



HAL
open science

Contaminants alimentaires et cancer colorectal : études mécanistiques de multiples voies de cancérogenèse (génotoxicité, reprogrammation métabolique) selon la susceptibilité génétique

Liana Arnaud

► To cite this version:

Liana Arnaud. Contaminants alimentaires et cancer colorectal : études mécanistiques de multiples voies de cancérogenèse (génotoxicité, reprogrammation métabolique) selon la susceptibilité génétique. Sciences agricoles. Institut National Polytechnique de Toulouse - INPT, 2021. Français. NNT : 2021INPT0096 . tel-04556679

HAL Id: tel-04556679

<https://theses.hal.science/tel-04556679v1>

Submitted on 23 Apr 2024

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.



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (Toulouse INP)

Discipline ou spécialité :

Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

Présentée et soutenue par :

Mme LIANA ARNAUD

le jeudi 28 octobre 2021

Titre :

Contaminants alimentaires et cancer colorectal : études mécanistiques de multiples voies de cancérogenèse (génotoxicité, reprogrammation métabolique) selon la susceptibilité génétique

Ecole doctorale :

Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :

Toxicologie Alimentaire (ToxAlim)

Directeur(s) de Thèse :

MME LAURENCE HUC

MME ELISA BOUTET

Rapporteurs :

M. ETIENNE BLANC, INSERM PARIS

MME CAROLINE ANINAT, INSERM GRAND OUEST

Membre(s) du jury :

MME BÉATRICE MORIO, INRA LYON, Présidente

MME ELISA BOUTET, UNIVERSITE TOULOUSE 3, Membre

MME LAURENCE HUC, INRA TOULOUSE, Membre

M. SYLVAIN BILLET, UNIVERSITE DU LITTORAL COTE D'OPALE, Membre

Résumé

Le cancer colorectal (CCR) est un problème de santé publique majeur qui touche 1,9 million de personnes dans le monde tous sexes confondus en 2020. Le CCR est une pathologie d'évolution progressive, en plusieurs étapes, dépendante de facteurs génétiques et environnementaux. L'étiologie du CCR est d'abord décrite selon une succession de mutations génétiques sporadiques, qui favorisent la progression tumorale. Parmi ces mutations, la perte des gènes suppresseurs de tumeur *APC* et *TP53*, l'activation du proto-oncogène *KRAS*, sont des événements décisifs. De plus, les travaux sur l'exposome et épidémiologiques ont mis en évidence que les facteurs environnementaux, tels que le manque d'activité physique, l'obésité, le tabagisme mais également l'alimentation, sont associés au CCR. L'humain est exposé quotidiennement *via* l'environnement ou l'alimentation, à une multitude de mélanges complexes de contaminants chimiques, à des doses variables et en mélanges. Parmi ces contaminants, mon projet de thèse s'est focalisé sur les suivants : des pesticides retrouvés dans les fruits, les légumes et les eaux contaminées ; le 4-Hydroxynonéal (HNE), composé néoformé pendant de digestion de viande rouge ; les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) (Benzo([a]pyrène (B[a]P) et Pyrène (PYR)) et les dioxines (TCDD), polluants environnementaux et produits formés lors de la cuisson des aliments. Le CCR résulte de l'interaction entre des facteurs génétiques et environnementaux : c'est pourquoi, mon projet s'est attaché à examiner l'impact de polluants sur la cancérogenèse colorectale en évaluant également les interactions gènes-environnement

Dans un premier temps, des modèles *in vitro* de cellules épithéliales humaines coliques, les HCECs, ont été caractérisés comme outils pertinents pour l'étude de la cancérogenèse colorectale et des interactions gène-environnement.

Ce système d'étude *in vitro* implique six lignées isogéniques, qui expriment une ou les trois mutations *driver* *APC*, *KRAS* et *TP53*, présentes dans la cancérogenèse colorectale. Ainsi, ces six lignées miment de façon simplifiée, les différentes étapes de la cancérogenèse colorectale : l'initiation, la promotion, la progression. Des différences au niveau de la morphologie, des capacités migratoires, du métabolisme énergétique, de la sensibilité aux stress génotoxiques et aux stimuli de mort cellulaire ont été observées entre les lignées cellulaires en fonction de leurs caractéristiques génétiques.

Ces cellules ont ensuite été utilisées pour mener une étude de l'impact des contaminants alimentaires. Ces travaux ont démontré un effet initiateur et promoteur des pesticides seuls ou en mélange avec le HNE de la cancérogenèse colorectale, après une exposition longue de trois semaines. Ces effets cancérigènes sont associés avec des mécanismes de génotoxicité mais aussi à des modifications cellulaires comme la croissance, la reprogrammation du métabolisme énergétique, la mobilité cellulaire et la transition épithélio-mésenchymateuse. Ces mécanismes tumorigènes varient en fonction de la susceptibilité génétique au CCR. De plus, suite à une exposition de deux semaines au PYR ou au mélange B[a]P-PYR-TCDD, un effet initiateur du CCR été observé. Un effet promoteur du CCR a été observé suite à une exposition au B[a]P, PYR et TCDD seuls ou en mélange.

En conclusion, cette thèse apporte : (i) une caractérisation d'un système de six modèles cellulaires *in vitro* comme outil original et pertinent pour l'étude de la cancérogenèse colorectale et des interactions gène-environnement ; (ii) la mise en évidence de potentiels effets cancérigènes des pesticides et du HNE dans la cancérogenèse colorectale ; (iii) une meilleure caractérisation de l'impact cellulaire du HNE, des pesticides, des HAP et de la dioxine TCDD, en fonction de la susceptibilité génétique au CCR.

Abstract

Colorectal cancer (CRC) is a major public health problem affecting 1.9 million people worldwide in 2020. CRC is a progressive pathology with several stages, depending on genetic and environmental factors. The etiology of CRC is first described according to a succession of sporadic genetic mutations, which promote tumor progression. Among these mutations, the loss of the tumor suppressor genes *APC* and *TP53* and the activation of the *KRAS* proto-oncogene are decisive events. In addition, work on the exposome and epidemiology has shown that environmental factors, such as lack of physical activity, obesity, smoking and diet, are associated with CRC. Humans are exposed daily, *via* the environment or food, to a multitude of complex mixtures of chemical contaminants, at variable doses and in mixtures. Among these contaminants, my thesis project focused on the following: pesticides found in fruits, vegetables and contaminated water; 4-Hydroxynonenal (HNE), a compound formed during the digestion of red meat; Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) (Benzo[a]pyrene (B[a]P) and Pyrene (PYR)) and dioxins (TCDD), environmental pollutants and products formed during the cooking of food. CRC results from the interaction between genetic and environmental factors: this is why, my project aimed at examining the impact of pollutants on colorectal carcinogenesis by also evaluating gene-environment interactions

First, *in vitro* models of human colonic epithelial cells, HCECs, were characterized as relevant tools for the study of colorectal carcinogenesis and gene-environment interactions.

This *in vitro* study system involves six isogenic lines, which express one or all three driver mutations *APC*, *KRAS* and *TP53*, present in colorectal carcinogenesis. Thus, these six lines mimic, in a simplified way, the different stages of colorectal carcinogenesis: initiation, promotion, progression. Differences in morphology, migratory capacities, energy metabolism, sensitivity to genotoxic stress and to cell death stimuli were observed between the cell lines according to their genetic characteristics.

These cells were then used to study the impact of food contaminants. This work demonstrated an initiating and promoting effect of pesticides alone or in mixture with HNE on colorectal carcinogenesis, after a long exposure of three weeks. These carcinogenic effects are associated with genotoxicity mechanisms but also with cellular modifications such as growth, reprogramming of energy metabolism, cell mobility and epithelial-mesenchymal transition. These tumorigenic mechanisms vary according to genetic susceptibility to CRC. In addition, following a two-week exposure to PYR or the B[a]P-PYR-TCDD mixture, a CRC initiating effect was observed. A CRC-promoting effect was observed following exposure to B[a]P, PYR and TCDD alone or in combination.

In conclusion, this thesis provides: (i) a characterization of a system of six *in vitro* cell models as an original and relevant tool for the study of colorectal carcinogenesis and gene-environment interactions; (ii) the identification of potential carcinogenic effects of pesticides and HNE in colorectal carcinogenesis; (iii) a better characterization of the cellular impact of HNE, pesticides, PAHs and dioxin TCDD, as a function of the genetic susceptibility to CRC.

Sommaire

Introduction.....	4
I Cancer colorectal (CCR)	5
1) Anatomie, histologie et fonctions du côlon et rectum	5
2) Les principales maladies du côlon	8
3) Incidence et mortalité du cancer colorectal (CCR).....	10
4) Cancérogenèse colorectale : du tissu sain au carcinome colique	11
5) Types de CCR	13
II Évènements génétiques et mutations majeures du CCR	15
1) Modèle génétique et moléculaire du CCR.....	15
2) Mutations du gène <i>APC</i>	17
3) Mutation du gène <i>KRAS</i>	24
4) Mutations du gène <i>TP53</i>	27
5) Autres mutations génétiques	30
III Exposome ou les origines environnementales des cancers	33
1) L'exposome.....	33
2) Les causes environnementales du cancer colorectal	34
3) Viande rouge	35
4) Pesticides.....	44
5) Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)	58
6) TCDD.....	63
IV Mécanismes cellulaires de la cancérogenèse.....	66
1) Instabilité du génome et mutations	67
2) Reprogrammation métabolique.....	78
3) La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT)	92
V Objectifs de la thèse	94
Etudes et Résultats.....	95
I Etude 1 : Caractérisation des lignées HCECs CT comme modèle en cancérogenèse environnementale	96
1) Résumé.....	96
2) Manuscrit.....	98
3) Etude de l'impact du Benzo[a]pyrène, du Pyrène et de la dioxine TCDD <i>in vitro</i> avec les HCECs.....	127
II Etude 2 : Etude de l'impact de HNE et des pesticides dans la cancérogenèse colorectale en fonction de la susceptibilité génétique	128

1) Résumé.....	128
2) Présentation du mélange de pesticides.....	130
3) Manuscrit sous forme de publication dans une revue à comité de lecture (Cancers, sous presse).....	131
III Etude 3 : Etude de la génotoxicité d'un pesticide : le Captane.....	155
1) Résumé.....	155
2) Manuscrit de l'article.....	157
Discussion et Conclusion.....	169
Annexes.....	177
I Publications et Communications.....	178
1) Publication dans revues à comité de lecture.....	178
2) Communication orale en congrès scientifique (présentée moi-même).....	178
3) Communication par poster et communication courte (présentée moi-même).....	178
II Formations et Enseignements.....	179
1) Formations.....	179
2) Enseignements.....	179
Références.....	181

Liste des abréviations

1-NP : 1-Nitropyrrène

ACC : Acétyl-CoA carboxylase

ACF : Aberrant Crypt Foci

ADNmt : ADN mitochondrial

AHC : Amines hétérocycliques

AhR : Aryl Hydrocarbon receptor

AICR : American Institute for Cancer Research

AKR : Aldo-kéto réductases

ALDH : Aldéhydes déshydrogénases

AMM : Autorisation de mise sur le marché

ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire

AOR : Alcénal/one oxydoréductase

AP : Apuriniques/Apyrimidiques

APC : Adenomatous polyposis coli

ARfD : Acute reference dose

ARNT : AhR Nuclear translocator

ASEF : APC-stimulated guanine nucleotide exchange factor

ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated

ATP : Adénosine triphosphate

B[a]P : Benzo[a]pyrrène

BCL-2 : B-cell lymphoma 2

BER : Base excision repair

BMD : Benchmark Dose

BPDE : Benzo[a]pyrrène 7,8-diol-9,10-époxyde

Cat : Catalase

CCR : Cancer Colorectal

CDK4 : Cyclin-dependent kinase 4

CDT : Cytolethal distending toxin

CIN : chromosomal instability

CIRC : Centre international de recherche sur le cancer

CK1 α : Caséine kinase 1 α

CMR : Cancérigène, mutagène et/ou reprotoxique

CYP450 : Cytochrome P450

DJA : Dose journalière admissible

EB1 : End binding 1

EFSA : Agence européenne de sécurité alimentaire

EGFR : Epidermal growth factor receptor

EMT : Transition épithélio-mésenchymateuse

EXO1 : Exonucléase 1

FASN : Fatty acid synthase

GDP : Guanosine di-phosphate

GLP2 : Glucagon-like peptide 2

GSH : Glutathion (sous forme réduite)

GSK3 β : Glycogène synthase kinase 3 β

GTP : Guanosine tri-phosphate

HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

HCECs : Human Colonic Epithelial Cells

hDlg : Human homologue of drosophila discs large

HHE : 4-hydroxy-2-hexéna1

HIF1a : Hypoxia-inductible factor 1a

HNE : 4-Hydroxynonéna1

HNPCC : Hereditary Non Polyposis Colorectal cancer

HR : Homologous recombinaison

HSP90 : Heat shock protein 90

hTERT : Human telomerase reverse transcriptase

IARC : International Agency for Research on Cancer

IGF-1 : Insuline-like growth factor 1

INCA : Institut National de Cancer

KRAS : kristen-ras

LMR : Limites maximales de résidus

LOAEL : Lowest observed adverse effect level

MCT-1 : Transporteur de lactate

MDA : Malondialdéhyde

MDC1 : Mediator Of DNA Damage Checkpoint 1

MDF : Mucin-depleted foci

MICI : Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

MLH1 : MutL homolog 1

MMR : Mismatch repair system

MSH2 : MutS homolog 2

MSI : Microsatellite instability

MT : Microtubules

NER : Nucleotide excision repair

NHEJ : Non-homologous end joining

Nitro-HAP : Hydrocarbure aromatique nitro-polycyclique

NOAEL : No observed adverse effect level

NOCs : N-nitroso compounds

Nrf2 : Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like2

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OXPHOS : Oxidative phosphorylation system

PAF : Polypose Adénomateuse Familiale

PCDD : Polychlorodibenzo-p-dioxines

PCDF : Polychlorodibenzofuranes

PDC : Pyruvate dehydrogenase complex

PDK : Pyruvate deshydrogenase

PDK : Pyruvate deshydrogenase

PDK1 : Pyruvate deshydrogenase kinase 1

PDK2 : Pyruvate dehydrogenase kinase 2

Pi : Phosphate inorganique

PI3K : phosphatidylinositol-3-kinase

PIK3CA : phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, sous-unité catalytique alpha

PNUE : Programme des nations unies pour l'environnement

POP : Persistent organic pollutants

PYR : Pyrène

ROS : reactive oxygen species

SCD1 : Stéaroyl-CoA désaturase 1

SCI : Syndrome du côlon irritable

SDHi : Succinate dehydrogenase inhibitor

SOD : Superoxide dismutase

TCDD : 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxine

TFIIH : Transcription factor II H

TOP1 : DNA topoisomerase 1

TP53 : Tumor protein 53

VTR : Valeurs toxicologiques de référence

WCRF : World Cancer Research Fund

XAP2 : X-associated protein 2

XPC : Xeroderma Pigmentosum

Liste des figures et tableaux

Figure 1 : Anatomie du côlon et du rectum	5
Figure 2 : Les quatre couches des parois du côlon et du rectum et les glandes de Lieberkühn	7
Figure 3 : Séquence de la cancérogenèse colorectale : du tissu sain au carcinome	12
Figure 4 : Voie de l'instabilité chromosomique et voie de l'instabilité des microsatellites	17
Figure 5 : Structure de la protéine APC	18
Figure 6 : Modèle de régulation de la voie Wnt par la protéine APC.....	20
Figure 7 : Gradient d'activation de la voie Wnt le long des cryptes coliques	21
Figure 8 : Implication d'APC dans le maintien de l'intégrité du cytosquelette d'actine, l'adhésion et la migration cellulaire.....	22
Figure 9 : Implication d'APC dans la ségrégation et l'instabilité chromosomique (CIN).....	24
Figure 10 : Structure de la protéine KRAS	25
Figure 11 : KRAS et les voies de signalisation RAS/MAPK et PI3K/AKT	27
Figure 12 : Structure du suppresseur tumeur P53	28
Figure 13 : Mécanismes d'activation et fonctions de P53.....	29
Figure 14 : Voie de signalisation TGFβ/SMAD4.....	32
Figure 15 : Mécanisme d'action expliquant les liens entre fer hémique et cancer colorectal	39
Figure 16 : Réaction de Fenton	40
Figure 17 : Structure chimique du HNE et Fonction réactives du HNE	41
Figure 18 : Métabolisme du HNE.....	43
Figure 19 : Modèle de promotion du cancer colorectal basé sur une sélection Darwinienne des cellules paranéoplasiques par rapport au cellules normales induite par le HNE.....	44
Figure 20 : Détermination des doses critiques NOAEL, LOAEL et BMD	50
Figure 21 : Evolution de la quantité totale de substances actives hors usages en agriculture bio et hors produit de bio contrôle vendues en France.	52
Figure 22 : Structures chimiques des seize HAP prioritaire selon US-EPA	60
Figure 23 : Activation de AhR par le B[a]P.....	62
Figure 24 : Structure chimique de la 2,3,7,8-tétrachlorées-p-dioxin	64
Figure 25 : Hallmarks du cancer	67
Figure 26 : La désamination des Bases de l'ADN.....	69
Figure 27 : Les sites abasiques	70
Figure 28 : La réparation par excision de base (BER)	73
Figure 29 : La réparation par excision de nucléotides (NER).....	74
Figure 30 : La réparation des mésappariements (MMR)	75
Figure 31 : Voies de réparation des cassures doubles brins Jonction des extrémités non homologues (NHEJ) et Recombinaison homologue.....	77
Figure 32 : Vue d'ensemble des principales voies du métabolisme énergétique.....	79
Figure 33 : Dynamique mitochondriale et Structure de la mitochondrie	83
Figure 34 : Les complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale.....	86
Figure 35 : EMT et progression tumorale.....	93
Figure 36 : Les Cellules HCECs	97
Figure 37 : Clonogenicity after long-term (2 weeks) exposure of HCEC cells to pollutants.....	127
Figure 38 : Etude de l'impact de HNE et des pesticides dans la cancérogenèse colorectale en fonction de la susceptibilité génétique.....	129
Figure 39 : Le captane induit deux effects genotoxiques indépendants	156
Figure 40 : Etude de l'impact de contaminants alimentaires sur la cancérogenèse colorectale en fonction de la susceptibilité génétique.....	170

Tableau 1 : La classification des pesticides	46
Tableau 2 : Mélange des cinq pesticides auxquels la population française est exposée.....	130

Introduction

I Cancer colorectal (CCR)

1) Anatomie, histologie et fonctions du côlon et rectum

a) Anatomie

Le côlon et le rectum constituent la partie inférieure du tractus digestif et sont situés entre l'intestin grêle et l'anus. Ils constituent le gros intestin, mesurant environ 155 cm chez la femme et 166 cm chez l'homme et permettent la formation de matières fécales. Le côlon se divise en 4 segments : le côlon ascendant (côlon droit), le côlon transverse, le côlon descendant (côlon gauche) et le côlon sigmoïde qui est relié au rectum. Le rectum se divise en 2 parties : le haut rectum ou tiers supérieur intrapéritonéal qui mesure 7 cm et les deux tiers inférieurs sous-péritonéaux qui mesurent 8 cm.

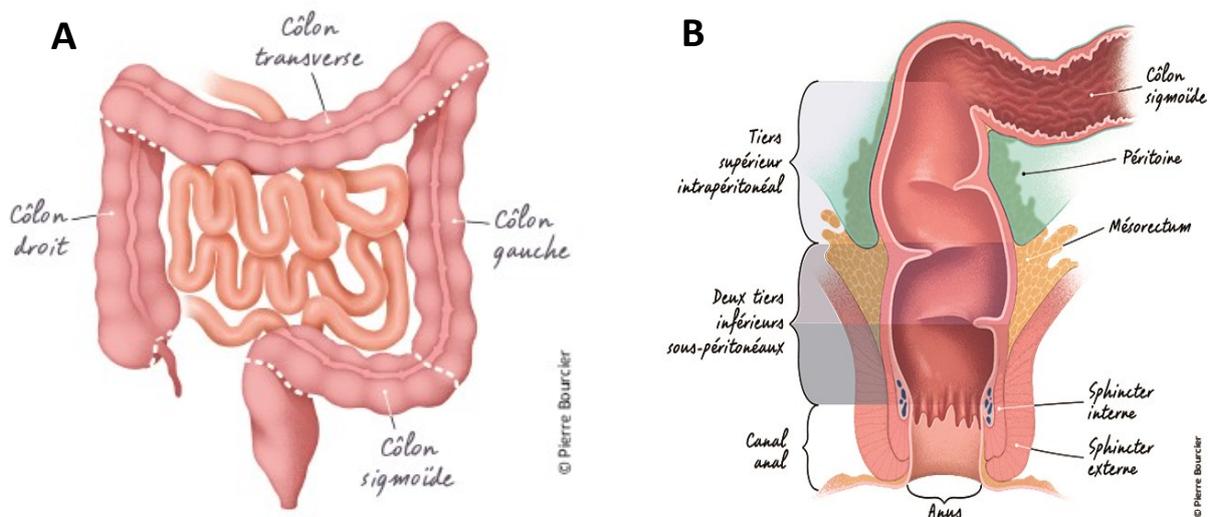


Figure 1 : Anatomie du côlon (A) et du rectum (B) (INCA, 2021).

b) Histologie

Les parois du côlon et du rectum, comme celles de l'ensemble du tube digestif, sont constituées de quatre couches différentes (Figure 2) :

- La muqueuse, qui tapisse l'intérieur du côlon. Elle comporte un revêtement épithélial, soutenu par un tissu conjonctif appelé chorion. Le chorion contient du tissu lymphoïde diffus et des follicules lymphoïdes. La muqueuse se termine par une couche mince de tissu musculaire lisse appelée musculaire-muqueuse. L'épithélium de la muqueuse est constituée d'invaginations, appelées glandes ou cryptes de Lieberkühn, où se trouvent plusieurs types de cellules épithéliales (Humphries and Wright, 2008) :
 - Les cellules caliciformes qui produisent le mucus et constituent la majeure partie des cryptes de Lieberkühn
 - Les colonocytes ou cellules absorbantes ; elles ont pour fonction d'absorber l'eau, les électrolytes et les nutriments non absorbés par l'intestin grêle
 - Les cellules entéro-endocrines, qui sécrètent des hormones (PeptideYY, glucagon-like peptide 2 (GLP2))
 - Les cellules souches, qui sont peu nombreuses et situées au fond des cryptes ; elles permettent le renouvellement cellulaire.
- La sous-muqueuse, qui est constituée d'un tissu conjonctif dense contenant des fibroblastes, des mastocytes et un important réseau sanguin et lymphatique.
- La musculuse, qui est constituée de deux couches de fibres musculaires lisses responsables de la contractilité permettant l'excrétion de matières fécales.
- La séreuse (couche externe), qui est composée d'un tissu conjonctif, tapissé par un épithélium simple.

L'homéostasie de l'épithélium colique est basée sur un renouvellement rapide et constant de la monocouche épithéliale. A partir de cellules souches, les cellules prolifèrent et se différencient en remontant le long de la glande, puis sont exfoliées en haut : c'est le renouvellement cellulaire qui dure de 2 à 7 jours (Crosnier et al., 2006; Hubrecht Institute video <https://www.youtube.com/watch?v=NIT1VYqMzgc>, 2015).

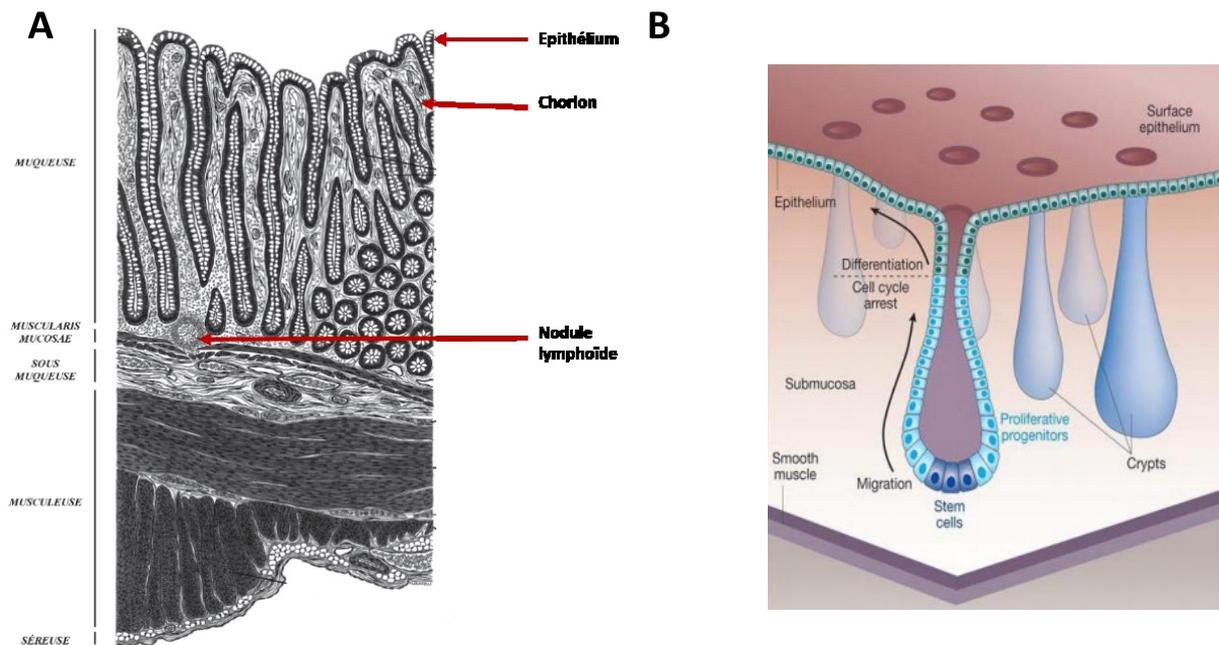


Figure 2 : Les quatre couches des parois du côlon et du rectum (A) (adapté du Site web histologie des organes, Université de médecine Montpellier-Nîmes) et les glandes de Lieberkühn (B) (Reya and Clevers, 2005).

c) Microenvironnement du côlon

Le corps humain est le foyer d'une communauté complexe, surpeuplée et variée, composée d'au moins 100 trillions de cellules microbiennes (Whitman et al., 1998). Cet écosystème microbien, qui réside dans et sur le corps humain, constitue le microbiote et les gènes qui le codent sont appelés microbiome. Le microbiote est constitué de bactéries, d'eucaryotes de virus et d'achérons qui interagissent entre eux et avec l'hôte, impactant de manière significative la santé humaine (Clemente et al., 2012). Le tractus gastro-intestinal, en particulier le côlon, concentre la grande majorité des micro-organismes. Le microbiote intestinal change rapidement en termes de variété et de composition au cours de la première année de vie chez l'humain et reste relativement constant à l'âge adulte. Cependant, la composition du microbiote peut être altérée en raison de facteurs environnementaux (chimiques et psychiques), principalement et par l'influence du régime alimentaire (Chassaing et al., 2017). Le côlon abrite les communautés les plus denses et les plus diverses de tous les

habitats corporels, pour favoriser la dégradation de certains résidus indigestes tels que les polysaccharides et pour résister à la colonisation par des espèces pathogènes dans des conditions saines (Sassone-Corsi and Raffatellu, 2015; Donaldson et al., 2016). La première ligne de défense contre les micro-organismes pathogènes est le mucus qui constitue avec l'épithélium la barrière muqueuse. Le mucus est sécrété par les cellules caliciformes et contient des micro-organismes commensaux (Turner, 2009). Le côlon contient deux couches de mucus qui sont renouvelées en permanence pour lubrifier et protéger les cellules épithéliales (Cai et al., 2020).

Le dérèglement du microbiote intestinal peut conduire à une affection appelée dysbiose qui est liée à un certain nombre de pathologies humaines, dont le CCR (Ahn et al., 2013).

d) Fonctions

Les résidus alimentaires (substances non digérées et non absorbées par l'estomac et l'intestin grêle) arrivent dans le côlon sous forme liquide. Le côlon absorbe l'eau associée à ces résidus jusqu'à obtenir des selles (ou matières fécales) semi-solides. Cela nécessite 4 fonctions principales :

- Fonction de motricité : stockage et brassage des matières fécales grâce à des mouvements de contraction avant la propulsion vers le rectum
- Fonction d'absorption : absorption d'eau au niveau des entérocytes du côlon ascendant (côlon droit)
- Fonction de sécrétion : sécrétion du mucus des cellules caliciformes, qui protège la muqueuse
- Fonction de digestion : assurée par la flore microbienne

Le rectum a pour fonction le stockage des matières fécales avant leur évacuation par l'anus.

2) Les principales maladies du côlon

a) Le syndrome du côlon irritable

Le syndrome du côlon irritable (SCI) est un trouble gastro-intestinal caractérisé par des habitudes intestinales altérées en association avec une gêne ou une douleur abdominale en

l'absence d'anomalies structurelles et biochimiques détectables. Ce trouble intestinal fonctionnel peut être débilitant chez certains patients, tandis que d'autres peuvent présenter des symptômes légers ou modérés. L'étiologie est mal connue et de nombreux facteurs sont impliqués (le sexe féminin, le jeune âge et les infections gastro-intestinales antérieures...). Actuellement, le diagnostic du SCI est basé sur les symptômes et l'exclusion d'autres maladies organiques, et la thérapie comprend le traitement médicamenteux des symptômes prédominants, la nutrition et la psychothérapie. Bien que la pathogenèse sous-jacente soit loin d'être comprise, les facteurs étiologiques comprennent une hyperperméabilité épithéliale accrue, une dysbiose, une inflammation, une hypersensibilité viscérale, l'épigénétique et la génétique, et les interactions cerveau-intestin altérées (Saha, 2014; Enck et al., 2016) .

b) Les maladies inflammatoires de l'intestin (MICI)

Les maladies inflammatoires de l'intestin (MICI) sont des maladies chroniques du tractus gastro intestinal, qui comprennent deux formes principales : la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique. L'inflammation de la muqueuse intestinale dans les MICI est caractérisée par des épisodes de douleurs abdominales, de diarrhée, de selles sanglantes, une perte de poids et l'afflux de neutrophiles et de macrophages qui produisent des cytokines, des enzymes protéolytiques et des radicaux libres qui entraînent une inflammation et une ulcération.

L'incidence et la prévalence des MICI ont nettement augmenté au cours de la seconde moitié du XX^e siècle, et depuis le début du XXI^e siècle, les MICI sont considérées comme l'une des maladies gastro-intestinales les plus répandues avec une incidence croissante dans les pays nouvellement industrialisés.

La maladie de Crohn implique généralement l'iléon terminal, le caecum, la région périanales et le côlon, mais elle peut affecter n'importe quelle région de l'intestin de manière discontinue. En revanche, la colite ulcéreuse implique le rectum et peut affecter une partie du côlon ou l'ensemble du côlon de manière continue. La maladie de Crohn présentait histologiquement une sous-muqueuse épaissie, une inflammation, une ulcération fissurée et des granulomes, alors que l'inflammation dans la rectocolite hémorragique est limitée à la muqueuse et à la sous-muqueuse avec des abcès cryptiques.

Bien que les causes des MICI restent mal connues, des études ont fourni ces dernières années des preuves que ces maladies sont associées à la susceptibilité de l'hôte, au microbiote intestinal, à des facteurs environnementaux (alimentation, tabagisme, stress psychologique, prise de certains médicaments) et à des anomalies immunologiques (Khor et al., 2011; Guan, 2019) .

En résumé le côlon joue un rôle de barrière, en filtrant le contenu luminal. Il préserve l'organisme des pathogènes et permet l'absorption des nutriments. L'épithélium colique est en contact direct avec le bol alimentaire et les contaminants chimiques et biologiques qui le composent. L'exposition de l'épithélium colique à différents types de contaminants peut parfois être délétère. De plus, le côlon est un lieu symbiotique de grand importance. Il abrite la communauté la plus dense et diverse de micro-organismes, qui est nécessaire à la digestion de certains aliments. Le microbiote jouerait, par exemple, un rôle dans la promotion de la cancérogenèse colorectale induite par la consommation de rouge. Il favoriserait la lipoperoxydation induite par le fer héminique contenu dans la viande rouge et responsable des effets délétères sur le côlon (Martin et al., 2015). L'homéostasie de l'épithélium colique est basée sur un renouvellement rapide et constant des cellules épithéliales : c'est un processus finement régulé. Un déséquilibre de cette homéostasie peut être causé par le vieillissement et donc rendre le côlon plus susceptible au développement de cancer (Tomasetti and Vogelstein, 2015; Tomasetti et al., 2017).

3) Incidence et mortalité du cancer colorectal (CCR)

Avec environ 43 000 nouveaux cas et 17 000 décès des suites de ce cancer en 2018 en France, le cancer colorectal est le troisième cancer le plus fréquent tous sexes confondus. Il représente près de 12% de l'ensemble des cancers tous sexes confondus et ce cancer est la deuxième cause de décès par cancer en France. Il représente donc un problème de santé publique majeur. Chez l'homme, il représente le troisième cancer le plus fréquent après le cancer la prostate et du poumon et en terme de mortalité, il constitue le deuxième après le cancer du poumon. Chez la femme, le CCR est le deuxième cancer le plus fréquent après le cancer du sein. En terme de mortalité, il est le troisième après le cancer du sein et du poumon (INCA, 2019).

Dans le monde, en 2018, le nombre de nouveaux cas de cancer colorectal s'élevait à 1,8 millions, soit 10,2% du nombre total des cancers et 881 000 décès, soit 9,2% de la mortalité par cancer. C'est le troisième cancer le plus fréquent et le deuxième en terme de mortalité pour tous sexes confondus (IARC, 2018).

4) Cancérogenèse colorectale : du tissu sain au carcinome colique

L'épithélium colique se renouvelle rapidement et constamment, avec un équilibre entre prolifération, différenciation, migration et apoptose. Toute perturbation de cet équilibre peut entraîner une accumulation d'anomalies et, dans les perturbations les plus graves, aboutir à un CCR. Un cancer peut se développer dans n'importe quelle partie du côlon et du rectum. Cependant, pour plus d'un cas sur deux, le CCR se développe au niveau du côlon sigmoïde. Le passage d'un tissu sain à l'adénocarcinome colique se déroule en plusieurs étapes (Figure3) :

- Les lésions prénéoplasiques sont considérées comme la première anomalie détectable. Il existe différents types de ces lésions, les plus répandues sont les foyers de cryptes aberrantes (ACF : *aberrant crypt foci*) (Pretlow et al., 1991) et les foyers déplétés en mucine (MDF : *mucin-depleted foci*) (Femia et al., 2004). Le passage d'une crypte normale à une crypte aberrante correspond au phénomène d'"initiation".
- Il existe deux types d'adénomes (Torlakovic et al., 2003) :
 - L'adénome plan ou non polypoïde, mesurant quelques centimètres de diamètre et se localisant généralement entre le côlon proximal et distal, avec une préférence pour le côlon transverse.
 - L'adénome polypoïde ou polype, mesurant entre 2 et plus de 60 mm et se localisant dans le rectum et le côlon sigmoïde.

Le passage d'un micro- adénome à un adénome est appelé "promotion".

Les adénomes sont des lésions néoplasiques peuvent aboutir à un adénocarcinome. Il faut en moyenne 10 ans pour qu'un adénome aboutisse à un adénocarcinome et cela se produit pour environ 5% d'entre eux (Stryker et al., 1987).

- Les adénocarcinomes constituent la plupart des cancers colorectaux. Leur développement commence en superficie dans l'épithélium. Puis ils évoluent vers les tuniques internes, dans la muqueuse, puis dans la musculaire muqueuse : on le qualifie

de ce fait d'adénocarcinome infiltrant. Ils peuvent ensuite progresser jusqu'à la séreuse de la paroi colique. Le passage d'un adénome à un adénocarcinome est appelé "progression".

- Les métastases se forment suite à une dissémination de cellules tumorales par les systèmes sanguin et lymphatiques, qui résulte de la formation d'une masse cancéreuse à distance de la tumeur d'origine. L'apparition de métastases est appelée "invasion". Dans le cadre du CCR, les métastases se développent principalement dans le foie et le poumon (Tauriello et al., 2017).

Le passage d'un épithélium colorectal à un carcinome est associé à une acquisition séquentielle d'événement génétiques, en particulier les mutations (Fearon and Vogelstein, 1990; Lengauer et al., 1998), comme nous le verrons ultérieurement.

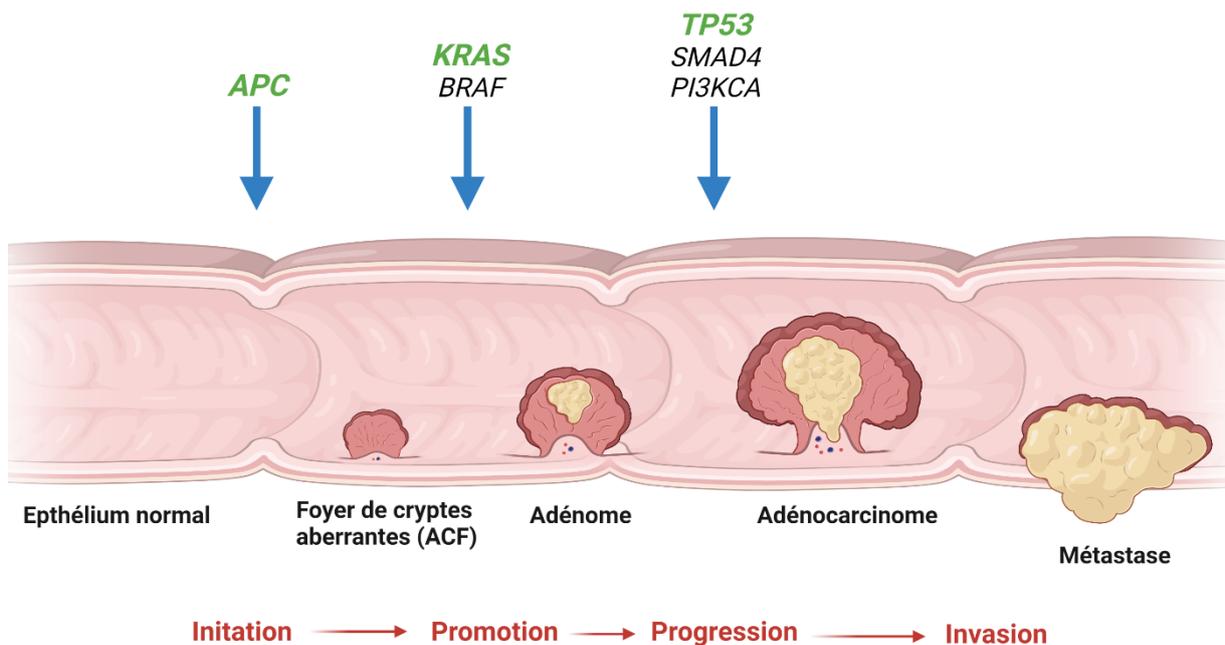


Figure 3 : Séquence de la cancérogenèse colorectale : du tissu sain au carcinome.

5) Types de CCR

a) Formes héréditaires

Les formes héréditaires représentent environ 5 à 10% des CCR. Les deux principales formes héréditaires du CCR sont la Polypose Adénomateuse Familiale (PAF) et le syndrome de Lynch aussi appelé syndrome HNPCC (Hereditary Non Polyposis Colorectal cancer) (Lynch and de la Chapelle, 2003).

i. Polypose adénomateuse familiale ou PAF

Seul 0,5 à 1% des cancers colorectaux sont des Polyposes adénomateuses familiales (PAF). Le risque de développer un cancer colorectal est une conséquence inévitable de la PAF. La maladie se développe généralement entre l'adolescence et ou autour d'une trentaine d'année (Fearhead et al., 2002). Cependant, une résection chirurgicale du côlon ou du rectum permet de lutter contre cette maladie. La PAF trouve son origine dans la mutation du gène *APC* (*Adenomatous polyposis coli*) qui est un gène suppresseur de tumeur. Un gène suppresseur de tumeur est un gène dont l'absence d'expression ou la délétion peut entraîner l'apparition d'une tumeur cancéreuse. Cette mutation *APC* survient dans 100% des cas de PAF et dans 70 à 80% des formes sporadiques du CCR. La position de la mutation sur le gène *APC* joue un rôle important dans la PAF, elle détermine la sévérité de la maladie. Il existe ainsi une forme atténuée qui se caractérise par un nombre de polypes inférieurs à cent contre plus de deux milles polypes pour la PAF non atténuée et une apparition plus tardive du cancer (Heinen, 2010).

ii. Syndrome de Lynch ou HNPCC

Le HNPCC est une maladie autosomique dominante similaire à la PAF : c'est la forme de CCR héréditaire la plus fréquente (2 à 4% des CCR) (Heinen, 2010). Les tumeurs HNPCC ont pour caractéristiques de se développer à un âge précoce (environ 44 ans) en comparaison aux formes sporadiques de CCR qui surviennent vers 50 ans (Lynch et al., 2003). Les patient·e·s HNPCC présentent un risque accru de développer des cancers dans d'autres organes (ovaires, intestin grêle, estomac, pancréas, voies hépatobiliaires, cerveau et voies uro-épithéliales).

Une liste de 3 critères a été établie pour aider à identifier les familles à syndrome HNPCC (Heinen, 2010) :

- Trois parents atteints ou plus de CCR, dont l'un des parents au premier degré
- Plus de deux générations affectées
- Au moins un-e malade diagnostiqué-e à moins de 50 ans

Une mutation de l'un des gènes de réparation des mésappariements de l'ADN ou MMR (mismatch repair system), généralement MLH1 (MutL homolog 1), MSH2 (MutS homolog2), MSH6 (MutS homologue 6) and PMS2 (Post-meiotic segregation increase), est responsable de la survenue de HNPCC. La mutation de ces gènes est responsable des niveaux élevés d'instabilité microsatellitaire (MSI) observée dans plus de 90% des HNPCC (Heinen, 2010). Les microsatellites sont des séquences d'ADN très polymorphes, constituées par une répétition continue de motifs de deux à dix nucléotides, en général dans des régions non codantes du génome. La MSI n'a de conséquence que dans les rares cas où elle touche une région codante du génome : c'est le cas du gène TGF β RII, impliqué dans la régulation de la prolifération cellulaire, ou du gène BAX, intervenant dans le processus d'apoptose (Heinen, 2010).

b) Formes sporadiques

Les formes sporadiques du cancer colorectal sont majoritaires et représentent environ 90% de la totalité des CCR. Une mutation de suppresseur de tumeur *APC* survient dans 70 à 80% d'entre elles et une mutation MMR dans environ 15% de cas (Fearon, 2011).

II Évènements génétiques et mutations majeures du CCR

1) Modèle génétique et moléculaire du CCR

Fearon et Vogelstein en 1990 ont été les premiers à modéliser les mécanismes génétiques et moléculaires survenant lors du développement d'un CCR, ce modèle a été actualisé en 2011 (Fearon, 2011; Fearon and Vogelstein, 1990). Depuis, les connaissances et la compréhension des changements génétiques et moléculaires ont été affinées. Les tumeurs colorectales font partie des tumeurs malignes qui possèdent les charges mutationnelles les plus élevées ; des dizaines de mutations somatiques ont été identifiées (Cancer Genome Atlas Network, 2012) (Figure 3). Au niveau génétique et moléculaire, il existe deux voies majeures par lesquelles les tumeurs colorectales se développent : les voies de l'instabilité chromosomique (CIN) et de l'instabilité des microsatellites (MSI) (Figure 4).

a) La voie de l'instabilité des microsatellites (MSI)

L'instabilité des microsatellites a été décrite pour la première fois dans les tumeurs HNPCC, elle est observée dans la quasi-totalité de ces tumeurs et dans près de 15% des CCR sporadiques (Boland et al., 1998). Comme décrit précédemment, les mutations dans les gènes *MMR* provoquent une instabilité dans les régions microsatellites. Les microsatellites d'ADN sont des séquences en tandem répétées constituées de répétitions de nucléotides mono-, di-nucléotidiques ou même d'ordre supérieur. Ces zones accumulent des erreurs, car l'ADN polymérase a du mal à lier efficacement ces séquences génomiques répétitives.

Ne pas évaluer correctement le nombre de bases à insérer dans ces zones invariables ou même un glissement lors de la synthèse de nouveaux brins peut produire une mutation de décalage du cadre de lecture qui entraîne la formation d'une protéine tronquée ou non fonctionnelle. Normalement, en l'absence de mutations délétères du gène *MMR*, le système de réparation des mésappariements reconnaît ces erreurs et effectue la réparation par excision de l'ADN avant la réplication du brin fille. Les cellules des tumeurs présentant le phénotype MSI ne détectent et ne réparent pas correctement l'ADN non apparié, ce qui leur permet de maintenir et de répliquer leurs mutations et d'acquérir des mutations

supplémentaires (Nguyen et al., 2020). Ces altérations mènent à un dysfonctionnement du cycle cellulaire et de l'apoptose avec inhibition des gènes *TGFβ RII* et *BAX*.

b) La voie de l'instabilité chromosomique (CIN)

L'instabilité chromosomique est observée dans 65 à 70% des CCR sporadiques et dans la totalité des cas de PAF (Grady and Carethers, 2008; Fearon, 2011; Vogelstein et al., 2013). Elle est caractérisée par des modifications chromosomiques comme les altérations du nombre de copies somatiques (SCNA) causée par une aneuploïdie, des délétions, des insertions, des amplifications ou une perte d'hétérozygotie (Nguyen et al., 2020). Cette voie résulte de défauts de ségrégation chromosomique, tel qu'une mauvaise séparation des chromatides sœurs ; une sénescence cellulaire désordonnée ; une machinerie dysfonctionnelle de réponse aux dommages de l'ADN ; et la perte d'hétérozygotie (LOH) au niveau d'un gène suppresseur de tumeur (Nguyen et al., 2020). Ces anomalies caryotypiques sont associées à des mutations des gènes suppresseurs de tumeurs *APC* et *TP53*, une mutation du proto-oncogène *KRAS* et une délétion de 18q. Un gène suppresseur de tumeur est un gène dont l'absence d'expression ou la délétion peut entraîner l'apparition d'une tumeur cancéreuse. Un proto-oncogène est un gène dont l'altération ou l'hyper expression favorise la transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse.

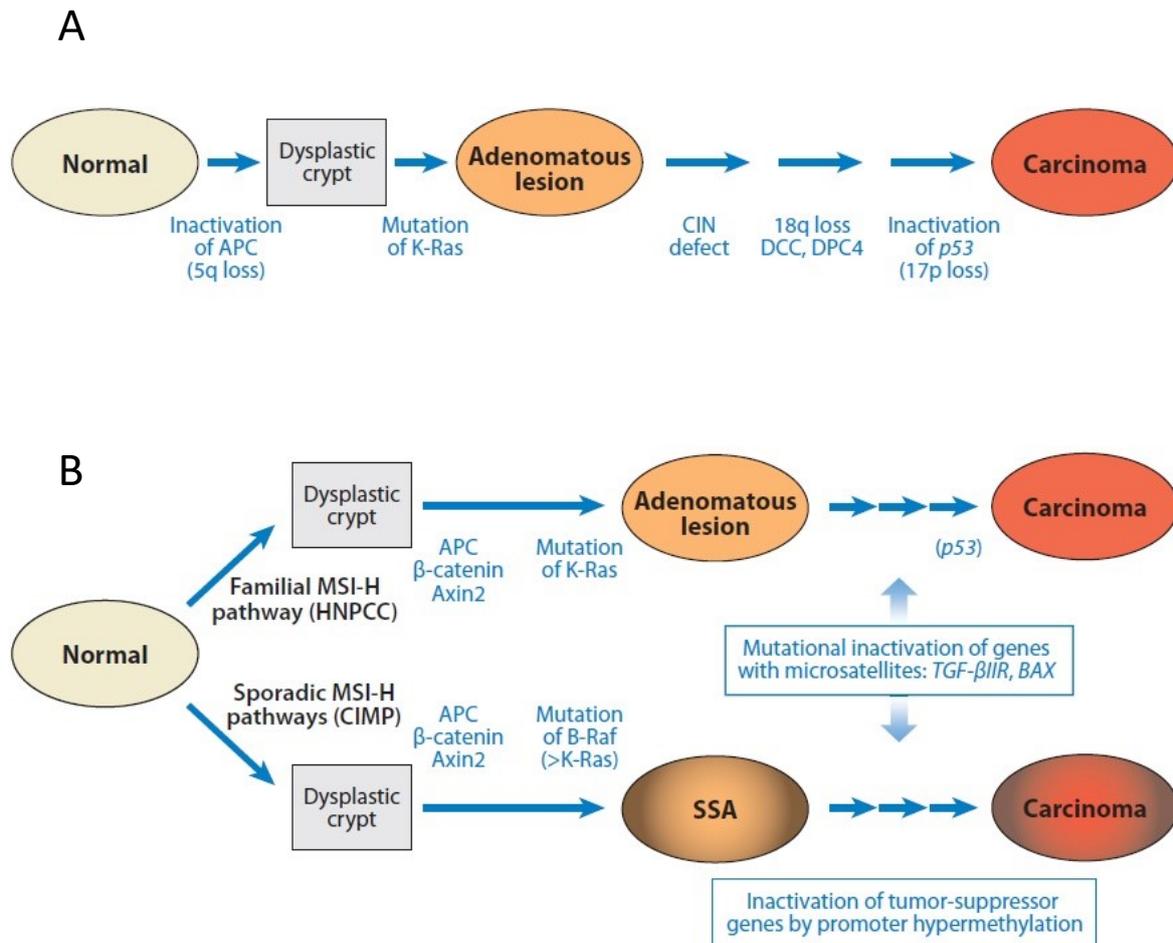


Figure 4 : Voie de l'instabilité chromosomique (A) et voie de l'instabilité des microsatellites (B) (Fearon, 2011).

2) Mutations du gène *APC*

Les mutations du gène *APC* constitue l'un des évènements génétiques le plus précoce et le plus fréquent de la cancérogenèse colorectale. Environ 70 à 80% des CCR sporadiques et 100% des PAF présentent une mutation de ce gène. Presque toutes les mutations somatiques conduisent à une troncature prématurée de la protéine APC, préférentiellement au niveau des codons 1309 et 1450 (Segditsas and Tomlinson, 2006). La mutation *APC* est décrite comme étant un évènement initiateur limitant dans le développement de la majorité des tumeurs colorectales : la mutation d'*APC* joue un rôle majeur dans la survenue du CCR (Fearon, 2011). De plus, la mutation *APC* est nécessaire au maintien de la tumeur. Dans les tumeurs établies *in vivo* chez la souris, la restauration du gène *APC* entraîne une différenciation rapide et

généralisée des cellules tumorales et une régression tumorale soutenue sans rechute même dans les tumeurs porteuses des mutations des gènes *KRAS* et *TP53* (Dow et al., 2015).

a) Structure de la protéine APC

Le gène suppresseur de tumeur *APC* est localisé sur le locus du chromosome 5q21, il est exprimé constitutivement dans l'épithélium colique normal. Le produit du gène *APC* est une protéine de 310 kDa localisée à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau. La protéine APC se compose de différents domaines (Figure 5) (Narayan and Roy, 2003) :

- La partie N-terminal contient des domaines d'oligomérisation et des séquences répétées permettant l'association de la protéine avec le réseau d'actine, elles sont appelées domaine d'Armadillo.
- La partie centrale se compose des sites de fixation et de liaison à la β -caténine mais également les sites de liaison à l'actine.
- La partie C-terminal comporte un domaine de fixation aux microtubules ainsi que les sites de fixations des protéines end binding protein 1 (EB1), impliquée dans la polarisation du réseau de microtubules (MT), et human homologue of drosophila discs large (hDlg) qui possède des fonctions de suppresseur de tumeur.

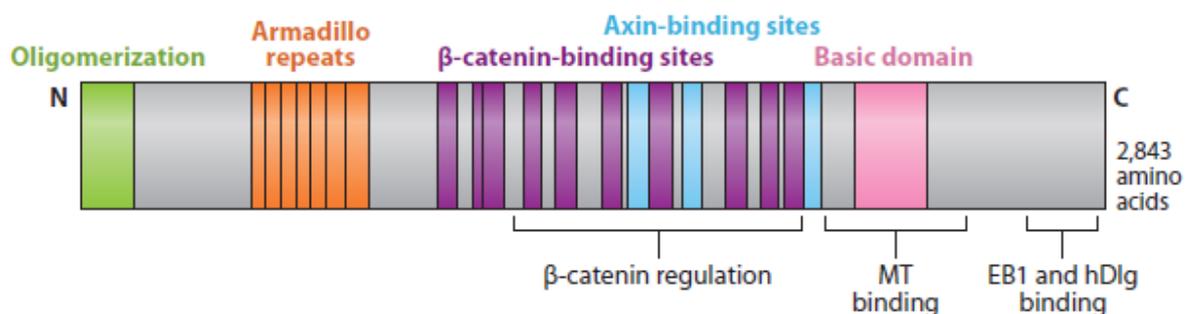


Figure 5 : Structure de la protéine APC (Fearon, 2011).

b) Fonction de la protéine APC

La protéine APC est impliquée dans la régulation de nombreuses fonctions cellulaires. Son principal rôle est la régulation du pool de β -caténine *via* la voie de signalisation Wnt. De par

sa structure, la protéine APC interagit avec des protéines diverses. Ainsi APC intervient dans les processus cellulaires liés au maintien du cytosquelette d'actine, à la régulation du cycle cellulaire, à la réparation de l'ADN et à la ségrégation des chromosomes (Baeg et al., 1995; Näthke et al., 1996; Browne et al., 1998; Kaplan et al., 2001; Sansom et al., 2004).

i. Régulation négative du pool de β -caténine via la voie Wnt

Bien qu'APC possède un rôle important dans de nombreuses fonctions cellulaires, la fonction d'APC la plus décrite dans les mécanismes de cancérogenèse est sa capacité à réguler négativement le pool de β -caténine *via* la voie de signalisation Wnt (Figure 6). Cette voie possède un rôle prépondérant dans l'homéostasie colique en régulant le renouvellement de l'épithélium colique et l'architecture des cryptes (Burgess et al., 2011).

Dans une cellule colique normale, en absence de stimulation du récepteur Frizzled par son ligand Wnt, APC forme, à l'aide d'autres protéines telles la glycogène synthase kinase 3 β (GSK3 β), l'Axine et la caséine kinase 1 α (CK1 α), un complexe de destruction. Ce complexe phosphoryle la β -caténine, entraînant son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome. Quand Frizzled est stimulé par son ligand, la voie de signalisation est activée, ce qui engendre l'inhibition de la formation du complexe de destruction et donc une augmentation du pool de β -caténine dans le cytoplasme. La β -caténine accumulée dans le cytoplasme va être transloquée dans le noyau, ce qui va entraîner l'activation de la transcription des gènes cibles impliqués dans la survie cellulaire, la prolifération ou la différenciation (Figure 6) (Fearon, 2011).

Dans une cellule colique cancéreuse, la mutation du gène *APC* entraîne une activation constitutive de la voie Wnt et de l'activité transcriptionnelle de la β -caténine. Ainsi, de nombreux gènes cibles de la β -caténine sont constitutivement exprimés tels que c-Myc ou la cycline D1 impliqués dans la prolifération et le cycle cellulaire (Narayan and Roy, 2003).

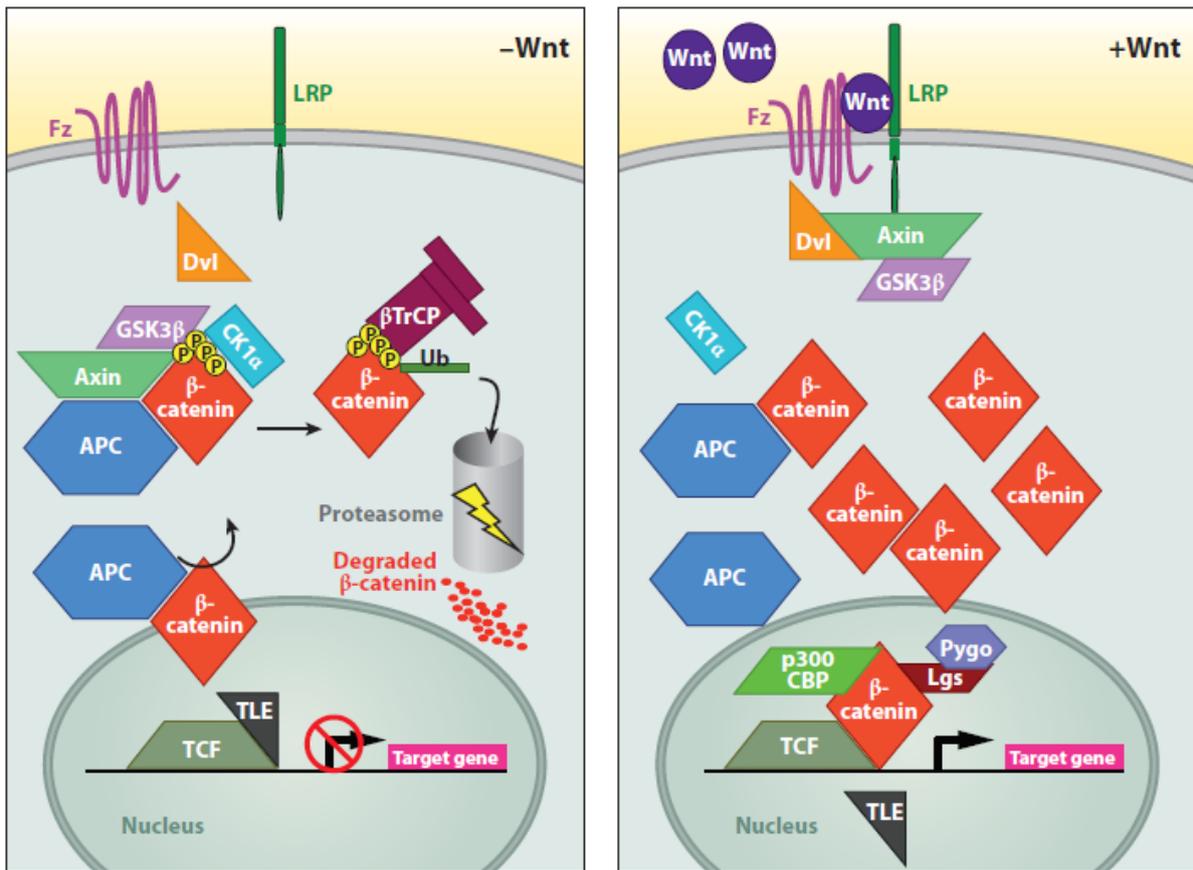


Figure 6 : Modèle de régulation de la voie Wnt par la protéine APC (Fearon, 2011).

De plus, la voie de signalisation Wnt régule la prolifération des cellules dans les cryptes coliques. Il existe un gradient d'activation de cette voie le long de la crypte (Figure 7). Les cellules souches situées au fond de la crypte possèdent un fort taux de prolifération et produisent des progéniteurs prolifératifs (transit amplifying cells ou TA cells). Ces progéniteurs remontent le long de la crypte et se différencient en différents types de cellules épithéliales coliques : cellules endocrines, cellules caliciformes, colonocytes. Plus les cellules migrent vers le haut de la crypte, plus elles sont différenciées et plus la voie s'inactive. Une hyperactivité de la voie Wnt en haut des cryptes peut causer une croissance incontrôlée et entraîner la formation de masses cellulaires dans l'épithélium colique pouvant se développer en tumeur cancéreuse (Sadanandam et al., 2013).

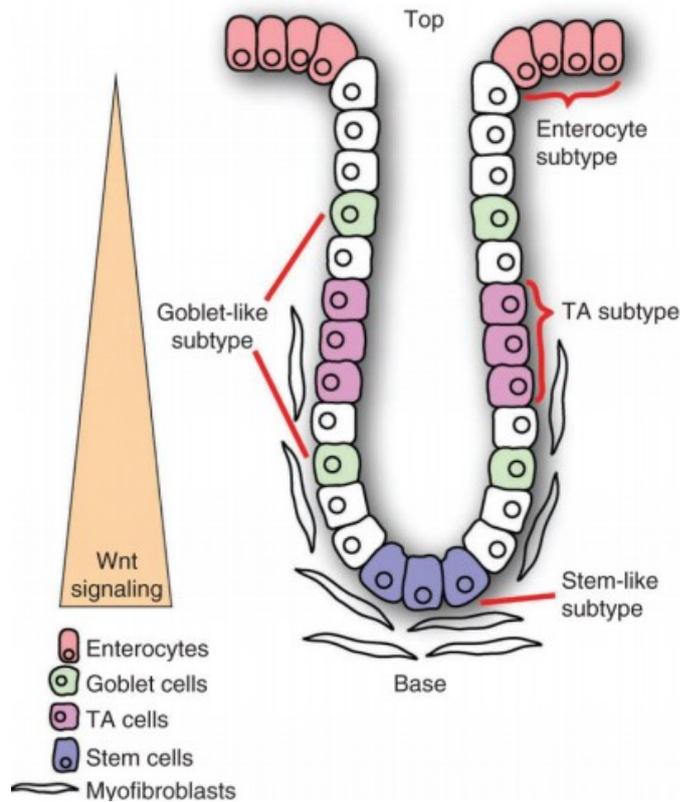


Figure 7 : Gradient d'activation de la voie Wnt le long des cryptes coliques. (Stem cells : cellules souches, TA cells : cellules amplificatrice de transit, Goblet cells : cellules caliciformes, enterocytes : entérocytes, myofibroblasts : myofibroblastes) (Sadanandam et al., 2013).

- ii. Maintien de l'intégrité du cytosquelette d'actine, l'adhésion et la migration cellulaire

L'intégrité du cytosquelette d'actine est nécessaire pour maintenir la forme et les jonctions d'adhérence des cellules. Le déséquilibre de l'intégrité du cytosquelette d'actine peut perturber l'adhésion cellule-cellule et la migration cellulaire. APC maintient le cytosquelette par son interaction avec la β -caténine. En effet, la β -caténine interagit avec α -caténine qui en se liant directement à l'actine permet le maintien du réseau intracellulaire du cytosquelette d'actine. La β -caténine sert de pont entre l'actine et APC. De plus, la β -caténine interagit avec

l'E-cadhérine, qui est une protéine impliquée dans l'adhésion cellule-cellule. Le domaine C-terminal de l'E-cadhérine interagit avec les β - et γ -caténines qui eux même sont associés à l' α -caténine et forment un complexe E-cadhérine avec le cytosquelette d'actine (Figure 8). Ce complexe maintient la stabilité des adhésions cellule-cellule. L'APC devient une partie du complexe d'adhésion cellule-cellule lié à l'E-cadhérine, car elle se lie directement à la β -caténine, à la γ -caténine et aux filaments d'actine.

APC est également impliquée dans la migration cellulaire, par une interaction entre APC et ASEF (APC-stimulated guanine nucleotide exchange factor) qui régule le cytosquelette d'actine. APC se lie à ASEF et contrôle son activité. ASEF est activé dans les cellules cancéreuses colorectales contenant des formes d'APC tronquées. ASEF activé diminue l'adhésion cellule-cellule médiée par la E-cadhérine et favorise la migration cellulaire. **Ainsi, l'association dynamique des protéines APC, EB1, ASEF, caténines, récepteurs EGFR ou c-Met, PTP-BL et E-cadhérine aux jonctions d'adhérence cellule-cellule et aux extrémités des microtubules joue un rôle important dans la communication cellule-cellule, la migration cellulaire et la cancérogenèse (Narayan and Roy, 2003).**

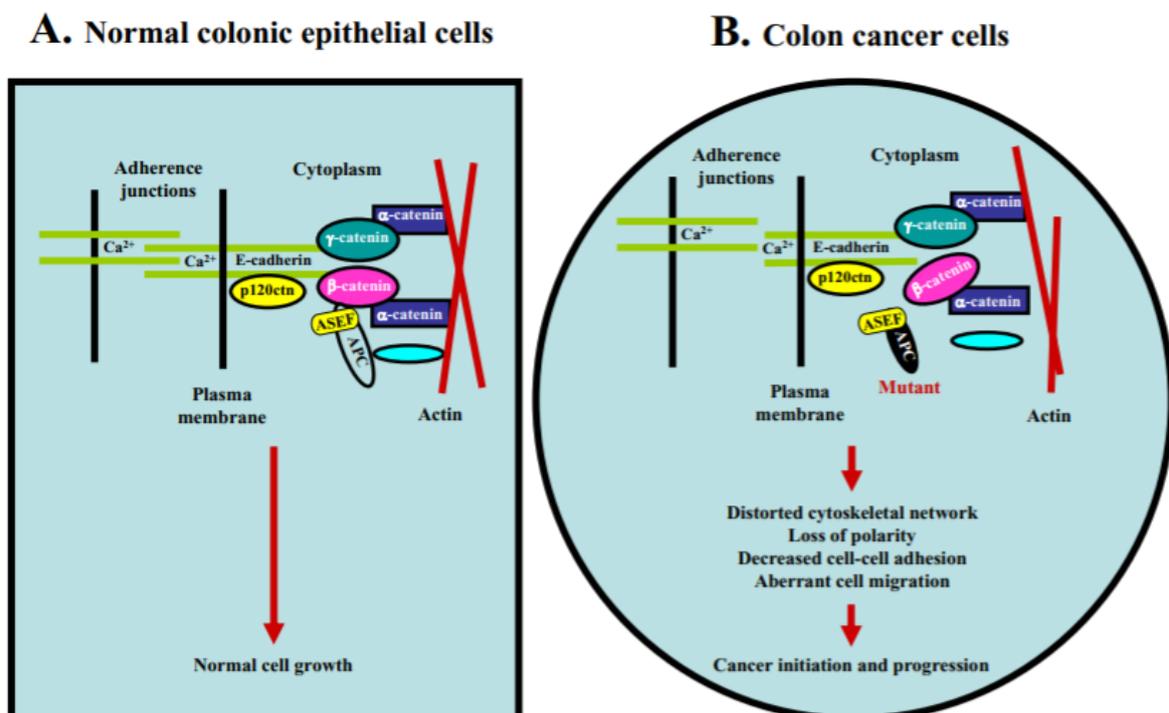


Figure 8 : Implication d'APC dans le maintien de l'intégrité du cytosquelette d'actine, l'adhésion et la migration cellulaire (Narayan and Roy, 2003).

iii. Réparation de l'ADN

APC est principalement située dans le cytoplasme, mais il peut également faire la navette dans le noyau pour réguler les fonctions nucléaires, y compris la réparation de l'ADN. APC peut se lier directement à la polymérase (Pol- β), à l'endonucléase FEN1 et à l'endonucléase APE1, inhibant l'assemblage des protéines de réparation impliquées dans la voie de réparation par excision de base (BER) sur l'ADN endommagé et bloquant le BER. Le domaine d'inhibition de la réparation de l'ADN (DRI) d'APC, qui est le site de liaison pour Pol- β et FEN1, est situé dans la région N terminale et est conservé dans les mutants APC. Ainsi, la plupart des protéines APC tronquées sont encore capables de moduler le BER, éventuellement à des degrés divers. APC peut également interagir avec la protéine de réplication A 32 (RPA32) pour moduler les réponses au stress de réplication et est directement impliquée dans la réparation des cassures double brin de l'ADN. Collectivement, l'APC mutée peut avoir des fonctions atténuées dans le BER et la réparation des cassure double brins, permettant aux cellules cancéreuses d'accumuler des altérations génétiques (Zhang and Shay, 2017).

iv. Ségrégation des chromosomes

L'aneuploïdie, le nombre anormal de chromosomes à la fois quantitativement et qualitativement, est une caractéristique des cellules coliques cancéreuses. L'aneuploïdie se produit pendant la mitose et conduit à l'instabilité chromosomique (CIN). La CIN peut survenir à des stades très précoces du développement du cancer colorectal. Les mécanismes par lesquels le CIN est généré dans les cellules cancéreuses du côlon est en grande partie méconnue. Des liens entre APC et la CIN ont été décrits. APC serait impliqué dans le maintien de la bonne connexion des microtubules avec les chromosomes. APC se localise dans les kinétochores et forme un complexe avec Bub1 et Bub3, deux protéines de point de contrôle mitotique. La formation réussie de ce complexe peut faciliter la croissance et la formation du fuseau et aider à maintenir l'euploïdie. Une fois que le gène *APC* est muté, la protéine APC tronquée peut perdre sa capacité à se lier à Bub1, et elle devient alors incapable de maintenir correctement la fixation des microtubules aux kinétochores, entraînant un défaut de ségrégation des chromosomes (Figure 9) (Narayan and Roy, 2003).

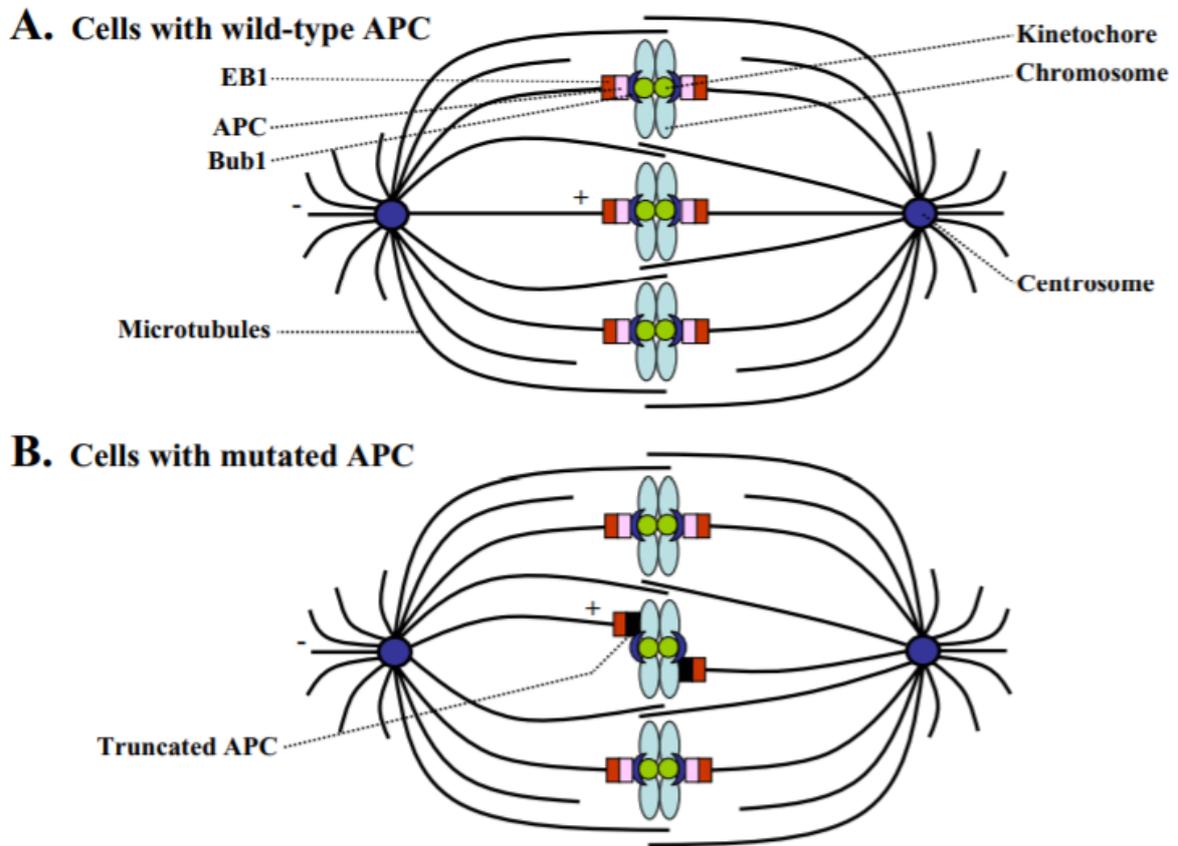


Figure 9 : Implication d'APC dans la ségrégation et l'instabilité chromosomique (CIN) (Narayan and Roy, 2003).

3) Mutation du gène *KRAS*

Les trois gènes *RAS* (*KRAS*, *NRAS* et *HRAS*) sont les oncogènes les plus fréquemment mutés dans tous les types de cancers et ces mutations surviennent dans 90% dans les cancers du pancréas, 35% des cancers du poumon et 45% des cancer colorectaux (Porru et al., 2018). *KRAS* est l'isoforme principalement mutée dans les cancers colorectaux, cette mutation est majoritairement observée dans les codons 12 et 13 de l'exon 2. Elle survient précocement au cours de la cancérogenèse colorectale, dès le stade d'adénome (Bamford et al., 2004). Les protéines *RAS* qui résultent de cette mutation du gène *KRAS* sont constitutivement actives et possèdent un pouvoir oncogénique.

c) Structure de la protéine KRAS

Les trois gènes *RAS* codent quatre GTPases, KRAS4A, KRAS4B, HRAS et NRAS. Les 2 isoformes de KRAS sont produites par épissage alternatif du gène KRAS à son extrémité 3'. KRAS4B est la variante prédominante et c'est celle que nous appellerons désormais KRAS (Malumbres and Barbacid, 2003). KRAS est une protéine d'environ 21 kDa située dans le chromosome 12 et qui se compose d'une hélice α et d'un brins β avec deux domaines structuraux (G et C) (Figure 10). KRAS est un protéine G monomère localisée dans le cytosol du côté de la membrane plasmique.

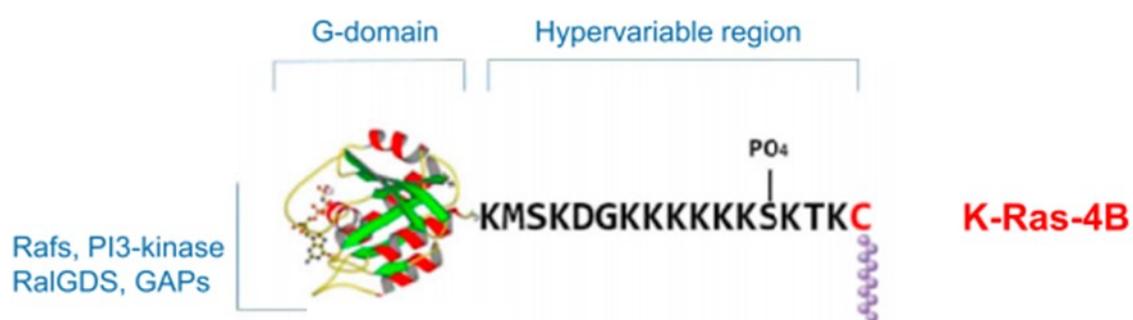


Figure 10 : Structure de la protéine KRAS (Stephen et al., 2014).

d) Fonctions de KRAS

KRAS est une GTPase qui joue un rôle important dans la transmission des signaux extracellulaires provenant de récepteurs membranaires vers le noyau, aboutissant à la régulation de la prolifération, de la survie, de la différenciation et de la migration cellulaire. Son activation se fait par l'intermédiaire de récepteur membranaires tel que l'EGFR (epidermal growth factor receptor). KRAS fonctionne de façon binaire comme un interrupteur au sein de diverses voies de signalisation et oscille entre deux états : actif quand la protéine KRAS est liée au GTP (guanosine tri-phosphate) et un état inactif quand elle est liée au GDP (guanosine di-phosphate). Durant l'état actif, KRAS interagit avec des molécules intracellulaires effectrices,

cet état permet l'activation de voies de signalisation telles que les voies RAS/MAPK et PI3K/AKT.

iii. EGF et les voies de signalisation RAS/MAPK et PI3K/AKT

L'EGFR fait partie de la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase HER (human epidermal growth factor receptor). 30 à 85% des cas de CCR présentent une surexpression de l'EGFR : la voie EGFR est alors anormalement activée. Cette voie devient active lors de la fixation de l'EGF ou d'autres ligands (TGF α , amphiréguline, épiréguline, β -celluline, facteur de croissance lié à l'héparine et neurégulines) à la partie extra-membranaire du récepteur. La fixation du ligand induit une dimérisation de EGFR et son activation par phosphorylation au niveau des résidus tyrosine spécifiques, ce qui va permettre l'activation des voies de signalisation RAS/MAPK et la voie PI3K/AKT (Figure 11).

L'activation de la voie RAS/MAPK est initiée par l'activation de la protéine KRAS, qui elle-même va induire l'activation en cascade de plusieurs protéines intracellulaires *via* des phosphorylations successives : RAF, MERK, et enfin ERK qui est transloquée dans le noyau et stimule la transcription de gènes cibles impliqués dans la survie, la prolifération et la migration cellulaire mais également dans l'angiogenèse (Drosten and Barbacid, 2020).

La voie PI3K/AKT peut être activée directement par l'EGFR activé ou indirectement par l'intermédiaire de la protéine KRAS activée. Cette voie est impliquée dans diverses fonctions cellulaires telles que la migration, l'apoptose ou la prolifération cellulaire. Ces deux voies de signalisation sont étroitement liées (Shaw and Cantley, 2006).

Dans les cellules cancéreuses coliques présentant une mutation du proto-oncogène KRAS, ces voies de signalisation sont activées de façon anarchique, entraînant un déséquilibre entre survie et mort cellulaire et favorise une prolifération cellulaire non contrôlée. Cet enchaînement d'évènements favorise le développement des tumeurs colorectales (Normanno et al., 2009).

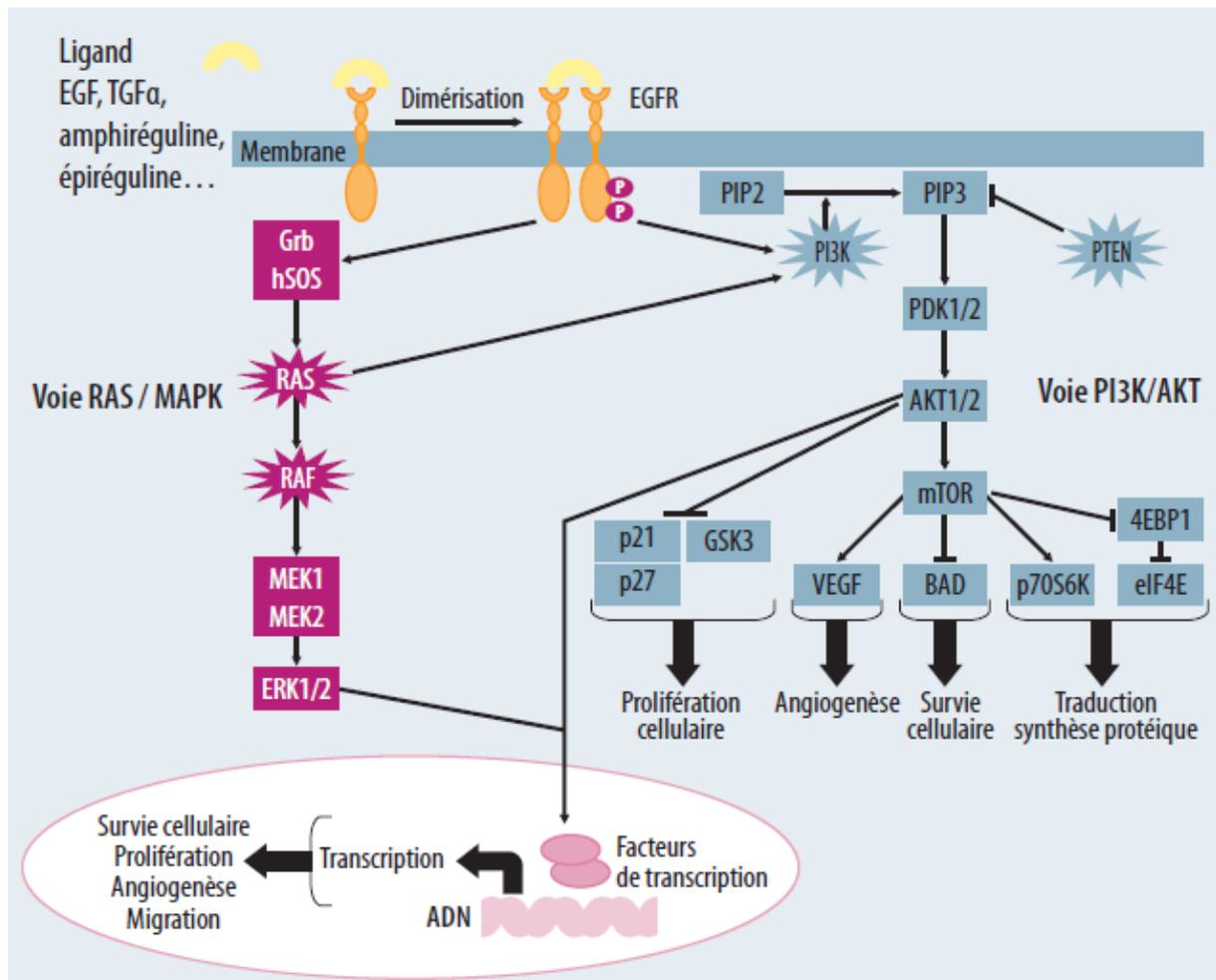


Figure 11 : KRAS et les voies de signalisation RAS/MAPK et PI3K/AKT (Lièvre, 2010).

4) Mutations du gène *TP53*

Des mutations du gène suppresseur de tumeur *TP53* sont fréquemment détectées dans de nombreux types de cancers : c'est le gène le plus fréquemment muté dans les cancers (Kandoth et al., 2013). Cette mutation est présente dans environ 60% des CCR, ce qui fait d'elle la deuxième mutation la plus fréquente avec APC dans les CCR (Nakayama and Oshima, 2018). Des altérations peuvent être retrouvées dans pratiquement toutes les régions de la protéine P53 (Leroy et al., 2013). Parfois, la mutation du gène *TP53* résulte de mutation de décalage du cadre de lecture ou non-sens, ce qui entraîne une perte l'expression de la protéine P53 comme c'est le cas pour d'autres suppresseurs de tumeurs. Cependant le plus souvent, on observe des mutations faux-sens que l'on retrouve principalement dans la région de liaison à l'ADN de

P53. Ces mutations entraînent généralement une perte ou une diminution de l'expression de p53 (Muller and Vousden, 2014).

a) Structure de P53

Le gène TP53 est situé sur le chromosome 17p et se compose de 11 exons et 10 introns. La protéine P53 se compose de 393 résidus d'acides aminés et de plusieurs domaines fonctionnels. Dans l'ordre de l'extrémité N à l'extrémité C, on retrouve : le domaine de Transactivation (TAD), le domaine riche en proline (PD), le domaine de liaison à l'ADN (DBD) le domaine de tétramérisation (TET) et le domaine C terminal (C) (Mello et al., 2017) (Figure 12).



Figure 12 : Structure du suppresseur tumeur P53 (adapté de (Mello et al., 2017)).

b) Fonctions de P53

Près de cinquante enzymes peuvent interagir avec P53 et altérer sa stabilité, sa localisation cellulaire ou encore son activité (Kruse and Gu, 2008). Les niveaux d'expression de P53 sont minutieusement régulés dans la cellule, de nombreuses protéines participent à cette régulation *via* la phosphorylation l'acétylation, l'ubiquitylation ou la méthylation de résidus spécifiques de P53. MDM2 régule négativement P53, elle l'ubiquityle ce qui entraîne sa dégradation. La protéine MDM4 (ou MDMX) module également l'activité de P53 et son interaction avec MDM2 et P53 au niveau moléculaire est complexe. MDM2 et MDM4 ont un rôle central de la régulation de P53. P53 est impliquée dans de multiples fonctions cellulaires en induisant ou en réprimant des gènes cibles. Plusieurs centaines de gènes cibles ont été identifiés, parmi eux des gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire, dans l'apoptose, dans l'inhibition de l'angiogenèse, dans la réparation de l'ADN, dans le métabolisme énergétique et dans la sénescence cellulaire (Whibley et al., 2009). De plus, P53 joue un rôle indispensable dans le maintien de la stabilité du génome, ce qui lui a valu d'être considéré comme « le

gardien du génome » (Lane, 1992). Les résultats d'un grand nombre d'études ont démontré sans équivoque que le mutant p53 joue non seulement un rôle central dans la promotion du CCR, mais contribue également à son agressivité et à son caractère invasif (Li et al., 2015; Nakayama and Oshima, 2018, p. 53; Liebl and Hofmann, 2021, p. 53). De plus, le gène TP53 est la cible privilégiée de polluants environnementaux génotoxiques tels que l'aflatoxine B1 et le benzo[a]pyrène qui favorise les mutations de ce suppresseur de tumeur (Aguilar et al., 1993; Hussain et al., 2001) .

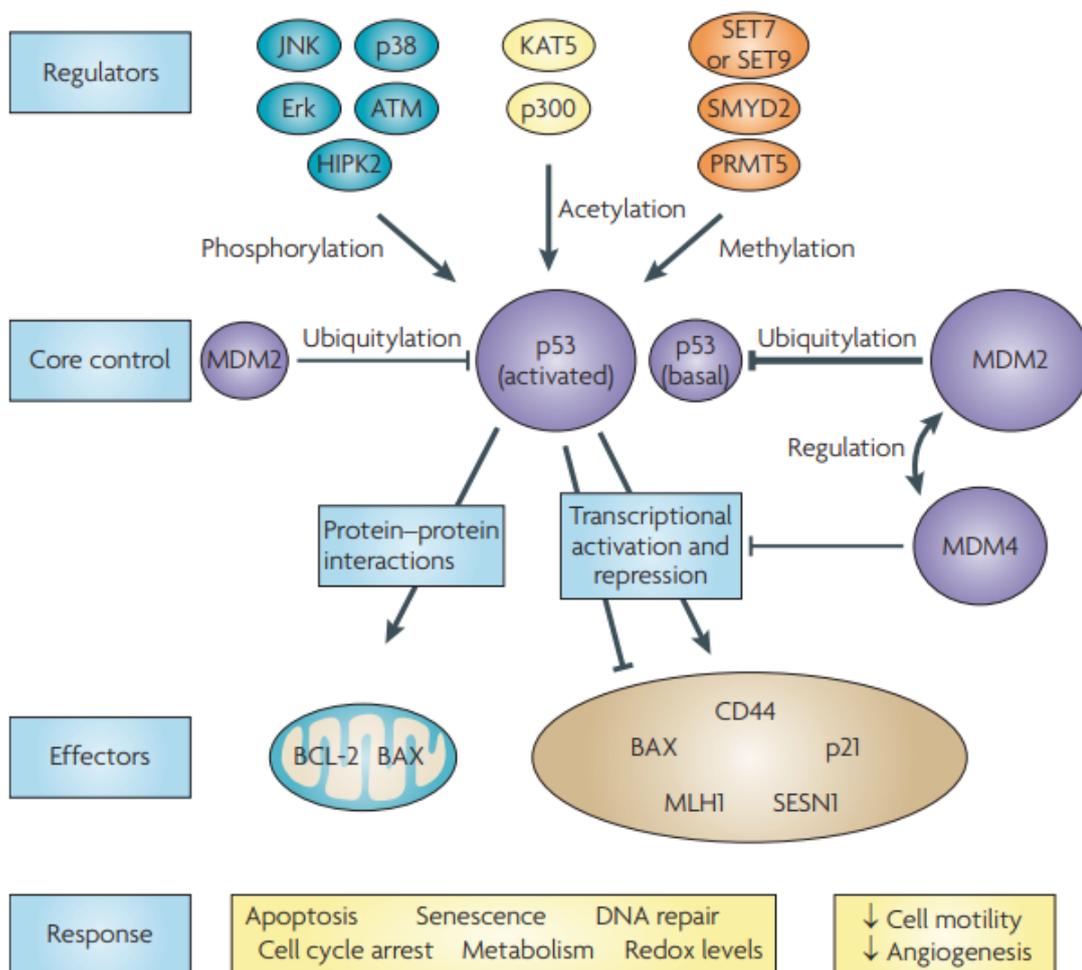


Figure 13 : Mécanismes d'activation et fonctions de P53 (Whibley et al., 2009).

5) Autres mutations génétiques

c) Mutation du gène *BRAF*

BRAF appartient à la famille des protéines kinases RAF, cette famille est également composée de *ARAF* et *CRAF*. Les protéines RAF sont impliquées dans la voie de signalisation RAS/MAPK. Les protéine RAS tel que *KRAS* active *BRAF*, *BRAF* activé entraîne la phosphorylation et l'activation de *MERK1/2* qui phosphoryle et active ensuite *ERK*. L'activation de cette voie conduit à la transcription de nombreux gènes cibles impliqués dans diverses fonctions cellulaires clés telles que la prolifération la différenciation, la migration, la survie et l'angiogenèse cellulaires. Environ 96% de toutes les mutations *BRAF* résultent d'une transversion de T1799A dans l'exon 15, conduisant une substitution de l'acide aminé valine : V006E ce qui entraîne une forte augmentation de l'activité de *BRAF* et par conséquent une activation de la voie RAS/MAPK associée (Wan et al., 2004; Cantwell-Dorris et al., 2011). Cette mutation est retrouvée dans 10% des cancers colorectaux (Tie et al., 2011).

d) Mutation du gène *PIK3CA*

La phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) appartient à la famille de lipide kinases hétérodimères. Activée par divers récepteurs à tyrosine kinases, tel que *EGFR* (Figure 9), PI3K régule et favorise différents mécanismes cellulaires comme la prolifération, la survie, l'apoptose et la migration. *PIK3CA* (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, sous-unité catalytique alpha), la sous-unité catalytique p110-alpha de PI3K, a été décrite comme étant mutée dans environ 15 à 20% des CCRs (Samuels et al., 2004). La majorité de ces mutations surviennent dans l'exon 9 (60 à 65%) ou 20 (20 à 25%) (Khaleghpour et al., 2004). Les mutations *PI3CA* surviennent environ deux fois plus souvent dans les tumeurs colorectales déjà mutées pour *KRAS*. La mutation *PIK3CA* entraîne une activation constitutive de la voie de signalisation PI3K ce qui favorise des mécanismes cellulaires participant à la cancérogenèse colorectale.

e) Mutation du gène *SMAD4*

SMAD4 est l'une des huit protéines composant de la famille des SMAD, elles participent à la transduction des signaux extracellulaires vers le noyau. Le gène SMAD4 est un gène suppresseur de tumeur. Sa mutation qui entraîne une diminution de son expression est retrouvée dans 20 à 40% des CCRs (Salovaara et al., 2002). SMAD4 joue un rôle central dans la voie de signalisation TGF β . Le complexe des récepteurs TGF β est un tétramère constitué de deux paires de sérine/thréonine protéine kinase transmembranaires : deux TGF β récepteur de type I (T β RI) et deux TGF β récepteur de type II (T β RII). L'activation de la voie de signalisation TGF β est initiée par la liaison du ligand, TGF β , au T β RII. T- β R II recrute et phosphoryle T β RI qui va à son tour induire la phosphorylation de SMAD2/3. Une fois phosphorylé SMAD2/3 se dissocie de T β RI et forme un complexe avec SMAD4. Ce complexe est transloqué dans le noyau pour activer ou réprimer l'expression de gènes cibles qui jouent un rôle clé dans la régulation de la progression tumorale. L'un des gènes cibles de la voie est SMAD7 qui participe au rétrocontrôle négatif de la durée et de l'intensité de la signalisation TGF β en recrutant une ubiquitine liguase E3, SMURF, au T β RI (Figure 14) (Liu et al., 2021). En plus de sa voie canonique de signalisation TGF β , SMAD4 module également des voies non canoniques telles que les voies de signalisation MAPK et PI3K. Une mutation de *SMAD4* entraîne une perturbation des voies canoniques du TGF β et non canoniques et peut favoriser la migration, l'invasion et la mortalité cellulaires ainsi que la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) (Zhang et al., 2010; Ai et al., 2013; Voorneveld et al., 2014; X. Li et al., 2017).

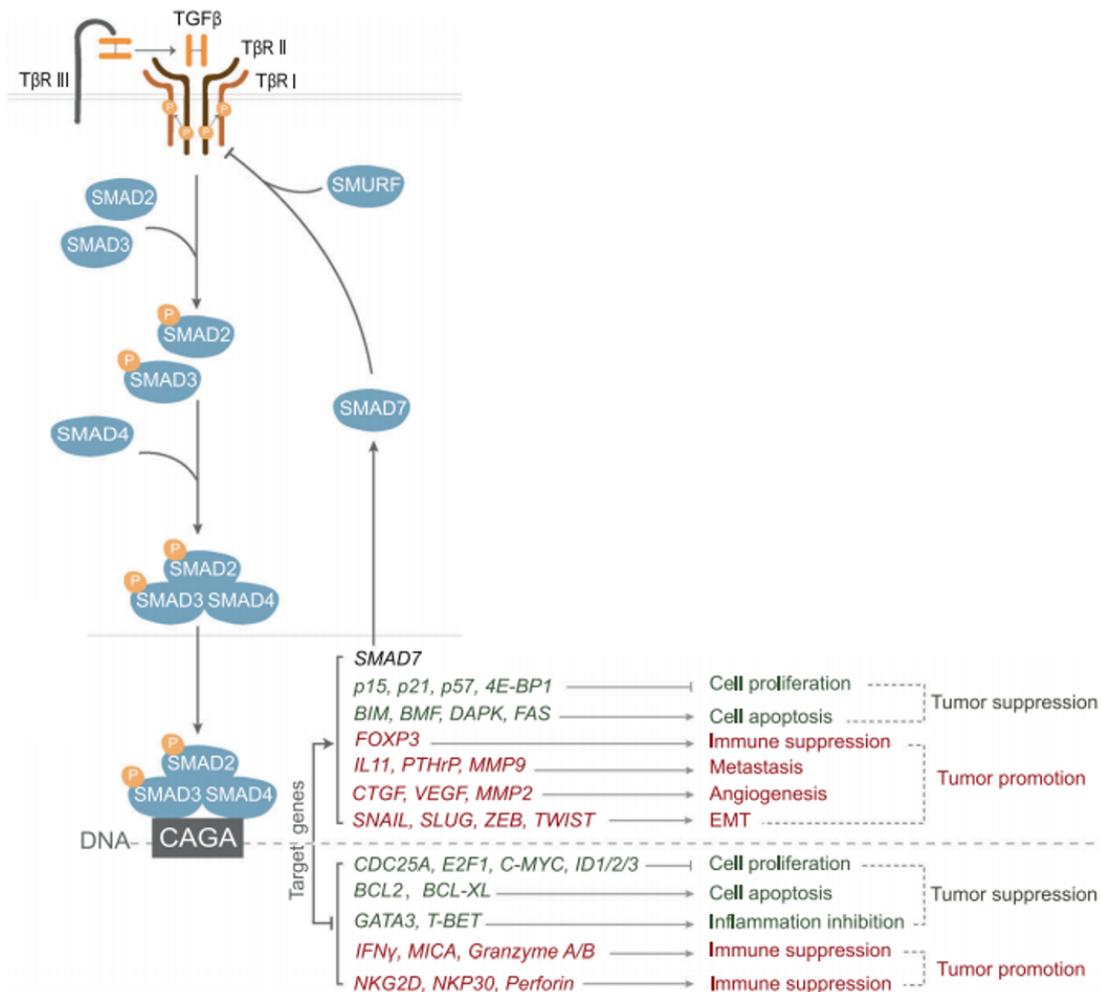


Figure 14 : Voie de signalisation TGFβ/SMAD4 (Liu et al., 2021).

En résumé, le cancer colorectal est une maladie progressive en plusieurs étapes pour laquelle les facteurs génétiques sont bien décrits. Le CCR résulte de l'accumulation d'une succession de mutations dans des proto-oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs. La perte d'*APC* et de *TP53* et l'activation de *KRAS* sont des évènements génétiques clés de la cancérogénèse colorectale. D'autres mutations interviennent dans le CCR, telles que les mutations des gènes *BRAF*, *PI3KCA* et *SMAD4*.

III Exposome ou les origines environnementales des cancers

1) L'exposome

a) Définition

L'exposome a été pour la première fois décrit par Christopher Wild, épidémiologiste et directeur du Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) est composé de l'ensemble de chacune des expositions à laquelle un individu est soumis de la conception à la mort. Il est important de prendre en compte à la fois la nature de ces expositions et leurs changements dans le temps. Trois grandes catégories d'expositions non génétiques sont décrites : internes, externe spécifique et externe générale.

L'exposome comprend des processus internes à l'organisme comme le métabolisme, les hormones circulantes endogènes, la flore intestinale, la peroxydation lipidique, la morphologie corporelle, l'activité physique et le vieillissement. Ces conditions internes affectent l'environnement cellulaire et sont décrit comme endogènes. Les processus d'expositions externes spécifiques sont vastes. Ils comprennent les rayonnements, les agents infectieux, les contaminants chimiques et les polluants environnementaux, l'alimentation, les facteurs liés au mode de vie (par exemple, le tabac et l'alcool), aux lieux de vie (pollution, plomb, amiante dans les matériaux), les professions exercées et les interventions médicales. Les études épidémiologiques tentent depuis des années de faire le lien entre ces facteurs de risques environnementaux et le cancer. Les processus externes généraux comprennent les influences sociales, économiques et psychologiques, comme par exemple, l'éducation, la situation financière et le stress psychologiques et mental (Wild, 2012).

b) L'exposome et le cancer

Le cancer est une maladie multifactorielle associée à des mutations spontanées, comme nous l'avons vu dans le précédent chapitre. Cependant, en complément des facteurs liés au génome, des expositions environnementales, notamment chimique, peuvent induire une instabilité génomique et perturber le fonctionnement des cellules. Il est difficile d'accéder à

la connaissance complète d'un exposome. C'est pourquoi on est souvent amené à l'évaluer plutôt dans un champ restreint, l'exposome chimique par exemple. Des études épidémiologiques et expérimentales ont mis en évidence des interactions exposome chimique-cancer. Par exemple, des données épidémiologiques ont démontré que le tabagisme était la principale cause de cancer du poumon. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques qui composent les cigarettes seraient responsables des effets cancérigènes (Hecht, 1999; Goldman et al., 2001).

Une meilleure connaissance de l'exposome permettrait de réaliser une meilleure prédiction des cancers, une meilleure surveillance des facteurs de risque et ainsi des meilleures stratégies de prévention des cancers.

2) Les causes environnementales du cancer colorectal

L'environnement est décrit comme l'un des facteurs de risque majeur du cancer colorectal. Ici l'environnement se définit au sens anglophone, incluant l'alimentation et l'hygiène de vie. Ainsi, il a été estimé que 44% des cas de CCR pourraient être prévenus au Royaume Uni en ayant une meilleure alimentation et en pratiquant de l'exercice physique (Parkin, 2011). Cependant, les liens entre environnement et cancer ont beaucoup fait débat, notamment avec les travaux de Tomasetti et al (2015; 2017). A l'aide d'une corrélation mathématique basée sur le nombre de divisions de cellules-souches dans les tissus et la part d'erreurs aléatoires dues à la réplication, ils décrivent que les mutations oncogéniques surviendraient de façon aléatoire lors de la division des cellules souches. Ils estiment que deux tiers des tumeurs seraient dus au hasard (bad luck) plutôt qu'à des facteurs environnementaux ou génétiques. Wu et al (2016) ont réévalué ces données et se sont appuyés sur la grande variation des taux de cancers dans le monde. Les migrants qui se déplacent d'un pays avec une prévalence faible vers un pays avec une prévalence plus élevée obtiennent alors un risque plus élevé de cancer (O'Keefe et al., 2007; Sharma and O'Keefe, 2007). Ces études concluent que les facteurs génétiques à eux seuls ne peuvent pas expliquer la survenue du cancer et que les facteurs extrinsèques jouent un rôle majeur.

Plusieurs facteurs environnementaux ont été identifiés comme facteurs de risques du CCR : l'alimentation, l'activité physique et l'obésité, le tabagisme et la consommation d'alcool

(Murphy et al., 2019). Une étude épidémiologique indique que 30 à 70% des CCR sont attribuable à l'alimentation (Parkin, 2011). Un régime western diet, riche en acide gras insaturés tel que la viande rouge et pauvre en fibres, est reconnue comme étant un facteur de risque majeur du CCR (Wiseman, 2008; Feng et al., 2017). De plus, notre alimentation peut être contaminée par des agents chimiques tels que les pesticides et des polluants environnementaux comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et les dioxines.

3) Viande rouge

La viande rouge fait référence à tous les types de viande issus des tissus musculaires de mammifères comme le bœuf, le veau, le porc, l'agneau, le mouton, le cheval et la chèvre. Le World Cancer Research Fund (WCRF) et l'American Institute for Cancer Research (AICR) qui œuvrent pour des politiques de prévention du cancer, ont produit une synthèse de la littérature scientifique globale de tous les résultats publiés au sujet des liens entre alimentation et cancer. Le premier rapport a été publié en 1997 mis à jour régulièrement par la suite, puis récemment en 2018. Ce rapport conclut à un risque relatif significatif de 1,12 [95% IC 1,00-1,25] pour 100 g de viande rouge consommée par jour, c'est-à-dire que chaque part de 100 g de viande rouge consommée par jour entraîne une augmentation du risque à hauteur de 12%.

De plus, en 2011 une étude anglaise estime que 21% des cas de cancers colorectaux pourraient être dus à la consommation de viande rouge et de charcuterie (Parkin, 2011). Le WCRF recommande alors de limiter la consommation de viande rouge à moins de 500 g par semaine et par individu.

En 2015, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) *via* le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC) a classé la consommation de viande rouge comme probablement cancérogène pour l'humain (groupe 2A).

a) Hypothèses mécanistiques

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer le lien entre consommation de viande rouge et cancer colorectal, notamment la teneur de la viande en graisses, en amines hétérocycliques (AHC) ou en hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), en composés N-nitrosés et en fer héminique.

i. Graisse animale

La teneur en graisse de la viande est l'une des premières hypothèses pour expliquer l'étiologie du cancer colorectal est sa teneur en graisse. L'ingestion de graisses augmente la sécrétion d'acides biliaires dans la lumière intestinale. Les acides biliaires sont abrasifs pour le côlonet peuvent favoriser le développement de tumeurs (Bruce, 1987). Un régime riche en graisses augmente le risque d'obésité qui est un facteur de risque du cancer colorectal selon WCRF. L'obésité est souvent associée à une résistance à l'insuline qui entraîne une augmentation du glucose, des acides gras libres, de l'insuline et de l'IGF-1 (insuline-like growth factor 1) dans le sang. Ces facteurs favorisent la prolifération et réduisent l'apoptose des cellules cancéreuses (Calle and Kaaks, 2004; Calle and Thun, 2004).

ii. Amines hétérocycliques (AHC) et hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)

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

La réaction à haute température entre la créatine ou la créatinine, des acides aminés et des sucres provenant de la viande entraîne la production de AHC. Leur formation est dépendante de la surface de cuisson, du degré de bruissement et de la durée de la cuisson (Lo et al., 2020; Skog et al., 1998). Les AHC les plus abondants dans la viande rouge sont le MeIQx et le PhiP (Turesky, 2007). Des effets cancérigènes de AHC ont été observés chez le singe et le rongeur, cependant les doses utilisées sont 1 000 à 10 000 fois plus importante que celles trouvées dans la viande (Sugimura et al., 2004).

Les HAP sont formés suite à la combustion incomplète de matières organiques contenues dans la viande. Les HAP notamment le benzo[a]pyrène B[a]P sont des mutagènes et des cancérigènes pour les animaux et chez les humains le B[a]P peut former des adduits à l'ADN

dans la muqueuse du côlon (Alexandrov et al., 1996). Le B[a]P est classé comme agent cancérigène par le CIRC (groupe 1).

Les études épidémiologiques montrent des résultats contradictoires, certaines études ont démontré un lien entre AHC, HAP et cancer colorectal (Abid et al., 2014; Cross et al., 2012) et d'autres non (Tabatabaei et al., 2010; Ollberding et al., 2012). L'absence de méta-analyse et le fait que l'impact de ces composés soit dépendant d'un génotype humain spécifique explique les résultats contradictoires sur les liens éventuels entre le cancer colorectal et ces composés (Gilsing et al., 2012).

iii. Composés N-nitrosilés (NOCs)

Les humains sont exposés aux NOCs de façon endogène et exogène. Des NOCs préformés et donc exogènes sont retrouvés dans les viandes transformées ou salées, les poissons, fromages ou bières fumés. La couleur rose, le rehaussement de savoir et l'amélioration de la durée de conservation de la viande transformée sont souvent assurés par un ajout de nitrite (NO_2). Les NOCs sont produits par la réaction du nitrite et des oxydes d'azote avec les amines secondaires et les N-alkylamides. Ils peuvent nuire à l'intégrité de l'ADN par alkylation des bases. De manière endogène les NOCs peuvent être formés par décarboxylation des acides aminés induite par les bactéries intestinales (Lijinsky, 1999; Kuhnle and Bingham, 2007). Les NOCs sont soupçonnés de jouer un rôle dans la cancérogenèse colorectale par l'induction de métabolites endommageant l'ADN tels que tels les aldéhydes et les ions alkyldiazonium, qui pourraient par conséquent conduire à des lésions cancéreuses dans les cellules (Bartsch and O'Neill, 1988). Le CIRC a classé les nitrites ingérés dans des conditions entraînant une nitrosination endogène comme probablement cancérigènes pour l'humain (groupe 2A). La charcuterie, viande transformée souvent conservée avec des sels nitrités favorisant la formation de NOC, est classé cancérigène avéré pour l'humain par le CIRC depuis 2015. Des antioxydants comme l'acide ascorbique inhibent la synthèse des NOCs et sont ajoutés à la viande transformée (Cross and Sinha, 2004).

iv. Le fer héminique

Le fer héminique désigne un atome de fer Fe^{2+} , inclus dans un noyau porphyrine qui est responsable de la couleur rouge de la viande. Ce complexe est appelé hème. Initialement, le lien entre le fer héminique et la cancérogenèse colorectale a été fait suite au constat que

l'association entre consommation de viande rouge et cancer colorectal ne se retrouve pas avec la viande blanche, celle-ci étant en moyenne 10 fois moins riche en fer héminique que la viande rouge. Le fer héminique a été mise en évidence comme étant le seul agent responsable de la promotion de la cancérogenèse colorectal chez le rat chimio-induit en comparaison avec les AHC, les nitrites et les nitrates, donnés à doses nutritionnelles (Bastide et al., 2015a).

Trois mécanismes peuvent expliquer l'effet de l'hème sur la cancérogenèse colorectale : l'hème induit la production de ROS et génère alors du stress oxydant, l'hème catalyse la N-nitrosation endogène et favorise la formation de NOCs et l'hème induit la peroxydation lipidique dans les aliments et dans l'intestin ce qui favorise le cancer colorectal (Figure 15).

L'hémoglobine (4 noyaux d'hème entouré de 4 molécules de globine) et l'hémine (un noyau d'hème) présente des effets génotoxiques *in vitro* sur des cellules tumorales ou des colonocytes en culture primaire (Glei et al., 2006; Angeli et al., 2011). Des effets cytotoxiques ont également été observés *in vitro* sur des lignées tumorales humaines (Glei et al., 2006). La génotoxicité de l'hème serait due à la capacité de ces molécules à induire la formation de ROS (Ishikawa et al., 2010).

L'hème peut catalyser la formation de NOCs endogènes après la consommation de charcuterie (Cross et al., 2003). Les liens entre NOCs et cancer colorectal sont décrits au chapitre précédent intitulé « Composés N-nitrosés (NOCs) ».

L'hème catalyse également l'oxydation de acides gras polyinsaturés ce qui entraîne la formation de composés tels que les époxydes et les aldéhydes. Les aldéhydes majeurs produits suite à la peroxydation lipidique sont le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxyhexéanal (HHE) et le 4-Hydroxynonéanal (HNE). Le MDA est connu pour induire des dommages à l'ADN en formant des adduits (Basu and Marnett, 1983; Niedernhofer et al., 2003) et le HNE semble être le produit de lipoperoxydation le plus toxique et induit l'apoptose et la nécrose cellulaire (Awasthi et al., 2003).

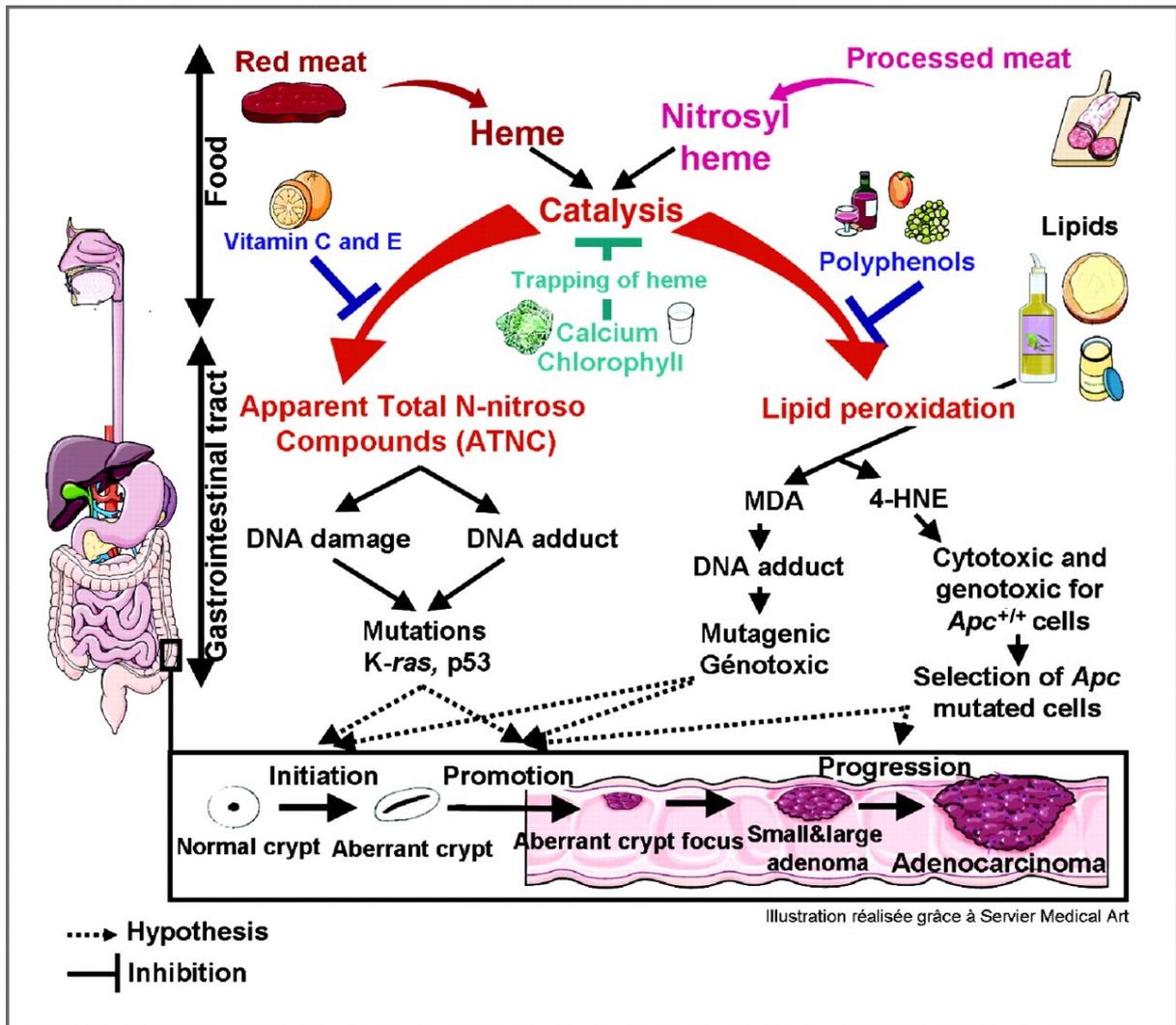


Figure 15 : Mécanisme d'action expliquant les liens entre fer héminique et cancer colorectal (Bastide et al., 2011).

b) Le HNE

La peroxydation lipidique peut être décrite de manière générale comme un processus par lequel des oxydants tels que les ROS attaquent les lipides contenant une ou plusieurs doubles liaisons carbone-carbone, en particulier les acides gras polyinsaturés (Ayala et al., 2014). Le fer par le biais de la réaction de Fenton avec le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Figure 16), peut également catalyser la formation de radicaux libres sous forme de radicaux hydroxyle ($\bullet OH$) ce qui le rend capable d'oxyder les lipides (Toyokuni, 1996). La peroxydation lipidique ou la réaction de l'oxygène avec des lipides insaturés produit une grande variété de produits d'oxydation tels que divers aldéhydes fortement réactifs : HNE, HHE et MDA. Le HNE fait

l'objet de nombreuses études de par ses multiples activités biologiques et son implication dans diverses pathologies en particulier le cancer.

Chez l'humain l'exposition au HNE peut être endogène ou exogène. Le HNE endogène correspond au HNE formé dans la cellule à partir des acides gras n-6 en conditions physiologiques ou pathologiques de stress oxydatif (Grune and Davies, 2003). Parallèlement, le corps humain peut être exposé de manière exogène au HNE, *via* la consommation d'aliments contenant du HNE ou via sa formation dans le tractus digestif à partir d'un bol alimentaire contenant ses précurseurs, le HNE est ainsi néoformé pendant la digestion.

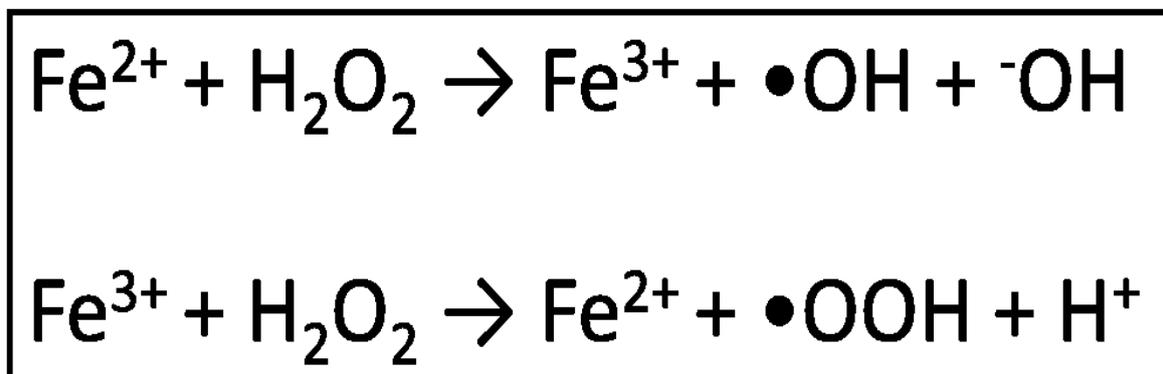


Figure 16 : Réaction de Fenton.

i. Structure et réactivité

Le 4-hydroxynonanal ou HNE est un aldéhyde à 9 carbones ($\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_2$) (Figure 17A) et un produit d'oxydation secondaire des acides gras polyinsaturés en n-6. Cette chaîne de 9 carbones est porteuse de 3 fonctions importantes, lui conférant une grande réactivité chimique envers de nombreuses molécules. De plus, la présence de deux doubles liaisons conjuguées (celle entre les carbones 2 et 3 et celle du groupement carbonyle) donne au HNE un fort caractère électrophile, qui est encore renforcé par l'effet du groupement hydroxy sur le carbone 4. Cette propriété permet au HNE de réaliser des attaques nucléophiles sur des groupements électrophiles présents dans diverses molécules organiques, notamment les protéines ou l'ADN. Les trois fonctions réactives du HNE sont : une double liaison $\text{C}_2=\text{C}_3$, un groupe carbonyle $\text{C}_1=\text{O}$ et un groupe hydroxyle en C_4 (Figure 17B). La formation d'adduits protéiques implique des groupes $\text{C}_2=\text{C}_3$ et $\text{C}_1=\text{O}$. Elle est initiée par l'addition de Michael qui qui sature

le groupe C2=C3 et permet la formation d'une liaison covalente sur C3 avec des résidus d'acides aminés (cystéine, histidine ou lysine). Après l'addition de Michael le groupe C1=O réagit avec le résidu lysine pour former une base de Schiff qui stabilise les adduits protéiques. La formation d'adduits protéiques peut modifier la structure et l'activité des protéines (par exemple, en formant des liaisons transversales entre protéines) ou même l'inactiver. Elle peut également induire un stress carbonyle.

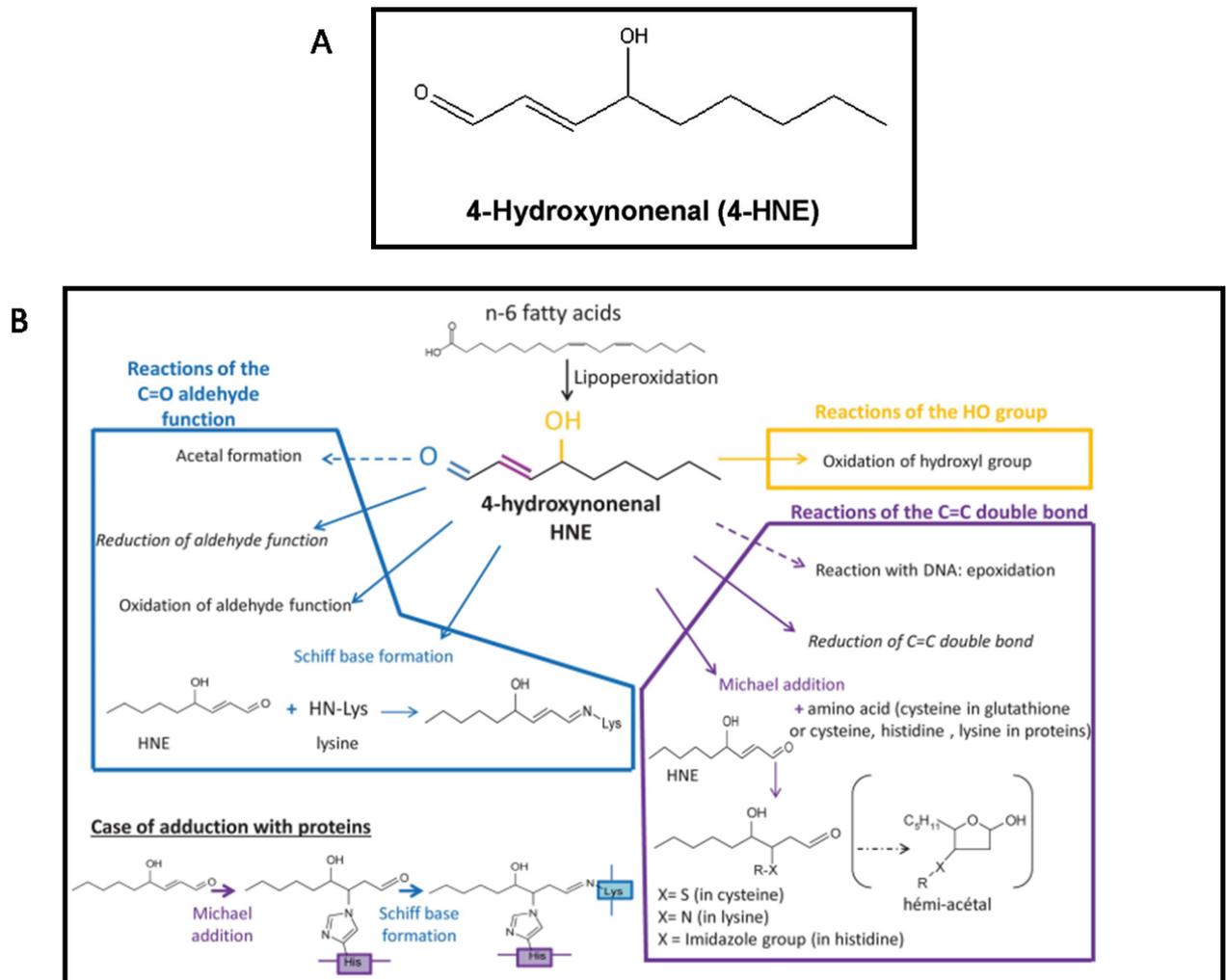


Figure 17 : (A) Structure chimique du HNE (Bastide et al., 2011) et (B) Fonction réactives du HNE (Dalleau et al., 2013)

ii. Le métabolisme du HNE

La demi-vie du HNE est inférieure à 2 minutes. Cette demi-vie relativement courte souligne l'importance de la détoxification du HNE en tant que système de défense cellulaire contre la toxicité du HNE (Dalleau et al., 2013). La détoxification du HNE dépend du type cellulaire. Par exemple, des colonocytes métabolisent 100% de 40 μ M de HNE en 90 minutes (Baradat et al., 2011) tandis que des hépatocytes métabolisent 95% de 100 μ M de HNE en 3 minutes (Siems et al., 1997). En général, les voies de détoxification du HNE consistent en une modification de la réactivité des groupements C2=C3 et C1=O par oxydation/réduction, saturation ou conjugaison (Figure 18). Les enzymes clés impliquées dans ces modifications sont : les Glutathion-S-Transférases (notamment la GSTA4), les aldéhydes déshydrogénases (ALDH), les aldo-kéto réductases (AKR) et l'alcénal/one oxydoréductase (AOR).

La première étape de la détoxification du HNE est sa conjugaison au glutathion (GSH) catalysée par la GSTA4 ce qui entraîne une déplétion en GSH dans la cellule. Le glutathion est formé à partir d'un précurseur de la cystine qui entre dans la cellule via le transporteur xCT (cystein/glutamate exchange transporter). La cystine est ensuite réduite par une thioredoxine reductase en une cystéine qui va contribuer à la formation d'une molécule de glutathion. La conjugaison du HNE au GSH permet de neutraliser la réactivité du HNE avec les protéines et l'ADN. Le conjugué HNE-GSH peut alors être soit exporté à l'extérieur de la cellule via des transporteurs (MRP et PLIP76) ou alors être métabolisé par deux types d'enzymes, les ALDH, qui vont permettre son oxydation puis sa cyclisation en HNA-lactone-GSH (HNA : acide 4-hydroxynonénoïque), ou les AKRs, qui vont permettre sa réduction en DHN-GSH (DHN : 1,4-dihydroxy-2-nonène). Les ALDH ont un rôle prépondérant. HNA-lactone-GSH et DHN-GSH sont efflués via des transporteurs. Les autres métabolites du HNE peuvent également être relargués à l'extérieur de la cellule (Dalleau et al., 2013).

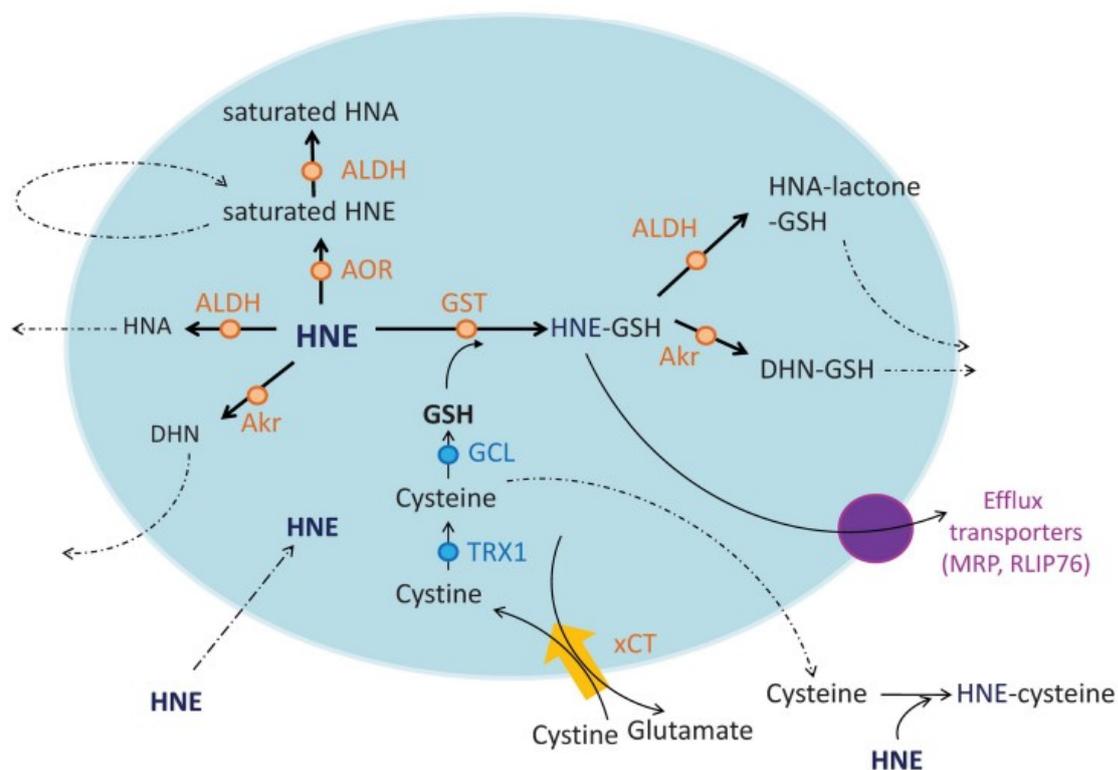


Figure 18 : Métabolisme du HNE. DHN: 1,4-dihydroxy-2-nonene; HNA: 4-hydroxynonenic acid; AOR: aldehyde oxydoreductase; AKR: aldo-keto reductase; GST: glutathione S-transferase; ALDH: aldehyde dehydrogenase; xCT: cystine transporter; MRP: multidrug-resistant protein; RLIP76: RaIAbinding protein 16 encoded 76-kDa splice variant; and Trx1: thioredoxine reductase 1 (Dalleau et al., 2013).

iii. HNE et cancer colorectal

Le fer héminique contenue dans la viande rouge induit une lipoperoxydation au niveau luminaire. Cette lipoperoxydation génère des produits secondaires comme le HNE qui sont impliqués dans la promotion de la cancérogenèse colorectale. Le HNE entraîne une sélection positive des cellules prénéoplasiques aux dépens des cellules normales (Figure 19). En effet, l'eau fécale, contenu luminaire auquel les cellules épithéliales coliques sont physiologiquement exposées, de rats nourris à l'hémoglobine et au bœuf induit préférentiellement l'apoptose dans les cellules épithéliales normales du côlon de souris que dans celles portant une mutation sur le gène *Apc*, considéré comme prénéoplasique. Cette résistance des cellules prénéoplasiques serait dû à un niveau élevé d'enzyme de détoxification. Ces enzymes sont régulées par Nrf2 (nuclear factor (erythroid-derived 2)-like2)

un facteur de transcription responsable de l'expression des enzymes antioxydantes. Le HNE favoriserait la promotion du cancer colorectal selon un modèle de sélection darwinienne dépendant de la réponse antioxydante orchestrée par Nrf2 (Pierre et al., 2007; Surya et al., 2016).

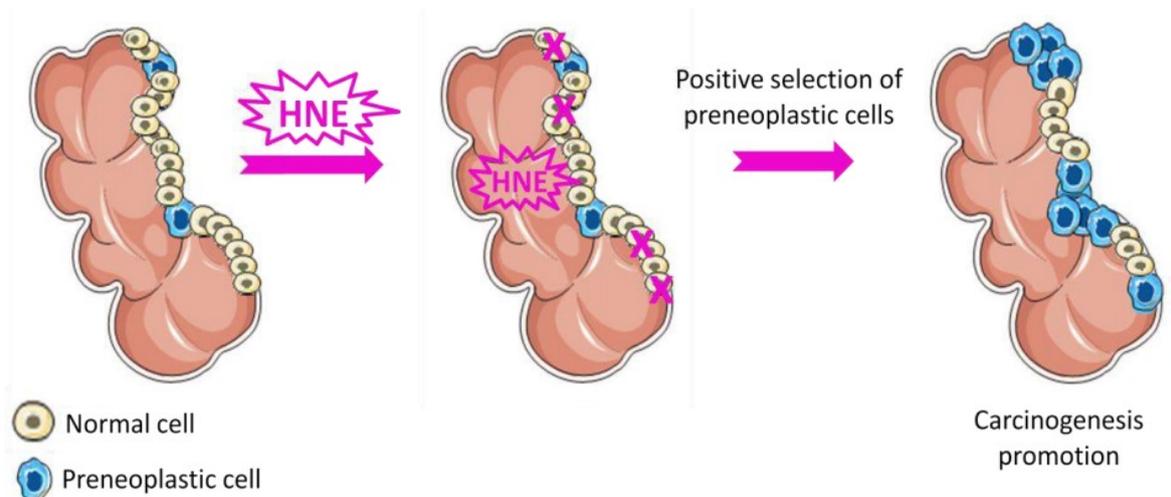


Figure 19 : Modèle de promotion du cancer colorectal basé sur une sélection Darwinienne des cellules paranéoplasiques par rapport au cellules normales induite par le HNE (Dalleau, 2013).

4) Pesticides

a) Définition

Le terme « pesticide » est une appellation générique dérivé du latin « pestis » (fleau) et « caedere » (tuer). Un pesticide est un produit chimique destiné à lutter contre les parasites animaux végétaux nuisibles aux cultures et aux produits récoltés. Ce terme connaît diverses définitions plus ou moins précises.

" On entend par pesticide toute substance ou mélange de substances, ou micro-organismes, y compris les virus, destinés à repousser, détruire ou combattre tout parasite, y compris les vecteurs de maladies humaines ou animales, les nuisibles, les espèces indésirables de plantes ou d'animaux qui causent des dommages pendant la production, la transformation, le stockage, le transport ou la commercialisation de denrées alimentaires, de produits agricoles,

de bois et de produits du bois ou d'aliments pour animaux, ou qui peuvent être administrés aux animaux pour combattre les insectes, arachnides ou autres parasites dans ou sur leur corps. Le terme comprend les substances destinées à être utilisées comme régulateurs de croissance des insectes ou des plantes, les défoliants, les desséchants, les agents de nouaison, d'éclaircissage ou de prévention de la chute prématurée des fruits, ainsi que les substances appliquées sur les cultures avant ou après la récolte pour protéger le produit de la détérioration pendant le stockage et le transport. Le terme inclut également les synergistes et les phytoprotecteurs des pesticides, lorsqu'ils font partie intégrante de la performance satisfaisante du pesticide. "(Organization and Safety, 2010)

Ils sont également définis en fonction de leurs usages et dans les textes relatifs à la réglementation européenne, on distingue :

- Les produits phytopharmaceutiques, selon la directive 97/414/CE, sont des « substances actives et préparations contenant une ou plusieurs substances actives, qui remplissent un ou plusieurs objectifs suivants : protéger les végétaux ou les produits végétaux contre tous les organismes nuisibles ou à prévenir leur action ; exercer une action sur les processus vitaux des végétaux, pour autant qu'il ne s'agisse pas de substances nutritives (par exemple, les régulateurs de croissance) ; assurer la conservation des produits végétaux, sauf si ces substances ou produits font l'objet de dispositions particulières concernant les agents conservateurs ; assurer la conservation des produits végétaux, sauf si ces substances ou produits font l'objet de dispositions particulières concernant les agents conservateurs ».
- Les biocides, selon la directive 98/8/CE, sont des produits anciennement nommés « pesticides à usage non agricole ». Ils concernent « les substances actives et préparations contenant une ou plusieurs substances actives qui sont présentées sous la forme dans laquelle elles sont livrées à l'utilisateur, destinées à détruire, repousser ou rendre inoffensif les organismes nuisibles, à en prévenir l'action ou à les combattre de toute autre manière, par une action chimique ou biologique ». Les biocides sont destinés à des usages domestiques par exemple les insecticides ménagers et les produits antiparasitaires (anti-acariens, antipuces).

b) Classification

Les pesticides peuvent être classés en fonction de leur cible principale, on distingue alors trois catégories principales :

- Les herbicides, qui luttent contre les plantes adventices des cultures.
- Les fongicides, qui luttent contre les champignons pathogènes.
- Les insecticides, qui luttent contre les insectes nuisibles.

Un deuxième système de classification des pesticides est basé sur la nature chimique de la substance active qui compose majoritairement les produits phytosanitaires. Les principaux groupes chimiques sont représentés dans le tableau 1. Parmi les familles les plus répandues on peut citer les organophosphorés, les organochlorés et les carbamates.

Catégories de pesticides	Classes	Exemples
Herbicides	Phosphonates Herbicides chlorophénoxy Diryridine	Glyphosate 20,4D, mecoprop (MCP) Diquat, paraquat
Fongicides	Phénylaminopyrimidine Phénylpyrrole Dicarboximide SDHi (succinate dehydrogenase inhibitor)	Cyprodinil Fludioxonil Procymidone, Iprodione Bixafen, Sedaxane, Boscalide
Insecticides	Organophosphorés Carbamates Pyréthroïdes/pyréthrines Organochlorés Néonicotinoïdes Phénylpyrazoles	Malathion Carbofuran Lambda-cyhalothrine Chlordécone Imidaclopride Fipronil

Tableau 1 : La classification des pesticides.

c) Autorisation de mise sur le marché des pesticides et pharmacovigilance

i. Réglementation pour l'utilisation des pesticides

Le règlement européen (CE) n°1107/20093 régit l'évaluation, l'évaluation, la mise sur le marché et l'utilisation des produits phytopharmaceutiques. Chaque substance active fait l'objet d'une évaluation des risques et d'une autorisation au niveau européen.

L'obtention d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) se déroule en deux étapes :

- Autorisation au niveau européen : conformément aux lignes directrices le demandeur doit présenter une analyse des risques de sa molécule. L'agence européenne de sécurité alimentaire (EFSA) mène une évaluation scientifique et remet un avis public de son expertise. Si la substance active est approuvée elle est inscrite à l'annexe du règlement UE/540/2011, liste des substances actives approuvées.
- Autorisation au niveau des Etats membres de l'Union Européenne : l'ensemble des substances actives du produit doivent au préalable avoir été autorisées au niveau européen. Le demandeur soumet un dossier dans chaque Etat membre où il souhaite le commercialiser. En France l'agence nationale de sécurité sanitaire (ANSES) est chargée de l'analyse des risques, elle remet un avis public de son expertise. Le ministère de l'agriculture se base sur cet avis de l'ANSES pour délivrer ou non l'AMM. L'AMM est valable dix ans et peut être renouvelée, elle peut aussi être retirée à tout moment.

Différents types de tests sont imposés par la directive 97/414/CE pour l'évaluation du risque d'un produit phytopharmaceutique pour l'humain et sont réalisés par le demandeur de l'AMM :

- Des tests de toxicité :
 - Aiguës qui permettent d'estimer la dose létale ainsi que les effets irritants ou sensibilisant d'un produit. Ils sont réalisés chez l'animal (rongeur, cobaye, lapin) par voie orale, cutanée ou par inhalation.
 - Court terme qui permettent d'étudier la pharmacocinétique du produit. Ils sont réalisés durant 28 jours chez le rongeur par voie orale, cutanée ou par inhalation.

- Moyen terme qui permettent de déterminer la dose sans effets observés ou NOAEL (No observed adverse effect level). Les animaux sont exposés de 90 jours à 1 an par voie orale.
- Des tests de mutagenèse et de génotoxicité : les tests de mutagenèse sont réalisés chez les procaryotes (test d'Ames) et sur les cellules de mammifères. Afin de se rapprocher des conditions physiologiques des tests de mutagenèse *in vivo* sont réalisés avec des produits de dégradation de la molécule mère obtenue *in vitro* (fraction métabolique S9) ou *in vivo* chez le rongeur. La génotoxicité est analysée *in vitro* via la réalisation de tests de clastogénicité, qui permettent de détecter les cassures de l'ADN pour étudier l'aberration chromosomique mais également *in vivo* dans le cas de résultats positifs sur des cellules germinales ou de micronoyaux sur moelle osseuse de rongeurs. Les effets directs et indirects sur l'ADN et le risque héréditaire sont étudiés.
- Des tests de cancérogenèse : qui sont réalisés chez deux espèces par voie orale (2 ans chez le rat et 18 mois chez la souris)
- Des tests de toxicité pour la reproduction : sont réalisés sur plusieurs générations de rongeurs et permettent d'évaluer les effets sur la fertilité et la gamétogenèse chez les parents mais également le développement pré/post natal, la mortalité et la croissance de la descendance. Les effets tératogènes ou les effets sur l'organogenèse sont également analysés.

Ces études permettent de classer les substances phytopharmaceutiques selon leur caractère cancérigène, mutagène et/ou reprotoxique (CMR) pour l'humain en 3 catégories :

- Catégorie 1 : substance connue par des preuves épidémiologiques comme cancérigène ou mutagène ou reprotoxique
- Catégorie 2 : substance assimilée (forte présomption) à un CMR pouvant provoquer des effets CMR chez l'humain
- Catégorie 3 : Effets CMR possibles chez l'Homme, les substances sont jugées préoccupantes mais les preuves sont insuffisantes pour les classer en catégorie 2.

De plus, en France, l'ANSES détermine des valeurs toxiques de références (VTR) sur la base des études toxicologiques réglementaires mises en œuvre par les entreprises du domaine phytosanitaires et fournies dans les dossiers de demande d'homologation/ de ré-

autorisation de la substance active. D'autres études, issues notamment de la recherche académique, sur l'animal, toxicologiques *in vitro* ou épidémiologiques sur l'humain peuvent également être utilisées pour la détermination des VTR. Ces valeurs sont des indices toxicologiques qui permettent de quantifier ou de qualifier un risque pour la santé humaine dans le but de tenter d'assurer la sécurité de ceux et celles qui les fabriquent, les manipulent et des individus exposés par leur environnement ou leur alimentation. Pour définir une VTR, il faut déterminer une dose critique chez l'humain ou l'animal (Figure 20) :

- NOAEL (no observed adverse effect level) ou dose maximale sans effet nocif observable. Correspond à la dose la plus élevée en dessous de laquelle la probabilité de survenue d'un effet nocif est théoriquement nulle.
- LOAEL (lowest observed adverse effect level) correspond à la plus faible dose inductrice d'un effet nocif.
- BMD (Benchmark Dose) correspond à la dose produisant un effet mesurable correspondant à un niveau de réponse par rapport à un groupe témoin. C'est-à-dire la dose (ou la limite inférieure de l'intervalle de confiance correspondant) produisant un effet critique avec une augmentation de la fréquence ou de la sévérité particulière conventionnellement fixée à 1, 5 ou 10 %.

Les NOAEL et LOAEL sont remises en question, notamment parce qu'elles nécessitent beaucoup d'animaux, qu'elles ne représentent qu'une partie de l'information donnée par les études toxicologiques et que leur valeur dépend de la taille de l'échantillon utilisé. Souvent établies sur des études réglementaires menées par les entreprises elles-mêmes, des publications académiques indépendantes peuvent amener à les ré-évaluer. La BMD a été développée pour s'affranchir de certains inconvénients. Dans ce cas, l'ensemble de la relation doses réponses est considéré, il n'y a donc pas de pertes d'information. Aussi par le calcul d'un intervalle de confiance cette méthode prend en compte la variabilité liée aux données toxicologiques.

Les principales VTR pour les individus exposés par l'alimentation sont :

- L'ARfD (acute reference dose) ou dose de référence aiguë, c'est la quantité estimée d'une substance présente dans les aliments ou l'eau de boisson, exprimée en fonction du poids corporel, qui peut être ingérée sur une période brève sans risques pour la santé du consommateur.

- La DJA (dose journalière admissible) ou la quantité d'une substance qu'un individu devrait ingérer par jour sans risque pour sa santé. Ce seuil de sécurité à long terme est exprimé en mg/kg de poids corporel/jour et est calculé à partir de la NOAEL.
- La LMR (limites maximales de résidus) ou seuil réglementaire de concentration de résidus de produits au-delà duquel la commercialisation du produit alimentaire n'est plus autorisée, cela concerne des denrées destinées à l'alimentation humaine ou animale.

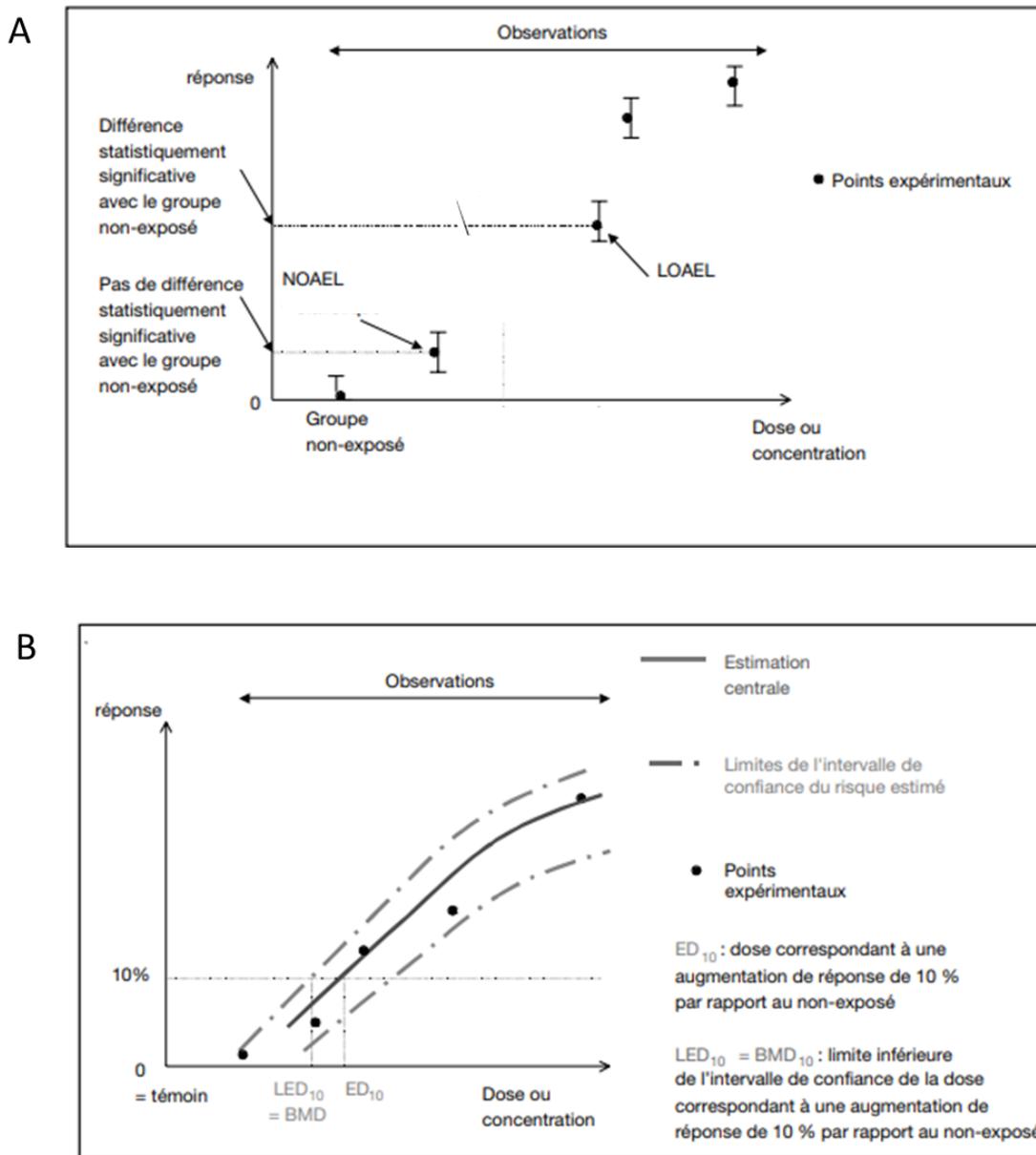


Figure 20 : Détermination des doses critiques (A) NOAEL, LOAEL et (B) BMD (adapté de (Bonvallot and Dor))

ii. La phytopharmacovigilance

Une fois mis sur le marché, un pesticide peut être utilisé à très grande échelle et des effets non intentionnels qui n'avaient pas été anticipés peuvent alors apparaître. La phytopharmacovigilance a été mise en place afin d'assurer une veille et un suivi de ces potentiels effets nocifs, l'objectif étant de détecter au plus tôt les signaux et prendre des mesures de prévention ou de limitation des risques. Ce dispositif est en vigueur en France depuis 2015 et est dirigé par l'ANSES. Il permet un suivi de la contamination des milieux, de l'exposition et des impacts sur les organismes vivants et les écosystèmes dans leur ensemble. Il permet également l'étude de l'apparition de résistance chez les organismes cibles. Ce dispositif repose sur trois piliers du recueil et de l'organisation de la connaissance :

- Une réseau d'organisme de surveillance ou de vigilance
- Des études *ad hoc*
- Le recueil de signalement spontanés

Dans les faits, le retrait de substances actives prend énormément de temps, comme cela est rapporté par différents travaux de sociologie des sciences (Demortain, 2008; Landrigan et al., 2018; Levain et al., 2015; Vandenberg et al., 2013).

d) Utilisation des pesticides en France

L'Union Européenne, et notamment la France, se sont engagées dans un processus de réduction de l'utilisation des pesticides dans le milieu agricole, sur la base de leur impact néfaste sur les écosystèmes et la santé. En France, du Grenelle de l'environnement en 2007 est né le plan « ECOPHYTO 2018 » lancé en 2009, afin de réduire les risques liés aux pesticides. L'un des objectifs du plan était la réduction de moitié, à l'horizon de 10 ans, l'emploi des pesticides de synthèse. Cependant, la vente de pesticides en France a été en hausse de 22% en 2018 (Figure 21). Depuis, plusieurs plans se sont succédés (Ecophyto 2 et 2+ actuellement). On note, en 2020 une hausse de 23% des ventes par rapport à 2019, avec 44 036 tonnes vendue. Les ventes de glyphosate ont notamment considérablement augmenté en 2020 avec 8 600 tonnes vendues contre 6 000 en 2019. Bien que les chiffres de 2020 restent inférieurs à ceux de 2018. Ces augmentations peuvent être dues à un phénomène d'anticipation des nouvelles réglementations notamment la hausse de la redevance pour pollutions diffuses au 1^{er} janvier 2019. De plus, la Cour des comptes constate que les effets du plan Ecophyto

demeurent très en deçà des objectifs fixés. Elle demande plus de transparence au niveau des dépenses des fonds publics et de la consommation des produits phytosanitaires en France. La Cour recommande donc de « publier et rendre accessibles au public, chaque année, les données et les analyses rendant compte de la politique menée, des substances actives émises et de leurs effets sur la santé humaine et sur l'environnement, notamment sous forme de cartographies ».

Evolution de la quantité totale de substances actives hors usages en agriculture bio et hors produit de bio contrôle vendues en France

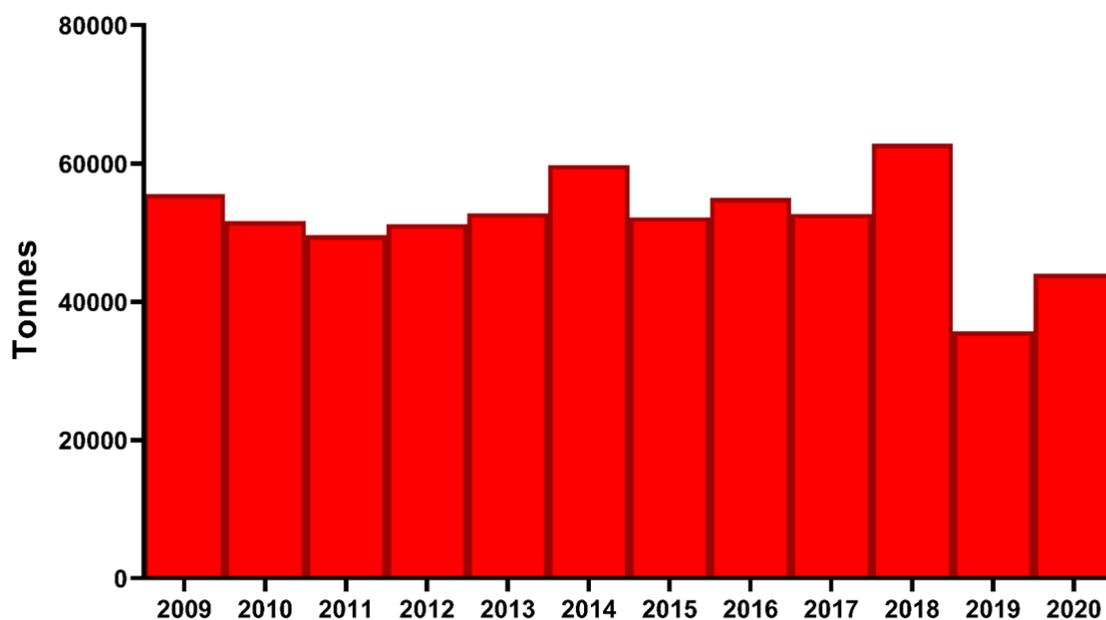


Figure 21 : Evolution de la quantité totale de substances actives hors usages en agriculture bio et hors produit de bio contrôle vendues en France.

e) Sources et voies d'exposition aux pesticides

L'exposition aux pesticides peut se produire directement dans le cadre de leur fabrication ou de leur utilisation ou indirectement par l'air, l'eau, les sols, les surfaces ou les denrées alimentaires contaminées. Les sources de contaminations sont multiples : les utilisations agricoles (90% des quantités vendues en France) tels que le traitement des cultures, des animaux ou des bâtiments d'élevage ou de stockage ; les utilisations non agricoles lors de l'entretien des infrastructures de transport (routes, chemins de fer, aéroports) ; leur usages domestiques (lutte contre les insectes et les parasites). On distingue deux types d'exposition l'exposition professionnelle ou l'exposition environnementale qui concerne la population générale. Quel que soit le type d'exposition les substances pénètrent dans l'organisme par voie cutanée, orale, et respiratoire.

En milieu professionnelle, l'exposition cutanée est la voie d'exposition majeure aux pesticides. Pour la population générale, la voie orale est souvent considérée comme la voie d'exposition la plus importante. Elle résulte de l'ingestion d'aliments ou de boisson contaminées ainsi que l'ingestion non alimentaire de poussière par exemple surtout chez l'enfant. Les denrées alimentaires sont encadrées par des dispositifs de réglementation et de surveillance fixant les limites maximales de résidus. En 2019, une analyse de près de 97 000 échantillons alimentaires menée par l'Efsa montre que 5 664, soit 45 % des échantillons, contenaient un ou plusieurs résidus de pesticides dans des concentrations inférieures ou égales aux LMR. De plus, 241 des échantillons, soit 2 %, contenaient des résidus dans des concentrations dépassant les LMR, dont 1 % ont donné lieu à des actions en justice. Les risques potentiels liés à l'alimentation semblent contrôlés, cependant les analyses sur lesquelles les évaluations se fondent ne prennent pas en compte l'impact des mélanges de pesticides : l'effet cocktail.

f) Effet cocktail des pesticides

En tant qu'individus, nous sommes exposé·e·s chroniquement à un grand nombre de contaminants alimentaires tels que les pesticides. Un des sujets majeurs en toxicologie environnementale concerne la problématique des effets des mélanges des pesticides auxquels l'humain exposé par son alimentation sur sa santé. On parle souvent d'effet cocktail

des pesticides. La question de l'impact des expositions chroniques à faibles doses constitue également un sujet tout aussi important. En effet, les pesticides sont retrouvés sous forme de cocktail dans les denrées alimentaires. En 2017, suite à son analyse sur les résidus de pesticides dans les denrées alimentaires, l'EFSA rapporte que 27.5% des échantillons contiennent deux ou plus de résidus de pesticides différents. Le nombre maximum de résidus retrouvés dans un seul échantillon (poivrons) était 30. Nous sommes quotidiennement exposé-e-s à une infinité de mélange de pesticides *via* notre alimentation, il est donc très complexe d'identifier les mélanges mais également de prédire leurs effets sur notre santé. L'évaluation du risque et la détermination des valeurs de références de ces composés sont fondés sur des études toxicologiques des pesticides pris individuellement. Les résultats qui en découlent sont de ce fait difficilement extrapolables à la réalité des expositions alimentaires humaines, puisque les pesticides en mélange peuvent interagir et conduire à des impacts non évalués avant leur mise sur le marché. La toxicité d'un mélange ne peut pas toujours être prédite à partir de celle de chacun des composés qui le composent. Les pesticides en mélanges peuvent avoir des effets additifs (somme des effets des pesticides du mélange), antagonistes (réduction des effets par un ou plusieurs composant du mélange), potentialisateurs (augmentation des effets due à un ou plusieurs produits du mélange) ou synergiques (un ou plusieurs produits augmentent très fortement l'effet des autres). Sur la base des résultats des programmes français de surveillance des aliments de 2006, une étude a déterminé les principaux mélanges de pesticides auxquels la population générale française a été exposée. L'exposition alimentaire de 3 337 personnes a été évaluée à l'aide de questionnaires alimentaires, 79 résidus de pesticides différents ont été identifiés et 7 mélanges de 2 à 6 pesticides chacun ont été caractérisés (Crépet et al., 2013b). Les effets toxicologiques *in vitro* de ces 7 mélanges et des leurs composés pris individuellement ont été étudiés sur un panel de modèles cellulaires humains ou provenant du rat, ciblant différents organes (foie, intestin, rein, côlon et cerveau). Pour la plupart des mélanges, les effets toxiques observés sur les cellules humaines ne sont pas facilement prévisibles à partir du potentiel toxique de chaque composé (Crépet et al., 2013a). Ce type d'approche est l'essentiel pour définir les mélanges des pesticides auxquels l'humain est exposé *via* son alimentation et ainsi améliorer les connaissances sur l'impact de ces mélanges sur la santé humaine.

g) Pesticides et cancers

Un important faisceau de données existe sur le rôle des pesticides dans le développement de pathologies chroniques, tels que les troubles neurologiques, les troubles de la reproduction et les cancers (ref expertise collective inserm 2013 et 2021). Le travail en épidémiologie permet d'établir des liens entre l'exposition à une substance et l'incidence de cancers. Les données les plus probantes proviennent des études épidémiologiques principalement menées en milieu professionnel chez les agriculteurs, pour lesquels l'exposition peut être caractérisée au mieux. Il est difficile de faire le lien entre cancer et un pesticide en particulier, compte tenu du nombre important de produits utilisés, de leur variabilité en fonction de la période et du type de culture tout au long d'une vie professionnelle. Il existe également un grand nombre des contraintes méthodologiques liées directement à ce type d'études. Ces difficultés empêchent de porter des conclusions précises quant à l'existence d'un risque potentiel. Cependant, en France, la cohorte AGRICAN (AGRIculture et CANcer) a été constituée entre 2005 et 2007 à partir d'agriculteurs ou de personnes travaillant en relation avec le milieu agricole (Jouzel, 2019). Elle comprend environ 180 000 individus pour lesquels a été établi un historique de santé, des cultures pratiquées et des pesticides utilisés sur douze départements de France métropolitaine (Levêque-Morlais et al., 2015). L'application aux données des questionnaires collectés au sein de cette cohorte de la matrice culture-exposition agricole PESTIMAT (Baldi et al., 2017), permet de déterminer la probabilité, l'intensité et la fréquence d'utilisation des pesticides dans les différents contextes agricoles français depuis les années 1950. Plus de 15 000 cancers incidents ont été identifiés dans la cohorte AGRICAN entre l'inclusion et la fin de l'année 2013, près de 4 000 cancers incidents supplémentaires ont été collectés en 2018 sur la période 2014-2015 portant à près de 20 000 cancers incidents actuellement identifiés (1 800 cancers du côlon, 500 cancers hépatiques, 800 cancers du rein, 250 cancers de la thyroïde et 1 800 lymphomes non-hodgkiniens).

Les travaux sur la cohorte AGRICAN mais aussi avec les autres cohortes internationales ont permis à ce jour, de disposer de résultats forts quant aux liens existants entre la survenue des cancers et l'exposition aux pesticides. Cela est particulièrement relevé lors de la dernière expertise collective inserm rendue publique en juin 2021 ("Pesticides et effets sur la santé," 2021). L'exposition aux pesticides a été plus particulièrement mise en cause dans certains types de cancers tels que le cancer de la prostate, les tumeurs cérébrales et les hémopathies

malignes (leucémies, myélomes multiple et lymphomes non hodgkiniens) (Musicco et al., 1988; Khuder et al., 1998; Costantini et al., 2001; van Balen et al., 2006; Mester et al., 2006; Orsi et al., 2007; Provost et al., 2007; Multigner et al., 2010). Les hémopathies malignes et la maladie de Parkinson sont reconnues comme maladies professionnelles. Les derniers résultats de l'enquête sur la cohorte AGRICAN datant de 2020, montrent que le taux de mortalité par cancer était inférieur à celui de la population générale avec -30% chez les hommes et -24% chez les femmes. Ceci pourrait s'expliquer en raison du tabagisme nettement moins fréquent en milieu agricole, de l'effet du travailleur sain et/ou d'une meilleure alimentation et activité physique dans ce secteur professionnel. Cependant, six cancers ont été retrouvés plus fréquemment dans les professions agricoles par rapport à la population générale : chez les hommes avec le cancer des lèvres, les lymphomes non-hodgkiniens, les cancers de la prostate et chez les femmes, les mélanomes cutanés, chez les deux sexes : les myélomes multiples et les lymphomes plasmocytaires/Waldenström. Le cancer du côlon est responsable d'un peu plus de 8% des décès par cancer de cette cohorte (Bulletin d'information AGRICAN 2020). D'autres études épidémiologiques associent positivement l'exposition professionnelle aux pesticides et le cancer de colorectal (Lee et al., 2007; Matich et al., 2021). Le manque de données concernant le lien causal entre une exposition alimentaire aux pesticides et le cancer colorectal, ne permet pas de conclure sur une potentielle association. A l'échelle de la population générale, où les expositions sont moins bien caractérisées, les données sont plus éparpillées. Cependant une association positive a été récemment observée entre les pesticides alimentaires et le cancer du sein chez les femmes ménopausées de la cohorte NutriNet (Rebouillat et al., 2021). De plus, une fréquence plus élevée de consommation d'aliments biologiques était associée à un risque réduit de cancer (Baudry et al., 2018). Ces données épidémiologiques montrent bien l'impact que peut avoir l'exposition alimentaire aux pesticides sur le développement de cancers.

De plus, le CIRC a examiné une soixante de pesticides sur les 1421 substances actives dont 428 autorisées en Europe. Il analyse les données disponibles en prenant en compte les études épidémiologiques, les études expérimentales *in vivo* ainsi que les études *in vitro* pour rechercher un éventuel mécanisme d'action. Ainsi le CIRC a classé plusieurs pesticides comme étant cancérigène pour l'humain (groupe 1) l'arsenic et ses dérivés inorganiques, le lindane et le pentachlorophénol, et d'autres comme cancérigène probable (groupe 2A) par exemple le dichlorodiphényltrichloroéthane (DTT) et le glyphosate.

h) Les mécanismes de toxicité des pesticides

Il existe un grand nombre de pesticides avec de grandes différences chimiques et des mécanismes de toxicité tout aussi différents. Les données toxicologiques dans la littérature scientifique sont fragmentaires. Ainsi, il y a un grand nombre de pesticides pour lesquels les mécanismes de toxicité pour l'humain restent méconnus (Landrigan et al., 2018). Les pesticides peuvent affecter la santé humaine par différents mécanismes tels que :

- La perturbation endocrinienne : aux Antilles françaises, l'usage du chlordécone, employé pour lutter contre le charançon du bananier de 1973 à 1993, a entraîné la pollution persistante des sols, de la chaîne alimentaire et donc de la population. De par ses caractéristiques hormonales bien définies, le chlordécone est considérée comme un perturbateur endocrinien. Ses propriétés œstrogéniques et progestagéniques pourraient expliquer en partie les effets indésirables observés. Une augmentation significative du risque de cancer de la prostate avec l'augmentation de la concentration plasmatique de chlordécone ont été démontrées (Multigner et al., 2010).
- La neurotoxicité : les études épidémiologiques suggèrent que les pesticides pourraient contribuer au développement de maladie neurodégénératives tel que la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson (reconnue maladie professionnelle en France en milieu agricole). Les insecticides sont les plus souvent décrits comme la famille de pesticides possédant les effets neurotoxiques les plus importants, puisqu'ils ciblent pas essence le système nerveux central des invertébrés (Pisa et al., 2017). Les mécanismes de neurotoxicité de ces pesticides sont parfois mal connus. Parmi les molécules les plus étudiées, la rotenone qui est couramment utilisée pour induire des affections neurologiques semblables au syndrome parkinsonien dans des modèle animaux (Höglinger et al., 2006). L'impact neurotoxique de cet insecticide serait en partie dû à sa capacité à inhiber le complexe I de la mitochondrie (Sherer et al., 2007; Choi et al., 2011).
- Les stress oxydant : Le glyphosate est l'herbicide le plus utilisé au monde. Les mécanismes de toxicité de ce pesticide sont multiples. Le glyphosate induit du stress

oxydant *in vitro* et *in vivo* dans des modèles humain, rongeurs et aquatiques (Kwiatkowska et al., 2014a, 2014b; M.-H. Li et al., 2017).

- L'épigénétique : correspond aux facteurs et processus moléculaires qui modifient de manière réversible, transmissible et adaptative l'expression des gènes sans changer la séquence nucléotidique de l'ADN. Les modifications épigénétiques comprennent la méthylation de l'ADN, les modifications post-traductionnelles des histones et l'expression différentielle des ARN non codants. Les processus épigénétiques peuvent être liés à la régulation de l'expression des gènes, à l'empreinte génomique et au développement de pathologies tel que le cancer. L'épigénome est influencé par des facteurs environnementaux. Le glyphosate a été décrit comme affectant les mécanismes épigénétiques. Ceux-ci incluent une diminution de la méthylation de régions spécifiques (les gènes ER et le suppresseur de tumeur TP53), les modifications des histones et l'expression différentielle des ARN non codant impliqué par exemple dans la voies de signalisation Wnt (Rossetti et al., 2021).
- La génotoxicité : le glyphosate a également été décrit pour ses effets génotoxiques. Aisin, une exposition au glyphosate de 0,5 à 10 mM peut induire des dommages à l'ADN dans les leucocytes tels que les cellules mononucléées du sang périphérique humain (Kwiatkowska et al., 2017).

Les pesticides étudiés dans cette thèse seront présentés dans le chapitre : Etudes et Résultats.

5) Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques sont des composés organiques neutres, apolaires qui contiennent au moins deux cycles aromatiques condensés, ils sont composés uniquement d'atomes de carbone et d'hydrogène. Des groupements de nature différente peuvent se substituer à ces cycles. Les HAP sont une famille de composés avec une grande diversité de structure chimiques et plus de 500 molécules présentes dans notre environnement. Cette diversité de structure chimique va leur conférer des propriétés physico-chimique et biologique très variées.

Les HAPs sont retournés dans l'environnement essentiellement au sein de composés fossiles (charbons, pétrole, tourbe...). Ils sont formés lors des processus pyrolytiques en raison de la combustion incomplète des matières organiques. Ils peuvent être d'origine naturelle résultant de phénomènes comme les feux de forêt ou les éruptions volcaniques ou anthropique résultant de l'activité humaine tel que l'industrie, le chauffage domestique et le transport.

L'agence environnementale américaine (US-EPA) a défini une liste de seize HAP prioritaires (Figure 22). Cette liste a été établie en se basant sur leur présence dans l'environnement, la disponibilité de méthodes analytiques pour leur dosage et leur potentiel toxique. Le Benzo[a]pyrène (B[a]P), est l'un des plus puissants agents cancérigènes des HAP. Ce qui lui a valu d'être comme cancérigène pour l'humain (groupe 1) par le CIRC en 2010. Le B[a]P est très répandu et est souvent considéré comme le prototype de la famille des HAP, il est donc très étudié. Contrairement au pyrène qui est beaucoup moins étudié mais il représente 10,68% des seize HAP de l'US-EPA détectés dans 4065 échantillons alimentaires contre seulement 1,36% pour le B[a]P, soit environ 10 fois plus. Le pyrène est classé comme agent inclassable quant à sa cancérogénicité (groupe 3) selon le CIRC.

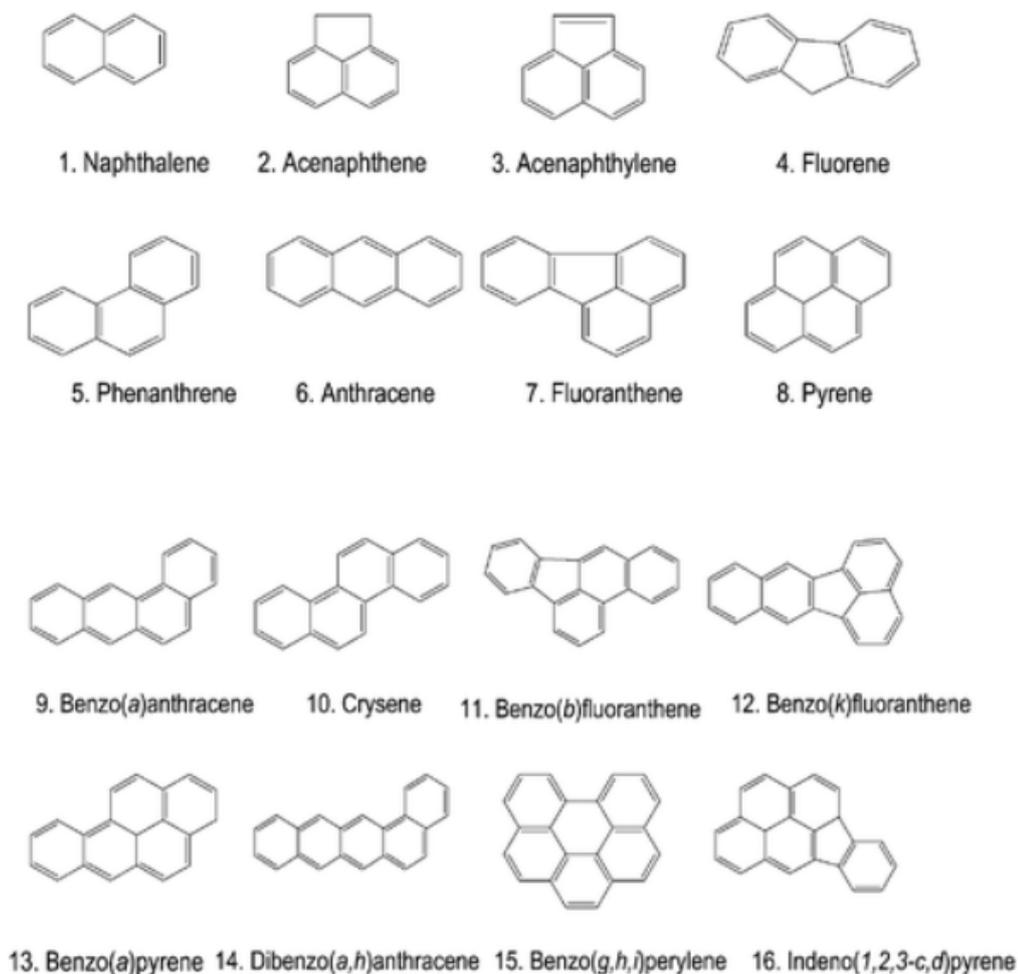


Figure 22 : Structures chimiques des seize HAP prioritaire selon US-EPA (Concetta Bruzzoniti et al., 2010).

a) Voies d'exposition aux HAP

L'humain est souvent exposé à un mélange complexe de HAP via son environnement. Les voies d'exposition au HAP sont multiples pour l'humain : l'air ambiant via la pollution atmosphérique, le tabagisme et enfin l'alimentation. Le niveau et les voies d'exposition vont dépendre du mode de vie : vie urbaine ou rurale, mode de chauffage, régime alimentaire, fumeur ou non-fumeur.

L'alimentation est la principale voie d'exposition humaine chez les non-fumeurs. Des études menées sur l'exposition humaine au B[a]P ont révélées que l'exposition alimentaire était comprise entre 2 et 500 ng par jour (Ramesh et al., 2004). L'alimentation peut être contaminé

via l'environnement les plantes absorbent les HAP via l'atmosphère et les sols, les HAP s'accumulent dans les aliments d'origine animale en particulier le bétail est dû à la consommation de pâturage et végétaux contaminés, les poissons et les crustacés sont contaminés *via* l'eau. La contamination des aliments peut être due au technique de transformation utilisées (fumage) ou à leur cuisson (barbecue).

L'apport alimentaire global en HAP varie de 0,02 à 3,6g par personne et par jour. Les aliments qui contribuent à un apport élevé en HAP sont la viande rouge, les graisses, les huiles, les céréales et les légumes (Ramesh et al., 2004).

b) Cancer et HAP

Une association positive entre le risque d'adénome colorectal et l'apport en B[a]P a été trouvé dans une étude cas-témoins, soutenant l'hypothèse que le B[a]P contribue à la cancérogenèse colorectale (Gunter et al., 2005).

i. Rôle de la métabolisation des HAP dans leur cancérogénicité

Les B[a]P est chimiquement inerte et une activation métabolique par les cytochromes P450 (CYP) lors de l'activation de AhR (Aryl Hydrocarbon receptor) est requise à leur effets délétères. Cette biotransformation induit la formation de métabolites hautement réactifs. Brevement, le B[a]P se lie et active le facteur de transcription AhR (Figure 23). En absence de ligand AhR, complexé avec un dimère de protéines HSP90 (heat shock protein 90) et la protéine chaperonne XAP2 (X-associated protein 2), est localisé au niveau du cytoplasme des cellules. Une fois lié au B[a]P, AHR est transloqué au noyau où il se lie à ARNT (AhR Nuclear translocator) ce qui provoque le détachement de HSP90, conduisant alors à la formation d'un complexe AhR/ARNT. Le complexe nouvellement formé reconnaît des séquences de l'ADN nommées "Xenobiotic Response Element" (XRE ; aussi appelées DRE pour Dioxin Response Element), qui sont présentes dans la région promotrice de différents gènes comprenant les cytochromes P450 CYP1A1, CYP1A2 et CYP1B1 activant ainsi leur transcription (Murray et al., 2014). De cette façon les HAP favorisent leur propre métabolisme via l'activation de AHR. Les HAP ne sont pas les seuls ligands de AhR, ce récepteur est classiquement décrit comme étant le récepteur de la 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD) (Poland and Kende, 1976; Poland and Knutson, 1982).

Le pyrène est un composé beaucoup moins étudié que le B[a]P, il est également un faible ligand de AhR mais il pourrait activer d'autres voies de signalisation en lien avec les récepteurs couplés aux protéines G. Cependant les mécanismes par lesquels le pyrène pourrait impacter la cancérogenèse colorectale restent à déterminer.

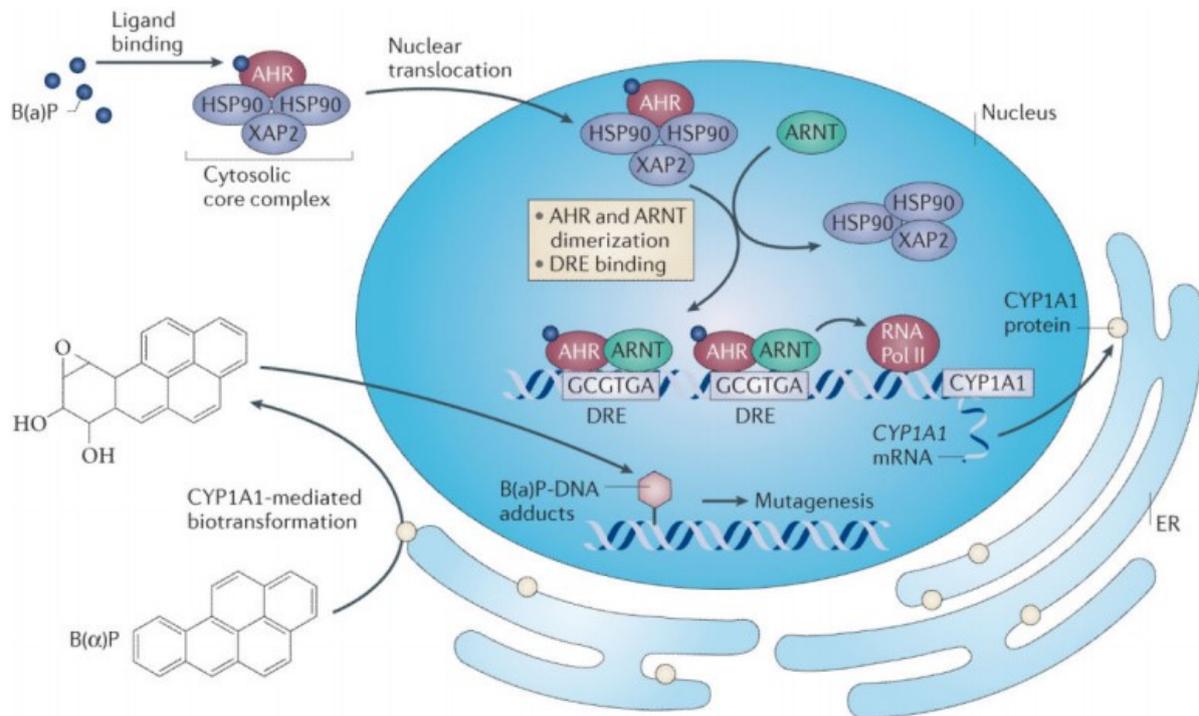


Figure 23 : Activation de AhR par le B[a]P (Murray et al., 2014).

ii. Impact des HAP sur les trois phases de la cancérogenèse

Le B[a]P est décrit comme étant un cancérigène complet car il est capable d'agir sur les trois phases de la cancérogenèse : l'initiation, la promotion et la progression.

(a) Initiation

Comme décrit précédemment la métabolisation du B[a]P entraîne la formation de métabolites hautement réactifs. Certains de ses métabolites tel que le benzo[a]pyrène 7,8-diol-9,10-époxyde (BPDE) se lie à l'ADN pour former des adduits. Si ces dommages à l'ADN ne sont pas réparés ou alors sont mal réparés, ils peuvent initier des mutations génétiques. Le B[a]P présente une mutagénicité élevée dans l'intestin grêle et le côlon murins (Harris et al., 2009)

et conduit à la formation d'adduits dio-époxyde-ADN dans le côlon humain (Umemoto et al., 1994; Pfohl-Leszkowicz et al., 1995). L'apparition de ces mutations peuvent permettre l'initiation de cancer colorectaux.

(b) Promotion

Parallèlement aux effets génotoxiques pouvant initier la cancérogenèse, le B[a]P peut également conférer un avantage sélectif aux cellules prénéoplasiques par rapport aux cellules normales par l'induction de facteurs de croissance et/ou de mécanismes anti-apoptotiques. Suite à l'exposition au B[a]P, la mort de cellules normales pourrait en outre favoriser les cellules pré néoplasiques (Qiu et al., 2011).

De plus, le B[a]P à faibles doses favoriserait une reprogrammation du métabolisme énergétique en induisant une diminution de la respiration cellulaire et une augmentation de la production de lactate qui reflète une augmentation de la glycolyse dans des cellules *in vitro* dans des cellules hépatiques. Le B[a]P à faibles concentrations pourrait donc conduire à un effet Warburg, caractéristiques essentielles des cellules cancéreuses. Ces changements sont associés à des altérations du cycle de Krebs et impliquent probablement un dysfonctionnement du complexe II de la mitochondrie. Ce shift métabolique confère un avantage sélectif aux cellules cancéreuses et permet la promotion de la cancérogenèse (Hardonnière et al., 2016).

(c) Progression

B[a]P peut également favoriser les métastases *via* le promotion de la migration cellulaire (Castillo-Sanchez et al., 2013) et de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) (Yoshino et al., 2007; Hardonnière et al., 2016) ou en agissant sur l'expression des composants de la matrice extracellulaire (Hillegass et al., 2006).

6) TCDD

Les dioxines sont des polluants organiques hautement toxiques et persistants, se distribuant dans tout l'environnement et s'accumulant dans la chaîne alimentaire principalement dans les tissus adipeux de l'animal. Elles font parties de la famille des organochlorés ou des POP (Polluants Organiques Persistants) au même titre que les pesticides. Elles sont principalement

rejetées dans l'atmosphère en tant que produits indésirables de divers procédés de combustion et industriels, se distribuant dans des matrices environnementales telles que le sol et l'eau. À partir de ces matrices, les dioxines s'accumulent dans les tissus végétaux et animaux et dans les tissus humains via l'alimentation (Patrizi and Siciliani de Cumis, 2018). La demi-vie de la TCDD chez l'humain est très longue, elle est estimée entre 7,1 et 11,3 ans (Wolfe et al., 1994).

Ces composés organiques halogénés appartiennent à deux familles : les polychlorodibenzo-p-dioxines (PCDD) et les polychlorodibenzofuranes (PCDF). Toutes les dioxines sont constituées de deux cycles benzéniques reliés par un ou deux atomes d'oxygène qui peuvent se lier à un minimum de quatre et un maximum de huit atomes de chlore, générant un grand nombre de composés : soixante-quinze PCDD et cent trente-cinq PCDF. Parmi ces deux cent dix molécules, la 2,3,7,8-tétrachlorée-p-dioxin (TCDD) (Figure 24) a la toxicité la plus élevée (Patrizi and Siciliani de Cumis, 2018). Le CIRC a classé la TCDD comme cancérigène pour l'humain (groupe 1).

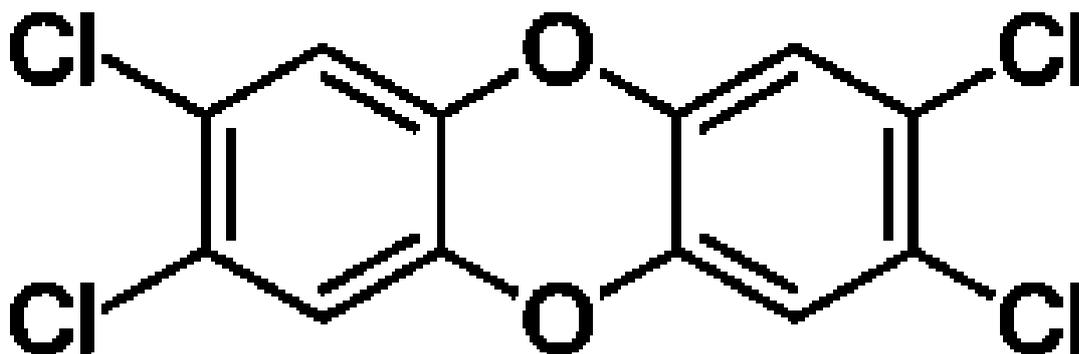


Figure 24 : Structure chimique de la 2,3,7,8-tétrachlorée-p-dioxin (TCDD).

a) Voies d'exposition des dioxines

La production des dioxines survient lors de procédés de combustion dans lesquels le carbone, l'oxygène et le chlore sont présents simultanément. Les dioxines peuvent être d'origine humaine (industrie, chauffage...) ou d'origine naturelle (éruption volcanique, incendie de forêt...). Les différentes voies d'expositions de ces composés ont été recensées et quantifiées par le programme des Nations unies pour l'environnement (PNUE) en 2005 (PNUE, 2005). Les

voies exposition de l'humain aux dioxines sont multiples : l'air essentiellement dû à l'activité industrielle ; l'eau qui peut provenir d'eaux usées, de ruissellements de sites contaminés ou d'utilisation de produits chimiques contaminés par des dioxines (comme les pesticides et le cas de l'agent Orange) ; les sols contaminés. La principale voie d'exposition aux dioxines est l'alimentation et représente environ 90 à 98% de l'exposition moyenne des humains (Schechter et al., 2002; Harrad et al., 2003). En effet, les dioxines s'accumulent tout au long de la chaîne alimentaire jusqu'à l'ingestion par l'humain de produits contaminés. Les principaux aliments contaminés par les dioxines sont les viandes, les poissons, les œufs, certaines matières grasses (huiles), le lait et les produits laitiers. La contamination des fruits et légumes est relativement négligeable par rapport aux matières grasses et produits laitiers.

En 1976, l'explosion d'une usine chimique près de Seveso en Italie a exposé les résidents à des niveaux élevés de TCDD. L'usine fabriquait du 2,4,5-trichlorophénol, un intermédiaire pour les cosmétiques et les produits pharmaceutiques. Une réaction chimique incontrôlée a entraîné la libération d'un nuage d'aérosols contenant de l'hydroxyde de sodium, de l'éthylène glycol, du trichlorophénate de sodium et environ 15 à 30 kg de TCDD sur une zone de 18 km² (Eskenazi et al., 2018).

b) La cancérogénicité de la TCDD

La TCDD n'est pas mutagène et n'induit pas directement de lésions de l'ADN. Cependant, les études expérimentales sur modèle animal et les études épidémiologiques sur la population humaine montrent une augmentation des maladies cancéreuses en lien avec l'exposition à la TCDD (Grassman et al., 1998; Bertazzi et al., 2001; Crump et al., 2003). Chez l'animal la TCDD est un puissant promoteur de tumeurs hépatiques et gastro-intestinales (Andersson et al., 2002). Suite à l'accident Seveso de 1976, une étude de suivi épidémiologique de la population hautement contaminée a démontré une incidence accrue des cancers digestifs (Bertazzi et al., 1997). Contrairement au B[a]P, la TCDD est un composé métaboliquement inerte et ne génère pas de métabolites génotoxiques. Les effets biologiques connus de la TCDD sont nombreux et sont principalement liés à sa capacité de liaison de haute affinité au AhR (Aryl Hydrocarbon Receptor). Le développement de souris AhR knock-out a confirmé que ce récepteur était nécessaire aux effets toxiques de la TCDD (Fernandez-Salguero et al., 1996; Mimura et al., 1997). Le rôle de AhR dans la cancérogenèse reste controversé. Les propriétés pro- et anti-

cancérogènes de la signalisation AhR dépendrait du ligand du contexte cellulaire et du tissu. Dans les cellules cancéreuses du côloncôlon humain l'interaction TCDD-AhR induit une forte prolifération cellulaire via l'activation de la voie EGFR médié par Scr (Xie et al., 2012). De plus la liaison TCDD-AhR active la redistribution des sites d'adhésion focaux qui participe à la migration cellulaire (Tomkiewicz et al., 2013).

En résumé, l'étiologie des cancers est complexe et dépend de l'interaction entre les facteurs génétiques avec la survenue de mutations spontanées dans les gènes suppresseurs de tumeur et/ou dans les proto-oncogènes et les facteurs environnementaux, en particulier les contaminants contenus dans notre alimentation. Il est difficile de déterminer la contribution de chacun de ces facteurs dans le développement des cancers. L'étude de l'interaction gène-environnement et en particulier l'interaction gène-contaminant alimentaire et leur compréhension dans l'étiologie du CCR n'est pas clair. Il semble alors important de mieux comprendre les interactions gène-environnement et les mécanismes cellulaires sous-jacents, afin de mener de meilleures stratégies de prévention.

IV Mécanismes cellulaires de la cancérogenèse

Le développement de cancer est un processus complexe, multifactoriel et séquentiel dans lequel les cellules normales sont transformées en cellules cancéreuses en acquérant diverses propriétés qui favorise la formation de tumeurs. Ses caractéristiques peuvent être causées par de nombreuses modifications du statut génétique, par des modifications épigénétiques et par des facteurs exogènes, des cancérogènes physiques (rayons X, rayons ultra-violet), biologiques (virus à oncogène, aflatoxine) ou chimiques (B[a]P, pesticides). Malgré cette complexité au

sein des cellules cancéreuses, Hanahan et Weinberg ont suggéré en 2011 que le cancer pouvait être résumé en dix caractéristiques clés appelés «hallmarks» qui contribuent à transformer les cellules normales en cellules tumorales (Hanahan and Weinberg, 2011) (Figure25). Les agents cancérigènes agissent en induisant de multiples caractéristiques dans la cellule normale, la transformant ainsi en cellule cancéreuse. Notamment le B[a]P, comme décrit précédemment est un cancérigène complet et impacte de plusieurs de ces caractéristiques (Figure25).

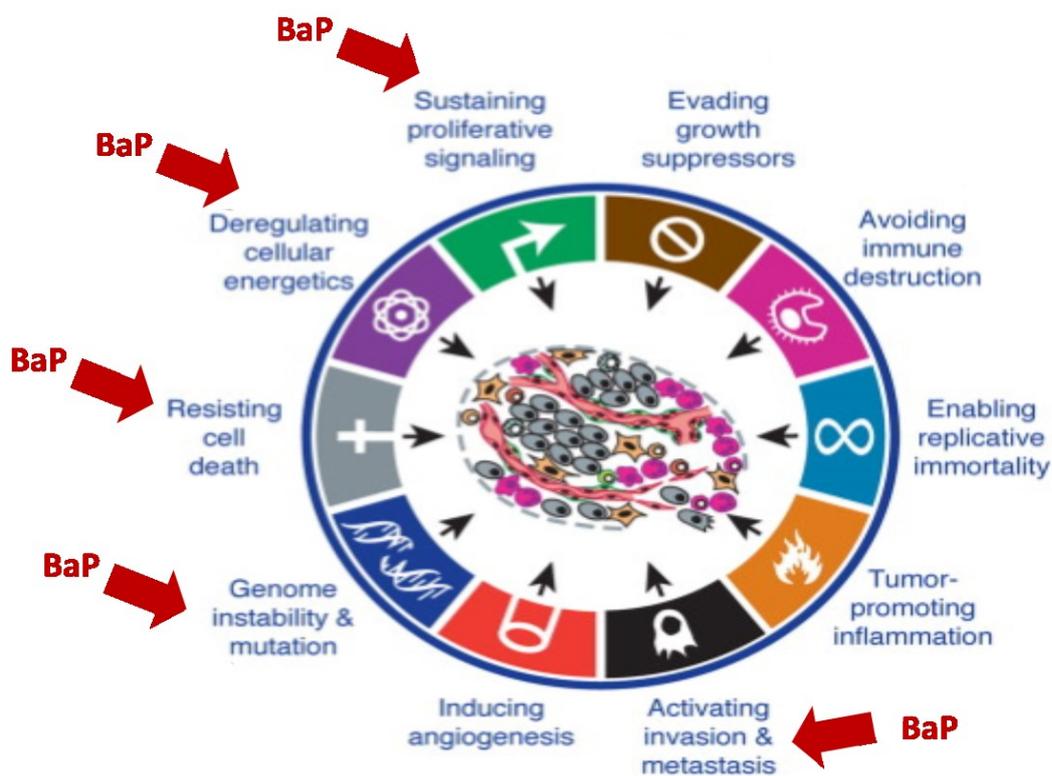


Figure 25 : Hallmarks du cancer (Hanahan and Weinberg, 2011).

1) Instabilité du génome et mutations

Le fonctionnement normal de cellules peut être la source de dommages spontanés de l'ADN. Ces dommages peuvent être causés par de mauvaises incorporations de bases, des erreurs des polymérases, de la réplication ou des erreurs de méthylations. Les dommages à l'ADN peuvent également être causés par des agents environnementaux, physiques et chimiques.

La génotoxicité est la capacité d'un agent physique ou chimique à altérer l'intégrité physique ou fonctionnelle du génome notamment en créant des dommages à l'ADN ou aux composés cellulaires associés.

Ces dommages entraînent des modifications du matériel génétique qui s'il ne sont pas ou sont mal réparés pourront impacter négativement les cellules, les organes puis l'organisme. Ces dommages peuvent conduire au développement de mutations s'ils persistent après un cycle de réplication. Si ces mutations touchent des cellules germinales, elles peuvent induire des pathologies génétiques héréditaires. Si elles touchent des cellules somatiques elles peuvent alors initier un processus de cancérogenèse (Elespuru and Sankaranarayanan, 2007; Erickson, 2010).

a) Les différents types de dommages à l'ADN

i. Erreurs de réplication et mésappariements des bases de l'ADN

Les ADN polymérases sont des complexes enzymatiques qui catalysent la synthèse d'un nouveau brin d'ADN à partir d'un brin pré existant qui sert de matrice. Elles participent également à la réparation et la recombinaison de l'ADN. A chaque réplication d'une cellule humaine, environ 3×10^9 bases sont copiées par des polymérases réplicatives hautement fidèles (δ and ϵ). Il existe cependant d'autres polymérases qui effectuent une synthèse de l'ADN avec une fidélité moindre lors de la réplication ou la réparation (par exemple α , β , θ , γ , REV1...). De plus, les voies de réparation des mésappariements (MMR), qui seront décrites plus loin, contribuent à la fidélité de la réplication en corrigeant les erreurs qui ont échappées aux relectures effectuées par les polymérases réplicatives.

Cependant, des substitutions de bases, des insertions et des délétions d'une seule base peuvent se produire et s'accumuler avec une fréquence de 10^{-6} à 10^{-8} par cellules et par génération. De plus, d'autres erreurs de réplication peuvent se produire, causées par des glissements de brins au niveau de séquences répétitives, provoquant des insertions et des suppressions de nucléotides qui peuvent potentiellement changer le cadre de lecture. L'uracile est parfois incorrectement incorporé par les polymérases ou encore, la fidélité de la réplication est compromise par un déséquilibre du pool de dNTP dans la cellule. Ces nucléotides incorrectement appariés et/ou incorporés, qui échappent à la relecture de la

polymérase et au MMR deviennent des mutations lors du prochain cycle de réplication et sont une source majeure de mutagenèse spontanée (Chatterjee and Walker, 2017).

ii. Désamination de bases

La désamination des bases est également une source majeure de mutagenèse spontanée dans les cellules humaines. La désamination est le processus durant lequel la cytosine (C), l'adénine (A), la guanine (G) et la 5-méthyl cytosine (5mC) perdent leur amine exocyclique pour devenir de l'uracile (U), hypoxanthine, xanthine et thymine (T), respectivement (Figure 26). Ce phénomène se produit plus fréquemment au niveau l'ADN simple brin que double brin et est favorisé par un simple brin transitoire pendant la réplication, la transcription et la recombinaison. La cytosine et la 5-méthyl cytosine sont les plus fréquemment désaminées. Cependant la 5-méthyl cytosine est désaminée trois à quatre fois plus que la cytosine. En plus des sources endogènes de la désamination des bases, l'exposition environnementale aux UV et aux agents intercalant peuvent augmenter la fréquence de désamination (Chatterjee and Walker, 2017).

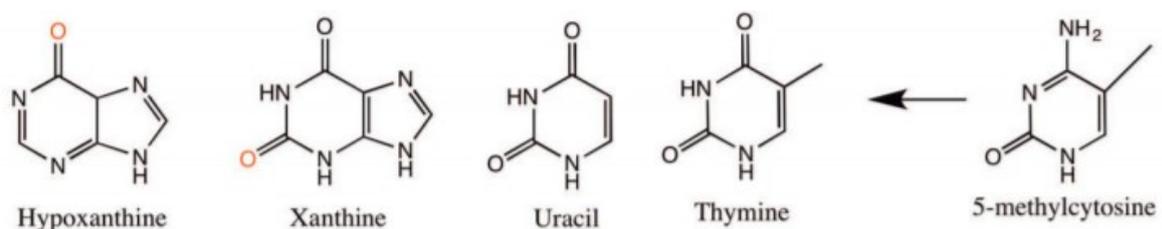


Figure 26 : La désamination des Bases de l'ADN (Chatterjee and Walker, 2017).

iii. Sites abasiques

Les sites abasiques ou AP (apuriniques/aprimidiques) sont continuellement créés dans l'ADN, lors de la liaison N-glycosylique, qui relie la base azotée et le squelette sucre phosphate, s'hydrolyse spontanément ou est clivée par l'ADN glycosylase (Figure 27). Par exemple, des sites AP sont formés lorsque l'uracile est retiré de l'ADN par l'uracile-ADN glycosylase. Les AP sont favorisés par des conditions de pH extrêmes et des températures élevées. Dans une cellule humaine, environ 10 000 sites abasiques sont créés par jour. Ils sont intrinsèquement instables et évoluent facilement en cassure simple brin et possèdent un très fort effet

mutagène. La plupart des sites AP sont efficacement éliminés par les endonucléases AP qui se clivent à leur extrémité 5' et permettent à la voie de la réparation par excision de base (BER) de les réparer. Cette voie de réparation sera décrite plus tard dans le manuscrit. Alternativement, les sites AP peuvent être contournés par les polymérases (Chatterjee and Walker, 2017). Les agents alkylants tel que les moutardes azotées, utilisés dans le traitement de certains cancers induisent des sites abasiques

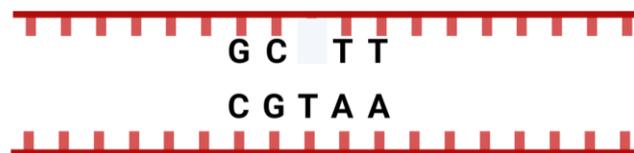


Figure 27 : Les sites abasiques.

iv. Dommages oxydatifs

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont produites essentiellement au niveau de la chaîne mitochondriale de transport d'électrons durant la respiration cellulaire et dérivent également des oxydases cataboliques, des processus anaboliques et du métabolisme peroxysomal. A des niveaux physiologiques, les ROS participent à la signalisation cellulaire et à l'homéostasie cellulaire. L'excès de ROS entraîne des réactions de défense dans le but de protéger les macromolécules ou de les réparer. Cela passe, par exemple, par une diminution de la respiration cellulaire, la protection de l'ADN en le complexant avec des histones ou par l'élimination des ROS excédentaires grâce à des anti-oxydants (enzymes superoxyde dismutase, catalase et peroxiredoxine). De nombreuses pathologies sont associées à une surabondance de ROS, comme la maladie d'Alzheimer, l'insuffisance cardiaque, le diabète et les cancers.

En excès, les ROS peuvent provoquer environ 100 lésions de bases oxydées différentes et des modifications 2-désoxyribose. L'un de ces ROS, le radical hydroxyle ($\text{HO}\cdot$), est un des produits de la réaction de Fenton de H_2O_2 avec Fe^{2+} , et est le ROS le plus réactif. Il est capable d'induire des dommages à l'ADN, aux protéines et aux lipides. Il s'attaque ainsi aux bases de l'ADN en induisant des doubles liaisons, soustrayant des atomes d'hydrogène à leurs groupes méthyles

et attaquant le résidu sucre dans leur voisinage immédiat. Outre les bases, les ROS peuvent endommager le squelette de l'ADN et provoquer jusqu'à environ 2300 cassures simple brin par cellule et par heure. La réparation des cassures du squelette de l'ADN se fait par l'activation des voies de réparation de cassure simple brin ou double brin, tandis que, les bases oxydées sont réparées par la voie du BER (Chatterjee and Walker, 2017).

v. Adduits à l'ADN

Les adduits à l'ADN sont des composés que certains xénobiotiques ou leurs métabolites électrophiles peuvent induire en se liant de manière covalente aux sites nucléophiles de l'ADN (atomes d'azote, d'oxygène et de carbone des bases pyrimidiques (thymine, cytosine) et puriques (adénine ou guanine)) (Ewa and Danuta, 2017). Il existe deux types d'adduits : des adduits stables et des adduits dit dépurinants. Les adduits stables restent fixés à l'ADN sauf s'ils sont pris en charge par les systèmes de réparation. Les adduits dépurinants se détachent de l'ADN par déstabilisation de la liaison N-glycosyl ou glycosylique (Dipple, 1995). La génération d'adduits est un changement antérieur à la mutation et, dans la plupart des cas, il est reconnu et traité par les systèmes de réparation. Cependant, les adduits qui n'ont pas été éliminés peuvent initier une mutation ponctuelle sous la forme d'une substitution ou d'une délétion, ce qui, par la suite, peut induire le développement d'un cancer. Comme décrit précédemment, le B[a]P induit des adduits à l'ADN.

vi. Cassure simple et double brin

Les cassures simple brin sont souvent générées par des dommages oxydatifs à l'ADN, à partir de sites abasiques ou d'une activité erronée de l'enzyme ADN topoisomérase 1 (TOP1). Lorsque les cassures simple brin ont lieu à proximité l'une de l'autre, elles peuvent former une cassure double brin. Les cassures double brin peuvent être également induites par divers agents chimiques et physiques endommageant l'ADN. C'est l'un des dommages les plus délétère pour la cellule car elle peut causer des modifications de structure de la chromatine et de sévères pertes de l'information génétique. Les cassures double brin non résolues sont impliquées dans le développement de cancer chez l'humain (Khanna and Jackson, 2001; Chatterjee and Walker, 2017). L'étoposide est un inhibiteur de la topoisomérase II qui est utilisé comme traitement anti canceréreux (poumon, testicule lymphome). Il induit des cassures simples et double brins.

b) La réparation des dommages à l'ADN

i. Réparation par excision de base (BER)

Le BER répare les dommages oxydatifs, les désaminations, les alkylations et les sites abasiques, altérations de l'ADN qui ne sont pas perçues comme des distorsions importantes de l'hélice. Le BER est généralement actif dans la phase G1 du cycle cellulaire. Cette voie de réparation met en jeu une protéine, l'ADN glycosylase, qui reconnaît et excise spécifiquement une base anormale en rompant la liaison N-glycosidique qui lie la base au désoxyribose (Figure 28). L'action de l'ADN glycosylase induit la formation d'un site abasique. Le site abasique ainsi formé doit être alors réparé. L'AP-endonucléase coupe le squelette désoxyribose phosphate contenant le site abasique, ce qui permet la formation d'une extrémité 3'OH. L'ADN polymérase se positionne à cette extrémité et ajoute le nucléotide complémentaire. Le brin est refermé par l'ADN ligase (Dianov and Hübscher, 2013).

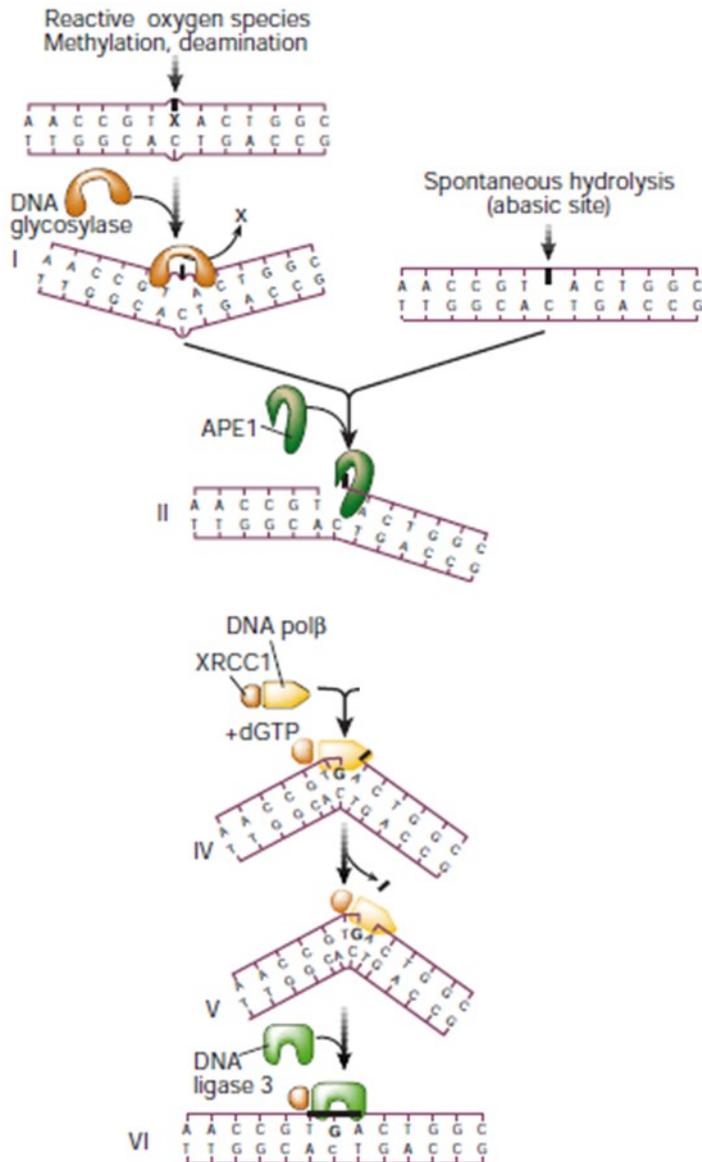


Figure 28 : La réparation par excision de base (BER) (adapté de (Hoeijmakers, 2001))

ii. Réparation par excision de nucléotides (NER)

Le NER est basé sur le même principe que le BER mais il correspond à des lésions plus volumineuses où plusieurs nucléotides sont à réparer. Le NER peut être divisée en deux sous voies qui diffèrent par leur processus de reconnaissance : le NER couplé à la transcription (RCT) et la réparation globale du génome (RGG) (Figure 29). La réparation globale du génome débute par la recherche et la reconnaissance de la lésion par un complexe de protéine XPC (Xeroderma Pigmentosum) avec la protéine RAD23B (UV excision repair protein 23B). Ce complexe permet ensuite le recrutement du facteur d'initiation de la transcription II H (TFIIH).

Puis, les hélicases XPD et XPB permettent l'ouverture de la double hélice. L'excision est réalisée par le complexe formé de XPF, ERCC1 et XPG. Enfin, la synthèse de l'ADN se fait par les ADN polymérase ϵ et δ et le brin est refermé par une ADN ligase (Spivak, 2015; Chatterjee and Walker, 2017).

La réparation couplée à la transcription (RCT) est initiée par une ARN polymérase II bloquée par une lésion. L'ARN polymérase bloquée va être déplacée par les protéines CSA (Cockayne syndrome WD repeat protein A ; également connue sous le nom ERCC8) et CSB (Cockayne syndrome protein B ; également appelée ERCC6). Par la suite la RCT se déroule de façon identique à la RGG.

Les personnes ayant des défauts génétiques sur les enzymes impliquées dans le NER peuvent présenter différents des syndromes (Chatterjee and Walker, 2017) :

- La Xeroderma Pigmentosum (XP) qui est associée à une prédisposition aux cancers de la peau
- Le Syndrome de Cockayne (SC) qui est rare et associé à un syndrome de sensibilité aux UV
- Le Syndrome cérébro-oculo-facio-squelettique (COFS)

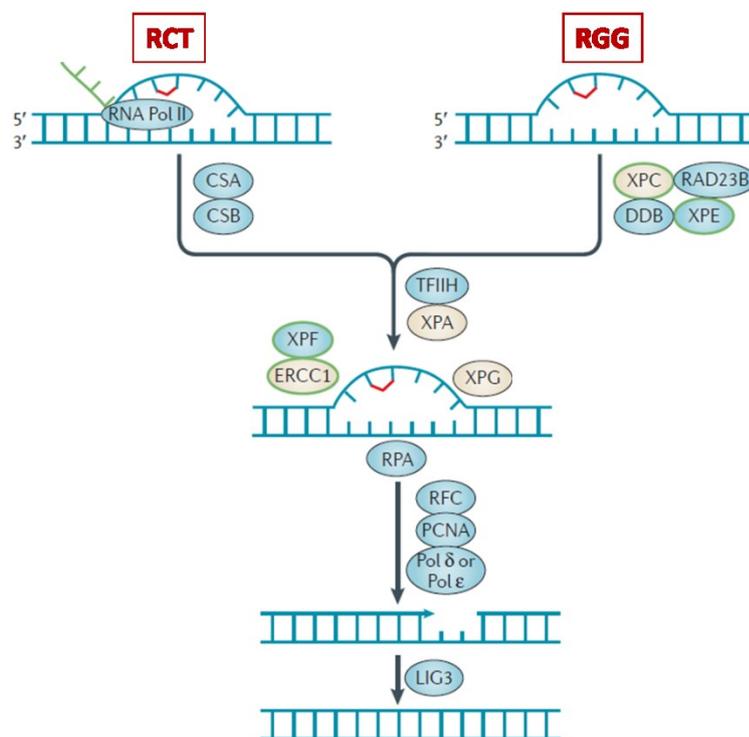


Figure 29 : La réparation par excision de nucléotides (NER) (adapté de (Curtin, 2012)).

iii. Réparation des mésappariements (MMR)

La réparation des mésappariements est une voie de réparation post-répliquative des erreurs commises par les ADN polymérase telles que les mésappariements, insertions et délétions de bases. Ce mécanisme a été découvert chez *E. coli* et fait intervenir les MutS, MutL et MutH. Chez l'humain leurs homologues sont MSH et MLH tandis qu'aucun homologue humain n'a été identifié pour MutH. Les insertions et les délétions sont reconnues par le complexe MSH2 et MSH3 alors que les mésappariements de base sont reconnus par le complexe MSH2 et MSH6. L'exonucléase 1 (EXO1) excise les nucléotides endommagés et le brin d'ADN est répliqué par l'ADN polymérase δ , puis refermé par l'ADN ligase I (Figure 30).

Des mutations germinales dans les gènes MMR entraînent le syndrome de Lynch ou HNPCC, forme héréditaire du cancer colorectal, comme évoqué dans le chapitre I (Chatterjee and Walker, 2017).

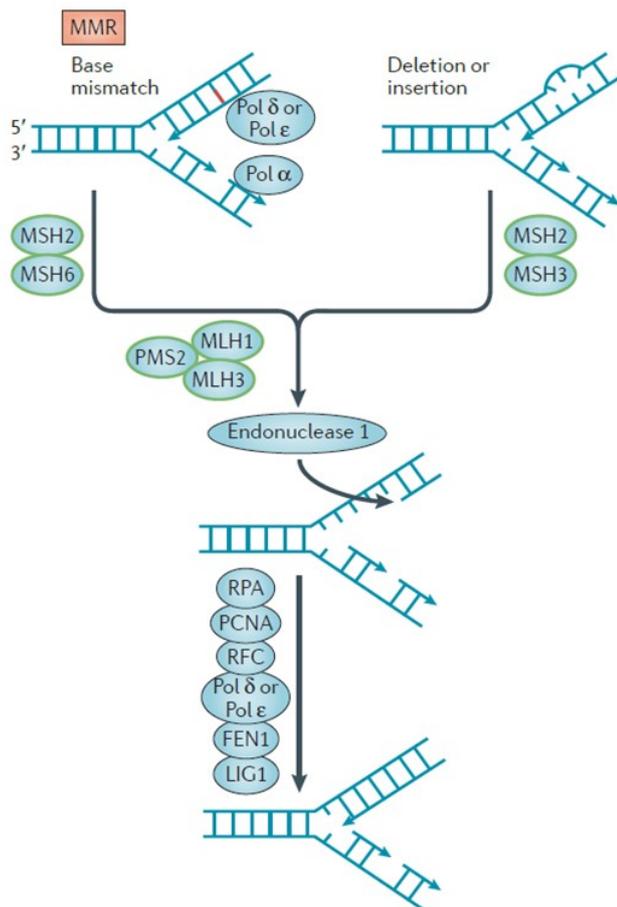


Figure 30 : La réparation des mésappariements (MMR) (adapté de (Curtin, 2012)).

iv. Réparation des cassures double brin

Les cassures doubles brins sont réparées via deux voies : la recombinaison homologue (HR) et la jonction des extrémités non homologues (NHEJ) (Figure 31). La présence d'une cassure double brin déclenche une cascade de signalisation notamment l'activation d'ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated), la phosphorylation de l'histone H2AX en position gamma, PARylation de la chromatine, le recrutement de MDC1 (Mediator Of DNA Damage Checkpoint 1) et enfin le recrutement de 53BP1 et BRCA1.

Lors du mécanisme de réparation jonction des extrémités non homologues (NHEJ) les cassures double brin sont réparées par ligature des extrémités cassées indépendamment de l'homologie de la séquence. La NHEJ se produit tout au long du cycle cellulaire mais survient principalement durant la phase G0/G1 et G2. Ce système de réparation est souvent associé à une perte ou à une addition de nucléotides et donc à une mutagénicité.

La recombinaison homologue survient, contrairement à NHEJ, uniquement au phase S et G2 du cycle cellulaire où l'ADN est répliqué et la matrice sœur est disponible. En effet la HR utilise la chromatide sœur comme modèle homologue pour restaurer la séquence de nucléotides endommagées. Le processus est généralement sans erreur (réparation fidèle) même si l'achèvement de la HR nécessite souvent des polymérases sujettes aux erreurs (Ceccaldi et al., 2016; Scully et al., 2019).

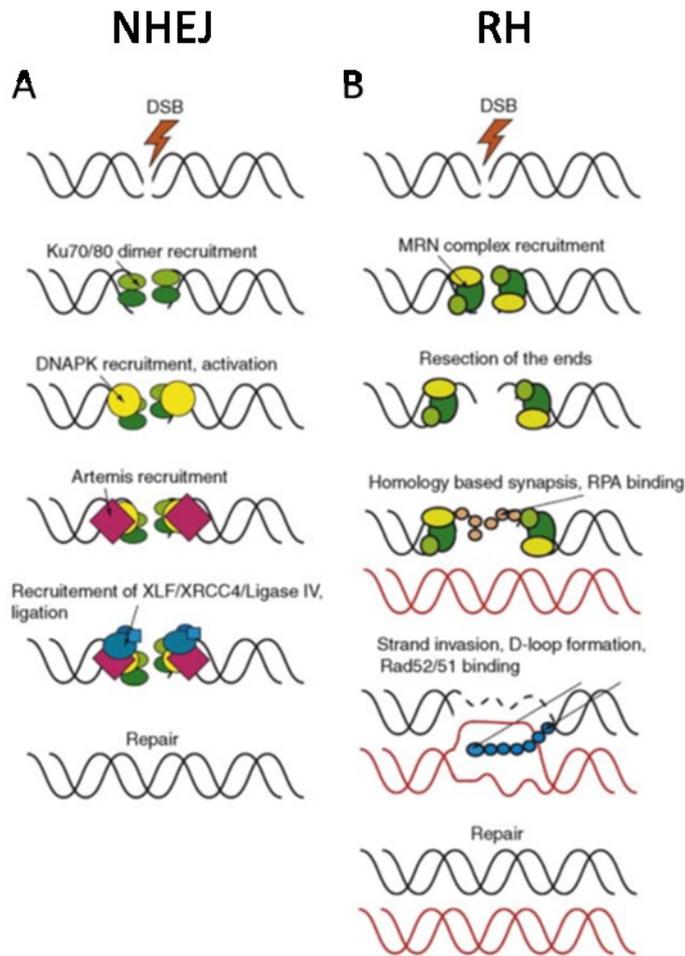


Figure 31 : Voies de réparation des cassures doubles brins (A) Jonction des extrémités non homologues (NHEJ) et (B) Recombinaison homologue (Nagy and Soutoglou, 2009).

c) Génotoxicité et cancer

Le caractère génotoxique est un bon indicateur du potentiel cancérigène des substances. Néanmoins, il ne faut pas considérer la génotoxicité comme nécessaire et suffisante. L'orientation de la recherche vers la génomique et les causes génétiques des maladies, à laisser l'idée qu'un cancérigène était forcément génotoxique. Or, il existe des substances cancérigènes et non génotoxiques dont il faut étudier et comprendre les mécanismes d'action. C'est le cas de la dioxine TCDD par exemple. De plus, le B[a]P a été décrit en 1969 comme favorisant une reprogrammation métabolique bien avant la démonstration de ses effets génotoxiques (Adachi et al., 1969). Otto Warburg, lui, pensait que le cancer était une

pathologie liée à un dysfonctionnement biochimique et métabolique. Cette thèse s'inscrit dans le cadre du projet Metahcol qui analyse l'impact des xénobiotiques sur la reprogrammation du métabolisme énergétique (Huc et al., 2007).

2) Reprogrammation métabolique

a) Le métabolisme énergétique

Le métabolisme énergétique correspond à l'ensemble des réactions biochimiques d'un organisme permettant de produire les ressources énergétiques et matérielles de la cellule. Le métabolisme énergétique est composé de deux composantes opposées : le catabolisme et l'anabolisme. Les voies cataboliques libèrent de l'énergie en décomposant des molécules complexes en molécules simples. Inversement, les voies anaboliques consomment de l'énergie et permettent de générer des molécules complexes à partir de molécules plus simple. L'énergie générée par les voies cataboliques peut être utilisées par les voies anaboliques. Ces processus sont complexes, certaines voies amphiboliques participent donc aux deux mécanismes précédemment décrits. Ces voies sont alors interdépendantes et un système complexe de régulation et d'interconnexion est mise en place (Figure 32). Les enzymes sont les principales actrices de cette régulation, ce sont des catalyseurs biologiques qui permettent la succession rapide et ordonnées des réactions chimiques qui composent les voies du métabolisme énergétique. (Cox, 1994; Campbell et al., 2012).

L'énergie est produite sous forme d'ATP (adénosine triphosphate) : c'est la forme d'énergie la plus universelle. La formation de l'ATP résulte du transfert enzymatique d'un groupement phosphate d'un substrat à une molécule d'ADP (adénosine diphosphate). Quatre réactions sont à l'origine de la formation d'ATP : deux durant la glycolyse, une durant le cycle de Krebs et la réaction principale est la chaîne respiratoire par l'intermédiaire de l'ATP synthase soit près de 90% de l'ATP produit (Campbell et al., 2012).

Le métabolisme des cellules cancéreuses dépend profondément des voies métaboliques pour maintenir leur prolifération et leur adaptation aux microenvironnement difficiles. Ainsi la compréhension de la reprogrammation métabolique qui s'opère dans les cellules cancéreuses fournit des informations essentielles pour le développement de thérapies ciblant le métabolisme. La compréhension de ces phénomènes métaboliques est réalisée grâce à des

approches qui mesurent avec précision le métabolisme à haut débit, de manière spatiale et temporelle. Parmi ces approches, la chromatographie couplée à la spectrométrie de masse et la RMN, permettent l'analyse du métabolome de façon globale. A partir de l'analyse globale du métabolisme, il est possible de réaliser une modélisation métabolique à l'échelle du génome qui permet d'obtenir une image complète des modulations et changements dans les réseaux métaboliques (Thiele et al., 2013; Aguilar et al., 2016; Kang et al., 2018; Weiss, 2018).

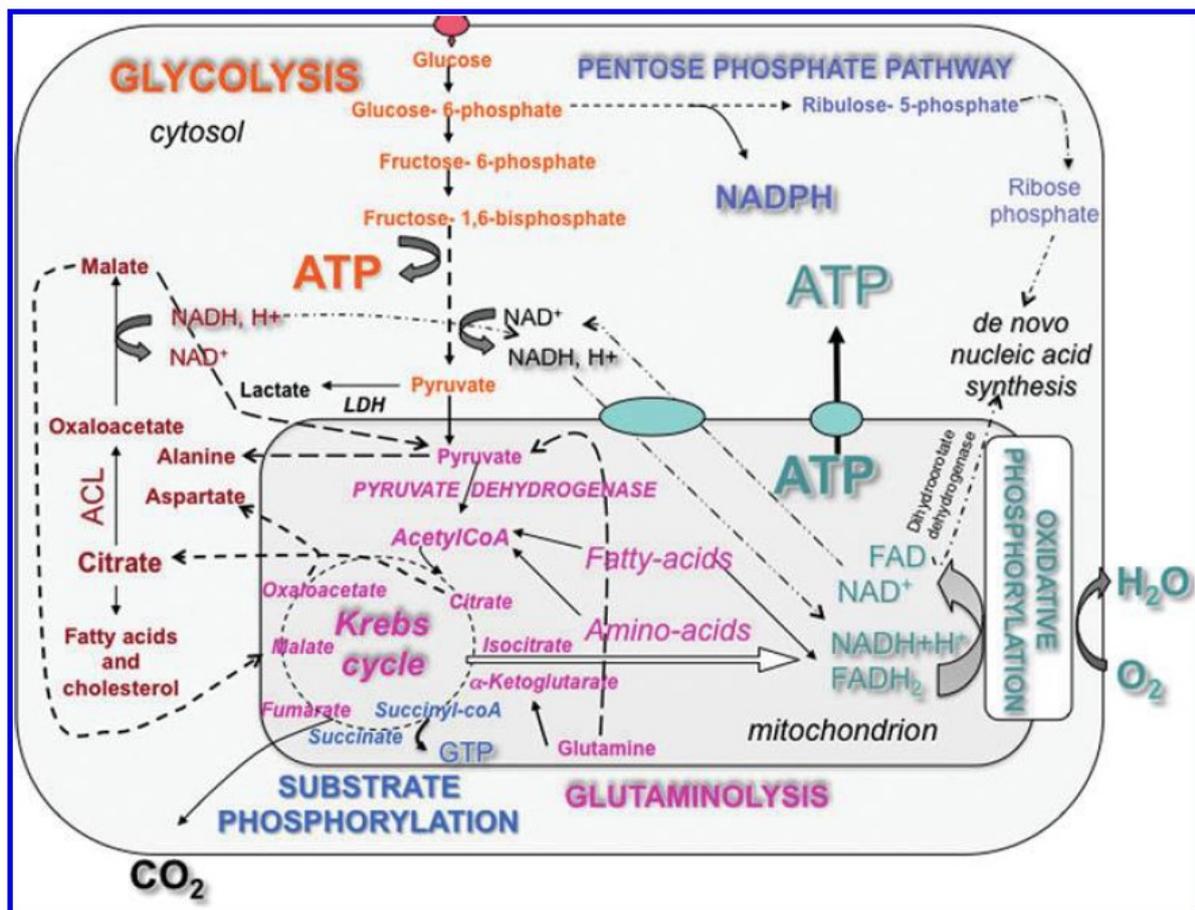


Figure 32 : Vue d'ensemble des principales voies du métabolisme énergétique (Jose et al., 2013).

i. Voies métaboliques

(a) Glycolyse

La glycolyse ou voie d'Embden-Meyerhof-Parnas est la voie anaérobie et cytosolique qui permet l'oxydation du glucose. Ce glucose provient de l'alimentation mais également de la mobilisation des stocks de glycogène ou de la synthèse hépatique du glucose à partir d'entités

non glucidiques *via* la néoglucogénèse. La glycolyse se compose de dix réactions enzymatiques permettant la conversion d'une molécule de glucose en deux molécules de pyruvate.

On peut résumer la glycolyse en 3 étapes : l'activation du glucose par phosphorylation, la conversion en deux trioses et la transformation de ces deux trioses en pyruvate permettant la production d'énergie.

Ce processus est modélisé par le bilan suivant :



Le pyruvate ainsi produit sert de substrat à la fermentation lactique en anaérobie à la génération d'acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA) dans la mitochondrie en aérobie.

Cette voie métabolique majeure est finement régulée ce qui permet d'adapter la vitesse de fonctionnement en fonction des besoins énergétiques de la cellule. Il existe trois points de contrôle au niveau d'enzyme catalysant des réactions limitantes ou irréversibles : l'étape 1 catalysée par l'hexokinase, l'étape 3 catalysée par la phosphofructokinase-1 et enfin l'étape 10 catalysée par la pyruvate kinase.

La régulation à la hausse de la glycolyse génère des H^+ ce qui conduit à une acidose micro environnementale nécessitant une évolution vers des phénotypes résistants à la toxicité cellulaire induite par l'acide (Gatenby and Gillies, 2004; Lagadic-Gossmann et al., 2019).

(b) Phosphorylation oxydative

La glycolyse anaérobie qui se déroule dans le cytosol et la phosphorylation oxydative (OXPHOS) mitochondriale qui nécessite un apport d'oxygène moléculaire sont les deux voies principales de production d'énergie chez les eucaryotes. Dans le cadre de la glycolyse, le couplage entre oxydation et production d'ATP est chimique, alors que le couplage entre respiration mitochondriale et produit d'ATP est chimio-osmotique. La phosphorylation oxydative permet la phosphorylation d'ADP en ATP *via* l'énergie libérée par l'oxydation des donneurs d'électron de la chaîne respiratoire. La chaîne respiratoire est formée de complexes qui seront détaillés plus loin. Le transfert des électrons, depuis les équivalents réduits (NADH et FADH_2) le long des complexes, permet le pompage des protons par les complexes I, III et IV

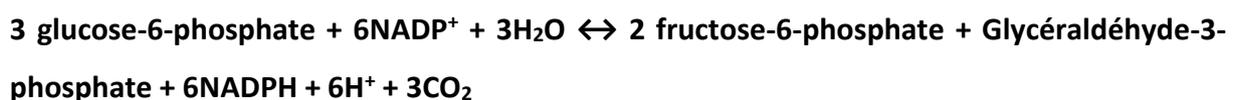
vers l'espace intermembranaire, créant ainsi un gradient électrochimique. Le retour des protons dans la matrice par l'ATP synthase permet de coupler la respiration et la synthèse d'ATP. Ces mécanismes impliquent une oxydation de matière organique qui peut se présenter sous différentes formes, glucides, lipides ou protides.

La respiration cellulaire peut être divisée en trois étapes. La première étape consiste en la dégradation du squelette carboné des sucres et des acides gras en acétyl-coA. C'est sous cette forme que le substrat peut entrer dans le cycle de Krebs. Le cycle de Krebs, ou cycle de l'acide citrique, est la seconde étape de la respiration cellulaire. L'acétyl-coA formé lors de la première étape y est alors oxydé permettant ainsi la libération d'énergie transférée aux coenzymes NAD⁺ et FAD. Les huit réactions qui composent le cycle de Krebs permettent d'obtenir trois molécules de NADH et une molécule de FADH₂ à partir d'une molécule d'acétyl-CoA. De plus, le cycle de Krebs forme le point de départ des synthèses protéiques, lipidiques, mais aussi glucidiques. Enfin la troisième étape de la respiration cellulaire est l'oxydation des coenzymes réduits, libérant des protons et des électrons. Ces électrons subissent des phénomènes de transports électriques libérant ainsi une quantité importante d'énergie sous forme d'ATP *via* la phosphorylation oxydative. Prenons l'exemple du B[a]P : la reprogrammation métabolique implique une diminution de l'OXPPOS., Ces changements sont associés à des altérations du cycle de Krebs qui impliquent probablement un dysfonctionnement du complexe mitochondrial II (Hardonnière et al., 2016).

(c) Voie des pentoses phosphates

Le glucose peut être également métabolisé par la voie des pentoses phosphates. Cette voie permet de générer du NADPH mais assurent également la synthèse de sucres à cinq carbones comme le ribose-5-phosphate, essentiel à la formation des ribonucléotides.

Le bilan global de cette réaction est le suivant :



Le resvératrol est un polyphénol présent dans les aliments naturels qui présente des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et anti-prolifératives potentiellement bénéfiques dans les cancers. Il a été démontré que le resvératrol modifie le profil lipidomique,

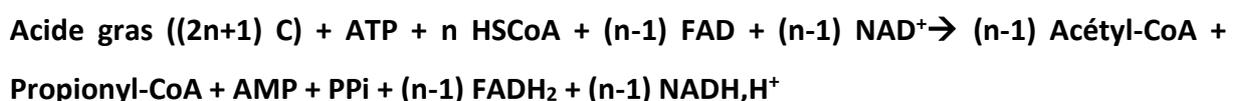
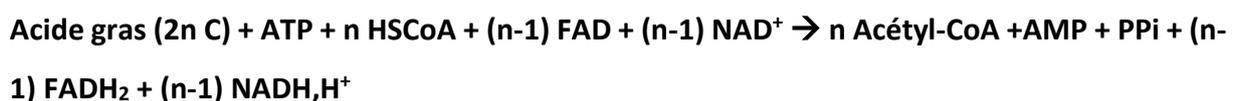
augmente les capacités oxydatives et diminue la glycolyse, en association avec une diminution de l'activité des pentoses phosphates et une augmentation de la production d'ATP (Saunier et al., 2017).

(d) β -oxydation des acides gras

Les acides gras sont des acides carboxyliques à chaîne longue carbonée. Il représente une source importante d'énergie. La β -oxydation se déroule dans la mitochondrie, elle est la voie principale de dégradation des acides gras. Premièrement, les acides gras sont activés en acyl-coA dans le cytosol. Les acides gras activés sont transférés dans la matrice mitochondriale. La β -oxydation des acides gras saturés est composée de 4 réactions successives :

- La déshydrogénation de l'acyl-coA : formation d'une double liaison entre les carbones α et β grâce à l'intervention de l'acyl-CoA déshydrogénase.
- L'hydratation de la double liaison : elle est assurée par l'énoyl-CoA hydratase pour former le 3-L-hydroxyacyl-CoA.
- La deuxième déshydrogénation : elle porte sur le 3-hydroxyacyl-CoA. L'accepteur des hydrogènes est le NAD^+ . L'oxydation de la fonction alcool conduit à une fonction cétone. L'enzyme est le 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase et le composé obtenu est le 3-cétoacyl-CoA.
- Le clivage de l'acide gras : l'enzyme qui intervient est la β -cétotliolase (lyase). Au cours de la thiolase en présence d'un HSCoA il y a libération d'un acétyl-CoA et reformation d'un acyl-CoA dont la chaîne est privée de 2 carbones. Ce dernier acyl-CoA va servir de substrat pour le tour suivant.

Ce processus est modélisé par la bilan suivant :



Des étapes supplémentaires sont nécessaires pour les acides gras saturés possédant un nombre impair de carbones ou des acides gras insaturés. L'oxydation complète des produits de la β -oxydation se déroule dans la mitochondrie par le cycle de Krebs et les oxydations phosphorylantes.

Le 1-Nitropyrrène (1-NP) est un hydrocarbure aromatique nitro-polycyclique (nitro-HAP) présent dans les gaz d'échappement des diesels et lié à une matière particulière dans l'air urbain. Ce polluant induit une diminution de la stéaroyl-CoA désaturase 1 (SCD1), enzyme clé du métabolisme des acides gras, ce qui entraîne une altération de l'homéostasie lipidique (Podechard et al., 2011).

ii. Mitochondrie

(a) Structure et morphologie

Les mitochondries sont des organites cytoplasmiques d'environ $1\mu\text{M}$ de long et $0,5\mu\text{M}$ de diamètre. Une cellule peut contenir jusqu'à 3000 mitochondries. Elles sont de forme et de taille très variable en fonction de leur origine et de leur état métabolique. La nature changeante et l'adaptabilité tant au niveau de leur morphologie que de leur distribution est décrite sous le nom de la dynamique mitochondriale. Les deux principaux mécanismes de cette dynamique sont la fusion et la fission (Figure 33A). Ils sont essentiels au maintien de l'homéostasie mitochondriale notamment en réponse au stress (Giacomello et al., 2020).

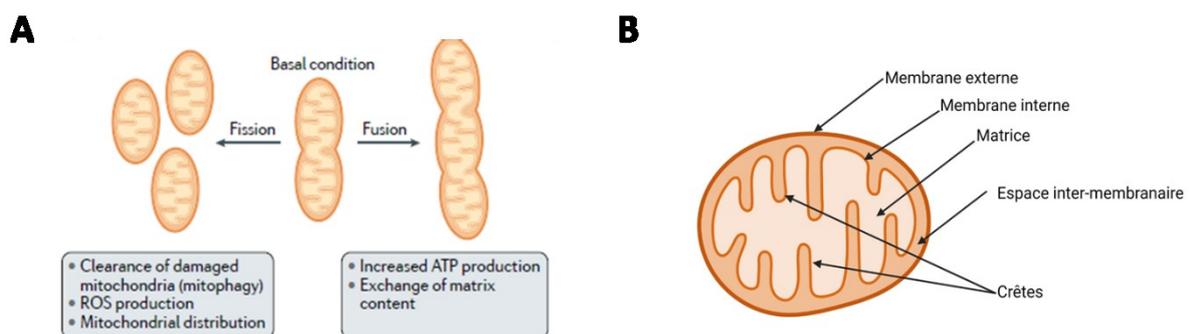


Figure 33 : (A) Dynamique mitochondriale (Giacomello et al., 2020) et (B) Structure de la mitochondrie.

La mitochondrie est composée de deux membranes, la membrane externe et la membrane interne, qui possèdent des compositions et des fonctions différentes. Elles délimitent la mitochondrie en deux compartiments distincts : l'espace intermembranaire et la matrice (Figure 33B).

Comme la membrane plasmique, la membrane externe mitochondriale est composée d'une bi couche lipidique de 5 à 7 nm d'épaisseur. Cette membrane joue un rôle clé dans la dynamique mitochondriale car elle abrite toutes les molécules impliquées dans la fusion et la fission mitochondriale. De plus, elle fonctionne comme une plateforme de la signalisation de mécanismes cellulaires impliquant la mitochondrie. Elle régule diverses cascades de signalisation cellulaire par exemple celles impliquées dans l'induction de l'apoptose notamment en interagissant avec BCL-2 (B-cell lymphoma 2), un régulateur de l'apoptose (Giacomello et al., 2020).

La membrane interne dont la perméabilité est finement contrôlée par le gradient électrochimique est composée d'une bicouche lipidique de 5 à 7 nm d'épaisseur formant des crêtes qui sont le lieu principal de la phosphorylation oxydative (OXPHOS) et contenant tous les complexes impliqués dans la respiration mitochondriale notamment la chaîne mitochondriale et l'ATP synthase (Gilkerson et al., 2003; Vogel et al., 2006). Ces processus seront décrits plus loin dans ce manuscrit.

La théorie endosymbiotique explique la présence de mitochondries dans les cellules eucaryotes par l'incorporation ou l'endocytose d'une α -protéobactérie dans une cellule hôte, il y a plusieurs milliards d'années. L'ADN des mitochondries est ainsi différent de celui du noyau et transmis généralement par la mère.

(b) Fonctions

La mitochondrie est impliquée dans de nombreuses processus cellulaires. Cependant sa fonction majeure est la production d'ATP via l'ATP synthase qui permet de fournir de l'énergie pour le fonctionnement cellulaire basale ainsi que la réparation et régénération cellulaire. La production d'ATP est couplée à la respiration cellulaire. La mitochondrie est le siège du métabolisme oxydatif ou phosphorylation oxydative (OXPHOS) au sein des cellules eucaryotes. Ces processus seront décrits plus loin dans ce manuscrit.

La mitochondrie est impliquée dans l'apoptose. L'apoptose est un mécanisme qui est déclenchée par deux voies moléculaires : la voie intrinsèque et le voie extrinsèque. Dans la

voie intrinsèque ou voie du récepteur de la mort l'apoptose est déclenché par le ligand aux récepteurs de la mort à la surface cellulaire. Dans la voie intrinsèque ou voie mitochondriale, l'apoptose résulte d'une cascade d'évènement intracellulaires dans laquelle la perméabilisation mitochondriale joue un rôle crucial. Cette voie est régulée principalement par les protéines Bcl-2. Les deux voies conduisent à l'activation de caspases qui régulent la mort cellulaire (Kroemer et al., 2007).

Les mitochondries sont la source majeure de production des ROS en particulier au niveau de la chaîne respiratoire. Une quantité physiologique de ROS participe à la signalisation cellulaire tandis qu'une quantité trop importante peut provoquer la mort cellulaire. L'équilibre entre production et élimination des ROS est donc très important. La mitochondrie participe au maintien de cet équilibre, pour cela elle dispose de nombreux système anti oxydant tel que la superoxide dismutase (SOD) et la catalase (Cat) (Ventura-Clapier et al., 2017).

La concentration cytosolique de calcium est régulée par la mitochondrie. En effet le calcium rentre dans la mitochondrie par gradient électrochimique. En revanche, la sortie du calcium se fait par des processus actifs dépendant et indépendant du sodium. Un excès de calcium entraîne un découplage de la phosphorylation oxydative et l'ouverture du mPTP (mitochondrial permeability transmission pore) et par conséquent la mort cellulaire. La mitochondrie régule la concentration cytosolique de calcium en régulant les mécanismes d'entrée et de sortie du calcium (Ventura-Clapier et al., 2017).

(c) La chaîne respiratoire et l'ATP synthase

La chaîne respiratoire ou chaîne de transport des électrons est composée de cinq complexes multiprotéiques : complexe I à V et de deux transporteurs mobiles d'électrons : coenzyme Q (ou ubiquinone) et cytochrome c (Figure 34). Elle occupe un rôle central au sein du métabolisme car elle est indispensable à la poursuite de différentes voies métaboliques. L'OXPPOS se déroule dans la membrane interne des mitochondries. Les électrons vont principalement intégrer la chaîne de transport des électrons via les deux premiers complexes. Le potentiel d'oxydoréduction des composants détermine la direction du flux le long de la chaîne de transport c'est-à-dire leur faculté à perdre ou à gagner des électrons. Les électrons se déplacent des molécules à faible potentiel d'oxydoréduction vers les molécules possédant un potentiel fort et donc du $\text{NADH}^+ \text{H}^+$ ou du succinate à l'oxygène moléculaire.

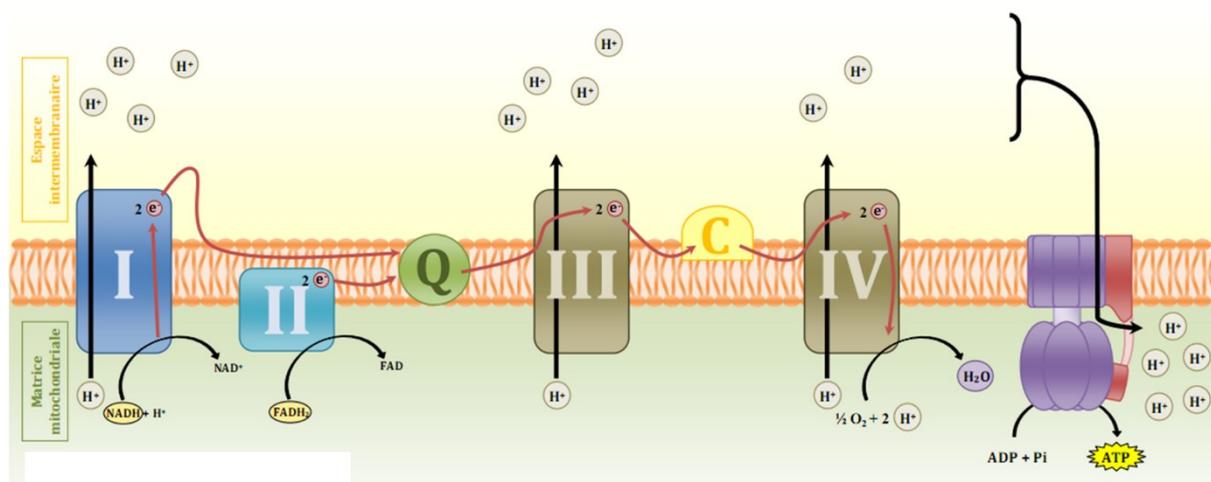


Figure 34 : Les complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale (site internet cours-pharmacie.com).

(d) Complexe I

Le complexe I ou NADH déshydrogénase est le premier complexe protéique de la chaîne respiratoire. Le coenzyme NADH issu de la glycolyse, de l'oxydation du pyruvate en acétyl-CoA, du cycle de Krebs, ainsi que de la β -oxydation des acides gras sert de substrat au complexe I. Il permet le transfert de deux électrons vers le coenzyme Q. Ce complexe permet ainsi le transfert de quatre protons vers l'espace intermembranaire. Il s'agit du plus gros complexe de la chaîne respiratoire, il comprend 45 sous unités protéiques et son poids moléculaire est d'environ 1000 kDa. Un pesticide, la roténone, est un inhibiteur spécifique de ce complexe (Höglinger et al., 2006).

(e) Complexe II

Le complexe II ou succinate déshydrogénase est le seul complexe de la chaîne respiratoire à participer au cycle de Krebs en catalysant la transformation du succinate en fumarate. Il se compose de 4 sous-unités, SDHA, SDHB, SDHC et SDHD, et son poids moléculaire est d'environ 130 kDa. Ce complexe permet le transfert de deux électrons du succinate vers le coenzyme Q avec l'intervention du co-facteur FAD (flavine adénine dinucléotide) qui accepte les électrons du succinate et les transferts au coenzyme Q via trois centre fer-soufre. Ce complexe n'est pas doté d'une machinerie de transfert de protons vers l'espace intermembranaire. Le malonate

et les fongicides SDHi (succinate dehydrogenase inhibitor) permettent d'inhiber le complexe II (Bénil et al., 2019).

(f) Complexe III

Le complexe III ou Ubiquinol-cytochrome C réductase est composé de deux monomères dont chacun est constitué de 12 sous unités pour un poids moléculaire total d'environ 300 kDa. Ce complexe permet la libération de deux protons dans l'espace intermembranaire et il génère en parallèle deux électrons provenant de l'ubiquinol vers le cytochrome c. L'antimycine A est un inhibiteur spécifique de ce complexe.

(g) Complexe IV

Le complexe IV ou cytochrome c oxydase est la dernière enzyme impliquée dans le transfert des électrons de la chaîne respiratoire. Les deux électrons du cytochrome c sont transférés à deux ions cuivre, puis aux cytochromes a et a₃ à l'intérieur du complexe IV. Dans une dernière réaction d'oxydoréduction, les deux électrons sont finalement transmis à un atome d'oxygène (contenu dans une molécule d'O₂) pour former une molécule d'eau (H₂O). Cette dernière étape permet de transférer quatre protons dans l'espace intermembranaire. Le cyanure est un inhibiteur de ce complexe.

(e) La force proton-motrice

La force proton-motrice résulte du transfert des protons dans l'espace intermembranaire. Elle est responsable du gradient électrochimique en induisant une différence de charge électrique de concentration en protons entre la face matricielle et l'espace intermembranaire. La force proton-motrice est donc la résultante du gradient de pH et du potentiel membranaire. Sous l'action de cette force proton-motrice, les protons retournent à la matrice, par l'ATP synthase, permettant la phosphorylation d'un ADP en ATP.

(f) Complexe V ou L'ATP synthase

L'ATP synthase, cinquième et dernier complexe de la chaîne respiratoire, est constitué de deux domaines fonctionnels : le domaine F₀ et le domaine F₁. Le domaine F₀ est ancré dans la membrane interne et il est composé de multiples sous unités formant le canal à protons. Le

domaine F1 situé du côté matriciel, il est composé des sous unités catalytique de l'enzyme ainsi que le pied central de l'enzyme qui constitue en partie le rotor. Il est constitué par des sous-unités α , β , γ , ϵ et δ . Les parties mobiles du complexe protéique comprenant la partie F1 et l'antenne centrale constitue le rotor de l'enzyme tandis que les parties immobiles comprenant la partie F0 et l'antenne périphérique se regroupent sous la dénomination de stator. En effet, la sous-unité α possède les sites de liaison pour l'ADP et le Pi (phosphate inorganique). L'association des sous-unités α et β forme une structure en forme d'hélice. Elle est associée au segment F0 par la sous-unité γ . Le passage des protons dans le canal du segment F0 va induire la rotation de la structure en hélice via la sous-unité γ . Cette rotation permet la liaison entre l'ADP et le Pi et la formation de l'ATP. Cette liaison n'a pas besoin d'énergie. Cependant, la libération de l'ATP ainsi formé nécessite l'énergie apportée par la force proton-motrice. L'ATP synthase permet donc la formation d'ATP à partir d'ADP et de Pi selon un mécanisme de rotation du segment F1 dont le sens est contrôlé par le flux de protons. L'ATP synthétisé est transféré de la matrice vers l'espace intermembranaire par la protéine de transport ATP-ADP translocase qui échange une molécule d'ATP contre une molécule d'ADP cytosolique. L'ATP se retrouve ensuite dans le cytosol où il est utilisé pour divers processus cellulaires. De nombreuses substances ciblent la mitochondrie, des polluants, des médicaments mais également des pesticides. De ce fait, ils agissent sur le métabolisme énergétique et peuvent ainsi favoriser des pathologies chroniques telles que la maladie de Parkinson, d'Alzheimer, les cancers et les maladie rénales. Des xénobiotiques peuvent affecter directement la mitochondrie : on parle alors de mitotoxicité, comme cela est le cas de B[a]P ou des SDHis et de la roténone (Hallinger et al., 2020).

b) Métabolisme énergétique des cellules cancéreuses

Afin de répondre à leur forte demande en énergie et en nutriments les cellules cancéreuses adaptent leur métabolisme pour soutenir leur rapide division cellulaire. La reprogrammation métabolique est une caractéristique des cellules cancéreuses, elle favorise la croissance et la prolifération tumorale (Hanahan and Weinberg, 2011). La reprogrammation métabolique est souvent décrite comme le résultat de la réponse d'adaptation cellulaire aux mitochondries non fonctionnelles ou endommagées. Cependant, les études de ces dernières décennies ont

révélé une interaction complexe entre la reprogrammation métabolique et la tumorigenèse associée par à des altérations génétiques (Neitzel et al., 2020).

i. Effet Warburg

Le premier changement métabolique dans les cellules cancéreuses a été décrit dans les années 1920 par Otto Warburg (Warburg et al., 1927). Il observe une augmentation anormale de la concentration en lactate, qui caractérise une fermentation anormale du glucose. Cette régulation à la hausse de la glycolyse se fait au détriment de la respiration mitochondriale. Otto Warburg a montré que les cellules cancéreuses modifient leur métabolisme pour obtenir un métabolisme anaérobie, le phénomène a été appelé « effet Warburg ». L'augmentation du glucose est indispensable aux cellules cancéreuses car il fournit rapidement de l'ATP et les intermédiaires métaboliques des réactions anaboliques, ceci pour permettre aux cellules cancéreuses de se développer rapidement. Ces caractéristiques métaboliques des cellules cancéreuses ont permis de développer une technique de détection et de suivi des tumeurs utilisant l'analogue du glucose 2-(18F)-fluoro-2-désoxy-D-glucose (FDG) par imagerie par tomographie par émission de positons (FDG-PET) (Lewis et al., 2015). Après cette découverte, Otto Warburg a tenté d'expliquer ce phénomène et il a proposé que l'augmentation de la glycolyse dans les cellules cancéreuses soit causée par un dysfonctionnement irréversible de la respiration mitochondriale (Warburg, 1956). Des études les plus récentes réfutent cette hypothèse et montrent qu'une diminution de l'expression de l'ATP synthase, un complexe protéique nécessaire à la respiration mitochondriale, ainsi que des mutations mitochondriales, peuvent être responsables d'un dysfonctionnement de la respiration mitochondriale. De plus, des études montrent qu'une inhibition de la glycolyse peut améliorer la respiration mitochondriale, ce qui prouve que le dysfonctionnement d'OXPPOS est réversible (Moreno-Sánchez et al., 2009; Dang, 2012; Ward and Thompson, 2012). Il est maintenant établi qu'il existe plusieurs types de reprogrammation métabolique et le concept d'Otto Warburg est maintenant largement revisité (Robey et al., 2015).

c) Le métabolisme énergétique modifié dans le CCR

Au sein des tumeurs des conditions d'hypoxie et un shift métabolique avec une augmentation de la glycolyse peuvent être observées. Ce changement est orchestré par le facteur de

transcription inductible par hypoxie 1α (HIF1 α). Ce facteur de croissance induit l'expression de plusieurs gènes associés à la prévention du stress provoqué par l'hypoxie (par exemple GLUT-1) et inhibe le métabolisme mitochondrial par l'activation de la pyruvate déshydrogénase (PDK). Dans le CCR, l'expression de HIF1 α est corrélée avec une augmentation de la mortalité et de la récurrence. De plus, les gènes régulés par HIF1 α sont associés à la chimio résistance dans le CCR.

Le transporteur mitochondrial de pyruvate (MPC), est responsable de l'absorption du pyruvate par la mitochondrie, il permet son oxydation dans le cycle de Krebs. Une délétion ou une régulation négative de ce transporteur dans les cellules coliques est associée à un mauvais pronostic. C'est un facteur crucial pour le devenir métabolique dans le CCR.

De nombreuses études mettent en lumière le rôle d'OXPPOS dans le CCR. Une analyse comparative fonctionnelle de biopsies de tissus cancéreux et de tissus sains révèle une activité glycolytique presque inchangée et une régulation positive de l'OXPPOS dans les cellules cancéreuses CCR. Cette régulation à la hausse des OXPPOS est aussi décrite dans les lignées cellulaires MSS, elle est associée à une augmentation du nombre de copies de l'ADN mitochondriale (ADNmt). L'induction d'OXPPOS est souvent associée au développement de résistance à la chimiothérapie.

Ces résultats contradictoires concernant le statut métabolique de CCR peuvent s'expliquer par le rôle majeur des oncogènes et des suppresseurs de tumeurs mutés dans CCR. Des études démontrent que le statut métabolique du CCR dépend des mutations génétiques en présence. Par exemple le nombre de copies d'ADNmt est dépendant des mutations *KRAS* et *BRAF*. Il s'avère significativement plus faible dans les tumeurs mutées pour *BRAF* et élevé dans les tumeurs mutées pour *KRAS* (van Osch et al., 2015; Neitzel et al., 2020).

d) Impact métabolique des oncogènes et suppresseurs de tumeurs du CCR

i. La signalisation APC/Wnt influence le métabolisme du CCR

Une signalisation APC/Wnt anormale est reconnue comme le principal évènement initiateur de la cancérogenèse colorectale. Cette signalisation joue un rôle important dans la prolifération des cryptes intestinales. De plus, l'altération de la signalisation APC/Wnt impacte le métabolisme énergétique de la cellule. Une signalisation anormale de cette voie augmente le métabolisme du glucose *via* la régulation de la pyruvate déshydrogénase kinase 1 (PDK1) et

le transporteur de lactate (MCT-1). PDK1 a une fonction inhibitrice sur les OXPHOS en inhibant le couplage de la glycolyse au cycle de Krebs (Nenkov et al., 2021). La voie de signalisation APC/Wnt est aussi impliquée dans la régulation de la lipogenèse via c-Myc, proto-oncogène et gène cible en aval de cette voie. Elle induit la synthèse des phospholipides et deux enzymes clés impliquées dans la lipogenèse, FASN (fatty acid synthase) et ACC (acétyl-CoA carboxylase), pourraient être régulées par APC/Wnt (Vergara et al., 2017; Yao et al., 2018).

ii. La signalisation de la forme proto-oncogène *KRAS* influence le métabolisme du CCR

L'impact métabolique de *KRAS* est essentiellement dû aux voies MAPK et PI3K et à leur régulation de HIF1 α (Pylayeva-Gupta et al., 2011). La mutation régule positivement le transporteur de glucose GLUT-1 ce qui entraîne une augmentation de l'absorption du glucose dans les cellules cancéreuses coliques alors que la fonction mitochondriale et la respiration oxydative n'étaient pas altérées (Yun et al., 2009). Une dépendance à la glutamine a été démontrée pour les lignées cellulaires mutées pour *Kras*. La glutamine est nécessaire pour alimenter le cycle de Krebs en tant que source de carbone et dans les voies de biosynthèse anabolique telle que la synthèse d'acides aminés, de nucléotides et de glutathion en tant que source d'azote. De plus, *KRAS* entraîne une augmentation de l'expression des enzymes impliquées dans le métabolisme de la glutamine : SLC25A22 et SLC24A13, mais également une régulation à la hausse de l'asparagine synthétase. La mutation *KRAS* induit une augmentation de l'OXPHOS associée à l'activation de HIF, un régulateur central de l'hypoxie, *in vitro* (Neitzel et al., 2020).

iii. Le gène suppresseur de tumeur *TP53* influence le métabolisme du CCR

Le gène suppresseur de tumeur *TP53* codant la protéine p53 muté altère le métabolisme énergétique contribuant ainsi à la progression tumorale. *TP53* muté augmente l'absorption du glucose *via* la stimulation de la translocation du transporteur GLUT-1. *P53* muté induit l'expression de l'enzyme HK2, l'une des enzymes clés qui catalyse la première étape de la glycolyse (Nenkov et al., 2021). Certaines mutations *TP53* (R175H et R273H) activent à la fois la glycolyse et l'OXPHOS et d'autres mutations (R181H, S241F et H179R) augmentent la glycolyse mais en inhibant simultanément l'OXPHOS (Eriksson et al., 2017). La synthèse d'acides gras est régulée positivement quand *TP53* est muté en régulant positivement

l'expression de gènes impliqués dans la synthèse des acides gras tels que le gène FASN (fatty acid synthase) (Freed-Pastor et al., 2012). P53 induit dans les cellules cancéreuses coliques une régulation positive de SCO2 (synthesis of cytochrome c oxidase 2) un acteur majeur de la chaîne de transport des électrons. P53 dans des conditions normales stimule l'activité de PDC (pyruvate dehydrogenase complexe) ainsi que les OXPHOS en inhibant PDK2 (pyruvate dehydrogenase kinase 2) *in vitro* et *in vivo* (Nenkov et al., 2021).

3) La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT)

a) Définition

La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) est un processus biologique qui permet à une cellule épithéliale polarisée de subir de multiples changements biochimiques qui lui permettent d'adopter un phénotype de cellule mésenchymateuse qui comprend une capacité migratoire accrue, invasivité, résistance élevée à l'apoptose et production considérablement accrue de composants de la matrice extracellulaire. L'achèvement d'une EMT est signalé par la dégradation de la membrane basale sous-jacente et la formation d'une cellule mésenchymateuse qui peut migrer loin de la couche épithéliale dans laquelle elle a pris naissance. Les travaux d'Elizabeth Hay ont été les premiers à décrire l'EMT comme étant une « transformation épithélio-mésenchymateuse » chez le poussin (Hay, 1995). Le terme transformation a été remplacé par transition en raison de la réversibilité du processus. Il existe un processus inverse à celui de l'EMT : la transition mésenchymateuse-épithéliale ou MET qui permet la reconversion des cellules mésenchymateuse en cellules épithéliales. L'EMT est décrit dans trois contextes biologiques distincts avec des conséquences fonctionnelles très différentes. On peut donc classer l'EMT en trois sous types (Kalluri and Weinberg, 2009) :

- EMT de type I qui survient pendant l'implantation l'embryogenèse et le développement des organes
- EMT de type II qui est associée à la régénération tissulaire et à la fibrose des organes
- EMT de type III associée à la progression tumorale et aux métastases

b) EMT et cancer

Les cellules cancéreuses qui subissent EMT de type III peuvent envahir et métastaser et ainsi générer les manifestations finales potentiellement mortelles de la progression du cancer (Figure 35). Il est important de noter que les cellules cancéreuses peuvent présenter des degrés d'EMT divers, certaines cellules conservant de nombreux traits épithéliaux tout en acquérant certains mésenchymateux et d'autres cellules se débarrassant de tous les vestiges de leur origine épithéliale et devenant entièrement mésenchymateuses. La liste complète des nombreux agents de signalisation contribuant à l'EMT reste incertaine. Une hypothèse suggère que les altérations génétiques et épigénétiques survenant dans les cellules cancéreuses les rendent particulièrement sensibles aux signaux induisant l'EMT. L'activation de l'EMT dans ces cellules dépend de divers réseaux de signalisation intracellulaire impliquant, entre autres des protéines de transduction de signal, ERK, MAPK, PI3K, Smads, β -caténine, Ras ainsi que l'E-cadhérine, molécule de l'adhésion intercellulaire et la Vimentine composant de la structure du cytosquelette (Kalluri and Weinberg, 2009). Les pesticides organochlorés, dichlorodiphényltrichloroéthane, heptachlore et endosulfan, la TCDD, le bisphénol A (BPA) et les phtalates favorisent l'EMT (Zucchini-Pascal et al., 2012; Lee et al., 2017). Ce qui suggère le fait que ces composés sont de potentiel inducteur de métastases cancéreuses.

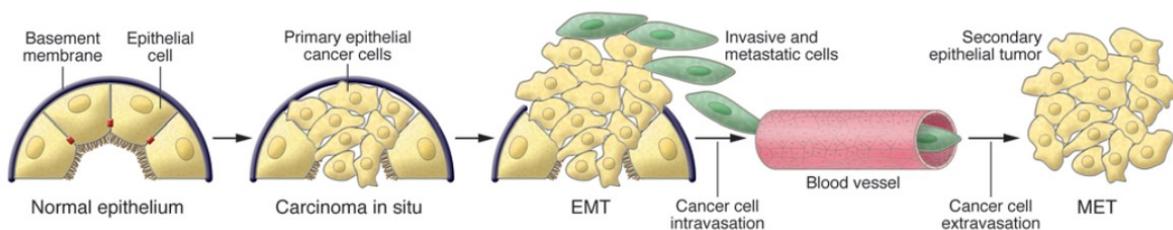


Figure 35 : EMT et progression tumorale (Kalluri and Weinberg, 2009)

V Objectifs de la thèse

A mon arrivée au laboratoire, j'ai intégré l'équipe « Contaminants & stress cellulaires » COMICS qui venait d'être créée. Les nouveaux projets mis alors en place visaient d'une part à mener des études mécanistiques de cancérogenèse environnementale liées à des expositions à des contaminants alimentaires. D'autre part, afin de se rapprocher de la santé humaine, les projets visaient à mener des travaux d'épidémiologie moléculaire sur la cohorte d'agriculteurs AGRICAN, pour identifier des biomarqueurs prédictifs d'exposition et d'effets des pesticides.

Mon projet de thèse s'est donc inscrit dans une démarche d'équipe d'études mécanistiques *in vitro*, afin de pouvoir, à terme, déterminer de nouveaux biomarqueurs pouvant être recherchés chez les agriculteurs. Mon premier travail a consisté à élucider les mécanismes de cancérogenèse colorectale induite par une exposition à des pesticides et au HNE.

Puis, grâce au financement du projet MetahCol (Plan Cancer 2014-2019, Aviesan, Inserm) pour « Impact of low dose mixtures of aromatic hydrocarbons on colon carcinogenesis process: focus on energy metabolism hallmark », j'ai pu mettre en place un projet de recherche au sein d'un réseau collaboratif sur les HAP et les dioxines. Enfin, j'ai également pu contribuer à terminer une étude sur la génotoxicité d'un pesticide particulier, le captane.

Les objectifs de ma thèse étaient de :

- Caractériser un bon modèle *in vitro* pour analyser les interactions gènes-environnement au cours de la cancérogenèse colique
- Etudier le potentiel cancérigène des contaminants alimentaires utilisés à faibles doses et en exposition chronique selon des contraintes de toxicologie alimentaire
- Comprendre par quels mécanismes cellulaires les contaminants exercent leurs potentiels effets cancérigènes, en considérant la génotoxicité mais aussi les autres mécanismes non-génotoxiques
- Identifier s'il y a certains stades au cours de la cancérogenèse sont plus sensibles que d'autres aux effets des contaminants.

Au final, mon projet de thèse visait à produire des connaissances fondamentales sur la cancérogénicité des contaminants alimentaires vis-à-vis du cancer colorectal, et de prendre en compte la susceptibilité génétique. Le but ultime est de pouvoir caractériser les mécanismes causant le cancer en évaluant la part des altérations génétiques intrinsèques et la part des altérations cellulaires issues de facteurs extrinsèques que sont les contaminants alimentaires. Cette étude s'inscrit dans une problématique de santé publique visant à prévenir les cancers par une meilleure identification de leurs causes, notamment celles sur lesquelles l'humain peut agir.

Etudes et Résultats

Mes travaux de thèse ont concerné la caractérisation des lignées HCECs comme modèles de cancérogenèse environnementale, l'étude de l'impact du HNE et des pesticides sur ces cellules et d'un mélange de HAP et TCDD. J'ai été également impliquée comme co-auteurice dans un travail sur la génotoxicité d'un pesticide, le captane. Ainsi, les résultats de mes travaux de thèse sont présentés dans ce manuscrit sous forme d'articles, soit en préparation (étude 1), soit publiés dans des revues à comité de lecture (études 2 et 3).

I Etude 1 : Caractérisation des lignées HCECs CT comme modèle en cancérogenèse environnementale

1) Résumé

Les HCECs ou human colonic epithelial cells ont été établies en 2010 et ont été obtenues à partir d'échantillons de biopsie de deux patients sains subissant un examen de routine (Figure 36). Après avoir été isolées et cultivées, ces cellules ont été immortalisées par transfections successives des protéines non oncogène CDK4 (cyclin-dépendent kinase 4) et hTERT (human telomerase reverse transcriptase) (Roig et al., 2010). CDK4 est une sous-unité catalytique du complexe de la protéine kinase qui joue un rôle important dans la progression de la phase G1 du cycle cellulaire et dans le développement de la télomérase. Une diminution de l'expression de CDK4 est associée à la sénescence cellulaire (Hanks, 1987; Zou et al., 2002, p. 4). hTERT est une unité catalytique de l'enzyme télomérase qui inverse le raccourcissement des télomères au cours de la réplication de l'ADN (Greider and Blackburn, 1985). Le raccourcissement de la télomérase est associé au vieillissement, mortalité et aux maladies liées au vieillissement (Cawthon et al., 2003). Par ce processus, les HCECs n'acquièrent pas de propriété tumorigène et/ou ne contiennent pas de multiples changements génétiques.

A partir des HCECs non transformées (les cellules CT), cinq lignées cellulaires ont été obtenues expérimentalement : trois d'entre elles miment les gènes des mutations driver présentes dans la cancérogenèse colorectale : perte d'APC (CTA) et de P53 (CTP) par shNRA et expression ectopique de KRAS (CTR) via l'introduction d'une forme constitutivement active de KRAS^{V12}. L'une d'entre elles contient et exprime les trois mutations driver (CTRPA) et une autre présente ces trois altérations ainsi que l'expression ectopique de la forme tronquée de 1309-

aa de l'APC (CTRPA), la forme la plus fréquemment rencontrée dans le CCR sporadique humain (Figure 36). Les six lignées cellulaires imitent de façon simplifiée les différentes étapes du CCR, l'initiation (cellules CT), la promotion (cellules CTA, CTR et CTP) et la progression (cellules CTRPA et CTRPA) et constituent un outil intégratif pour étudier l'impact des produits chimiques en fonction des étapes de la carcinogénèse colorectale humaine et de la prédisposition génétique.

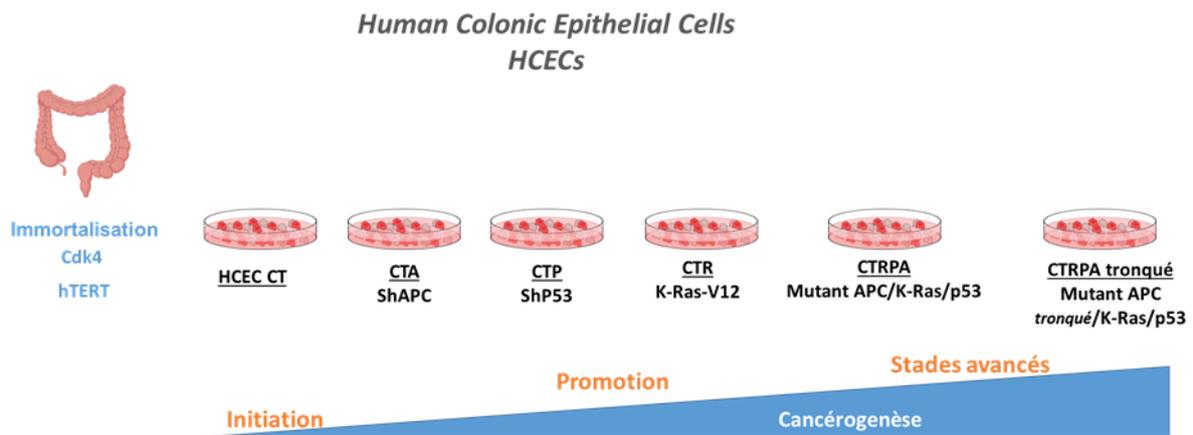


Figure 36 : Les Cellules HCECs.

2) Manuscrit

Characterization of human isogenic epithelial cell lines as a relevant tool to study colon carcinogenesis and interaction between genes and environment

Tête A^{1,*}, Arnaud L^{2,*}, Le Mentec H^{3,*}, Gallais I³, Tournadre N³, Duarte-Hospital C^{1,2}, Lippi Y², Mathevet F^{4,5}, Lefort G^{4,5}, Burel A⁶, Surya R⁷, Boutet-Robinet E², Shay JW⁸, Vialaneix N^{4,5,#}, Bortoli S^{1,#}, Lagadic-Gossmann D^{3,#}, Huc L^{2,#}

¹T3S UMR S-1124, Université de Paris, Paris, France, ²ToxAlim INRAE UMR 1331, Université de Toulouse, France, ³IRSET UMR S-1085, Université de Rennes 1, Rennes, France, ⁴MIAT UR875, Toulouse, France, ⁵Platform Biostatistique, Genotoul, Toulouse, France, ⁶Biosit UMS 3480, Rennes, France, ⁷Department of Food Technology, Faculty of Engineering, Bina Nusantara University, Jakarta, Indonesia, ⁸Department of Cell Biology, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX, USA,

*Equal contribution

#Equal supervision

Introduction

Colorectal cancer (CRC) is the 3rd in men and 2nd in women most common cancer with 1.9 million people affected worldwide in 2020 (Sung et al., 2021). The majority of CRC cases are sporadic and a small proportion (between 5 and 10%) of colorectal cancer cases are attributable to familiar cancer syndromes (Pancione et al., 2012). CRC is a multistep progressive disease, which can result from a combination of mutations in tumor suppressor genes and proto-oncogenes. Among the genes characterized in CRC carcinogenesis, the loss of tumor suppressor gene *APC* (*Adenomatous polyposis coli*) and *TP53* (tumor protein 53) and the activation of the proto-oncogene *K-RAS* (Kristen-ras) are particularly crucial for the CRC initiation and progression (Smith et al., 2002). The mutation on *APC* gene is the initiating step of CRC occurring in the large majority of cases (70-80%). *APC* is involved in the regulation of

the WNT signalling pathway and is a negative regulator of beta-catenin activation, important in the proliferation of stem cells in the bottom of the colonic crypt. The activation of proto-oncogene K-RAS occurring in 40% of CRC and K-RAS mediates proliferation induced by growth factors. The loss of the tumor suppressor TP53 is found in 70% of CRC and TP53 is involved in the DNA repair, cell cycle and apoptosis induction.

The heterogeneity of the distribution of colorectal cancer worldwide, both geographically and in terms of social background, underlines the involvement of the environment in the occurrence of this cancer (Chen et al., 2018). Various well-established environmental factors are associated with CRC, such as physical inactivity, obesity, smoking or dietary factors like red and processed meat (Chen et al., 2018; Murphy et al., 2019; Sung et al., 2021). Epidemiological studies in the UK indicate that 30 to 70% of all CRC cases are attributable to diet (Parkin, 2011). Among the candidate deleterious compounds proposed to be responsible for CRC, food contaminants have been proposed. The molecular nature of food contaminants is highly variable. Their presence in diet can result from an adventitious contamination by fungi producing mycotoxins. The anthropic activities also generate chemical pollutants, like pesticides used in agriculture and food preservation, polycyclic aromatic hydrocarbons produced during cooking, bisphenols, nanoparticles, microplastics found in packaging or used as food additives. Then, through their diet, consumers are exposed to a large number of complex mixtures of food contaminants. The complexity of the chemical exposome makes it difficult to study the causes of colorectal carcinogenesis. That is why scientists need new tools to investigate the complex mechanisms of environmental carcinogenesis.

CRC etiology is dependent on i) aging and associated spontaneous mutations and ii) on environmental exposure to chemicals leading to genome instability too, but also disturbing various cellular processes. It is difficult to determine the relative contribution of these factors in the development of cancer. Moreover, the environmental part in cancer etiology is the source of debates and controversies. The weight of genome *versus* exposome is challenged. Some studies estimated that two-thirds of all cancers are caused by the inevitable spontaneous accumulation of somatic genetic mutations as a consequence of aging (Tomasetti et al., 2017; Tomasetti and Vogelstein, 2015). Others works support that environmental carcinogens are responsible for most mutations and cause 70–90% of human cancers (Wu et al., 2018, 2016). The interaction gene environment and particularly gene-food

contaminant and their relative contribution in CRC development are unclear and supplementary *in vitro* studies with robust models are necessary. Understanding the gene-contaminant interaction and identifying the underlying cellular mechanisms will allow a better risk assessment and the implementation of more specific prevention strategies.

This study aims to characterize an *in vitro* relevant tool to study the gene-environment interaction in colorectal carcinogenesis. This *in vitro* tool implies the non-malignant isogenic human epithelial colonic cells (HCECs) and their isogenic derivatives. They were immortalized by cyclin-dependent kinase 4 (Cdk4) and the human ribonucleoprotein enzyme telomerase (hTERT). HCECs have no multiple cytogenetic changes. By this process, HCECs do not acquire tumorigenic properties and have a normal karyotype (Roig et al., 2010). Five cell lines have been experimentally obtained from the non-transformed HCECs (CT cells): three of them mimic the driver mutation genes found in CRC: loss of *APC* (CTA cells) and *TP53* (CTP cells) and ectopic expression of mutant *KRAS* (CTR cells) (Smith et al., 2002). One contains and expresses the three driver mutations (CTRPA cells) and another one has these three alterations and the ectopic expression of the 1309-aa truncated form of *APC* (CTRPA_t cells), the most frequently found form in human sporadic CRC. The six cell lines mimic the different steps of CRC, initiation (CT cells), promotion (CTA, CTR and CTP cells) and progression (CTRPA and CTRPA_t cells).

In this work, we have characterized the six isogenic cell lines according to endpoints relevant for environmental carcinogenesis: morphology, migration, proliferation, susceptibility to apoptotic and genotoxic stress and energetic metabolism. We also performed a transcriptomic analysis allowing the *in silico* genomic-scale based modelling of metabolic networks in each cell line. Based on these data, our study provided data about a pertinent set of cell lines useful to explore environmental carcinogenesis relative to genetic predisposition.

Materials and Methods

HCEC cell lines and culture

Isogenic human colorectal cell lines (HCECs), generated and provided by Pr Jerry W Shay. These cell lines were: 1CT (Roig et al., 2010) (CDK4 and hTERT immortalized HCEC), CTA (down-

expressed *APC*), CTR (overexpressed *KRAS^{V12}*), CTP (down-expressed *TP53*), CTRPA (overexpressed *KRAS^{V12}* and down-expressed *APC*, *TP53*) and CTRPat (overexpressed *KRAS^{V12}* and down-expressed *APC*, *TP53* and overexpressed truncated APC (A1309)).

According to experiments, cells were seeded at 1750/cm² or 5000/cm² and grown in a mix of 4X DMEM (Gibco) and 1X MEM (Sigma-Aldrich) medium supplemented with 20 ng/ml EGF (E9644, Sigma- Aldrich), 1 µg/ml hydrocortisone (H0888, Sigma-Aldrich), 10 µg/ml insulin (I9278, Sigma-Aldrich), 2 µg/ml holo-transferrin (T0665, Sigma-Aldrich), 5 nM sodium selenite (S5261, Sigma-Aldrich), 2 % FBS, 50mg/ml gentamycine sulfate (15750037 ThermoFisher Scientific), 50 µg/ml primocin (ant-pm2, InvivoGen), 2 mM L-glutamine (25030081, Gibco) and incubated at 37 °C in presence of 5% CO₂.

Specific supplementations were further performed according the cell lines, as follows: for CTP 1 mg/ml zeocin™ (R25001, ThermoFisher Scientific), CTA 10 µg/ml puromycin (A1113803, ThermoFisher Scientific), and CTR 200 µg/ml hygromycin B (10687010, ThermoFisher Scientific). All experiments, unless stated, were performed after 96h of cell culture.

Characterization of cell morphology by microscopy

Transmitted light microscopy experiments

To evaluate HCEC live cell morphology without staining, images were acquired by transmitted light microscopy using a AxioObserver Z1 microscope (ZEISS) with PlasDIC differential interference contrast with a ×10 objective.

Actin and paxillin staining by immunofluorescence

Actin network and focal adhesion sites were observed by staining with phalloidin and anti-paxillin antibodies, respectively. Briefly, cells were grown on coverslip for 96h and then fixed with Antigenfix (DiaPath) for 15 min, washed with PBS and subsequently permeabilized with 0.2% Triton X-100 for 3 min at room temperature. After blocking unspecific binding sites with a solution composed of 1% serum albumin and 0.3M of glycine for 30 min, cells were then incubated with Paxillin antibody (dilution 1/200, Y113 ab32084, Abcam) and Phalloidin TRITC (dilution 1/2000, P1951, Sigma) for 1h. Next, cells were washed with PBS containing 0.1%

Tween-20 and incubated with a 1:200 diluted secondary antibody (Alexa-Fluor 488, Invitrogen) for 1 h at room temperature. After washing with PBS-0.1% tween-20 buffer, nuclei were stained with Dapi for 5 min and coverslips were sealed on slide with Aqueous Mounting Medium (Dako). Images were recorded using a laser-scanning confocal microscope imaging system (LSM-710, ZEISS) with a 63 × oil-immersion objective.

Characterization of cell proliferation

Doubling time calculation

Ninety six hours after seeding, cells were count using a LUNA automated cell counter (Logos Biosystems Inc). Calculation of the doubling time of each cell lines was performed using an online calculator (Roth V, 2006). The doubling time correspond to time required for cell population to double. Values are expressed in 1/doubling time to facilitate the comparison with Ki67 index.

Ki67 staining

Cells were seeded on coverslip and stained after 96h of culture according to the same protocols of fixation, permeabilization that were used for actin and phalloidin staining. After blocking with a blocking solution for 30 min, cells were then incubated over night at 4°C with Ki67 antibody (dilution 1:800, 8D5 Mouse mAb #9449, Cell Signaling). Then, cells were washed with PBS containing 0.1% Tween-20 and incubated with a 1:200 diluted secondary antibody (Alexa-Fluor 488, Invitrogen) for 1h at room temperature. After washing with PBS-0.1% tween-20, nuclei were stained with Dapi for 5 min and coverslips were seal on slide with Aqueous Mounting Medium (Dako). Image acquisition and analysis of Ki67 staining were performed using an automated Cell Imaging System ImageXpress Pico (Molecular devices).

Soft Agar Clonogenicity Assay

In a 6-wells plate coated with a lower layer media containing Noble agar 0.5%, cells were seeded in medium 0.375% Noble agar at 5000 cells per well, in triplicate. After 15 days,

colonies were counted in the whole well. Experiments were performed in four independent experiments.

Wound healing scratch assay

Migration capacities of HCEC cell lines were assessed by wound healing scratch assay. Briefly, cells were seeded $2.5 \cdot 10^5$ cells/well for 24h in 12-wells microplates to reach confluency and cultivated in serum depleted-medium to limit cell proliferation for several hours. Wounds were made by scraping cell monolayer with a 20 μ l pipette tip on center of the well. Cells were then carefully washed off and placed in thermostatically controlled-chamber (37°C) under 5% CO₂ in an epifluorescence microscope system (AxioObserver Z1, ZEISS). The wound gaps were observed at regular intervals (30 min) for 24h. Images were acquired using an ORCA Flash 2.8 camera (Hamamatsu Photonics) and a polarization-optical transmitted light differential interference contrast (PlasDIC) with a $\times 10$ objective. The wound closure area was measured using ImageJ (Ver. ImageJ1.52a, accessed on 05 July 2021) plugging Wound_healing_size_tool.

Evaluation of energetic metabolism

Substrate oxidation assays

Oxidative capacities of glucose and glutamine were assessed by measurement of ¹⁴CO₂ production from cells incubated either with [U¹⁴C]-glucose or [U¹⁴C]-glutamine respectively. Briefly, 96h after seeding, cells were trypsinized, counted and 10^6 cells were incubated for 90 min at 37 °C in Krebs-Ringer phosphate buffer containing 5 mM U-¹⁴C-glucose (isotopic dilution 1/1000, Perkin Elmer), or 4 mM [U¹⁴C]-glutamine (isotopic dilution 1/5000, Perkin Elmer). Following incubation, reaction was stopped with 6N sulphuric acid and CO₂ was recovered for 1 h in benzethonium hydroxide. The radioactive CO₂ was counted by liquid scintillation (Ultima Gold, Perkin Elmer) and results were normalized with total protein amount.

Lactate

Ninety-six hours after seeding, cells were incubated with Krebs-Ringer phosphate buffer containing 5 mM glucose for 2h at 37 °C. Medium were then collected and directly frozen at -80°C. Extracellular lactate was then measuring following previously described protocol.

Real-Time Cell Metabolic Analysis: adenosine triphosphate (ATP) production

Cell energetic metabolism was assessed by analyzing the oxygen consumption (OCR) and extracellular acidification (ECAR) rates using the Seahorse technology (Seahorse Bioscience, Agilent Technologies), as previously described (Tête et al., 2020). Briefly, the various cell lines were seeded in Seahorse XF 24-well Seahorse microplates at 8,000 cells per well. Then, cells were grown during 96 h. On the day prior to the experiment, XF extracellular flux cartridge was hydrated with XF calibrant overnight. After 4 days-proliferation, the medium was next changed to assay medium (unbuffered DMEM with 10 mM glucose, 2 mM glutamine, and 2 mM pyruvate) and kept 1 h in a non-CO₂ incubator at 37 °C. OCR and ECAR were measured and normalized according to protein content.

The measurement of adenosine triphosphate (ATP) production was evaluated by distinguishing the ATP produced from mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS) *versus* the one stemming from glycolysis. To do so, consecutive injections of 1.5 µM oligomycin and a mix of 0.5 µM rotenone / 0.5 µM antimycin A were used. The fractions of ATP produced from OXPHOS and glycolysis were determined by Wave Desktop software (Agilent Technologies). Nine independent experiments were performed for each cell line.

Measurement of intracellular pH (pH_i)

The pH_i of HCEC cells seeded in 96-well microplates was monitored following 48h of culture, using the pH-sensitive fluoroprobe, 5-(and-6)-Carboxy-SNARF -1-AM (Acetoxymethyl Ester) (Thermo Fisher Scientific C1272). Cells were incubated with 5 µM SNARF for 30 minutes at 37°C and 5% CO₂ in the presence of HEPES-buffered solution (pH of 7.4 at 37°C). Measurements were realized with the ClarioSTAR® apparatus (BMG Labtech) that is a

multiplate reader with atmosphere (CO₂) and temperature control. The fluorescence recordings were carried out for 10 minutes. The emission ratio 640/590 nm (corrected for background fluorescence) detected from intracellular SNARF, was calculated and converted to pH_i value using *in situ* calibration obtained by the nigericin (Sigma Aldrich N-7143) technique, as previously described (Huc et al., 2004). Six independent experiments were performed.

Evaluation of mitochondrial morphology and function

Mitochondrial network organization and ultrastructure were assessed by transmission electronic microscopy (TEM) and by confocal fluorescence microscopy after staining of functional mitochondria with Mitotracker Orange CMTMRos (M7510, Thermofisher). Mitochondrial function was evaluated by measurement of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) using flow cytometry.

Mitochondrial ultrastructure observation by TEM

As previously described (Tête et al., 2018), following 96 h of culture and rinsing, cells were fixed successively in a glutaraldehyde (2.5%) - 0.15 M cacodylate buffer, then in a 1.5% osmium tetroxide buffer. The samples were then dehydrated with ethanol to be next successively infiltrated in an acetone-eponate (50/50) mixture, then in pure eponate. Finally, the samples were embedded into DMP30-eponate. Ultrafine sections were mounted on copper grids and counterstained with 4% uranyl acetate and Reynolds' lead citrate. Sample examination was performed with a JEOL 1400 transmission electron microscope operated at 120kV.

Functional mitochondria imaging by confocal microscopy

Before using, CMTMRos Orange Mitotracker probe was diluted with DMSO at a concentration of 1 mM. Ninety-six hours after seeding, cells were incubated with Mitotracker probe (dilution 1/4000) for 45 min at 37°C. Following incubation, cells were washed in PBS 1X and fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min. Then nuclei were stained with Dapi for 5 min and coverslips

were sealed on slide with Aqueous Mounting Medium (Dako). Images were recorded using laser-scanning confocal microscope imaging system (LSM-710, ZEISS) with a 63× oil-immersion objective.

Evaluation of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$)

$\Delta\Psi_m$ was evaluated using the cell-permeant fluorescent tetramethylrhodamine methyl ester dye (TMRM, T668, Thermofisher) by flow cytometry. Briefly, cells were incubated with 200 nM TMRM solution for 30 min at 37°C. Following incubation, supernatants were collected with cells after washing with Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) and trypsinization. Cells and supernatants were then centrifuge and resuspended in running buffer composed of 2 % SVF-HBSS supplemented with 0.2 μ M TOPRO-3 to assess cell viability. Cells exposed to 30 μ M of uncoupling agent Carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) for 20 min is used as positive control for $\Delta\Psi_m$ depolarization. Samples acquisition and analysis were performed using a Attune NxT flow cytometer (Thermofisher) and FlowJo software (BD Biosciences).

Real-time analysis of cell death

To evaluate the HCEC susceptibility to cell death (apoptosis and necrosis), we measured the fluorescence intensity of both sytox[®] green (S7020 Invitrogen), a cell-impermeable fluoroprobe that enters cells following plasma membrane permeabilization, and of caspase-mediated release of a fluorophore from its quencher Ac-DEVD-AMC (ALX-260-031 Enzo Life Sciences) (Grootjans et al., 2016). To elicit death cell, staurosporine (S5921 Sigma-Aldrich) and rotenone (R8875 Sigma-Aldrich) were used as cell death stimuli. The measurements were realized over a 5 days-period, every 8h : for this real-time analysis, the ClarioSTAR[®] (BMG Labtech), a multiplate reader with atmosphere (CO₂) and temperature control, was used. The fluorescence intensity of sytox green and DEVD-AMC were simultaneously measured using the following wavelenghts : for Sytox green, Ex 487 nm and Em 530 nm ; for DEVD-AMC, Ex 360 nm and Em 460 nm.

8,000 cells of each HCEC cell line were seeded in a 96-well microplates. After 48h of culture, the medium was changed and supplemented with a mix containing 28 nM sytox green, 5,5 μ M

Ac-DEVD-AMC and either 2 μ M staurosporine, 2 μ M rotenone or DMSO as control vehicle. Then, the real-time measurement was started. Six independent experiments for sytox green and nine for Ac-DEVD-amc were performed.

Genotoxicity analysis

53BP1 immunofluorescence

Cells were grown on glass slide in 12-well plates (5,000 cells/well) for 48h. After 24h or 3 weeks of food contaminant treatment, cells were washed with PBS and fixed with 4% of paraformaldehyde for 20 min on ice. Cells were washed with PBS for 5 min then permeabilized with 0.5% Triton X-100 in PBS for 15 min. Cells were blocked with 3% BSA in PBS for 1h and incubated with primary antibodies anti 53BP1 (Novus Biological, Abingdon, United Kingdom, ref: NB100-304) from rabbit 1/2000 for 2h. After 3 washes, cells were incubated with secondary antibodies Alexa fluor 568 (spectrum 578/603, ThermoFisher, ref: A-11011 and A-11001) 1/800 from rabbit for 1h and nuclei were labelled with 4,6-diamino-2-phenyl indole (DAPI). Coverslips were mounted with Prolong Gold. Slides were analysed with a confocal laser-scanning microscope (SP8, LEICA) equipped with a 40x oil immersion objective and using 405 and 565 nm lasers to reveal DAPI and Alexa 568, respectively. For the quantification of DNA damage, the images were analysed using ImageJ software (Ver. Image J 1 .52a, accessed on 05 July 2021) and cells were scored positive when containing more than five 53BP1 foci. Experiments were performed in three independent experiments.

Comet assay

The alkaline comet assay was used to detect strand breaks as previously described (Perdry et al., 2018). HCECs were exposed for 2h to methyl methanesulfonate (MMS). Trypsinized cells were then pelleted for 10 min at 200g at 4°C. They were embedded in 0.7% low melting point agarose and deposit on Gelbond® prior to lysis and electrophoresis. Fifty cells per deposit and two deposits per sample were analysed. The extent of DNA damage was evaluated for each cell by measuring the intensity of all tail pixels divided by the total intensity of all pixels in the

head and tail of the comet with Lucia comet assay software. The median of these 100 values was calculated and named % tail DNA. PBMC treated with methyl methanesulfonate (MMS) were used as a positive control. Experiments were performed in three independent experiments.

Microarray Gene Expression Studies

Gene expression profiles were performed at the GeT-TRiX facility (GénoToul, Génopole Toulouse Midi-Pyrénées) using Agilent Sureprint G3 Human GE v3 microarrays (8x60K, design 072363) following the manufacturer's instructions. For each sample, Cyanine-3 (Cy3) labeled cRNA was prepared from 200 ng of total RNA using the One-Color Quick Amp Labeling kit (Agilent Technologies) according to the manufacturer's instructions, followed by Agencourt RNAClean XP (Agencourt Bioscience Corporation, Beverly, Massachusetts). Dye incorporation and cRNA yield were checked using Dropsense™ 96 UV/VIS droplet reader (Trinean, Belgium). 600 ng of Cy3-labelled cRNA were hybridized on the microarray slides following the manufacturer's instructions. Immediately after washing, the slides were scanned on Agilent G2505C Microarray Scanner using Agilent Scan Control A.8.5.1 software and fluorescence signal extracted using Agilent Feature Extraction software v10.10.1.1 with default parameters.

Microarray data and experimental details are available in NCBI's Gene Expression Omnibus (Edgar et al., 2002) and are accessible through GEO Series accession number GSEXXXXX (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSEXXXXX>).

Microarray data statistical analysis

Microarray data were analyzed using R (R Core Team, 2018) and Bioconductor packages (Huber et al., 2015) as described in GEO accession GSEXXXXX. Raw data (median signal intensity) were filtered, log2 transformed and normalized using quantile method (Bolstad et al., 2003).

A model was fitted using the limma lmFit function (Ritchie et al., 2015) considering the plates as a blocking factor. Pair-wise comparisons between biological conditions were applied using specific contrasts. A correction for multiple testing was applied using Benjamini-Hochberg

procedure (Benjamini and Hochberg, 1995) to control the False Discovery Rate (FDR). Probes with $FDR \leq 0.05$ were considered to be differentially expressed between conditions.

Hierarchical clustering was applied to the samples and the differentially expressed probes using 1-Pearson correlation coefficient as distance and Ward's criterion for agglomeration. The clustering results are illustrated as a heatmap of expression signals.

The enrichment of Gene Ontology (GO) Biological Processes and KEGG pathways on selected gene lists was evaluated using enrichGO function and enrichKEGG functions from clusterProfiler R package (Yu et al., 2012).

Western blot analysis

After 96h of proliferation, cells were lysed on ice in RIPA buffer supplemented with cComplete™, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (11873580001, Roche Diagnostics). After protein concentration determination, 30 µg of whole-cell lysates were then heated for 5 min at 95°C, and then separated by SDS–PAGE 40% acrylamide/bis solution, 29/1 (1610146 Biorad). Gels were next electroblotted onto Amersham™ Protean® Western blotting membranes nitrocellulose overnight at 4°C. Membranes were next blocked with a Tris-buffered saline tween solution supplemented with 5% bovine serum albumin for 2h and then hybridized with either CYP1B1 1/1000 (sc374228, Santa Cruz Biotechnology) antibodies overnight at 4 °C. Membranes were then incubated with appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies for 1 h and immunolabeled proteins were visualized by chemiluminescence using the ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad). For protein loading evaluation, a primary antibody anti-HSC70 1/10000 (sc-7298 Santa Cruz Biotechnology) was used. Image processing was performed using Image Lab software (Bio-Rad).

Statistical Analysis

All values are presented as means ± SEM (standard error of mean) from at least three independent experiments. Multiple comparisons are performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Dunnett's post-test for comparison to CT cells conditions using GraphPad Prism 5 software.

Results

Phenotype characterization of HCECs

We first analyse cell morphology using transmitted light microscopy (Fig 1A). We observe that the six isogenic HCECs exhibit different morphologies and shapes related to the genetic modification. CTR cells are the one that differs the most from other cell lines. CTR cells have a more elongated shape compared to the others. Moreover, actin network and the focal adhesion sites were stained respectively with dye-labelled phalloidin and antibody directed against paxillin (Fig 1A). We observed a higher number of focal adhesion sites in CTP and CTRPA cells compared to CT cells. In comparison to CT cells, CTR, CTP, CTRPA and even more CTRPA cells exhibit stress fibers, associated with punctuated paxillin localization. Then, they exhibited a mobile phenotype.

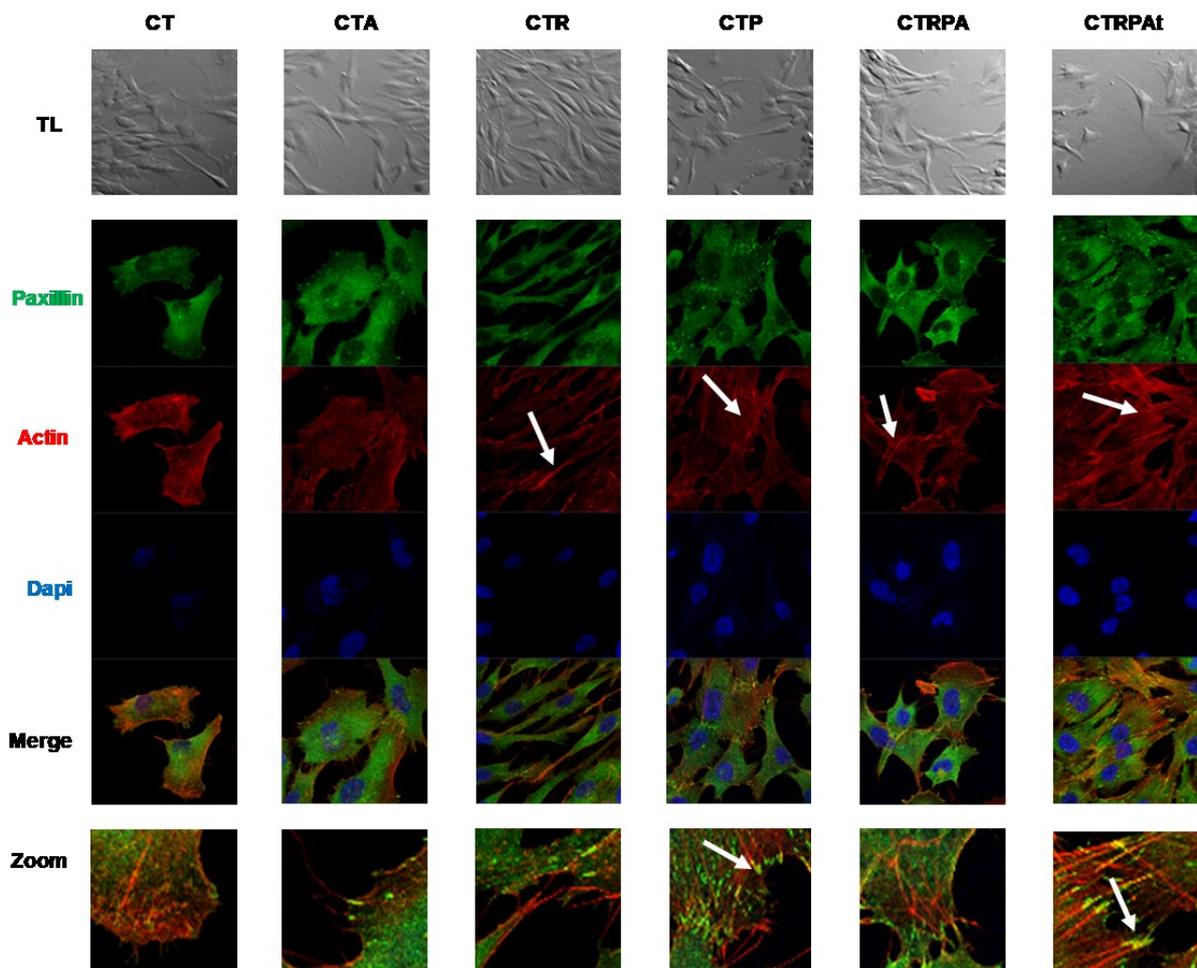
We evaluated proliferation of the six cell lines. Proliferation rate was determined by calculation of the doubling time 96h after seeding (Fig 1B) and by determination of Ki67 index (Fig 1C). CTP and CTRPA cells exhibit a higher rate of cell proliferation, as shown by a diminution of the doubling time and an increase of Ki67 index.

Non-malignant cells do not grow without anchoring and are not able to grow in soft agar. However, cancerous cells can acquire the ability to grow without anchoring and thus grow in soft agar. Then, the capacity of the six cell lines to grow without anchoring was analyzed by the soft agar assay (Fig 1D). Fifteen days after seeding, CTR, CTP, CTRPA and CTRPA cells display a higher capacity to grow without anchoring and form colony in soft agar compared CT cells.

The cell migration capacity was evaluated using wound healing assay. The wound area was analyzed after 1h and 12h by transmitted light microscopy (Fig 1E) and the cell migration was expressed by wound closure rate over 12h (Fig 1F). In comparison with CT cells, CTR, CTP and CTRPA cells have a higher rate of migration in wound healing assay.

Overall, cells mutated for TP53 (CTP cells) and KRAS (CTR cells) are distinguished by phenotypic characteristics different from other cell lines. They exhibit strong capacity to grow without anchorage and to migrate.

A



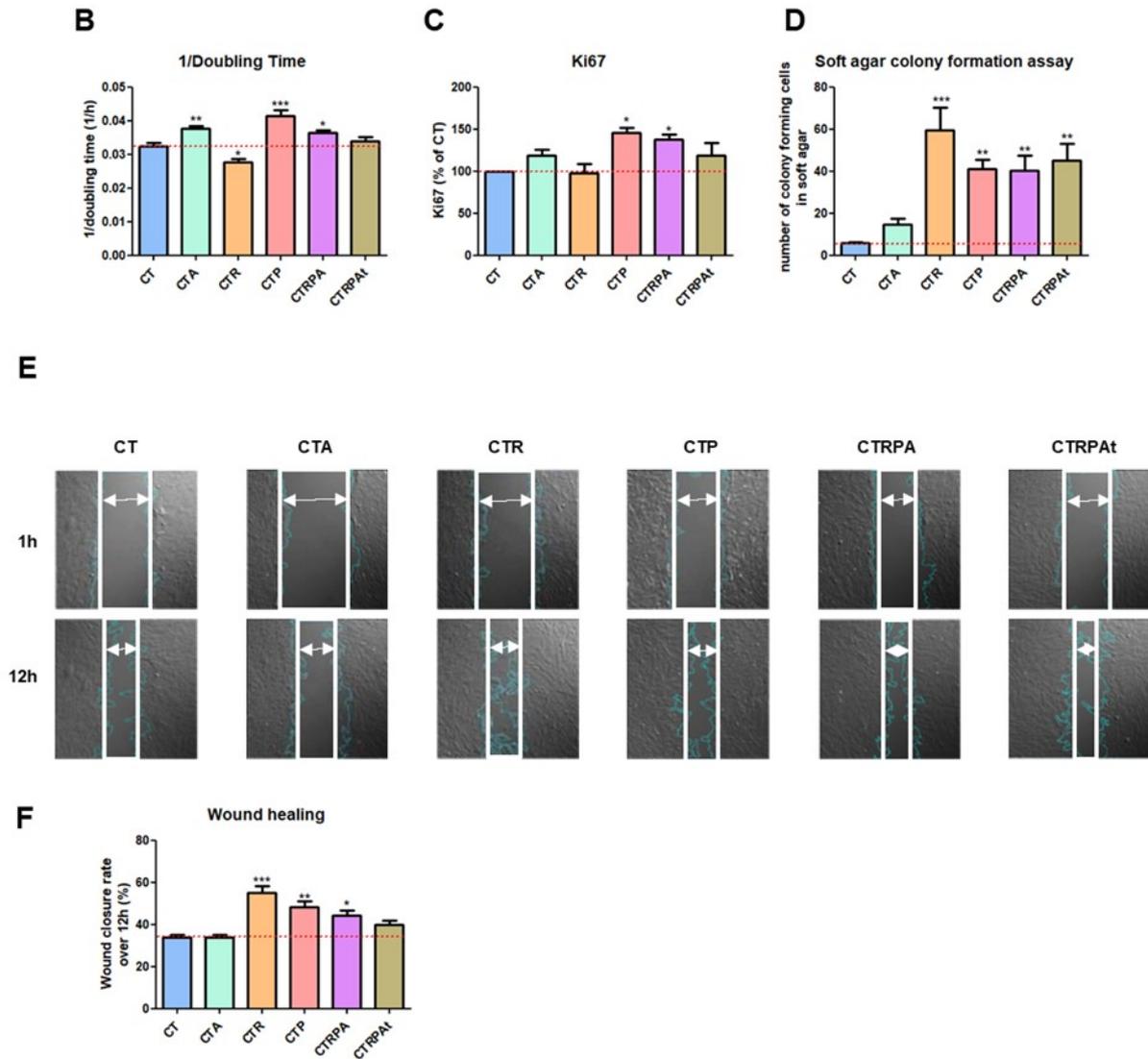


Fig 1. Cell phenotype characterization. **A)** Cell morphology was assessed by transmitted light (TL) microscopy and by confocal microscopy after with staining with anti-paxillin antibodies and phalloidin, used to examine the focal adhesion sites and actin network, respectively. White arrow indicate stress fibers and focal adhesion sites **B-C)** Proliferation rate was evaluated by the calculation of the doubling time 96h after seeding (**B**) and by the determination of the Ki67 index. **D)** Capacity of cells to growth without anchorage was analyzed by soft agar colony formation assay after fifteen days post-seeding. **E-F)** Cell migration capacity was investigated by wound healing assay. Representative TL microscopy images shows wound area after 1h and 12h (**E**) and cell migration was expressed by wound closure rate over 12h (**F**) Scale. All values are presented as means \pm SEM (standard error of mean) from at least three independent experiments. Multiple comparisons are performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Dunnett's post-test using GraphPad Prism 5 software. Differences are considered as significant when $P < 0.05$. * : significantly different from CT cells.

Characterization of the metabolic program

Driver mutations involved in CRC, loss of *APC* and *TP53* genes and activation of the proto-oncogene K-RAS, strongly influence the energetic metabolism program of human cells (Pylayeva-Gupta et al., 2011; Nenkov et al., 2021). To evaluate cell energy metabolism, glucose (Fig 2A) and glutamine (Fig 2B) oxidation capacities of cells were assessed by measurement of $^{14}\text{CO}_2$ production from cells incubated for 2h in Krebs phosphate buffer supplemented with [^{14}C]-glucose or [^{14}C]-glutamine. We observed that glucose oxidation was higher in CTP cells and that glutamine oxidation was higher in CTP, CTRPA and CTRPAt compared to CT cells.

Lactate secretion from glucose was evaluated by quantifying the presence of lactate in media after incubation of cells for 2h in Krebs phosphate buffer supplemented with 5 mM of glucose (Fig 2B). Lactate secretion was higher in CTP cells and lower in CTA and CTRPA cells compared to CT cells.

ATP production from mitochondria or glycolysis was determined using Seahorse XF ATP rate assay kit (Fig 2D). ATP production from mitochondria or glycolysis was more elevated in CTP cells compared to CT cells.

Intracellular pH (pH_i) was measured using pH-sensitive carboxy-SNARF1 fluorescent probe (Fig 2E). CTP cells exhibited a greater pH_i compared to CT cells

In conclusion, TP53 seems to have impact the most impact on the metabolism, with an higher glucose and glutamine oxidation, lactate release and ATP (glycolytic and mitochondrial) production, with an elevated pH_i , compared to the other cell lines.

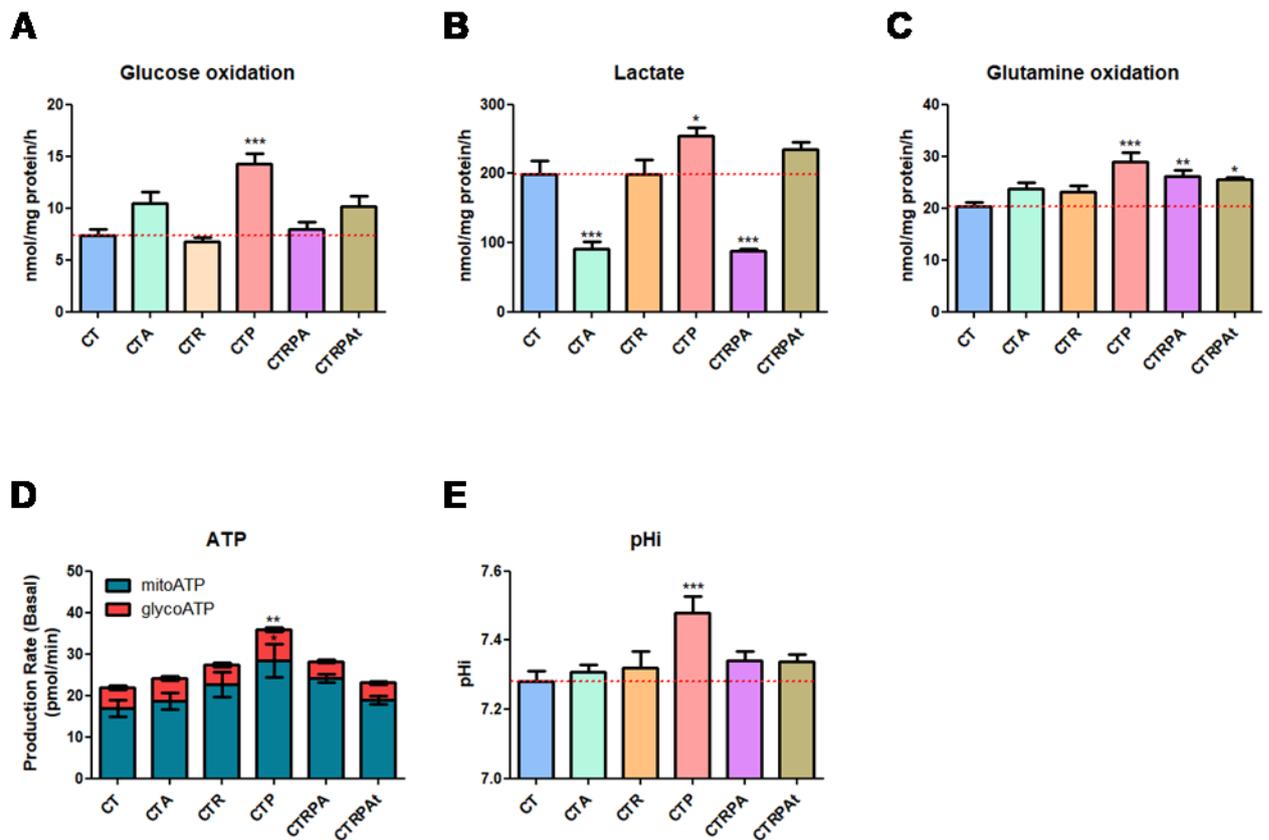


Fig 2. Characterization of the metabolic program. A,C) Glucose (A) and glutamine (C) oxidation capacities was assessed by measurement of $^{14}\text{CO}_2$ production from cells incubated for 2h in Krebs phosphate buffer supplemented with $[\text{U}^{14}\text{C}]$ -glucose or $[\text{U}^{14}\text{C}]$ -glutamine. B) Lactate secretion from glucose was evaluated by quantifying lactate release in media after incubation of cells for 2h in Krebs phosphate buffer supplemented with 5 mM of glucose. D) ATP production from mitochondria (mitoATP) or glycolysis (glycoATP) was determined using Seahorse XF ATP rate assay kit. E) Intracellular pH (pHi) was analyzed using pH-sensitive SNARF probe. All values are presented as means \pm SEM (standard error of mean) from at least three independent experiments. Multiple comparisons are performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Dunnett's post-test using GraphPad Prism 5 software. Differences are considered as significant when $P < 0.05$. * : significantly different from CT cells.

Characterization of mitochondrial morphology and functions

Mitochondrial network structure was observed by electronic microscopy (EM) and by confocal microscopy following staining active mitochondria with MitoTracker Orange CMTMRos probe. Mitochondrial membrane potential ($\Psi\Delta$) was measured by flow cytometry using TMRM dye. FCCP was used as positive control of mitochondrial membrane depolarization. All the isogenic cells seem to have the same mitochondrial network pattern. However, the mitochondrial membrane potential was higher in CTR and CTRPA cells and lower in CTA and CTP cells, compared to CT cells.

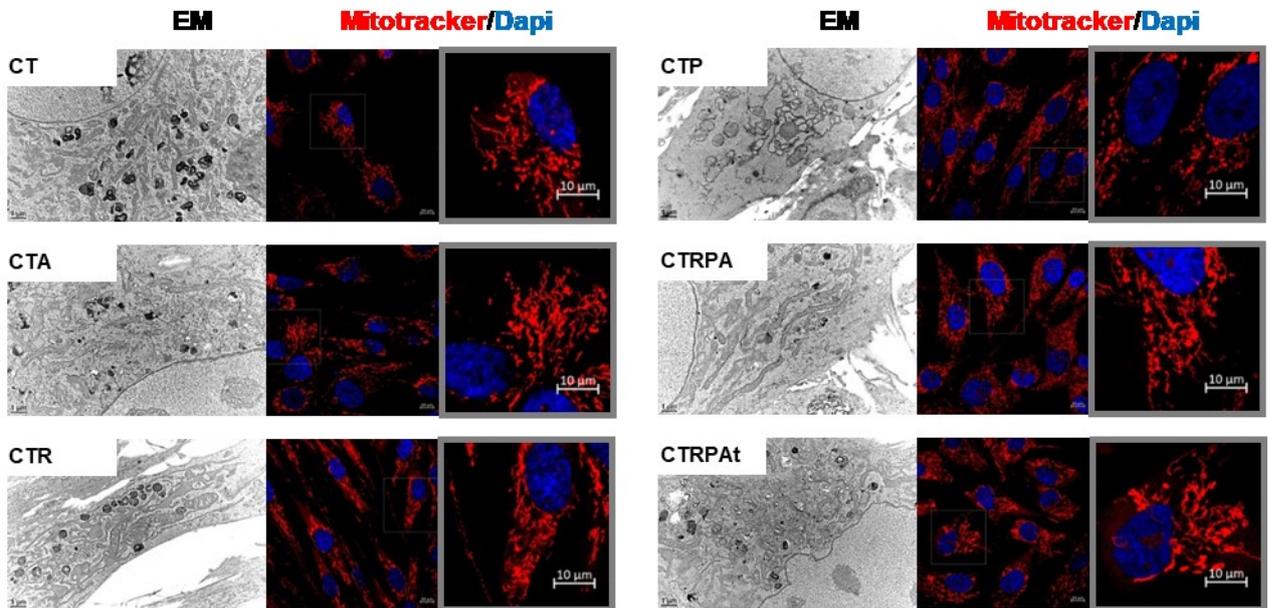
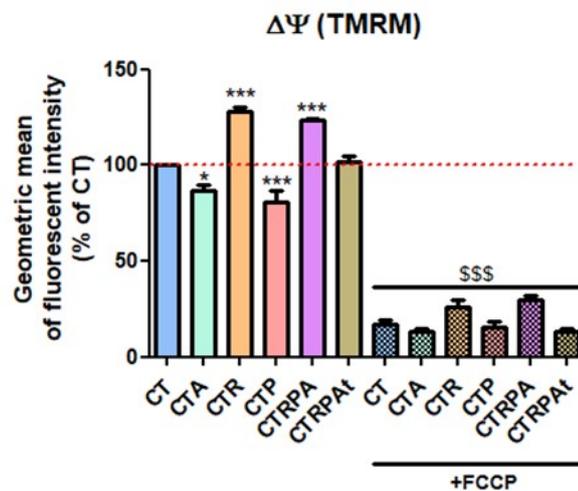
A**B**

Fig 3. Mitochondrial morphology and functions. A) Mitochondrial network structure was observed by electronic microscopy (EM) and by confocal microscopy following staining with MitoTracker Orange CMTMRos probe. B) Mitochondrial membrane potential ($\Psi\Delta$) was measured by flow cytometry using TMRM dye. FCCP was used as positive control of mitochondrial membrane depolarization, All values are presented as means \pm SEM from at least three independent experiments. Multiple comparisons are performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Dunnett's post-test using GraphPad Prism 5 software, Differences are considered significant when $P < 0.05$. * : significantly different from CT cells ; \$: significantly different from control conditions in the respective cells.

Sensitivity to cell death stimuli

We evaluated the sensitivity to cell death induction in the six cell lines, by treatments with two chemical stressors: staurosporine (inhibitor of PKC protein kinase C, 2 μ M) and rotenone (inhibitor of complex I of respiratory chain, 2 μ M). We chose the concentration of 2 μ M and measured in real time caspase activation (Fig 4A) and membrane permeabilization (Fig 4B) using DEVD-AMC and sytox green, respectively. Staurosporine, which induces intrinsic apoptosis (Malsy et al., 2019), triggered caspase activation in CT and CTRPA cells only, whereas it permeabilized the membrane of all the cell lines, suggesting that staurosporine was able to induce apoptosis according to a caspase-dependent pathway in CT and CTRPA cells only. In response to rotenone, we observed a rapid activation of caspases in CT cells and CTRPA cells. Rotenone also induced the permeabilization of the membrane, mainly in CT, CTA, CTRPA. CTR appeared to be the less sensitivity to such a mitochondrial stressor.

CTR and CTRPA cells would appear as the most resistant cell lines to chemical stressors (staurosporine and rotenone) with a low induction of cell death.

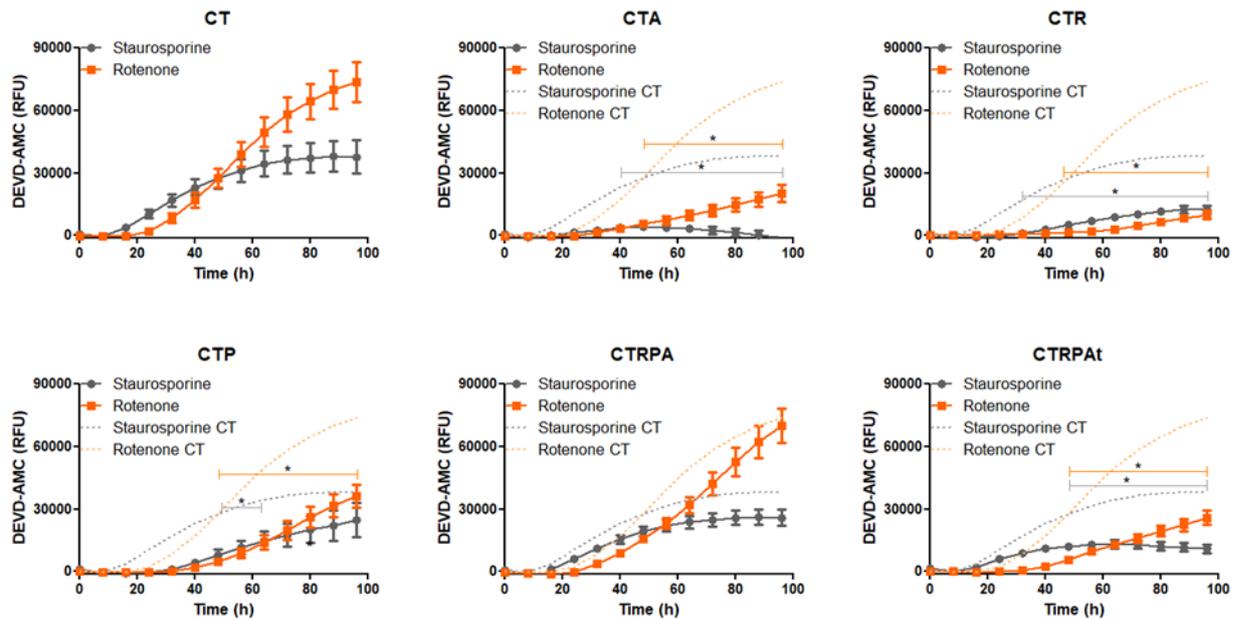
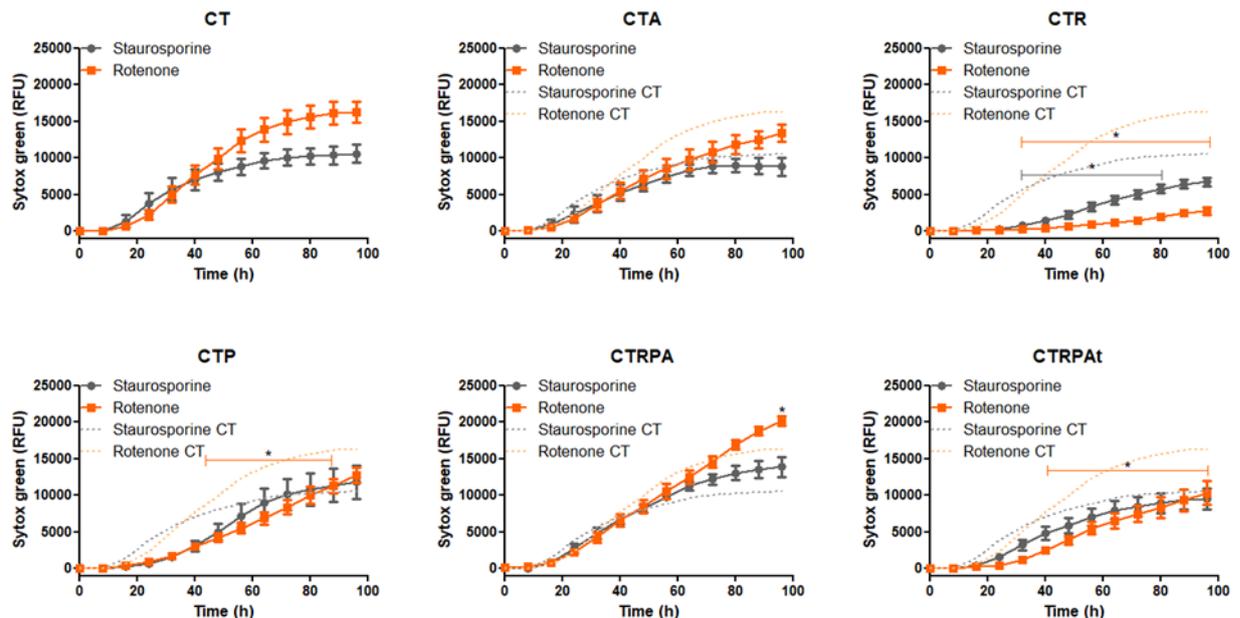
A**B**

Fig 4. Sensitivity to cell death stimuli. Caspases 3-7 activation (A) and membrane permeabilization (B) were analyzed using DEVD-AMC probe or sytox green staining respectively, in response to staurosporine or rotenone treatment at 2 μ M. Fluorescence intensity was measured using ClarioSTAR real-time microplate reader. All values are presented as means \pm SEM from at least three independent experiments. Multiple comparisons are performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Dunnett's post-test using GraphPad Prism 5 software. Differences are considered significant when $P < 0.05$. * : significantly different from CT cells. Curves from CT conditions are represented in other cells panels in opaque dotted lines.

Sensitivity to genotoxic stress

To evaluate the sensitivity to genotoxic stress of the six isogenic cells, we carried out comet assay after 2h exposure to methylmethanesulfonate (MMS), a DNA damage inducer. In control conditions or after 2h of exposure to MMS, we observed in all the cell lines the same DNA damage level. APC, KRAS or TP53 altered expressions do not appear to impact basal level of DNA damage and sensitivity to this genotoxic stress in HCECs cells.

Double-strand break (DSB) is the most critical DNA damage in carcinogenesis. We evaluated DSB by quantifying 53-BP1 foci in the nuclei. We challenged HCECs cells with etoposide, a DSB inducer, for 2h. In order to evaluate the repair capacity, we measured DNA damage after the removal of etoposide for 1h. In control conditions, we observed the same level of 53BP1 foci, showing that there was no difference in the basal conditions between cell lines. When exposed to etoposide, the accumulation of 53BP1 in the nuclei was different, according to the cell lines. CT and CTP cells seemed to be more sensitive to etoposide, compared to CTA, CTR and CTRPA. The increase of 53BP1 in CTRPA was not significant compared to control condition. After etoposide release, all the cell lines recovered the basal level of 53BP1: it suggests that all the cell lines were able to repair DNA damage even if the levels of etoposide-induced damage were different.

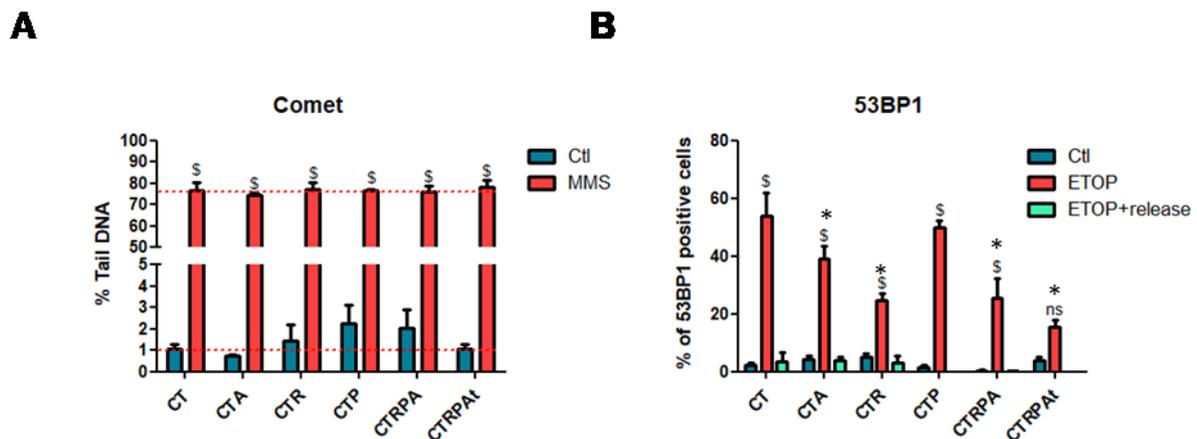


Fig 5 Sensitivity to genotoxic stress. **A)** DNA fragmentation was evaluated following an exposure to MMS by alkaline Comet assay and quantified as percentage of DNA in tail. **B)** Double-strand break marker 53BP1 staining was measured by fluorescent microscopy after treatment with Etoposide (ETOP). Release of ETOP after treatment was proceeded to evaluate DNA repair capacity of the cells after 1h of etoposide removal. All values are represented as means \pm SEM (standard error of mean) from at least three independent experiments. Multiple comparisons are performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Dunnett's post-test using GraphPad Prism 5 software, Differences are considered significant when $P < 0.05$. * : significantly different from CT cells ; § : significantly different from without treatments (MMS or ETOP or ETOP+release).

Transcriptomic analysis and CYP1B1 expression

We analyse the transcriptomic profile of the six isogenic cell lines using microarray gene expression. We represented these data in Venn diagram of number and intersection between differentially-expressed genes of the different cell lines in comparison to CT cells (Fig 6A) and in a heat map of cell lines clusterization considering differentially-expressed (Fig 6B). We observed that the cell lines have different genetic expression profiles compared to CT cells. Two groups of cell lines stand out : CTR and CTRPA cells with genetic expression profiles closer than CT, CTA, CTP and CTRPA cells.

CYP1B1 belongs to the cytochrome P450 superfamily of enzymes. CYP1 are regulated by aryl hydrocarbon receptor, a xenobiotic sensor that play a major role in detoxification of contaminants such as benzo[a]pyrene and dioxin. We analysed CYP1B1 gene (Fig 6C) and protein expression level (Fig 6D). CYP1B1 gene expression level increase in CTR, CTRPA and CTRPA cells compared to CT cells. CYP1B1 protein expression level increase in CTR and CTRPA.

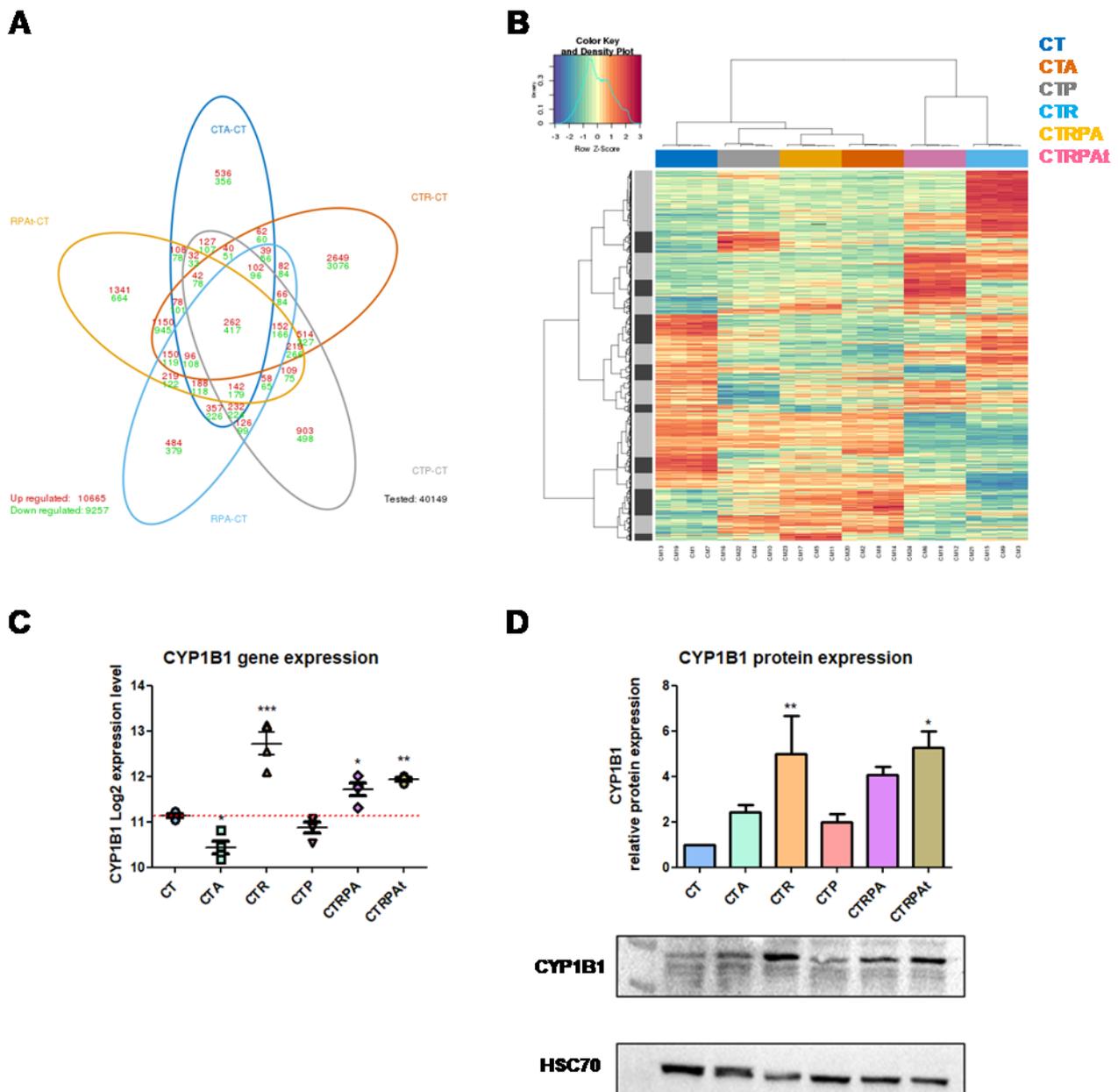


Fig 6. Transcriptional analysis and CYP1B1 expression. **A**) Venn diagram of number and intersections between differentially-expressed (BH p value < 0.05) genes of the different cell lines in comparison to CT cells. **B**) Heatmap of cell lines clusterization considering differentially-expressed (BH p value < 0.05) genes. **C**) CYP1B1 log2 gene expression level from transcriptomic analysis. **D**) CYP1B1 protein level assessed by western-blotting and densitometric analysis. All values are presented as means \pm SEM (standard error of mean) from at least three independent experiments. Multiple comparisons are performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Dunnett's post-test using GraphPad Prism 5 software, Differences are considered significant when $P < 0.05$. * : significantly different from CT cells.

Discussion

CRC etiologic is complex and depend to genetic and environmental factors. The gene-environment interaction is unclear and supplementary *in vitro* studies are necessary: it requires robust cellular models. In this study, we characterized an *in vitro* relevant tool to study gene-environment interaction in colorectal carcinogenesis : non-malignant isogenic human epithelial colonic cells (HCECs). These six cells line mimic CRC mutations and represent the different steps of colorectal carcinogenesis initiation (CT cells), promotion (CTA, CTR, CTP cells) and progression (CTRPA and CTRPA_t cells).

Our comparative observations of the six HCECs isogenic cell lines show different phenotypic, metabolic, mitochondrial, genotoxic, apoptotic and transcriptomic characteristics when the expression of APC, KRAS and / or TP53 are altered as in CRC. We have observed that CT cells are more sensitive to cell death and genotoxic stimuli than most other cell lines. KRAS alteration seemed to confer resistance to these phenomena. CTA cells show a decrease in lactate release and mitochondrial potential compared to CT cells. They are also less sensitive to cell death stimuli and genotoxic stress induced by etoposide.

CTP cells have a strong proliferation capacity and a strong migratory capacity compared to CT cells. Their capacity to grow without anchoring is also more important for CT cells. In addition, CTP cells exhibit the most important metabolic changes with increased oxidation of glucose and glutamine, lactate release, pH_i and ATP (glycolytic and mitochondrial) production compared to other cell lines. We also observed a decrease in mitochondrial potential compared to CT cells. Finally, CTP cells exhibit greater sensitivity to the genotoxic stress induced by etoposide compared to other lines, however they exhibit good repair capacity.

CTR cells exhibit increased migratory capacity and unanchored growth capacity compared to CT cells. We observed increased mitochondrial potential, decreased sensitivity to cell death stimuli and etoposide-induced genotoxic stress, and induction of CYP1B1 expression.

We observed different results between CTRPA and CTRPA_t cells, in particular at the proliferative, migratory, metabolic and mitochondrial level, but also at the level of sensitivity to cell death and genotoxic stress. These differences seem to result from the different APC mutation in the two lines: CTRPA loss of APC by shRNA and CTRPA_t ectopic expression of 1309-aa truncated form of APC.

The six isogenic lines show different characteristics and gene expression profiles. However, we can distinguish cells that are genetically closer than others, such as CTR and CTRPA_t.

Overall, this study characterized a relevant and original *in vitro* model for the study of gene-environment interaction, in particular food toxicology studies in the context of colorectal carcinogenesis. This type of model allows a better understanding of the etiology of CRC and thus the implementation of better prevention strategies.

The simultaneous use of these six isogenic cells has many advantages. First, these cells do not contain multiple genetic changes and have not acquired tumorigenic properties, which makes them a relevant model to study early stages of colorectal carcinogenesis : this point is critical

for environmental carcinogenesis studies. On the one side, the most commonly used colonic cell models are Caco-2, HT29, LS-174T, HCT116 that derived from adenocarcinoma of the colonic epithelium. This characteristic is limiting when one wishes to develop studies on the early stages of carcinogenesis. On the other side, normal APC^{+/+} and APC^{Min/+} preneoplastic cells allow comparative studies only in the early stages of carcinogenesis related to *Apc* gene (Bastide et al., 2015b; Surya et al., 2016). Moreover, these cells are derived from mice unlike HCECs, which are of human origin. The six isogenic lines, CT, CTA, CTR, CTP, CTRPA and CTRPAT, allow the study of both the early stages and the promotion and progression of CRC.

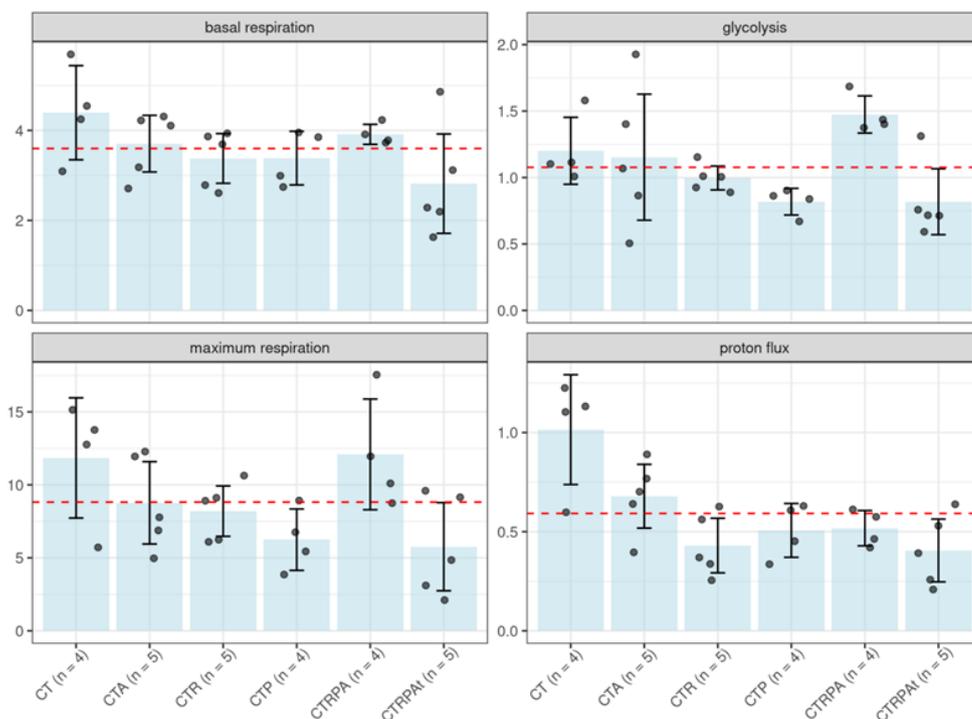
HCECs have proven to be a relevant model for the study of the impact of cytolethal distension toxin (CDT) on colorectal carcinogenesis. Pathogenic *Escherichia coli* possess a variety of virulent factors, among which CDT, which induce DNA double-strand breaks, cell cycle arrest and apoptosis in a wide range of mammalian cells. A comparative study was led, with normal CT cell lines and simply genetically modified CTA, CTR and CTP cell lines following acute and chronic exposure to CDT. CDT did not impact the initiation step, but could have promoting effects in CTA, CTR and CTP cells, involving different mechanisms depending on the genetic alterations associated with CRC (Graillet et al., 2016).

Furthermore, the impact of dietary contaminants on colorectal carcinogenesis was studied with the six isogenic HCECs lines. We have recently studied the 4-hydroxynonenal HNE, a major lipid peroxidation product neoformed during digestion, and pesticides in this context. After acute exposure, we did not observe any cytotoxicity or major DNA damage. However, long-term exposure to pesticides alone and in mixture with HNE induced clonogenic transformation in normal HCECs, as well as in cells representing later stages of carcinogenesis. It was associated with genotoxic and non-genomic mechanisms (cell growth, metabolic reprogramming, cell mobility and epithelial-mesenchymal transition) depending on genetic susceptibility. This study demonstrated a potential initiating and promoting effect of food contaminants on CRC after long-term exposure (Arnaud et al., 2021). This demonstrates the relevance of this model in the study of gene-environment interaction. These results should be confirmed *in vivo*. From this point of view, the use of rodents seems limited, because of both the large number of animals used and their sensitivity to chemical stresses, and because of the weakness of the mechanistic information obtained. The zebrafish model appears to be a model of choice for studying the early stages of carcinogenesis induced by low dose chemical pollutants (Imran et al., 2018; Lu et al., 2017; Podechard et al., 2017; Raby et al., 2020) The zebrafish is a relevant model in toxicology and from a genetic point of view, it is easy to generate mutations. Thus, a zebrafish model mimicking CRC mutations could allow to conduct this type of *in vivo* studies.

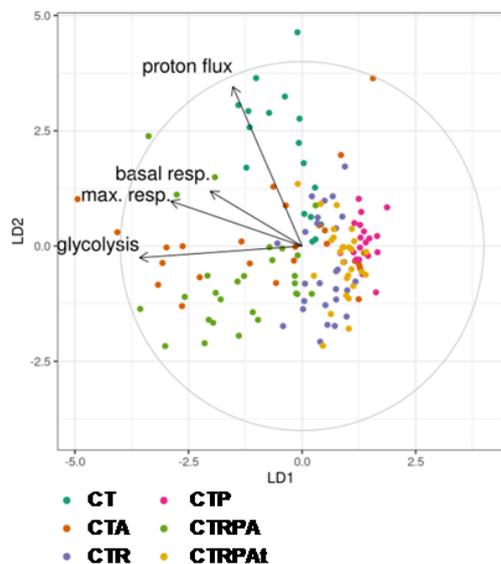
In conclusion, the present study compared different colonic epithelial lines derived from an immortalised healthy line HCEC CT. We provided data about major hallmarks of cancer. As they present the major genetic alterations linked to colorectal cancer, they are of real interest to be used together to study the impact of chemical pollutants on colorectal carcinogenesis, in order to better characterise gene-environment interactions. This mechanistic information sheds light on our knowledge of the genome-exposome links in the cause of colorectal cancers.

Supplementary datas

A

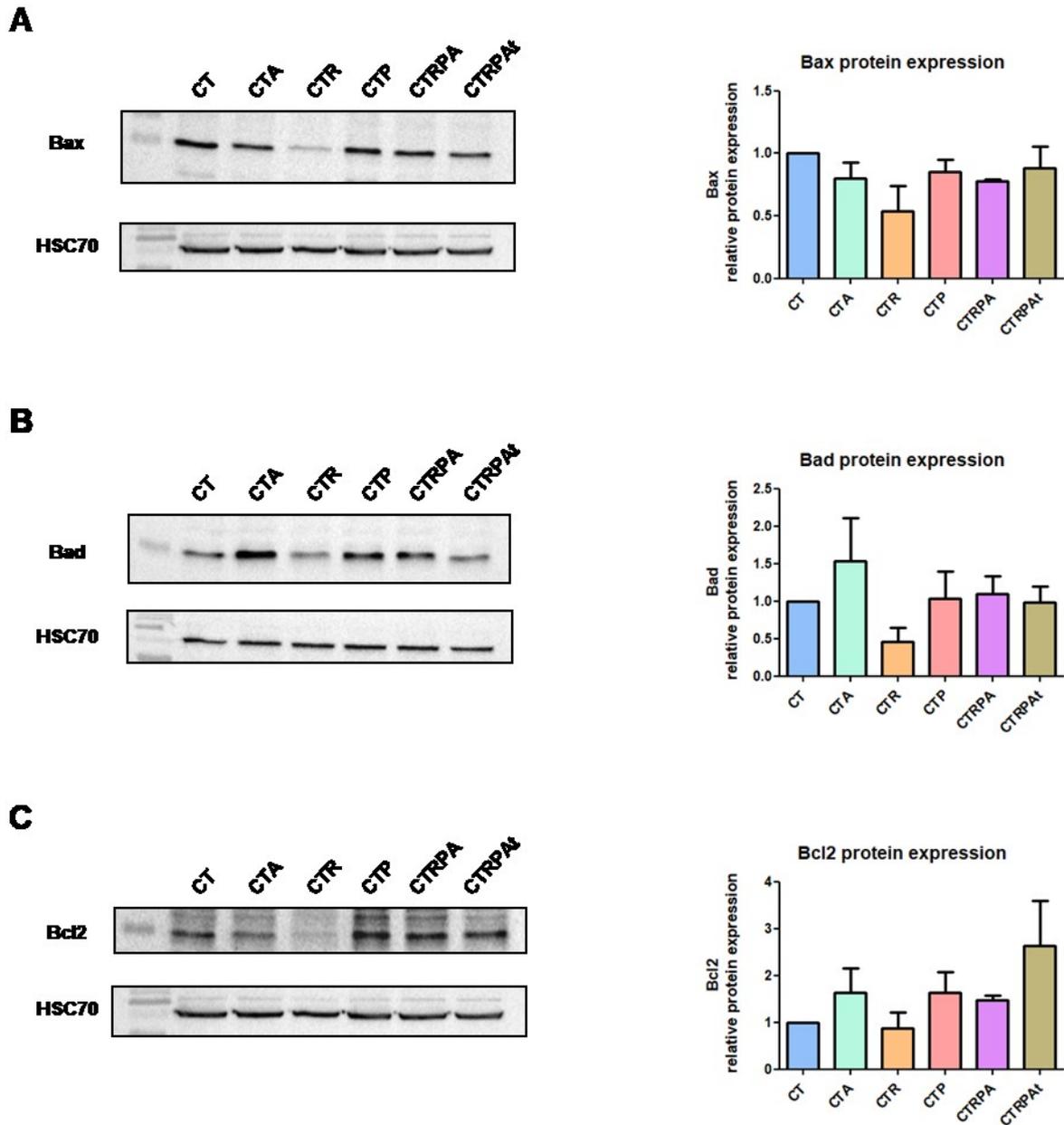


B

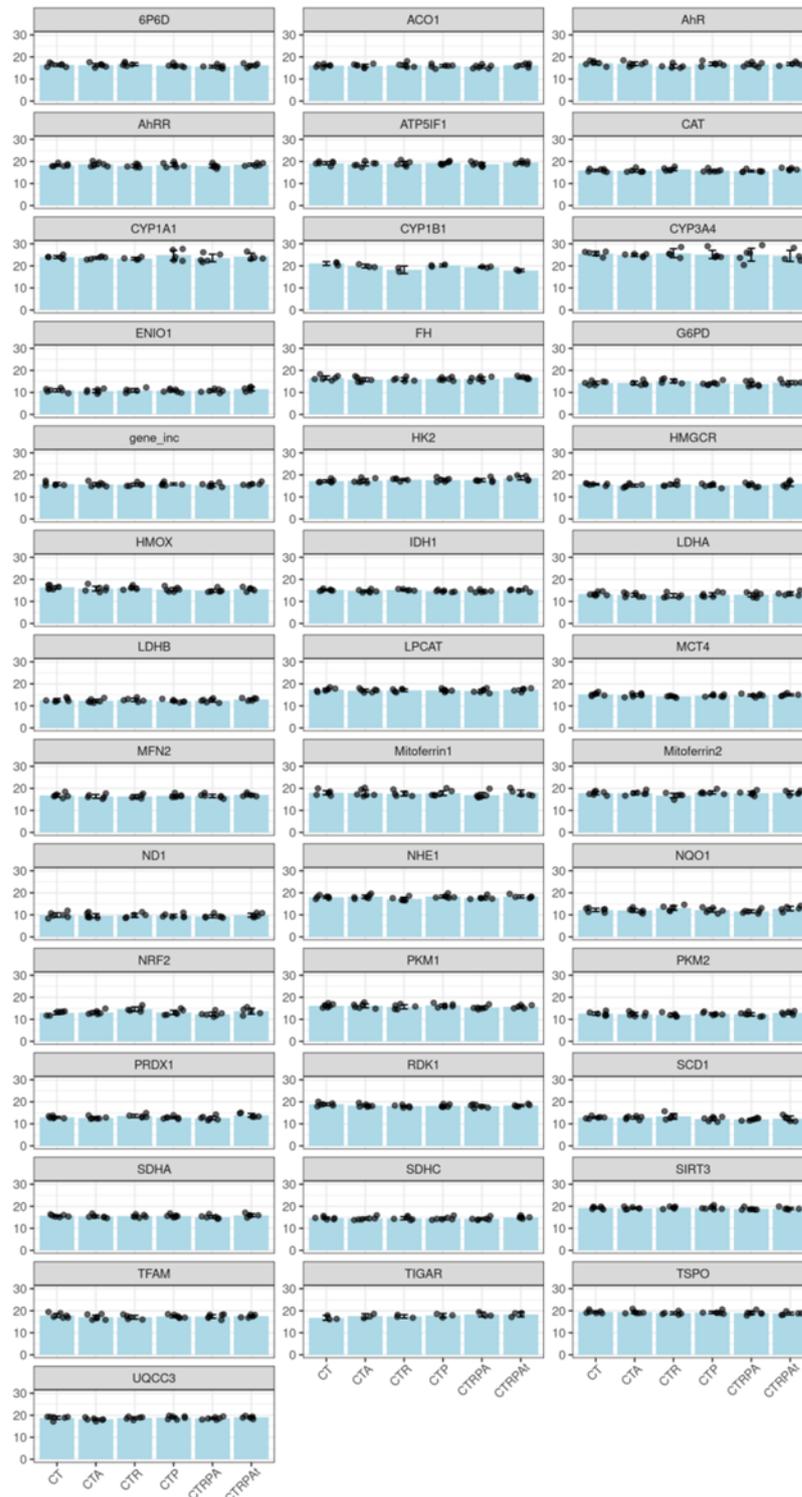


	glyco	maxResp	protons
CT-CTA	0,999	0,745	0,122
CT-CTR	0,919	0,571	0,001
CT-CTP	0,487	0,193	0,010
CT-CTRPA	0,73	0,999	0,011
CT-CTRPAI	0,434	0,1	0,001
CTA-CTR	0,917	0,999	0,323
CTA-CTP	0,459	0,838	0,742
CTA-CTRPA	0,647	0,662	0,793
CTA-CTRPAI	0,399	0,668	0,216
CTR-CTP	0,938	0,941	0,99
CTR-CTRPA	0,175	0,483	0,974
CTR-CTRPAI	0,921	0,831	0,999
CTP-CTRPAI	0,041	0,49	0,999
CTP-CTRPAI	1,000	0,999	0,954
CTRPA-CTRPAI	0,027	0,073	0,917

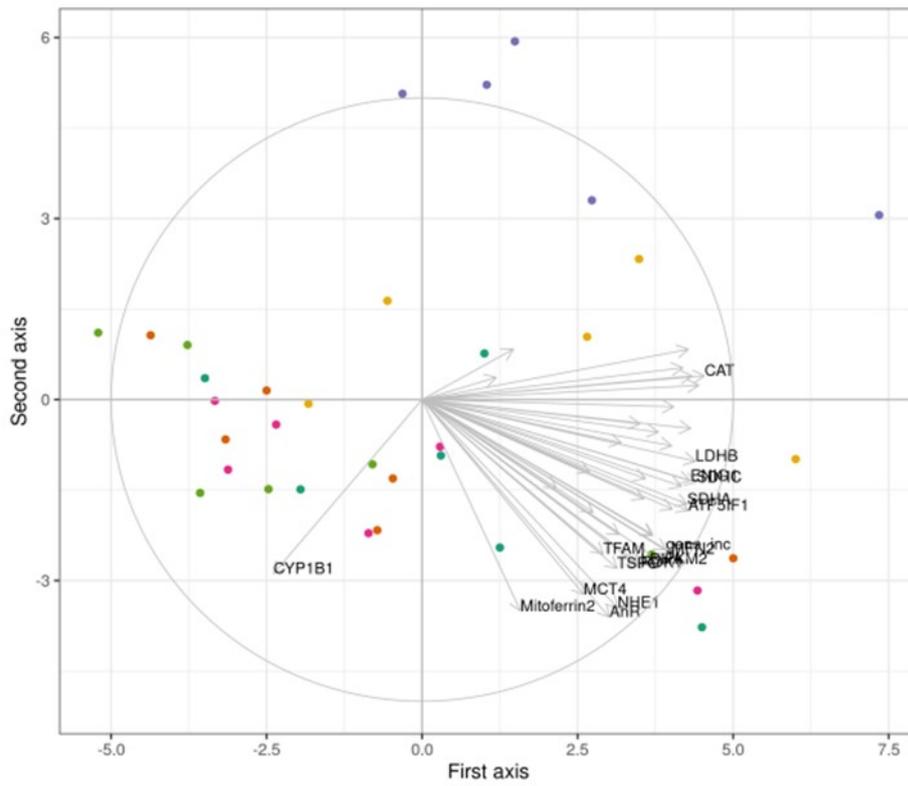
Supplementary Fig 1. A) Mitochondrial respiration and glycolytic functions monitored by Oxygen consumption rate (OCR) and extracellular acidification rate (ECAR) assessed with Seahorse XFCeIl Mitostress test and **B)** multivariate statistical analysis (table represented p.values correspondant to each condition. All values are from at least three independent experiments.



Supplementary Fig 2. Protein level expression assessed by western-blotting and densitometric analysis for pro-apoptotic **Bax** (A) and **Bad** (B) and anti-apoptotic **Bcl2** (C). All values are presented as means \pm SEM (standard error of mean) from at least three independent experiments. No significant differences was found with Multiple comparisons performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Dunnett's post-test using GraphPad Prism 5 software.

A

Supplementary Fig 3. mRNA expression of different genes involved in energetic metabolism, mitochondrial and pH homeostasis or oxidative stress response analysed by RT-qPCR. All values are presented as means \pm SEM (standard error of mean) from at least three independent experiments.



Supplementary Fig 4. Multivariate analysis of genes expression performed with Partial least squares discriminant analysis (PLS-DA).

3) Etude de l'impact du Benzo[a]pyrène, du Pyrène et de la dioxine TCDD *in vitro* avec les HECES

Nous avons analysé la capacité des cellules HECES à pousser sans ancrage (hallamark du cancer) avec le test de clonogénicité en soft agar suite à une exposition chronique de deux semaines au Benzo[a]pyrène (B[a]P) 50 nM, du Pyrène (PYR) 500 nM et de la dioxine (TCDD) 10nM seuls ou en mélange (Mix) (Figure 37). Les cellules non tumorales ne poussent pas sans ancrage et ne poussent donc pas dans l'agar. Tandis, que les cellules cancéreuses poussent sans ancrage et ainsi dans l'agar. Quinze jours après l'ensemencement dans l'agar le nombre de colonies formées est déterminé. Nous avons observé une augmentation du nombre de clones suite à une exposition chronique au PYR et au Mix chez les cellules normale CT. De plus, les polluants ont induit une augmentation du nombre de clones chez les autres lignées cellulaires CTA, CTR, CTP, CTRAPet CTRPAT. Le pyrène seul et le mélange des polluants semble initier la cancérogenèse colorectale et les polluants seuls ou en mélange favorisent la progression et la promotion du CCR.

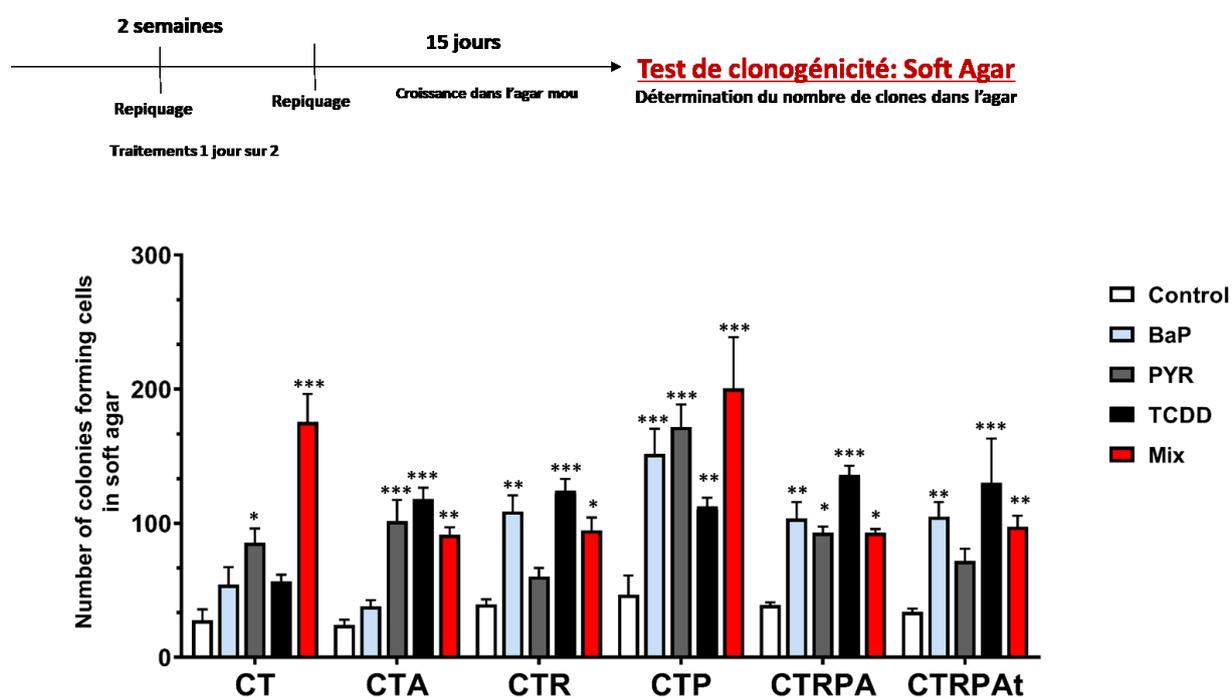


Figure 37 : Clonogenicity after long-term (2 weeks) exposure of HCEC cells to pollutants. After exposure to pollutants, HECES were cultured in soft agar and the colonies are quantified after 15 days. Results represent the mean \pm SEM of six independent experiments; statistical differences were analysed by post-hoc tests of a 2-way ANOVA model between control and treated cells (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

II Etude 2 : Etude de l'impact de HNE et des pesticides dans la cancérogenèse colorectale en fonction de la susceptibilité génétique

1) Résumé

Le cancer colorectal (CCR) est un problème de santé publique majeur avec près de deux millions de personnes atteintes dans le monde en 2020 (Sung et al., 2021). Les facteurs génétiques jouent un rôle clé dans cette pathologie avec la mutation initiatrice *APC* (Adenomatous polyposis coli), l'activation du proto oncogène *KRAS* (Kristen-ras) et la perte du suppresseur de tumeur *TP53* (Tumor protein 53) (Smith et al., 2002). De plus, l'environnement, en particulier l'alimentation, joue un rôle majeur dans le développement de CCR (Brenner and Chen, 2018; Murphy et al., 2019; Sung et al., 2021). Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à deux contaminants alimentaires associés au régime « western diet » : le 4-hydroxynonanal (HNE) et un mélange de pesticides. Le 4-hydroxynonanal (HNE) est un produit majeur de lipoperoxydation néoformé durant la digestion, notamment après l'ingestion de fer héminique provenant de la viande rouge et des acides gras oméga 6. Le mélange de cinq pesticides choisi, fait partie des mélanges de pesticides auxquels les français ont été les plus exposés *via* leur alimentation en 2006 (Crépet et al., 2013a, 2013b).

L'objectif de cette étude était de mieux comprendre l'impact de l'environnement sur le CCR, à travers un mélange complexe de contaminants alimentaires en fonction de la susceptibilité génétique. Nous avons, pour cela, utilisé un modèle de lignées cellulaires coliques humaines présentant des susceptibilités génétiques au cancer colorectal : les cellules épithéliales coliques non transformées (HCEC) et leurs cinq lignées isogoniques avec la perte d'*APC* (Adenomatous polyposis coli) et de *TP53* (Tumor protein 53) et/ou l'expression ectopique de *KRAS* muté (Kristen-ras) (Smith et al., 2002), décrites dans ma première étude. Ces six lignées miment, de façon simplifiée, les différentes étapes de la cancérogenèse colorectale : initiation, promotion et progression. Elles ont été exposées de façon aiguë ou à long terme à 1 μ M de HNE et/ou à 10 μ M de pesticides.

Nos résultats montrent qu'une exposition aiguë aux contaminants n'a pas induit de cytotoxicité et de dommages à l'ADN majeur. En revanche, une exposition long terme (trois

semaines de traitements quotidiens) a induit une transformation tumorale dans les lignées HCECs normales mais aussi dans les lignées représentant les stades avancés de la cancérogénèse. Elle était associée à des mécanismes cellulaires génotoxiques et non génotoxiques : croissance cellulaire, reprogrammation du métabolisme énergétique, mobilité cellulaire et transition épithélio-mésenchymateuse, en fonction de la susceptibilité génétique. Cette étude a montré un potentiel effet initiateur et promoteur des contaminants alimentaires sur le CCR suite à une exposition long terme. Elle a aussi démontré que ces contaminants pouvaient accélérer la cancérogénèse lors de la survenue des mutations des oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeurs (Figure 38).

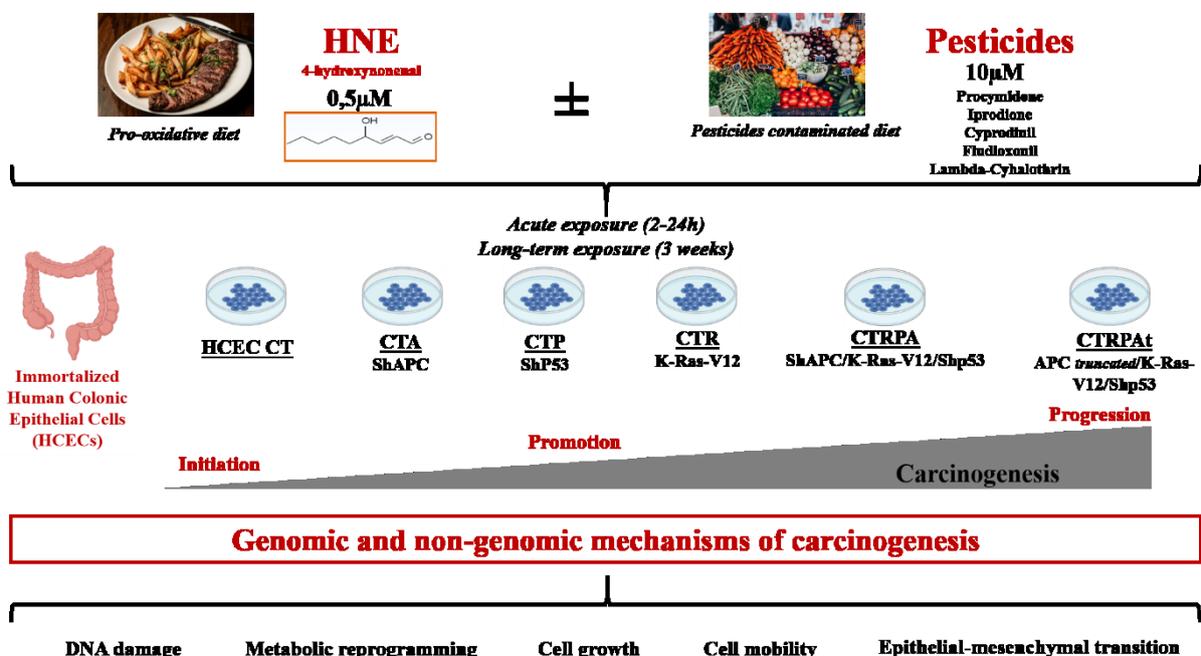


Figure 38 : Etude de l'impact de HNE et des pesticides dans la cancérogénèse colorectale en fonction de la susceptibilité génétique.

2) Présentation du mélange de pesticides

Dans cette étude, nous avons étudié l'impact d'un mélange de cinq pesticides (Tableau 2). En effet, il existe tellement de substances actives pesticides (plus de 1400 autorisées en Europe) auxquelles nous sommes exposés que nous avons choisi de nous focaliser sur un mélange-type, pertinent de l'exposition humaine. Ainsi, nous nous sommes basées sur une étude menée par l'Agence française de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) (Crépet et al., 2013a, 2013b) et choisi l'un des mélanges auquel la population française a été le plus exposée par l'alimentation en 2006.. Le mélange est composé de cinq pesticides et nous avons respecté les mêmes proportions que l'exposition alimentaire française : quatre fongicides (Procymidone, Iprodione, Cyprodinil et Fludioxonil) et un insecticide (Lambda-Cyhalothrine).

Pesticide	Proportion	Famille	Famille chimique		Références bibliographiques
Procymidone	42%	Fongicide	Dicarboximide	Interdit en 2008 Perturbateur endocrinien Antagoniste du récepteur au androgène (AR) Induit la peroxydation lipidique <i>via</i> la production de ROS	Blystone <i>et al</i> Toxicol.Lett 2007 Ostby <i>et al</i> Toxicol.Ind.Health 1999 Radice <i>et al</i> Aquat. Toxicol. 2001
Iprodione	33%	Fongicide	Dicarboximide	Retrait des produits à base d'Iprodione en 2018 Perturbateur endocrinien Induit la peroxydation lipidique <i>via</i> la production de ROS	Blystone <i>et al</i> Toxicol.Lett 2007 Edlich <i>et al</i> Traget Site of Fungicide Action 2018 Radice <i>et al</i> toxicology 1998 Radice <i>et al</i> Aquat. Toxicol. 2001
Cyprodinil	15%	Fongicide	Pyrimidiamine	Activateur du récepteur AhR induction du CYP1A1	Go <i>et al</i> Toxicol. Appl. Pharmacol 2015 Fang <i>et al</i> Toxicology 2013 Medjakovic <i>et al</i> Environ. Toxicol 2014
Fludioxonil	9%	Fongicide	Phenylpyrrole	Potentiel activateur des récepteurs AhR AR et ER	Medjakovic <i>et al</i> Environ. Toxicol 2014
Lambda-Cyhalothrin	1%	Insecticide	Synthetic Pyrethroids	Perturbateur endocrinien: Xenoestrogène Induit du stress oxydatif	Hamadi <i>et al</i> Experimental and toxicologic Pathology 2008 Meirong <i>et al</i> Environmental Toxicology and Chemistry 2008

Tableau 2 : Mélange des cinq pesticides auxquels la population française est exposée. Ce tableau indique les proportions respectives de chaque pesticide dans la composition du mélange, la famille de pesticides à laquelle ils appartiennent, la famille chimique, les informations réglementaires et effets biologiques et les références bibliographiques.

3) Manuscrit sous forme de publication dans une revue à comité de lecture (Cancers, sous presse)

Article

Short-Term and Long-Term Carcinogenic Effects of Food Contaminants (4-Hydroxynonenal and Pesticides) on Colorectal Human Cells: Involvement of Genotoxic and Non-Genomic Mechanisms

Liana C. Arnaud ¹, Thierry Gauthier ¹, Augustin Le Naour ¹, Saleha Hashim ¹, Nathalie Naud ¹, Jerry W. Shay ², Fabrice H. Pierre ¹, Elisa Boutet-Robinet ^{1,†} and Laurence Huc ^{1,*,†}

Citation: Arnaud, L.C.; Gauthier, T.; Naour, A.L.; Hashim, S.; Naud, N.; Shay, J.W.; Pierre, F.H.; Boutet-Robinet, E.; Huc, L. Short-Term and Long-Term Carcinogenic Effects of Food Contaminants (4-Hydroxynonenal and Pesticides) on Colorectal Human Cells: Involvement of Genotoxic and Non-Genomic Mechanisms. *Cancers* **2021**, *13*, 4337. <https://doi.org/10.3390/cancers13174337>

Academic Editor: Nicole M. Gatto

Received: 5 July 2021

Accepted: 19 August 2021

Published: 27 August 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

¹ Toxalim (Research Centre in Food Toxicology), University of Toulouse, INRAE, ENVT, INP-Purpan, UPS, 31027 Toulouse, France; Liana.Arnaud@inrae.fr (L.C.A.); Thierry.Gauthier@inrae.fr (T.G.); augustin.le-naour@inrae.fr (A.L.N.); saleha.hashim@inrae.fr (S.H.); nathalie.naud.31@inrae.fr (N.N.); Fabrice.Pierre@inrae.fr (F.H.P.); elisa.boutet@univ-tlse3.fr (E.B.-R.)

² Southwestern Medical Center Dallas, Department of Cell Biology, The University of Texas, Dallas, TX 75390, USA; Jerry.Shay@UTSouthwestern.edu

* Correspondence: laurence.huc@inrae.fr; Tel.: +00-335-82-06-63-20

† These authors have equally contributed to this paper.

Simple Summary: One's environment, including diet, play a major role in the occurrence and the development of colorectal cancer (CRC). In this study, we are interested in two western diet-associated food contaminants: 4-hydroxynonenal (HNE), a major lipid peroxidation product neoformed during digestion, and a mixture of pesticides to which we are commonly exposed to via fruit and vegetable consumption. The aim of this study was to analyse the impact of acute and long-term exposure to these contaminants, alone or in combination, on colorectal carcinogenesis. We used *in vitro* models of human colonic cells, either exhibiting or not different genetic susceptibilities to CRC. After acute exposure, we did not observe major alteration. However, long-term exposure to contaminants induce malignant transformation with different cellular mechanisms, depending on genetic susceptibility and contaminants alone or in mixtures.

Abstract: To investigate environmental impacts upon colorectal carcinogenesis (CRC) by diet, we assessed two western diet food contaminants: 4-hydroxynonenal (HNE), a major lipid peroxidation product neoformed during digestion, and a mixture of pesticides. We used human colonic cell lines ectopically eliciting varied genetic susceptibilities to CRC: the non-transformed human epithelial colonic cells (HCECs) and their five isogenic cell lines with the loss of *APC* (Adenomatous polyposis coli) and *TP53* (Tumor protein 53) and/or ectopic expression of mutated *KRAS* (Kristen-ras). These cell lines have been exposed for either for a short time (2–24 h) or for a long period (3 weeks) to 1 μ M HNE and/or 10 μ M pesticides. After acute exposure, we did not observe any cytotoxicity or major DNA damage. However, long-term exposure to pesticides alone and in mixture with HNE induced clonogenic transformation in normal HCECs, as well as in cells representing later stages of carcinogenesis. It was associated with genotoxic and non-genomic mechanisms (cell growth, metabolic reprogramming, cell mobility and epithelial-mesenchymal transition) depending on genetic susceptibility. This study demonstrated a potential initiating and promoting effect of food contaminants on CRC after long-term exposure. It supports that these contaminants can accelerate carcinogenesis when mutations in oncogenes or tumor suppressor genes occur.

Keywords: Colorectal carcinogenesis; pesticides; 4-hydroxynonenal; genotoxicity; non genomic carcinogenesis; genetic susceptibility

survival and migration [21] in mammalian cells and also activated ER (estrogen receptor) signalling [22]. Cyprodinil is an activator of the Aryl hydrocarbon receptor (AhR) and induces Ah target genes such as cytochrome P450 (CYP) 1A1 in ovarian granulosa cells [23,24]. Fludioxonil is a phenylpyrrole fungicide that is a potential activator of AhR, AR and ER [24]. Cyprodinil and Fludioxonil are able to induce neurotoxicity in human neuronal and glial cell lines *in vitro*. Lambda-Cyhalothrin is a synthetic pyrethroid (SP) [25]. Several studies show that SPs represent a class of endocrine disrupting chemicals (EDCs) inducing a dysregulation of biosynthesis, metabolism or action of hormones [26,27]. Furthermore, a childhood exposure to pyrethroid insecticides is associated with a decrease of neurocognitive abilities in children at six years [28].

However, the scientific literature does not cover the areas of multiple pesticide exposure and health consequences. *In vivo* studies on mixtures of pesticides have shown that dietary exposure may promote the occurrence of chronic diseases, but no mechanistic results are available to date [29,30]. The occurrence of CRC results from the interplay of genetic, environmental and microenvironmental factors [31]. In this study, we investigated if genetic alterations modify cellular responses to food contaminants. For this purpose, we used isogenic human epithelial colonic cells (HCECs) exposed to an original and never tested combination of food contaminants, HNE and /or the mixture of pesticides. These cells are non-malignant. They were immortalized by cyclin-dependent kinase 4 (Cdk4) and the human ribonucleoprotein enzyme telomerase (hTERT). HCEC have no multiple cytogenetic changes [32]. By this process, HCECs do not acquire tumorigenic properties and have a normal karyotype. Five cell lines have been experimentally obtained from the non-transformed HCECs (CT cells): three of them mimic the driver mutation genes found in CRC: loss of *APC* (CTA cells) and *TP53* (CTP cells) and ectopic expression of mutant *KRAS* (CTR cells) [3]. One contains and expresses the three driver mutations (CTRPA cells) and another one has these three alterations and the ectopic expression of the 1309-aa truncated form of *APC* (CTRPA_t cells), the most frequently found form in human sporadic CRC. The six cell lines mimic the different steps of CRC, initiation (CT cells), promotion (CTA, CTR and CTP cells) and progression (CTRPA and CTRPA_t cells) and constitute an integrative tool to study the impact of chemicals according to the stages of human colorectal carcinogenesis and genetic predisposition [33].

Previous studies separately analysed the impact of HNE [10] and this mixture of pesticides [13] at high concentrations (HNE 40 μ M and pesticides 100 μ M). Here we analysed the impacts of long-term exposure to lower concentrations of HNE (0.5 μ M) and to a mixture of pesticides (10 μ M) on these six cell lines and analysed the acquisition of cancer hallmarks potential. We conducted an original mechanistic toxicological study on the effects of a mixture of pesticides and a neoformed compound during digestion in colorectal carcinogenesis. This study allows a better understanding of the impact of environment through a complex mixture of food contaminants relative to genetic susceptibility to CRC.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals and Supplements for Cell-Culture-Media

The 4-hydroxynonenal (HNE) was provided by Clinisciences (Nanterre, France). Fetal Bovine Serum (FBS) provided by ThermoFisher (Eindhoven, Netherlands). Puromycin, hydromycin and zeocin were provided by Fisher Scientific (Hampton, NH, USA). Epidermal growth factor (EGF), hydrocortisone, insulin, transferrin, sodium selenite (5 nM) and gentamycin sulfate (5 μ g/mL), DMSO (dimethylsulfoxide), procymidone, iprodione, cyprodinil, fludioxonil, lambda-cyhalothrin, methyl methanesulfonate (MMS), Trifluoromethoxy carbonyl cyanide phenylhydrazone (FCCP), rotenone, oligomycin and etoposide were provided by Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Ro 19-8022 was a gift from Hoffman Laroche Ltd. (Basel, Switzerland), and formamidopyrimidine-DNA glycosylase (Fpg) a gift from Serge Boiteux, CNRS, France.

2.2. Antibodies

Anti 53BP1 (Novus Biological, Abingdon, United Kingdom, ref: NB100-304) from rabbit was diluted 1/2000 in PBS containing 3% bovine serum albumin (BSA) and 0.1% Triton X-100 for the detection of 53BP1 nuclear foci. For the detection of γ H2AX nuclear foci, anti γ H2AX (Merck Millipore, Fontenay-sous-Bois, France, ref: 05-636) from mouse was diluted 1/2000 in PBS containing 3% BSA and 0.1% Triton X-100.

Anti-Paxillin (rabbit monoclonal, abcam, ref: ab32084), Phalloidin (for actin staining) (Sigma-Aldrich, ref: P1951), were diluted 1/250 and 1/2500 respectively in PBS containing 3% BSA and 0.1% Triton X-100.

Alexa fluor 568 (spectrum 578/603) from rabbit and 488 (spectrum 490/525) from mouse (ThermoFisher, Eindhoven, Netherlands, ref: A-11011 and A-11001) were diluted 1/800 in PBS containing 3% BSA and 0.1% Triton X-100.

E-Cadherin (1/200), Vimentin (1/1000) and Actin (1/10000) proteins was detected by mouse monoclonal antibody (Abcam, Paris, France, ref: ab1416), rabbit monoclonal antibody (Abcam, Paris, France, ref: ab92547) and mouse monoclonal antibody respectively (Sigma-Aldrich, ref: A5441). Donkey anti-Rabbit IgG (H + L), HRP and Donkey anti-Mouse IgG (H + L) (ThermoFisher, Eindhoven, Netherlands, ref: SA1-200 and SA1-100 respectively) was used as secondary antibody. The secondary antibodies were diluted 1/1000 in TBS/BSA 3%/0.1% Tween.

2.3. Cell Lines and Maintenance

Isogenic human colorectal cell lines (HCECs), generated and provided by Pr Jerry W Shay [32], were maintained on Primaria™ flasks (Dominique Dutscher, Bernolsheim, France) in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37 °C, in 4:1 high-glucose Dulbecco modified Eagle medium/medium 199 supplemented with 2% FBS, epidermal growth factor (EGF 20 ng/mL), hydrocortisone (1 mg/mL), insulin (10 mg/mL), transferrin (2 mg/mL), sodium selenite (5 nM) and gentamycin sulfate (50 µg/mL). In addition, CTA cells were selected by puromycin (1 µg/mL), CTR cells by hygromycin (200 µg/mL) and CTP cells by zeocin (1 mg/mL). Malassez Counting Chamber (Dominique Dutscher, Bernolsheim, France) was used for study the growth of cells.

2.4. Treatments

Cells are exposed to DMSO (1/2000) as control, etoposide (25 nM or 10 µM), MMS or Ro-19-8022 as positive controls of genotoxicity, HNE (0.5 µM in water), pesticides (the total concentration of mixture was 10 µM in DMSO) with the mixture composed of procymidone, iprodione, cyprodinil, fludioxonil and lambda-cyhalothrin (Table 1). The cells are exposed up to 24 h for the acute exposure or daily during 3 weeks with a splitting per week for the long-term exposure.

Table 1. Composition of mixture of pesticides.

Pesticide	Family	Chemical Family	Proportion	Final Concentration
Procymidone	Fungicide	Dicarboximide	42%	4.2 µM
Iprodione	Fungicide	Dicarboximide	33%	3.3 µM
Cyprodinil	Fungicide	Pyrimidiamine	15%	1.5 µM
Fludioxonil	Fungicide	Phenylpyrrole	9%	0.9 µM
Lambda-Cyhalothrin	Insecticide	Synthetic Pyrethroids	1%	0.1 µM

2.5. Viability Assay

Cell viability was first determined using the CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay (Promega) (Madison, Wisconsin, USA) according to the manufacturer's instructions. Cell Titer-Glo[®] determine the number of viable cells based on quantification of ATP level, which signals the presence of metabolically active cells. HCECs were grown on Primaria[™] 96 well plates (8000 cells/well) during 24 h. Then, cells were exposed with the different treatments. Luminescence was read using Infinite 200 PRO reader (TECAN).

The XCelligence[®] system (Ozyme, St Cyr L'Ecole, France) was used according to the manufacturer's instructions (Ozyme). HCECs were seeded on electronic microtiter plates (E-Plate) with 8000 cells/well. After 24 h, when the cell index (CI) was stable, cells were treated with the different treatments. Cell impedance was measured in each well every 1 h for 24 h. Impedance signals were analyzed by an integrated software RTCA Analyzer Version 2.0 (Ozyme, St Cyr L'Ecole, France) and expressed as a CI-value that reflects cell number, cell adhesion and/or cell morphology. Experiments were carried out independently in triplicate.

2.6. Immunofluorescence

Cells were grown on glass slide in 12-well plates (5000 cells/well) for 48 h. After 24 h or 3 weeks of food contaminant treatment, cells were washed with PBS and fixed with 4% of paraformaldehyde for 20 min on ice. Cells were washed with PBS for 5 min then permeabilized with 0.5% Triton X-100 in PBS for 15 min. Cells were blocked with 3% BSA in PBS for 1 h and incubated with primary antibodies anti 53 BP1 (rabbit) and anti γ H2AX (mouse) or anti paxillin (rabbit) and anti-phalloidin for 2 h. After three washes, cells were incubated with secondary antibodies Alexa fluor 568 and Alexa fluor 488 for 1 h and nuclei were labelled with 4,6-diamino-2-phenyl indole (DAPI). Coverslips were mounted with Prolong Gold. Slides were analysed with a confocal laser-scanning microscope (SP8, LEICA, Nanterre, France) equipped with a 40 \times oil immersion objective and using 405, 488 and 565 nm lasers to reveal DAPI, Alexa 488 and Alexa 568, respectively. For the quantification of DNA damage, the images were analysed using ImageJ software and cells were scored positive when containing more than five γ H2AX or 53BP1 foci. For the mobile cell parameters (anchoring points, lamellipodia, filipodia, stress fibers, pseudopods and cortical actin), the analysis of fluorescent confocal images (z-stack, μ M-sized step) was done by blinded visual scoring by two independent experimenters. For this reason, we considered these parameters as semi-quantitative. No statistical analyses were performed on these results and they were described only as a range of effects.

2.7. Comet Assay

The alkaline comet assay was used to detect strand breaks and alkali-labile sites as previously described [34]. To induce DNA damage as products of purine oxidation detectable by formamidopyrimidine-DNA glycosylase (Fpg), defrosted human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) (120 000 cells/mL) were placed on ice and treated with the compound Ro 19-8022 (at 1 mM in PBS) during 2 min 30 sec under visible light (1000 W-halogen). Ro 19-8022 plus visible light exposure is an appropriate positive control for the Fpg-modified comet assay [35]. Cells were then pelleted for 10 min at 200 \times g at 4 $^{\circ}$ C. Briefly, trypsinized HCECs were embedded in 0.7% low melting point agarose and deposit on Gelbond[®] (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) prior to lysis and electrophoresis. A parallel digestion with Fpg enzyme allowing the detection of Fpg-sensitive sites was performed, as described [34]. Fifty cells per deposit and two deposits per sample were analysed. The extent of DNA damage was evaluated for each cell by measuring the intensity of all tail pixels divided by the total intensity of all pixels in the head and tail of the comet. The median of these 100 values was calculated and named % tail DNA. The Net level of Fpg-sensitive sites (% Tail DNA) was obtained for each condition by subtracting the damage (% Tail DNA) obtained in the absence of Fpg from Fpg-exposed comets

("+Fpg"—"–Fpg" = Net Fpg). This Net Fpg level represents mainly oxidized bases. HCEC cells and PBMC were treated with methyl methanesulfonate (MMS) to induce DNA damage. MMS is a positive control to the experiment.

2.8. Western Blot Analysis

Cells were washed in ice-cold PBS, scrapped and pelleted by centrifugation. The whole lysates were collected in electrophoresis sample buffer containing 50 mM Tris-Base/150 mM NaCl (pH 7.5), 1% Triton X100, 2% sodium deoxycholate, and 2% sodium dodecyl sulfate. Lysates were further homogenized by sonication on ice and heated at 100 °C for 5 min. Protein concentrations were measured by DC™ Protein Assay (BIO-RAD, Marnes La Coquette, France). Proteins (10 µg/well) were separated by SDS-PAGE and blots were transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were then saturated and incubated with primary antibodies E-cadherin and Vimentin at 4 °C for a night under agitation. Secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase (HRP) enzyme were incubated for 30 min and membranes were revealed using Pierce™ Western Blot Signal Enhancer (ThermoFisher, Eindhoven, Netherlands, ref: 21050) and ChemiDoc™ Touch Imaging System (BIO-RAD, Marnes La Coquette, France). The quantification was realised with Image J software. (Ver. Image J 1 .52a, accessed on 05 July 2021)

2.9. Soft Agar Clonogenicity Assay

In a 6-wells plate coated with a lower layer media containing Noble agar 0.5%, cells were seeded in medium 0.375% Noble agar at 5000 cells per well, in triplicate. After 10 days, colonies were counted in the whole well. Experiments were performed in three independent experiments.

2.10. Seahorse

Cells were grown on Seahorse 96-well plates (24 000 cells/well) for 24 h. Cells were washed and incubated in base medium (Agilent Technologies, Les Ulis, France) at 37 °C for 1 h. Extracellular Acidification Rate (ECAR) and Oxygen Consumption Rate (OCR) were measured in real-time with Glycolysis Stress Test Kit and Mito Stress Test Kit respectively using the Seahorse XFe96 Analyser (Agilent Technologies, Les Ulis, France) following manufacturer's instructions. Data were normalized by protein content that was measured by the DC™ Protein Assay (BIO-RAD, Marnes La Coquette, France).

2.11. Statistical Analysis

For gaussian parameters (continue responses with normal distribution), a two-way analysis of the variance is carried out with contaminants, cell lines and interaction as fixed factors. A Log transformation is applied when Log-Normal distribution is detected on the parameter. Parameters resulting from a counting are fitted with a generalized linear model assuming a negative binomial distribution. Post-hoc tests for pairwise comparisons on contaminants or cell lines are provided without adjusted for multiplicity to preserve the beta-risk level in the context of the study (safety purpose). Statistical significance is set at 5% alpha-risk level (p -value ≤ 0.05). Descriptive summary and graphical representations are provided by contaminants and cell lines using arithmetic mean and standard deviation of the mean on actual values.

The pairwise differences of cell lines at the DMSO level are performed on the observed values. For the other analyses, comparisons of contaminants versus DMSO at a fixed level of the cell line and comparisons of cell lines at a fixed level of contaminant (DMSO excluded), the treatments are carried out on the values focused on the average of DMSO within the respective cell line. These data pre-processing normalizes the effect of contaminants as a variation from the average DMSO of each cell line.

The statistical analysis is summarized in tables in Figure S2.

As complementary analysis, a non-supervised Principal Component Analysis (PCA) was produced to describe the correlation structure of the carcinogenic events. Data analyses were performed using "R: A language and environment for statistical computing" (R Core Team (2016)) and SAS/STAT® software 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA).

3. Results

For this study, we chose a combination of pesticides that includes four fungicides (Procymidone, Iprodione, Cyprodinil and Fludioxonil) and one insecticide (Lambda-Cyhalothrin) (Table 1). This pesticide combination (at 10 µM) was used alone or in mixture with 0.5 µM of HNE (HNE-Pest). Previous studies separately analysed the impact of HNE [10] and this mixture of pesticides [13] at much higher concentrations, 40 µM and 100 µM respectively. The six isogenic HCECs were exposed for 24 h (acute) and for three weeks (long-term treatment), to characterize toxicity and carcinogenic events.

3.1. Acute Viability and DNA Damage of Contaminants in HCECs

We firstly evaluated acute viability after 24 h exposure by measuring the cellular ATP concentration (Figure 1A). We observed differences of cellular ATP levels between cell lines independently of the treatments: CTA, CTP and CTRPA cells have higher level of cellular ATP compared to CT cells. For each cell line taken separately, treatments did not have significant effects (versus control). We also measured cellular impedance to follow in real time the cell index (CI) (Figure 1B). The arbitrary unit CI represents the number of cells, cellular adhesion and shape. The six isogenic HCECs exhibit different CI, reflecting the different morphologies and shapes related to the genetic modification. For each cell line taken separately, treatments did not have significant effects after 24 h. In conclusion, treatments did not affect ATP levels and cellular impedance. We just evidenced some difference between isogenic cells, irrespective of the treatments.

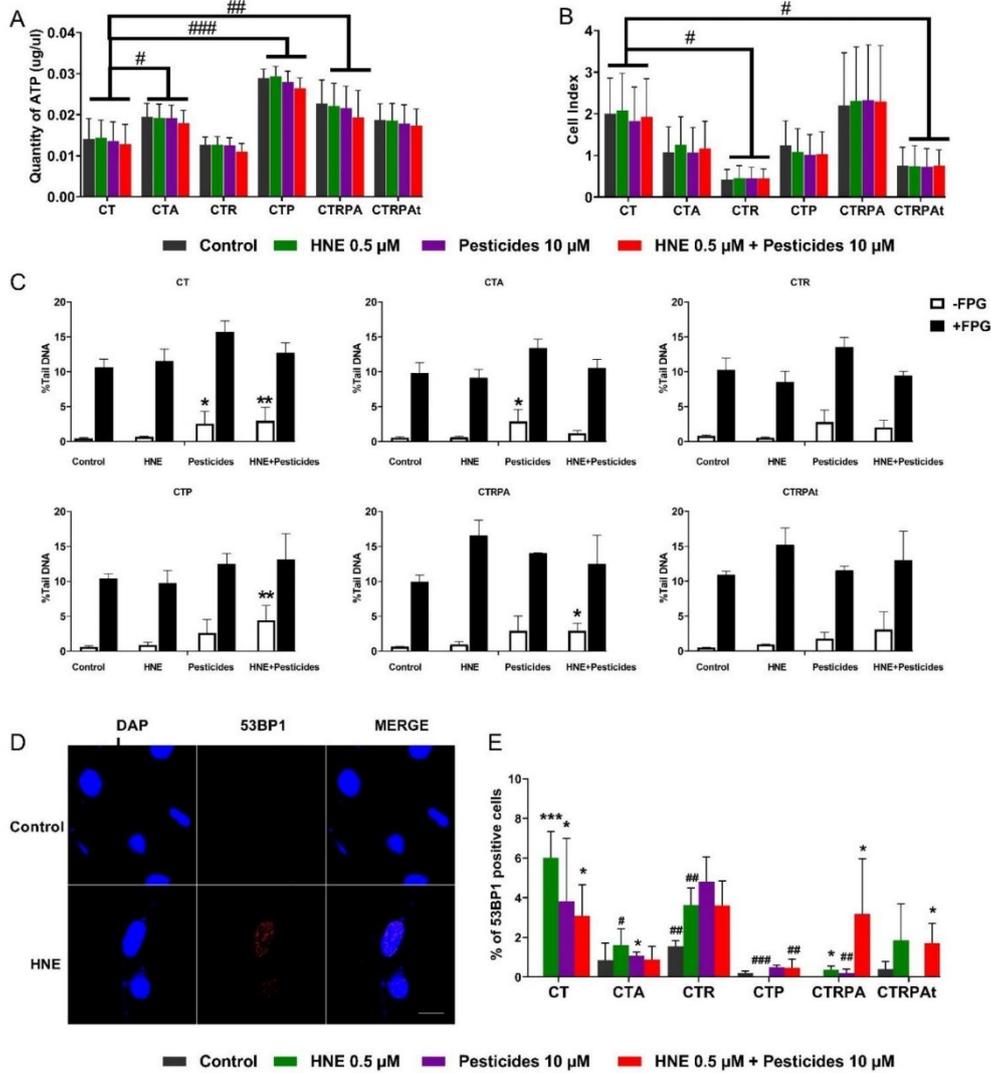


Figure 1. Acute viability and DNA damage induced by contaminants in HCECs. (A) Quantification of ATP levels at 24 h post-treatment using Cell Titer Glo®. (B) Cell index values (Xcelligence, as described in Materials and Methods) at 24 h post-treatment. (C) DNA damage evaluated by alkaline (-Fpg) and Fpg modified comet assay (+Fpg) at 2 h post-treatment in CT, CTA, CTR, CTP, CTRPA and CTRPAi respectively. (D) Representative images of 53BP1 (red) immunostaining in CT cell line in control condition or treated with HNE for 2 h. DNA was stained with DAPI (blue). Scale bar = 10 μm (E) Quantification of HCECs positives for 53BP1 after 2 h of treatment to contaminants. Cells were scored positive when containing more than five 53BP1 foci. No positive cells were observed in the conditions of untreated CT. All the results (A, B, C, E) represent the mean ± SEM of three independent experiments; statistical differences were analysed by post-hoc tests of a 2-way ANOVA model between control and treated cells (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) or between CT cells and others isogenic cell lines (# $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$).

In absence of major impact in cell viability at these concentrations, we were able to assess acute DNA damage, such as DNA breaks and DNA oxidation. For this purpose, we performed alkaline comet assay to detect DNA single- and double-strand breaks.

We also carried out Fpg-comet assay to detect oxidative lesions of DNA, mainly 8-oxoguanine. The addition of FPG enzyme allows enzymatic conversion of 8-oxoguanine into DNA breaks, which is detected by alkaline comet assay. The Fpg-comet assay has been described to be a valid and sensitive marker of oxidative DNA lesion [36,37]. After 2 h of treatment with pesticides, comet assay revealed a significant increase in DNA breaks induced by pesticides in CT and CTA cells. HNE exposure had no effect irrespective of the cell line. The HNE-Pest treatment induced DNA breaks in CT, CTP, CTRPA cells, (Figure 1C). No oxidative DNA damage was induced by the treatments, as the addition of Fpg enzyme did not reveal any Fpg-sensitive sites. MMS and Ro 19-8022 were used as positive controls (Figure S1 A–B).

DNA damage has been also evaluated by immunofluorescence with antibodies directed against 53BP1, which is a biomarker of double-strand breaks (DSB). 53BP1 is recruited to DSB and forms nuclear foci at DNA damaged sites [38] (Figure 1D). We used etoposide as a positive control of DSB (Figure S1C). HNE increased the number of foci in CT, and much less in CTRPA cells. Pesticide treatment increased the number of foci in CT and in CTA cells while HNE-Pest treatment increased the number of foci in CT, CTRPA and CTRPA_t cells (Figure 1E). These results also showed that some cells had different sensitivity towards treatments (interaction cell line × treatment $p = 0.021$, Figure S3). CT cells appeared more sensitive to all the treatments compared to the other cell types.

3.2. Cell Growth and Clonogenicity after a Long-term Exposure to Contaminants in HCECs

We investigated the impact of the contaminants on the HCECs after a long-term exposure. The different cell lines were exposed to HNE, pesticides and HNE-Pest daily for three weeks.

These experiments aimed at characterizing the whole capacity of cells to proliferate and survive and to growth after splitting in the presence of chemicals. Then, the impact of long-term exposure on cell growth during three weeks was evaluated by counting cells at each splitting (each week). Here we present in Figure 2A, the last splitting after three weeks of exposure. The comparison of all the untreated cells showed that CTP and CTRPA cells exhibited a higher number of cells after three weeks. When considering the treatments, we observed no effect of HNE and pesticides alone, whereas the mixture HNE-Pest induced a significant increase in the number of cells in CTA, CTP and CTRPA_t cells.

The capacity of the contaminants to induce malignant transformation (hallmark of cancer) in the six cell lines after a three-week exposure was analysed by the soft agar assay (Figure 2B). Non-malignant cells do not grow without anchoring and are not able to grow in soft agar. However, cancerous cells can acquire the ability to grow without anchoring and thus grow in soft agar. The exposure to pesticides and HNE-Pest induced the increase in the number of colonies in all isogenic cell lines. HNE induced a significant increase only in CTA, CTP and CTRPA cells. The CTA, CTP and CTRPA cells were the cell lines the more responsive to HNE. CTP and CTRPA cells are more responsive to pesticides and CTA cells were more responsive to HNE-Pest, in comparison with the others cell lines.

In the majority of the tested conditions, contaminants are able to transform non-mutated cells (CT cells) and genetically predisposed cells (CTA, CTR, CTP cells) and to increase the tumorigenesis in advanced-stage cells (CTRPA and CTRPA_t cells).

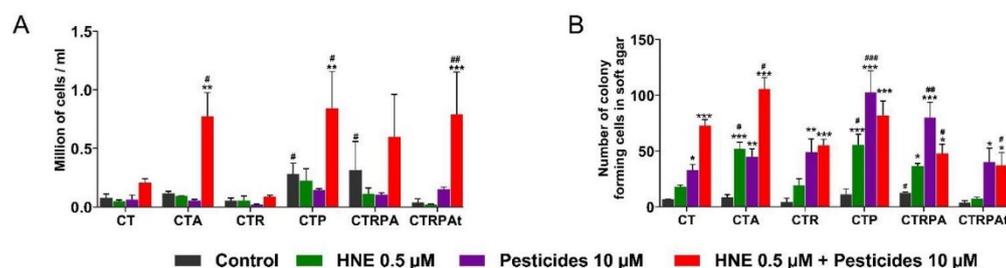


Figure 2. Cell growth and clonogenicity after a three week-exposure to contaminants in HCECs. (A) Cell counting at the end of exposure. (B) After exposure, HCECs were cultured in soft agar and colonies were quantified after 10 days. Results in (A) and (B) panels represent the mean \pm SEM of three independent experiments; statistical differences were analysed by post-hoc tests of a 2-way ANOVA model between control and treated cells (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) or between CT cells and others isogenic HCECs (# $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$).

3.3. Long-term DNA Damage of Contaminants in HCECs

In an attempt to explain the capacity of the contaminants to induce malignant transformation in the different cell lines, DNA damage was analysed after a long-term exposure (3 weeks) to the contaminants by immunofluorescence using antibodies directed against γ H2AX (phosphorylation of H2AX on Ser139) (Figure 3A) and 53BP1 (Figure 3B). They are both biomarkers that signal DNA damage or possibly non-homologous end-joining involving DSB [39]. A long-term exposure treatment with HNE, pesticides and the mixture HNE-Pest induced a significantly increased proportion of γ H2AX positive cells in all the cell lines (Figure 3A).

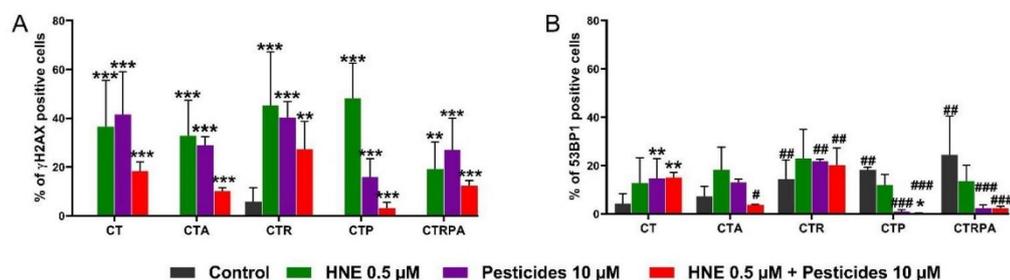


Figure 3. Analysis of DNA damage markers after three weeks exposure in HCECs. (A) Quantification of HCECs positives for γ H2AX. No positive cells were observed in the conditions of untreated CT, CTA, CTP and CTRPA. (B) Quantification of HCECs positives for 53BP1 after a long-term exposure (3 weeks). Results from (A) and (B) panels represent the mean \pm SEM of three independent experiments; statistical differences were analysed by post-hoc tests of a 2-way ANOVA model between control and treated cells (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) or between CT cells and others isogenic HCECs (# $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$).

In untreated cells, the proportion of 53BP1 positive cells was more important for CTP, CTR and CTRPA cells compared to CT cells. The pesticide treatment and the mixture HNE-Pest induced an increase in the proportion of 53BP1 positive cells in CT cells. After exposure to HNE-Pest, the proportion of 53BP1 positive cells was less for CTA, CTP and CTRPA cells compared to CT cells. As 53BP1, detected in nuclear foci, is a more specific DSB signalling biomarker than γ H2AX [40,41], this could explain the higher level a positive

γ H2AX-foci positive cells, which could correspond to signalling of DSB but also replicative stress, or other chromatin modifications.

3.4. Metabolic Reprogramming after Long-term Exposure to Contaminants in HCECs

To evaluate the impact of contaminants on cell energy metabolism, Extracellular Acidification Rate (ECAR) and Oxygen Consumption Rate (OCR) were measured in real-time using Seahorse® technology. Cells were submitted to a MitoStress protocol to challenge the mitochondrial function (Figure 3A).

We observed that HNE-Pest treatment induced an increase in basal OCR and basal ECAR (Figure 4B) in the cell lines altered or mutated for APC function (CTA, CTRPA and CTRPAt cells. Since this treatment also increased the maximal respiratory rate (Figure 4C), it could be assumed that the higher basal respiratory rate was due to a better efficiency of the electron transport chain. Thus, these cells were more sensitive to HNE-Pest and exhibited a higher metabolic level. Moreover, the capacity of ATP production of all cell lines except CT cells, reached a higher level when exposed to HNE-Pest (Figure 4D). This capacity can contribute to the cellular fitness supporting carcinogenic process triggered by the mixture HNE-Pest.

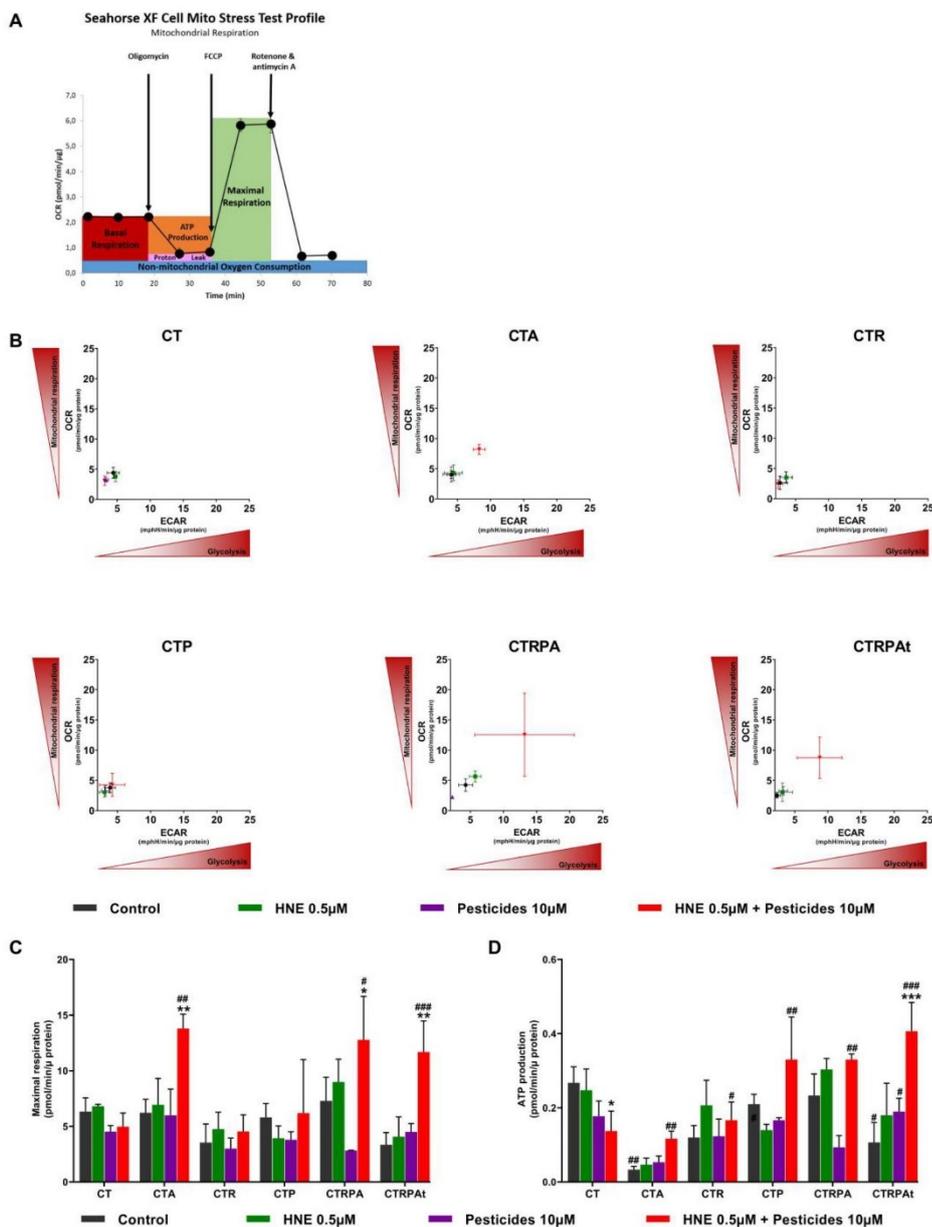


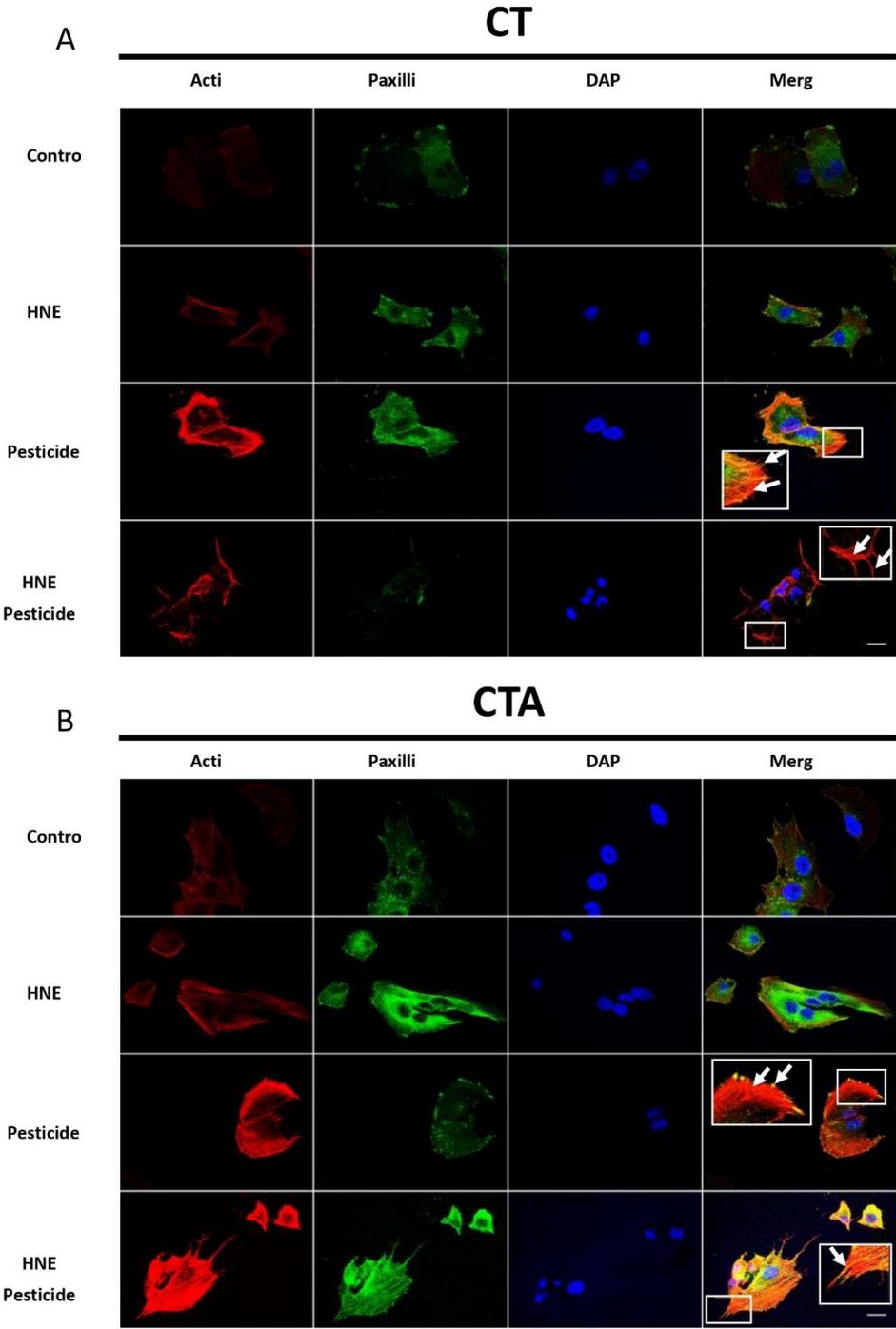
Figure 4. Metabolic reprogramming after three weeks exposure to contaminants in HCECs. (A) Agilent Seahorse XF Cell Mito Stress Test profile, showing the key parameters of mitochondrial function. (B) Quantification of basal Extracellular Acidification Rate (ECAR) and basal Oxygen Consumption Rate (OCR) using Seahorse® after long term-exposure to contaminants in HCECs. (C) Maximal respiratory using Seahorse®. (D) ATP production using Seahorse®. All the results (B, C, D) represent the mean ± SEM of three independent experiments; statistical differences were analysed by post-hoc tests of

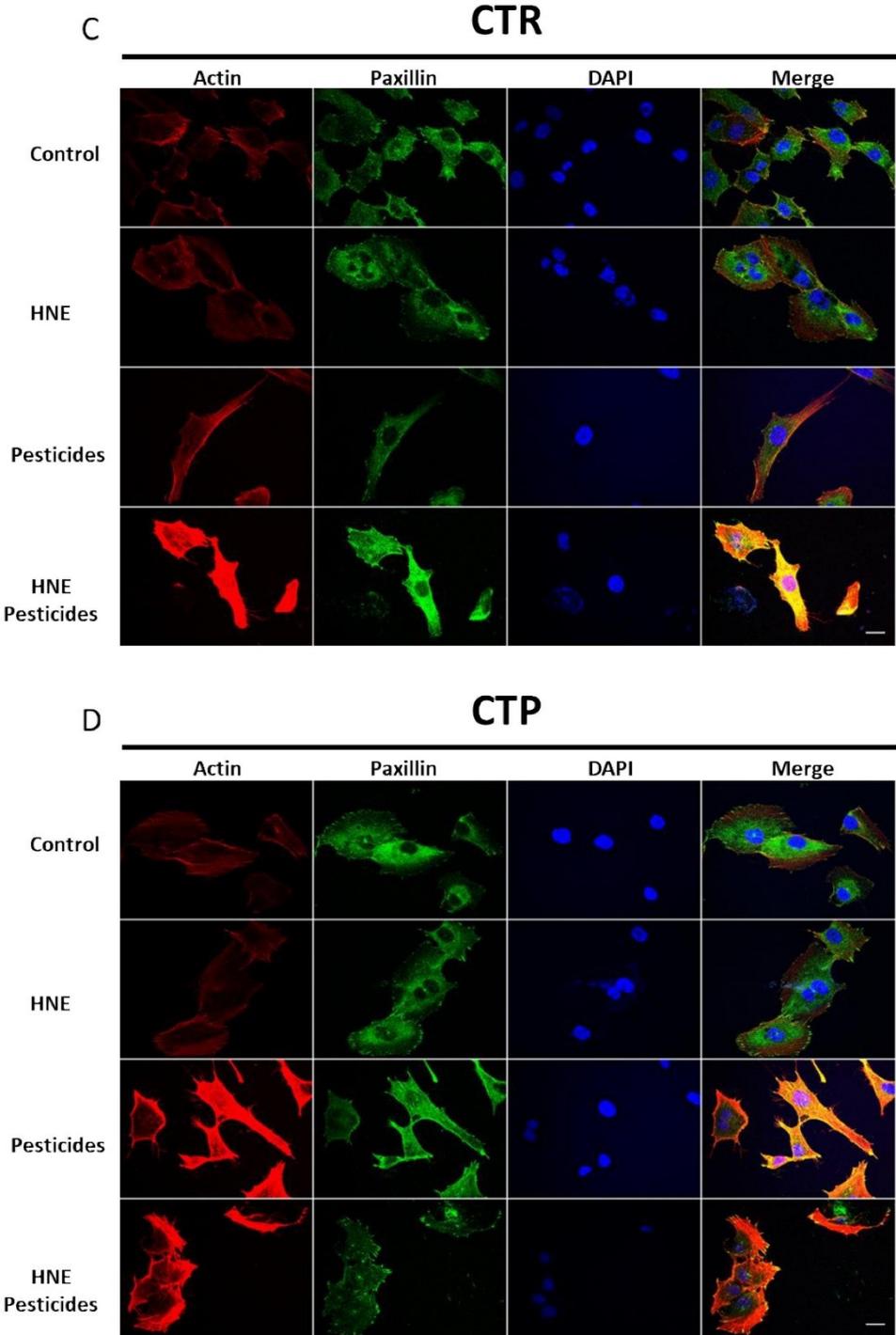
a 2-way ANOVA model between control and treated cells (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) or between HCECs CT cells and others isogenic HCECs (# $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$)

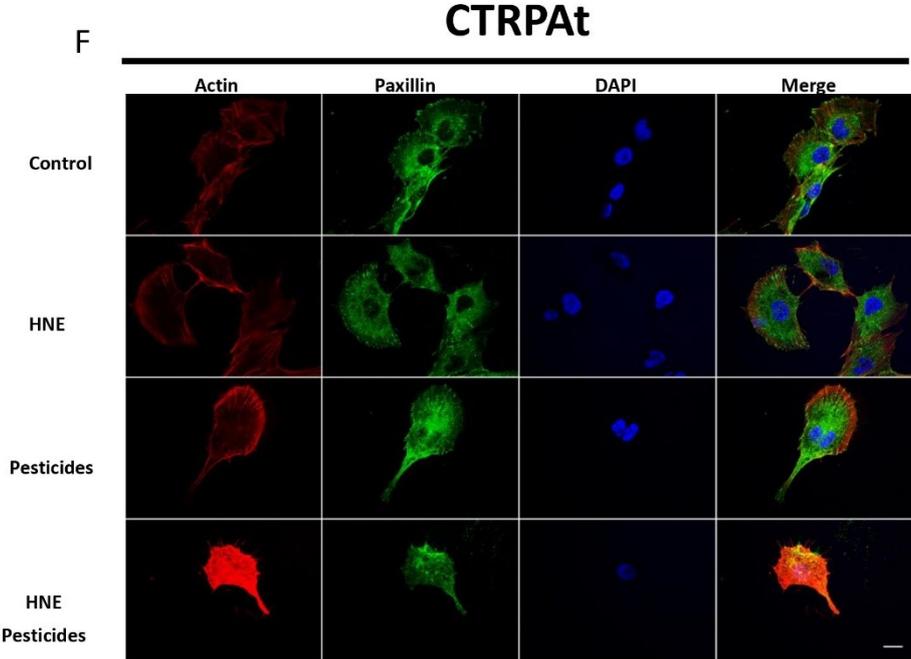
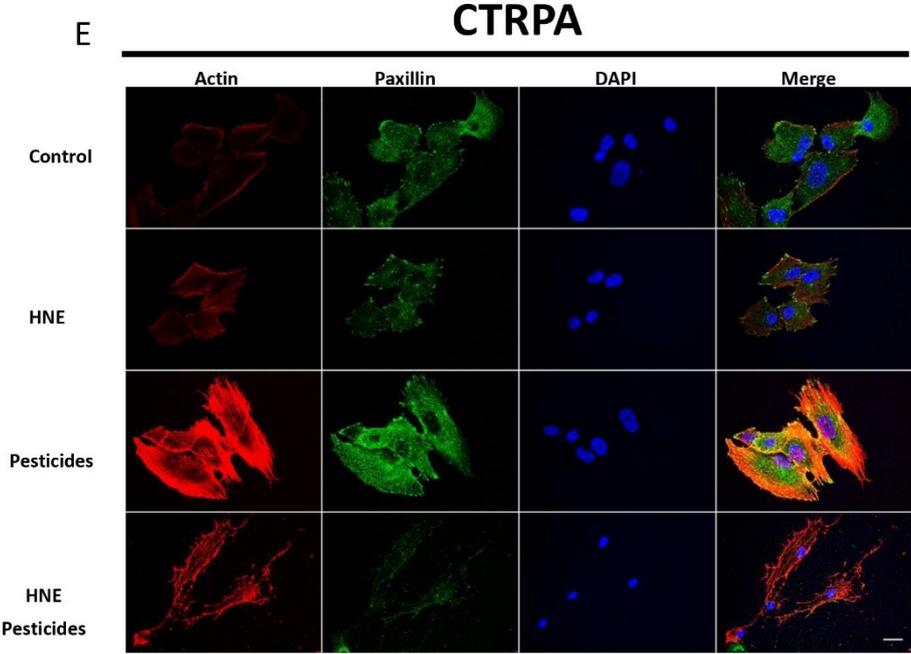
3.5. Cell Morphology after Long-term Exposure to Contaminants in HCECs

In order to evaluate the effects of treatment on cell morphology, actin and paxillin were stained respectively with dye-labelled phalloidin and antibody (Figure 5). We considered the following parameters which are the hallmarks of moving cells: anchoring points, lamellipodia, filipodia, stress fibers, pseudopods and cortical actin. Cells showing at least one of these parameters were considered as moving cells.

In control conditions for the six cell lines, we observed that around 20% of cells were mobile, except for CTRPAt cells exhibiting a slight increase in cell mobility (around 30%). After long-term exposure, HNE had no effect on mobility parameters. The treatment by pesticides and HNE-Pest increased the number of mobile cells in all cell lines except in CTRPAt cells which may be due to their higher basal mobility. The maximal effect was around 60–75% of mobile cells.







G

		Anchoring points	Lamellipodia	Filipodia	Stress fibers	Cortical actin	Pseudopods
CT	Control	-	-	-	-	-	-
	HNE	-	-	-	-	-	-
	Pest	+	+	+	+	+	-
	HNE-Pest	-	+	+	+	+	-
CTA	Control	-	-	-	-	-	-
	HNE	-	-	-	-	+	-
	Pest	+	+	+	+	+	-
	HNE-Pest	+	+	+	+	+	-
CTR	Control	-	-	-	-	-	-
	HNE	-	-	-	-	-	-
	Pest	-	+	+	+	+	-
	HNE-Pest	+	+	+	+	+	+
CTP	Control	-	-	-	-	-	-
	HNE	-	-	-	-	-	-
	Pest	+	+	+	+	+	+
	HNE-Pest	+	+	+	+	+	-
CTRPA	Control	-	-	-	-	-	-
	HNE	-	-	-	-	-	-
	Pest	+	+	+	+	+	-
	HNE-Pest	-	+	+	+	+	-
CTRPA ^t	Control	-	-	-	-	-	-
	HNE	-	-	-	-	+	-
	Pest	-	+	+	-	+	+
	HNE-Pest	+	+	+	+	+	+

Figure 5. Cell morphology after three weeks exposure to contaminants in HCECs. Representative images of Actin (red), Paxillin (green) immunostaining in the six HCECs, showing the colocalization of Actin and Paxillin (MERGE, yellow). DNA was stained with DAPI (blue). Scale bar = 10 μ m. (A) CT cells: for pesticide condition, white arrows indicate filipodia, stress fibers and lamellipodia; for HNE-Pest condition white arrows indicate cortical actin and filipodia. (B) CTA cells: for pesticide condition, white arrows indicate stress fibers and anchoring points; for HNE-Pest condition arrows indicate filipodia. (C) CTR cells, (D) CTP cells, (E) CTRPA cells and (F) CTRPA^t cells. (G) Summarized table of analysed moving cells parameters after long-term exposure of contaminants.

3.6. Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) after Long-term Exposure to Contaminants in HCECs

EMT can also be involved in tumoral transformation following contaminants exposure. We compared the effects of treatments in each cell line (Figure 6 and Figure S4) on the level of E-cadherin and vimentin, two markers of the EMT process. Pesticide and HNE-Pest treatment significantly decreased the level E-cadherin in CTA cells. We observed a tendency of decrease in CT and CTRPA^t cells. There is no statistical difference between treatments per cell line regarding vimentin.

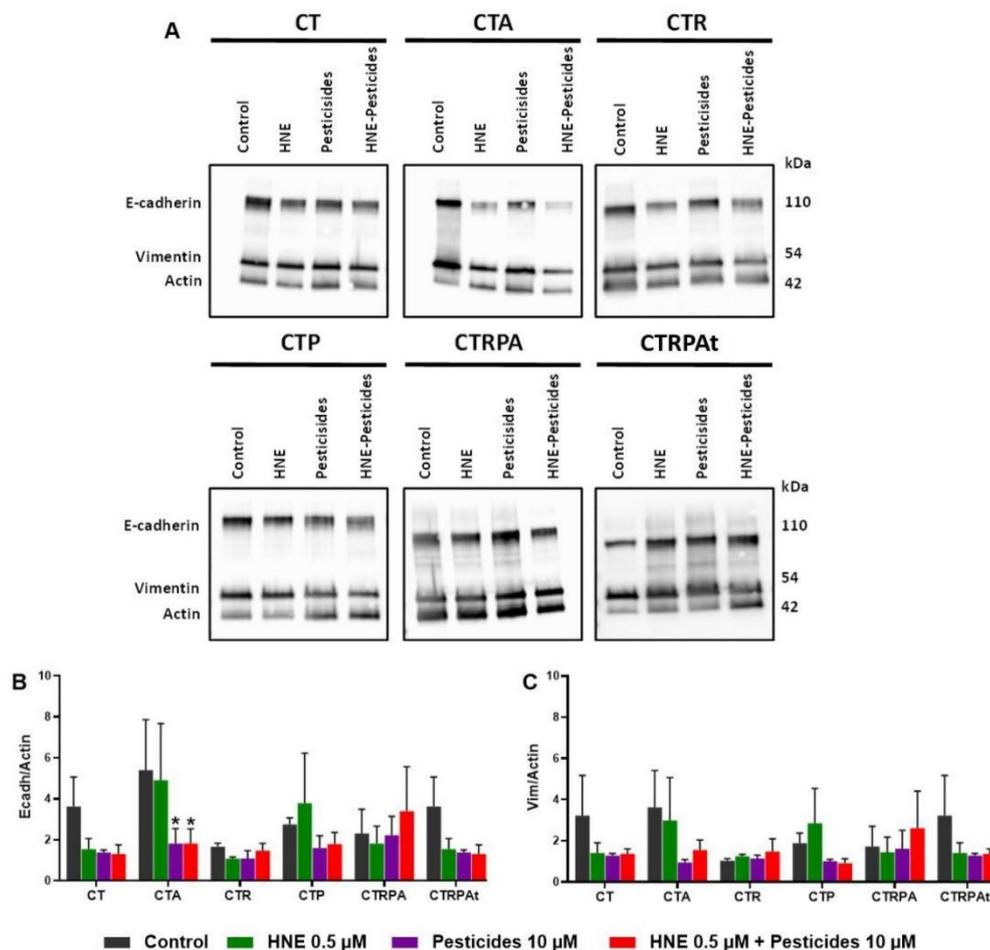


Figure 6. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) markers, after three weeks exposure to contaminants in HCECs. (A) E-cadherin, Vimentin and Actin immunoblots of soluble extracts. (B) Quantification of E-cadherin immunoblots of HCECs relative to actin. (C) Quantification of Vimentin immunoblots of HCECs relative to actin. All the results (B, C) represent the mean \pm SEM of three independent experiments; statistical differences were analysed by post-hoc tests of a 2-way ANOVA model between control and treated cells ($* p < 0.05$).

3.7. Principal Component Analysis of Long-term Exposure Results to Contaminants in HCECs.

To determine whether the examined carcinogenic events correlated, we carried out a principal component analysis (PCA) of long-term exposure results (Figure 7). On the two-dimensional projection here after which support about 62% of the total variability, we observe a correlation between cellular metabolism (including ATP production, basal OCR maximal OCR and ECAR), another correlation between the results of DNA damage signalling (γ H2AX and 53BP1 immunostaining) and finally, a correlation between the results of EMT (E-cadherin and Vimentin immunoblots). However, no result was strongly correlated with the malignant transformation observed with soft agar assay. This suggests that the acquisition of the major carcinogenic transformation with growth without anchoring

is not simply the result of single cellular alteration, but of a combination of several mechanisms, probably DNA damage signalling, cell growth and energetic metabolism.

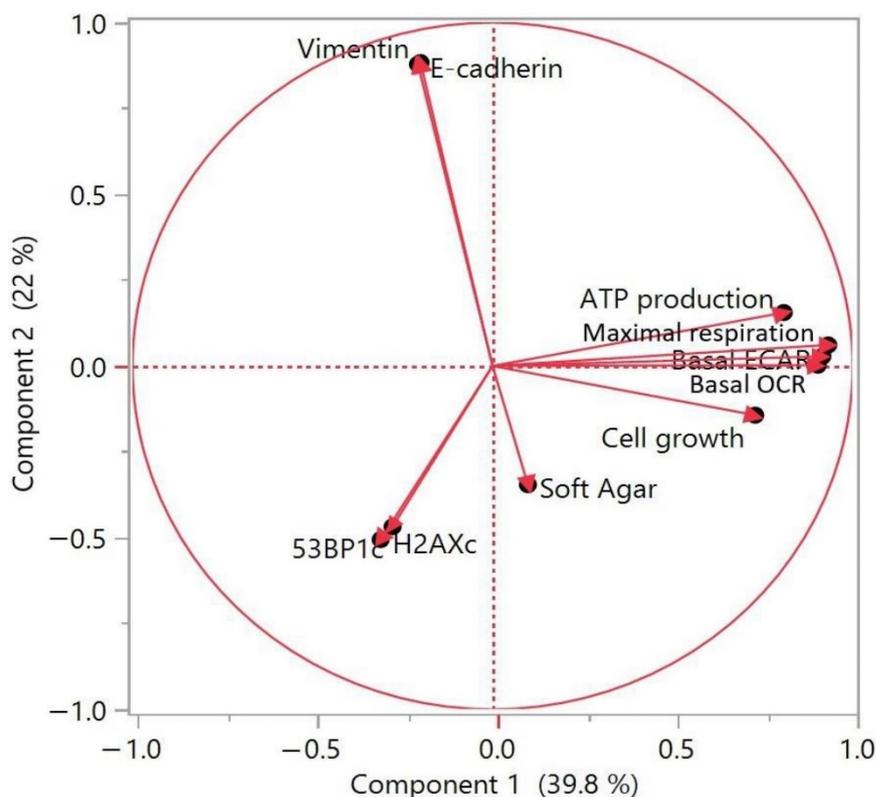


Figure 7. Principal component analysis of long-term exposure results to contaminants in HCECs.

4. Discussion

The link between cancer and the environment is a controversial subject that has been brought up to date these last years [42,43]. Using a mathematical correlation analysis, scientists estimated that two thirds of tumours are due to random chance rather than environmental or genetic factors. Wu et al. (2016) reassessed these data and concluded that extrinsic factors play a major role in the occurrence of cancer [44]. By joining this debate supported by philosophers of cancer biology [45], we questioned the role of environmental factors, especially food, in the onset of colorectal carcinogenesis. We analysed the impact of two types of food contaminants used alone or in combination: HNE, a neoformed compound, and a mixture of pesticides. HNE is produced during digestion of iron-containing food, such as red meat [10,46]. This process involves microbiota [47,48]. Moreover, we chose a representative mixture of pesticides to which French consumers are exposed daily [13]. We used this mixture of pesticides reflecting a real food exposure to carry out mechanistic studies relative to its carcinogenic potential. In order to study acute toxicity but also long-term exposure, more relevant for carcinogenesis studies, we carried out experiments after 24 h and three weeks of exposure. To study early and progressive steps of

colorectal carcinogenesis, we use non transformed human epithelial colonic cells (HCECs) and their five isogenic cells lines [32]. By working with these six isogenic cell lines, we could compare the differences of susceptibility regarding contaminants and we hypothesized that contaminants can affect different stages of colon carcinogenesis.

We first studied classical toxicological endpoints, *e.g.*, cell viability and genotoxicity, after acute (2 h or 24 h) and long-term (three weeks) treatments with the food contaminants (at 0.5 μ M for HNE and 10 μ M for pesticides). Previous studies demonstrated that the same mixture of pesticides was able to induce cytotoxicity on a colonic cell line (LS-174T) after 24 h at a concentration of 100 μ M [13], 10 times higher than those used here. Other studies showed that HNE induced apoptosis at 40 μ M [10,46], a concentration 80 times greater than the concentration used in our study. In contrast, using lower concentrations, we observed discrete effects after acute treatment: no modification of cell viability and some discrete DNA damage differences with pesticides and HNE-Pest, notably DNA breaks. For analysed DNA damage, we used two methods: alkaline comet assay (to detect both single and DSB) and 53BP1 foci (to detect the signalling of DSB), which are complementary. For example, in CT cells, pesticides and HNE-Pest induced a significant effect with both assays, suggesting induction of DSB (without excluding single-strand breaks). When only the comet assay is positive, as in CTP cells exposed to HNE-Pest, it suggests only single-strand breaks. Except for this discrete DNA damage, main differences were due to intrinsic genetic differences between cell lines. HNE, at 0.5 μ M and 2 h exposure, barely induced 53BP1 foci in CT cells, whereas it was described to be genotoxic in cerebral endothelial cells for doses higher than 1 μ M after 3 h of exposure [49]. A previous study proposed that low DNA damage induced by an acute exposure to a low concentration of environmental toxicant can lead to an efficient DNA damage response, *i.e.*, an efficient DNA repair and maintenance of cellular integrity [50]. In contrast, long-term exposure to HNE seems to trigger γ H2AX foci in all cell lines, suggesting that the maintenance of DNA integrity could not be longer assured and could contribute to mutagenesis, in particular G:C > T:A mutations in proto-oncogenes like *K-RAS* [51]. In these experimental conditions, in which cells were cultivated and exposed for three weeks, cellular aging is also a parameter that could influence basal DNA damage. However, the level of γ H2AX foci in control cells was very low, underlying that aging was not major in the observation of the effects of the exposure.

When mimicking long-term exposure and studying a broader panel of toxicological endpoints, we identified important changes supporting carcinogenesis. Indeed, major changes in cell growth, morphology related to mobility, DNA damage signalling, growth without anchoring and cell metabolism for *APC*-modified cells were observed. Thus, our study strongly indicates that long-term exposure is a major condition that should be taken into account for real-life food contamination assessment. It is also supported by previous studies demonstrating different genotoxic and metabolic effects of pesticides after long-term exposure compared to acute exposure [52,53]. These results also highlight the fact that environmental carcinogenesis involves multiple mechanisms depending on the type of contaminant and genetic susceptibility [5]. *In vivo* experiments could confirm our mechanistic hypothesis: by injecting the transformed cells after long-term exposure into nude mice, we could evaluate their malignant potential. Alternatively, by feeding azoxymethane-induced rats with a diet containing haem iron and pesticides, we could evaluate the preneoplastic incidence after three months [46] and the involvement of gut microbiota [54]. To conciliate *in vitro* and *in vivo* approaches, in order to investigate carcinogenesis and the related mechanisms, zebrafish could constitute a promising model [55].

In order to study the carcinogenesis potency of the toxicants, we evaluated the capacity of contaminants to induce a step in malignant transformation after a long-term exposure (three weeks) using the Soft Agar assay. The Soft Agar assay allows the evaluation of the ability of cells to grow without anchorage, a hallmark of carcinogenic transformed

cells. CT cells, considered as normal HCECs, acquired the capacity to grow without anchorage only after a long-term exposure to pesticides and HNE-Pest. Thus, we demonstrated for the first time that these contaminants could induce CRC initiation. Genetically-predisposed cells (CTA, CTR and CTP cells) and advanced stage cells (CTRPA and CTRAt cells) also acquired an increase in the capacity to grow without anchorage in the majority of conditions of exposure. This suggests that pesticides alone or in mixture with HNE could promote CRC and increase tumorigenesis in advanced stages. Moreover, we suggest that contaminants in food can enhance carcinogenesis when cells exhibit genetic susceptibility, as already mentioned by Bermejo & Hemminki [56].

In a previous study, we analysed the potential tumorigenic role of Cytolethal Distending Toxin (CDT) in HCECs [33]. In these conditions, the genotoxic CDT did not induce CRC initiation but favored CRC promotion. The induction of malignant transformation by CDT was also associated with DNA damage. However, in the present work, genotoxicity was not related to the malignant transformation observed after acute or long-term exposure to the contaminants, as supported by the PCA analysis. Therefore, we investigated non-genomic carcinogenic effects, which are known to disrupt different signaling pathways [57,58].

We conducted a comparative study by analysing HCECs CT cells and five isogenic lines mimicking the main stages of colorectal carcinogenesis. We observed a differential impact of contaminants when the cells are genetically modified. Pesticides and HNE-Pest favour malignant transformation in CT cells and it was also associated with an increase in cell mobility. Transformation was observed in CTA cells with all the contaminants. Compared to CT cells, this transformation is associated with cell mobility changes, but also included increase of cell growth and changes in cell metabolism. CTA cells are more sensitive to HNE transformation compared to CT cells. The difference of sensitivity of normal CT cells and CTA cells was previously described after a short exposure to a higher dose of HNE and fecal water for heme-containing diet fed rats [10,46]. For CTR cells, transformation was induced by pesticides and HNE-Pest and it was associated only with increase of cell mobility. The ectopic expression of KRAS does not appear to affect cell mechanisms studied here after a long-term exposure to contaminants. All the contaminants lead to a transformation in CTP cells that are more sensitive than CT cells. Only changes of cell mobility were observed as for CT cells, while the cell growth is strongly increase in CTP cells compared to CT cells. The inactivation of the tumour suppressor TP53 favour cell proliferation in CRC *via* its role in the regulation of cell cycle [59,60]. Mixture HNE-Pest induced distinct cellular impact in CTRPA and CTRPAt cells compared to CT cells, especially concerning cell metabolism. Globally, we observed that the cell lines altered or mutated for APC (CTA, CTRPA and CTRPAt cells) exhibit changes in cell metabolism. CRC is associated with activation of Wnt signalling because APC mutations appear in the majority of CRC. Previous studies reported potential links between Wnt signalling and cancer metabolism in several cancer types [61–64]. It is important to note that the increase in cell mobility observed in some cell lines did not associate with epithelial-mesenchymal transition (EMT). EMT did not appear to be induced by the mixture of pesticides and/or HNE.

5. Conclusions

This work highlights the toxicity of food contaminants alone or in mixture on different isogenic cell human colonic epithelial cell lines with different genetic susceptibilities after acute and long-term exposure. Our results show that the carcinogenic effect of HNE and pesticides cannot be explained only by genomic alterations but by a combination of cell disturbances relative to cell growth, energetic metabolism and cell mobility. The procarcinogenic effect of foods is often analysed in terms of nutritional composition (meat, fibre, fat). However, our results show the need to take into account the level of contamination by pesticides, which constitute a chemical microenvironment that should

no longer be ignored, in order to be able to conduct effective colorectal cancer prevention policies.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/article/10.3390/cancers13174337/s1, Figure S1: Positive controls for genotoxicity assays, Figure S2: Summarized tables of statistical analysis. Figure S3: Summarized tables of statistical refocused data, Figure S4: Western blot images.

Author Contributions: Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing—original draft, L.C.A.; Methodology, Investigation, T.G.; Investigation, Review and Editing, A.L.N.; Investigation, S.H.; Investigation, N.N.; Conceptualization, Writing—original draft, J.W.S.; Investigation, Review and editing, F.H.P.; Funding, Conceptualization, Investigation, Supervision, Writing—original draft, E.B.-R.; Funding, Conceptualization, Investigation, Supervision, Writing—original and revised draft, L.H. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study has been supported by ITMO-Cancer-Metahcol project (2017–2022) n°17CE041-00, the French National Research Institute for Agriculture, Food and the Environment (INRAE), the French Cancer Research Foundation Association de Recherche sur le Cancer-ARC, ITMO Cancer Metahcol n°17CE041-00, Ligue Régionale contre le Cancer- Midi-Pyrénées and Cancer Plan PestiBG (n°ENV201401).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Raw data are available upon request.

Acknowledgments: LA was funded by ITMO-Cancer-Metahcol project (2017–2022) n°17CE041-00. We would like to acknowledge our fundings: the French National Research Institute for Agriculture, Food and the Environment (INRAE), the French Cancer Research Foundation Association de Recherche sur le Cancer-ARC, ITMO Cancer Metahcol n°17CE041-00, Ligue Régionale contre le Cancer- Midi-Pyrénées, Cancer Plan PestiBG (n°ENV201401). We thank the plateau LAMI for Seahorse experiments and Alia Dehman and David Colongo from Hyphen stat for statistical analysis.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 209–249, doi:10.3322/caac.21660.
- Pancione, M.; Remo, A.; Colantuoni, V. Genetic and Epigenetic Events Generate Multiple Pathways in Colorectal Cancer Progression. *Pathol. Res. Int.* **2012**, *2012*, 509348, doi:10.1155/2012/509348.
- Smith, G.; Carey, F.A.; Beattie, J.; Wilkie, M.J.V.; Lightfoot, T.J.; Coxhead, J.; Garner, R.C.; Steele, R.J.C.; Wolf, C.R. Mutations in APC, Kirsten-Ras, and P53—Alternative Genetic Pathways to Colorectal Cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 9433–9438, doi:10.1073/pnas.122612899.
- Brenner, H.; Chen, C. The Colorectal Cancer Epidemic: Challenges and Opportunities for Primary, Secondary and Tertiary Prevention. *Br. J. Cancer* **2018**, *119*, 785–792, doi:10.1038/s41416-018-0264-x.
- Murphy, N.; Moreno, V.; Hughes, D.J.; Vodicka, L.; Vodicka, P.; Aglago, E.K.; Gunter, M.J.; Jenab, M. Lifestyle and Dietary Environmental Factors in Colorectal Cancer Susceptibility. *Mol. Aspects Med.* **2019**, *69*, 2–9, doi:10.1016/j.mam.2019.06.005.
- Parkin, D.M. 5. Cancers Attributable to Dietary Factors in the UK in 2010. II. Meat Consumption. *Br. J. Cancer* **2011**, *105*, S24–S26, doi:10.1038/bjc.2011.478.
- Feng, Y.-I.; Shu, I.; Zheng, P.-F.; Zhang, X.-Y.; Si, C.-J.; Yu, X.-I.; Gao, W.; Zhang, I. Dietary Patterns and Colorectal Cancer Risk: A Meta-Analysis. *Eur. J. Cancer Prev. Off. J. Eur. Cancer Prev. Organ. ECP* **2017**, *26*, 201–211, doi:10.1097/CEJ.0000000000000245.
- Wiseman, M. The Second World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research Expert Report. Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: A Global Perspective. *Proc. Nutr. Soc.* **2008**, *67*, 253–256, doi:10.1017/S002966510800712X.
- Dalleau, S.; Baradat, M.; Guéraud, F.; Huc, L. Cell Death and Diseases Related to Oxidative Stress: 4-Hydroxynonenal (HNE) in the Balance. *Cell Death Differ.* **2013**, *20*, 1615–1630, doi:10.1038/cdd.2013.138.
- Surya, R.; Héliers-Toussaint, C.; Martin, O.C.; Gauthier, T.; Guéraud, F.; Taché, S.; Naud, N.; Jouanin, I.; Chantelauze, C.; Durand, D.; et al. Red Meat and Colorectal Cancer: Nrf2-Dependent Antioxidant Response Contributes to the Resistance of Preneoplastic Colon Cells to Fecal Water of Hemoglobin- and Beef-Fed Rats. *Carcinogenesis* **2016**, *37*, 635–645, doi:10.1093/carcin/bgw035.
- Kortenkamp, A.; Faust, M. Regulate to Reduce Chemical Mixture Risk. *Science* **2018**, *361*, 224–226, doi:10.1126/science.aat9219.

12. Crépet, A.; Héraud, F.; Béchaux, C.; Gouze, M.E.; Pierlot, S.; Fastier, A.; Leblanc, J.C.; Le Hégarat, L.; Takakura, N.; Fessard, V.; et al. The PERICLES Research Program: An Integrated Approach to Characterize the Combined Effects of Mixtures of Pesticide Residues to Which the French Population Is Exposed. *Toxicology* **2013**, *313*, 83–93, doi:10.1016/j.tox.2013.04.005.
13. Crépet, A.; Tressou, J.; Graillot, V.; Béchaux, C.; Pierlot, S.; Héraud, F.; Leblanc, J.C. Identification of the Main Pesticide Residue Mixtures to Which the French Population Is Exposed. *Environ. Res.* **2013**, *126*, 125–133, doi:10.1016/j.envres.2013.03.008.
14. Graillot, V.; Takakura, N.; Hegarat, L.L.; Fessard, V.; Audebert, M.; Cravedi, J.-P. Genotoxicity of Pesticide Mixtures Present in the Diet of the French Population. *Environ. Mol. Mutagen.* **2012**, *53*, 173–184, doi:10.1002/em.21676.
15. Edlich, W.; Lyr, H.; Lyr, H. Target Sites of Fungicides with Primary Effects on Lipid Peroxidation Available online: <https://www.taylorfrancis.com/> (accessed on 7 August 2019).
16. Radice, S.; Marabini, L.; Gervasoni, M.; Ferraris, M.; Chiesara, E. Adaptation to Oxidative Stress: Effects of Vinclozolin and Iprodione on the HepG2 Cell Line. *Toxicology* **1998**, *129*, 183–191, doi:10.1016/S0300-483X(98)00086-9.
17. Radice, S.; Ferraris, M.; Marabini, L.; Grande, S.; Chiesara, E. Effect of Iprodione, a Dicarboximide Fungicide, on Primary Cultured Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Hepatocytes. *Aquat. Toxicol.* **2001**, *54*, 51–58, doi:10.1016/S0166-445X(00)00175-2.
18. Canal-Raffin, M.; l’Azou, B.; Jorly, J.; Hurtier, A.; Cambar, J.; Brochard, P. Cytotoxicity of Folpet Fungicide on Human Bronchial Epithelial Cells. *Toxicology* **2008**, *249*, 160–166, doi:10.1016/j.tox.2008.05.003.
19. Blystone, C.R.; Lambright, C.S.; Furr, J.; Wilson, V.S.; Gray, L.E. Iprodione Delays Male Rat Pubertal Development, Reduces Serum Testosterone Levels, and Decreases Ex Vivo Testicular Testosterone Production. *Toxicol. Lett.* **2007**, *174*, 74–81, doi:10.1016/j.toxlet.2007.08.010.
20. Ostby, J.; Kelce, W.R.; Lambright, C.; Wolf, C.J.; Mann, P.; Gray, L.E. The Fungicide Procymidone Alters Sexual Differentiation in the Male Rat by Acting as an Androgen-Receptor Antagonist in Vivo and in Vitro. *Toxicol. Ind. Health* **1999**, *15*, 80–93, doi:10.1177/0748233799015001008.
21. Go, R.-E.; Kim, C.-W.; Choi, K.-C. Effect of Fenhexamid and Cyprodinil on the Expression of Cell Cycle- and Metastasis-Related Genes via an Estrogen Receptor-Dependent Pathway in Cellular and Xenografted Ovarian Cancer Models. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2015**, *289*, 48–57, doi:10.1016/j.taap.2015.09.001.
22. Huang, X.; Jin, Y.; Zhou, D.; Xu, G.; Huang, J.; Shen, L. IQGAPI Modulates the Proliferation and Migration of Vascular Smooth Muscle Cells in Response to Estrogen. *Int. J. Mol. Med.* **2015**, *35*, 1460–1466, doi:10.3892/ijmm.2015.2134.
23. Fang, C.-C.; Chen, F.-Y.; Chen, C.-R.; Liu, C.-C.; Wong, L.-C.; Liu, Y.-W.; Su, J.-G.J. Cyprodinil as an Activator of Aryl Hydrocarbon Receptor. *Toxicology* **2013**, *304*, 32–40, doi:10.1016/j.tox.2012.11.018.
24. Medjakovic, S.; Zochling, A.; Gerster, P.; Ivanova, M.M.; Teng, Y.; Klinge, C.M.; Schildberger, B.; Gartner, M.; Jungbauer, A. Effect of Nonpersistent Pesticides on Estrogen Receptor, Androgen Receptor, and Aryl Hydrocarbon Receptor. *Environ. Toxicol.* **2014**, *29*, 1201–1216, doi:10.1002/tox.21852.
25. Coleman, M.D.; O’Neil, J.D.; Woehrling, E.K.; Ndunge, O.B.A.; Hill, E.J.; Menache, A.; Reiss, C.J. A Preliminary Investigation into the Impact of a Pesticide Combination on Human Neuronal and Glial Cell Lines in Vitro. *PLoS ONE* **2012**, *7*, doi:10.1371/journal.pone.0042768.
26. Ankley, G.T.; Bencic, D.C.; Cavallin, J.E.; Jensen, K.M.; Kahl, M.D.; Makynen, E.A.; Martinović, D.; Mueller, N.D.; Wehmas, L.C.; Villeneuve, D.L. Dynamic Nature of Alterations in the Endocrine System of Fathead Minnows Exposed to the Fungicide Prochloraz. *Toxicol. Sci.* **2009**, *112*, 344–353, doi:10.1093/toxsci/kfp227.
27. Takeuchi, T.; Tsutsumi, O.; Ikezumi, Y.; Takai, Y.; Taketani, Y. Positive Relationship between Androgen and the Endocrine Disruptor, Bisphenol A, in Normal Women and Women with Ovarian Dysfunction. *Endocr. J.* **2004**, *51*, 165–169, doi:10.1507/endocrj.51.165.
28. Viel, J.-F.; Warembourg, C.; Le Maner-Idrissi, G.; Lacroix, A.; Limon, G.; Rouget, F.; Monfort, C.; Durand, G.; Cordier, S.; Chevrier, C. Pyrethroid Insecticide Exposure and Cognitive Developmental Disabilities in Children: The PELAGIE Mother–Child Cohort. *Environ. Int.* **2015**, *82*, 69–75, doi:10.1016/j.envint.2015.05.009.
29. Lukowicz, C.; Ellero-Simatos, S.; Régnier, M.; Polizzi, A.; Lasserre, F.; Montagner, A.; Lippi, Y.; Jamin, E.L.; Martin, J.-F.; Naylies, C.; et al. Metabolic Effects of a Chronic Dietary Exposure to a Low-Dose Pesticide Cocktail in Mice: Sexual Dimorphism and Role of the Constitutive Androstane Receptor. *Environ. Health Perspect.* **2018**, *126*, 067007, doi:10.1289/EHP2877.
30. Smith, L.; Klément, W.; Dopavogui, L.; de Bock, F.; Lasserre, F.; Barretto, S.; Lukowicz, C.; Fougerat, A.; Polizzi, A.; Schaal, B.; et al. Perinatal Exposure to a Dietary Pesticide Cocktail Does Not Increase Susceptibility to High-Fat Diet-Induced Metabolic Perturbations at Adulthood but Modifies Urinary and Fecal Metabolic Fingerprints in C57Bl6/J Mice. *Environ. Int.* **2020**, *144*, 106010, doi:10.1016/j.envint.2020.106010.
31. Vodicka, P.; Vodenkova, S.; Buchler, T.; Vodickova, L. DNA Repair Capacity and Response to Treatment of Colon Cancer. *Pharmacogenomics* **2019**, *20*, 1225–1233, doi:10.2217/pgs-2019-0070.
32. Roig, A.I.; Eskiocak, U.; Hight, S.K.; Kim, S.B.; Delgado, O.; Souza, R.F.; Spechler, S.J.; Wright, W.E.; Shay, J.W. Immortalized Epithelial Cells Derived From Human Colon Biopsies Express Stem Cell Markers and Differentiate in Vitro. *Gastroenterology* **2010**, *138*, 1012–1021.e5, doi:10.1053/j.gastro.2009.11.052.
33. Graillot, V.; Dormoy, I.; Dupuy, J.; Shay, J.W.; Huc, L.; Mirey, G.; Vignard, J. Genotoxicity of Cytolethal Distending Toxin (CDT) on Isogenic Human Colorectal Cell Lines: Potential Promoting Effects for Colorectal Carcinogenesis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2016**, *6*, 34, doi:10.3389/fcimb.2016.00034.

34. Perdry, H.; Gutzkow, K.B.; Chevalier, M.; Huc, L.; Brunborg, G.; Boutet-Robinet, E. Validation of Gelbond® High-Throughput Alkaline and Fpg-Modified Comet Assay Using a Linear Mixed Model. *Environ. Mol. Mutagen.* **2018**, *59*, 595–602, doi:10.1002/em.22204.
35. Collins, A.R. Measuring Oxidative Damage to DNA and Its Repair with the Comet Assay. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1840*, 794–800, doi:10.1016/j.bbagen.2013.04.022.
36. European Standards Committee on Oxidative DNA Damage (ESCODD) Measurement of DNA Oxidation in Human Cells by Chromatographic and Enzymic Methods. *Free Radic. Biol. Med.* **2003**, *34*, 1089–1099, doi:10.1016/s0891-5849(03)00041-8.
37. Gedik, C.M.; Collins, A.; ESCODD (European Standards Committee on Oxidative DNA Damage) Establishing the Background Level of Base Oxidation in Human Lymphocyte DNA: Results of an Interlaboratory Validation Study. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **2005**, *19*, 82–84, doi:10.1096/fj.04-1767fje.
38. Fernandez-Vidal, A.; Vignard, J.; Mirey, G. Around and beyond 53BP1 Nuclear Bodies. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 122611, doi:10.3390/ijms18122611.
39. Gupta, A.; Hunt, C.R.; Chakraborty, S.; Pandita, R.K.; Yordy, J.; Ramnarain, D.B.; Horikoshi, N.; Pandita, T.K. Role of 53BP1 in the Regulation of DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice. *Radiat. Res.* **2014**, *181*, 1–8, doi:10.1667/RR13572.1.
40. de Feraudy, S.; Revet, I.; Bezroukove, V.; Feeney, L.; Cleaver, J.E. A Minority of Foci or Pan-Nuclear Apoptotic Staining of GammaH2AX in the S Phase after UV Damage Contain DNA Double-Strand Breaks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 6870–6875, doi:10.1073/pnas.1002175107.
41. Vignard, J.; Mirey, G.; Salles, B. Ionizing-Radiation Induced DNA Double-Strand Breaks: A Direct and Indirect Lighting Up. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* **2013**, *108*, 362–369, doi:10.1016/j.radonc.2013.06.013.
42. Tomasetti, C.; Li, L.; Vogelstein, B. Stem Cell Divisions, Somatic Mutations, Cancer Etiology, and Cancer Prevention. *Science* **2017**, *355*, 1330–1334, doi:10.1126/science.aaf9011.
43. Tomasetti, C.; Vogelstein, B. Cancer Etiology. Variation in Cancer Risk among Tissues Can Be Explained by the Number of Stem Cell Divisions. *Science* **2015**, *347*, 78–81, doi:10.1126/science.1260825.
44. Wu, S.; Powers, S.; Zhu, W.; Hannun, Y.A. Substantial Contribution of Extrinsic Risk Factors to Cancer Development. *Nature* **2016**, *529*, 43–47, doi:10.1038/nature16166.
45. Plutynski, A. Is Cancer a Matter of Luck? *Biol. Philos.* **2021**, *36*, 3, doi:10.1007/s10539-020-09778-8.
46. Bastide, N.M.; Chenni, F.; Audebert, M.; Santarelli, R.L.; Taché, S.; Naud, N.; Baradat, M.; Jouanin, I.; Surya, R.; Hobbs, D.A.; et al. A Central Role for Heme Iron in Colon Carcinogenesis Associated with Red Meat Intake. *Cancer Res.* **2015**, *75*, 870–879, doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-2554.
47. Martin, O.; Lin, C.; Naud, N.; Tache, S.; Raymond-Letron, I.; Corpet, D.; Pierre, F. Antibiotic Suppression of Intestinal Microbiota Reduces Heme-Induced Lipoperoxidation Associated with Colon Carcinogenesis in Rats. *Nutr. Cancer* **2014**, *67*, 119–125, doi:10.1080/01635581.2015.976317.
48. Martin, O.C.B.; Olier, M.; Ellero-Simatos, S.; Naud, N.; Dupuy, J.; Huc, L.; Taché, S.; Graillot, V.; Levêque, M.; Bézirard, V.; et al. Haem Iron Reshapes Colonic Luminal Environment: Impact on Mucosal Homeostasis and Microbiome through Aldehyde Formation. *Microbiome* **2019**, *7*, 72, doi:10.1186/s40168-019-0685-7.
49. Karlhuber, G.M.; Bauer, H.C.; Eckl, P.M. Cytotoxic and Genotoxic Effects of 4-Hydroxynonenal in Cerebral Endothelial Cells. *Mutat. Res.* **1997**, *381*, 209–216.
50. Boutet-Robinet, E.; Bortoli, S.; Huc, L. DNA Damage Response upon Environmental Contaminants: An Exhausting Work for Genomic Integrity. *Curr. Opin. Toxicol.* **2018**, *8*, 28–33, doi:10.1016/j.cotox.2017.12.002.
51. Vodicka, P.; Urbanova, M.; Makovicky, P.; Tomasova, K.; Kroupa, M.; Stetina, R.; Opattova, A.; Kostovcikova, K.; Siskova, A.; Schneiderova, M.; et al. Oxidative Damage in Sporadic Colorectal Cancer: Molecular Mapping of Base Excision Repair Glycosylases in Colorectal Cancer Patients. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, E2473, doi:10.3390/ijms21072473.
52. de Azevedo Mello, F.; Magalhaes Silva, B.B.; Barreiro, E.B.V.; Franco, I.B.; Nogueira, I.M.; Nahas Chagas, P.H.; Santos Parizi, J.L.; Pereira, D.R.; Rossi, R.C.; Nai, G.A. Evaluation of Genotoxicity after Acute and Chronic Exposure to 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid Herbicide (2,4-D) in Rodents Using Machine Learning Algorithms. *J. Toxicol. Sci.* **2020**, *45*, 737–750, doi:10.2131/jts.45.737.
53. Kaur, M.; Sandhir, R. Comparative Effects of Acute and Chronic Carbofuran Exposure on Oxidative Stress and Drug-Metabolizing Enzymes in Liver. *Drug Chem. Toxicol.* **2006**, *29*, 415–421, doi:10.1080/01480540600837969.
54. Barretto, S.A.; Lasserre, F.; Huillet, M.; Régnier, M.; Polizzi, A.; Lippi, Y.; Fougerat, A.; Person, E.; Bruel, S.; Bétoulières, C.; et al. The Pregnane X Receptor Drives Sexually Dimorphic Hepatic Changes in Lipid and Xenobiotic Metabolism in Response to Gut Microbiota in Mice. *Microbiome* **2021**, *9*, 93, doi:10.1186/s40168-021-01050-9.
55. Spitsbergen, J.M.; Tsai, H.W.; Reddy, A.; Miller, T.; Arbogast, D.; Hendricks, J.D.; Bailey, G.S. Neoplasia in Zebrafish (Danio Rerio) Treated with 7,12-Dimethylbenz[a]Anthracene by Two Exposure Routes at Different Developmental Stages. *Toxicol. Pathol.* **2000**, *28*, 705–715, doi:10.1177/0192262330002800511.
56. Bermejo, J.L.; Hemminki, K. Gene-Environment Studies: Any Advantage over Environmental Studies? *Carcinogenesis* **2007**, *28*, 1526–1532, doi:10.1093/carcin/bgm068.
57. Gamage, S.M.K.; Lee, K.T.W.; Dissabandara, D.I.O.; Lam, A.K.-Y.; Gopalan, V. Dual Role of Heme Iron in Cancer; Promotor of Carcinogenesis and an Inducer of Tumour Suppression. *Exp. Mol. Pathol.* **2021**, *120*, 104642, doi:10.1016/j.yexmp.2021.104642.

58. Zárate, I.V.; Pontillo, C.A.; Español, A.; Miret, N.V.; Chiappini, F.; Cocca, C.; Álvarez, L.; de Pisarev, D.K.; Sales, M.E.; Randi, A.S. Angiogenesis Signaling in Breast Cancer Models Is Induced by Hexachlorobenzene and Chlorpyrifos, Pesticide Ligands of the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2020**, *401*, 115093, doi:10.1016/j.taap.2020.115093.
59. Li, X.-L.; Zhou, J.; Chen, Z.-R.; Chng, W.-J. P53 Mutations in Colorectal Cancer- Molecular Pathogenesis and Pharmacological Reactivation. *World J. Gastroenterol. WJG* **2015**, *21*, 84–93, doi:10.3748/wjg.v21.i1.84.
60. Liebl, M.C.; Hofmann, T.G. The Role of P53 Signaling in Colorectal Cancer. *Cancers* **2021**, *13*, 92125, doi:10.3390/cancers13092125.
61. Cha, P.-H.; Hwang, J.-H.; Kwak, D.-K.; Koh, E.; Kim, K.-S.; Choi, K.-Y. APC Loss Induces Warburg Effect via Increased PKM2 Transcription in Colorectal Cancer. *Br. J. Cancer* **2021**, *124*, 634–644, doi:10.1038/s41416-020-01118-7.
62. Lee, S.Y.; Jeon, H.M.; Ju, M.K.; Kim, C.H.; Yoon, G.; Han, S.I.; Park, H.G.; Kang, H.S. Wnt/Snail Signaling Regulates Cytochrome C Oxidase and Glucose Metabolism. *Cancer Res.* **2012**, *72*, 3607–3617, doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-0006.
63. Melnik, S.; Dvornikov, D.; Müller-Decker, K.; Depner, S.; Stannek, P.; Meister, M.; Warth, A.; Thomas, M.; Muley, T.; Risch, A.; et al. Cancer Cell Specific Inhibition of Wnt/ β -Catenin Signaling by Forced Intracellular Acidification. *Cell Discov.* **2018**, *4*, 37, doi:10.1038/s41421-018-0033-2.
64. Schwartz, D.R.; Wu, R.; Kardia, S.L.R.; Levin, A.M.; Huang, C.-C.; Shedden, K.A.; Kuick, R.; Misek, D.E.; Hanash, S.M.; Taylor, J.M.G.; et al. Novel Candidate Targets of Beta-Catenin/T-Cell Factor Signaling Identified by Gene Expression Profiling of Ovarian Endometrioid Adenocarcinomas. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 2913–2922.

III Etude 3 : Etude de la génotoxicité d'un pesticide : le Captane

1) Résumé

Le captane est un fongicide agricole commercialisé depuis plus de 60 ans pour les fruits du verger. L'exposition au captane peut être alimentaire, il a été retrouvé parmi les résidus de pesticides dans l'alimentation dans les pays européens (Crépet et al., 2013b; Lozowicka, 2015) ou professionnelle. Il est associé à un risque accru de myélome multiple chez les agriculteurs (Presutti et al., 2016). Malgré des études approfondies, sa toxicité n'est pas toujours clairement établie. En dépit de son potentiel mutagène détecté depuis de nombreuses années par le test d'Ames et le caractère cancérigène observé chez la souris, le potentiel génotoxique de ce pesticide chez l'humain nécessitait d'être examiné avec des approches mécanistiques plus poussées.

L'objectif de cette étude était d'apporter davantage de connaissances sur les mécanismes d'une génotoxicité éventuelle du captane dans des lignées cellulaires *in vitro* de mammifères : les cellules ovariennes de hamster chinois (CHO) et les cellules cancéreuses humaines HeLa.

Nos résultats montrent que le captane induit des dommages à l'ADN *via* de deux voies génotoxiques indépendantes (Figure 39). La première est caractérisée par l'induction de modifications de bases nécessitant un processus de réparation dépendant de XRCC1. La deuxième est caractérisée par un stress répliatif associé à une diminution drastique de la synthèse de l'ADN causée par une réduction de la progression des fourches de réplication. Ce stress répliatif active la réponse de signalisation ATR et entraîne des cassures doubles brins à l'ADN et des micronoyaux. Ces deux voies contribuent à l'induction d'une instabilité génétique. Cette étude démontre l'implication d'au moins deux voies dans les effets génotoxiques du captane, qui pourraient jouer un rôle dans la cancérogenèse de ce fongicide.

Ce projet sur le captane était déjà bien avancé lors de mon arrivée en thèse, ma contribution a été de réaliser des expériences pour finaliser des résultats, d'où ma contribution en tant que 2^{ème} autrice dans cet article.

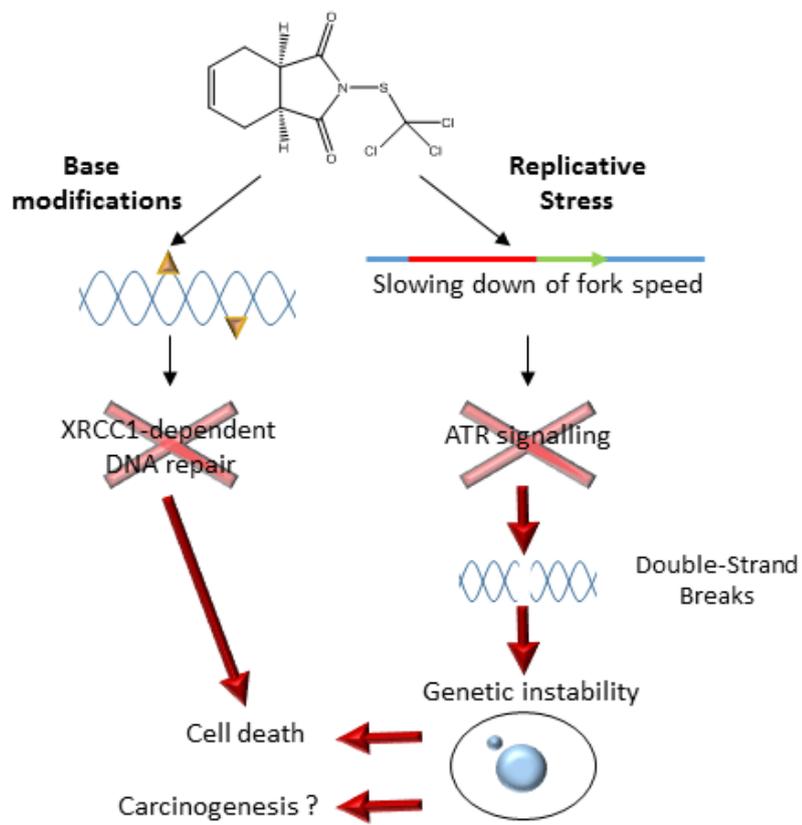


Figure 39 : Le captane induit deux effets genotoxiques indépendants.



Research Article

Exposure to the Fungicide Captan Induces DNA Base Alterations and Replicative Stress in Mammalian Cells

Anne Fernandez-Vidal, Liana C. Arnaud, Manon Maumus, Marianne Chevalier, Gladys Mirey, Bernard Salles, Julien Vignard,* and Elisa Boutet-Robinet *

Toxalim (Research Centre in Food Toxicology), Université de Toulouse, INRA, ENVT, INP-Purpan, UPS, Toulouse, France

The classification of the fungicide captan (CAS Number: 133-06-2) as a carcinogen agent is presently under discussion. Despite the mutagenic effect detected by the Ames test and carcinogenic properties observed in mice, the genotoxicity of this pesticide in humans is still unclear. New information is needed about its mechanism of action in mammalian cells. Here, we show that Chinese Hamster Ovary (CHO) cells exposed to captan accumulate Fpg-sensitive DNA base alterations. In CHO and HeLa cells, such DNA lesions require the XRCC1-dependent pathway to be repaired. Captan also induces a replicative stress that

activated the ATR signaling response and resulted in double-strand breaks and micronuclei. The replicative stress is characterized by a dramatic decrease in DNA synthesis due to a reduced replication fork progression. However, impairment of the XRCC1-related repair process did not amplify the replicative stress, suggesting that the fork progression defect is independent from the presence of base modifications. These results support the involvement of at least two independent pathways in the genotoxic effect of captan that might play a key role in carcinogenesis. *Environ. Mol. Mutagen.* 2018. © 2018 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: pesticide; captan; replicative stress; DNA damage; XRCC1

INTRODUCTION

Captan is an agricultural fungicide that belongs to the phthalimide family. It was first registered in 1951 for tree fruit use and has been used commercially for over 60 years. Despite extensive studies its toxicity is still not consensual and it has been classified in several ways. It was classified in 1982 by the International Agency for Research on Cancer (IARC) as group 3 “Not classifiable as to its carcinogenicity to human” (IARC (International Agency for Research on Cancer) 1982). In the United States, the Environmental Protection Agency (EPA) reclassified it in 2004 from “probable human carcinogen” to “not likely carcinogenic to human” (Gordon 2007). In contrast, it is classified in category 2 H351 (“suspected of causing cancer”) according to the European regulations (European Commission, EC Reg N° 1272/2008). Captan is authorized in many countries. It is used mainly on fruits such as apples and is detected as pesticide residues in food in European countries (Crepet et al. 2013; Lozowicka 2015).

Concerning occupational exposure, a recent analysis from the North American Pooled Project showed that captan is associated with an increased risk of multiple myeloma in farmers (odds ratio 3.14 with a confidence interval 95% of 1.30–7.58) (Presutti et al. 2016). However, this risk is reduced for duration of exposure greater than 7 years

(Presutti et al. 2016). Moreover, this non-monotonic exposure response pattern and the previous absence of association between the highest level of captan exposure and risk of cancer revealed by the Agricultural Health Study (AHS) (Greenburg et al. 2008) contributed to the US EPA revision in 2004. A risk assessment study was conducted by the European Food Safety Authority (EFSA) in 2009 which concluded in its non-genotoxic potential (European Food Safety Authority 2009). However, the mutagenic potency of captan has long been reported in Ames strains TA1535 and TA104 and also in the *Escherichia coli* WP2uvrA strain (Bridges 1975; Barrueco and de la Pena 1988; Ohta et al. 2002), revealing base-change substitution on AT or

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Grant sponsor: Cancer Plan; Grant number: PestiBG n° ENV201401.

*Correspondence to: Elisa Boutet-Robinet, TOXALIM UMR 1331, 180 Chemin de Tournefeuille, BP 93173, F-31027 Toulouse cedex 3, France. E-mail: elisa.boutet@univ-tlse3.fr or Julien Vignard, TOXALIM UMR 1331, 180 Chemin de Tournefeuille, BP 93173, F-31027 Toulouse cedex 3, France. E-mail: julien.vignard@inra.fr

Received 18 July 2018; provisionally accepted 14 November 2018; and in final form 19 November 2018

DOI: 10.1002/em.22268

Published online 00 Month 2018 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

GC base pairs, as well as in mammalian cellular mutation assays (O'Neill et al. 1981; Edgar et al. 1985). In addition to its mutagenic activity, the genotoxic potential of captan is supported by the induction of DNA breaks leading to chromosomal aberrations in mammalian cells (Swenberg et al. 1976; Tezuka et al. 1980; Snyder 1992). Finally, a direct interaction of captan with DNA and/or proteins linked to chromatin such as histones, polymerases or topoisomerase II, has been suggested (Anderson and Rosenkranz 1974; Couch and Siegel 1977; Couch et al. 1977; Selsky and Matheson 1981; Dillwith and Lewis 1982; Pritchard and Lappin 1991; Snyder 1992; Grilli et al. 1995; Provan et al. 1995; Provan and Eyton-Jones 1996; Rahden-Staron 2002).

In contrast to cellular analyses, carcinogenesis assays were negative in rats and slightly positive in mice, which developed duodenal glandular tumors and squamous cell lesions of the forestomach [see for review (Cohen et al. 2010)]. The difference observed in genotoxicity and mutagenesis between *in vitro* and *in vivo* situations might depend on the metabolism of captan and sequestration of reactive derivatives [for review see (Arce et al. 2010)]. Under *in vivo* conditions, the presence of thiol-rich environment such as cysteine or glutathione found in blood or liver, could explain the absence of genotoxicity by the rapid elimination of the reactive and volatile breakdown product of captan, the thiophosgene (Swenberg et al. 1976; Moriya et al. 1978; Gordon 2010). Thus, the increased tumor risk observed in mice might be due to chronic mucosal wounding and regenerative hyperplasia (Arce et al. 2010; Thompson et al. 2017), leading to non-genotoxic effects inducing duodenal carcinogenesis. Nevertheless, Mac Cauley and colleagues have described a significant positive association between DNA damage in oral human leukocytes using alkaline comet assay and urinary concentration of the captan metabolite tetrahydrophthalimide (McCauley et al. 2008).

In this context, it is of great interest to throw new light on captan mechanisms of toxicity. To this end, we investigated captan potential genotoxicity in mammalian cell lines. Here, we show that captan induces DNA damage that requires a XRCC1-dependent repair process and an independent replicative stress characterized by a slowing down of fork velocity, resulting in the formation of double-strand breaks (DSBs) and genomic instability.

MATERIAL AND METHODS

Cell Lines and Treatments

HeLa human cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco, Life technologies). AA8 (XRCC1^{+/+}) and EM9 (XRCC1^{-/-}) rodent cell lines were maintained in a mixture of 50% DMEM media and 50% F-12 media. All media were supplemented with 10% heat-inactivated calf serum and 0.5 mg/mL penicillin/streptomycin (P/S). Cells lines were grown in a humidified incubator at 37°C with 5%

CO₂. All cell lines were checked and were mycoplasma-free. Peripheral Blood Mononuclear cells (PBMC) collected from one volunteer [Établissement Français du Sang, (EFS), written consent for the use of blood samples for the research protocol obtained according to the regulation for blood transfusion of the French blood organization EFS, Toulouse (France)] were Ficoll-separated from whole blood and aliquoted (1*10⁶ cells/aliquot) prior to cryopreservation in liquid nitrogen as described previously (Lebailly et al. 2015). For each experiment, aliquots of PBMC were defrosted, washed with phosphate-buffered saline (PBS) with 10% serum, centrifuged (200 g, 10 min) and resuspended in PBS. When needed, cells were treated with captan (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Germany/CIL-Cluzeau; purity of 98.5%, with impurities as inorganic salts, besides 0.02% ethanol and 0.01% dichloromethane). Captan was added to culture medium, supplemented with serum for all experiments, except for comet assays experiments, which were carried out without serum.

To induce DNA damage as products of purine oxidation detectable by formamidopyrimidine-DNA glycosylase (Fpg), cells were placed on ice and treated with the compound Ro 19-8022 (gift from Hoffman Laroche) (at 1 μM in PBS) for 2 min 30 s under visible light (1000 W-halogen). Ro 19-8022 plus light is an appropriate positive control for the Fpg-modified comet assay (Azqueta et al. 2013).

RNA Interference

Gene silencing was performed by transfection of siRNA (Sigma-Aldrich) in HeLa cells with INTERFERin[®] according to the manufacturer's instructions (Polyplus). Briefly, siRNA were mixed with INTERFERin[®] in Opti-MEM and incubated for 10 min at room temperature. Then, HeLa cells were transfected with the negative control siRNA (CAUGUCAUGU GUCACAUCU-dTdT), or with siRNA directed against XRCC1 (GGAAG AUAUAGACAUGAG-dTdT), or ATR (CCUCCUGAUGUUGCUU GA-dTdT). After 24 h of incubation, cells were counted and plated for further analysis.

Clonogenic Assay

Cells were plated in triplicate at a density of 200 to 500 cells per well in 6-well plates. One day after seeding, cells were treated with captan at the indicated concentrations in complete medium and grown for 6–12 days. AA8 and EM9 cells were exposed to captan until fixed. For HeLa cells treated with siRNA, cells were exposed to captan 66 h to 90 h post-transfection during the most efficient time of siRNA-mediated protein depletion. Formed colonies were fixed and stained with a 0.25% methylene blue (Sigma) and 50% methanol solution. Colonies containing more than 50 cells were counted and the survival rate calculated. Survival rates are normalized to 100% for undamaged cells for each cell population.

Proliferation Assay

Cells were plated in duplicate in 24-well plates at a density of 40,000 and 50,000 cells per well for AA8 and EM9 cells, respectively. One day after seeding, cells were treated in duplicate with captan at the indicated concentrations in complete medium and grown for 48 h. Final cell number in each well was estimated by Malassez cell counting.

Micronucleus Assay

HeLa cells were grown in 12-well plates (2 × 10⁴ cells/well) for 24 h before to be treated or not with captan for 24 h. AA8 and EM9 cells were grown in 24-well plates (2 × 10⁴ cells/well) for 24 h before to be treated with captan for 24 h. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min after a PBS wash. They were then permeabilized with 0.5% Triton X-100 in PBS for 15 min, and nuclei were stained with 4,6-diamino-2-phenyl indole (DAPI) (100 nM).

Comet Assay

The alkaline comet assay was used to detect strand breaks and alkali-labile sites as previously described with minor modifications (Lebailly et al. 2015). Cells were embedded in 0.7% low melting point agarose and a parallel digestion with Fpg enzyme (gift from Serge Boiteux, CNRS, France) allowing the detection of Fpg-sensitive sites was performed, as already described (Azqueta et al. 2013). Fifty cells per slide and two slides per sample were analyzed. The extent of DNA damage was evaluated for each cell by measuring the intensity of all tail pixels divided by the total intensity of all pixels in the head and tail of the comet. The median of these 100 values was calculated and named % tail DNA. For comet cellular repair assay, the Net level of Fpg-sensitive sites (% Tail DNA) was obtained for each condition by subtracting the damage (% Tail DNA) obtained in the absence of Fpg from Fpg-exposed comets ($\% \text{ Tail DNA} - \% \text{ Tail DNA}_{\text{Fpg}} = \text{Net Fpg}$). To specifically calculate the effect of captan (% Tail DNA), Net Fpg-sensitive sites of non-treated (control) cells was subtracted from Net Fpg-sensitive sites of captan treated cells, corresponding to Net Fpg-sensitive sites above the control cells (Net Fpg of captan - Net Fpg of control cells = Net Fpg of captan above control).

Immunofluorescence Analysis

Cells were grown on glass coverslips. After at least 24 h of culture, cells were fixed with 4% paraformaldehyde, permeabilized with 0.5% Triton X-100 for 15 min, blocked in 3% BSA and stained with primary antibodies (dilution 1:3000) overnight at 4°C in blocking solution. For FANCD2 detection, a pre-extraction step (0.5% Triton X-100 for 5 min) was performed before fixation. 53BP1 (NB100-304) and FANCD2 (NB100-182) antibodies were purchased from Novus Biologicals and γ H2AX antibody from Merck/Millipore (05-636). Cells were washed three times with PBS Tween 0.1% and incubated with the secondary antibodies (dilution 1:800) for 1 h (Rhodamine Red X (R6394) and AlexaFluor 488 Goat anti-mouse (A11017) or anti-rabbit (A11070), purchased from Invitrogen). DNA was stained with DAPI. Cells were counted positive for γ H2AX and 53BP1 foci formation when >10 foci/nucleus were detected and counted positive for FANCD2 when >3 foci/nucleus were detected.

Flow Cytometry Analyses

γ H2AX Staining

Two hours after treatment with 10 μ M captan, AA8 and EM9 cell lines were fixed in PBS containing 4% paraformaldehyde for 15 min at room temperature, washed, then permeabilized with PBS containing 0.2% triton X-100 and 1% BSA for 20 min at room temperature. Antibody against γ H2AX (1:300, clone JBW301, Millipore) was incubated for 3 h in PBS containing 1% BSA at room temperature. After three washes, cells were incubated with the secondary antibody anti-mouse Alexa Fluor 488 (1:1,000, A11017, Thermofisher) for 30 min at room temperature. Then, cells were washed three times and incubated in PBS containing DAPI (1 μ g/mL) for 15 min before samples were processed using flow cytometry (MACSQuant, Miltenyi Biotec). At least 10,000 events were analyzed *per* sample using FlowJo software.

Cell Cycle Analysis

Two hours after captan treatment (10 μ M), CHO cell lines were incubated with EdU (5 μ M) for 15 min. Cells were collected by trypsinization and incorporated EdU was detected using the baseclick EdU flow cytometry kit (Sigma, BCK-FC488) according to the manufacturer's instructions. Cells were incubated in PBS containing DAPI (1 μ g/mL) for 15 min before samples were processed using flow cytometry (MACSQuant, Miltenyi Biotec). At least 10,000 events were analyzed *per* sample using FlowJo software.

DNA Fiber Assay

CHO cell lines were plated for 24 h before sequential pulse labelling with 50 μ M CldU (5-chlorodeoxyuridine, Sigma-Aldrich), then 100 μ M IdU (5-iododeoxyuridine, Sigma-Aldrich) for 20 min each, followed by a chase with 200 μ M thymidine (Sigma-Aldrich) for 1 h. Then, cells were collected for DNA fiber assays and re-suspended in cold PBS. Two μ l of cells resuspended in PBS (5×10^5 cells/ml) were spotted onto clean glass slides, mixed with 7.5 μ L of lysis buffer (200 mM Tris-HCl pH 7.4, 50 mM EDTA, 0.5% SDS) and incubated horizontally for 5 min at room temperature. DNA was spread by tilting the slide manually at a 30–45° angle. The air-dried DNA was fixed in cold methanol/acetic acid (3:1) for 20 min. Slides were rehydrated in PBS twice and the DNA was denatured in 2.5 M HCl for 45 min at room temperature. The slides were washed twice in PBS, followed by incubation in blocking solution (1% BSA, 0.1% Tween 20, PBS) for 30 min at room temperature followed by primary antibodies (rat anti-CldU (1:75, OBT0030G, Biorad) and mouse anti-IdU (1:50, BD347583, Becton Dickinson)) for 1.5 h at room temperature. After three washes in PBS, the slides were fixed in 4% paraformaldehyde for 10 min, washed and then incubated in blocking solution for 10 min. Next, the slides were incubated with the secondary antibodies (anti-rat Alexa Fluor 546 (A11081) and anti-mouse Alexa Fluor 488 (A11017), Thermofisher, 1:200) for 1 h at room temperature. Subsequently, they were washed as before, incubated in blocking solution for 10 min, then with the single-strand DNA antibody overnight at 4°C (mouse-anti ssDNA, 1:50, MAB3034, Millipore). After three washes in PBS, the slides were incubated in blocking solution for 10 min and finally with the secondary antibody (anti-mouse Alexa Fluor 350, 1:200, A21130, Thermofisher) for 2 h. Images were analyzed using NIS Elements-AR Nikon software. The specific DNA staining allowed the exclusion of any signal due to broken or overlapping DNA fibers. IdU track length was determined if flanked by a CldU track. At least 400 fibers *per* condition were measured.

Western Blot Analysis

Cells were incubated on ice for 30 min in lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM NaCl and 0.5% NP40) containing the Halt™ Protease and Phosphatase inhibitor cocktail (Thermo Scientific) and sonicated. Cell lysates were centrifuged and the supernatant containing total soluble proteins was kept. Proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane (Amersham). Membranes were incubated with the primary antibody for a period of 1–16 h. Chk1 (2G1D5) and pChk1 (133D3) antibodies (dilution 1:1,000) were purchased from Cell Signaling, ATR (SAB4200348, dilution 1:500) and Lamin A/C (SAB4200236, dilution 1:1,000) antibodies from Santa Cruz, XRCC1 antibody (X0629, dilution 1:1,000) from SIGMA, FANCD2 antibody (NB100-182, dilution 1:5,000) from Novus Biologicals, and GAPDH (GTX100118, dilution 1:50,000) antibody from GeneTex. The secondary anti-mouse or anti-rabbit HRP-conjugated antibodies (Jackson Immunoresearch laboratories) were incubated for 1 h at room temperature. Proteins were visualized with the enhanced chemiluminescence substrate ECL (Biorad) and imaged using the ChemiDoc XRS Biorad Imager and Image Lab Software. Lamin, Chk1 and GAPDH were used as internal control.

Statistical Analysis

The results are expressed as the mean \pm SEM. Statistical analysis was assessed using Prism 6 software (GraphPad). Student's *t*-test, Mann-Whitney or two-ways ANOVA tests, followed by *post hoc* tests were used when appropriate. A *P* value <0.05 was considered significant. For clonogenic survival assay, micronucleus assay, γ H2AX and 53BP1 immunofluorescence analyses on siRNA-transfected HeLa and CHO (AA8 and EM9) cells, two-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparison test were used in order to study treatment effects and cell line effect. This statistical approach was also used for γ H2AX staining analyzed by flow cytometry and cell cycle analysis. For the analysis of "Fpg-sensitive sites" by

comet assay, two-tailed Student's *t*-test was used. For the other comet assays, two-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparison tests were performed. For DNA fiber assay, statistical analysis was performed using two-tailed Mann-Whitney test.

RESULTS

XRCC1 Deficiency Induces Hypersensitivity to Captan

Since captan was reported to induce base substitution reversion in Ames test strains (TA102 and TA104) and WP2uvrA6 *Escherichia coli* strains used to detect base

substitution mutagenesis, we first tested the effect of XRCC1 defect, a scaffold protein involved in base excision repair (BER) (Kubota et al. 1996). HeLa cells were depleted for XRCC1 protein by transfection with siRNA (Fig. 1A, left panel). Compared to control cells transfected with a scramble siRNA, XRCC1-deficient cells showed a significant higher sensitivity to 1 μ M of captan (Fig. 1A, right panel). Similarly, EM9 CHO cells mutated in XRCC1 were more sensitive than the wild type AA8 cells to captan treatment (Fig. 1B). These results suggest that captan sensitivity is associated with the induction of DNA damage that is repaired by XRCC1. HeLa cells exposed to 10 μ M of

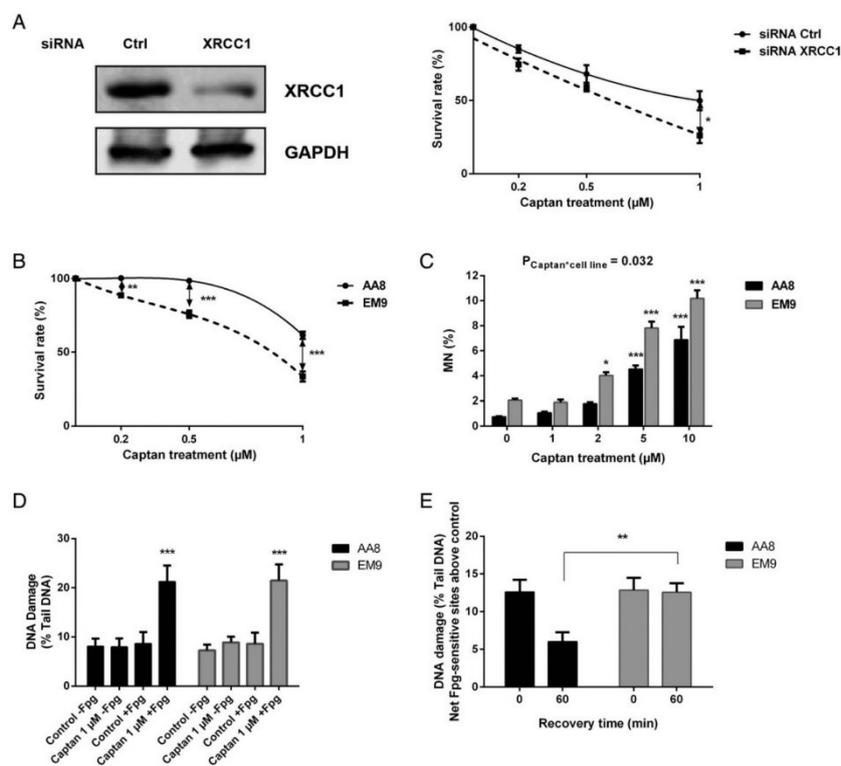


Fig. 1. Hypersensitivity to captan in XRCC1-deficient mammalian cells. (A) Left Panel: HeLa cells were transfected with scramble (Ctrl) or XRCC1 siRNA, and XRCC1 protein level was analyzed by Western blot. GAPDH is shown as a loading control. Right panel: clonogenic survival of HeLa cells transfected with scramble (Ctrl) or XRCC1 siRNA and exposed to captan. Results are the mean \pm SEM of at least four independent experiments. ($^*P < 0.05$). (B) Clonogenic survival of AA8 and EM9 CHO cells after treatment with captan. Results represent the mean \pm SEM of three independent experiments. ($^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$). (C) Micronucleus frequency after captan treatment for

24 h observed in AA8 and EM9 cells. Data are expressed as the mean \pm SEM of four independent experiments. ($^*P < 0.05$, $^{***}P < 0.001$). (D) DNA damage evaluated by alkaline (-Fpg) and Fpg-modified comet assay (+Fpg) after 1 μ M captan treatment for 2 h in AA8 or EM9 CHO cells. Results are mean \pm SEM of three independent experiments. ($^{***}P < 0.001$ vs. non-treated). (E) DNA damage evaluated by Fpg-modified comet assay, represented as increase of Net Fpg-sensitive sites (above the control treatment cells), immediately after 2 h of captan treatment (1 μ M) (time = 0) and after a recovery time of 60 min. Results are mean \pm SEM of six independent experiments. ($^{**}P < 0.01$).

captan for 24 h exhibited a higher percentage of micronucleus-containing cells compared to untreated cells (Supporting Information Fig. S1), suggesting that captan induces DNA damage that can generate genetic instability. Moreover, AA8 and EM9 CHO cells exposed to captan for 24 h exhibit a dose-dependent increase of micronucleus formation, with a significant greater impact on EM9 cells (Fig. 1C). This data demonstrates that XRCC1 is involved in the prevention of genetic instability induced by captan.

In order to confirm that captan induces DNA damage in mammalian cells, an alkaline comet assay was performed on human peripheral lymphocytes. When exposed to 1 μ M of captan for 2 h, these lymphocytes present more DNA damage than the non-treated cells (Supporting Information Fig. S2), confirming the genotoxic activity of the fungicide. Then, the involvement of XRCC1 in the repair of DNA damage induced by captan was analyzed through alkaline and Fpg-modified comet assays. In CHO cells exposed to 1 μ M of captan for 2 h, no damage was observed through alkaline comet assay (Fig. 1D), probably due to the high basal DNA damage already detected in this cellular background. In the same way, no DNA damage through alkaline comet assay can be observed in these cells treated with Ro 19-8022, a chemical agent known to generate 8-oxoguanine (Supporting Information Fig. S3A). Next, the Fpg-modified comet assay was performed to reveal Fpg-sensitive sites which mainly represent oxidative base modifications [Reviewed in (Collins 2014)], usually repaired by the BER pathway. Similar to the control treatment with Ro 19-8022 (Supporting Information Fig. S3A), captan exposure for 2 h induced Fpg-sensitive DNA lesions, as shown in AA8 and EM9 CHO cells (Fig. 1D). To determine whether XRCC1 is involved in the repair of such lesions, Fpg-modified comet assay was also performed on AA8 and EM9 CHO cells released for 1 h in fresh media after captan or Ro 19-8022 exposure. In control cells, repair of DNA lesions induced by captan or Ro 19-8022 was almost complete within 60 min (Fig. 1E for captan and Supporting Information Fig. S3B for Ro 19-8022). In contrast, repair of Fpg-sensitive lesions was severely impaired in XRCC1-deficient cells after captan or Ro 19-8022 exposure (Fig. 1E for captan and Supporting Information Fig. S3B for Ro 19-8022). These results indicate the involvement of XRCC1 in the repair of DNA damage induced by captan.

The Replicative Stress Response Is Crucial for Survival from Captan-Related Genotoxicity

To further characterize the genotoxic stress induced by captan, we performed immunofluorescence analyses in HeLa cells to investigate histone H2AX phosphorylation (γ H2AX), which is a general DNA damage marker mainly associated with DSBs and replication stress (RS), and 53BP1 recruitment, which is more specific to DSBs (de Feraudy et al. 2010; Vignard et al. 2013) (Fig. 2A). After 2 h of captan exposure, a dose-dependent increase in both γ H2AX- and

53BP1-positive cells was observed (Fig. 2B). Except for the non-treated condition where the γ H2AX signaling may be too low in some cells to be properly detected, all the 53BP1 positive cells were also γ H2AX positive after captan treatment. However, a subclass of captan-treated cells accumulating a γ H2AX signal was devoid of 53BP1 foci (Fig. 2A,B). This suggests that captan-related DNA damage generates a RS that subsequently results in DSB formation. To test this hypothesis, HeLa cells exposed to captan for 2 h were co-labeled with γ H2AX and FANCD2, a protein that spontaneously form foci in S-phase cells (Liu et al. 2000; Taniguchi et al. 2002). As in non-treated HeLa cells where a weak γ H2AX staining related to a low RS signaling is only visible in FANCD2 positive cells, the increased subclass of cells accumulating γ H2AX after captan exposure is limited to the FANCD2 positive population (Supporting Information Fig. S4). Taken together, these data suggest that captan-mediated DNA damage induces a RS and subsequently DSB signaling specifically during S-phase.

To investigate whether captan exposure induces RS, we assessed the induction of CHK1 phosphorylation at S345 (pCHK1) and of FANCD2 monoubiquitylation, two well-established markers of RS (Liu et al. 2000; Taniguchi et al. 2002). HeLa cells exposed to 20 μ M of captan for 2 h exhibited higher pCHK1 and FANCD2 monoubiquitylation compared to non-treated cells, demonstrating that captan-exposed cells undergo RS (Fig. 2C). We next confirmed that the RS response is crucial after captan treatment by addressing the sensitivity of cells deficient in ATR, an essential kinase for surviving RS (Saldivar et al. 2017). As expected, siRNA-mediated ATR downregulation resulted in loss of viability in HeLa cells exposed to captan (Fig. 2D). Moreover, ATR-deficient cells treated with 10 μ M of captan for 24 h presented a higher percentage of micronuclei compared to control cells (Fig. 2E), indicating that the RS response is important to prevent genetic instability after captan. In addition, the proportion of 53BP1-positive cells after captan exposure was higher after ATR depletion (Fig. 2F), providing further evidence that these DSBs derive from captan-induced RS. Taken together, these data demonstrate that captan exposure induces an RS that requires ATR to prevent DSB formation and genetic instability.

Captan Impairs Replication Fork Progression in an XRCC1-Independent Manner

The early RS induced by captan should rapidly mitigate the proliferative rate of exposed cells. Remarkably, AA8 and EM9 CHO cells treated with captan for 48 h show a similar dose-dependent proliferation defect (Supporting Information Fig. S5), suggesting that the captan induced RS does not merely relies on the presence of the DNA lesions that require XRCC1 to be repaired. To obtain better insights into the RS induced by captan and investigate

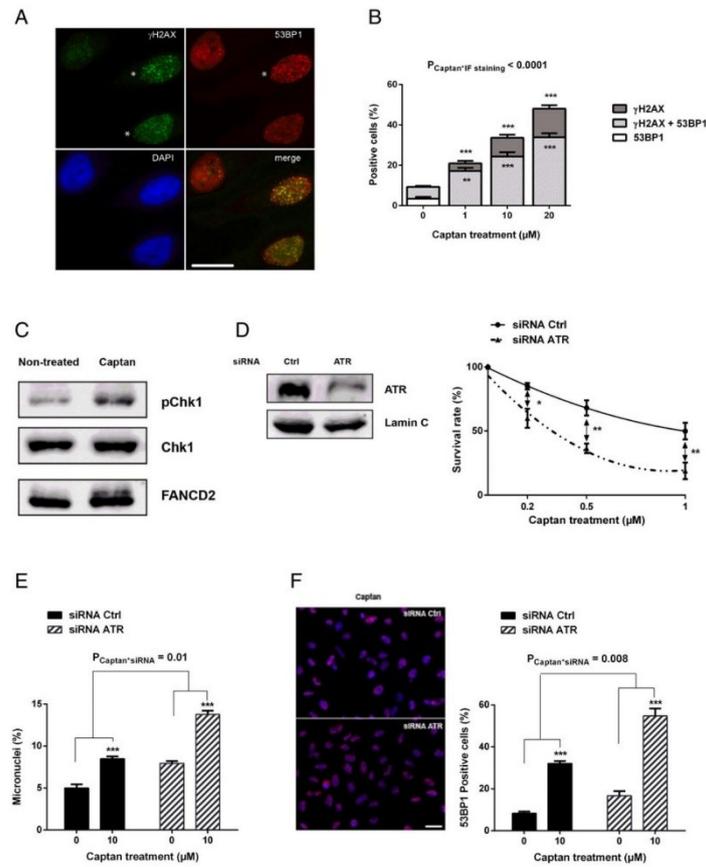


Fig. 2. Importance of replicative stress signaling in response to captan. (A) Representative images of γ H2AX and 53BP1 immunostaining of HeLa cells treated with 20 μ M of captan for 2 h. Asterisks indicate cells scored positive for γ H2AX or 53BP1 staining. Scale bar = 20 μ m. (B) Quantification of HeLa cells positive for γ H2AX or 53BP1 signal. (** P < 0.01, *** P < 0.001 vs. non-treated for each staining). [$P_{\text{Captan}^{\text{IF}} \text{staining}}$ represents the P -value of the interaction between captan treatment and staining (γ H2AX or 53BP1) showing a significant higher staining of γ H2AX than 53BP1 induced by captan]. (C) pChk1, Chk1, and FANCD2 immunoblots of soluble extracts from HeLa cells treated for 2 h with captan 20 μ M or non-treated cells. (D) Left Panel: HeLa cells were transfected with scramble (Ctrl) or ATR siRNA and ATR protein level was analyzed by Western blot. Lamin C is shown as a loading control. Right panel: Clonogenic survival of HeLa cells transfected with scramble

(Ctrl siRNA) or ATR siRNA and exposed to captan. Results are the mean \pm SEM of at least three independent experiments. (* P < 0.05, ** P < 0.01). (E) Micronucleus frequency after 10 μ M captan treatment for 24 h measured in HeLa control (scramble siRNA) and ATR siRNA. Data are expressed as mean \pm SEM of three independent experiments. *** P < 0.001 vs. non-treated for each cell line). ($P_{\text{Captan}^{\text{siRNA}}}$ represents the P -value of the interaction between treatment and siRNA). (F) Left panel: Representative images of 53BP1 immunostaining of HeLa cells transfected with scramble (Ctrl siRNA) or ATR siRNA and treated with 10 μ M of captan for 2 h. Scale bar = 50 μ m. Right panel: Quantification of HeLa cells positive for 53BP1 foci formation. Data represent the mean \pm SEM of three independent experiments. (** P < 0.01 vs. non-treated for each cell line). ($P_{\text{Captan}^{\text{siRNA}}}$ represents the P -value of the interaction between treatment and siRNA).

the impact of XRCC1 deficiency in this process, we analyzed γ H2AX distribution through the cell cycle by flow cytometry in AA8 and EM9 CHO cells. We observed a significant increase in γ H2AX staining in the S phase of

both cell lines in the same range, mostly at the onset of the S phase (Fig. 3A). These data confirm the RS induction by captan highlighted in Figure 2 but suggest that it could be independent of the repair defects caused by XRCC1

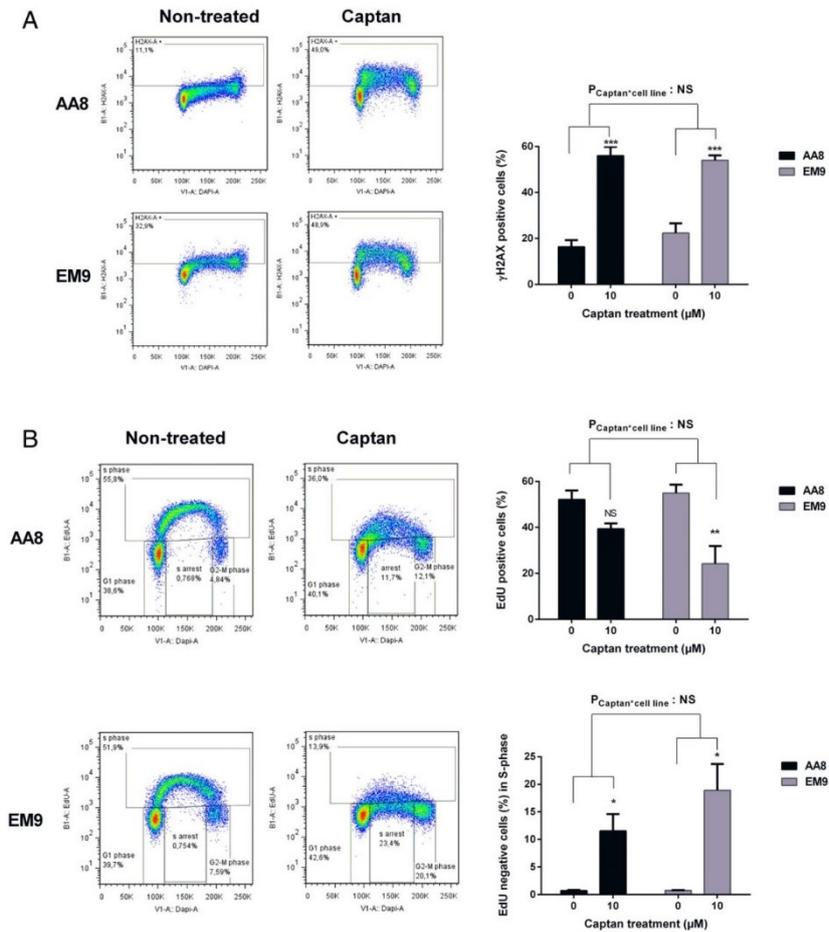


Fig. 3. Captan decreases replication speed and fork restart independently of XRCC1. (A) Left panel: Representative flow cytometry of AA8 and EM9 CHO cells treated or not with 10 μM captan for 2 h followed by cell cycle analysis. EdU incorporation is plotted against the cellular DNA content (DAPI). Quantification of G1, S and G2 cell population (boxed) is indicated. Right panel: Data represent the percentage of EdU-positive (upper panel) and EdU-negative cells (lower panel) in the S phase (mean ± SEM of three independent experiments). (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. non-treated for each cell line). $P_{\text{Captan} \times \text{cell line}}$ represents the interaction between treatment (captan or non-treated) and cell line (AA8 or EM9 CHO cell lines). (B) Left

panel: Representative flow cytometry of AA8 and EM9 CHO cells treated or not with 10 μM captan for 2 h followed by cell cycle analysis. EdU incorporation is plotted against the cellular DNA content (DAPI). Quantification of G1, S and G2 cell population (boxed) is indicated. Right panel: Data represent the percentage of EdU-positive (upper panel) and EdU-negative cells (lower panel) in the S phase (mean ± SEM of three independent experiments). (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. non-treated for each cell line).

deficiency. Then, we assessed the impact of captan treatment on the cell cycle, especially in the S phase, by performing EdU incorporation experiments followed by flow cytometry analysis. In the absence of treatment, almost all AA8 and EM9 CHO cells in the S phase incorporated EdU (Fig. 3B). However, captan induced a huge loss of

global EdU intensity only 2 h after treatment (Fig. 3B and Supporting Information Fig. S6). Consequently, the proportion of EdU-negative S phase cells increased significantly in the same range in both cell lines (Fig. 3B). Impairment of EdU incorporation during replication suggests a slowing down of replication fork velocity.

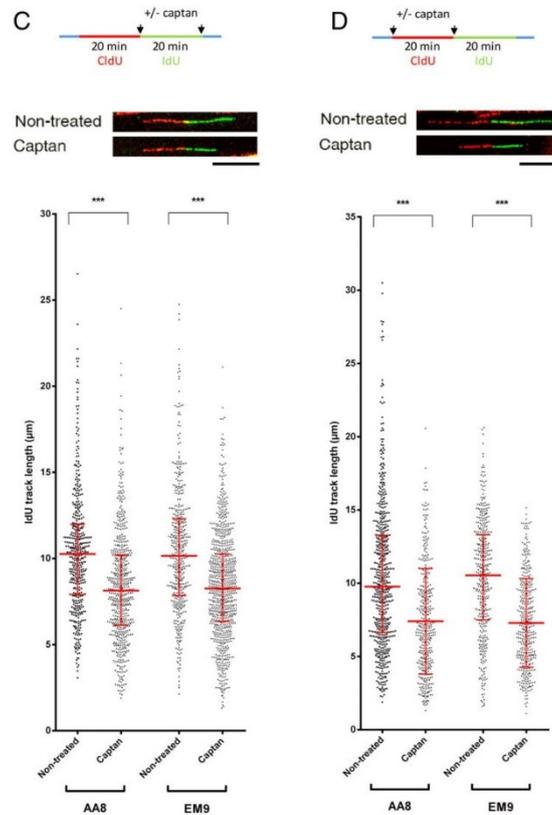


Fig. 3. (Continued) (C) Upper panel: Replication fork speed was analyzed by DNA fiber assay. AA8 and EM9 CHO cell lines were treated or not with 10 μ M of captan during IdU incorporation. IdU track length was determined. Middle panel: Representative images of replication tracks; CldU (red) and IdU (green) (Original magnification X40, Scale bar = 10 μ m). Lower panel: Horizontal red lines represent the median (***) $P < 0.001$). This experiment is representative of two independent

experiments. (D) Quantification of replication fork restart in AA8 and EM9 CHO cell lines after captan treatment. Cells were treated or not with 10 μ M of captan during CldU incorporation, and IdU track length was analyzed. Middle panel: Representative images of replication tracks; CldU (red) and IdU (green) (Original magnification X40, Scale bar = 10 μ m). Lower panel: Horizontal red lines represent the median (***) $P < 0.001$).

To directly address this question, we performed DNA fiber assays by successive double-pulse labelling with two nucleotide analogues, CldU followed by IdU incorporation, to measure replication fork speed in the DNA fiber. AA8 and EM9 CHO cell lines were treated with captan only during the second pulse labelling (IdU incorporation) and the track lengths were measured (Fig. 3C). We observed a significant decrease in IdU track length, reflecting a slowing down of replication fork velocity in the presence of captan. Moreover, the decrease in replication fork speed was similar between AA8 and EM9 cells, suggesting that the captan-related replication fork slowdown

is independent of the repair defects caused by XRCC1 deficiency. To test whether XRCC1 could influence the fork restart, we performed a DNA fiber assay on AA8 and EM9 CHO cell lines exposed to captan only during the first pulse labelling (CldU), then quantified the fork restart by measuring the IdU track length (Fig. 3D). As shown, the replication fork restart was similar in both cell lines, suggesting that XRCC1 depletion does not affect the replication fork restart. Altogether, these results demonstrate that during the S phase, captan exposure inhibits replication fork progression, leading to H2AX phosphorylation, independently of BER pathway.

DISCUSSION

Despite the mutagenic effect of captan reported on bacteria testing strains [e.g. see (Bridges 1975; Barrueco and de la Pena 1988; Ohta et al. 2002)], the genotoxic effect of captan on eukaryotic cells, and in particular on human cells, is still under debate.

Our data indicate that the susceptibility of mammalian cells to captan is linked to its genotoxic potential, as revealed by the sensitivity of XRCC1-deficient cells. XRCC1 polymorphism has been associated with a higher risk of cancers (Hu et al. 2005; Hung et al. 2005). We show here that in absence of XRCC1, captan exposure of mammalian cells induces more micronucleus formation, indicating that XRCC1 may prevent genetic instability after captan. Indeed, XRCC1 plays a major role in maintaining chromosomal stability, its deficiency leading to an elevated level of sister chromatid exchange and chromosomal aberrations (Thompson et al. 1982; Zdzienicka et al. 1992). XRCC1 is a scaffold protein that interacts with different components of the BER machinery to stabilize or stimulate them (Caldecott 2014). BER is a versatile system capable of dealing with a broad range of base modifications, including oxidation, alkylation or deamination as well as abasic sites and single-strand breaks (Krokan and Bjoras 2013). The modified alkaline comet assay allowed us to shed the light on the presence of Fpg-sensitive DNA sites after captan exposure. As Fpg is a bacterial glycosylase mainly active across oxidized purines (Boiteux et al. 2017), our results corroborate bacterial mutagenicity studies with strains that detect oxidative compounds. Moreover, the sensitivity and the repair defects of CHO cells defective in XRCC1 protein demonstrate the role of BER in overcoming the genotoxic effect of captan. The XRCC1 deficient EM9 cells show moderate hypersensitivity to captan, which might suggest that other DNA repair pathways could be required to survive captan exposure. However, EM9 cells have previously been reported to exhibit massive or slight hypersensitivity to base modifications depending on the ROS-generating or methylating agent, which may be correlated to differential XRCC1 requirement in many BER sub-pathways implying different DNA glycosylases (Barrows et al. 1991; Horton et al. 2008). While the highlighting of Fpg-sensitive sites and the moderated sensitivity of XRCC1 deficient cells after captan exposure argue for the formation of oxidized bases such as 8-oxoguanine, our data cannot exclude that other lesions such as alkylated bases are induced. Further studies will be necessary to better characterize the base lesions induced by captan and the cellular mechanisms involved for repair. In summary, these results indicate that captan induces Fpg-sensitive DNA lesions in mammalian cells, presumably altered bases, which require an XRCC1-dependent BER process to be repaired, as depicted in the model (Fig. 4).

The cellular consequences of captan genotoxicity were first analyzed by co-immunodetection of γ H2AX and 53BP1. After captan exposure, HeLa cells accumulated more γ H2AX- than 53BP1-positive cells. 53BP1 is specifically recruited to DSBs (Schultz et al. 2000), whereas γ H2AX can form foci after RS independently of DSB formation (Ray Chaudhuri et al. 2012). This suggests that captan induces an RS that may subsequently result in S-phase-dependent DSBs. Indeed, captan-treated HeLa cells rapidly exhibit enhanced Chk1 phosphorylation and FANCD2 monoubiquitinylation, two hallmarks of RS signaling (Liu et al. 2000; Taniguchi et al. 2002). These data are strengthened by the role of ATR, the major kinase governing the cellular response to RS (Liu et al. 2000; Taniguchi et al. 2002) to survive captan exposure. Finally, the increase in micronuclei- and 53BP1-positive cells after captan exposure in ATR-deficient cells compared to control cells demonstrates that an effective RS response is necessary to prevent DSB formation and genetic instability in response to captan, as depicted in the model (Fig. 4). This indicates that the most dramatic cellular consequences of captan exposure arise during the S phase.

The latter finding prompted us to characterize the RS induced by captan in more detail. Furthermore, we wondered whether the induction of the Fpg-sensitive sites by captan sustains the replication defects. The slowing down of the

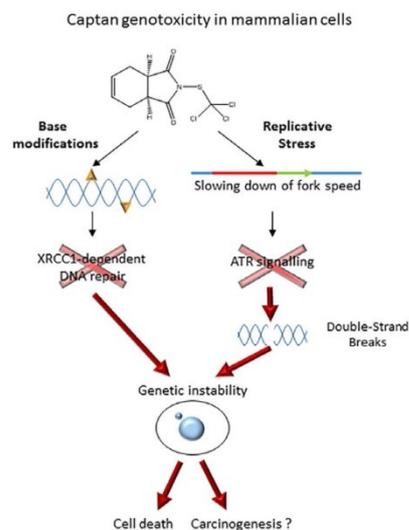


Fig. 4. The fungicide captan induces two independent genotoxic effects. Left part: captan induces base modifications that require XRCC1 to be repaired. Right part: captan is also responsible for a replicative stress, impacting replicative-fork speed and leading to double-strand breaks. Both effects contribute to the establishment of genomic instability.

replication fork observed from only 20 min after captan treatment was not exacerbated by XRCC1 deficiency. This suggests that in parallel to induction of the Fpg-sensitive DNA lesions detected by the Fpg-modified comet assay, captan also inhibits DNA replication, which is in good agreement with previous studies. Indeed, biochemical analyses have shown that captan could be a general inhibitor of both eukaryotic and prokaryotic DNA polymerases (Dillwith and Lewis 1982; Freeman-Wittig et al. 1989; Snyder 1992). These reports showed that the fungicide impairs initiation of polymerization, but not the elongation step of DNA synthesis, in an irreversible manner by competing with DNA regarding polymerase loading. Consequently, dissociation of the polymerase from the DNA template would promote its inhibition by captan. This observation could explain the difficulties encountered by replicative forks to restart after captan treatment. It also raises the question of potential differences in captan sensitivity between replicative polymerases and specialized DNA polymerases, which are involved in DNA repair, translesion synthesis and replication. On the other hand, we cannot exclude that captan may induce different type of DNA lesions which repair is independent of XRCC1, and that may impede replication fork progression. Indeed, the repair of Fpg-sensitive sites induced by captan is less efficient than those induced by Ro 19-8022, suggesting a more complex situation. In the same way, the previously reported interaction of captan with DNA or proteins associated to chromatin (Arce et al. 2010), such as the topoisomerase II inhibition by captan (Rahden-Staron 2002), may be responsible for the RS we report in this study. Further analyses on the possible role of other DNA repair pathways will be necessary to address these issues.

DNA strand breaks and micronuclei are induced as a consequence of RS, which in turn leads to genomic instability. Our study demonstrates that captan exposure in mammalian cells induces various genotoxic effects, corroborating previous *in vivo* reports (Legator 1969; Feng and Lin 1987; Snyder 1992) and suggesting that these mechanisms could play a role in carcinogenesis. Moreover, our *in vitro* results on human peripheral lymphocytes, showing DNA damage with alkaline comet assay after captan treatment (Supporting Information Fig. S2), corroborate human *in vivo* study which has reported a significant positive association between DNA damage using alkaline comet assay and urinary concentration of captan (McCauley et al. 2008). In view of recent epidemiological data pointing to a carcinogenic effect in farmers exposed to captan (Presutti et al. 2016), more data are needed to evaluate the human health risk that this fungicide potentially represents.

ACKNOWLEDGMENT

Dr. Sandrine Ellero-Simatos is greatly acknowledged for her advice on statistical analysis. The authors were

supported by grants from the Cancer Plan for PestiBG (n°ENV201401) (EBR).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AFV, JV, and EBR designed the study. LCA, MM, MC, AVF, JV, and EBR performed the experiments, analyzed the data, prepared draft figures and tables. AFV, JV, and EBR prepared the manuscript draft with important intellectual input from GM and BS. All authors approved the final manuscript.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that there are no conflicts of interest.

REFERENCES

- Anderson M, Rosenkranz H. 1974. Greenhouse fungicide-environmental carcinogen. *Henry Ford Hosp Med J* 22:35-40.
- Arce GT, Gordon EB, Cohen SM, Singh P. 2010. Genetic toxicology of folpet and captan. *Crit Rev Toxicol* 40:546-574.
- Azqueta A, Arbillaga L, Lopez de Cerain A, Collins A. 2013. Enhancing the sensitivity of the comet assay as a genotoxicity test, by combining it with bacterial repair enzyme FPG. *Mutagenesis* 28:271-277.
- Barrows LR, Paxton MB, Kennedy KA, Thompson LH. 1991. Characterization of revertants of the CHO EM9 mutant arising during DNA transfection. *Carcinogenesis* 12:805-811.
- Barrueco C, de la Pena E. 1988. Mutagenic evaluation of the pesticides captan, folpet, captafol, dichlofluanid and related compounds with the mutants TA102 and TA104 of salmonella typhimurium. *Mutagenesis* 3:467-480.
- Boiteux S, Coste F, Castaing B. 2017. Repair of 8-oxo-7,8-dihydroguanine in prokaryotic and eukaryotic cells: Properties and biological roles of the Fpg and OGG1 DNA N-glycosylases. *Free Radic Biol Med* 107:179-201.
- Bridges BA. 1975. The mutagenicity of captan and related fungicides. *Mutat Res* 32:3-34.
- Caldecott KW. 2014. DNA single-strand break repair. *Exp Cell Res* 329:2-8.
- Cohen SM, Gordon EB, Singh P, Arce GT, Nyska A. 2010. Carcinogenic mode of action of folpet in mice and evaluation of its relevance to humans. *Crit Rev Toxicol* 40:531-545.
- Collins AR. 2014. Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. *Biochim Biophys Acta* 1840:794-800.
- Couch R, Siegel M. 1977. Interaction of captan and folpet with mammalian DNA and histones. *Pestic Biochem Physiol* 7:531-546.
- Couch RC, Siegel MR, Dorrough HW. 1977. Fate of captan and folpet in rats and their effects on isolated liver nuclei. *Pestic Biochem Physiol* 7:547-558.
- Crepet A, Tressou J, Graillot V, Bechaux C, Pierlot S, Heraud F, Leblanc J. 2013. Identification of the main pesticide residue mixtures to which the French population is exposed. *Environ Res* 126:125-133.
- de Feraudy S, Revet I, Bezrookove V, Feeney L, Cleaver JE. 2010. A minority of foci or pan-nuclear apoptotic staining of gammaH2AX in the S phase after UV damage contain DNA double-strand breaks. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:6870-6875.

- Dillwith JW, Lewis RA. 1982. Inhibition of DNA polymerase by captan. *Biochim Biophys Acta* 696:245–252.
- Edgar D, Bosworth H, Ransome S, Banks S, Hankinson K. 1985. An assessment of the mutagenic potential of Merpan technical using an in vitro mammalian cell test system. Report No MSB/9A from CRO: Huntingdon, Cambridgeshire, England: Huntingdon Research Centre Sponsor: Beer Sheva, Israel: Makhteshim Chemical Works Ltd, December 16.
- European Food Safety Authority. 2009. Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance captan. *EFSA J* 7:296, 291–290.
- Feng JY, Lin BY. 1987. Cytogenetic effects of an agricultural antibiotic, captan, on mouse bone marrow and testicular cells. *Environ Res* 43:359–363.
- Freeman-Wittig MJ, Welch W Jr, Lewis RA. 1989. Binding of captan to DNA polymerase I from *Escherichia coli* and the concomitant effect on 5'→3' exonuclease activity. *Biochemistry* 28: 2843–2849.
- Gordon E. 2007. Captan: Transition from 'B2' to 'not likely'. How pesticide registrants affected the EPA cancer classification update. *J Appl Toxicol* 27:519–526.
- Gordon EB. 2010. Captan and Folpet. *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology*, 3rd ed. San Diego, CA: Elsevier, pp. 1915–1949.
- Greenburg DL, Rusiecki J, Koutros S, Dosemeci M, Patel R, Hines CJ, Hoppin JA, Alavanja MC. 2008. Cancer incidence among pesticide applicators exposed to captan in the agricultural health study. *Cancer Causes Control* 19:1401–1407.
- Grilli S, Moauro A, Mazzullo M. 1995. In vivo fluorimetric assay of DNA unwinding as evidence of the damage induced by folpet in rat liver DNA. *J Environ Sci Health Part A* 30: 1119–1127.
- Horton JK, Watson M, Stefanick DF, Shaughnessy DT, Taylor JA, Wilson SH. 2008. XRCC1 and DNA polymerase beta in cellular protection against cytotoxic DNA single-strand breaks. *Cell Res* 18:48–63.
- Hu Z, Ma H, Chen F, Wei Q, Shen H. 2005. XRCC1 polymorphisms and cancer risk: A meta-analysis of 38 case-control studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14:1810–1818.
- Hung RJ, Hall J, Brennan P, Boffetta P. 2005. Genetic polymorphisms in the base excision repair pathway and cancer risk: A HuGE review. *Am J Epidemiol* 162:925–942.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). 1982. Miscellaneous pesticides. *IARC Monogr Eval Carcinog Risk Hum* 30:295–318.
- Krokan HE, Bjoras M. 2013. Base excision repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5:a012583.
- Kubota Y, Nash RA, Klungland A, Schar P, Barnes DE, Lindahl T. 1996. Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins: Interaction between DNA polymerase beta and the XRCC1 protein. *EMBO J* 15:6662–6670.
- Lebailly P, Mirey G, Herin F, Lecluse Y, Salles B, Boutet-Robinet E. 2015. DNA damage in B and T lymphocytes of farmers during one pesticide spraying season. *Int Arch Occup Environ Health* 88: 963–972.
- Legator MS. 1969. Mutagenic effects of aflatoxin. *J Am Vet Med Assoc* 155:2080–2083.
- Liu Q, Guntuku S, Cui XS, Matsuoka S, Cortez D, Tamai K, Luo G, Carattini-Rivera S, DeMayo F, Bradley A, Donehower LA, Elledge SJ. 2000. Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev* 14:1448–1459.
- Lozowicka B. 2015. Health risk for children and adults consuming apples with pesticide residue. *Sci Total Environ* 502:184–198.
- McCauley LA, Lasarev M, Muniz J, Nazar Stewart V, Kisby G. 2008. Analysis of pesticide exposure and DNA damage in immigrant farmworkers. *J Agromed* 13:237–246.
- Moriya M, Kato K, Shirasu Y. 1978. Effects of cysteine and a liver metabolic activation system on the activities of mutagenic pesticides. *Mutat Res* 57:259–263.
- Ohta T, Tokishita S, Tsunoi R, Ohmae S, Yamagata H. 2002. Characterization of Trp(+) reversions in *Escherichia coli* strain WP2uvrA. *Mutagenesis* 17:313–316.
- O'Neill JP, Forbes NL, Hsie AW. 1981. Cytotoxicity and mutagenicity of the fungicides captan and folpet in cultured mammalian cells CHO/HGPRT system. *Environ Mutagen* 3:233–237.
- Presutti R, Harris SA, Kachuri L, Spinelli JJ, Pahwa M, Blair A, Zahm SH, Cantor KP, Weisenburger DD, Pahwa P, McLaughlin JR, Dosman JA, Freeman LB. 2016. Pesticide exposures and the risk of multiple myeloma in men: An analysis of the North American pooled project. *Int J Cancer* 139:1703–1714.
- Pritchard D, Lappin G. 1991. Captan: DNA binding study in the mouse. Report No CTL/P/3380 from ICI Central Toxicology Laboratory, Alderley Park, Macclesfield, Cheshire, United Kingdom Second Amendment, September 22.
- Provan W, Eyton-Jones H. 1996. The bioavailability of captan to the duodenum of CD-1 mice following dietary administration. Report No CTL/R/1260 from Zeneca, Inc, Central Toxicology Laboratory, Alderley Park, Macclesfield, Cheshire, United Kingdom, January 24.
- Provan WM, Eyton-Jones H, Lappin G, Pritchard D, Moore RB, Green T. 1995. The incorporation of radiolabelled Sulphur from captan into protein and its impact on a DNA binding study. *Chem Biol Interact* 96:173–184.
- Rahden-Staron I. 2002. The inhibitory effect of the fungicides captan and captafol on eukaryotic topoisomerases in vitro and lack of recombinogenic activity in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 518:205–213.
- Ray Chaudhuri A, Hashimoto Y, Herrador R, Neelsen KJ, Fachinetti D, Bermejo R, Cocito A, Costanzo V, Lopes M. 2012. Topoisomerase I poisoning results in PARP-mediated replication fork reversal. *Nat Struct Mol Biol* 19:417–423.
- Saldívar JC, Cortez D, Cimprich KA. 2017. The essential kinase ATR: Ensuring faithful duplication of a challenging genome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 18:622–636.
- Schultz LB, Chehab NH, Malikzay A, Halazonetis TD. 2000. p53 binding protein 1 (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks. *J Cell Biol* 151:1381–1390.
- Selsky C, Matheson D. 1981. The association of captan with mouse and rat deoxyribonucleic acid. Report no T-10435, Farmington, CT: Stauffer.
- Snyder RD. 1992. Effects of Captan on DNA and DNA metabolic processes in human diploid fibroblasts. *Environ Mol Mutagen* 20:127–133.
- Swenberg JA, Petzold GL, Harbach PR. 1976. In vitro DNA damage/alkaline elution assay for predicting carcinogenic potential. *Biochem Biophys Res Commun* 72:732–738.
- Taniguchi T, Garcia-Higuera I, Andreassen PR, Gregory RC, Grompe M, D'Andrea AD. 2002. S-phase-specific interaction of the Fanconi anemia protein, FANCD2, with BRCA1 and RAD51. *Blood* 100: 2414–2420.
- Tezuka H, Ando N, Suzuki R, Terahata M, Moriya M, Shirasu Y. 1980. Sister-chromatid exchanges and chromosomal aberrations in cultured Chinese hamster cells treated with pesticides positive in microbial reversion assays. *Mutat Res* 78:177–191.
- Thompson LH, Brookman KW, Dillehay LE, Carrano AV, Mazrimas JA, Mooney CL, Minkler JL. 1982. A CHO-cell strain having hypersensitivity to mutagens, a defect in DNA strand-break repair, and

12 Fernandez-Vidal et al.

- an extraordinary baseline frequency of sister-chromatid exchange. *Mutat Res* 95:427–440.
- Thompson CM, Wolf JC, McCoy A, Suh M, Proctor DM, Kirman CR, Haws LC, Harris MA. 2017. Comparison of toxicity and recovery in the duodenum of B6C3F1 mice following treatment with intestinal carcinogens Capan, Folpet, and hexavalent chromium. *Toxicol Pathol* 45:1091–1101.
- Vignard J, Mirey G, Salles B. 2013. Ionizing-radiation induced DNA double-strand breaks: A direct and indirect lighting up. *Radiother Oncol* 108:362–369.
- Zdzienicka MZ, van der Schans GP, Natarajan AT, Thompson LH, Neuteboom I, Simons JW. 1992. A Chinese hamster ovary cell mutant (EM-C11) with sensitivity to simple alkylating agents and a very high level of sister chromatid exchanges. *Mutagenesis* 7: 265–269.

Accepted by—
D. M. Wilson, 3rd

Discussion et Conclusion

Mes travaux de thèse ont permis :

- De valider des modèles *in vitro* de cellules épithéliales humaines coliques, les HCECs, comme outils pertinents pour l'étude de la cancérogenèse colorectale et des interactions gène-environnement.
- D'identifier que le HNE et les pesticides, seuls ou en mélange, pouvaient initier et promouvoir la transformation tumorale *in vitro*
- De mettre en évidence que le potentiel cancérogène de ces contaminants est identifiable après une exposition longue et implique de multiples processus de cancérogenèse : génotoxicité, reprogrammation métabolique, croissance cellulaire, migration et transition épithélio-mésenchymateuse
- De montrer que le stade de cancérogenèse ou la susceptibilité génétique intrinsèque des cellules conditionnent leurs réponses aux contaminants alimentaires. De façon générale, mes résultats démontrent que la présence d'une simple altération génétique de gènes suppresseurs de tumeurs ou proto-oncogène contribue à une cancérogénicité accrue des contaminants que j'ai pu tester.

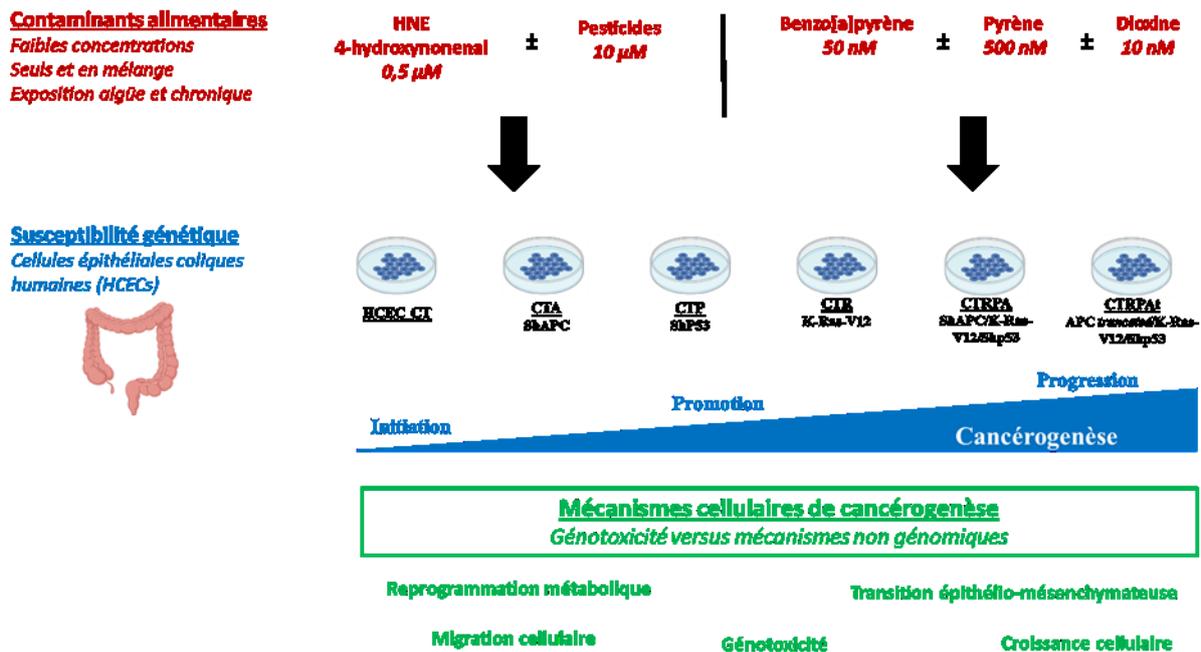


Figure 40 : Etude de l'impact de contaminants alimentaires sur la cancérogenèse colorectale en fonction de la susceptibilité génétique.

Importance des modèles *in vitro* pertinents dans l'étude des interactions gène-environnement

L'étiologie du cancer colorectal est complexe car elle résulte de facteurs génétiques et environnementaux. La contribution de chacun de ces deux facteurs est difficile à déterminer, tant en épidémiologie qu'en recherche fondamentale sur les étapes précoces de la cancérogenèse.

Concernant mon travail de toxicologie alimentaire mécanistique, les études *in vitro* pour examiner les liens gènes-environnement sont nécessaires, mais exigent des modèles robustes. Nous avons caractérisé un modèle original de cellules épithéliales coliques humaines : les HCECs. Cinq lignées cellulaires ont été obtenues expérimentalement à partir des HCECs (cellules CT) non transformées : trois d'entre elles miment les mutations retrouvées dans la cancérogenèse colorectale : perte d'*APC* (CTA) and *TP53* (CTP) et introduction de la forme constitutivement active de *KRAS* (CTR) (Smith et al., 2002). Une contient les trois mutations clé de CCR (CTRPA) et une autre présente les trois mutation et l'introduction de la forme tronquée 1309-aa d'*APC* (CTRPA_t), la forme la plus fréquemment retrouvé dans la cancérogenèse colorectale. Les six lignées miment les différentes étapes du CCR : initiation (CT), promotion (CTA, CTR et CTP) et progression (CTRPA et CTRPA_t). Ce modèle présente de nombreux avantages.

Les HCECs sont un modèle pertinent dans l'étude des stades précoces du CCR. En effet, elles ne présentent pas de multiples changements génétiques et elles n'ont pas acquis des caractéristiques tumorales. Le niveau de croissance sans ancrage est faible par rapport à celui mesuré après une exposition à des polluants. L'étude des stades précoces est un point crucial pour les études en cancérogenèse environnementale : on peut difficilement tirer des conclusions sur le potentiel cancérogène de substances quand les cellules sont déjà tumorales. Dans ce cas, les

facteurs génétiques sont fortement présents et peuvent masquer les effets discrets des contaminants, d'autant plus dans une problématique de faibles doses. Utilisées simultanément, les six lignées permettent l'étude des autres stades de la cancérogenèse, progression et promotion. Il existe d'autres modèles cellulaires épithéliales coliques tels que Caco-2, HT29, LS-174T, HCT116. Cependant ils ne permettent pas l'étude des stades précoces car ils proviennent d'adénocarcinomes colorectaux. Un autre modèle de cellules normales APC^{+/+} et prénéoplasiques APC^{Min/+} existe et permet l'étude des stades précoces comme cela a été fait pour l'effet du HNE et de la consommation de viande rouge. Cependant, ces modèles cellulaires proviennent de la souris contrairement aux HCECs qui proviennent de l'humain (Bastide et al., 2015b; Surya et al., 2016). Ainsi, il n'y a pas de différences inter-espèces à prendre en compte dans l'interprétation des effets.

L'étude comparative de ces six HCECs a révélé des différences phénotypiques, métaboliques, de physiologie mitochondriale, de génotoxicité, d'apoptose et de régulation des gènes lorsque l'expression de *APC*, *KRAS* et/ *TP53* étaient altérés.

Ce modèle a été utilisé déjà par l'équipe pour l'étude de l'impact de la cytolethal distending toxin (CDT) sur la cancérogenèse colorectale et s'est révélé être un modèle pertinent. Une exposition à CDT n'a pas induit d'effet initiateur mais des effets promoteurs avec des mécanismes différents en fonction des altérations génétiques associées au CCR. Ceci montre bien la pertinence de ce modèle dans l'étude des interactions gène-environnement (Graillet et al., 2016).

Pour affiner ce type d'études et analyser de façon plus précise la cancérogenèse colorectale, d'autres cellules avec des doubles mutations pourraient être ajoutées à ces modèles. Une étude génétique de cohorte de patients atteints de CCR a montré que les combinaisons de mutations *APC* et *TP53* étaient fortement représentées (Smith et al., 2002). Il serait alors pertinent de générer des cellules

présentant des altérations à la fois de *APC* et *TP53*. De plus, d'autres mutations, *BRAF*, *PI3KCA* ou *SMAD4*, sont décrites comme jouant un rôle clé dans le CCR. L'intégration au modèle de cellules présentant ses mutations permettrait d'enrichir les connaissances sur le CCR, selon différentes voies de cancérogenèse décrites d'un point de vue physiopathologiques. Dans un contexte de polluants pouvant être génotoxiques, il serait intéressant d'explorer les cancers colorectaux dépendant de MMR.

Les résultats observés avec CDT, HNE et pesticides mériteraient d'être confirmés *in vivo*. Le modèle rongeur semble limité en raison de la quantité d'animaux nécessaires à ce type d'études et de la faiblesse des informations mécaniques obtenues. Le poisson zèbre apparaît comme un modèle plus pertinent dans l'étude des stades précoces de la cancérogenèse. D'un point de vue génétique il est facile de générer des mutations. Ainsi un modèle de poisson zèbre mimant les mutations du CCR permettrait de mener ce type d'études *in vivo* (Spitsbergen et al., 2000; Lu et al., 2017; Podechard et al., 2017; Raby et al., 2020). Dans le projet Metahcol, les expériences sur le poisson-zèbre vont permettre de comparer les effets identifiés sur les cellules HCECs à ceux mesurés sur les larves exposées à des doses semblables. A terme, nous aurons une meilleure idée de la prédictibilité de ces modèles sur la cancérogenèse.

Importance du type d'exposition en toxicologie alimentaire : forte dose en aigue versus faibles doses en chronique ; composé seul ou en mélange

L'humain est exposé continuellement à une multitude de mélanges complexes de contaminants *via* son environnement et son alimentation. Il est difficile d'identifier la composition exacte de ces mélanges. C'est là tous les enjeux des méthodes d'études de l'exposome chimique. Un des enjeux majeurs en toxicologie environnementale est d'améliorer les connaissances sur la problématique des

effets des mélanges de contaminants auxquels la population générale est exposée *via* son alimentation. Les études toxicologiques des contaminants tels que les pesticides, analysent l'impact d'une substance active seule. La toxicité d'un mélange de substances ne peut être toujours prédite à partir de celle de chacun de ses composants. Des effets additifs, synergiques, antagonistes ou potentialisateurs peuvent être observés (Cedergreen, 2014; Martin et al., 2021). Il existe un manque de données expérimentales sur l'impact des mélanges de contaminants sur la santé humaine.

De plus, les études toxicologiques sont souvent menées à fortes doses et en exposition aiguë. Ce type d'expositions ne semblent pas pertinentes dans le cadre d'études en toxicologie alimentaire. Par notre alimentation, nous sommes chroniquement exposés à de faibles doses de contaminants. En expérimentation animale, les expositions peuvent concerner toute la vie, y compris la vie *in utero*. *In vitro*, nous ne pouvons pas reproduire de telles conditions mais nous pouvons en revanche adapter les protocoles d'exposition à la problématique d'exposition chronique à des polluants.

Nous avons mené une étude de l'impact aigu et chronique de plusieurs contaminants à faibles doses seuls ou en mélange sur le CCR. Premièrement, nous avons étudié l'impact du HNE et/ou d'un mélange des pesticides alimentaires. Nous avons observé des effets différentiels du mélange par rapport aux contaminants seuls après une exposition chronique au niveau de la croissance cellulaire, de la capacité à croître sans ancrage (hallmark du cancer), de la génotoxicité, du métabolisme énergétique et de la mobilité cellulaire. Les effets cancérogènes observés après l'exposition longue n'étaient pas prédits par les différents tests effectués après exposition aiguë. Cela remet en question les pratiques en toxicologie cellulaire pour détecter la toxicité *in vitro* des substances chimiques sur la base de tests après exposition aiguë.

De plus, nous avons étudié l'impact de contaminants persistants, le benzo[a]pyrène, le pyrène et la dioxine TCDD. La finalisation de cette étude est en cours. A ce jour, nous avons observé des résultats différentiels entre les polluants seuls et en mélange. Le mélange de polluants et le pyrène semblent initier la cancérogenèse colorectale alors que le benzo[a]pyrène et la dioxine TCDD seuls n'en sont pas capables aux concentrations testées. Des travaux complémentaires sur les voies de cancérogenèse (notamment la reprogrammation métabolique) permettront de mieux expliquer ces différences.

Il semble enfin important de développer des méthodes sensibles pour identifier les mélanges auxquels les consommateurs et consommatrices sont exposé·e·s. Mes travaux de toxicologie alimentaire mécanistique sont les premiers à avoir été conduits sur un mélange réel de pesticides. Ils viennent compléter les travaux menés également dans le laboratoire sur des modèles de souris par le Dr Laurence Payrastra et ses collaborateurs (Lukowicz et al., 2018; Smith et al., 2020). L'impact de ce type de recherche pourrait aider à appréhender une meilleure gestion de l'usage des pesticides, de façon globale, et non uniquement centrée sur quelques substances. Les mélanges représentent une nature chimique et un potentiel toxique différents de ses simples constituants. Les prendre en compte permettraient une prévention de risque plus efficace.

Génotoxicité *versus* mécanismes non génotoxiques.

Des historiens et philosophes des sciences ont analysé les différentes orientations prises par la recherche scientifique sur les origines des cancers dans les années 50 (Girel, 2017; Proctor, 1995). Mathias Girel et Robert Proctor ont notamment constaté qu'il existait une position hégémonique sur la définition d'une cellule cancéreuse sur la base des altérations génétiques, des mutations de gènes suppresseurs de tumeur ou de proto-oncogènes. Cela s'explique en partie par le fait

que le financement massif de la recherche sur le séquençage du génome humain orientait de la la science vers les origines génétiques des cancers Un cancérigène, selon cette vision, était alors essentiellement un composé altérant l'ADN. Cette vision restreinte a conduit plus tard, à focaliser la recherche sur les cancérigènes selon leur capacité à altérer le matériel génétique. En réalité, les cellules cancéreuses subissent de multiples transformations qui ne sont pas liées à l'altération génique. Il existe plusieurs mécanismes qui caractérisent une cellule tumorale. Parmi ses caractéristiques, on peut distinguer la reprogrammation du métabolisme énergétique ou la transition épithélio-mésenchymateuse.

Nous avons observé que le mélange HNE-pesticides pouvait initier le CCR et favoriser sa promotion et sa progression. Ces effets seraient associés à de la génotoxicité mais également à des mécanismes non génotoxiques comme la croissance cellulaire, la reprogrammation du métabolisme énergétique, la mobilité cellulaire et l'EMT. Les potentiels effets cancérigènes de ces contaminants ne dépendait pas uniquement des effets génotoxiques seuls mais plutôt d'une combinaison d'effets génotoxiques et non génotoxiques. Ainsi, mes travaux ont permis de mettre en évidence la nécessité de conduire des études de cancérogenèse environnementale qui intègrent différents niveaux de complexité de la transformation tumorale, afin de ne pas manquer des évènements majeurs. Notons en particulier que la reprogrammation métabolique ou la mitotoxicité mobilisent des voies de signalisation impliquant le AhR, qui est un récepteur de xénobiotiques, notamment de la dioxine, de certains HAP et de certains pesticides (Hardonnière et al., 2016; Hwang et al., 2016; Nault et al., 2016; Zhou et al., 2017; Sutter et al., 2019). De même que la génotoxicité a mobilisé un grand nombre de recherches sur les substances chimiques, ces voies de cancérogénicité doivent également être mieux explorées pour assurer une meilleure évaluation du danger.

Annexes

I Publications et Communications

1) Publication dans revues à comité de lecture

Short-Term and Long-Term Carcinogenic Effects of Food Contaminants (4-Hydroxynonenal and Pesticides) on Colorectal Human Cells: Involvement of Genotoxic and Non-Genomic Mechanisms

Liana C. Arnaud , Thierry Gauthier , Augustin Le Naour , Saleha Hashim, Nathalie Naud , Jerry W. Shay , Fabrice H. Pierre , Elisa Boutet-Robinet * and Laurence Huc *.

Cancers 13 (17): 4337. <https://doi.org/10.3390/cancers13174337>.

* Contributions équivalentes

Exposure to the Fungicide Captan Induces DNA Base Alterations and Replicative Stress in Mammalian Cells

Anne Fernandez-Vidal , **Liana C Arnaud** , Manon Maumus , Marianne Chevalier , Gladys Mirey , Bernard Salles , Julien Vignard , Elisa Boutet-Robinet

Environmental and Molecular Mutagenesis 60 (3): 286-97. <https://doi.org/10.1002/em.22268>.

2) Communication orale en congrès scientifique (présentée moi-même)

Congrès du club d'étude de cellules épithéliales digestives- mars 2019, Toulouse

Impact de contaminants alimentaires en fonction de de la susceptibilité génétique au cancer colorectal

Liana Arnaud, Thierry Gauthier, Nathalie Naud, Fabrice Pierre, Elisa Boutet-Robinet*, Laurence Huc*.

*Contributions équivalentes

3) Communication par poster et communication courte (présentée moi-même)

Congrès society of redox biology and medicine (SFRBM) - novembre 2020, Distantiel

Impact of food contaminants (4-hydroxynonenal and pesticides) relative to genetic susceptibility to colorectal cancer *in vitro*

Liana Arnaud, Thierry Gauthier, Nathalie Naud, Fabrice Pierre, Elisa Boutet-Robinet*, Laurence Huc*.

*Contributions équivalentes

II Formations et Enseignements

1) Formations

- 2018** **Mentorat**
Université Fédérale de Toulouse Midi Pyrénées
Femmes & Sciences Toulouse
- 13C-fluoromics applied to cancer cells**
Genotoul Metatoul Toulouse
- Droit d'auteur : Enseignement, Recherche**
Université Fédérale de Toulouse Midi Pyrénées
- Conduite et gestion de projet adaptées à la thèse**
Cabinet PROGRESS, Toulouse
- Conduite de réunion**
Cabinet PROGRESS, Toulouse
- Rumeurs et désinformation sur Internet**
Université Fédérale de Toulouse Midi Pyrénées
- Publier dans les revues scientifiques : enjeux et modalités pratiques à l'heure du numérique**
Université Fédérale de Toulouse Midi Pyrénées
- 2019** **Parcours d'accompagnement pour publier et communiquer en science (Papyrus)**
INRAE, ToxAlim Toulouse

2) Enseignements

- 2018** **4h TD filière recherche**
Faculté de pharmacie Toulouse
- 2019** **18h TP toxicologie**
Faculté de pharmacie Toulouse

2020 **3h CM Master 2 Toxicologie Humaine, Evaluation des risques, Vigilance (THERV)**

Université Paris

4h CM Master 2 Biotox

Université Fédérale de Toulouse Midi Pyrénées

3h CM Master 2 Pharmacologie

Université Fédérale de Toulouse Midi Pyrénées

Références

- Abid, Z., Cross, A.J., Sinha, R., 2014. Meat, dairy, and cancer. *Am. J. Clin. Nutr.* 100 Suppl 1, 386S–93S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.113.071597>
- Adachi, K., Yamasawa, S., Suskind, R.R., Christian, G., 1969. Hexokinase activities in normal, hyperplastic and cancerous epidermis of mice. *Nature* 222, 191–192. <https://doi.org/10.1038/222191a0>
- Aguilar, E., de Mas, I.M., Zodda, E., Marin, S., Morrish, F., Selivanov, V., Meca-Cortés, Ó., Delowar, H., Pons, M., Izquierdo, I., Celià-Terrassa, T., de Atauri, P., Centelles, J.J., Hockenbery, D., Thomson, T.M., Cascante, M., 2016. Metabolic reprogramming and dependencies associated with epithelial cancer stem cells independent of the epithelial-mesenchymal transition program. *Stem Cells Dayt. Ohio* 34, 1163–1176. <https://doi.org/10.1002/stem.2286>
- Aguilar, F., Hussain, S.P., Cerutti, P., 1993. Aflatoxin B1 induces the transversion of G→T in codon 249 of the p53 tumor suppressor gene in human hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 8586–8590.
- Ahn, J., Sinha, R., Pei, Z., Dominianni, C., Wu, J., Shi, J., Goedert, J.J., Hayes, R.B., Yang, L., 2013. Human Gut Microbiome and Risk for Colorectal Cancer. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 105, 1907–1911. <https://doi.org/10.1093/jnci/djt300>
- Ai, X., Wu, Y., Zhang, Wei, Zhang, Z., Jin, G., Zhao, J., Yu, J., Lin, Y., Zhang, Wanguang, Liang, H., Datta, P.K., Zhang, M., Zhang, B., Chen, X., 2013. Targeting the ERK pathway reduces liver metastasis of Smad4-inactivated colorectal cancer. *Cancer Biol. Ther.* 14, 1059–1067. <https://doi.org/10.4161/cbt.26427>
- Alexandrov, K., Rojas, M., Kadlubar, F.F., Lang, N.P., Bartsch, H., 1996. Evidence of anti-benzo[a]pyrene diolepoxide-DNA adduct formation in human colon mucosa. *Carcinogenesis* 17, 2081–2083. <https://doi.org/10.1093/carcin/17.9.2081>
- Andersson, P., McGuire, J., Rubio, C., Gradin, K., Whitelaw, M.L., Pettersson, S., Hanberg, A., Poellinger, L., 2002. A constitutively active dioxin/aryl hydrocarbon receptor induces stomach tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 9990–9995. <https://doi.org/10.1073/pnas.152706299>
- Angeli, J.P.F., Garcia, C.C.M., Sena, F., Freitas, F.P., Miyamoto, S., Medeiros, M.H.G., Di Mascio, P., 2011. Lipid hydroperoxide-induced and hemoglobin-enhanced oxidative damage to colon cancer cells. *Free Radic. Biol. Med.* 51, 503–515. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.04.015>
- Arnaud, L.C., Gauthier, T., Le Naour, A., Hashim, S., Naud, N., Shay, J.W., Pierre, F.H., Boutet-Robinet, E., Huc, L., 2021. Short-Term and Long-Term Carcinogenic Effects of Food Contaminants (4-Hydroxynonenal and Pesticides) on Colorectal Human Cells: Involvement of Genotoxic and Non-Genomic Mechanisms. *Cancers* 13, 4337. <https://doi.org/10.3390/cancers13174337>
- Awasthi, Y.C., Sharma, R., Cheng, J.Z., Yang, Y., Sharma, A., Singhal, S.S., Awasthi, S., 2003. Role of 4-hydroxynonenal in stress-mediated apoptosis signaling. *Mol. Aspects Med.* 24, 219–230. [https://doi.org/10.1016/s0098-2997\(03\)00017-7](https://doi.org/10.1016/s0098-2997(03)00017-7)
- Ayala, A., Muñoz, M.F., Argüelles, S., 2014. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2014, 360438. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>
- Baeg, G.H., Matsumine, A., Kuroda, T., Bhattacharjee, R.N., Miyashiro, I., Toyoshima, K., Akiyama, T., 1995. The tumour suppressor gene product APC blocks cell cycle progression from G0/G1 to S phase. *EMBO J.* 14, 5618–5625.
- Baldi, I., Carles, C., Blanc-Lapierre, A., Fabbro-Peray, P., Druet-Cabanac, M., Boutet-Robinet, E., Soulat, J.-M., Bouvier, G., Lebailly, P., PESTIMAT Group, 2017. A French crop-exposure matrix for use in epidemiological studies on pesticides: PESTIMAT. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* 27, 56–63. <https://doi.org/10.1038/jes.2015.72>
- Bamford, S., Dawson, E., Forbes, S., Clements, J., Pettett, R., Dogan, A., Flanagan, A., Teague, J., Futreal, P.A., Stratton, M.R., Wooster, R., 2004. The COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) database and website. *Br. J. Cancer* 91, 355–358. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601894>

- Baradat, M., Jouanin, I., Dalleau, S., Taché, S., Gieules, M., Debrauwer, L., Canlet, C., Huc, L., Dupuy, J., Pierre, F.H.F., Guéraud, F., 2011. 4-Hydroxy-2(E)-nonenal metabolism differs in Apc(+ / +) cells and in Apc(Min / +) cells: it may explain colon cancer promotion by heme iron. *Chem. Res. Toxicol.* 24, 1984–1993. <https://doi.org/10.1021/tx2003036>
- Bartsch, H., O’Neill, I.K., 1988. Ninth International Meeting on N-Nitroso Compounds: Exposures, Mechanisms, and Relevance to Human Cancer. *Cancer Res.* 48, 4711–4714.
- Bastide, N.M., Chenni, F., Audebert, M., Santarelli, R.L., Taché, S., Naud, N., Baradat, M., Jouanin, I., Surya, R., Hobbs, D.A., Kuhnle, G.G., Raymond-Letron, I., Gueraud, F., Corpet, D.E., Pierre, F.H.F., 2015a. A Central Role for Heme Iron in Colon Carcinogenesis Associated with Red Meat Intake. *Cancer Res.* 75, 870–879. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-2554>
- Bastide, N.M., Chenni, F., Audebert, M., Santarelli, R.L., Taché, S., Naud, N., Baradat, M., Jouanin, I., Surya, R., Hobbs, D.A., Kuhnle, G.G., Raymond-Letron, I., Gueraud, F., Corpet, D.E., Pierre, F.H.F., 2015b. A central role for heme iron in colon carcinogenesis associated with red meat intake. *Cancer Res.* 75, 870–879. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-2554>
- Bastide, N.M., Pierre, F.H.F., Corpet, D.E., 2011. Heme Iron from Meat and Risk of Colorectal Cancer: A Meta-analysis and a Review of the Mechanisms Involved. *Cancer Prev. Res. (Phila. Pa.)* 4, 177–184. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-10-0113>
- Basu, A.K., Marnett, L.J., 1983. Unequivocal demonstration that malondialdehyde is a mutagen. *Carcinogenesis* 4, 331–333. <https://doi.org/10.1093/carcin/4.3.331>
- Baudry, J., Assmann, K.E., Touvier, M., Allès, B., Seconda, L., Latino-Martel, P., Ezzedine, K., Galan, P., Hercberg, S., Lairon, D., Kesse-Guyot, E., 2018. Association of Frequency of Organic Food Consumption With Cancer Risk: Findings From the NutriNet-Santé Prospective Cohort Study. *JAMA Intern. Med.* 178, 1597–1606. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2018.4357>
- Bénil, P., Kahn, A., Chretien, D., Bortoli, S., Huc, L., Schiff, M., Gimenez-Roqueplo, A.-P., Favier, J., Gressens, P., Rak, M., Rustin, P., 2019. Evolutionarily conserved susceptibility of the mitochondrial respiratory chain to SDHI pesticides and its consequence on the impact of SDHIs on human cultured cells. *PloS One* 14, e0224132. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224132>
- Benjamini, Y., Hochberg, Y., 1995. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol.* 57, 289–300. <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x>
- Bertazzi, P.A., Consonni, D., Bachetti, S., Rubagotti, M., Baccarelli, A., Zocchetti, C., Pesatori, A.C., 2001. Health effects of dioxin exposure: a 20-year mortality study. *Am. J. Epidemiol.* 153, 1031–1044. <https://doi.org/10.1093/aje/153.11.1031>
- Bertazzi, P.A., Zocchetti, C., Guercilena, S., Consonni, D., Tironi, A., Landi, M.T., Pesatori, A.C., 1997. Dioxin exposure and cancer risk: a 15-year mortality study after the “Seveso accident.” *Epidemiol. Camb. Mass* 8, 646–652.
- Boland, C.R., Thibodeau, S.N., Hamilton, S.R., Sidransky, D., Eshleman, J.R., Burt, R.W., Meltzer, S.J., Rodriguez-Bigas, M.A., Fodde, R., Ranzani, G.N., Srivastava, S., 1998. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res.* 58, 5248–5257.
- Bolstad, B.M., Irizarry, R.A., Astrand, M., Speed, T.P., 2003. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 19, 185–193. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/19.2.185>
- Bonvallot, N., Dor, F., n.d. Valeurs toxicologiques de référence : méthodes d’élaboration.
- Brenner, H., Chen, C., 2018. The colorectal cancer epidemic: challenges and opportunities for primary, secondary and tertiary prevention. *Br. J. Cancer* 119, 785–792. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0264-x>
- Browne, S.J., MacFarlane, M., Cohen, G.M., Paraskeva, C., 1998. The adenomatous polyposis coli protein and retinoblastoma protein are cleaved early in apoptosis and are potential

- substrates for caspases. *Cell Death Differ.* 5, 206–213.
<https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400331>
- Bruce, W.R., 1987. Recent Hypotheses for the Origin of Colon Cancer. *Cancer Res.* 47, 4237–4242.
- Bulletin d'information AGRICAN 2020 [WWW Document], n.d. URL
<https://anticipe.eu/thematiques/cancers-et-preventions/environnement-cancers/AGRICAN/resultats> (accessed 8.13.21).
- Burgess, A.W., Faux, M.C., Layton, M.J., Ramsay, R.G., 2011. Wnt signaling and colon tumorigenesis--a view from the periphery. *Exp. Cell Res.* 317, 2748–2758.
<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.08.010>
- Cai, R., Cheng, C., Chen, J., Xu, X., Ding, C., Gu, B., 2020. Interactions of commensal and pathogenic microorganisms with the mucus layer in the colon. *Gut Microbes* 11, 680–690.
<https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1735606>
- Calle, E.E., Kaaks, R., 2004. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat. Rev. Cancer* 4, 579–591. <https://doi.org/10.1038/nrc1408>
- Calle, E.E., Thun, M.J., 2004. Obesity and cancer. *Oncogene* 23, 6365–6378.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207751>
- Campbell, N.A., Reece, J.B., Cain, M.L., Faucher, J., Lachaine, R., 2012. *Biologie*. PEARSON, Paris.
- Cancer Genome Atlas Network, 2012. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 487, 330–337. <https://doi.org/10.1038/nature11252>
- Cantwell-Dorris, E.R., O'Leary, J.J., Sheils, O.M., 2011. BRAFV600E: implications for carcinogenesis and molecular therapy. *Mol. Cancer Ther.* 10, 385–394. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-10-0799>
- Castillo-Sanchez, R., Villegas-Comonfort, S., Galindo-Hernandez, O., Gomez, R., Salazar, E.P., 2013. Benzo-[a]-pyrene induces FAK activation and cell migration in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cell Biol. Toxicol.* 29, 303–319. <https://doi.org/10.1007/s10565-013-9254-1>
- Cawthon, R.M., Smith, K.R., O'Brien, E., Sivatchenko, A., Kerber, R.A., 2003. Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. *Lancet Lond. Engl.* 361, 393–395. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12384-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12384-7)
- Ceccaldi, R., Rondinelli, B., D'Andrea, A.D., 2016. Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. *Trends Cell Biol.* 26, 52–64. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.07.009>
- Cedergreen, N., 2014. Quantifying Synergy: A Systematic Review of Mixture Toxicity Studies within Environmental Toxicology. *PLoS ONE* 9, e96580.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096580>
- Chassaing, B., Vijay-Kumar, M., Gewirtz, A.T., 2017. How diet can impact gut microbiota to promote or endanger health. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 33, 417–421.
<https://doi.org/10.1097/MOG.0000000000000401>
- Chatterjee, N., Walker, G.C., 2017. Mechanisms of DNA damage, repair and mutagenesis. *Environ. Mol. Mutagen.* 58, 235–263. <https://doi.org/10.1002/em.22087>
- Chen, C., Stock, C., Hoffmeister, M., Brenner, H., 2018. Public health impact of colonoscopy use on colorectal cancer mortality in Germany and the United States. *Gastrointest. Endosc.* 87, 213–221.e2. <https://doi.org/10.1016/j.gie.2017.04.005>
- Choi, W.-S., Palmiter, R.D., Xia, Z., 2011. Loss of mitochondrial complex I activity potentiates dopamine neuron death induced by microtubule dysfunction in a Parkinson's disease model. *J. Cell Biol.* 192, 873–882. <https://doi.org/10.1083/jcb.201009132>
- Clemente, J.C., Ursell, L.K., Parfrey, L.W., Knight, R., 2012. The Impact of the Gut Microbiota on Human Health: An Integrative View. *Cell* 148, 1258–1270.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.035>
- Concetta Bruzzoniti, M., Fungi, M., Sarzanini, C., 2010. Determination of EPA's priority pollutant polycyclic aromatic hydrocarbons in drinking waters by solid phase extraction-HPLC. *Anal. Methods* 2, 739–745. <https://doi.org/10.1039/B9AY00203K>
- Costantini, A.S., Miligi, L., Kriebel, D., Ramazzotti, V., Rodella, S., Scarpi, E., Stagnaro, E., Tumino, R., Fontana, A., Masala, G., Viganò, C., Vindigni, C., Crosignani, P., Benvenuti, A., Vineis, P., 2001.

- A multicenter case-control study in Italy on hematolymphopoietic neoplasms and occupation. *Epidemiol. Camb. Mass* 12, 78–87. <https://doi.org/10.1097/00001648-200101000-00014>
- Cox, L.N., 1994. *Principes de biochimie*. Médecine Sciences Flammarion.
- Crépet, A., Héraud, F., Béchaux, C., Gouze, M.E., Pierlot, S., Fastier, A., Leblanc, J.C., Le Hégarat, L., Takakura, N., Fessard, V., Tressou, J., Maximilien, R., de Sousa, G., Nawaz, A., Zucchini-Pascal, N., Rahmani, R., Audebert, M., Graillet, V., Cravedi, J.P., 2013a. The PERICLES research program: an integrated approach to characterize the combined effects of mixtures of pesticide residues to which the French population is exposed. *Toxicology* 313, 83–93. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2013.04.005>
- Crépet, A., Tressou, J., Graillet, V., Béchaux, C., Pierlot, S., Héraud, F., Leblanc, J.C., 2013b. Identification of the main pesticide residue mixtures to which the French population is exposed. *Environ. Res.* 126, 125–133. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2013.03.008>
- Crosnier, C., Stamatakis, D., Lewis, J., 2006. Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nat. Rev. Genet.* 7, 349–359. <https://doi.org/10.1038/nrg1840>
- Cross, A.J., Harnly, J.M., Ferrucci, L.M., Risch, A., Mayne, S.T., Sinha, R., 2012. Developing a heme iron database for meats according to meat type, cooking method and doneness level. *Food Nutr. Sci.* 3, 905–913. <https://doi.org/10.4236/fns.2012.37120>
- Cross, A.J., Pollock, J.R.A., Bingham, S.A., 2003. Haem, not protein or inorganic iron, is responsible for endogenous intestinal N-nitrosation arising from red meat. *Cancer Res.* 63, 2358–2360.
- Cross, A.J., Sinha, R., 2004. Meat-related mutagens/carcinogens in the etiology of colorectal cancer. *Environ. Mol. Mutagen.* 44, 44–55. <https://doi.org/10.1002/em.20030>
- Crump, K.S., Canady, R., Kogevinas, M., 2003. Meta-analysis of dioxin cancer dose response for three occupational cohorts. *Environ. Health Perspect.* 111, 681–687. <https://doi.org/10.1289/ehp.5831>
- Curtin, N.J., 2012. DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. *Nat. Rev. Cancer* 12, 801–817. <https://doi.org/10.1038/nrc3399>
- Dalleau, S., 2013. Viande rouge et cancer colorectal: le 4-hydroxynonéal est-il le chaînon manquant?
- Dalleau, S., Baradat, M., Guéraud, F., Huc, L., 2013. Cell death and diseases related to oxidative stress: 4-hydroxynonenal (HNE) in the balance. *Cell Death Differ.* 20, 1615–1630. <https://doi.org/10.1038/cdd.2013.138>
- Dang, C.V., 2012. Links between metabolism and cancer. *Genes Dev.* 26, 877–890. <https://doi.org/10.1101/gad.189365.112>
- Demortain, D., 2008. La légitimation par les normes : experts transnationaux, Commission européenne et la régulation des aliments nouveaux. *Sociol. Trav.* 50, 1–14. <https://doi.org/10.4000/sdt.17735>
- Dianov, G.L., Hübscher, U., 2013. Mammalian Base Excision Repair: the Forgotten Archangel. *Nucleic Acids Res.* 41, 3483–3490. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt076>
- Dipple, A., 1995. DNA adducts of chemical carcinogens. *Carcinogenesis* 16, 437–441. <https://doi.org/10.1093/carcin/16.3.437>
- Donaldson, G.P., Lee, S.M., Mazmanian, S.K., 2016. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 20–32. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3552>
- Dow, L.E., O'Rourke, K.P., Simon, J., Tschaharganeh, D.F., van Es, J.H., Clevers, H., Lowe, S.W., 2015. Apc restoration promotes cellular differentiation and reestablishes crypt homeostasis in colorectal cancer. *Cell* 161, 1539–1552. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.033>
- Drosten, M., Barbacid, M., 2020. Targeting the MAPK Pathway in KRAS-Driven Tumors. *Cancer Cell* 37, 543–550. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.03.013>
- Edgar, R., Domrachev, M., Lash, A.E., 2002. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res.* 30, 207–210. <https://doi.org/10.1093/nar/30.1.207>

- Elespuru, R., Sankaranarayanan, K., 2007. New approaches to assessing the effects of mutagenic agents on the integrity of the human genome. *Mutat. Res.* 616, 83–9. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2006.11.015>
- Enck, P., Aziz, Q., Barbara, G., Farmer, A.D., Fukudo, S., Mayer, E.A., Niesler, B., Quigley, E.M.M., Rajilić-Stojanović, M., Schemann, M., Schwille-Kiuntke, J., Simren, M., Zipfel, S., Spiller, R.C., 2016. Irritable bowel syndrome. *Nat. Rev. Dis. Primer* 2, 16014. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.14>
- Erickson, R.P., 2010. Somatic gene mutation and human disease other than cancer: an update. *Mutat. Res.* 705, 96–106. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2010.04.002>
- Eriksson, M., Ambroise, G., Ouchida, A.T., Lima Queiroz, A., Smith, D., Gimenez-Cassina, A., Iwanicki, M.P., Muller, P.A., Norberg, E., Vakifahmetoglu-Norberg, H., 2017. Effect of Mutant p53 Proteins on Glycolysis and Mitochondrial Metabolism. *Mol. Cell. Biol.* 37, e00328-17. <https://doi.org/10.1128/MCB.00328-17>
- Eskenazi, B., Warner, M., Brambilla, P., Signorini, S., Ames, J., Mocarelli, P., 2018. The Seveso accident: A look at 40 years of health research and beyond. *Environ. Int.* 121, 71–84. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.08.051>
- Ewa, B., Danuta, M.-Š., 2017. Polycyclic aromatic hydrocarbons and PAH-related DNA adducts. *J. Appl. Genet.* 58, 321–330. <https://doi.org/10.1007/s13353-016-0380-3>
- Fearnhead, N.S., Wilding, J.L., Bodmer, W.F., 2002. Genetics of colorectal cancer: hereditary aspects and overview of colorectal tumorigenesis. *Br. Med. Bull.* 64, 27–43. <https://doi.org/10.1093/bmb/64.1.27>
- Fearon, E.R., 2011. Molecular Genetics of Colorectal Cancer. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 6, 479–507. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130235>
- Fearon, E.R., Vogelstein, B., 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759–767. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90186-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90186-1)
- Femia, A.P., Dolara, P., Caderni, G., 2004. Mucin-depleted foci (MDF) in the colon of rats treated with azoxymethane (AOM) are useful biomarkers for colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 25, 277–281. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgh005>
- Feng, Y.-L., Shu, L., Zheng, P.-F., Zhang, X.-Y., Si, C.-J., Yu, X.-L., Gao, W., Zhang, L., 2017. Dietary patterns and colorectal cancer risk: a meta-analysis. *Eur. J. Cancer Prev. Off. J. Eur. Cancer Prev. Organ. ECP* 26, 201–211. <https://doi.org/10.1097/CEJ.0000000000000245>
- Fernandez-Salguero, P.M., Hilbert, D.M., Rudikoff, S., Ward, J.M., Gonzalez, F.J., 1996. Aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 140, 173–179. <https://doi.org/10.1006/taap.1996.0210>
- Freed-Pastor, W.A., Mizuno, H., Zhao, X., Langerød, A., Moon, S.-H., Rodriguez-Barrueco, R., Barsotti, A., Chicas, A., Li, W., Polotskaia, A., Bissell, M.J., Osborne, T.F., Tian, B., Lowe, S.W., Silva, J.M., Børresen-Dale, A.-L., Levine, A.J., Bargonetti, J., Prives, C., 2012. Mutant p53 disrupts mammary tissue architecture via the mevalonate pathway. *Cell* 148, 244–258. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.12.017>
- Gatenby, R.A., Gillies, R.J., 2004. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat. Rev. Cancer* 4, 891–899. <https://doi.org/10.1038/nrc1478>
- Gilsing, A.M.J., Berndt, S.I., Ruder, E.H., Graubard, B.I., Ferrucci, L.M., Burdett, L., Weissfeld, J.L., Cross, A.J., Sinha, R., 2012. Meat-related mutagen exposure, xenobiotic metabolizing gene polymorphisms and the risk of advanced colorectal adenoma and cancer. *Carcinogenesis* 33, 1332–1339. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs158>
- Girel, M., 2017. Science et territoires de l'ignorance [WWW Document]. *Libr. Quae*. URL <https://www.quae.com/produit/1416/9782759225934/science-et-territoires-de-l-ignorance> (accessed 6.24.19).
- Glei, M., Klenow, S., Sauer, J., Wegewitz, U., Richter, K., Pool-Zobel, B.L., 2006. Hemoglobin and hemin induce DNA damage in human colon tumor cells HT29 clone 19A and in primary

- human colonocytes. *Mutat. Res.* 594, 162–171.
<https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.08.006>
- Goldman, R., Enewold, L., Pellizzari, E., Beach, J.B., Bowman, E.D., Krishnan, S.S., Shields, P.G., 2001. Smoking increases carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in human lung tissue. *Cancer Res.* 61, 6367–6371.
- GRADY, W.M., CARETHERS, J.M., 2008. Genomic and Epigenetic Instability in Colorectal Cancer Pathogenesis. *Gastroenterology* 135, 1079–1099.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.07.076>
- Graillot, V., Dormoy, I., Dupuy, J., Shay, J.W., Huc, L., Mirey, G., Vignard, J., 2016. Genotoxicity of Cytolethal Distending Toxin (CDT) on Isogenic Human Colorectal Cell Lines: Potential Promoting Effects for Colorectal Carcinogenesis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 6, 34.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00034>
- Grassman, J.A., Masten, S.A., Walker, N.J., Lucier, G.W., 1998. Animal models of human response to dioxins. *Environ. Health Perspect.* 106, 761–775.
- Greider, C.W., Blackburn, E.H., 1985. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* 43, 405–413. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(85\)90170-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(85)90170-9)
- Grootjans, S., Hassannia, B., Delrue, I., Goossens, V., Wiernicki, B., Dondelinger, Y., Bertrand, M.J.M., Krysko, D.V., Vuylsteke, M., Vandenabeele, P., Vanden Berghe, T., 2016. A real-time fluorometric method for the simultaneous detection of cell death type and rate. *Nat. Protoc.* 11, 1444–1454. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.085>
- Grune, T., Davies, K.J.A., 2003. The proteasomal system and HNE-modified proteins. *Mol. Aspects Med.* 24, 195–204. [https://doi.org/10.1016/s0098-2997\(03\)00014-1](https://doi.org/10.1016/s0098-2997(03)00014-1)
- Guan, Q., 2019. A Comprehensive Review and Update on the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *J. Immunol. Res.* 2019, 7247238. <https://doi.org/10.1155/2019/7247238>
- Gunter, M.J., Probst-Hensch, N.M., Cortessis, V.K., Kulldorff, M., Haile, R.W., Sinha, R., 2005. Meat intake, cooking-related mutagens and risk of colorectal adenoma in a sigmoidoscopy-based case-control study. *Carcinogenesis* 26, 637–642. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgh350>
- Hallinger, D.R., Lindsay, H.B., Paul Friedman, K., Suarez, D.A., Simmons, S.O., 2020. Respiriometric Screening and Characterization of Mitochondrial Toxicants Within the ToxCast Phase I and II Chemical Libraries. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 176, 175–192.
<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfaa059>
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hanks, S.K., 1987. Homology probing: identification of cDNA clones encoding members of the protein-serine kinase family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 388–392.
<https://doi.org/10.1073/pnas.84.2.388>
- Hardonnière, K., Saunier, E., Lemarié, A., Fernier, M., Gallais, I., Héliès-Toussaint, C., Mograbi, B., Antonio, S., Bénit, P., Rustin, P., Janin, M., Habarou, F., Ottolenghi, C., Lavault, M.-T., Benelli, C., Sergeant, O., Huc, L., Bortoli, S., Lagadic-Gossmann, D., 2016. The environmental carcinogen benzo[a]pyrene induces a Warburg-like metabolic reprogramming dependent on NHE1 and associated with cell survival. *Sci. Rep.* 6, 30776.
<https://doi.org/10.1038/srep30776>
- Harrad, S., Wang, Y., Sandaradura, S., Leeds, A., 2003. Human dietary intake and excretion of dioxin-like compounds. *J. Environ. Monit. JEM* 5, 224–228. <https://doi.org/10.1039/b211406b>
- Harris, D.L., Washington, M.K., Hood, D.B., Roberts, L.J., Ramesh, A., 2009. Dietary fat-influenced development of colon neoplasia in *Apc* Min mice exposed to benzo(a)pyrene. *Toxicol. Pathol.* 37, 938–946. <https://doi.org/10.1177/0192623309351722>
- Hay, E.D., 1995. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat. (Basel)* 154, 8–20.
<https://doi.org/10.1159/000147748>
- Hecht, S.S., 1999. Tobacco Smoke Carcinogens and Lung Cancer. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 91, 1194–1210. <https://doi.org/10.1093/jnci/91.14.1194>

- Heinen, C.D., 2010. Genotype to phenotype: analyzing the effects of inherited mutations in colorectal cancer families. *Mutat. Res.* 693, 32–45. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2009.09.004>
- Hillegass, J.M., Murphy, K.A., Villano, C.M., White, L.A., 2006. The impact of aryl hydrocarbon receptor signaling on matrix metabolism: implications for development and disease. *Biol. Chem.* 387, 1159–1173. <https://doi.org/10.1515/BC.2006.144>
- Hoeijmakers, J.H., 2001. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411, 366–374. <https://doi.org/10.1038/35077232>
- Höglinger, G.U., Oertel, W.H., Hirsch, E.C., 2006. The rotenone model of parkinsonism--the five years inspection. *J. Neural Transm. Suppl.* 269–272. https://doi.org/10.1007/978-3-211-45295-0_41
- Huber, W., Carey, V.J., Gentleman, R., Anders, S., Carlson, M., Carvalho, B.S., Bravo, H.C., Davis, S., Gatto, L., Girke, T., Gottardo, R., Hahne, F., Hansen, K.D., Irizarry, R.A., Lawrence, M., Love, M.I., MacDonald, J., Obenchain, V., Oleś, A.K., Pagès, H., Reyes, A., Shannon, P., Smyth, G.K., Tenenbaum, D., Waldron, L., Morgan, M., 2015. Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. *Nat. Methods* 12, 115–121. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3252>
- Hubrecht Institute, n.d. Clevers group: The intestinal Crypt.
- Huc, L., Sparfel, L., Rissel, M., Dimanche-Boitrel, M.-T., Guillouzo, A., Fardel, O., Lagadic-Gossmann, D., 2004. Identification of Na⁺/H⁺ exchange as a new target for toxic polycyclic aromatic hydrocarbons. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 18, 344–346. <https://doi.org/10.1096/fj.03-0316fje>
- Huc, L., Tekpli, X., Holme, J.A., Rissel, M., Solhaug, A., Gardyn, C., Moigne, G.L., Gorria, M., Dimanche-Boitrel, M.-T., Lagadic-Gossmann, D., 2007. c-Jun NH₂-Terminal Kinase-Related Na⁺/H⁺ Exchanger Isoform 1 Activation Controls Hexokinase II Expression in Benzo(a)Pyrene-Induced Apoptosis. *Cancer Res.* 67, 1696–1705. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2327>
- Humphries, A., Wright, N.A., 2008. Colonic crypt organization and tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer* 8, 415–424. <https://doi.org/10.1038/nrc2392>
- Hussain, S.P., Amstad, P., Raja, K., Sawyer, M., Hofseth, L., Shields, P.G., Hewer, A., Phillips, D.H., Ryberg, D., Haugen, A., Harris, C.C., 2001. Mutability of p53 Hotspot Codons to Benzo(a)pyrene Diol Epoxide (BPDE) and the Frequency of p53 Mutations in Nontumorous Human Lung. *Cancer Res.* 61, 6350–6355.
- Hwang, H.J., Dornbos, P., LaPres, J.J., 2016. Data on AHR-dependent changes in the mitochondrial proteome in response to ,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Data Brief* 8, 191–195. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2016.05.023>
- IARC, 2018. Dernières données mondiales sur le cancer : le fardeau du cancer atteint 18,1 millions de nouveaux cas et 9,6 millions de décès par cancer en 2018 3.
- Imran, M., Sergent, O., Tête, A., Gallais, I., Chevanne, M., Lagadic-Gossmann, D., Podechard, N., 2018. Membrane Remodeling as a Key Player of the Hepatotoxicity Induced by Co-Exposure to Benzo[a]pyrene and Ethanol of Obese Zebrafish Larvae. *Biomolecules* 8, E26. <https://doi.org/10.3390/biom8020026>
- INCA, 2021. Le côlon - Cancer du côlon [WWW Document]. URL <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-colon/Le-colon> (accessed 6.9.21).
- INCA, 2019. Le cancer colorectal - Les cancers les plus fréquents [WWW Document]. URL <https://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/Les-chiffres-du-cancer-en-France/Epidemiologie-des-cancers/Les-cancers-les-plus-frequents/Cancer-colorectal> (accessed 6.10.21).
- 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, 1182–1191. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200900348>
- Jose, C., Melsner, S., Benard, G., Rossignol, R., 2013. Mitoplasticity: adaptation biology of the mitochondrion to the cellular redox state in physiology and carcinogenesis. *Antioxid. Redox Signal.* 18, 808–849. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4357>

- Jouzel, J.-N., 2019. Pesticides. Comment ignorer ce que l'on sait. Presses de Sciences Po.
- Kalluri, R., Weinberg, R.A., 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* 119, 1420–1428. <https://doi.org/10.1172/JCI39104>
- Kandoth, C., McLellan, M.D., Vandin, F., Ye, K., Niu, B., Lu, C., Xie, M., Zhang, Q., McMichael, J.F., Wyczalkowski, M.A., Leiserson, M.D.M., Miller, C.A., Welch, J.S., Walter, M.J., Wendl, M.C., Ley, T.J., Wilson, R.K., Raphael, B.J., Ding, L., 2013. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* 502, 333–339. <https://doi.org/10.1038/nature12634>
- Kang, Y.P., Ward, N.P., DeNicola, G.M., 2018. Recent advances in cancer metabolism: a technological perspective. *Exp. Mol. Med.* 50, 31. <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0027-z>
- Kaplan, K.B., Burds, A.A., Swedlow, J.R., Bekir, S.S., Sorger, P.K., Näthke, I.S., 2001. A role for the Adenomatous Polyposis Coli protein in chromosome segregation. *Nat. Cell Biol.* 3, 429–432. <https://doi.org/10.1038/35070123>
- Khaleghpour, K., Li, Y., Banville, D., Yu, Z., Shen, S.-H., 2004. Involvement of the PI 3-kinase signaling pathway in progression of colon adenocarcinoma. *Carcinogenesis* 25, 241–248. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgg195>
- Khanna, K.K., Jackson, S.P., 2001. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat. Genet.* 27, 247–254. <https://doi.org/10.1038/85798>
- Khor, B., Gardet, A., Xavier, R.J., 2011. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 474, 307–317. <https://doi.org/10.1038/nature10209>
- Khuder, S.A., Mutgi, A.B., Schaub, E.A., 1998. Meta-analyses of brain cancer and farming. *Am. J. Ind. Med.* 34, 252–260. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0274\(199809\)34:3<252::aid-ajim7>3.0.co;2-x](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0274(199809)34:3<252::aid-ajim7>3.0.co;2-x)
- Kruse, J.-P., Gu, W., 2008. SnapShot: p53 posttranslational modifications. *Cell* 133, 930–930.e1. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.05.020>
- Kuhnle, G.G.C., Bingham, S.A., 2007. Dietary meat, endogenous nitrosation and colorectal cancer. *Biochem. Soc. Trans.* 35, 1355–1357. <https://doi.org/10.1042/BST0351355>
- Kwiatkowska, M., Huras, B., Bukowska, B., 2014a. The effect of metabolites and impurities of glyphosate on human erythrocytes (in vitro). *Pestic. Biochem. Physiol.* 109, 34–43. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.01.003>
- Kwiatkowska, M., Nowacka-Krukowska, H., Bukowska, B., 2014b. The effect of glyphosate, its metabolites and impurities on erythrocyte acetylcholinesterase activity. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 37, 1101–1108. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.04.008>
- Kwiatkowska, M., Reszka, E., Woźniak, K., Jabłońska, E., Michałowicz, J., Bukowska, B., 2017. DNA damage and methylation induced by glyphosate in human peripheral blood mononuclear cells (in vitro study). *Food Chem. Toxicol.* 105, 93–98. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.03.051>
- Lagadic-Gossmann, D., Hardonnière, K., Mograbi, B., Sergent, O., Huc, L., 2019. Disturbances in H+ dynamics during environmental carcinogenesis. *Biochimie* 163, 171–183. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.06.013>
- Landrigan, P.J., Fuller, R., Acosta, N.J.R., Adeyi, O., Arnold, R., Basu, N.N., Baldé, A.B., Bertollini, R., Bose-O'Reilly, S., Boufford, J.I., Breyse, P.N., Chiles, T., Mahidol, C., Coll-Seck, A.M., Cropper, M.L., Fobil, J., Fuster, V., Greenstone, M., Haines, A., Hanrahan, D., Hunter, D., Khare, M., Krupnick, A., Lanphear, B., Lohani, B., Martin, K., Mathiasen, K.V., McTeer, M.A., Murray, C.J.L., Ndahimananjara, J.D., Perera, F., Potočník, J., Preker, A.S., Ramesh, J., Rockström, J., Salinas, C., Samson, L.D., Sandilya, K., Sly, P.D., Smith, K.R., Steiner, A., Stewart, R.B., Suk, W.A., van Schayck, O.C.P., Yadama, G.N., Yumkella, K., Zhong, M., 2018. The Lancet Commission on pollution and health. *Lancet Lond. Engl.* 391, 462–512. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32345-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32345-0)
- Lane, D.P., 1992. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358, 15–16. <https://doi.org/10.1038/358015a0>
- Lee, H.-M., Hwang, K.-A., Choi, K.-C., 2017. Diverse pathways of epithelial mesenchymal transition related with cancer progression and metastasis and potential effects of endocrine disrupting

- chemicals on epithelial mesenchymal transition process. *Mol. Cell. Endocrinol.* 457, 103–113. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.12.026>
- Lee, W.J., Sandler, D.P., Blair, A., Samanic, C., Cross, A.J., Alavanja, M.C.R., 2007. Pesticide use and colorectal cancer risk in the Agricultural Health Study. *Int. J. Cancer* 121, 339–346. <https://doi.org/10.1002/ijc.22635>
- Lengauer, C., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., 1998. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396, 643–649. <https://doi.org/10.1038/25292>
- Leroy, B., Fournier, J.L., Ishioka, C., Monti, P., Inga, A., Fronza, G., Soussi, T., 2013. The TP53 website: an integrative resource centre for the TP53 mutation database and TP53 mutant analysis. *Nucleic Acids Res.* 41, D962-969. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1033>
- Levain, A., Joly, P.B., Barbier, M., Cardon, V., Dedieu, F., Pellissier, F., 2015. Continuous discontinuation – The DDT Ban revisited. Presented at the 6. International Sustainability Transitions Conference “Sustainability transitions and wider transformative change, historical roots and future pathways,” p. np.
- Levêque-Morlais, N., Tual, S., Clin, B., Adjemian, A., Baldi, I., Lebailly, P., 2015. The AGRICulture and CANcer (AGRICAN) cohort study: enrollment and causes of death for the 2005-2009 period. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 88, 61–73. <https://doi.org/10.1007/s00420-014-0933-x>
- Lewis, D.Y., Soloviev, D., Brindle, K.M., 2015. Imaging tumor metabolism using positron emission tomography. *Cancer J. Sudbury Mass* 21, 129–136. <https://doi.org/10.1097/PPO.000000000000105>
- Li, M.-H., Ruan, L.-Y., Zhou, J.-W., Fu, Y.-H., Jiang, L., Zhao, H., Wang, J.-S., 2017. Metabolic profiling of goldfish (*Carassius auratus*) after long-term glyphosate-based herbicide exposure. *Aquat. Toxicol.* 188, 159–169. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.05.004>
- Li, X.-L., Zhou, J., Chen, Z.-R., Chng, W.-J., 2015. p53 mutations in colorectal cancer- molecular pathogenesis and pharmacological reactivation. *World J. Gastroenterol. WJG* 21, 84–93. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i1.84>
- Li, X., Li, Xinlei, Lv, X., Xiao, J., Liu, B., Zhang, Y., 2017. Smad4 Inhibits VEGF-A and VEGF-C Expressions via Enhancing Smad3 Phosphorylation in Colon Cancer. *Anat. Rec. Hoboken NJ* 2007 300, 1560–1569. <https://doi.org/10.1002/ar.23610>
- Liebl, M.C., Hofmann, T.G., 2021. The Role of p53 Signaling in Colorectal Cancer. *Cancers* 13, 2125. <https://doi.org/10.3390/cancers13092125>
- Lièvre, A., n.d. Mutations du gène KRAS et réponse aux anticorps anti-EGFR dans les cancers colorectaux : ce qu'il faut retenir. *MISE AU POINT* 4.
- Lijinsky, W., 1999. N-Nitroso compounds in the diet. *Mutat. Res.* 443, 129–138. [https://doi.org/10.1016/s1383-5742\(99\)00015-0](https://doi.org/10.1016/s1383-5742(99)00015-0)
- Liu, S., Ren, J., ten Dijke, P., 2021. Targeting TGFβ signal transduction for cancer therapy. *Signal Transduct. Target. Ther.* 6, 1–20. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00436-9>
- Lo, J.J., Park, Y.-M.M., Sinha, R., Sandler, D.P., 2020. Association between meat consumption and risk of breast cancer: Findings from the Sister Study. *Int. J. Cancer* 146, 2156–2165. <https://doi.org/10.1002/ijc.32547>
- Lozowicka, B., 2015. Health risk for children and adults consuming apples with pesticide residue. *Sci. Total Environ.* 502, 184–198. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.09.026>
- Lu, J.-W., Ho, Y.-J., Ciou, S.-C., Gong, Z., 2017. Innovative Disease Model: Zebrafish as an In Vivo Platform for Intestinal Disorder and Tumors. *Biomedicines* 5, E58. <https://doi.org/10.3390/biomedicines5040058>
- Lukowicz, C., Ellero-Simatos, S., Régnier, M., Polizzi, A., Lasserre, F., Montagner, A., Lippi, Y., Jamin, E.L., Martin, J.-F., Naylies, C., Canlet, C., Debrauwer, L., Bertrand-Michel, J., Al Saati, T., Théodorou, V., Loiseau, N., Mselli-Lakhal, L., Guillou, H., Gamet-Payrastre, L., 2018. Metabolic Effects of a Chronic Dietary Exposure to a Low-Dose Pesticide Cocktail in Mice: Sexual Dimorphism and Role of the Constitutive Androstane Receptor. *Environ. Health Perspect.* 126, 067007. <https://doi.org/10.1289/EHP2877>

- Lynch, H.T., de la Chapelle, A., 2003. Hereditary colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 348, 919–932. <https://doi.org/10.1056/NEJMra012242>
- Lynch, H.T., Lynch, J.F., Shaw, T.G., Lubiński, J., 2003. HNPCC (Lynch Syndrome): Differential Diagnosis, Molecular Genetics and Management - a Review. *Hered. Cancer Clin. Pract.* 1, 7. <https://doi.org/10.1186/1897-4287-1-1-7>
- Malsy, M., Bitzinger, D., Graf, B., Bundscherer, A., 2019. Staurosporine induces apoptosis in pancreatic carcinoma cells PaTu 8988t and Panc-1 via the intrinsic signaling pathway. *Eur. J. Med. Res.* 24, 5. <https://doi.org/10.1186/s40001-019-0365-x>
- Malumbres, M., Barbacid, M., 2003. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat. Rev. Cancer* 3, 459–465. <https://doi.org/10.1038/nrc1097>
- Martin, O., Scholze, M., Ermler, S., McPhie, J., Bopp, S.K., Kienzler, A., Parissis, N., Kortenkamp, A., 2021. Ten years of research on synergisms and antagonisms in chemical mixtures: A systematic review and quantitative reappraisal of mixture studies. *Environ. Int.* 146, 106206. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106206>
- Martin, O.C.B., Lin, C., Naud, N., Tache, S., Raymond-Letron, I., Corpet, D.E., Pierre, F.H., 2015. Antibiotic suppression of intestinal microbiota reduces heme-induced lipoperoxidation associated with colon carcinogenesis in rats. *Nutr. Cancer* 67, 119–125. <https://doi.org/10.1080/01635581.2015.976317>
- Matich, E.K., Laryea, J.A., Seely, K.A., Stahr, S., Su, L.J., Hsu, P.-C., 2021. Association between pesticide exposure and colorectal cancer risk and incidence: A systematic review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 219, 112327. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112327>
- Mello, S.S., Valente, L.J., Raj, N., Seoane, J.A., Flowers, B.M., McClendon, J., Biegging-Rolett, K.T., Lee, J., Ivanochko, D., Kozak, M.M., Chang, D.T., Longacre, T.A., Koong, A.C., Arrowsmith, C.H., Kim, S.K., Vogel, H., Wood, L.D., Hruban, R.H., Curtis, C., Attardi, L.D., 2017. A p53 Super-tumor Suppressor Reveals a Tumor Suppressive p53-Ptpn14-Yap Axis in Pancreatic Cancer. *Cancer Cell* 32, 460-473.e6. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.09.007>
- Mester, B., Nieters, A., Deeg, E., Elsner, G., Becker, N., Seidler, A., 2006. Occupation and malignant lymphoma: a population based case control study in Germany. *Occup. Environ. Med.* 63, 17–26. <https://doi.org/10.1136/oem.2005.020453>
- Mimura, J., Yamashita, K., Nakamura, K., Morita, M., Takagi, T.N., Nakao, K., Ema, M., Sogawa, K., Yasuda, M., Katsuki, M., Fujii-Kuriyama, Y., 1997. Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* 2, 645–654. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.1997.1490345.x>
- Moreno-Sánchez, R., Rodríguez-Enríquez, S., Saavedra, E., Marín-Hernández, A., Gallardo-Pérez, J.C., 2009. The bioenergetics of cancer: is glycolysis the main ATP supplier in all tumor cells? *BioFactors Oxf. Engl.* 35, 209–225. <https://doi.org/10.1002/biof.31>
- Muller, P.A.J., Vousden, K.H., 2014. Mutant p53 in Cancer: New Functions and Therapeutic Opportunities. *Cancer Cell* 25, 304–317. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.01.021>
- Multigner, L., Ndong, J.R., Giusti, A., Romana, M., Delacroix-Maillard, H., Cordier, S., Jégou, B., Thome, J.P., Blanchet, P., 2010. Chlordecone exposure and risk of prostate cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 28, 3457–3462. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.27.2153>
- Murphy, N., Moreno, V., Hughes, D.J., Vodicka, L., Vodicka, P., Aglago, E.K., Gunter, M.J., Jenab, M., 2019. Lifestyle and dietary environmental factors in colorectal cancer susceptibility. *Mol. Aspects Med.* 69, 2–9. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2019.06.005>
- Murray, I.A., Patterson, A.D., Perdew, G.H., 2014. AH RECEPTOR LIGANDS IN CANCER: FRIEND AND FOE. *Nat. Rev. Cancer* 14, 801–814.
- Musicco, M., Sant, M., Molinari, S., Filippini, G., Gatta, G., Berrino, F., 1988. A case-control study of brain gliomas and occupational exposure to chemical carcinogens: the risk to farmers. *Am. J. Epidemiol.* 128, 778–785. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a115031>
- Nagy, Z., Soutoglou, E., 2009. DNA repair: easy to visualize, difficult to elucidate. *Trends Cell Biol.* 19, 617–629. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2009.08.010>

- Nakayama, M., Oshima, M., 2018. Mutant p53 in colon cancer. *J. Mol. Cell Biol.* 11, 267–276. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjy075>
- Narayan, S., Roy, D., 2003. Role of APC and DNA mismatch repair genes in the development of colorectal cancers. *Mol. Cancer* 2, 41. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-2-41>
- Näthke, I.S., Adams, C.L., Polakis, P., Sellin, J.H., Nelson, W.J., 1996. The adenomatous polyposis coli tumor suppressor protein localizes to plasma membrane sites involved in active cell migration. *J. Cell Biol.* 134, 165–179. <https://doi.org/10.1083/jcb.134.1.165>
- Nault, R., Fader, K.A., Ammendolia, D.A., Dornbos, P., Potter, D., Sharratt, B., Kumagai, K., Harkema, J.R., Lunt, S.Y., Matthews, J., Zacharewski, T., 2016. Dose-Dependent Metabolic Reprogramming and Differential Gene Expression in TCDD-Elicited Hepatic Fibrosis. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 154, 253–266. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfw163>
- Neitzel, C., Demuth, P., Wittmann, S., Fahrer, J., 2020. Targeting Altered Energy Metabolism in Colorectal Cancer: Oncogenic Reprogramming, the Central Role of the TCA Cycle and Therapeutic Opportunities. *Cancers* 12, 1731. <https://doi.org/10.3390/cancers12071731>
- Nenkov, M., Ma, Y., Gaßler, N., Chen, Y., 2021. Metabolic Reprogramming of Colorectal Cancer Cells and the Microenvironment: Implication for Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 6262. <https://doi.org/10.3390/ijms22126262>
- Nguyen, L.H., Goel, A., Chung, D.C., 2020. Pathways of Colorectal Carcinogenesis. *Gastroenterology* 158, 291–302. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.08.059>
- Niedernhofer, L.J., Daniels, J.S., Rouzer, C.A., Greene, R.E., Marnett, L.J., 2003. Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells. *J. Biol. Chem.* 278, 31426–31433. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212549200>
- Normanno, N., Tejpar, S., Morgillo, F., De Luca, A., Van Cutsem, E., Ciardiello, F., 2009. Implications for KRAS status and EGFR-targeted therapies in metastatic CRC. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 6, 519–527. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2009.111>
- O’Keefe, S.J.D., Chung, D., Mahmoud, N., Sepulveda, A.R., Manafe, M., Arch, J., Adada, H., van der Merwe, T., 2007. Why do African Americans get more colon cancer than Native Africans? *J. Nutr.* 137, 175S-182S. <https://doi.org/10.1093/jn/137.1.175S>
- Ollberding, N.J., Wilkens, L.R., Henderson, B.E., Kolonel, L.N., Le Marchand, L., 2012. Meat consumption, heterocyclic amines and colorectal cancer risk: the Multiethnic Cohort Study. *Int. J. Cancer* 131, E1125-1133. <https://doi.org/10.1002/ijc.27546>
- Organization, W.H., Safety, I.P. on C., 2010. The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2009. World Health Organization.
- Orsi, L., Troussard, X., Monnereau, A., Berthou, C., Fenaux, P., Marit, G., Soubeyran, P., Huguet, F., Milpied, N., Leporrier, M., Hemon, D., Clavel, J., 2007. Occupation and lymphoid malignancies: results from a French case-control study. *J. Occup. Environ. Med.* 49, 1339–1350. <https://doi.org/10.1097/JOM.0b013e3181569a49>
- Pancione, M., Remo, A., Colantuoni, V., 2012. Genetic and epigenetic events generate multiple pathways in colorectal cancer progression. *Pathol. Res. Int.* 2012, 509348. <https://doi.org/10.1155/2012/509348>
- Parkin, D.M., 2011. 5. Cancers attributable to dietary factors in the UK in 2010. II. Meat consumption. *Br. J. Cancer* 105 Suppl 2, S24-26. <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.478>
- Patrizi, B., Siciliani de Cumis, M., 2018. TCDD Toxicity Mediated by Epigenetic Mechanisms. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 4101. <https://doi.org/10.3390/ijms19124101>
- Perdry, H., Gutzkow, K.B., Chevalier, M., Huc, L., Brunborg, G., Boutet-Robinet, E., 2018. Validation of Gelbond® high-throughput alkaline and Fpg-modified comet assay using a linear mixed model. *Environ. Mol. Mutagen.* 59, 595–602. <https://doi.org/10.1002/em.22204>
- Pesticides et effets sur la santé, 2021.
- Pfohl-Leskowicz, A., Grosse, Y., Carrière, V., Cugnenc, P.H., Berger, A., Carnot, F., Beaune, P., de Waziers, I., 1995. High levels of DNA adducts in human colon are associated with colorectal cancer. *Cancer Res.* 55, 5611–5616.

- 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, 321–327. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgl127>
- Pisa, L., Goulson, D., Yang, E.-C., Gibbons, D., Sánchez-Bayo, F., Mitchell, E., Aebi, A., van der Sluijs, J., MacQuarrie, C.J.K., Giorio, C., Long, E.Y., McField, M., Bijleveld van Lexmond, M., Bonmatin, J.-M., 2017. An update of the Worldwide Integrated Assessment (WIA) on systemic insecticides. Part 2: impacts on organisms and ecosystems. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0341-3>
- PNUE, 2005.
- Podechard, N., Chevanne, M., Fernier, M., Tête, A., Collin, A., Cassio, D., Kah, O., Lagadic-Gossmann, D., Sergent, O., 2017. Zebrafish larva as a reliable model for in vivo assessment of membrane remodeling involvement in the hepatotoxicity of chemical agents. *J. Appl. Toxicol. JAT* 37, 732–746. <https://doi.org/10.1002/jat.3421>
- Podechard, N., Tekpli, X., Catheline, D., Holme, J.A., Rioux, V., Legrand, P., Rialland, M., Fardel, O., Lagadic-Gossmann, D., Lecureur, V., 2011. Mechanisms involved in lipid accumulation and apoptosis induced by 1-nitropyrene in Hepa1c1c7 cells. *Toxicol. Lett.* 206, 289–299. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.07.024>
- Poland, A., Kende, A., 1976. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin: environmental contaminant and molecular probe. *Fed. Proc.* 35, 2404–2411.
- Poland, A., Knutson, J.C., 1982. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 22, 517–554. <https://doi.org/10.1146/annurev.pa.22.040182.002505>
- Porru, M., Pompili, L., Caruso, C., Biroccio, A., Leonetti, C., 2018. Targeting KRAS in metastatic colorectal cancer: current strategies and emerging opportunities. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* 37, 57. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0719-1>
- Presutti, R., Harris, S.A., Kachuri, L., Spinelli, J.J., Pahwa, M., Blair, A., Zahm, S.H., Cantor, K.P., Weisenburger, D.D., Pahwa, P., McLaughlin, J.R., Dosman, J.A., Freeman, L.B., 2016. Pesticide exposures and the risk of multiple myeloma in men: An analysis of the North American Pooled Project. *Int. J. Cancer* 139, 1703–1714. <https://doi.org/10.1002/ijc.30218>
- Pretlow, T.P., Barrow, B.J., Ashton, W.S., O’Riordan, M.A., Pretlow, T.G., Jurcisek, J.A., Stellato, T.A., 1991. Aberrant Crypts: Putative Preneoplastic Foci in Human Colonic Mucosa. *Cancer Res.* 51, 1564–1567.
- Proctor, R.N., 1995. *The Cancer Wars: How Politics Shapes What We Know And Don’t Know About Cancer.* Basic Books, New York.
- Provost, D., Cantagrel, A., Lebailly, P., Jaffré, A., Loyant, V., Loiseau, H., Vital, A., Brochard, P., Baldi, I., 2007. Brain tumours and exposure to pesticides: a case-control study in southwestern France. *Occup. Environ. Med.* 64, 509–514. <https://doi.org/10.1136/oem.2006.028100>
- Pylayeva-Gupta, Y., Grabocka, E., Bar-Sagi, D., 2011. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat. Rev. Cancer* 11, 761–774. <https://doi.org/10.1038/nrc3106>
- Qiu, W., Wang, X., Leibowitz, B., Yang, W., Zhang, L., Yu, J., 2011. PUMA-mediated apoptosis drives chemical hepatocarcinogenesis in mice. *Hepatology* 54, 1249–1258. <https://doi.org/10.1002/hep.24516>
- R Core Team, 2018. *R: A language and environment for statistical computing.* R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Raby, L., Völkel, P., Le Bourhis, X., Angrand, P.-O., 2020. Genetic Engineering of Zebrafish in Cancer Research. *Cancers* 12, E2168. <https://doi.org/10.3390/cancers12082168>
- Ramesh, A., Walker, S.A., Hood, D.B., Guillén, M.D., Schneider, K., Weyand, E.H., 2004. Bioavailability and risk assessment of orally ingested polycyclic aromatic hydrocarbons. *Int. J. Toxicol.* 23, 301–333. <https://doi.org/10.1080/10915810490517063>
- Rebouillat, P., Vidal, R., Cravedi, J.P., Taupier-Letage, B., Debrauwer, L., Gamet-Payrastre, L., Touvier, M., Deschasaux-Tanguy, M., Latino-Martel, P., Hercberg, S., Lairon, D., Baudry, J., Kesse-Guyot, E., 2021. Prospective association between dietary pesticide exposure profiles and

- postmenopausal breast-cancer risk in the NutriNet-Santé cohort. *Int. J. Epidemiol.* <https://doi.org/10.1093/ije/dyab015>
- Reya, T., Clevers, H., 2005. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 434, 843–850. <https://doi.org/10.1038/nature03319>
- Ritchie, M.E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C.W., Shi, W., Smyth, G.K., 2015. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* 43, e47. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv007>
- Robey, R.B., Weisz, J., Kuemmerle, N.B., Salzberg, A.C., Berg, A., Brown, D.G., Kubik, L., Palorini, R., Al-Mulla, F., Al-Temaimi, R., Colacci, A.M., Mondello, C., Raju, J., Woodrick, J., Scovassi, A.I., Singh, N., Vaccari, M., Roy, R., Forte, S., Memeo, L., Salem, H.K., Amedei, A., Hamid, R.A., Williams, G.P., Lowe, L., Meyer, J., Martin, F.L., Bisson, W.H., Chiaradonna, F., Ryan, E.P., 2015. Metabolic reprogramming and dysregulated metabolism: cause, consequence and/or enabler of environmental carcinogenesis? *Carcinogenesis* 36, S203–S231. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgv037>
- Roig, A.I., Eskiocak, U., Hight, S.K., Kim, S.B., Delgado, O., Souza, R.F., Spechler, S.J., Wright, W.E., Shay, J.W., 2010. Immortalized Epithelial Cells Derived From Human Colon Biopsies Express Stem Cell Markers and Differentiate In Vitro. *Gastroenterology* 138, 1012–1021.e5. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.11.052>
- Rossetti, M.F., Canesini, G., Lorenz, V., Milesi, M.M., Varayoud, J., Ramos, J.G., 2021. Epigenetic Changes Associated With Exposure to Glyphosate-Based Herbicides in Mammals. *Front. Endocrinol.* 12, 671991. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.671991>
- Roth V, 2006.
- Sadanandam, A., Lyssiotis, C.A., Homicsko, K., Collisson, E.A., Gibb, W.J., Wullschleger, S., Ostos, L.C.G., Lannon, W.A., Grotzinger, C., Del Rio, M., Lhermitte, B., Olshen, A.B., Wiedenmann, B., Cantley, L.C., Gray, J.W., Hanahan, D., 2013. A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy. *Nat. Med.* 19, 619–625. <https://doi.org/10.1038/nm.3175>
- Saha, L., 2014. Irritable bowel syndrome: Pathogenesis, diagnosis, treatment, and evidence-based medicine. *World J. Gastroenterol.* WJG 20, 6759–6773. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i22.6759>
- Salovaara, R., Roth, S., Loukola, A., Launonen, V., Sistonen, P., Avizienyte, E., Kristo, P., Järvinen, H., Souchelnytskyi, S., Sarlomo-Rikala, M., Aaltonen, L.A., 2002. Frequent loss of SMAD4/DPC4 protein in colorectal cancers. *Gut* 51, 56–59. <https://doi.org/10.1136/gut.51.1.56>
- Samuels, Y., Wang, Z., Bardelli, A., Silliman, N., Ptak, J., Szabo, S., Yan, H., Gazdar, A., Powell, S.M., Riggins, G.J., Willson, J.K.V., Markowitz, S., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Velculescu, V.E., 2004. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* 304, 554. <https://doi.org/10.1126/science.1096502>
- Sansom, O.J., Reed, K.R., Hayes, A.J., Ireland, H., Brinkmann, H., Newton, I.P., Batlle, E., Simon-Assmann, P., Clevers, H., Nathke, I.S., Clarke, A.R., Winton, D.J., 2004. Loss of Apc in vivo immediately perturbs Wnt signaling, differentiation, and migration. *Genes Dev.* 18, 1385–1390. <https://doi.org/10.1101/gad.287404>
- Sassone-Corsi, M., Raffatellu, M., 2015. No Vacancy: How beneficial microbes cooperate with immunity to provide colonization resistance to pathogens. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 194, 4081–4087. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1403169>
- Saunier, E., Antonio, S., Regazzetti, A., Auzeil, N., Laprèvote, O., Shay, J.W., Coumoul, X., Barouki, R., Benelli, C., Huc, L., Bortoli, S., 2017. Resveratrol reverses the Warburg effect by targeting the pyruvate dehydrogenase complex in colon cancer cells. *Sci. Rep.* 7, 6945. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07006-0>
- Schecter, A., Pavuk, M., Amirova, D.A., Grosheva, E.I., Pöpke, null, Ryan, J.J., Adibi, J., Piskac, A.L., 2002. Characterization of dioxin exposure in firefighters, residents, and chemical workers in the Irkutsk Region of Russian Siberia. *Chemosphere* 47, 147–156. [https://doi.org/10.1016/s0045-6535\(01\)00197-7](https://doi.org/10.1016/s0045-6535(01)00197-7)

- Scully, R., Panday, A., Elango, R., Willis, N.A., 2019. DNA double strand break repair pathway choice in somatic mammalian cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 20, 698–714. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0152-0>
- Segditsas, S., Tomlinson, I., 2006. Colorectal cancer and genetic alterations in the Wnt pathway. *Oncogene* 25, 7531–7537. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210059>
- Sharma, S., O’Keefe, S.J.D., 2007. Environmental influences on the high mortality from colorectal cancer in African Americans. *Postgrad. Med. J.* 83, 583–589. <https://doi.org/10.1136/pgmj.2007.058958>
- Shaw, R.J., Cantley, L.C., 2006. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature* 441, 424–430. <https://doi.org/10.1038/nature04869>
- Sherer, T.B., Richardson, J.R., Testa, C.M., Seo, B.B., Panov, A.V., Yagi, T., Matsuno-Yagi, A., Miller, G.W., Greenamyre, J.T., 2007. Mechanism of toxicity of pesticides acting at complex I: relevance to environmental etiologies of Parkinson’s disease. *J. Neurochem.* 100, 1469–1479. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04333.x>
- Siems, W.G., Zollner, H., Grune, T., Esterbauer, H., 1997. Metabolic fate of 4-hydroxynonenal in hepatocytes: 1,4-dihydroxynonene is not the main product. *J. Lipid Res.* 38, 612–622.
- site cours-pharmacie.com, n.d. URL <https://www.cours-pharmacie.com/images/chaine-respiratoire.png> (accessed 9.6.21).
- Site web histologie des organes, Université de médecine Montpellier-Nîmes [WWW Document], n.d. URL <https://doc-pedagogie.umontpellier.fr/medecine/histologieLV/index.php?module=detail&subaction=desc&vue=4&itm=126&g=1&d=2> (accessed 8.20.21).
- Skog, K.I., Johansson, M.A., Jägerstad, M.I., 1998. Carcinogenic heterocyclic amines in model systems and cooked foods: a review on formation, occurrence and intake. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 36, 879–896. [https://doi.org/10.1016/s0278-6915\(98\)00061-1](https://doi.org/10.1016/s0278-6915(98)00061-1)
- Smith, G., Carey, F.A., Beattie, J., Wilkie, M.J.V., Lightfoot, T.J., Coxhead, J., Garner, R.C., Steele, R.J.C., Wolf, C.R., 2002. Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53--alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 9433–9438. <https://doi.org/10.1073/pnas.122612899>
- Smith, L., Klément, W., Dopavogui, L., de Bock, F., Lasserre, F., Barretto, S., Lukowicz, C., Fougerat, A., Polizzi, A., Schaal, B., Patris, B., Denis, C., Feuillet, G., Canlet, C., Jamin, E.L., Debrauwer, L., Mselli-Lakhal, L., Loiseau, N., Guillou, H., Marchi, N., Ellero-Simatós, S., Gamet-Payrastre, L., 2020. Perinatal exposure to a dietary pesticide cocktail does not increase susceptibility to high-fat diet-induced metabolic perturbations at adulthood but modifies urinary and fecal metabolic fingerprints in C57Bl6/J mice. *Environ. Int.* 144, 106010. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106010>
- Spitsbergen, J.M., Tsai, H.W., Reddy, A., Miller, T., Arbogast, D., Hendricks, J.D., Bailey, G.S., 2000. Neoplasia in zebrafish (*Danio rerio*) treated with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene by two exposure routes at different developmental stages. *Toxicol. Pathol.* 28, 705–715. <https://doi.org/10.1177/019262330002800511>
- Spivak, G., 2015. Nucleotide excision repair in humans. *DNA Repair* 36, 13–18. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.09.003>
- Stephen, A.G., Esposito, D., Bagni, R.K., McCormick, F., 2014. Dragging Ras Back in the Ring. *Cancer Cell* 25, 272–281. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.02.017>
- Stryker, S.J., Carney, J.A., Dozois, R.R., 1987. Multiple adenomatous polyps arising in a continent reservoir ileostomy. *Int. J. Colorectal Dis.* 2, 43–45. <https://doi.org/10.1007/BF01648998>
- Sugimura, T., Wakabayashi, K., Nakagama, H., Nagao, M., 2004. Heterocyclic amines: Mutagens/carcinogens produced during cooking of meat and fish. *Cancer Sci.* 95, 290–299. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2004.tb03205.x>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F., 2021. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36

- Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* 71, 209–249.
<https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Surya, R., Héliès-Toussaint, C., Martin, O.C., Gauthier, T., Guéraud, F., Taché, S., Naud, N., Jouanin, I., Chantelauze, C., Durand, D., Joly, C., Pujos-Guillot, E., Pierre, F.H., Huc, L., 2016. Red meat and colorectal cancer: Nrf2-dependent antioxidant response contributes to the resistance of preneoplastic colon cells to fecal water of hemoglobin- and beef-fed rats. *Carcinogenesis* 37, 635–645. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgw035>
- Sutter, C.H., Olesen, K.M., Bhujji, J., Guo, Z., Sutter, T.R., 2019. AHR Regulates Metabolic Reprogramming to Promote SIRT1-Dependent Keratinocyte Differentiation. *J. Invest. Dermatol.* 139, 818–826. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.10.019>
- Tabatabaei, S.M., Heyworth, J.S., Knuiman, M.W., Fritschi, L., 2010. Dietary benzo[a]pyrene intake from meat and the risk of colorectal cancer. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* 19, 3182–3184.
<https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-10-1051>
- Tauriello, D.V.F., Calon, A., Lonardo, E., Batlle, E., 2017. Determinants of metastatic competency in colorectal cancer. *Mol. Oncol.* 11, 97–119. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12018>
- Tête, A., Gallais, I., Imran, M., Chevanne, M., Liamin, M., Sparfel, L., Bucher, S., Burel, A., Podechard, N., Appenzeller, B.M.R., Fromenty, B., Grova, N., Sergent, O., Lagadic-Gossmann, D., 2018. Mechanisms involved in the death of steatotic WIF-B9 hepatocytes co-exposed to benzo[a]pyrene and ethanol: a possible key role for xenobiotic metabolism and nitric oxide. *Free Radic. Biol. Med.* 129, 323–337. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.09.042>
- Tête, A., Gallais, I., Imran, M., Legoff, L., Martin-Chouly, C., Sparfel, L., Bescher, M., Sergent, O., Podechard, N., Lagadic-Gossmann, D., 2020. MEHP/ethanol co-exposure favors the death of steatotic hepatocytes, possibly through CYP4A and ADH involvement. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 146, 111798. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111798>
- Thiele, I., Swainston, N., Fleming, R.M.T., Hoppe, A., Sahoo, S., Aurich, M.K., Haraldsdottir, H., Mo, M.L., Rolfsson, O., Stobbe, M.D., Thorleifsson, S.G., Agren, R., Bölling, C., Bordel, S., Chavali, A.K., Dobson, P., Dunn, W.B., Endler, L., Hala, D., Hucka, M., Hull, D., Jameson, D., Jamshidi, N., Jonsson, J.J., Juty, N., Keating, S., Nookaew, I., Le Novère, N., Malys, N., Mazein, A., Papin, J.A., Price, N.D., Selkov, E., Sigurdsson, M.I., Simeonidis, E., Sonnenschein, N., Smallbone, K., Sorokin, A., van Beek, J.H.G.M., Weichart, D., Goryanin, I., Nielsen, J., Westerhoff, H.V., Kell, D.B., Mendes, P., Palsson, B.Ø., 2013. A community-driven global reconstruction of human metabolism. *Nat. Biotechnol.* 31, 419–425. <https://doi.org/10.1038/nbt.2488>
- Tie, J., Gibbs, P., Lipton, L., Christie, M., Jorissen, R.N., Burgess, A.W., Croxford, M., Jones, I., Langland, R., Kosmider, S., McKay, D., Bollag, G., Nolop, K., Sieber, O.M., Desai, J., 2011. Optimizing targeted therapeutic development: Analysis of a colorectal cancer patient population with the BRAFV600E mutation. *Int. J. Cancer* 128, 2075–2084.
<https://doi.org/10.1002/ijc.25555>
- Tomasetti, C., Li, L., Vogelstein, B., 2017. Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention. *Science* 355, 1330–1334. <https://doi.org/10.1126/science.aaf9011>
- Tomasetti, C., Vogelstein, B., 2015. Cancer etiology. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. *Science* 347, 78–81.
<https://doi.org/10.1126/science.1260825>
- Tomkiewicz, C., Herry, L., Bui, L.-C., Métayer, C., Bourdeloux, M., Barouki, R., Coumoul, X., 2013. The aryl hydrocarbon receptor regulates focal adhesion sites through a non-genomic FAK/Src pathway. *Oncogene* 32, 1811–1820. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.197>
- Torlakovic, E., Skovlund, E., Snover, D.C., Torlakovic, G., Nesland, J.M., 2003. Morphologic reappraisal of serrated colorectal polyps. *Am. J. Surg. Pathol.* 27, 65–81.
<https://doi.org/10.1097/00000478-200301000-00008>
- Toyokuni, S., 1996. Iron-induced carcinogenesis: the role of redox regulation. *Free Radic. Biol. Med.* 20, 553–566. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02111-6](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02111-6)

- Turesky, R.J., 2007. Formation and biochemistry of carcinogenic heterocyclic aromatic amines in cooked meats. *Toxicol. Lett.* 168, 219–227. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2006.10.018>
- Turner, J.R., 2009. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 799–809. <https://doi.org/10.1038/nri2653>
- Umemoto, A., Kajikawa, A., Tanaka, M., Hamada, K., Seraj, M.J., Kubota, A., Nakayama, M., Kinouchi, T., Ohnishi, Y., Yamashita, K., 1994. Presence of mucosa-specific DNA adduct in human colon: possible implication for colorectal cancer. *Carcinogenesis* 15, 901–905. <https://doi.org/10.1093/carcin/15.5.901>
- van Balen, E., Font, R., Cavallé, N., Font, L., Garcia-Villanueva, M., Benavente, Y., Brennan, P., de Sanjose, S., 2006. Exposure to non-arsenic pesticides is associated with lymphoma among farmers in Spain. *Occup. Environ. Med.* 63, 663–668. <https://doi.org/10.1136/oem.2005.024026>
- van Osch, F.H.M., Voets, A.M., Schouten, L.J., Gottschalk, R.W.H., Simons, C.C.J.M., van Engeland, M., Lentjes, M.H.F.M., van den Brandt, P.A., Smeets, H.J.M., Weijnenberg, M.P., 2015. Mitochondrial DNA copy number in colorectal cancer: between tissue comparisons, clinicopathological characteristics and survival. *Carcinogenesis* 36, 1502–1510. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgv151>
- Vandenberg, L.N., Colborn, T., Hayes, T.B., Heindel, J.J., Jacobs, D.R., Lee, D.-H., Myers, J.P., Shioda, T., Soto, A.M., vom Saal, F.S., Welshons, W.V., Zoeller, R.T., 2013. Regulatory Decisions on Endocrine Disrupting Chemicals Should be Based on the Principles of Endocrinology. *Reprod. Toxicol. Elmsford N* 38, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.02.002>
- Vergara, D., Stanca, E., Guerra, F., Priore, P., Gaballo, A., Franck, J., Simeone, P., Trerotola, M., De Domenico, S., Fournier, I., Bucci, C., Salzet, M., Giudetti, A.M., Maffia, M., 2017. β -Catenin Knockdown Affects Mitochondrial Biogenesis and Lipid Metabolism in Breast Cancer Cells. *Front. Physiol.* 8, 544. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00544>
- Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V.E., Zhou, S., Diaz, L.A., Kinzler, K.W., 2013. Cancer Genome Landscapes. *Science* 339, 1546–1558. <https://doi.org/10.1126/science.1235122>
- Voorneveld, P.W., Kodach, L.L., Jacobs, R.J., Liv, N., Zonneville, A.C., Hoogenboom, J.P., Biemond, I., Verspaget, H.W., Hommes, D.W., de Rooij, K., van Noesel, C.J.M., Morreau, H., van Wezel, T., Offerhaus, G.J.A., van den Brink, G.R., Peppelenbosch, M.P., Ten Dijke, P., Hardwick, J.C.H., 2014. Loss of SMAD4 alters BMP signaling to promote colorectal cancer cell metastasis via activation of Rho and ROCK. *Gastroenterology* 147, 196–208.e13. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.03.052>
- Wan, P.T.C., Garnett, M.J., Roe, S.M., Lee, S., Niculescu-Duvaz, D., Good, V.M., Jones, C.M., Marshall, C.J., Springer, C.J., Barford, D., Marais, R., Cancer Genome Project, 2004. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* 116, 855–867. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00215-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00215-6)
- Warburg, O., 1956. On the origin of cancer cells. *Science* 123, 309–314. <https://doi.org/10.1126/science.123.3191.309>
- Warburg, O., Wind, F., Negelein, E., 1927. THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *J. Gen. Physiol.* 8, 519–530.
- Ward, P.S., Thompson, C.B., 2012. Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate. *Cancer Cell* 21, 297–308. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.02.014>
- Weiss, R.H., 2018. Metabolic Reprogramming in Kidney Cancer. *Semin. Nephrol.* 38, 175–182. <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2018.01.006>
- Whibley, C., Pharoah, P.D.P., Hollstein, M., 2009. p53 polymorphisms: cancer implications. *Nat. Rev. Cancer* 9, 95–107. <https://doi.org/10.1038/nrc2584>
- Whitman, W.B., Coleman, D.C., Wiebe, W.J., 1998. Prokaryotes: The unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 6578–6583.
- Wild, C.P., 2012. The exposome: from concept to utility. *Int. J. Epidemiol.* 41, 24–32. <https://doi.org/10.1093/ije/dyr236>

- Wiseman, M., 2008. The second World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research expert report. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. *Proc. Nutr. Soc.* 67, 253–256. <https://doi.org/10.1017/S002966510800712X>
- Wolfe, W.H., Michalek, J.E., Miner, J.C., Pirkle, J.L., Caudill, S.P., Patterson, D.G., Needham, L.L., 1994. Determinants of TCDD half-life in veterans of operation ranch hand. *J. Toxicol. Environ. Health* 41, 481–488. <https://doi.org/10.1080/15287399409531858>
- Wu, S., Powers, S., Zhu, W., Hannun, Y.A., 2016. Substantial contribution of extrinsic risk factors to cancer development. *Nature* 529, 43–47. <https://doi.org/10.1038/nature16166>
- Wu, S., Zhu, W., Thompson, P., Hannun, Y.A., 2018. Evaluating intrinsic and non-intrinsic cancer risk factors. *Nat. Commun.* 9, 3490. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05467-z>
- Xie, G., Peng, Z., Raufman, J.-P., 2012. Src-mediated aryl hydrocarbon and epidermal growth factor receptor cross talk stimulates colon cancer cell proliferation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 302, G1006-1015. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00427.2011>
- Yao, Y., Sun, S., Wang, J., Fei, F., Dong, Z., Ke, A.-W., He, R., Wang, L., Zhang, L., Ji, M.-B., Li, Q., Yu, M., Shi, G.-M., Fan, J., Gong, Z., Wang, X., 2018. Canonical Wnt Signaling Remodels Lipid Metabolism in Zebrafish Hepatocytes following Ras Oncogenic Insult. *Cancer Res.* 78, 5548–5560. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-3964>
- Yoshino, I., Kometani, T., Shoji, F., Osoegawa, A., Ohba, T., Kouso, H., Takenaka, T., Yohena, T., Maehara, Y., 2007. Induction of epithelial-mesenchymal transition-related genes by benzo[a]pyrene in lung cancer cells. *Cancer* 110, 369–374. <https://doi.org/10.1002/cncr.22728>
- Yu, G., Wang, L.-G., Han, Y., He, Q.-Y., 2012. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *Omics J. Integr. Biol.* 16, 284–287. <https://doi.org/10.1089/omi.2011.0118>
- Yun, J., Rago, C., Cheong, I., Pagliarini, R., Angenendt, P., Rajagopalan, H., Schmidt, K., Willson, J.K.V., Markowitz, S., Zhou, S., Diaz, L.A., Velculescu, V.E., Lengauer, C., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Papadopoulos, N., 2009. Glucose deprivation contributes to the development of KRAS pathway mutations in tumor cells. *Science* 325, 1555–1559. <https://doi.org/10.1126/science.1174229>
- Zhang, B., Halder, S.K., Kashikar, N.D., Cho, Y.-J., Datta, A., Gorden, D.L., Datta, P.K., 2010. Antimetastatic role of Smad4 signaling in colorectal cancer. *Gastroenterology* 138, 969–980.e1–3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.11.004>
- Zhang, L., Shay, J.W., 2017. Multiple Roles of APC and its Therapeutic Implications in Colorectal Cancer. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 109, djw332. <https://doi.org/10.1093/jnci/djw332>
- Zhou, B., Wang, X., Li, F., Wang, Y., Yang, L., Zhen, X., Tan, W., 2017. Mitochondrial activity and oxidative stress functions are influenced by the activation of AhR-induced CYP1A1 overexpression in cardiomyocytes. *Mol. Med. Rep.* 16, 174–180. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6580>
- Zou, X., Ray, D., Aziyu, A., Christov, K., Boiko, A.D., Gudkov, A.V., Kiyokawa, H., 2002. Cdk4 disruption renders primary mouse cells resistant to oncogenic transformation, leading to Arf/p53-independent senescence. *Genes Dev.* 16, 2923–2934. <https://doi.org/10.1101/gad.1033002>
- Zucchini-Pascal, N., Peyre, L., de Sousa, G., Rahmani, R., 2012. Organochlorine pesticides induce epithelial to mesenchymal transition of human primary cultured hepatocytes. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 50, 3963–3970. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.08.009>