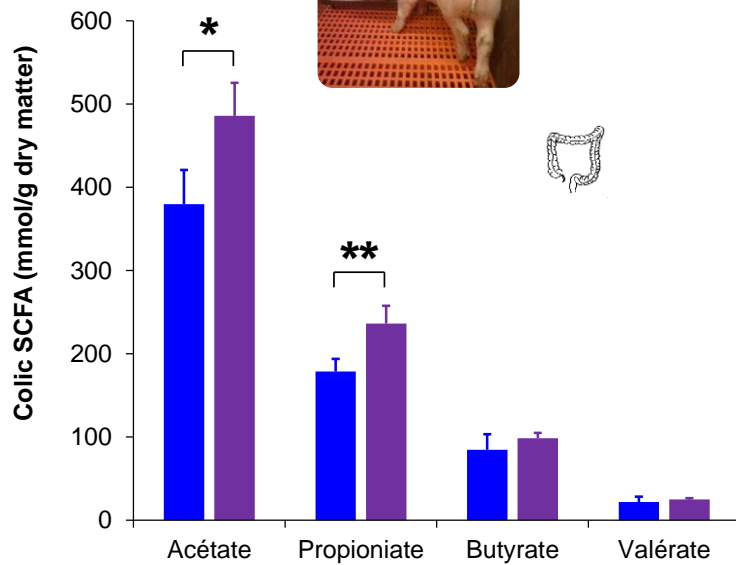
Préparation d'un fromage expérimental



Sélection des souches

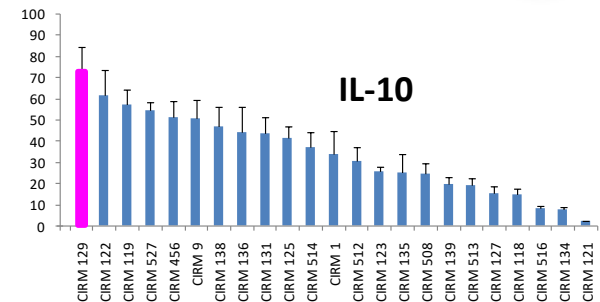
Effets probiotiques avérés

↪ *P. freudenreichii* ITGP9,
alias CIRM-BIA 138

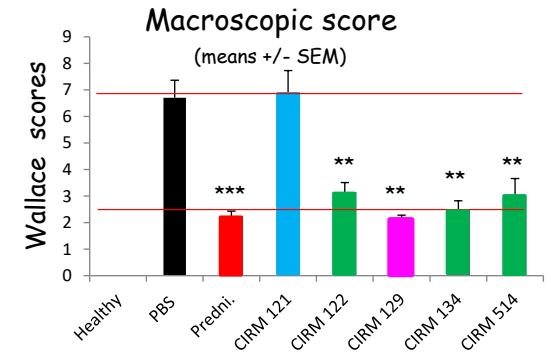
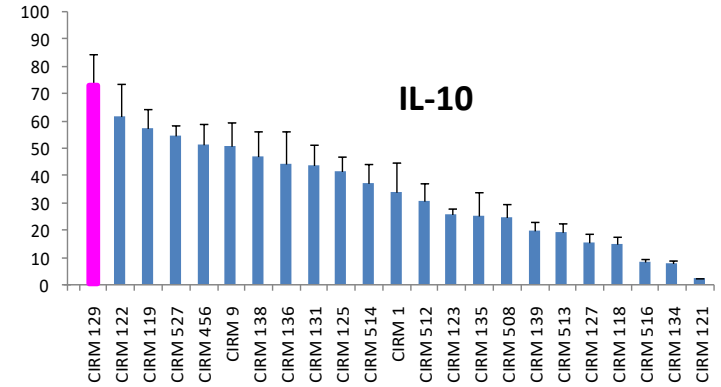
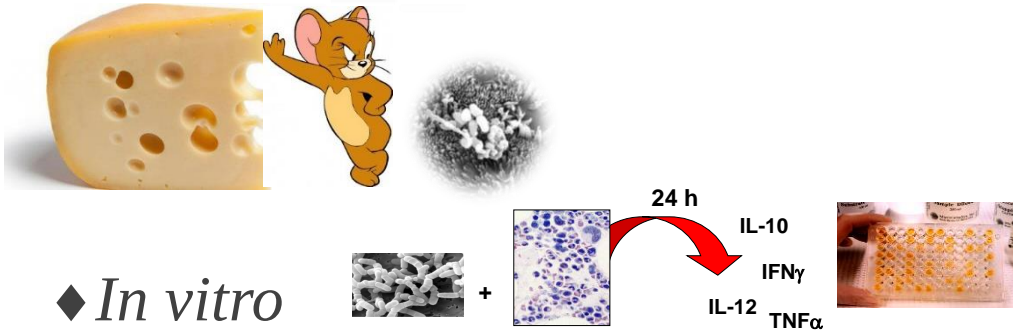


Cousin et al., Food Microbiol. 2012

↪ *P. freudenreichii* ITGP20,
alias CIRM-BIA 129

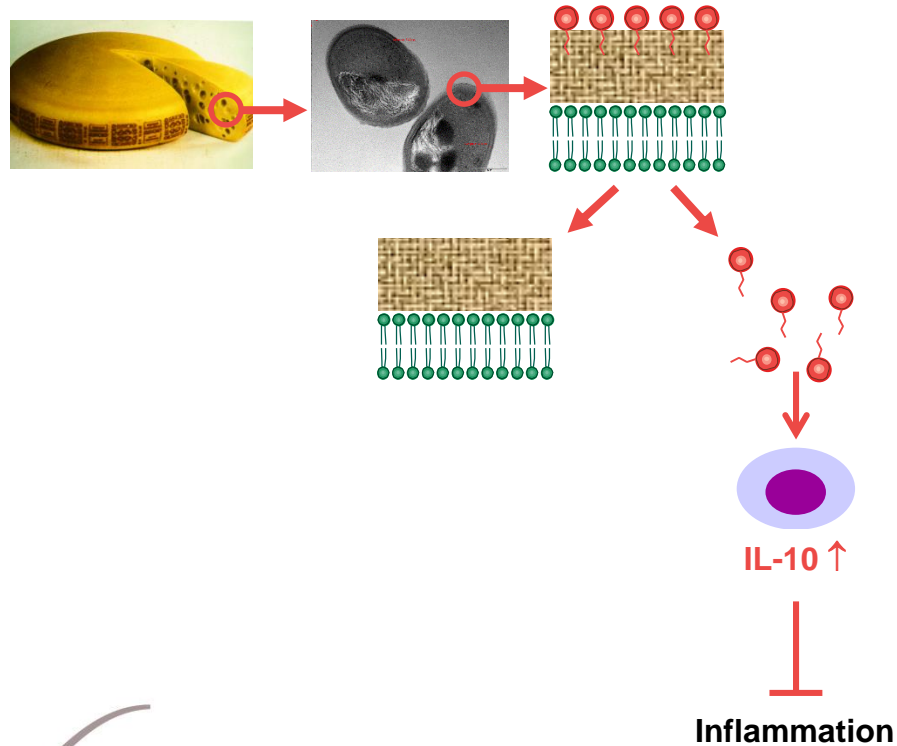


L'ANR SURFING en quelques mots



SURFING
Starter Surface
against Inflammation of the Gut

L'ANR SURFING en quelques mots



 **SURFING**
Starter Surface
against **Inflammation** of the Gut

Préparation des levains

Base laitière



Lait de vache

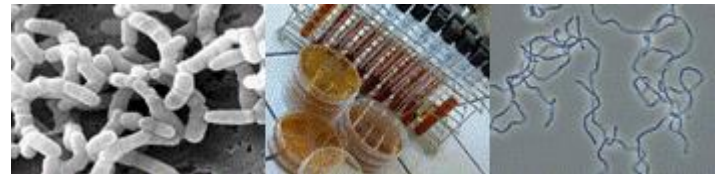
Ultrafiltration (8 kDa)

Récupération du perméat



Préparation des levains

Culture de souches certifiées



Lait de vache

Ultrafiltration (8 kDa)

Récupération du perméat

Addition de Lactate Na qsp 0,1M

Addition de peptone de caséine qsp 50 g/L

Stérilisation par filtration 0,22 μm

Inoculation de *P. freudenreichii* à 10^6 CFU/mL

Croissance 3 jours à 30°C : 2 fois 5 litres

↪ *P. freudenreichii* ITGP9,
alias CIRM-BIA 138

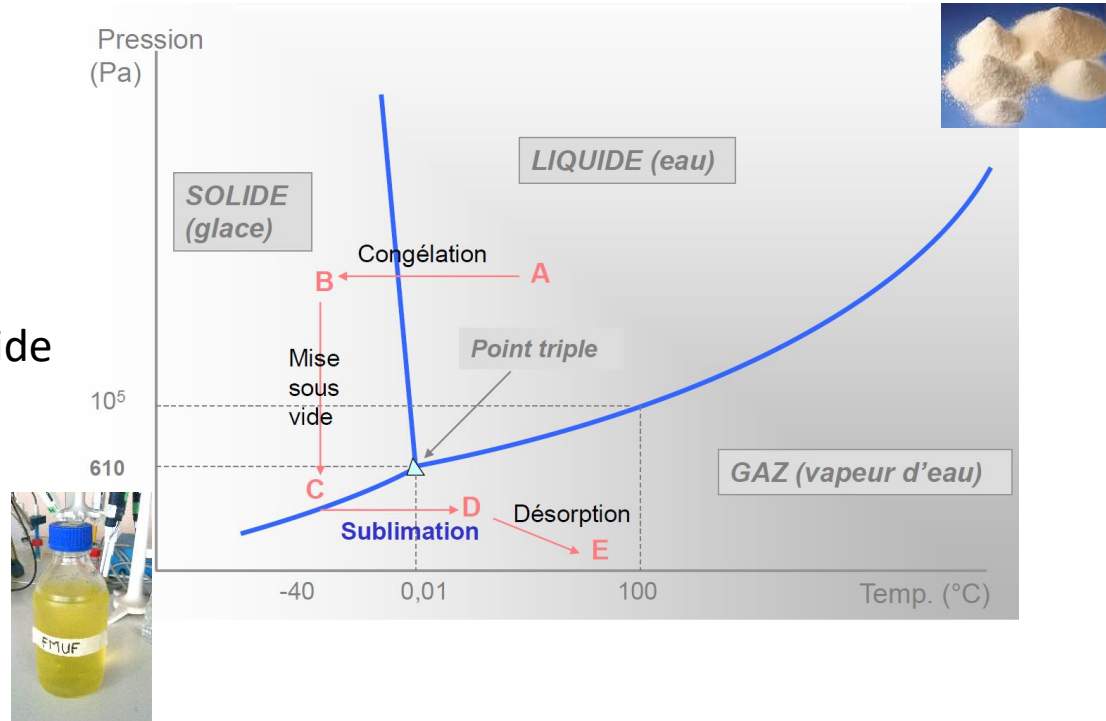
↪ *P. freudenreichii* ITGP20,
alias CIRM-BIA 129

Préparation des levains

Concentration & séchage



Couche très mince
Pré-congélation à -80°C
Transfert du congélateur au lyoph
Paliers progressifs de mise sous vide
Jusqu'au point triple
Sublimation
Désorption

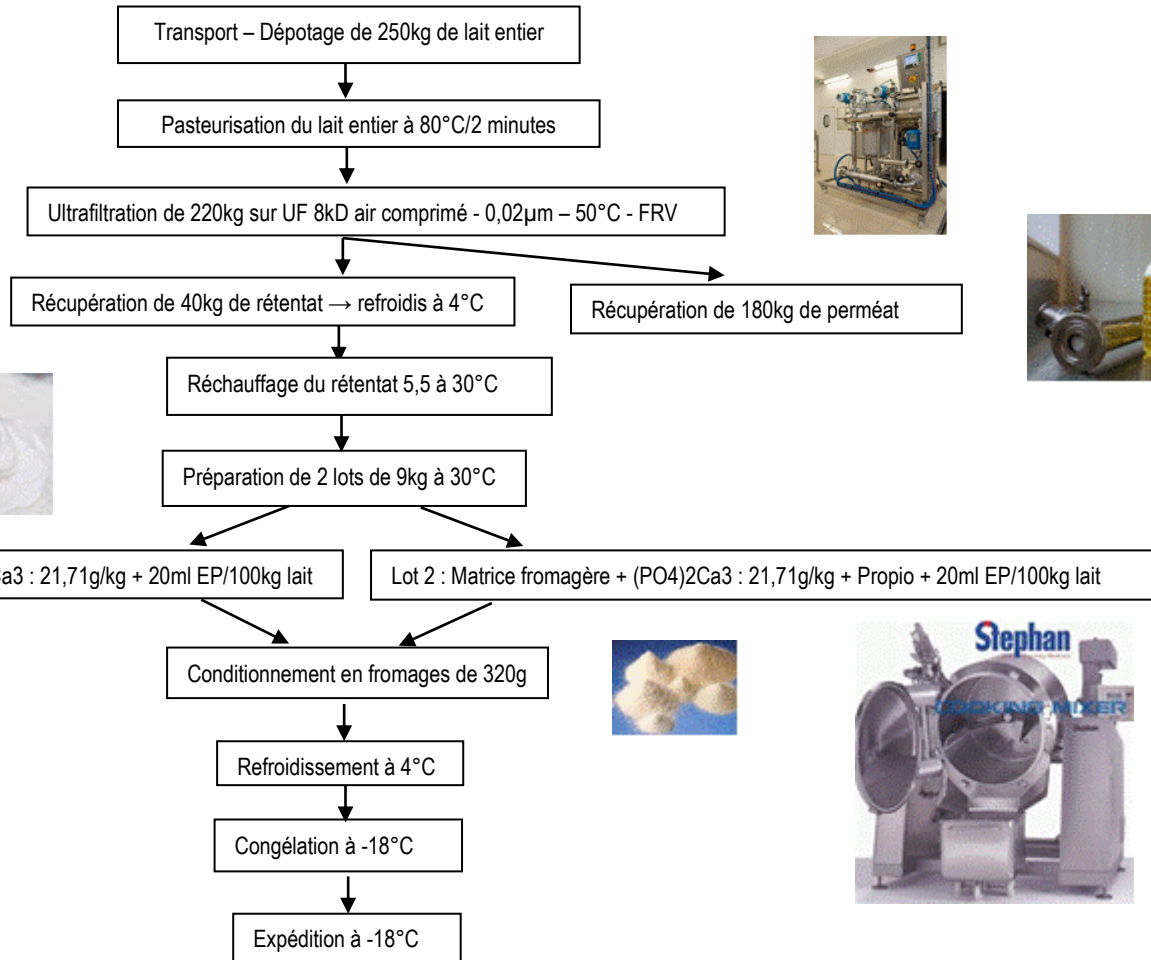


Préparation des fromages

La matrice fromagère modèle



1.1. Protocole expérimental détaillé



Préparation des fromages

Analyses effectuées

| QUI | fait QUOI | QUAND |
|-------------|---|--------------|
| MHO | Nettoyage du pilote d'UF | Lu 17/09 |
| JLT | Nettoyage/Désinfection ligne dépotage | Ma 18/09 |
| JLT | Transport – Dépotage du lait entier | Me 19/09 |
| GG | Nettoyage/Désinfection ligne traitement thermique | Me 19/09 |
| GG | Traitement thermique du lait entier | Me 19/09 |
| GG, AK | Stockage du lait entier à 50°C dans 2 mini-cuves | Me 19/09 |
| MHO | Désinfection pilote UF | Me 19/09 |
| MHO | UF (FRV 5,5) | Me 19/09 |
| MHO, GG, GJ | Réalisation des matrices | Je 20/09 |
| MHO, GG, GJ | Conditionnement, incubation à 30°C, refroidissement à 4°C | Je 20/09 |
| GJ | Mise en congélation à 4°C | Ve 21/09 |
| GJ | Expédition des produits | Lu 24/09 |
| BC | Analyses microbiologiques | Ve 21/09 |
| AL, FB | Analyses physico-chimiques | Sem 38 et 39 |
| MHO | Compte-rendu | Sem 39 |

| Nom échantillon | Code | FMAR | MAT | Ca ²⁺ | MG |
|-------------------------|--------------------------------------|------|-----|------------------|----|
| Lait entier pasteurisé | 18-032-Essai-LP | x | x | | x |
| Rétentat FRV 5,5 | 18-032-Essai-R | x | x | x | x |
| PUF | 18-032-Essai-PUF | | x | | |
| Lot 1 avant congélation | 18-032-Essai-Lot1 | | x | x | x |
| Lot 2 avant congélation | 18-032-Essai-Lot2 | | x | X | x |
| Lot 1 après congélation | 18-032'Essai-Lot 1 après congélation | x | | | |
| Lot 2 après congélation | 18-032-Essai-Lot 2 après congélation | x | | | |

Préparation des fromages

Résultats : suivi de l'ultrafiltration

Heure début : 10h00 ; qté lait départ : 220kg ; FCV =5,5 ; qté rétentat : 40kg ; qté perméat : 180kg
 pH_{départ} : 6,50 ; T°C : 50°C

| Temps (minutes) | PA (bars) | PC (bars) | T° boucle (degrés) | Débit _p (l/h) | Débit _r (l/h) | Débit de recirculation (m ³ /h) | RMQ |
|-----------------|-----------|-----------|--------------------|--------------------------|--------------------------|--|--------------------------|
| 5 | 1 | 1,8 | 47 | - | 1042 | 30,66 | Vanne perméat fermée |
| 10 | 1 | 1,7 | 47 | 92,5 | 1002 | 30,65 | 2,370 |
| 15 | 1 | 1,8 | 47 | 84,5 | 1000 | 30,63 | 13,175 |
| 30 | 1 | 1,8 | 46,5 | 73,5 | 1017,9 | 30,63 | 30,520 |
| 45 | 1 | 1,8 | 46,7 | 70,5 | 1004,7 | 30,57 | 47,475 |
| 60 | 1 | 1,8 | 47 | 70,5 | 1011 | 30,55 | 61,85 |
| 75 | 1,1 | 1,9 | 47 | 65,9 | 1021 | 30,52 | 80,56 |
| 80 | 1,1 | 1,9 | 46 | 62,7 | 1032,9 | 30,53 | 97,250 |
| 95 | 1,1 | 2,0 | 46,8 | 60,8 | 1025 | 30,54 | 112,87 |
| 100 | 1,2 | 2,1 | 46,8 | 57,5 | 1031 | 30,60 | 127,03 |
| 115 | 1,3 | 2,2 | 46,8 | 50,6 | 1043 | 30,67 | 140,36 |
| 130 | 1,4 | 2,3 | 47,1 | 42,3 | 1067,5 | 30,77 | 153,055 |
| 145 | 1,6 | 2,6 | 48,6 | 33,4 | 1074,4 | 30,96 | 162,420 |
| 160 | 1,8 | 2,9 | 48,2 | 22,9 | 1128,2 | 31,17 | 169,590 |
| 175 | 2,0 | 3,2 | 48 | 16 | 1175 | 31,36 | 173,860 |
| 180 | 2,3 | 3,6 | 48,3 | 11 | 1232,8 | 31,64 | 177,545 |
| 195 | 2,7 | 3,9 | 48,1 | 9,4 | 1282,5 | 31,88 | 180 : arrêt <u>UF</u> |

Préparation des fromages

Résultats : analyses

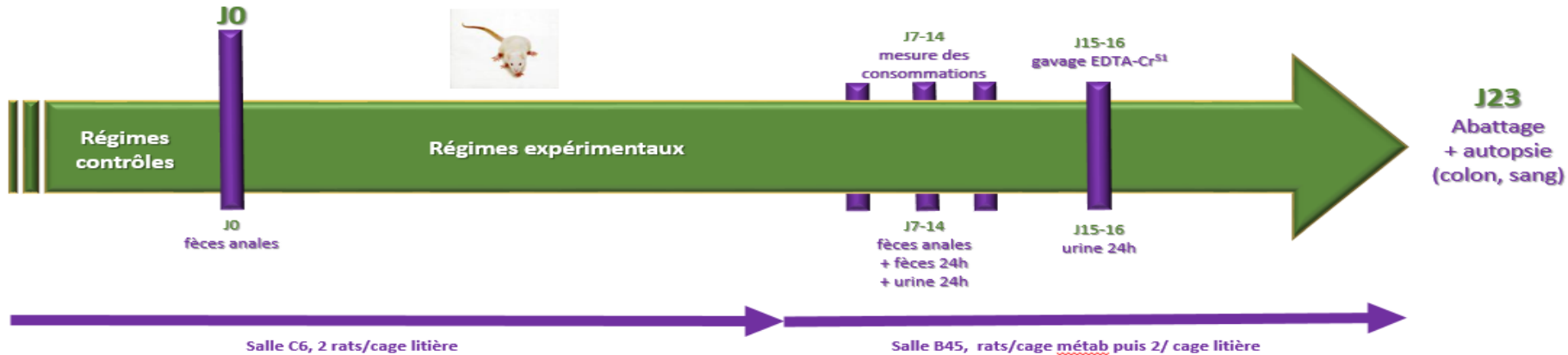
| Analyse réalisée | Produit analysé | | |
|------------------|-----------------|-------------|---------------|
| | Rétentat moyen | Lait entier | Perméat moyen |
| pH/T°C | 6,47/49,8 | 6,79/5,7 | - |
| EST (%) | 40,38 | 13,26 | 5,63 |
| MG (%) | 20,5 | 4 | 0 |
| MP (%) | 15,3 | 3,31 | 0.192 |
| G/S (%) | 50,7 | | |
| Ca (%) | 0,510 | | |
| ESD (%) | 19,88 | | |
| Ca/ESD (%) | 2,57 | | |

| | | | |
|-------------------------|--|------------------|-----------------------|
| Demandeur : | GJ | | Rendu le : 08/10/2018 |
| N° fiche projet | HèmeEntal | | Remis à : GJ |
| Analyste | B Camier | | |
| N° cahier labo et page | C23626 | | |
| Méthodes | | | |
| Analyse le | 01/10/2018 | | |
| Préparation Echantillon | 10gr+90 gr eau citraté/stomacher 6 min vit max | | |
| | Fromage mis en décongélation à 8h à 6°C Analyse à 16h | | |
| | | | |
| Code échantillon | Nom échantillon | Yela 6j/30°C ANA | |
| | | ufc/gr | |
| | Fromage | 7,6 10e8 | |

| Analyse réalisée | Produit analysé | |
|------------------|-----------------|-------|
| | Lot 1 | Lot 2 |
| EST (%) | 43,58 | 39,32 |
| MG (%) | 21 | 20 |
| MP (%) | 15,03 | 15,12 |
| G/S (%) | 48,18 | 50,86 |
| Ca (%) | 1,24 | 1,14 |
| ESD (%) | 22,58 | 19,32 |
| Ca/ESD (%) | 5,49 | 5,90 |

Expérimentation nutritionnelle court terme conduite à l'UMR ToxAlim

21 jours d'expérimentation nutritionnelle chez le rat F344



Biomarqueurs analysés sur les eaux fécales

- Peroxydation luminale : TBARS
- Concentration en fer héminique
- Activité cytotoxique testée sur des cellules épithéliales normales et pré-néoplasiques
- Activité génotoxiques testée sur des cellules épithéliales normales et pré-néoplasiques

Biomarqueur urinaire

- DHN-MA

Biomarqueur muqueux

- Myeloperoxydase
- Cytokines pro et anti-inflammatoire
- ARN des Protéines de jonction : ZO-1
- ARN de PPAR γ , COX2

Biomarqueurs sériques

- IL6, SAA

Protocole factoriel Hème x Calcium x Propio.

**Calcium sous deux formes: sel calcique et matrice fromagère
=> *protocole en 2x2x3= > 12 groupes expérimentaux***

- Groupe contrôle (sans hème, sans calcium, sans propionobactéries)
- Groupe hème (hémoglobine)
- Groupe calcium sous forme de sel calcique
- Groupe propionibactéries (par gavage)
- Groupe hème + calcium sous forme de sel calcique
- Groupe phosphate de calcium + propionobactéries (gavage)
- Groupe hème + propionibactéries (gavage)
- Groupe hème + phosphate de calcium + propionobactéries (gavage)

*Hème X calcium X propio.
2x2x2: 8 groupes*

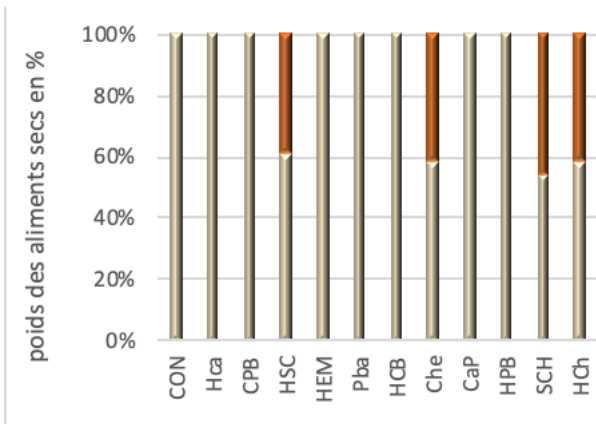
Les 4 groupes supplémentaires où le calcium est apporté par la matrice fromagère

- Groupe calcium intégré dans une matrice fromagère stérile
- Groupe hème + calcium intégré dans une matrice fromagère stérile
- Groupe [calcium + propionibactéries] intégré dans une matrice fromagère non stérile
- Groupe hème + [calcium et propionibactéries] intégrés dans une matrice fromagère non stérile

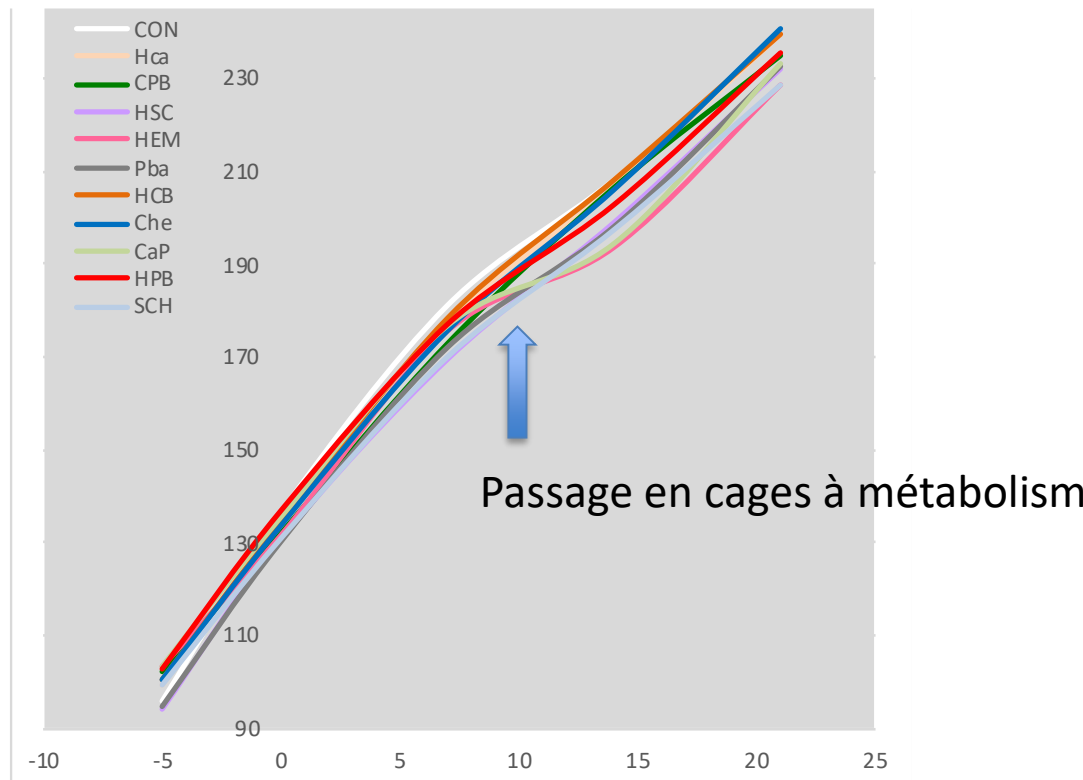
*... X matrice
fromagère*

Phase animale

- Régime contrôle semi-synthétique type AIN-76
- Régimes équilibrés, protéines, lipides, glucides et fer
- Matrice fromagère consommée « fraîche », renouvelée tous les jours et distribuée juste avant prise alimentaire.



Consommation : 40% de la MS consommée = matrice fromagère



Prise de poids:

Pas de différence significative entre les groupes

En cours

- Analyse des données de perméabilité intestinale
- Préparation des eaux fécales
- Extraction des ARN de la muqueuse colique

Merci de votre attention

