

L'ajout de vitamine E dans l'alimentation des porcs permet-il de prévenir le risque de développement d'un cancer colorectal chez le rat par rapport à un ajout direct dans la fabrication des produits ?

Nathalie NAUD (1), Florence BLAS-Y-ESTRADA (1), Martine CARLIER (2), Jean-Luc MARTIN (2), Edwin FOUCHE (1), Aurélie PROMEYRAT (2), Françoise GUERAUD (1), Gilles NASSY (2), Fabrice PIERRE (1)

(1) INRA UMR1331, TOXALIM, Université de Toulouse, ENVT, INP-Purpan, UPS, Toulouse, France

(2) IFIP-Institut du Porc, 35651 Le Rheu, France

aurelie.promeyrat@ifip.asso.fr

L'ajout de vitamine E dans l'alimentation des porcs permet-il prévenir le risque de développement d'un cancer colorectal chez le rat par rapport à un ajout direct dans la fabrication des produits ?

Fondée sur des études épidémiologiques, la consommation excessive de viandes transformées induit une augmentation faible, mais significative, du risque de développement d'un cancer colorectal. Cette étude vise à (i) évaluer l'effet d'un ajout de vitamine E dans l'aliment des porcs sur la prévention de la cancérogenèse colorectale chez les rats, nourris avec un régime à base de saucisses provenant d'animaux supplémentés (LE : 500 ppm de DL-alpha-tocophérol dans l'aliment) et (ii) comparer ces résultats avec ceux obtenus avec un régime à base de saucisses témoins (LT : 10 ppm de DL-alpha-tocophérol dans l'aliment) et avec deux autres régimes où une vitamine E, hydrosoluble ou liposoluble, est apportée lors de la fabrication des saucisses (LTH ou LTL : respectivement, 500 ppm dans la méléée). Les mesures réalisées sur les viandes montrent un indice de rouge plus élevé ($P = 0,03$) en faveur de celles provenant de porcs supplémentés (LE). La supplémentation augmente d'un facteur 2,6 la teneur en vitamine E des saucisses (LE vs LT). Sur les quatre lots de saucisses, les taux de fer héminique et de peroxydation lipidique ne sont pas significativement différents. L'étude sur 50 rats chimio-induits (modèle animal de carcinogenèse colorectale), répartis en quatre groupes expérimentaux plus un groupe contrôle négatif sans saucisse, montre que les lésions précancéreuses coliques et les biomarqueurs fécaux sont plus faibles quand la vitamine E est ajoutée lors de la fabrication, avec un effet significatif sur l'activité cytotoxique ($P < 0,05$). Toutefois, la stratégie alimentaire en phase d'élevage n'a été réalisée qu'avec une supplémentation réelle en vitamine E de + 366 ppm contre + 500 ppm au moment de la fabrication qui pourrait expliquer ces différences.

Does the vitamin E supplementation in pig diet allow to prevent the risk of developing colorectal cancer in rats compared to a direct addition at the preparation of meat products?

Based on epidemiological studies, excessive consumption of processed meats induces a slight, but significant, increase in the risk of developing colorectal cancer. This study aimed to (i) determine effects of adding vitamin E to pig feed on preventing colorectal carcinogenesis in rats fed a sausage-based diet from supplemented animals (LE: 500 ppm of DL-alpha-tocopherol in the diet) and (ii) compare these results to those obtained with a diet composed of a control sausages (LT: 10 ppm of DL-alpha-tocopherol in the diet) and to those of two other diets for which water- or fat-soluble vitamin E was added directly at the preparation of sausages (LTH or LTL, respectively: 500 ppm in the meat stuffing). Measurements of pork showed a higher red index ($P = 0.03$) in favour to those from supplemented animals (LE). Supplementation increased the vitamin E content of sausages by a factor of 2.6 (LE vs LT). Among the four batches sausages, no significant differences in levels of heme-iron and lipid peroxidation were observed. Study on 50 carcinogen-induced rats (animal model of colorectal carcinogenesis), divided among four experimental groups and a negative control group without sausage, showed fewer a colonic precancerous lesion numbers and faecal biomarkers when vitamin E is added during the preparation of the meat products with a significant effect on cytotoxic activity ($P < 0.05$). However, nutritional strategy at the rearing phase was only performed with a real vitamin E supplementation from + 366 ppm against + 500 ppm at the processing time that could explained these differences.

INTRODUCTION

Les recommandations nutritionnelles données par le World Cancer Research Fund (WCRF) suggèrent de réduire la consommation de viande rouge et d'éviter la consommation de produits transformés. La relation entre viandes/produits transformés et cancer colorectal (CRC) proviendrait du fer héminique, agissant comme catalyseur des réactions de peroxydation responsables de la promotion de la carcinogenèse colique (Bastide *et al.*, 2015). Le tractus digestif est en effet un milieu favorable à la production des composés *N*-nitrosés, compte tenu de l'environnement physico-chimique, de la libération de peptides, d'acides aminés par les protéases digestives (De La Pomélie *et al.*, 2017, 2018), et il est également propice à la formation d'aldéhydes issus de la peroxydation lipidique. Quant aux procédés de transformation, ils n'ajouteraient que de nouveaux agents cancérigènes ou augmenteraient les quantités déjà présentes. Par exemple, le sel nitrité, ajouté pour son rôle antibactérien et pour son action antioxydante, pour le développement de couleur et de saveur spécifique des produits transformés, est associé, au même titre que le fer héminique, à une forte nitrosation-nitrosylation, peroxydation colique et une activité cytotoxique fécale. Ces substances cancérigènes joueraient un rôle dans la promotion des lésions préneoplasiques type FCA (foyers de cryptes aberrantes) et FRM (foyer réduit en mucine) coliques observées chez le rat chimio-induit. Les études épidémiologiques récentes confirment le rôle promoteur du fer héminique sur la carcinogenèse colorectale chez l'Homme (Bastide *et al.*, 2016)

Afin de réduire ces effets, les antioxydants apportés par l'alimentation limiteraient la formation de ces substances cancérigènes (Agnoli *et al.*, 2013 ; Kanner *et al.*, 2017). L'ajout de vitamine E lors de la fabrication des produits transformés permet de normaliser la nitrosylation et la peroxydation luminale. Dans ce sens, les études épidémiologiques et expérimentales ont permis de démontrer que les antioxydants, respectivement issus du régime ou ajoutés dans les produits transformés, limitent l'effet promoteur de l'hème (Bastide *et al.*, 2016 ; Pierre *et al.*, 2013). De plus, une supplémentation supra nutritionnelle en vitamine E dans la ration des porcs de 500 ppm réduit la peroxydation dans le salami et la formation de nitrosamines observées après digestion *in vitro* (Meineri *et al.*, 2013).

L'objectif de cette étude est donc d'évaluer l'impact de différents modes d'administrations et formes d'apports en vitamine E sur la modulation de la cancérogenèse chez le rat chimio-induit après consommation de saucisses : lorsque la vitamine E est ajoutée indirectement dans la ration des porcs (phase d'élevage) ou directement sous forme hydrosoluble ou liposoluble lors de la fabrication des saucisses. Cette étude propose une démarche de l'élevage des animaux jusqu'à l'aliment.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1 Etude expérimentale sur les porcs

Deux lots de 30 porcs (15 mâles castrés et 15 femelles) de génétique (Piétrain) x (Large White x Landrace) de poids initial moyen de 93 kg ont été mis en essai à la station IFIP de Romillé (35) et ont reçu pendant 39 jours des aliments expérimentaux avant d'être abattus à un poids moyen de 128 kg.

Les porcs ont été sexés et répartis dans quatre cases, puis nourris *ad libitum* avec l'un des deux régimes. Les animaux témoins ont été nourris avec un aliment finition standard (9,6 MJ d'énergie nette, 7 g/kg de lysine digestible, 14 % de protéines, 2 % de lipides, 5 % de celluloses brutes) avec une teneur classique en DL-alpha-tocophérol de 10 ppm. Les animaux expérimentaux ont été nourris avec le même aliment finition standard plus une teneur supra nutritionnelle de DL-alpha-tocophérol de 500 ppm. Au démarrage de l'essai, une analyse de la teneur en vitamine E est réalisée sur les deux aliments pour déterminer la concentration réelle en vitamine. Les résultats montrent un écart entre les quantités ajoutées et les valeurs analysées. Le régime témoin présente un taux de vitamine E de 32 ppm contre 10 ppm ajoutés. Cet écart peut s'expliquer par la présence de vitamine E sous forme naturelle dans les céréales qui serait au minimum de 22 ppm. Le régime supplémenté contient 388 ppm de vitamine E contre 500 ppm ajoutés : soit un apport vitaminique de + 366 ppm (388 ppm – 22 ppm des céréales). Ce résultat surprenant proviendrait des pertes en vitamines au moment de la granulation de l'aliment.

A l'abattoir les données de classement sont relevées. Les pH1 et pH ultime sont mesurés (pH mètre SYDEL, électrode Mettler Toledo LoT406-M6- DXKS7/25) au niveau du *semimembranosus*. Les indices de couleur, « L* » (luminosité), « a* » (rouge) et « b* » (jaune) ont été mesurés (Minolta CR300, D65, sans « blooming ») au niveau du *gluteus medius* le lendemain de l'abattage et immédiatement après la séparation du jambon de la longe lors de la découpe primaire. Une mesure d'exsudat a été effectuée en quantifiant les pertes en eau entre 24 et 48 h après abattage sur le *gluteus medius*. Enfin, des prélèvements de viande maigre (épaule découennée et désossée) et de tissu gras issu de la bardièrre découennée ont été effectués pour l'élaboration de saucisses pour l'étude nutritionnelle sur les rats.

1.2 Fabrication des saucisses pâte fine

Quatre fabrications de saucisses ont été réalisées à l'IFIP : une à partir d'épaules et de gras de bardières issues de porcs supplémentés en vitamine E (LE) et trois autres avec des épaules et du gras de bardières provenant d'animaux témoins (LT), dont deux d'entre elles avec incorporation d'une vitamine E hydrosoluble (LTH, + 500 ppm) ou liposoluble (LTL, + 500 ppm) (Tableau 1).

Tableau 1 – Fabrication des saucisses (g/100 g)

Régime finition :	Témoin			Enrichi en vit. E
Lot	LT	LTH	LTL	LE
Epaule	55,70	55,70	55,70	55,70
Glace	13,60	13,40	13,50	13,60
Gras de bardièrre	27,50	27,50	27,50	27,50
Sel nitrité	1,70	1,70	1,70	1,70
Polyphosphates	0,50	0,50	0,50	0,50
Lactose	1,00	1,00	1,00	1,00
Erythorbate de sodium	0,05	0,05	0,05	0,05
Vitamine E 500BG	-	0,10	-	-
Covitol F1300	-	-	0,60	-

Tous les ingrédients sont mixés à l'aide d'un cutter-mélangeur CDH jusqu'à l'obtention d'une température finale de mûlêe de 15°C. Les mûlêes sont embossées sous boyaux collagéniques de 25-26 mm de diamètre.

Les saucisses sont ensuite placées dans un four FRIMA à vapeur (100% d'humidité) pour réaliser un étuvage pendant 45 min à 55°C et un 2^{ème} traitement thermique pendant 25 min à 71°C. Après refroidissement des saucisses dans une chambre froide, un conditionnement en sachet sous vide est réalisé, avant un stockage au congélateur jusqu'à réalisation des analyses et de l'étude nutritionnelle sur rats. Trois séries de fabrication par lot de saucisses ont été réalisées pour assurer un approvisionnement continu pour l'expérimentation sur rats pendant 100 jours en partant d'une consommation de base de 30 g de saucisses/rat/jour. Sur les trois séries de fabrication des quatre lots de saucisses, des analyses ont été réalisées pour, d'une part, évaluer le taux d'enrichissement en vitamine E des saucisses issues d'animaux supplémentés en vitamine E (LE) vs animaux témoins (LT) avec ou sans ajout de vitamine E lors de la fabrication (LTH et LTL) et, d'autre part, pour quantifier les teneurs initiales en fer héminique totaux (FeH), fer nitrosylé (FeHNO) et le potentiel de peroxydation. La vitamine E a été quantifiée selon la norme NF EN 12822 (Janvier 2001). Les teneurs en pigments héminiques totaux et nitrosylés ont été analysées selon la méthode de Hornsey (1956). Le potentiel de peroxydation des lipides des saucisses a été réalisé selon la méthode des sr-TBA (substances réactives à l'acide thiobarbiturique) décrite par Witte *et al.* (1970).

1.3 Etude nutritionnelle sur rats

1.3.1 Dispositif expérimental et alimentation des rats

Cette étude évalue l'impact de différentes formes d'apports et modes d'administrations en vitamine E dans la charcuterie sur la modulation des biomarqueurs précoces de la carcinogenèse après consommation de saucisses par des rats : lorsque la vitamine E est apportée sous forme hydrosoluble ou liposoluble directement dans la saucisse ou indirectement par de la vitamine E ajoutée dans la ration des porcs. Cette expérimentation animale a été réalisée avec 50 rats Fisher F344 (Iffa-Credo, Lyon, France), âgés de 6 semaines. Les rats ont été nourris durant 2 jours avec un régime témoin de type AIN76 (American Institute of Nutrition, 1977) et une injection d'azoxyméthane (20 mg/kg i.p.; Sigma Chemical) a été réalisée pour initier la cancérogenèse colorectale. Une semaine après cette injection, les régimes expérimentaux ont été distribués quotidiennement durant 100 jours à 17h00. Les rats ont été répartis en cinq groupes de 10 individus qui ont eu un accès *ad libitum* aux régimes expérimentaux : 1) un régime contrôle négatif, sans saucisse (CON-), 2) un régime avec les saucisses témoins (LT), 3) un régime composé de saucisses enrichies en vitamine E hydrosoluble, ajoutée pendant la fabrication (LTH), 4) un régime contenant des saucisses enrichies en vitamine E liposoluble ajoutée pendant la fabrication (LTL), 5) un régime avec des saucisses fabriquées à partir de viandes issues de porcs alimentés avec un supplément en vitamine E (LE).

1.3.2 Analyse des lésions préneoplasiques (FCA)

A la fin de l'expérimentation, les rats sont sacrifiés au CO₂ et les côlons prélevés pour le dénombrement des foyers de cryptes aberrantes (FCA), après coloration au bleu de méthylène (0,05% dans de l'eau distillée). Le comptage se fait sous microscope par un opérateur, en aveugle.

1.3.3 Analyse d'un biomarqueur luminal (sr-TBA)

Les eaux fécales, contenant la fraction bio-disponible et active des fèces en contact avec la muqueuse colique, ont été préparées à partir de fèces de 24 h, récupérées individuellement à J13-J14.

Les fèces sont homogénéisées au Fast-Prep (broyeur à billes en tubes 15 mL) : 0,40 g de fèces mélangées avec 1 mL d'eau distillée et 50 µL de BHT à 0,45 M. Le surnageant récupéré après centrifugation correspond à l'eau fécale. Il est aliquoté pour les dosages de sr-TBA selon la méthode décrite par Pierre *et al.* (2013).

1.3.4 Activité cytotoxique des eaux fécales

L'activité cytotoxique a été évaluée sur des cellules saines de l'épithélium colique murin, APC +/+, et sur les cellules mutées sur le gène APC (APC min/+, la mutation APC représentant une mutation initiatrice du cancer du côlon dans 75% des cas humains). Ces cellules sont conditionnellement immortalisées : proliférantes à 33°C en présence d'interféron gamma (IFN γ) et de facteur de croissance (EGF) et non proliférantes à 37°C. Les cellules sont ensemencées (10⁴ cellules par puits dans des plaques de 96 puits) dans un milieu DMEM puis cultivées en condition permissive à 33°C en présence d'IFN γ et d'EGF. A 80% de confluence, elles sont mises en conditions non permissives (sans IFN γ ni EGF et à 37°C). Les eaux fécales, diluées au 1/10^{ème} dans du milieu DMEM et filtrées (0,22 µm), sont déposées sur les cellules dans les puits. Vingt-quatre heures après, l'activité cytotoxique est mesurée selon la méthode décrite par Pierre *et al.* (2007) par spectrophotométrie à 570 nm et 690 nm. La viabilité des cellules est exprimée en pourcentage de l'absorbance des puits traités par rapport aux puits contrôles, contenant uniquement du milieu DMEM.

1.4 Traitement statistique

Les données concernant l'expérimentation sur les porcs et les analyses sur les saucisses ont été traitées selon la procédure GLM sur le logiciel SAS (v9.4, Inst. Inc. Cary, NC). Pour les mesures de qualité des viandes, l'unité expérimentale est le porc avec un effet fixe le régime finition des porcs avec deux modalités. Pour la caractérisation des saucisses, l'unité expérimentale correspond aux séries de saucisses avec en effet fixe le lot de saucisses avec quatre modalités. Pour l'étude sur rats, une analyse de variance a été réalisée avec le logiciel GrahPad Prism. L'unité expérimentale est le rat avec en effet fixe le régime alimentaire avec cinq modalités. Si une différence significative est trouvée entre les régimes ($P < 0,05$), un test de Dunnett est effectué.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

L'essai ne permet pas de mesurer l'incidence de la supplémentation en vitamine E sur les performances zootechniques des porcs.

2.1 Mesures de la qualité de la viande

Concernant les mesures de la qualité de la viande, seul l'indice de rouge est influencé par l'enrichissement en vitamine E (Tableau 2). Une augmentation de 9% du « a* » est observée en faveur du régime finition enrichi en vitamine E. Des résultats similaires ont été observés par Asghar *et al.* (1991) qui montrent des valeurs d'indice de rouge supérieures dans des viandes issues d'animaux nourris avec un aliment supplémentés avec 200 ppm de vitamine E par rapport à celles provenant de porcs nourris avec un aliment supplémenté à 10 ppm.

La vitamine E est communément utilisée dans la ration des animaux, et son effet sur la couleur est expliqué par son action

antioxydante qui retarde l'oxydation de l'oxymyoglobine et des acides gras insaturés (lipoperoxydation) (Jiang et Xiong, 2016).

Tableau 2 – Mesures de qualité de la viande

Régime finition :	Témoïn	Enrichi en vit. E	ETR ¹	P-value ¹
pH1	6,2	6,2	0,23	0,73
pH24	5,7	5,7	0,16	0,24
L*	49,1	50,2	4,18	0,34
a*	11,4	12,5	1,72	0,03
b*	9,2	9,5	1,64	0,58
Exsudat (%)	6,1	6,5	3,80	0,69

¹ETR : écart-type résiduel ; analyse de variance avec le porc en unité expérimentale et le régime de finition en effet fixe.

2.2 Composition des saucisses

Des analyses ont été réalisées sur les quatre lots de saucisses (Tableau 3). Elles permettent d'évaluer les quantités initiales en catalyseurs (FeH), inhibiteurs (Vit. E) des réactions à l'origine de formation de composés *N*-nitrosés (dont le FeHNO) et d'estimer le potentiel de peroxydation des lipides (sr-TBA).

Tableau 3 – Composition des saucisses

Régime finition	Témoïn			Enrichi en vit. E	Statistiques ¹	
	LT	LTH	LTL		ETR	P
Lot						
Vit. E, mg/kg	5,1 ^a	504,1 ^b	521,7 ^b	12,6 ^a	3,5	0,00
sr-TBA, mg MDA/kg	0,17	0,20	0,20	0,20	0,06	0,86
FeH, mg/kg	55,3	54,7	55,0	63,0	3,6	0,06
FeHNO, mg/kg	21,3	27,0	32,0	36,7	7,7	0,16

¹ETR : écart-type résiduel ; analyse de variance avec les séries de saucisses en unité expérimentale ($n = 12$) et un effet du lot avec quatre modalités ; sur une ligne donnée, les moyennes par lot affectées de lettres différentes (*a* ou *b*) en exposant sont significativement différentes au seuil de 5%. Sur chaque ligne, les moyennes sont obtenues à partir des valeurs des trois séries de fabrication de chaque lot de saucisses.

Les teneurs en vitamine E sont différentes en fonction de l'enrichissement direct ou indirect avec des valeurs plus élevées pour un ajout de vitamine E lors de la fabrication des lots LTH et LTL ($P < 0,001$). Cette différence est attendue car lors d'une supplémentation en vitamine E en phase d'élevage, seule une fraction de la vitamine ingérée, absorbée par l'organisme, se retrouve au niveau des tissus cibles (foie, muscle, tissu adipeux). Egalement, un écart est observé entre les quantités de vitamine E apportée indirectement par l'alimentation et directement lors de la fabrication : avec un apport réel de vitamine E de + 366 ppm dans la ration des animaux contre + 500 ppm lors de la fabrication des saucisses. Toutefois, cette supplémentation supra-nutritionnelle dans la ration des animaux permet d'augmenter d'un facteur 2,5 le taux de vitamine E par comparaison avec la valeur obtenue sur les saucisses fabriquées avec les animaux témoins, lot (LT). Ce résultat, bien que non significatif dans un modèle statistique complet, concorde avec les observations antérieures. Monahan *et al.* (1990) observent des valeurs plasmatiques et tissulaires en vitamine E 2,5 à 3,0 fois supérieures chez des porcs supplémentés à hauteur de 160 ppm en vitamine E par rapport à ceux nourris avec un régime témoin. Les recommandations nutritionnelles en vitamine E dans les élevages porcins traditionnels sont de 15 à 40 mg/kg d'aliment (Jensen *et al.*, 1998).

Asghar *et al.* (1991) observent chez des porcs supplémentés en vitamine E à hauteur de 100 UI/kg d'aliment par rapport à des

porcs témoins avec un apport 10 UI/kg, une augmentation d'un facteur 2,7 de la teneur en vitamine E dans le tissu adipeux, d'un facteur 5,0 dans le tissu musculaire, et dans une plus grande proportion dans les mitochondries ($\times 8,3$) et dans les microsomes des muscles ($\times 2,5$). La vitamine E est associée aux biomembranes et son action antioxydante protège les lipides membranaires de l'oxydation. Deux formes de vitamine E, une hydrosoluble et une autre liposoluble, sont testées sur deux lots (LTH et LTL). Les teneurs en sr-TBA ne sont pas significativement différentes entre les deux formes de vitamine E incorporées lors de la fabrication des saucisses (LTH vs LTL). Le mode d'administration de la vitamine E direct vs indirect n'a pas d'effet sur le niveau initial des sr-TBA (LT vs LE). Concernant le fer non nitrosylé, une légère tendance est observée avec les saucisses du lot LE, qui présentent une teneur en FeH plus élevée de 14% par rapport aux autres fabrications. Sur le fer nitrosylé (FeHNO), l'analyse statistique ne révèle aucune différence significative entre les quatre lots de saucisses. A partir de ces deux données, un pourcentage de nitrosylation est calculé. Il représente une part significative des composés *N*-nitrosés. Les résultats montrent un pourcentage de nitrosylation de 58% pour les lots LTL et LE contre 48% et 38%, respectivement pour les lots LTH et LT ($P = 0,24$). Les analyses montrent que seule la teneur en vitamine E varie significativement.

2.3 Etude nutritionnelle sur les rats

Le poids des rats est relevé chaque semaine et des différences significatives ($P < 0,05$) entre les régimes expérimentaux sont observées (résultats non présentés). Précisément, les régimes LT et LE augmentent de 15% (respectivement, 434 ± 42 g et 424 ± 31 g) la prise de poids des rats par rapport au régime contrôle (372 ± 10 g). Les régimes LTH et LTL n'induisent pas d'augmentation significative de prise de poids par rapport au contrôle (respectivement, 393 ± 31 g et 396 ± 18 g). Les régimes expérimentaux à base de saucisses et le régime contrôle sont basés sur une équivalence énergétique avec des teneurs respectives en protéines de 38% et 35%, en lipides de 21% et 20%, et glucides de 36% et 42%.

2.3.1 Formation des lésions préneoplasiques (FCA)

La figure 1 présente l'effet des cinq régimes alimentaires sur la formation de lésions préneoplasiques sur les colons des rats. Les lésions préneoplasiques de type FCA se forment à partir de la muqueuse normale après initiation de la carcinogenèse. Elles peuvent contenir deux à plus de vingt cryptes aberrantes qui peuvent évoluer en adénocarcinomes (tumeur maligne). Sur ce paramètre FCA, aucune différence significative n'a été observée entre les cinq régimes expérimentaux (Figure 1A). Premièrement, les régimes à base de saucisses n'ont pas induit une augmentation significative du nombre de FCA. Deuxièmement, la supplémentation en vitamine E, directe vs indirecte, et la forme d'enrichissement lors de la fabrication, hydrosoluble vs liposoluble, n'ont pas induit de réduction significative du nombre de FCA (Figure 1A). Certains résultats non significatifs, sont intéressants à relever, car en accord avec des travaux précédent (Pierre *et al.*, 2013). Notamment, le régime saucisse témoin LT induit une augmentation du nombre de FCA (Figure 1A) et du nombre de cryptes aberrantes (Figure 1B), un paramètre assimilable à la surface lésionnelle, et du nombre de gros FCA par colon (Figure 1C) par rapport au régime contrôle.

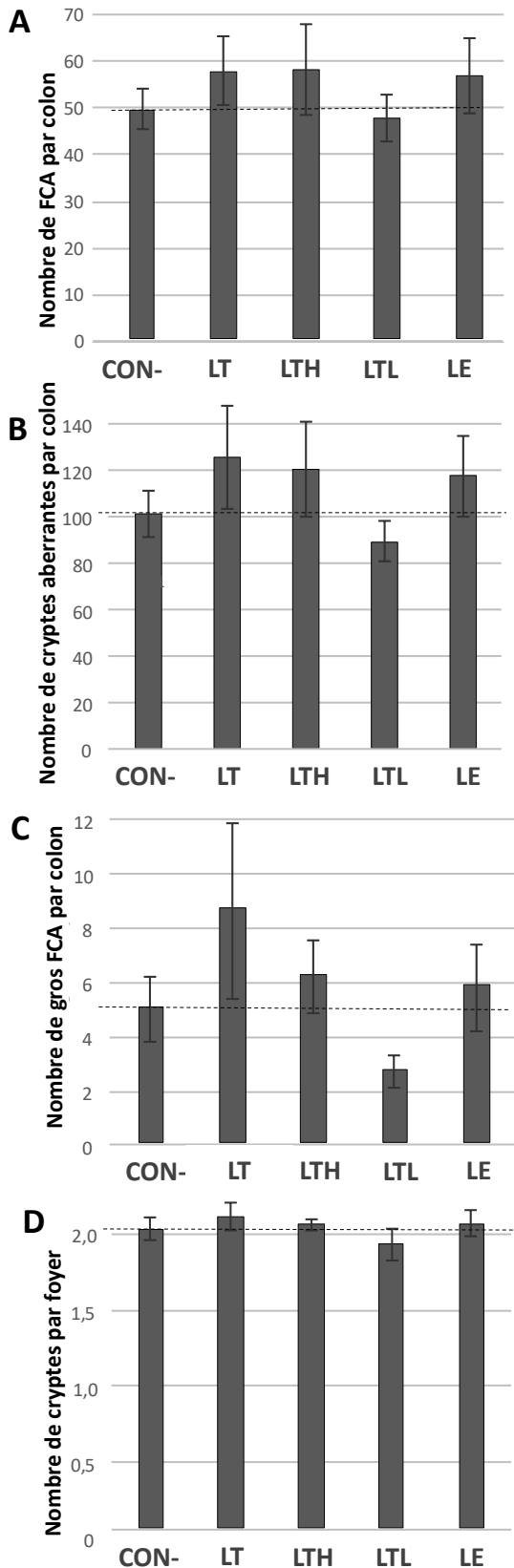


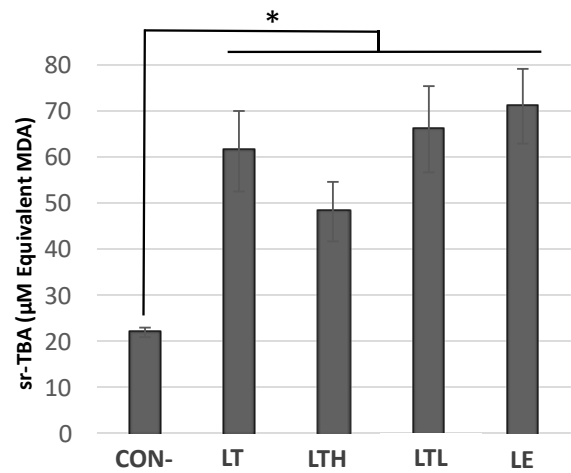
Figure 1 - Nombre (A) de lésions par colon ($P = 0,73$), (B) de cryptes par colon ($P = 0,48$), (C) de grosses lésions par colon ($P = 0,14$) et (D) de cryptes par lésion ($P = 0,58$)

Un gros FCA correspond à un foyer contenant plus de trois cryptes, un paramètre corrélé au risque d'apparition d'adénomes et adénocarcinomes coliques. Par comparaison avec LT, les régimes LTH et LE ne modifient pas le nombre de FCA (Figure 1A), le nombre de cryptes aberrantes par foyer (Figure 1D) ni le nombre de cryptes aberrantes par colon (Figure 1B). Par contre, le régime LTL tend à diminuer ces quatre paramètres par rapport aux autres régimes.

Avant d'établir des conclusions sur l'efficacité de ces traitements, ces résultats seront comparés avec un autre type de lésions, les foyers réduits en mucine (FRM). Les études réalisées sur les rongeurs montrent que les FRM sont de meilleurs prédicteurs du CRC (Bastide *et al.*, 2017). Les FRM sont moins nombreux que les FCA, donc les résultats plus cohérents avec le nombre de tumeurs observées sur un côlon (plus de cent FCA contre moins de dix FRM et environ deux tumeurs par côlon en moyenne) (Bastide, 2012).

2.3.2 Effet des régimes expérimentaux sur sr-TBA luminaux

La promotion du CRC induite par la consommation de produits transformés est associée à une augmentation de sr-TBA (Bastide *et al.*, 2017). Les régimes à base de saucisses induisent une augmentation significative de la peroxydation luminale, sans impact du lot de saucisse (Figure 2). Bien que, un taux de peroxydation lipidique plus faible est observé en faveur du régime LTH.

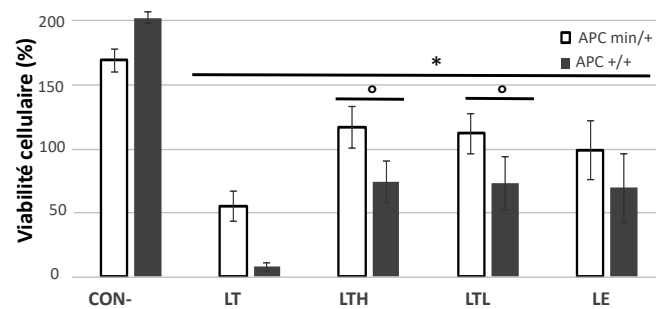


(*) Significativement différent du groupe CON- ($P < 0,0001$)

Figure 2 – Peroxydation lipidique des eaux fécales

2.3.3 Activité cytotoxique

La mutation du gène APC est un évènement précoce lors de la cancérogenèse colorectale. La figure 3 montre que la consommation des quatre lots de saucisses est associée à une augmentation de l'activité cytotoxique, caractérisée par une diminution de la viabilité cellulaire suite au traitement par des eaux fécales, avec un effet plus important pour les eaux fécales du régime LT. L'ajout de vitamine E lors de la fabrication des saucisses, régimes LTH et LTL, diminue significativement l'activité cytotoxique par rapport au régime LT. La vitamine E ajoutée pendant la phase d'élevage n'a pas d'impact significatif malgré une légère baisse de l'activité cytotoxique.



(*) Significativement différent du régime CON-, (°) significativement différent de LT, ($P_{APC+/+} < 0,0001$ et $P_{APC\ min/+} = 0,003$)

Figure 3 – Activité cytotoxique des eaux fécales.

CONCLUSION

Ce projet propose pour la première fois une démarche de l'élevage jusqu'à l'aliment en vue d'apporter quelques éléments de réponse concernant l'efficacité d'une supplémentation supra nutritionnelle vitaminique dans la ration des animaux sur la modulation des phases précoces de la cancérogenèse colorectale des rats nourris pendant 100 jours avec des régimes à base de produits transformés. Les bases des résultats obtenus jusqu'à maintenant ne permettent pas de soutenir l'hypothèse initiale sur l'efficacité d'une supplémentation supra nutritionnelle en vitamine E dans la ration des animaux au moment de la phase d'élevage. Ces données ne mettent pas en évidence une différence significative entre les effets des différents régimes sur les lésions précancéreuses. Ces effets devront donc être complétés avec une recherche de biomarqueurs plus pertinents de la cancérogenèse colorectale afin d'être en mesure de confirmer ou non les hypothèses proposées par Meineri *et al.* (2013). Ces auteurs suggéraient un meilleur effet protecteur de la vitamine E quand elle est apportée dans la ration des animaux, malgré une quantité de vitamine E supérieure dans le produit final lorsque la vitamine E est rajoutée pendant la fabrication. Cette différence de résultats

entre les travaux de Meineri *et al.* (2013) et notre étude peut être expliquée par une supplémentation différente en vitamine E, lors de la phase d'élevage, en termes de concentration (+ 500 ppm vs + 366 ppm au réel) et de durée (2 mois vs 1 mois). Toutefois, certains effets intéressants sont observés en faveur d'un enrichissement direct en vitamine E dans la mèche qui permet de réduire le nombre de lésions préneoplasiques. Plus particulièrement, l'activité cytotoxique des eaux fécales des rats confirme l'effet protecteur de la vitamine E ajoutée au moment de la fabrication. Enfin, les résultats de cette étude, certes non significatifs, confirment ceux précédemment obtenus avec une charcuterie modèle maigre de type épaule où la supplémentation pendant la fabrication limitait significativement l'effet promoteur et la peroxydation (Pierre *et al.*, 2013).

REMERCIEMENTS

Ce travail a été mené avec l'appui financier de France Agrimer et de APRIVIS. Les phases d'élevage des porcs et de fabrication des saucisses ont été réalisées par l'IFIP. Les expérimentations sur rats et l'analyse des biomarqueurs ont été conduites à l'INRA. Les auteurs remercient Éric Gault, Didier Gaudré et Thierry Lhommeau de l'IFIP pour leur collaboration.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Agnoli C., Grioni S., Sieri S., Palli D., Masala G., Sacerdote C., Vineis P., Tumino R., Giurdanella M.C., Pala V., Berrino F., Mattiello A., Panico S., Krogh V., 2013. Italian mediterranean index and risk of colorectal cancer in the Italian section of the EPIC cohort. *Int. J. Cancer*, 132, 1404–1411.
- American Institute of Nutrition, 1977. Report of the American Institute of Nutrition ad hoc committee on standards for nutritional studies. *J. Nutr.*, 107, 1340-1348.
- Asghar A., Gray J.I., Booren A.M., Gomaa E.A., Abouzied M.M., Miller E.R., Buckley D.J., 1991. Effects of supranutritional dietary vitamin E levels on subcellular deposition of α -tocopherol in the muscle and on pork quality. *J. Sci. Food Agric.*, 57, 31–41.
- Bastide N.M., 2012. Fer héminique et Cancérogenèse colorectale : Etude des Mécanismes et Recherche de Stratégies Préventives. Thèse de doctorat. Université de Toulouse, Toulouse, 198 p.
- Bastide N.M., Naud N., Nassy G., Vendevre J.-L., Taché S., Guéraud F., Hobbs D.A., Kuhnle G.G., Corpet D.E., Pierre, F.H., 2017. Red Wine and Pomegranate Extracts Suppress Cured Meat Promotion of Colonic Mucin-Depleted Foci in Carcinogen-Induced Rats. *Nutr. Cancer*, 69, 289–298.
- Bastide N.M., Morois S., Cadeau C., Kangas S., Serafini M., Gusto G., Dossus L., Pierre F.H., Clavel-Chapelon F., Boutron-Ruault M.C., 2016. Heme Iron Intake, Dietary Antioxidant Capacity, and Risk of Colorectal Adenomas in a Large Cohort Study of French Women. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 25(4), 640-647.
- Bastide N.M., Chenni F., Audebert M., Santarelli R., Taché S., Naud N., Baradat M., Jouanin I., Surya R.Z., Hobbs D.A., Kuhnle G.C., Raymond-Letron I., Gueraud F., Corpet D.E., 2015. A central role for heme iron in colon carcinogenesis associated with red meat intake. *Cancer Res.*, 75, 870-879.
- De La Pomélie D., Santé-Lhoutellier V., Gatellier P., 2018. Mechanisms and kinetics of heme iron nitrosylation in a gastro-intestinal model. *Food Chem.*, 239, 86-93.
- De La Pomélie D., Santé-Lhoutellier V., Gatellier P., 2017. Mechanisms and kinetics of tryptophan N-nitrosation in a gastro-intestinal model. *Food Chem.*, 218, 487-495.
- Hornsey H.C., 1956. The colour of cooked cured pork. I.—Estimation of the nitric oxide-haem pigments. *J. Sci. Food Agric.*, 7, 534–540.
- Jensen C., Lauridsen C., Bertelsen G., 1998. Dietary vitamin E: Quality and storage stability of pork and poultry. *Trends Food Sci. Technol.*, 9, 62-72.
- Jiang J., Xiong Y.L., 2016. Natural antioxidants as food and feed additives to promote health benefits and quality of meat products: A review. *Meat Sci.*, 120, 107-117.
- Kanner J., Selhub J., Shpaizer A., Rabkin B., Shacham I., Tirosh O., 2017. Redox homeostasis in stomach medium by foods: The Postprandial Oxidative Stress Index (POSI) for balancing nutrition and human health. *Redox Biol.*, 12, 929-936.
- Meineri G., Medana C., Giancotti V., Visentin S., Peiretti P.G., 2013. Effect of dietary supplementation of vitamin E in pigs to prevent the formation of carcinogenic substances in meat products. *J. Food Compos. Anal.*, 30, 67-72.
- Monahan F.J., Buckley D.J., Morrissey P.A., Lynch P.B., Gray J.I., 1990. Effect of dietary α -tocopherol supplementation on α -tocopherol levels in porcine tissues and on susceptibility to lipid peroxidation. *Food Sci. Nutr. N.*, 203-212.
- Pierre F.H., Martin O.C., Santarelli R.L., Taché S., Naud N., Guéraud F., Audebert M., Dupuy J., Meunier N., Attaix D., Vendevre J.-L., Mirvish S.S., Kuhnle G.C., Cano N., Corpet D.E., 2013. Calcium and α -tocopherol suppress cured-meat promotion of chemically induced colon carcinogenesis in rats and reduce associated biomarkers in human volunteers. *Am. J. Clin. Nutr.*, 98, 1255-1262.
- Pierre F., Tache S., Guéraud F., Rerole A.L., Jourdan M.L., Petit C., 2007. Apc mutation induces resistance of colonic cells to lipoperoxide-triggered apoptosis induced by faecal water from haem-fed rats. *Carcinogenesis*, 28(2), 321-327.
- Witte V.C., Krause G.F., Bailey M.E., 1970. A new extraction method for determining 2-Thiobarbituric acid values of pork and beef during storage. *J. Food Sci.*, 35, 582-585.