



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *l'Université Toulouse III - Paul Sabatier*

Discipline ou spécialité : *Pathologies, Toxicologie, Génétique et Nutrition*

Présentée et soutenue par :
Sabine DALLEAU

Le 06 décembre 2013

Titre :

Viande rouge et Cancer colorectal: le 4-hydroxynonénal est-il le chaînon manquant?

JURY

*Pr Bruno SEGUI
Dr Françoise Guéraud
Dr Laurence Huc*

Ecole doctorale : *SEVAB*
Unité de recherche : *INRA. UMR1331_ToxAlim*
Directeur(s) de Thèse : *Françoise Guéraud & Laurence Huc*
Rapporteurs : *Dr Olivier Dangles
Dr Jean Marc Pascussi
Dr Valérie Lecureur*

REMERCIEMENTS

Merci à mes directrices de thèse, qui, chacune à sa façon, m'ont accompagnée tout au long de ma thèse :

*Françoise, pour m'avoir aidée dans mes pérégrinations diverses et variées et m'avoir encouragée à chaque fois que c'était nécessaire.

*Laurence, pour son aide précieuse, ses conseils avisés, sa rigueur, et sa patience à toute épreuve.

Merci aux filles : Julia, Nadia, Océane, pour être venues à ma rescousse de nombreuses fois et m'avoir accompagnée avec le sourire tout au long de ces trois années. Merci à Maryse, pour les bons moments en temps que co-bureau, pour sa spontanéité, et ses précieuses explications sur le métabolisme, inlassablement fournies malgré leurs difficultés à m'imprégner durablement. Aux autres membres de l'équipe : Jacques, Fabrice, Sylviane, Nathalie, Cécile, et Denis, qui chacun à un moment ou un autre ont fait preuve de leur gentillesse et de leur disponibilité.

Merci au Pr Bruno Ségui, qui a accepté d'être le président de mon jury de thèse ; au Dr Jean-Marc Pascussi et au Pr Olivier Dangles, pour leurs corrections pertinentes de mon manuscrit ; ainsi qu'au Dr Valérie Lecureur pour avoir bien voulu de faire partie de mon jury. Merci également au Dr Anne Negre-Salvayre et au Dr Odile Sergent pour avoir contribué à l'avancement de ma thèse en participant aux différents comités.

Merci enfin, et par-dessus tout, à mes parents.

A ma maman, pour les fous rires et les bons moments. Parce que nous sommes géographiquement séparées, mais que je pense souvent à toi.

A mon papa: merci pour tout ce que tu as fait pour moi, merci de m'avoir prodigué tes conseils, merci pour le temps que tu m'as consacré tout au long ces vingt-cinq années, merci d'avoir cru en moi dans les moments importants. Indéniablement, je ne serai pas là où j'en suis sans toi, et c'est la raison pour laquelle je te dédie ce manuscrit.

RESUME

Le cancer colorectal est la troisième cause de décès par cancer dans le monde. Deux aspects doivent être pris en compte:

- un aspect génétique avec la mutation APC (adenomatous polyposis coli), qui est décrit comme le premier événement génétique conduisant à l'initiation de la cancérogenèse colique ;

- un aspect environnemental avec la consommation de viande rouge, que des études épidémiologiques ont positivement associée à la promotion de la cancérogenèse colique.

Le lien entre la viande rouge et le cancer colorectal impliquerait de la lipoperoxydation et la formation de produits de peroxydation lipidique secondaires. Ces sous-produits peuvent être formés spontanément à partir de la matrice alimentaire ou peuvent résulter de l'oxydation des acides gras insaturés dans l'intestin par le fer héminique libéré de son support protéique pendant le processus de digestion. Dérivé des acides gras n-6, le HNE (4-hydroxynonéal) est bien caractérisé, et est connu pour présenter une forte réactivité vis à vis des macromolécules et avoir une activité biologique.

NRF2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) est un gène maître de la réponse antioxydante, capable d'induire l'expression de certains gènes codant pour des enzymes de détoxification de la cellule, y compris ceux qui sont impliqués dans la détoxification du HNE. NRF2 est connu pour être surexprimé dans divers types de cellules cancéreuses et dans les tumeurs, et est censé conférer à ces cellules un avantage de survie face au stress oxydatif. Ce travail établit pour la première fois qu'un haut niveau de NRF2 peut déjà être détecté dans des cellules pré-néoplasiques, et cela a été associé à de meilleures capacités de détoxification chez ces cellules. Ce statut conférerait un gain de survie aux colonocytes mutés pour Apc en présence de HNE par rapport aux colonocytes sains. Nous montrons également que cette différence de réponse peut être partiellement inversée en prétraitant ces cellules avec du curcumin ou du ptérostilbène, deux inducteurs naturels de NRF2. Ces deux composés engendrent de manière sélective une apoptose accrue chez les cellules mutées pour Apc et une meilleure survie des cellules de type sauvage après l'exposition HNE.

ABSTRACT

Colorectal cancer is the third leading cause of cancer-related death. Two aspects must be taken into account:

- a genetic aspect with *APC* (adenomatous polyposis coli) mutation, which is described to be the first genetic event leading to initiation of colon carcinogenesis;
- an environmental aspect with red meat consumption, which has been positively associated by epidemiologic studies to the promotion of colon carcinogenesis.

The link between red meat and colorectal cancer has been suggested to imply lipoperoxidation and the formation of secondary lipid peroxidation products. These byproducts can be formed spontaneously in food matrix or can result from the oxidation of unsaturated fatty acids in the gut by heme iron liberated from its protein support during digestion process. Derived from n-6 fatty acids, HNE (4-hydroxynonenal) is actually well characterized, exhibiting high reactivity towards macromolecules, and extended biological activities.

NRF2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) is a master gene of antioxidant response, inducing the expression of some genes coding for detoxification enzymes in the cell, included those involved in HNE detoxification. NRF2 is known to be upregulated in various cancer cell types and tumors and is supposed to confer to these cells a survival advantage to manage oxidative stress.

This work establishes for the first time that a higher level of NRF2 can already be detected in preneoplastic cells, and this was associated with better detoxification abilities in preneoplastic cells. This status was shown to confer a gain of survival to *Apc*-mutated colonocytes against HNE compared to wild type colonocytes. We also show that the differential can be partially reversed pretreating these cells with curcumin or pterostilbene, two natural inducers of NRF2. These two compounds selectively generated strong apoptosis in *Apc*-mutated and better survival in wild type cells after HNE exposure.

ABREVIATIONS

AFAP : attenuated adenomatous polyposis coli

AAH : amine aromatique hétérocyclique

AKR : alkenal/alkenone réductase

AKT/PKB : protéine kinase B

ALD : alcoholic liver disease

ALDH : aldéhyde déshydrogénase

ALK-3/BMPRIA : bone morphogenetic protein receptor IA

AOM : azoxyméthane

APC : adenomatous polyposis coli

ASEF : APC-stimulated guanine nucleotide exchange factor

ASK-1 : apoptosis signal-regulating kinase 1

BCRP : breast cancer resistance associated protein

BITC : benzylisothiocyanate

BSO : buthionine-sulfoximine

BTB : tramtrack and bric-à-brac

CBP ou CREB-BP: (cAMP Responsive Element Binding protein) binding protein

C/EBP β : CCAAT/enhancer-binding protein β

CHD6 : chromodomain helicase DNA binding protein 6

CK1/2 : casein kinase 1/2

CLIP-170 : CAP-Gly domain-containing linker protein 1

CMHI : complexe majeur d'histocompatibilité 1

COMT : catéchol O-méthyl-transférase

COX-2 : cyclooxygénase 2

CRM1 : chromosomal maintenance 1

DCC : deleted in colorectal carcinogenesis

DGR : double glycine repeat

DISC : death inducing signaling complex

Dkk1 : dickkopf 1

DMT1 : divalent metal transporter 1

EB1 : end binding protein 1

EGF : epithelial growth factor

EPIC : european prospective investigation into cancer and nutrition

ERK : extracellular regulated kinases

FAP : familial adenomatous polyposis

GCL : glutamate cysteine ligase

GEF : guanine exchange factor

GSH : glutathion

GSK3 : glycogen synthase kinase 3

GST : glutathion S-transferase

HAP : hydrocarbure aromatique polycyclique

HDAC2 : histone déacétylase 2

hDlg : human discs large

HGF : hepatocyte growth factor

HHE : 4-hydroxyhexenal

HNE : 4-hydroxy-2(E)-nonenal

HNPCC : hereditary non polyposis colorectal cancer

HO-1 : heme oxygenase 1

HSF : heat shock factor

HSP : heat shock protein

IAP : inhibitor of apoptotic protein

IKK : I κ B kinase

IQGAP1 : IQ motif containing GTPase activating protein 1

IVR : intervening region

I κ B : inhibitor of κ B

JNK : c-Jun N-terminal kinases

KEAP1 : kelch-like ECH-associated protein 1

LC3 : microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3

LKB1/STK11 : serine threonine kinase 11

LRP : low-density lipoprotein-receptor-related protein

MAPK : mitogen activated protein kinases

MARE : MAf Recognition Element

MCP-1 : monocyte chemotactic protein-1

MCR : mutation cluster region

MDA : malondialdehyde

MDM2 : mouse double minute 2 homolog

MDR : multidrug resistance

MeIQx : 2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline

MKP : MAPK phosphatase

MLH1 : mutL momologue 1

MMP2 : metalloprotéase 2

MMR : mismatch repair

MOMP : mitochondrial outer membrane pore

MRP : multidrug resistance associated protein

MSH2/6 : MutS Homologue 2/6

NAC : *N*-acétyl-cystéine

NAFLD : non alcoholic fatty liver disease

NAT1 : *N*-acétyl-transférase 1

NES : nuclear export signal

NF- κ B : nuclear factor-kappa B

NLS : nuclear localization signal

NO : monoxyde d'azote

NQO : NAD(P)H quinone oxidoreductase

NRF2 : nuclear factor erythroid 2-related factor 2

PALB2 : partner and localizer of BRCA2

PDGF : platelet-derived growth factor

PDGFR : platelet-derived growth factor receptor

PERK : protein *kinase* RNA-like endoplasmic reticulum *kinase*

PGE2 : prostaglandine E2

PhIP : 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine

PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase

PKC : proteine kinase C

PLC : phospholipase C

PPAR : peroxisome proliferator-activated receptor

PTEN : phosphatase and tensin homolog

ROS : reactive oxygen species

RHD : Rel homology domain

RLIP76 : Ral interacting protein 76kDa

SAC : spindle assembly checkpoint

SERCA1 : sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ ATPase 1

SMAD : version humaine de Mothers Against Decapentaplegic homolog

SULT : sulfotransférase

T-BARS : thiobarbituric acid reactive substance

tBHQ : tert-butylhydroquinone

TCF/LEF : T-cell factor/lymphoid enhancement factor

TFR1 : transferrin receptor 1

TGF β : transforming growth factor β

TMPT : thiopurine S-méthyl transferase

TNF α : tumor necrosis factor α

UGT : UDP-glucuronosyltransférase

VEGF : vascular endothelial growth factor

WCRF : World Cancer Research Fund

xCT : glutamate/cysteine exchange transporter

SOMMAIRE

<u>PREAMBULE</u>	15
<u>RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES</u>	16
<u>A. Le cancer colorectal : données générales</u>	17
A.1 Incidence du cancer colorectal	17
A.2 Anatomie du côlon sain et cancéreux	17
A.3 Histologie du colon sain et cancéreux	19
<u>A.3.1 Histologie générale du colon</u>	
<u>A.3.2 Du tissu colorectal sain au carcinome</u>	
<u>B. Les altérations génétiques majeures du cancer colorectal</u>	21
B.1 La mutation APC	22
→ Une forme héréditaire du cancer colorectal : la FAP (Familial Adenomatous Polyposis)	
<u>B.1.1 APC : structure</u>	
<u>B.1.2 APC : fonctions</u>	
<i>B.1.2.a APC et la régulation de la voie Wnt/b-caténine</i>	
<i>B.1.2.b APC et le cytosquelette</i>	
<i>B.1.2.c APC et le contrôle de la ségrégation des chromosomes</i>	
<i>B.1.2.d APC et inflammation</i>	
<i>B.1.2.e APC, cycle cellulaire et apoptose</i>	
<i>B.1.2.f La mutation APC, la souris Min comme modèle d'étude</i>	
→ Apc +/+ et Apc Min/+, les modèles cellulaires	
B.2 Les autres événements initiateurs	35
B.3 Les mutations impliquées dans la progression	36

<u>B.3.1 De la dysplasie au microadénome</u>	
<u>B.3.2 Du microadénome au cancer</u>	
<u>B.3.3 Cancer colorectal : l'hypothèse des cellules souches cancéreuses</u>	
C. <u>Facteurs environnementaux et cancer colorectal</u>	40
C.1 La teneur en graisse	41
C.2 Les hydrocarbures aromatiques polycycliques et les amines hétérocycliques	42
C.3 Le fer héminique	43
<u>C.3.1 Effet indirect du fer : l'hypothèse de la lipoperoxydation</u>	
<u>C.3.2 Effet direct du fer</u>	
C.4 Cancer du côlon et microbiote	47
D. <u>Le HNE : un produit de lipoperoxydation secondaire aux multiples facettes</u>	47
D.1 La réactivité du HNE	48
→ Détoxification du HNE	
D.2 Le HNE, mort cellulaire et physiopathologies	52
<u>D.2.1 HNE et physiopathologies</u>	
<i>D.2.1.a Le syndrome métabolique</i>	
<i>D.2.1.b Les maladies cardiovasculaires</i>	
<i>D.2.1.c Les maladies neurodégénératives</i>	
<i>D.2.1.d Le cancer</i>	
→ HNE et cancer colorectal	
<u>D.2.2 HNE et mort cellulaire</u>	
<i>D.2.2.a L'apoptose</i>	
<i>D.2.2.b Les autres voies de mort cellulaire</i>	

→ Mort cellulaire régulée par le fer

D.3. Rôles physiologiques du HNE.....60

D.3.1 HNE, prolifération et différenciation

D.3.2 HNE et hormesis

E. Lutter contre le stress oxydant : le credo de la cellule.....61

E.1 NRF2.....62

E.1.1 NRF2 : structure

E.1.2 NRF2 : fonction

E.1.3 NRF2 et pathologies : focus sur le lien NRF2-cancer

E.1.3.a Apports de la souris KO Nrf2

E.1.3.b NRF2 oncogénique

E.1.3.c NRF2, facteur protecteur contre le cancer

E.1.4 NRF2 : régulation pré-induction transcriptionnelle

E.1.4.a KEAP1, la voie classique

E.1.4.b p62/SQSTM1

E.1.4.c GSK3

E.1.4.d Epigénétique et micro-ARNs, les voies émergentes

E.1.5 NRF2 : régulation post-induction transcriptionnelle

E.1.5.a KEAP1, le retour

E.1.5.b BACH1

E.1.5.c Les modifications de NRF2

E.2. Les autres gènes importants de la réponse anti-oxydante.....76

E.2.1 NFκB

E.2.1.a NFκB et inflammation

E.2.1.b NFκB et stress oxydant

E.2.2 MAP Kinases

<u>F. Les inducteurs de NRF2</u>	81
F.1 Le HNE	81
F.2 Les autres inducteurs	81
<u>G. Cancer du côlon : focus sur le curcumin et le ptérostilbène</u>	83
G.1 Le curcumin	83
G.2 Le ptérostilbène	85
<u>OBJECTIFS DE MA THESE</u>	87
<u>TRAVAUX ET RESULTATS</u>	91
I. Quelles sont les voies de signalisation susceptibles d'expliquer pourquoi les cellules préneoplasiques résistent mieux au HNE que les cellules saines?	92
Article commenté (publié en 2011 dans Chemical Research in Toxicology) : <u>4-Hydroxy-2(E)-nonenal Metabolism Differs in Apc^{+/+} Cells and in ApcMin^{+/+} Cells: It May Explain Colon Cancer Promotion by Heme Iron</u> <i>Maryse Baradat, Isabelle Jouanin, Sabine Dalleau, Sylviane Taché, Mathilde Gieules, Laurent Debrauwer, Cécile Canlet, Laurence Huc, Jacques Dupuy, Fabrice H. F. Pierre, & Françoise Guéraud</i>	
II. Est-il possible, de rétablir l'équilibre entre cellules saines et cellules préneoplasiques au regard du HNE?	94

Article commenté (soumis en 2015) :

Nuclear factor erythroid 2-related factor-2 activity modulate the differential sensitivity of normal and preneoplastic colonocytes to 4-hydroxynonenal

Sabine Dalleau, Maryse Baradat, Thierry Gauthier, Nathalie Naud, Fabrice Pierre, Françoise Guéraud & Laurence Huc

III. Quel(s) type(s) de mort(s) cellulaire(s) sont initiées dans les deux lignées en réponse au HNE ?.....97

Revue commentée (publié en 2013 dans Cell Death and Differentiation) :

4-hydroxynonenal and mechanisms of cell death

Sabine Dalleau, Maryse Baradat, Françoise Guéraud, & Laurence Huc

DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....100

CONCLUSION.....110

TABLEAUX ET FIGURES

Figure 1 : Anatomie descriptive du côlon-rectum chez l'Homme.....	18
Figure 2a : Paroi colique: structure et histologie.....	19
Figure 2b : Muqueuse colique : structure et histologie.....	20
Figure 3 : La séquence adénome-carcinome dans le cadre du cancer colorectal.....	21
Figure 4 : Structure la protéine APC.....	24
Figure 5 : Vue d'ensemble des fonctions de la protéine APC.....	25
Figure 6 : Implication de la protéine APC dans l'architecture des cryptes du tractus digestif.....	26
Figure 7 : Rôle de la protéine APC et de la voie Wnt dans la régulation de la β -caténine.....	27
Figure 8 : Localisation de la protéine APC dans la cellule en interphase et en mitose.....	30
Figure 9 : Activation de la voie Wnt par COX-2.....	32
Figure 10 : Etablissement des lignées cellulaires murines Apc +/+ et Apc Min/+.....	35
Figure 11 : Sélection clonale vs cellules souches cancéreuses.....	39
Figure 12 : Toxicité du fer sur l'épithélium colique.....	45
Figure 13 : La modulation du taux de fer comme levier thérapeutique dans le cadre cancer du côlon.....	46
Figure 14 : Fonctions réactives du HNE.....	49
Figure 15 : Voies de détoxification du HNE.....	51
Figure 16 : Induction de l'apoptose par le HNE.....	57
Figure 17 : Mort cellulaire induite par la ferritine.....	59
Figure 18 : Structure de la protéine NRF2.....	63
Tableau 1 : Physiopathologies dans lesquelles NRF2 a été identifiée comme ayant un rôle protecteur.....	65
Figure 19 : Structure de la protéine KEAP1.....	69

Figure 20 : modèle « hinge and latch » de l'interaction KEAP1-NRF2.....	70
Figure 21 : Régulation de NRF2 par KEAP1 et activité transcriptionnelle de NRF2.....	72
Figure 22 : Régulation des séquences similaires à ARE par BACH1 et NRF2.....	75
Figure 23 : NF- κ B, stress oxydant, inflammation, et cancer.....	79
Figure 24 : MAPKs et stress oxydant.....	80
Figure 25 : principales classes d'inducteurs de NRF2.....	83
Figure 26 : Différentiel de survie à différentes concentrations de HNE entre les lignées Apc +/+ et Apc Min/+ établi par un test MTT.....	89
Figure 27 : Modèle de sélection darwinienne des cellules mutées pour APC dans le côlon en conditions de stress oxydant.....	89
Figure 28 : Immunolocalisation de p62 dans les cellules Apc +/+ et Apc Min/+, traitées ou non au HNE.....	102
Figure 29 : PCRs évaluant le niveau d'expression de l'Aldh2 et des Akr1b7 et 1b8 dans des cellules coliques de rats nourris avec une charcuterie modèle, enrichie ou non en curcumin.....	104
Figure 30 : Survie de cellules Apc +/+ et Apc Min/+ à un inducteur (rapamycine) et des inhibiteurs (bafilomycine et 3-méthyladénine) d'autophagie, avec ou sans traitement HNE 40 μ M 24H évaluée par un test WST.....	107
Figure 31 : PCRs évaluant le niveau d'expression des PPAR γ et δ en conditions basales et en réponse au HNE 40 μ M _ avec et sans prétraitement au curcumin ou au ptérostilbène chez des Apc +/+ et des Apc Min/+.....	108

PREAMBULE

Ce manuscrit est structuré en trois grandes parties : une première partie générale de rappels bibliographiques sur les notions fondamentales qui seront utilisées ensuite (le cancer du côlon et son épidémiologie, la mutation *APC* et les autres mutations associées au cancer colorectal, NRF2 et les différents gènes impliqués dans le stress oxydant); une seconde partie axée sur les résultats que j'ai obtenus durant ces trois années de thèse et leur valorisation sous forme d'articles publiés ou en préparation ; et une dernière partie s'ouvrant sur les perspectives d'expériences et d'études à venir.

Les trois articles suivants seront présentés :

4-Hydroxy-2(E)-nonenal Metabolism Differs in *Apc*^{+/+} Cells and in *ApcMin*^{+/+} Cells: It May Explain Colon Cancer Promotion by Heme Iron

Maryse Baradat, Isabelle Jouanin, Sabine Dalleau, Sylviane Taché, Mathilde Gieules, Laurent Debrauwer, Cécile Canlet, Laurence Huc, Jacques Dupuy, Fabrice H. F. Pierre, & Françoise Guéraud

Nuclear factor erythroid 2-related factor-2 activity modulate the differential sensitivity of normal and preneoplastic colonocytes to 4-hydroxynonenal

Sabine Dalleau, Maryse Baradat, Thierry Gauthier, Nathalie Naud, Fabrice Pierre, Françoise Guéraud & Laurence Huc

4-hydroxynonenal and mechanisms of cell death

Sabine Dalleau, Maryse Baradat, Françoise Guéraud & Laurence Huc

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

A. LE CANCER COLORECTAL : DONNEES GENERALES

A.1 : Incidence du cancer colorectal

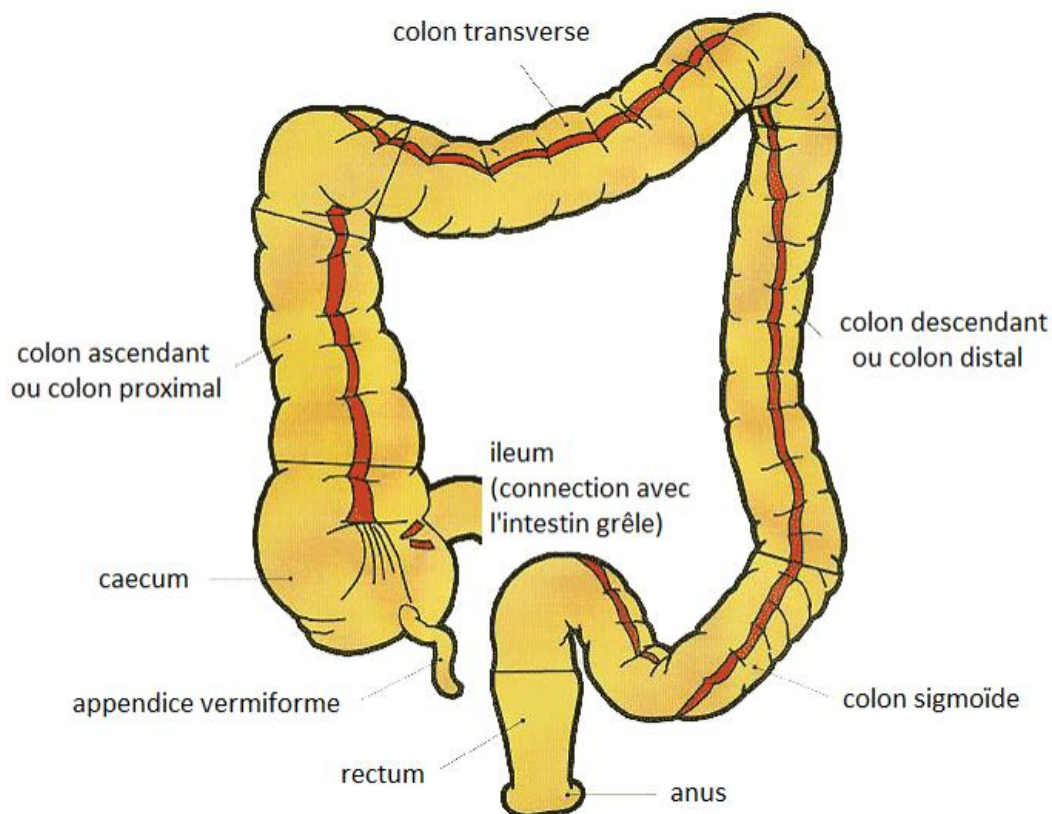
Le cancer colorectal est un problème majeur de santé publique. Il se classe au troisième rang des cancers les plus fréquents, tous sexes confondus (le deuxième chez la femme après le cancer du sein, le troisième chez l'homme après le cancer du poumon et de la prostate). En France, 40500 nouveaux cas ont été diagnostiqués en 2011, tandis que 17500 personnes en sont mortes (« La situation du cancer en France ». 2011 : p1-315, Ed. INCA). A l'échelle mondiale, le constat se confirme avec plus de 1.2 millions de nouveaux cas recensés en 2008 (« Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer : a global perspective », WCRF and AICR, Washington DC, 2007 : 1-537. « Continuous update project report: The association between food, nutrition, and physical activity, and the risk of colorectal cancer », WCRF and AICR, Washington DC, 2010 : 1-855). Le diagnostic s'effectue généralement après coloscopie ou évaluation de la présence de sang dans les selles. Cependant quand le diagnostic est posé le pronostic vital est souvent mauvais : la survie à 5 ans n'excède pas les 60% dans les pays développés, et n'atteint pas les 40% dans les autres (FERLAY *et al.* 2010). En termes de traitement le premier acte est la chirurgie, qui consiste à enlever complètement la zone du côlon porteuse de la tumeur. Elle sera ensuite analysée, ainsi que l'ensemble des éléments retirés au cours de l'opération, au cours d'un examen anatomopathologique qui permettra de décider si une radiothérapie ou une chimiothérapie est ensuite nécessaire.

A.2 Anatomie du côlon sain et cancéreux

Le côlon est la partie terminale du tube digestif. C'est un segment du gros intestin d'environ 1.5m de long compris entre le caecum (d'où part l'appendice vermiforme) et le rectum. Il est composé de quatre parties : le côlon ascendant (situé du côté droit), le côlon transverse, le côlon descendant (situé du côté du côté gauche), et le côlon sigmoïde. La fonction du côlon

est triple : d'une part, la sécrétion de mucus, d'autre part la concentration des matières fécales par absorption de l'eau et des nutriments, et enfin il est le siège d'une activité microbienne permettant la synthèse de la vitamine K et d'acide folique. Son anatomie est illustrée en [figure 1](#).

Dans les pays où l'incidence du cancer colorectal est élevée, environ 60% des cas se développent dans la partie distale du côlon, tandis que dans les pays à faible incidence, la majeure partie des cas se développe dans la partie proximale, suggérant des influences différentes des facteurs de risques sur l'étiologie du cancer colorectal (HAENSZEL and CORREA 1973).



[Figure 1](#) : Anatomie descriptive du côlon-rectum chez l'homme (adapté du schéma original du Dr Serge Nataf, Université de Lyon).

A.3 Histologie du côlon sain et cancéreux

A.3.1 Histologie générale du côlon

L'histologie du côlon-rectum est illustrée en [figure 2 \(a et b\)](#).

La paroi du côlon comprend quatre couches : la muqueuse interne recouverte d'épithélium, la sous-muqueuse, et les couches musculaires circulaires et longitudinales. La muqueuse est faite d'une surface luminale constituée de cellules épithéliales complètement différenciées et ponctuée d'une succession de cryptes, invaginations contenant les cellules souches. Parmi les cellules différenciées on retrouve des cellules absorbantes et des cellules sécrétrices. Les cellules absorbantes, ou entérocytes, sont chargées de récupérer l'eau, les vitamines, et les sels présents dans le contenu provenant de l'intestin grêle. Les cellules sécrétrices, ou cellules calciformes, sont responsables de la sécrétion de mucus alcalin et lubrifiant, riche en glycoprotéines. Le turnover cellulaire dans le tractus gastro-intestinal, qui régit la différenciation d'une cellule souche du fond des cryptes en cellule épithéliale affleurant le lumen, se produit en 2 à 7 jours (CROSNIER *et al.* 2006).

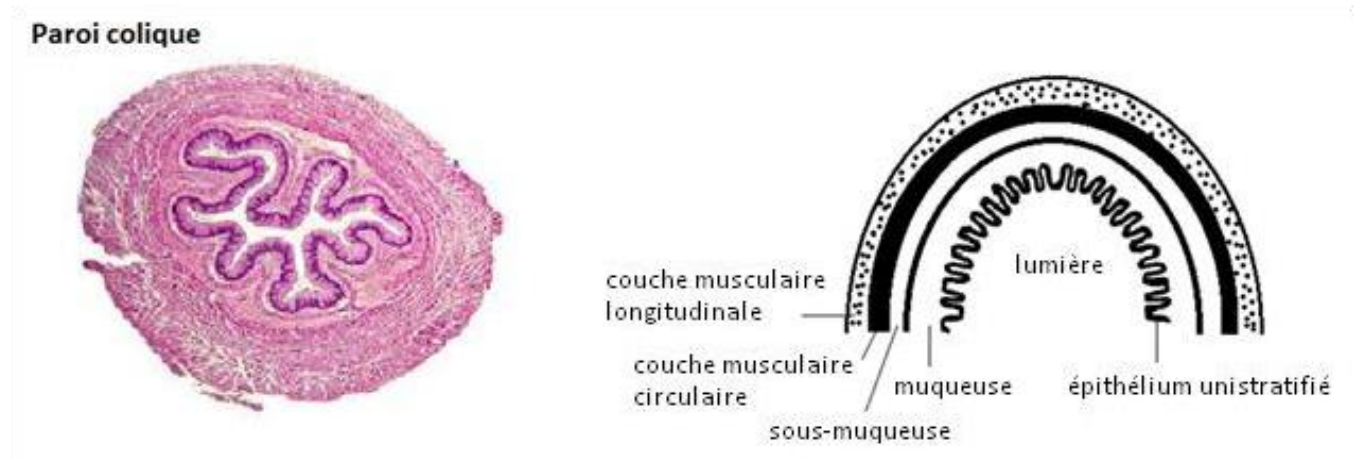


Figure 2a : Paroi colique : structure et histologie.

Muqueuse colique

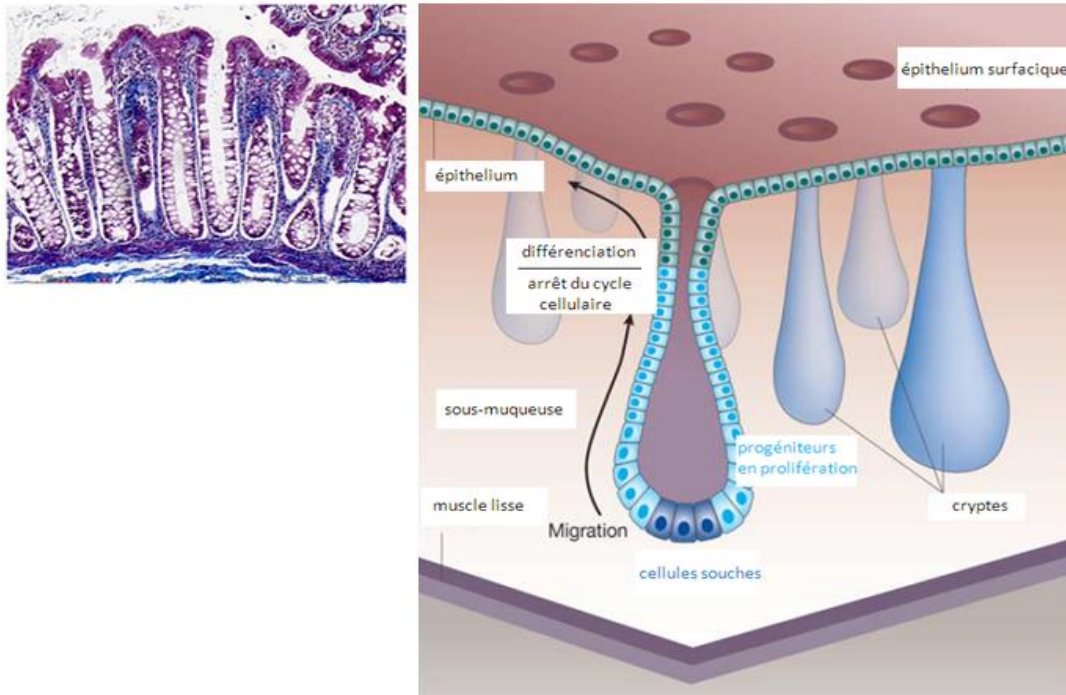


Figure 2b : Muqueuse colique : structure et histologie.

[A.3.2 Du tissu colorectal sain au carcinome](#)

Lorsque les cellules se mettent à proliférer anormalement en échappant aux mécanismes de contrôle et cumulent les anomalies, on parle de dysplasies. Il existe plusieurs grades de dysplasies coliques. Les cryptes aberrantes, ou micro-adénomes, qui se présentent comme des anomalies de surface et constituent les lésions précurseurs de l'adénome plan (PRETLOW *et al.* 1991). L'adénome plan, ou adénome non polypoïde, est une lésion érythémateuse de l'ordre du centimètre de diamètre, d'architecture tubuleuse, que l'on retrouve essentiellement entre le côlon proximal et le côlon distal avec une prédominance pour le côlon transverse. On peut distinguer deux types d'adénomes plans : l'adénome festonné, qui en réalité n'est strictement plan que dans la moitié des cas environ, tandis que dans l'autre moitié il est sessile (posé sur la muqueuse) ou pédiculé (avec un « pied » l'ancrant dans la paroi colique)(TORLAKOVIC *et al.* 2003); et l'adénome plan tubuleux dont l'examen macroscopique révèle souvent que la lésion est supérieure au centimètre et qui siège essentiellement dans le caecum et le rectum. A l'opposé des adénomes plans, les adénomes polypoïdes ou polypes, arrondis ou polylobés, sessiles ou pédiculés, peuvent mesurer de

2mm à plus de 60mm et se localisent au niveau du rectum et du côlon sigmoïde. Le risque de dégénérescence maligne de ces polypes adénomateux est important, aussi bien dans les cas sporadiques que dans les cas de polyposes familiales héréditaires. Sur le plan moléculaire, la filiation adénome-cancer a été proposée en 1990 par Fearon et Vogelstein (FEARON and VOGELSTEIN 1990) (figure 3).

B. LES ALTERATIONS GENETIQUES MAJEURES DU CANCER COLORECTAL

Du colonoocyte sain au colonoocyte malin, du tissu normal au tissu tumoral, la progression est séquentielle et plusieurs étapes sont franchies : ainsi on estime qu'une tumeur colorectale « classique » contient au moins 11000 altérations génomiques (GRADY and MARKOWITZ 2002). De plus, des altérations épigénétiques existent (hyperméthylations d'ilôts CpG par exemple) et jouent également un rôle non négligeable dans l'initiation et la progression tumorale, rôle que nous ne développerons pas ici (voir à ce sujet l'article récent de Hammoud SS, publié en 2013 dans Current Opinion in Cellular Biology (HAMMOUD *et al.* 2013)) (figure 3).

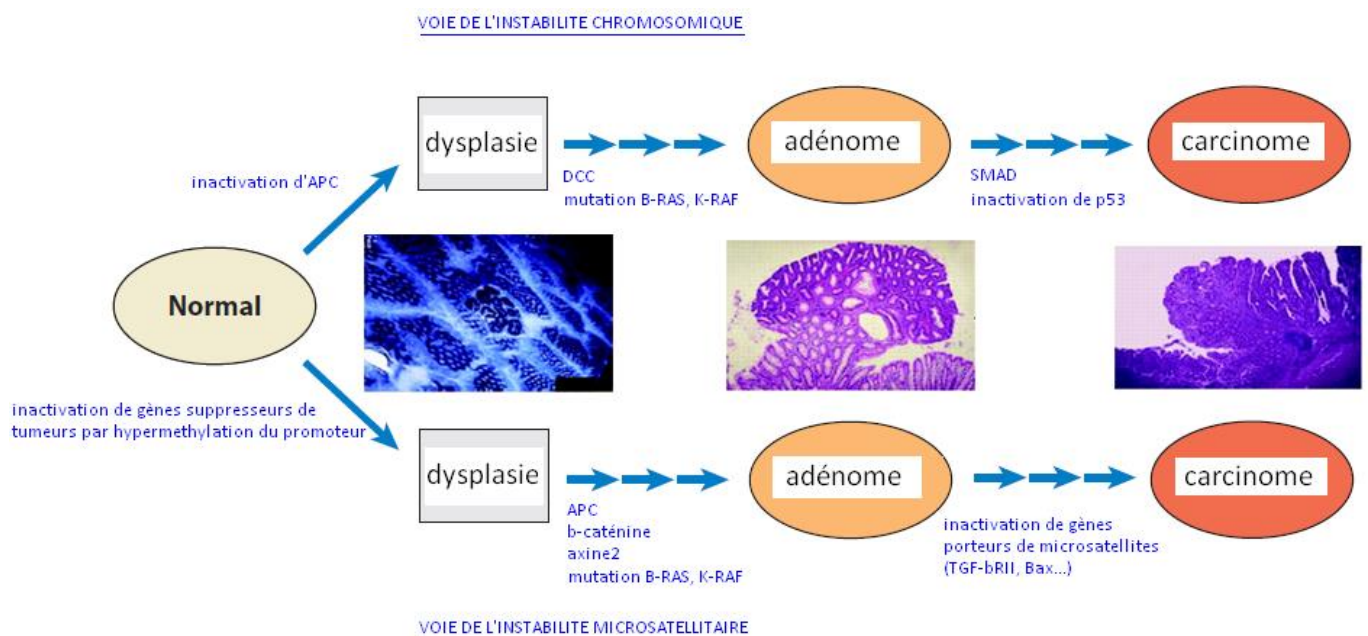


Figure 3 : La séquence adénome-carcinome dans le cadre du cancer colorectal. APC: adenomatous polyposis coli ; DCC : deleted in colorectal carcinogenesis ; MAPK : mitogen activated protein kinase ; SMAD : version humaine de Mothers Against Decapentaplegic homolog ; TGFβ: transforming growth factor β.

B.1 La mutation APC

La mutation initiatrice la plus fréquente porte sur le gène *APC* (Adenomatous Polyposis Coli): elle est présente dans pratiquement 100% des cas héréditaires de cancer du côlon et dans 70 à 80% des cas sporadiques (c'est-à-dire affectant les individus de façon isolée, hors du cadre de l'hérédité génétique). Elle correspond au premier « hit », celle qui selon la théorie de Knudson (KNUDSON 1971) va constituer la première altération par laquelle le développement de l'adénome colorectal débute. *APC* est un gène suppresseur de tumeurs situé sur le locus 5q21 chez l'homme. Il code une protéine cytoplasmique à domaines multiples d'environ 2843 acides aminés (~310kDa), impliquée dans plusieurs fonctions cellulaires telles que la régulation de la voie Wnt, le maintien de l'intégrité du cytosquelette, le contrôle de la ségrégation des chromosomes, ou encore l'inflammation et la régulation du cycle cellulaire (AOKI *et al.*, 2007) (figure 5). Plus d'une centaine de mutations du gène *APC* ont été caractérisées, et la position de la mutation pourrait influencer la sévérité de la maladie (FRIEDL *et al.* 2001).

➔ Une forme héréditaire de cancer colorectal : la FAP (familial adenomatous polyposis)

La polypose adénomateuse familiale est une maladie génétique autosomique dominante. Les cas se caractérisent cliniquement par la présence de 100 à 1000 polypes dans le côlon et le rectum des individus atteints, apparaissant spontanément entre 10 et 40 ans. Il existe aussi une forme atténuée de FAP (AFAP ou Attenuated FAP) caractérisée par un nombre de polypes inférieur à 100. La probabilité subséquente de développer un cancer du côlon étant étroitement relié au nombre de polypes, dans les familles à risque une coloscopie annuelle est recommandée dès l'adolescence (DEBINSKI *et al.* 1996). Dans les cas de FAP, la mutation *APC* est germinale et aboutit le plus souvent à la synthèse d'une protéine tronquée qui perd sa fonction (KERR *et al.* 2013). La plupart des mutations porte sur les codons 1061 et 1309 (soit essentiellement dans la région MCR (Mutation Cluster Region) (cf figure 4), mais de manière plus générale, les mutations se produisent entre les codons 200 et 1600. Leur position être corrélée au deuxième « hit » qui va mener les individus déjà porteurs de la mutation héréditaire à développer un cancer du côlon : ainsi, si une mutation germinale est portée entre les codons 1194 et 1392, la perte de l'autre allèle d'*APC* comme deuxième évènement semble fréquente ; sinon, le deuxième évènement semble plutôt être une

mutation non-sens ou une mutation affectant le cadre de lecture (BEROUD and SOUSSI 1996; LAMLUM *et al.* 1999; MIYOSHI *et al.* 1992).

B.1.1 APC : structure

La protéine APC est composée de plusieurs domaines (figure 4):

-un domaine d'oligomérisation situé en N-ter.

-une région Armadillo, séquence typique d'une quarantaine d'acides aminés contenant un nombre variable de répétitions en tandem. Dans APC, ce domaine se lie à la sous-unité régulatrice B56 de la phosphatase PP2A, phosphatase qui serait un antagoniste de la kinase GSK3 impliquée dans la régulation de la β -caténine (SEELING *et al.* 1999). Le domaine Armadillo permet également l'interaction avec les protéines ASEF et IQGAP1 participant à son ancrage au cytosquelette.

-un domaine de liaison à la β -caténine qui comprend 3 répétitions d'une séquence de 15 acides aminés et 7 répétitions d'une séquence de 20 acides aminés portant chacun une signature spécifique. Ce domaine contient le MCR.

-un domaine basique, riche en résidus arginines, lysines et prolines, impliqué dans la liaison aux microtubules.

-en C-ter des sites de liaison à des protéines telles qu'EB1 (End Binding protein 1), impliquée dans la liaison d'APC aux microtubules, ou hDlg (human Discs large) connue pour inhiber le passage de la phase G0 à G1 du cycle cellulaire (ISHIDATE *et al.* 2000).

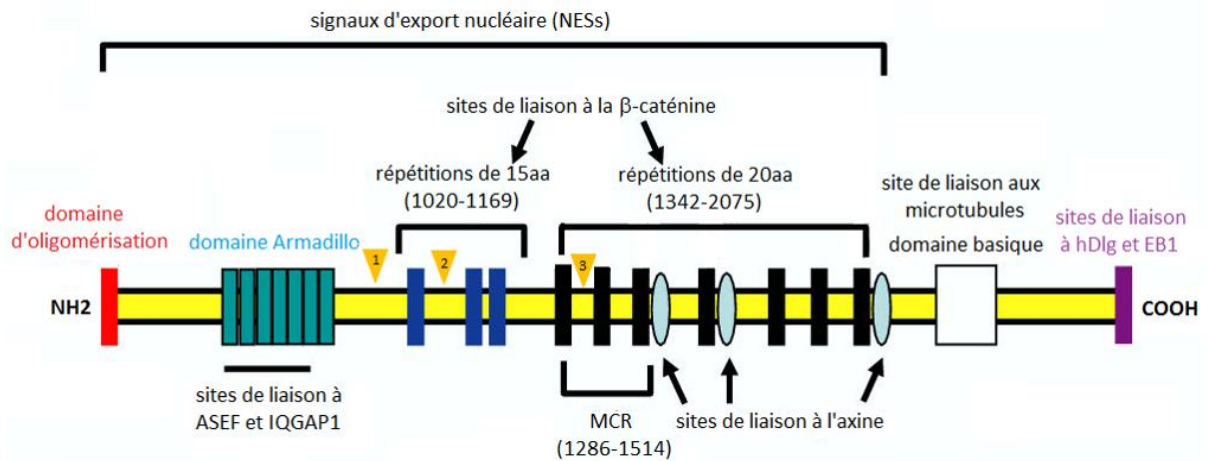


Figure 4 : Structure la protéine APC. Le triangle 1 indique la position de la mutation chez la souris Min, générant une protéine tronquée de 850aa. Les triangles 2 et 3 indiquent la position des mutations les plus fréquentes dans les cas de FAP, générant des protéines tronquées de respectivement 1061 et 1309aa (librement adapté de Narayan & Roy, *Molecular Cancer* 2003). ASEF : APC-stimulated guanine nucleotide exchange factor; hDlg : human disc large; EB1 : end binding protein 1 ; IQGAP1 : IQ motif containing GTPase activating protein 1; MCR : mutation cluster region.

B.1.2 APC : fonctions

En 1997, Oshima et ses collaborateurs montrent en générant une souris $Apc^{\Delta 716}$ que la seule perte d'Apc engendre la formation spontanée de polypes (OSHIMA *et al.* 1997). APC est une protéine aux multiples fonctions, impliquée dans la voie de signalisation Wnt, mais également dans la migration et l'adhésion cellulaires ainsi que dans la ségrégation des chromosomes (HANSON *et al.*, 2005). Or aussi bien la prolifération ou la motilité cellulaire que l'instabilité chromosomique sont connues pour participer à la tumorigenèse (figure 5).

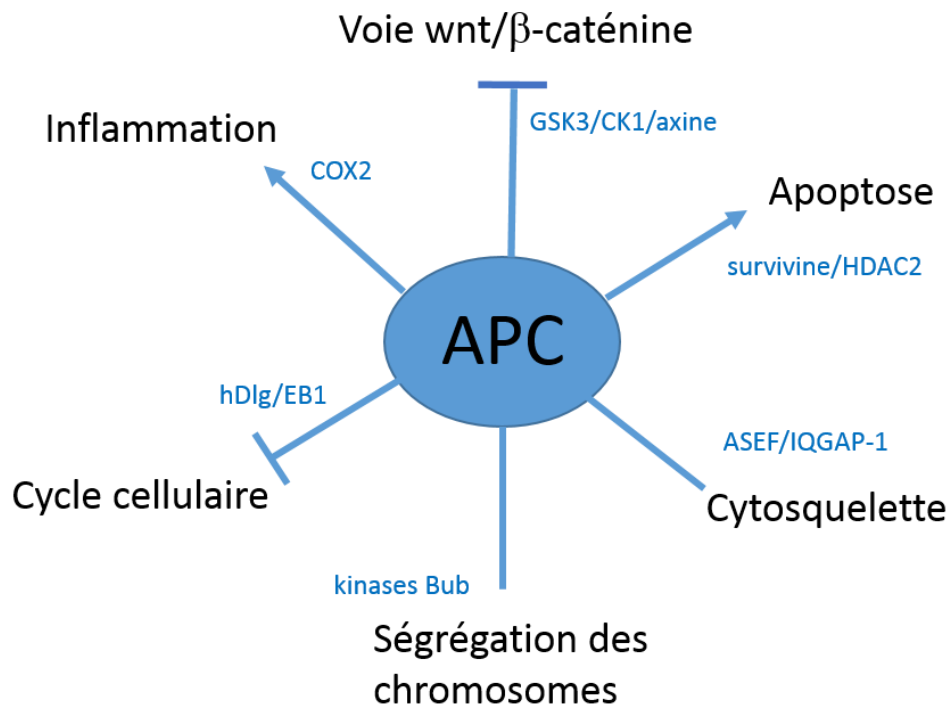


Figure 5 : Vue d'ensemble des fonctions de la protéine APC. ASEF : APC-stimulated guanine nucleotide exchange factor ; CK1 : casein kinase 1 ; COX-2 : cyclooxygénase 2 ; EB1 : end binding protein 1 ; GSK3 : glycogen synthase kinase 3 ; HDAC2 : histone deacetylase 2 ; hDlg : human disc large ; IQGAP1 : IQ motif containing GTPase activating protein 1 .

B.1.2.a APC et la régulation de la voie Wnt/β-caténine

APC est l'un des régulateurs de la voie Wnt/β-caténine (CADIGAN and LIU 2006). La voie Wnt est une voie majeure de l'embryogenèse (mise en place des axes de polarité chez la drosophile ou le xénope par exemple) et intervient également dans le maintien à l'état indifférencié des cellules souches. Elle a aussi été identifiée comme étant activement impliquée dans le renouvellement de l'épithélium colique et de l'architecture des cryptes (BURGESS *et al.* 2011) (figure 6). Ainsi, il a été montré qu'une inhibition du signal Wnt en utilisant un antagoniste spécifique de Wnt, Dkk1 (Dickkopf1), a pour conséquence une diminution de la prolifération épithéliale dans le côlon, qui s'accompagne d'une dégénération progressive de son architecture, avec en sept jours une perte de la structure des cryptes (KUHNERT *et al.* 2004).

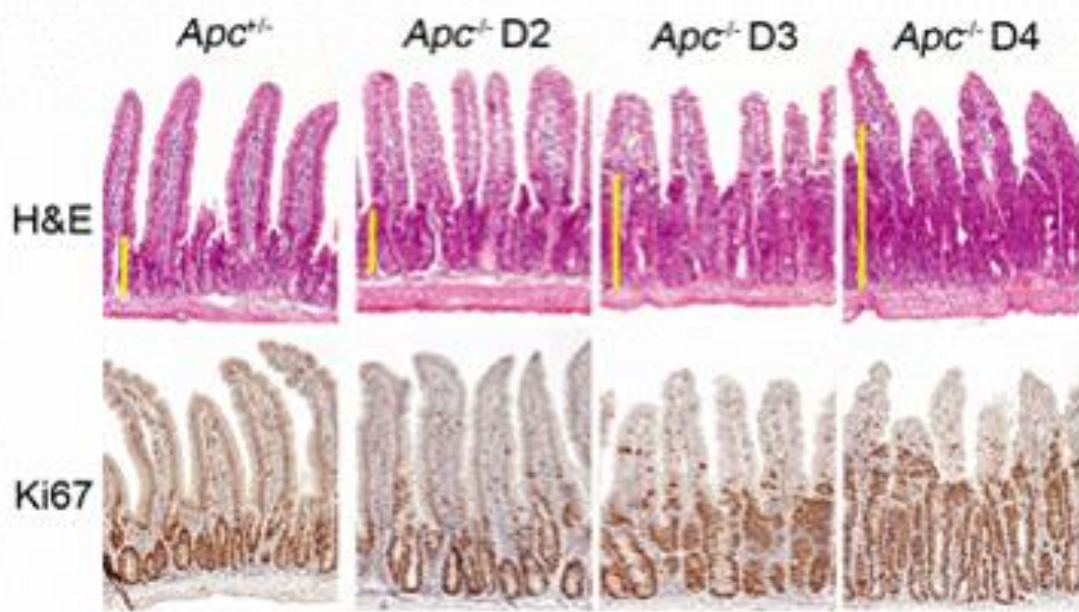


Figure 6 : Implication de la protéine APC dans l'architecture des cryptes du tractus digestif. H&E : Hématoxyline et Eosine. Ki67 : marqueur de prolifération. +/- : mutation Apc hétérozygote ; -/- : mutation Apc homozygote. D1, D2, D3 : Jour 1, Jour2, Jour3 (source : Institut Cochin).

En l'absence de signal Wnt, APC forme dans le cytoplasme un « complexe de destruction » avec la β -caténine, la GSK3 (Glycogen Synthase Kinase 3), la CK1 (Casein Kinase 1), et l'axine _ qui joue le rôle de protéine adaptatrice. La GSK3 et la CK1 sont des sérines/thréonines kinases qui vont phosphoryler la β -caténine, et en faire une cible pour le complexe ubiquitine-ligase E3 et la voie de dégradation protéasomale. APC est également phosphorylée au cours de ce processus, mais cette phosphorylation renforce son affinité pour la β -caténine permettant une dégradation plus efficace de celle-ci (HA *et al.* 2004).

L'activation de la voie Wnt débute par la liaison de Wnt à ses co-récepteurs transmembranaires : Frizzled et LRP5/6 (Low-density lipoprotein-Receptor-related Protein 5/6). Les facteurs Wnt sont une famille de 19 glycoprotéines sécrétées qui ont un rôle crucial dans la régulation de diverses fonctions cellulaires telles que la prolifération, la survie, la migration, la polarité, ou encore le renouvellement des cellules souches. Le signal Wnt peut notamment être régulé par des facteurs inhibiteurs sécrétés (les

WIFs, pour Wnt Inhibitory Factors), et des récepteurs sécrétés présentant des similitudes avec Frizzled (les SFRPs, pour Secreted Frizzled-Related Proteins), qui agissent tous comme compétiteurs de l'interaction Wnt/Frizzled. Lorsque cette interaction a lieu, elle permet en aval la dissociation de l'axine, de la GSK3, et d'APC, du « complexe de destruction », et induit par défaut la stabilisation de la β -caténine. La β -caténine s'accumule dans le cytoplasme puis est transloquée vers le noyau où elle se lie au facteur de transcription TCF/LEF (T-cell factor/lymphoid enhancement factor) et, avec la coopération entre autres des facteurs Legless/Bcl-9 et Pygopus, elle active la transcription de gènes cibles impliqués dans la survie cellulaire, la prolifération, ou la différenciation, tels que les facteurs régulateurs du cycle cellulaire c-myc et cycline D1. Ainsi la mutation APC a pour conséquence une activation constitutive de la voie Wnt et de l'activité transcriptionnelle de la β -caténine, ce qui induit l'expression constitutive d'oncogènes (c-myc par exemple) (figure 7).

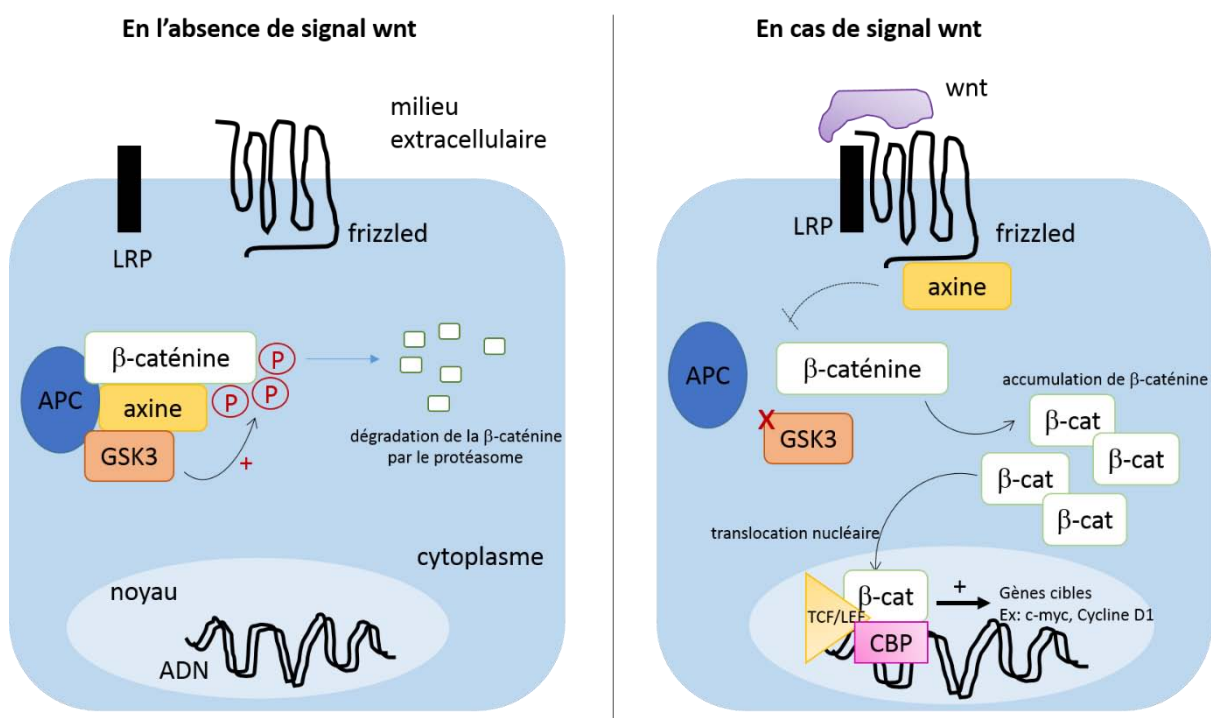


Figure 7 : Rôle de la protéine APC et de la voie Wnt dans la régulation de la β -caténine: dégradation de la β -caténine en absence de signal Wnt [à gauche], et activation de la fonction transcriptionnelle de la β -caténine par translocation nucléaire en présence d'un signal Wnt [à droite]. CBP: CREB binding protein; GSK3 : glycogen synthase kinase 3; LRP : low-density lipoprotein-receptor-related protein; TCF/LEF : T-cell factor/lymphoid enhancement factor.

APC intervient également dans la régulation nucléaire de l'activité β -caténine. Les données actuellement disponibles sur cet aspect ont été exhaustivement décrites par K.L. Neufeld dans un article publié en 2009 (NEUFELD 2009). En effet, APC, en plus des domaines précédemment cités, contient également dans sa région C-ter deux signaux potentiels de localisation nucléaire (NLS) et un domaine connu pour améliorer l'import nucléaire, ainsi que dans ses régions centrale et N-ter cinq signaux d'export nucléaire (NES). En l'absence de ces séquences, le poids moléculaire élevé, 310kDa, d'APC serait rédhibitoire pour une entrée passive dans le noyau, les pores nucléaires filtrant toute protéine dépassant les 30-50kDa. Une fois dans le noyau, APC agirait d'une part en séquestrant la β -caténine du complexe d'activation transcriptionnelle dont elle fait partie. Cette séquestration passe probablement par une compétition avec TCF/LEF pour la fixation à la β -caténine comme semblent l'indiquer les données *in vitro* sur le sujet. D'autre part, pour pouvoir interagir efficacement avec la β -caténine, il s'avère que le facteur LEF doit être phosphorylé par la CK2 (casein kinase 2). Or APC pourrait venir se lier à la CK2 et l'inactiver, empêchant celle-ci de phosphoryler LEF, et le laissant donc sous une forme moins affine pour la β -caténine. Cet aspect de la régulation de la β -caténine par APC est d'autant plus intéressant que dans de nombreux cancers du côlon, APC tronqué pourrait être incapable d'inactiver CK2, ce qui contribuerait à une activité β -caténine libre de toute régulation négative et donc une voie Wnt constitutivement activée. Par ailleurs, il a été montré qu'APC est aussi capable de se lier au facteur d'export nucléaire CRM1 (Chromosomal Maintenance 1). Cette liaison semble nécessaire à son retour vers le cytoplasme et à la dégradation de la β -caténine. Ainsi APC est capable de réguler l'activité de la β -caténine à la fois en séquestrant la protéine dans le cytoplasme et en limitant la durée du signal β -caténine dans le noyau.

B.1.2.b APC et le cytosquelette

Le cytosquelette est globalement composé de trois constituants : des filaments d'actine, des microtubules de tubulines, et des filaments intermédiaires de kératine. APC a un rôle majeur dans le maintien de l'intégrité du cytosquelette, ce qui en fait une protéine importante de la régulation de la polarité et de la migration cellulaires. Ainsi il a été montré qu'une

surexpression d'APC dans des cellules souches embryonnaires murines induit une migration désordonnée des cellules épithéliales intestinales (WONG *et al.* 1996), tandis qu'une perte d'APC ou l'expression d'un mutant tronqué d'APC diminue leurs capacités de migration (ANDREU *et al.* 2005)(MAHMOUD *et al.* 1997).

Il existe deux liens clés entre APC et cytosquelette :

-le premier est ASEF (APC-Stimulated guanine nucleotide Exchange Factor)(KAWASAKI *et al.* 2003; KAWASAKI *et al.* 2000). ASEF est une protéine à activité GEF (Guanine Exchange Factor) avec laquelle APC interagit via son domaine Armadillo_ et non son domaine N-ter, ce qui signifie que cette interaction pourrait n'être pas affectée lorsque APC est tronquée (KAWASAKI *et al.* 2003). L'interaction APC/ASEF active ASEF qui peut en retour activer les protéines cdc42 ou Rac1, deux rho-GTPases régulant la polymérisation et l'organisation de l'actine ainsi que l'adhésion cellulaire, puisque l'on retrouve ces protéines au niveau des complexes d'adhésion à la matrice extracellulaire (ALLEN *et al.* 1997). A noter qu'APC pourrait également se lier seul à l'actine, directement par son domaine C-ter, mais cette possibilité, basée sur des expériences de surexpression de la protéine, nécessite d'être confirmée (MOSELEY *et al.* 2007).

-le second est IQGAP1 (IQ motif containing GTPase Activating Protein 1). Il interagit également avec le domaine Armadillo de APC et le lie aux microtubules (WATANABE *et al.* 2004). Dans les cellules en migration, IQGAP1 est capable de recruter APC sur des sites spécifiques où ils forment un complexe avec CLIP-170 (CAP-Gly domain-containing Linker Protein 1), une protéine de stabilisation des microtubules, et cdc42 ou Rac1 activé (WATANABE *et al.* 2004). Parallèlement, APC contient dans son domaine N-ter un site de liaison à la protéine EB1, avec laquelle il serait susceptible d'interagir et qui intervient aussi dans la stabilisation des microtubules (MORRISON *et al.* 1998; NAKAMURA *et al.* 2001).

B.1.2.c APC et le contrôle de la ségrégation des chromosomes

Durant la mitose, APC se localise d'une part au niveau des kinétochores, un complexe de protéines qui s'assemble près des centromères des chromosomes mitotiques, où il régulerait l'attachement correct des chromosomes au fuseau mitotique et participerait ainsi à l'un des nombreux points de contrôle de la mitose : le « spindle assembly checkpoint » ou SAC. Il se

localise d'autre part au niveau des centrosomes, point de polymérisation des microtubules, essentiels à la formation de la plaque équatoriale et au déplacement polaire des chromosomes (figure 8).

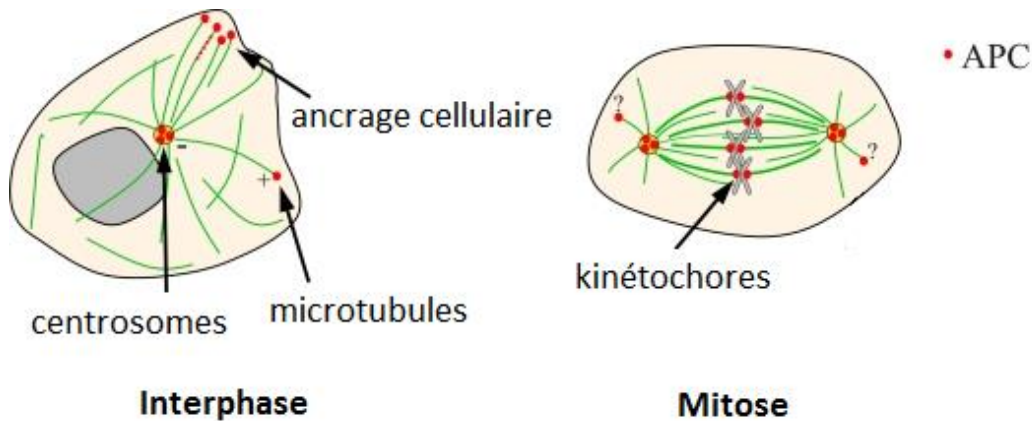


Figure 8 : Localisation de la protéine APC dans la cellule en interphase et en mitose (adapté de Rusan N.M. et al, *Journal of Biological Chemistry* 2008).

Les premiers liens entre APC muté et **instabilité chromosomique** ont été mis en évidence en 2001 lorsque deux équipes (FODDE *et al.* 2001; KAPLAN *et al.* 2001) ont observé que des cellules souches embryonnaires possédant une mutation homozygote du gène APC devenaient aneuploïdes en culture et cumulaient les réarrangements chromosomiques. Depuis, de nombreuses études ont montré que la perte d'une protéine APC fonctionnelle mène à une ségrégation chromosomique défectueuse (ALBERICI *et al.* 2007; AOKI *et al.* 2007). Or l'instabilité chromosomique est un des facteurs qui favorise la tumorigenèse. L'hypothèse la plus probable serait qu'APC muté ne peut plus se fixer aux microtubules et interagir avec le complexe de stabilisation qui y est normalement associé, d'où des erreurs de ségrégation chromosomique. Une autre hypothèse serait plutôt liée à la fonction de régulateur de mitose d'APC, chargé de diriger la cellule vers l'apoptose en cas de défauts dans la séparation/répartition chromosomique. APC muté serait privé de sa fonction pro-apoptotique, et les anomalies mitotiques s'accumuleraient, menant à l'instabilité chromosomique (KAPLAN *et al.* 2001). Cependant, à ce jour aucun mécanisme consensus n'a encore véritablement émergé pour expliquer la relation entre la protéine et le phénomène.

B.1.2.d APC et inflammation

Dans le tractus gastro-intestinal, inflammation et cancer du côlon sont deux évènements pathologiques étroitement liés. Il existe plusieurs types de maladies inflammatoires coliques dont la colite ulcéreuse et la maladie de Crohn's, qui ont toutes les deux été fortement associées à la cancérogenèse colorectale (EKBOM *et al.* 1990; FREEMAN 2008). Récemment la création d'un modèle de poisson zèbre génétiquement modifié pour *Apc*, appelé *apc^{mcr}*, dans lequel la mutation est la même que celle généralement observée chez l'homme (HARAMIS *et al.* 2006), a permis de mettre en évidence que la mutation *Apc* s'accompagnait également d'une inhibition de la biosynthèse de l'acide rétinoïque (JETTE *et al.* 2004; NADAULD *et al.* 2006), ce qui a pour conséquence une inhibition du facteur de transcription C/EBP β (CCAAT/Enhancer Binding Protein β), et donc l'activation de la transcription de COX-2, un facteur majeur de l'inflammation (EISINGER *et al.* 2006). D'autres études au contraire placeraient COX-2 en amont de la voie β -caténine. Le rôle de COX-2 est de catalyser la conversion de l'acide arachidonique en prostaglandines. Parmi elles, la PGE2 est capable d'activer les kinases PI3K (Phosphatidylinositol 3-Kinase) et AKT (ou PKB : Proteine Kinase B), kinases qui pourraient en aval phosphoryler la GSK3 et ainsi induire la stabilisation de la β -caténine. Allant dans ce sens, une lignée épithéliale colique cancéreuse DLD-1 traitée avec de la PGE2 présente une augmentation de la translocation nucléaire de β -caténine (CASTELLONE *et al.* 2005) ; tandis que le traitement d'embryons de poissons zèbres *apc^{mcr}* avec un inhibiteur de COX-2, le MG132, conduit à une diminution des taux cellulaires de β -caténine (EISINGER *et al.* 2007). Ainsi, un lien étroit existe entre les deux phénomènes majeurs de la cancérogenèse colorectale : inflammation et mutation APC (figure 9).

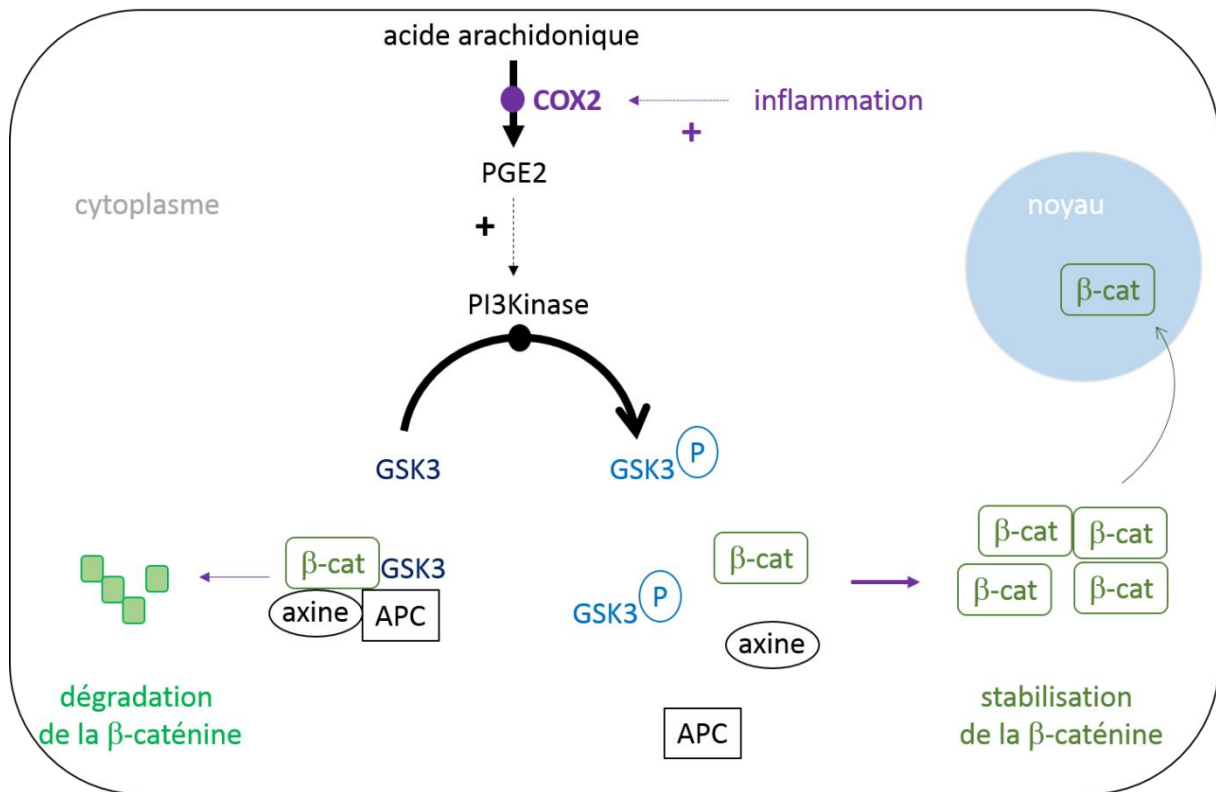


Figure 9 : Activation de la voie Wnt par COX-2, ou comment l'inflammation fait le lit de la cancérogénèse colorectale. COX-2 : cyclooxygénase 2; GSK3 : glycogène synthase kinase 3 ; PGE2 : prostaglandine E2; PI3Kinase : phosphatidylinositol 3-kinase.

B.1.2.e APC, cycle cellulaire et apoptose

L'expression d'APC dans la muqueuse colique suit un gradient inversement proportionnel au gradient de β-caténine, croissant du fond des cryptes à la surface épithéliale, là où les cellules différenciées finissent par entrer en apoptose et être éliminées dans la lumière colique. Le rôle d'APC dans l'apoptose a jusqu'à présent été mis en évidence de façon indirecte : dans un système de cellules HT29 inducible pour l'expression d'une protéine APC complète, la survivine par exemple, un facteur anti-apoptotique, apparaît inhibé par l'expression d'APC (ZHANG *et al.* 2001a) ; cependant, le(s) mécanisme(s) par lequel APC induit l'apoptose n'est/ne sont pas encore élucidé.

Par ailleurs, APC est capable de bloquer le cycle cellulaire en phase G0/G1 et d'empêcher sa progression vers la phase S et donc inhiber la division cellulaire (BAEG *et al.* 1995), sans qu'il soit possible de déterminer si cette capacité est liée à sa fonction d'inhibiteur de la voie

Wnt/ β -caténine ou relève d'une activité indépendante comme par exemple de sa liaison à hDlg. En effet, l'expression d'une protéine APC ne possédant plus son domaine de liaison à hDlg, ou, inversement l'expression d'une protéine hDlg ne possédant plus son site de liaison à APC a pour effet un blocage plus faible de la transition G0/G1-S, suggérant que l'interaction entre les deux protéines est au moins nécessaire à défaut d'être suffisante (ISHIDATE *et al.* 2000).

B.1.2.f La mutation APC, la souris Min comme modèle d'étude

La souris *Min* (Multiple intestinal neoplasia) est initialement une souris mutante découverte en 1990 par Moser et ses collaborateurs (MOSER *et al.* 1990). Il s'est avéré que cette souris présentait de multiples tumeurs intestinales et une mutation *Apc* constitutive, phénotype typiquement comparable à ce qui était observé chez les patients atteints de polypose adénomateuse familiale ou à de nombreuses formes de cancer sporadiques (KARIM and HUSO 2013). Elle porte une mutation hétérozygote du gène *Apc*, le phénotype homozygote n'étant pas viable et développe en moyenne une trentaine de polypes dans l'intestin grêle qui évoluent de façon occasionnelle vers le carcinome invasif n'atteignant que très rarement le stade métastatique (MCCART *et al.* 2008). A noter que ces souris présentent en outre un état cachectique (perte de poids, faiblesse, fatigue, anorexie) (BALTGALVIS *et al.* 2010), une hyperlipidémie (NIHO *et al.* 2003), et une prédisposition aux tumeurs mammaires spontanées (MOSER *et al.* 1993).

Parmi les lacunes de ce modèle on peut citer le fait que les souris *Min* développent plus de tumeurs dans l'intestin grêle que dans le côlon, et que la mutation présente chez les souris *Min* génère une protéine bien plus courte que celles typiquement observées dans les cas humains de cancer du côlon. Cependant, parmi les modèles murins, la souris *Min* reste le modèle le plus caractérisé et qui, en dépit de ses limites, permet le mieux d'évaluer les conséquences biologiques de la mutation *APC*.

➔ *Apc* +/+ et *apc* min/+, les modèles cellulaires développés en laboratoire

La mutation *APC* étant l'une des mutations initiatrices majeures de la cancérogenèse colorectale, elle est souvent celle qui caractérise la transition entre colonocyte sain et

côlonocyte prénéoplasique. Aussi, pouvoir modéliser un état cellulaire sauvage et un état cellulaire prénéoplasique muté pour Apc s'est rapidement révélé intéressant : pour étudier leurs différences intrinsèques, mais aussi pour évaluer leur réponse respective à des composés chimio-inducteurs ou chimio-protecteurs présents dans l'alimentation. Ces deux lignées ont été créées en 2003 (FOREST *et al.* 2003a), à partir d'un croisement entre une souris *C57BL6* ou une souris *Min* avec une *ImmortoMouse*. Une génération F1 a été obtenue de ces croisements, dont les cryptes coliques ont été prélevées. Les cellules épithéliales de ces cryptes ont ensuite été clonées (figure 10). La souris *Min* est une souris dont les cellules expriment constitutivement la mutation Apc sur un allèle, son croisement avec une *ImmortoMouse* a donc permis de générer une lignée Apc Min/+ ; la *C57BL6* étant quant à elle une souris « saine », elle a permis de générer une lignée Apc +/+. L'*ImmortoMouse* est une souris transgénique dans laquelle le gène codant pour un variant thermosensible de l'antigène T du virus SV40 a été mis sous le contrôle du promoteur CMHI (Complexe Majeur d'Histocompatibilité 1). Ce promoteur est connu pour être inductible par l'interféron γ (HARMS and SPLITTER 1995). L'antigène T est connu pour inactiver p53 et favoriser la prolifération cellulaire (DOBBELSTEIN and ROTH 1998) ; dans les lignées modèles, il permet d'immortaliser les cellules.

Les lignées Apc +/+ et Apc Min/+ dérivant toutes deux d'un croisement avec cette souris, elles sont à la fois sous le contrôle de la température et de l'interféron γ : concrètement, à 33°C et avec interféron γ ces cellules prolifèrent, à 37°C et sans interféron γ ces cellules cessent de proliférer et se différencient, se comportant comme des primo-cultures. Les différences intrinsèques entre ces deux lignées sont multiples. Les cellules Apc Min/+ possèdent des taux plus élevés de β -caténine et un réseau d'actine déstructuré (figure 10). Génétiquement, elles possèdent également un lot de 3n chromosomes _ contre 2n chez les Apc +/+, une aneuploïdie qui pourrait être liée au rôle en conditions normales de la protéine APC dans la ségrégation chromosomique. On observe également une diminution de l'expression des caspases 3 et 7, impliquées dans les dernières étapes de la mort cellulaire par apoptose (CHEN *et al.* 2003). Enfin, d'un point de vue phénotypique, elles forment plus de colonies en agar que les cellules Apc +/+ (FOREST *et al.* 2003b).

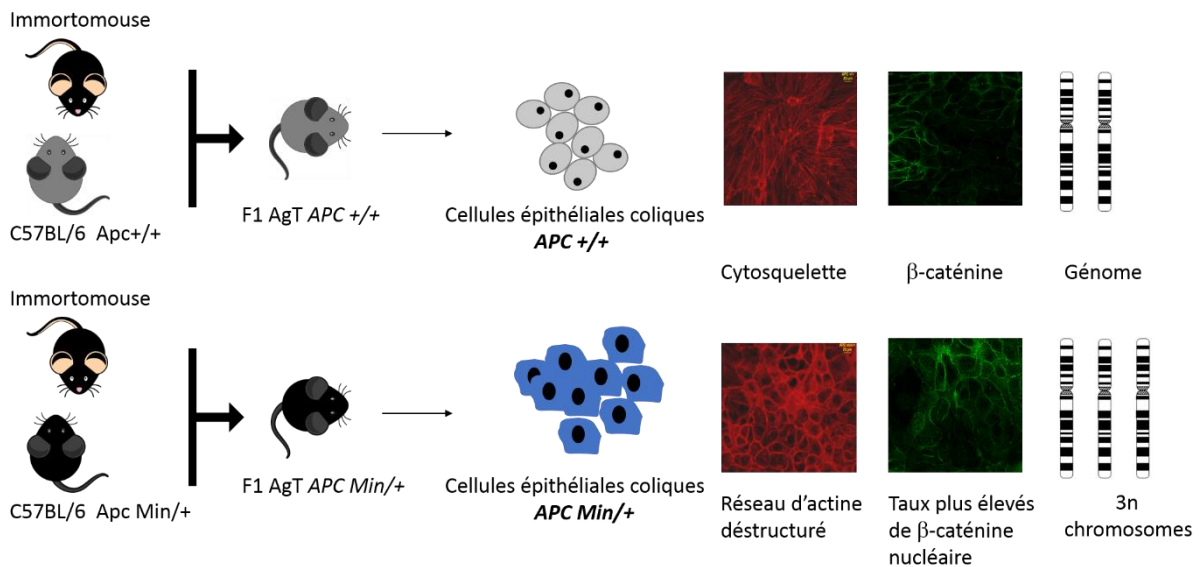


Figure 10 : Etablissement des lignées cellulaires murines *Apc* ^{+/+} et *Apc* ^{Min/+}. Mise en évidence leurs caractéristiques génétiques et biochimiques (librement adapté de Forest V. et al, *Nutrition cancer* 2003).

B.2 Les autres évènements initiateurs

Si la mutation *APC* est la mutation initiateur la plus courante, d'autres altérations initiateur existent (KEMP *et al.* 2004; PENEGAR *et al.* 2007). Parmi elles on retrouve notamment un défaut d'expression des gènes *MMRs* (MisMatch Repair), qui codent pour des protéines de réparation de l'ADN. Par exemple, le *silencing* du gène *MLH1* (MutL Homologue 1) peut être induit par méthylation des résidus guanines et cytosines des îlots CpG de son promoteur, comme cela est observé dans certaines formes sporadiques de cancer colorectal (KUISMANEN *et al.* 2000) . Ce défaut a pour conséquence une **instabilité microsatellitaire**, différente de l'instabilité chromosomique engendré par la mutation d'*APC* tel qu'évoqué précédemment. Ces instabilités microsatellitaires lorsqu'elles sont germinales sont notamment responsables du syndrome de Lynch _ encore appelé HNPCC (Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer) qui constitue une autre forme de cancer colorectal héréditaire dû à la mutation de trois gènes *MMRs* : *MLH1*, *MSH2* (MutS Homologue 2), ou *MSH6* (BONADONA *et al.* 2011) .

D'autres mutations initiatrices sont beaucoup moins connues car elles sont à l'origine de maladies héréditaires à faibles incidences : ainsi la mutation germinale du gène *LKB1/STK11* (Serine Threonine Kinase 11), un gène codant pour une protéine qui intervient dans la polarité cellulaire, l'inhibition de la synthèse des acides gras, et l'apoptose, est à l'origine du syndrome de Peutz-Jeghers ; la mutation germinale des gènes *SMAD4* (version humaine de Mothers Against Decapentaplegic homolog 4) ou *ALK-3/BMPRI* (Bone Morphogenetic Protein Receptor, type IA), codant pour des facteurs de transcriptions impliqués dans la prolifération cellulaire, est à l'origine de la polypose juvénile ; tandis que la mutation germinale de *PTEN* (Phosphatase and TENSin homolog) codant pour une protéine régulatrice du cycle cellulaire est à l'origine du syndrome de Cowden's.

B.3 Les mutations impliquées dans la progression

La séquence adénome-carcinome est ponctuée de mutations autres que la mutation *APC*. Nous développerons essentiellement ici les phénomènes impliqués dans la voie de l'instabilité chromosomique, au détriment de la voie de l'instabilité microsatellitaire (figure 3).

B.3.1 De la dysplasie au microadénome

Le gène *DCC* (Deleted in Colorectal Carcinogenesis) apparaît délété dans plus de 70% des carcinomes. Ce gène code pour un récepteur transmembranaire qui fait partie de la famille des récepteurs à dépendance et dont le ligand principal serait la netrine-1 : en absence de netrine-1, *DCC* induirait l'apoptose, tandis qu'en sa présence il dirigerait la cellule vers la survie. La perte de son hétérozygotie dans les cas de cancers colorectaux conduirait à l'émission dérégulée de signaux positifs de croissance cellulaire (ARAKAWA 2004; MEHLEN and FEARON 2004). D'autres mutations se produisent également, parmi elles celles de *BRAF* ou *KRAS*, deux proto-oncogènes notoires impliqués dans l'activation des voies (des MAP kinases

notamment) de régulation de la croissance et de la différenciation cellulaire ainsi que de l'apoptose (TIBBLES and WOODGETT 1999).

B.3.2 Du microadénome au cancer

Dans la suite de la séquence, le gène suppresseur de tumeur SMAD4, un facteur de transcription de la famille SMAD qui est l'un des effecteurs de la voie du TGF β (Transforming Growth Factor β), apparaît quant à lui délété dans un tiers des cas de cancers colorectaux. Le TGF β est connu pour être un inhibiteur de la prolifération des cellules épithéliales dans le tractus gastro-intestinal. En conditions normales il phosphoryle les SMAD 2 et 3, qui se lient ensuite à SMAD4, avant que le complexe ne soit transloqué dans le noyau pour moduler l'expression des gènes cibles du TGF β , tels que c-myc, p15 ou p21. L'interruption de cette voie, lorsque l'un des facteurs SMAD ou le TGF β lui-même sont mutés a pour conséquence une augmentation de la prolifération des cellules épithéliales coliques et participe activement à la tumorigenèse colorectale (FIOCCHI 2001). Comme c'est le cas dans plus de 50% des cancers, p53 est également muté dans 75% des tumeurs colorectales (VOGELSTEIN *et al.* 1988). En conditions normales, p53 est impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires essentielles telles que la régulation du cycle, la réparation de l'ADN, la réponse à divers stress, ou l'apoptose. Sa mutation fait perdre à la cellule l'un de ses principaux et l'un de ses plus pléiotropes gène suppresseur de tumeur.

B.3.3 Cancer colorectal : l'hypothèse des cellules souches cancéreuses

Concernant la transformation du tissu colique sain en tissu colique tumoral, deux théories coexistent (figure 11).

Longtemps, le mécanisme consensuel a été celui de la sélection clonale (le modèle *top-down*) affirmant 1) que ce sont les cellules différenciées qui accumulent des mutations sur des gènes suppresseurs de tumeur et autres oncogènes (ex : p53, p21, KRAS) et 2) que, si

toutes les cellules ainsi potentiellement tumorigènes peuvent proliférer, seuls les clones les plus agressifs finiront par émerger selon un processus de sélection darwinienne. En 1997 plusieurs études ont été publiées portant sur la capacité de lignées cancéreuses colorectales injectées à des souris *nude* à générer des tumeurs se développant sur le mode de la croissance clonale, et mettent en avant l'importance du micro-environnement dans la sélection de ces clones (DE BOTH *et al.* 1997; SINGH *et al.* 1997) . Néanmoins, outre que cette hypothèse ait été sujette à caution en clinique en raison des nombreux cas de rechute inexplicée des patients après thérapie (VAIOPOULOS *et al.* 2012), dans le cadre du cancer du côlon, elle a surtout été mise à mal par le fait que le renouvellement cellulaire y est trop rapide pour que les cellules épithéliales puissent accumuler suffisamment de mutations pour devenir malignes. C'est la raison pour laquelle ce sont les cellules souches coliques qui sont communément admises comme étant les cibles des mutations cancérigènes (BACH *et al.* 2000; WONG and WRIGHT 1999) (le modèle *bottom-up*). Dans l'intestin grêle, ces cellules sont supposées être à l'origine de l'axe complet crypte-vili, rendant leur vulnérabilité d'autant plus critique (BRITTAN and WRIGHT 2002). L'existence de cellules souches cancéreuses coliques a été mise en évidence par trois études indépendantes. En 2007 O'Brien et ses collaborateurs (O'BRIEN *et al.* 2007) isolent des cellules porteuses du marqueur de non-différenciation CD133 à partir d'un échantillon de 17 tumeurs coliques humaines ; leur injection à des souris immunodéficientes NOD/SCID aboutit à une croissance tumorale. De la même manière, Dalerba et al (DALERBA *et al.* 2007) mettent en évidence la tumorigénicité de cellules épithéliales coliques humaines CD44+ (autre marqueur de l'état indifférencié), quand la même année Ricci-Vitiani et ses collaborateurs (RICCI-VITIANI *et al.* 2007) réussissent à isoler et mettre en culture des cellules souches cancéreuses coliques CD133+ : l'injection sous-cutanée à des souris immunodéficientes des cellules filles issues de ces cultures aboutit également à une croissance tumorale. Un autre argument qui a plaidé en faveur de l'hypothèse des cellules souches tumorales est l'hétérogénéité en termes de stades de mutations observée au sein d'une même tumeur. Ainsi une mutation affectant la cellule souche colique va modifier l'homéostasie complète de la crypte : à la fois sa vitesse de renouvellement, le remplacement stochastique de ses cellules, et le profil des cellules épithéliales qui seront formées. En effet, d'une part il a été montré que certaines seront ciblées par des mutations leur conférant un avantage évolutif : par exemple, l'inactivation de MLH1 chez des cellules coliques conduit à une incapacité de la cellule à réparer les

dommages à l'ADN, ce qui en fait une cellule tumorale à fort potentiel prolifératif. D'autre part, il a été mis en évidence que les cellules souches cancéreuses présentent des niveaux élevés d'activité de la voie Wnt, plus élevé que chez les cellules différenciées tumorales qui en dérivent, même si celles-ci sont mutées pour la voie Wnt. Enfin, des cellules tumorales différenciées pourraient également revenir au stade de cellules souches cancéreuses en exprimant le facteur HGF (Hepatocyte Growth Factor)(DE SOUSA *et al.* 2013), tandis qu'une fraction de cellules quiescentes a été identifiée, qui serait associée à la résistance aux chimiothérapies (KRESO *et al.* 2013). Tous ces types cellulaires, aux caractéristiques pourtant très différentes, peuvent cohabiter au sein d'une même tumeur. Aujourd'hui l'hypothèse des cellules souches cancéreuses s'est largement généralisée à tous types de cancers (LOBO *et al.* 2007) et le challenge demeure la recherche de nouveaux marqueurs cellulaires de surface permettant de les repérer.

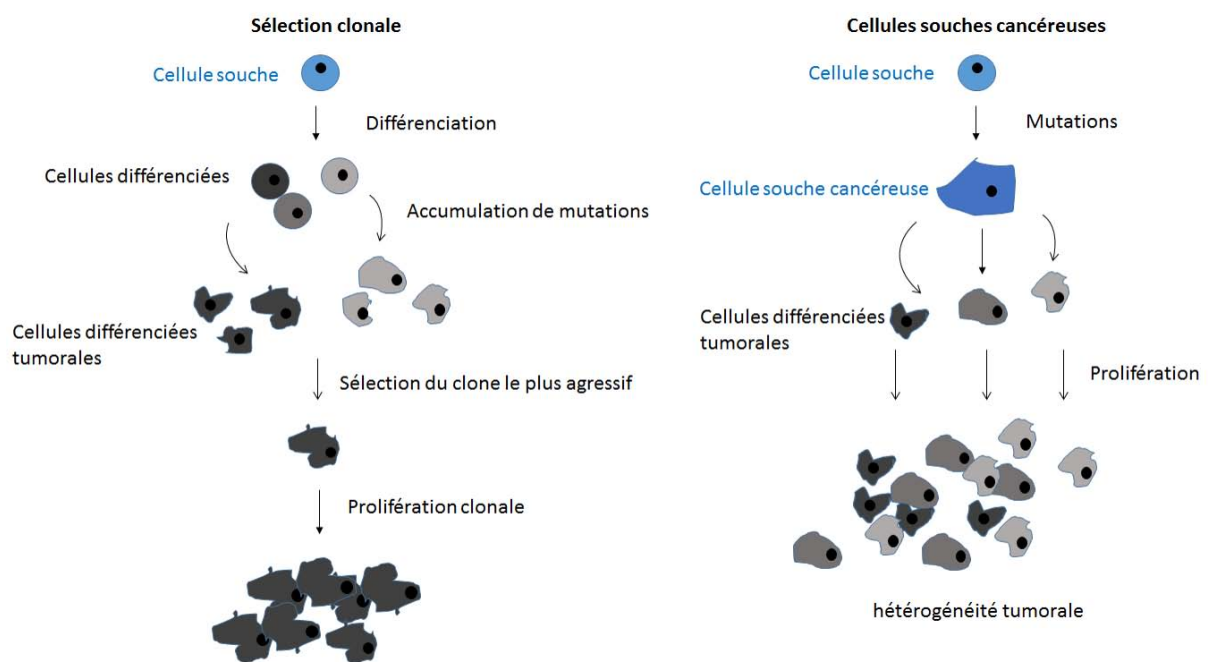


Figure 11 : Sélection clonale vs cellules souches cancéreuses. Schéma résumant les deux théories proposées pour expliquer le passage du tissu sain au tissu tumoral.

Certaines cellules souches expriment des facteurs de transcriptions SNAIL, capables d'induire la transition épithélio-mésenchymateuse (EM)(HORVAY *et al.* 2011), transition qui transforme une cellule épithéliale en cellule migratoire avec un fort potentiel invasif. L'expression de

facteurs induisant la transition EM dans des cellules souches pourrait être physiologiquement liée à un maintien de la plasticité de ces cellules, ou pathologiquement liée à une exploitation de leur plasticité lors de leur prolifération et de leur différenciation. Il a été observé que les niveaux de micro-ARNs non codants de la famille miR-200 étaient très bas dans les tumeurs coliques primaires, et au contraire très élevés dans les métastases correspondantes. Or l'expression de ces ARNs miR-200 est normalement inhibée dans les cellules souches sous le contrôle du gène suppresseur de tumeur p53, p53 dont la perte de fonction est liée au phénotype de cellules souches ayant subi la transition EM (DE CRAENE and BERX 2013).

C. FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX ET CANCER COLORECTAL

Parmi les facteurs de risques élémentaires liés au cancer de manière générale, le tabac, l'alcool, ou encore la surcharge pondérale et le manque d'activité physique, font partie de ceux sur lesquels tout le monde s'accorde (<http://www.e-cancer.fr/moyenspouragir/html/prevenir/les-conseils-pour-reduire-les-risques-de-cancers.html>). Concernant l'alimentation, le lien de cause à effet est souvent plus âprement discuté. Plusieurs études de cohorte réalisées dans les années 90 (GIOVANNUCCI and WILLETT 1994; GOLDBOHM *et al.* 1994; PIETINEN *et al.* 1999) rapportent une association significative entre viande rouge et cancer colorectal. Récemment résumées par Norat *et al.*, ces études ont contribué à établir la consommation de viande rouge comme facteur majeur de risque de développement du cancer du côlon : les données actuelles avancent 24% d'augmentation du risque de cancer colorectal pour chaque augmentation de la consommation de viande rouge de 120 grammes par jour, avec un risque relatif de 1.35 associé à un intervalle de confiance situé entre 1.21 et 1.51 (NORAT *et al.* 2002). Parallèlement, des études de migrants, où des populations migrent de zones associées à un faible risque de cancer colorectal vers des zones à haut risque, ont montré qu'à l'échelle d'une seule génération l'incidence du cancer colorectal chez les immigrants se rapproche de l'incidence observée dans la population native hôte (KUNE *et al.* 1986). En complément des études épidémiologiques traditionnelles, ce type d'études met en exergue l'importance des facteurs liés à l'environnement et au style de vie dans la survenue du cancer du côlon. Aujourd'hui on estime qu'une personne consommant 100 g de viande

rouge par jour a 17% de risque supplémentaire de développer un cancer colorectal, comparativement à une personne en mangeant moins de 500 g par semaine (NORAT *et al.* 2002). A l'heure actuelle, en Europe, une seule étude épidémiologique de grande envergure a été réalisée : il s'agit de l'étude de cohorte EPIC (European Prospective Investigation into Cancer and nutrition), réalisée sur plus de 400 000 sujets volontaires appartenant à dix pays européens. Et elle confirme qu'il existe 35% de risque supplémentaire de déclarer un cancer colorectal pour une personne consommant plus de 160 grammes de viande rouge par jour, comparativement à une personne en consommant quotidiennement moins de 20 grammes. Moyennée avec les études rétrospectives publiées entre 1990 et 2006, l'augmentation du risque estimée reste juste (NORAT *et al.* 2002). Ce lien de causalité est suffisamment déterminant pour que le Fond Mondial de Recherche contre le Cancer (le World Cancer Research Fund, basé à Londres) publie en 2007, à destination du grand public, une recommandation selon laquelle il faut limiter la consommation de charcuteries un facteur alimentaire qui ne sera pas détaillé ici_ et de viandes rouges telles que celle du bœuf, du porc, de l'agneau, ou du canard.

Cependant, la question s'est longtemps posée, et se pose encore, de savoir quel composé/ quel processus serait à l'origine du caractère promoteur de la cancérogenèse de la viande rouge. Plusieurs hypothèses ont été émises, parmi lesquelles les graisses, les amines hétérocycliques, les hydrocarbures aromatiques polycycliques, et le fer héminique, semblent les plus pertinentes.

C.1 La teneur en graisse

Concernant les graisses d'origine alimentaire, plusieurs études épidémiologiques ont montré une corrélation positive entre apports lipidiques élevés et risque de cancer du côlon, tandis que des études menées chez le rat ont montré une augmentation du nombre de tumeurs colorectales consécutives à un régime alimentaire au contenu lipidique similaire à celui de l'alimentation humaine (ARMSTRONG and DOLL 1975; ROSE *et al.* 1986). Cependant, il semble d'une part que, plutôt que la quantité totale de lipides ingérés, c'est la composition en lipides qui a une influence sur l'étiologie du cancer colorectal (BOUGNOUX and MENANTEAU

2005), et d'autre part, les études d'intervention n'ont pas montré que les régimes pauvres en lipides diminuaient le risque de cancer du côlon (BERESFORD *et al.* 2006; SCHATZKIN *et al.* 2000). Il s'avère que plusieurs études relevant une association positive entre consommation importante de lipides et risque de cancer du côlon relèvent également une association positive entre apports caloriques et cancer du côlon. Ainsi, le rôle des graisses serait minime : les régimes riches en graisse augmentant essentiellement l'obésité, cela pourrait biaiser les études. Et ce d'autant que ce lien n'est confirmé par aucune méta-analyse récente (ALEXANDER *et al.* 2009; NORAT and RIBOLI 2001).

C.2 Les hydrocarbures aromatiques polycycliques et les amines aromatiques hétérocycliques

La cuisson de la viande à haute température (grillade, barbecue, friture) génère la formation de composés cancérigènes, parmi lesquels on recense les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), dont la formation est due à la combustion incomplète à forte température des matières organiques durant la cuisson, et les amines aromatiques hétérocycliques (AAHs), dont le niveau de formation est directement proportionnel au temps de cuisson. Parmi les AAHs les plus connues, on peut citer le MeIQx (2-Amino-3,8-diméthylimidazo[4,5-f]quinoxaline) et le PhIP (2-Amino-1-méthyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine). Le lien entre AAHs/HAPs et cancer du côlon est sujet à controverses. Ainsi, certaines études suggèrent que la consommation de viandes très cuites est associée au risque de développer un cancer colorectal *via* les AAHs (BUTLER *et al.* 2003; CROSS *et al.* 2010; ZHENG and LEE 2009); tandis que d'autres prouvent que non (OLLBERDING *et al.* 2012). Cet antagonisme pourrait refléter les limites de la statistique à détecter des associations significatives lorsqu'elles sont faibles. Il pourrait aussi s'expliquer par le fait que des approches variables sont utilisées pour classer et définir la consommation de viande rouge (FLOOD *et al.* 2003), par des différences dans les recettes et les tables de composition des aliments utilisés, ainsi que par les différences dans les groupes examinés concernant la fourchette estimée de consommation de viande ainsi que l'apport énergétique total. Par ailleurs il a été montré qu'il y a bien plus d'AAHs dans le poulet (viande blanche) que dans le bœuf (LARSSON and WOLK 2006; NORAT *et al.* 2002); tandis que les céréales sont la source majeure de HAPs (PHILLIPS 1999). Pourtant, ni la consommation de céréales, ni la

consommation de viande blanche, ne sont liées à un risque de cancer ; même s'il faut prendre en compte le fait que les profils d'amines hétérocycliques retrouvés dans une viande de poulet sont différents de ceux retrouvés dans une viande de bœuf. La première est plus riche en PhIP, la seconde est plus riche en MeIQX (LIAO *et al.* 2010; SINHA *et al.* 1998a; SINHA *et al.* 1998b). Un autre élément à prendre en compte est le polymorphisme génétique de chaque individu pour les gènes impliqués dans l'activation de ces composés cancérigènes (ROBERTS-THOMSON *et al.* 1999). Parmi les gènes influents : le cytochrome CYP1A2 et l'acétyltransférase NAT1 (N-Acétyl-Transférase 1). En effet, une étude montre que le polymorphisme du cytochrome CYP1A2 constituant en une substitution 154 A>C modifie le risque de développer un cancer colique en réponse à la consommation de viande rouge (WANG *et al.* 2012b). De même pour le polymorphisme rs6586714 de NAT1 qui modifie l'association entre MeIQx et risque d'adénome colorectal (GILSING *et al.* 2012). Ainsi, le lien de cause à effet entre AAHs et HAPs d'origine alimentaire et cancer du côlon pourrait être exploré en prenant en compte, outre la consommation de viande en elle-même, les paramètres génétiques et l'apport calorique dans son ensemble.

C.3 Le fer héminique

Dans l'organisme, le fer héminique sert à transporter l'oxygène des poumons aux muscles, inclus dans le noyau tétrapyrrolique d'une molécule d'hémoglobine ou de myoglobine. Le lien entre fer et cancérogenèse colorectale vient initialement du fait qu'aucune association n'a été établie entre la consommation de viande blanche et le risque de cancer du côlon : or il s'avère qu'il y a dix fois plus de fer héminique dans la viande rouge que dans la viande blanche et que c'est là l'une de leurs différences majeures. Plusieurs observations ont contribué à asseoir cette relation:

-chez des rats dont la nourriture a été enrichie en hème, la concentration en sodium augmente d'un facteur 10 dans les fèces, et celle de potassium d'un facteur 4, indiquant une capacité de réabsorption modifiée au niveau de l'épithélium surfacique (DE VOGEL *et al.* 2008).

-l'exfoliation des colonocytes peut être évaluée en mesurant la quantité d'ADN de rat dans les fèces. Or un enrichissement de la diète du rat en hème engendre une diminution d'un facteur 100 de l'excrétion d'ADN hôte, tandis que la prolifération des colonocytes double comparativement à des rats contrôle. 60% de cette augmentation serait due à des cellules en prolifération, 40% est due à des cellules en G0 surfacique (DE VOGEL *et al.* 2008).

-il y a une corrélation dose-réponse entre la quantité de fer héminique et la promotion : des rats nourris avec 60% de boudin noir (régime riche en fer héminique) développent un plus grand nombre de lésions préneoplasiques que les rats nourris avec du bœuf qui eux-mêmes en développent plus que les rats nourris avec du poulet. La promotion est identique chez des rats nourris avec du bœuf que chez des rats nourris avec un régime-équivalent en hème contenant de l'hémoglobine (PIERRE *et al.* 2006).

En 2011, une revue publiée par Bastide et al reposant sur une méta-analyse des études épidémiologiques réalisées entre 1970 et 2010 met clairement en évidence une association entre consommation de fer héminique et risque de cancer colorectal, en avançant le chiffre de 18% d'augmentation du risque chez des personnes présentant une forte consommation vs des personnes en consommant moins (BASTIDE *et al.* 2011).

C.3.1 Effet indirect du fer: l'hypothèse de la lipoperoxydation

Une alimentation riche en fer héminique a été associée à la sécrétion urinaire d'un marqueur de peroxydation lipidique, le DHN-MA (aussi bien chez des rats et des souris ayant consommé de la viande rouge que chez des volontaires ayant consommé du boudin noir), et à l'augmentation dans les fèces du niveau des T-BARS (ThioBarbituric Acid Reactive Substance, mesure du niveau global d'aldéhydes qui sont généralement issus de la peroxydation lipidique). L'un des mécanismes proposés pour expliquer, au moins en partie, la promotion de la cancérogenèse colorectale par la consommation de viande rouge est que le fer héminique serait capable d'oxyder des acides gras polyinsaturés tels que les n-3, les n-6, et les n-9, pour générer des produits de lipoperoxydation secondaires hautement toxiques tel que le HNE (4-hydroxynonéal), le HHE (4-hydroxyhexéal), ou le MDA (malondialdéhyde) (figure 12).

C.3.2 Effet direct du fer

Au-delà de l'hypothèse de la peroxydation lipidique, il est à noter qu'un effet direct de l'hème sur les cellules coliques a été mis en évidence : l'hémoglobine, forme native de l'hème, s'est en effet révélé génotoxique et cytotoxique sur des cellules coliques tumorales humaines (GLEI *et al.* 2006), et ces deux évènements pourraient contribuer à endommager la surface épithéliale colique et générer, en compensation, une hyper-prolifération cellulaire (IJSSENNAGGER *et al.* 2012). Par ailleurs, le principal mécanisme de détoxication de l'hème passe par l'hème oxygénase 1 *via* une réaction qui génère du fer libre Fe²⁺. Ce qui pourrait expliquer que de l'hémine (hème stabilisé par une molécule de chlore) mis au contact de cellules épithéliales coliques Caco-2 augmente les lésions à l'ADN et la prolifération cellulaire, ainsi que la sécrétion d'interleukines pro-inflammatoires (ISHIKAWA *et al.* 2010). En outre, par un mécanisme encore non-identifié, le fer pourrait favoriser la translocation de la β -caténine du cytoplasme vers le noyau, ce qui contribuerait à amplifier le signal Wnt dans les cas de fond génétique APC muté, et soulignerait l'importance de la modulation du taux de fer comme levier thérapeutique (TORTI and TORTI 2013) (figure 12).

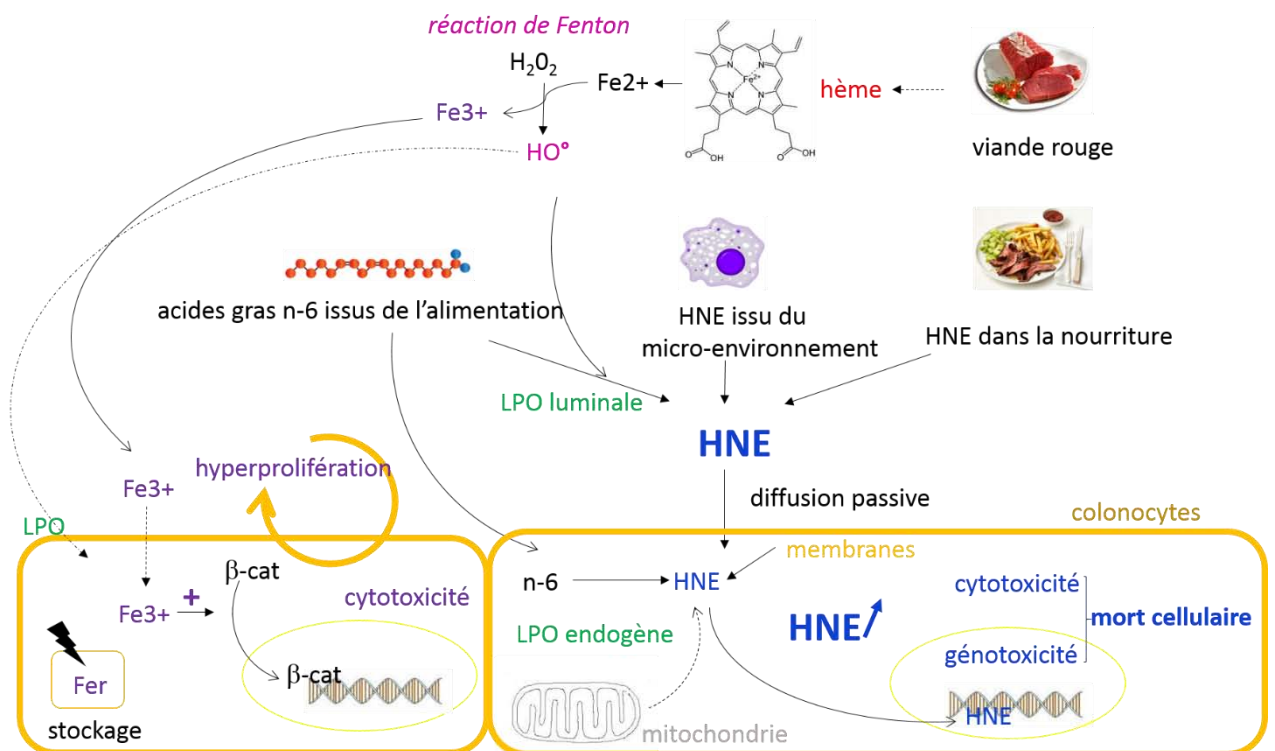


Figure 12 : Toxicité du fer sur l'épithélium colique : effet direct et lipoperoxydation. β -cat : β -caténine ; HNE : 4-hydroxynonéal ; LPO : lipoperoxydation.

Enfin, il a été montré que les voies de stockage et d'absorption/efflux du fer étaient modifiées dans les cellules cancéreuses. Par exemple, en cas de délétion APC, c'est l'induction de l'expression de protéines de régulation du niveau de fer intracellulaire, telles que TFR1 (Transferrin Receptor 1) et DMT1 (Divalent Metal Transporter 1), qui provoque une augmentation de la concentration cellulaire en fer. Par ailleurs, des expériences réalisées chez la souris Min, mutée pour Apc montrent qu'une déplétion luminale en fer s'accompagne d'une suppression de la tumorigénicité intestinale avec un taux d'apoptose multiplié par 2 à 3 au sein des polypes, ce qui conduit à des tumeurs plus petites et à croissance plus lentes ; tandis qu'inversement une augmentation de la teneur luminale en fer s'accompagne d'une tumorigénicité élevée, due à un taux de prolifération accru amenant à des tumeurs plus larges et plus agressives (RADULESCU *et al.* 2012) (figure 13).

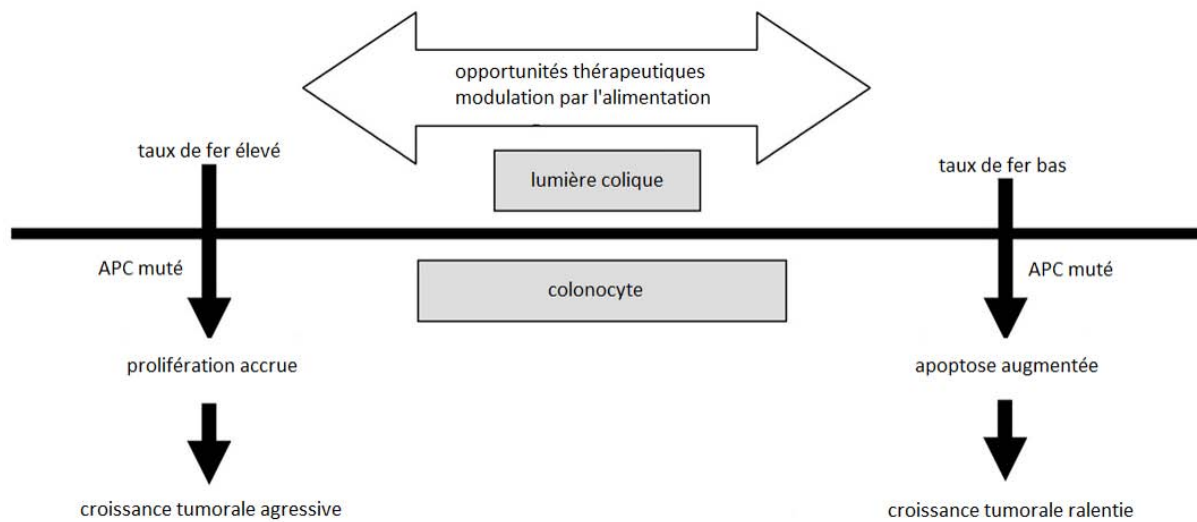


Figure 13 : La modulation du taux de fer comme levier thérapeutique dans le cadre du cancer du côlon (adapté de Radulescu S et al, *Cell reports* 2012). APC : adenomatous polyposis coli.

C.4 Cancer du côlon et microbiote

Le côlon est très concentré en micro-organismes : on estime à 10^{11} bactéries/ml la concentration colique en bactéries (FLINT *et al.* 2010). Celles-ci ont notamment un rôle primordial dans le métabolisme des cellules épithéliales coliques environnantes : par exemple elles contribuent à la dégradation des sucres complexes contenus dans les fibres alimentaires en acides gras à chaîne courte, en butyrate, en propionate, et en acétate, qui vont par la suite constituer une source d'énergie pour les cellules épithéliales coliques dans lesquelles ils entrent de façon passive. Ce microbiote résident est également capable de générer des ROS (Reactive Oxygen Species) ou EAO (Espèces Actives de l'Oxygène) en français, qui sont entre autres susceptibles de promouvoir l'inflammation (JONES *et al.* 2012) et de peroxyder les lipides insaturés. Plusieurs études récentes ont mis en évidence que des bactéries coliques résidentes pourraient se comporter comme des oncogènes : certaines souches d'*E.coli* par exemple sont capables de synthétiser une toxine, la colibactine, à l'origine de dommages génotoxiques (des cassures doubles brins de l'ADN) dans les cellules épithéliales coliques (NOUGAYREDE and OSWALD 2011). De même, des macrophages infectés par *Enterococcus faecalis*, une bactérie de la flore intestinale, seraient capables de provoquer l'arrêt en phase G2/M du cycle cellulaire et un phénotype d'instabilité chromosomique dans les cellules épithéliales intestinales : ces effets seraient dus au HNE, dont la production augmente dans les macrophages infectés (WANG *et al.* 2012c). Une revue exhaustive publiée en 2013 rassemble ces données émergentes concernant le lien entre microbiote intestinal et développement du cancer colorectal (ZHU *et al.* 2013).

D. LE HNE, UN PRODUIT DE LIPOPEROXYDATION SECONDAIRE AUX MULTIPLES FACETTES

La peroxydation lipidique est initiée par l'attaque de ROS sur des acides gras polyinsaturés présents dans la membrane cellulaire ou dans le micro-environnement cellulaire. Dans le côlon, le fer rendu libre par les processus de digestion intervient dans la réaction de Fenton et provoque la formation de radicaux OH^\bullet très réactifs, ce qui le rend également capable

d'oxyder les lipides (TOYOKUNI 1996). Ces réactions d'oxydation génèrent divers aldéhydes fortement réactifs: le HHE, le HNE, ou encore le MDA, mentionnés précédemment. Parmi eux, le HNE a fait l'objet de nombreuses études de par ses multiples activités biologiques, ses propriétés chimiques, et sa longue demi-vie (deux minutes), comparativement au HO° (radical hydroxyde) par exemple, dont la demi vie est estimée à 10^{-9} secondes (SIES 1993), ou aux autres radicaux libres.

D.1 La réactivité du HNE

Le HNE est un alcénal α - β insaturé. Sa structure chimique est présentée [figure 14](#). Il contient trois fonctions importantes:

-une double liaison C=C, impliquée dans les additions de Michael. Une addition de Michael consiste en l'ajout d'un nucléophile sur la double liaison C=C ; ce nucléophile peut être une cystéine, une lysine, ou une histidine, un acide nucléique (ex : une guanine, composante de l'ADN), ou encore une éthanolamine (composante du phospholipide membranaire phosphatidyléthanolamine). La liaison C=C peut également être réduite par une AOR (alkenal/alkenone réductase) qui participe au métabolisme du HNE.

-un groupement C=O, fonction aldéhyde portée en C1 impliqué dans la formation de bases de Schiff. Une base de Schiff repose sur la réaction entre le groupement OH et un groupement amine apporté, par exemple, par une protéine. Elle est à l'origine du *cross-linking* (ou formation d'agrégats) de protéines communément induit par le HNE. La liaison C=O peut notamment être oxydée, sous l'activité d'ALDHs (Aldéhydes DésHydrogénases), ou réduite par des AKRs (Aldo-Kéto Reductases): ces réactions participent également au métabolisme du HNE.

-un groupement OH, pouvant faire l'objet de réactions secondaires telles que la formation d'hémi-acétals, ou l'oxydation en cétone.

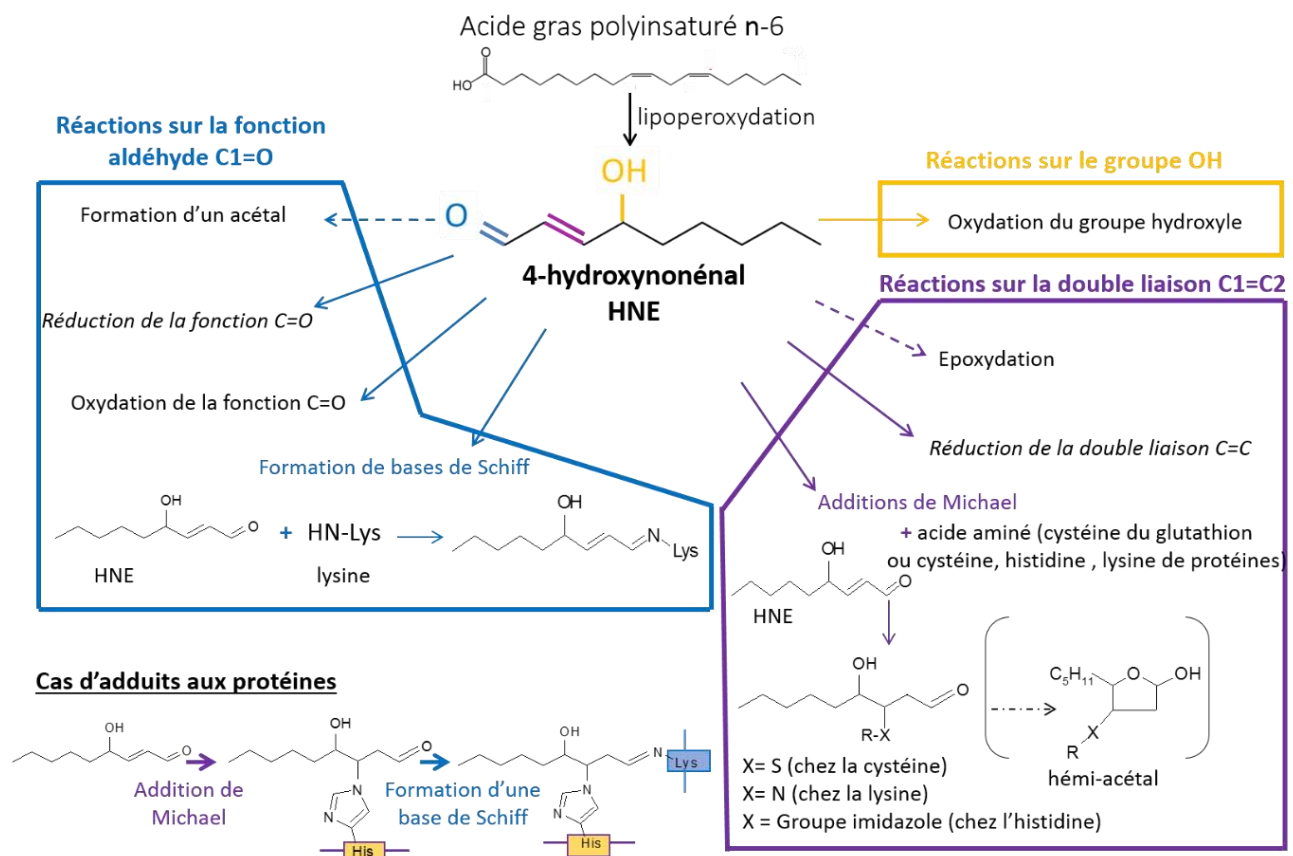


Figure 14 : Fonctions réactives du HNE. Dissection des mécanismes d'adduction aux protéines (adapté de Dalleau S. et al, *Cell Death and Differentiation* 2013).

La réactivité du HNE est responsable de sa capacité à former des adduits avec tous types de macromolécules : l'ADN (SCHAUR 2003), les lipides (BACOT *et al.* 2003), et surtout les protéines (BESTERVELT *et al.* 1995). Il est communément admis que les effets toxiques et biologiques du HNE sont liés à cette capacité à réagir avec les groupements SH (thiols) et les groupements amines des macromolécules et à participer à la formation d'adduits aux protéines. La formation d'adduits HNE-protéines contribue à moduler de nombreuses fonctions cellulaires, selon le type de protéine impliquée : enzymes, récepteurs, protéines de structure... Il a notamment été suggéré que le potentiel du HNE à se lier au site catalytique de nombreuses enzymes était responsable de l'inhibition de leur activité comme c'est notamment le cas de la PKC (Protein Kinase C)(CHIARPOTTO *et al.* 1999), de la cathepsine B (CRABB *et al.* 2002), de la sous-unité 20S du protéasome(FERRINGTON and KAPPAHN 2004), ou encore de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (SZWEDA *et al.* 1993). Cependant, le HNE

est également capable d'activer la voie JNK (c-Jun N-terminal kinases), tant par liaison directe (PAROLA *et al.* 1998) qu'en activant sa phosphorylation via des kinases de la voie MAPK (Mitogen Activated Protein Kinases) sensibles au stress oxydant (UCHIDA *et al.* 1999). L'activation de JNK par le HNE permet l'activation de la caspase 3 impliquée dans la mort par apoptose (CHENG *et al.* 2001b; SOH *et al.* 2000). Le HNE est également capable d'inhiber la fonction de canaux ioniques dépendants de l'ATP, conduisant à une interruption de l'homéostasie ionique, pouvant par exemple mener à la dégénérescence neuronale (CRIFO *et al.* 2005a; CRIFO *et al.* 2005b). Il modifierait aussi ceux impliqués dans l'homéostasie calcique en particulier en se liant aux groupements SH de la pompe SERCA1 (Sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ ATPase 1) du réticulum endoplasmique (HORTIGON-VINAGRE *et al.* 2011; McCONNELL and RAESS 2002). Le HNE possède ses propres activités biologiques, mais dans de nombreuses pathologies associées à du stress oxydatif (maladies neurodégénératives et cardiovasculaires, syndrome métabolique et cancers notamment), la quantification des adduits-HNE peut être utilisé comme biomarqueur du stress oxydant. Enfin, il est intéressant de noter que c'est aussi cette capacité à se lier aux protéines qui est responsable de sa propre détoxication, puisque sa liaison à des senseurs du stress oxydant tels que Keap1, *via* une adduction aux résidus cystéine, enclenche la voie de métabolisation qui le neutralise.

➔ Détoxication du HNE

Brièvement, (cf Revue Dalleau *et al.*, CDD 2013), la première étape de détoxication du HNE est sa conjugaison au glutathion catalysée par la GSTA4. Ainsi, l'effet immédiat du HNE dans la cellule est une déplétion en GSH. Le glutathion est formé à partir d'un précurseur cystine qui entre dans la cellule *via* le transporteur Xct. 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 HNE-GSH permet de neutraliser une partie de la réactivité du HNE en empêchant les liaisons de Michael avec les protéines et l'ADN. Le conjugué GSH-HNE formé peut ensuite soit être exporté à l'extérieur de la cellule via RLIP76 et les MRPs (CHENG *et al.* 2001a; MIRANDA *et al.* 2009; SHARMA *et al.* 2002), soit être métabolisé au choix par deux types d'enzymes : les ALDHs, qui vont permettre son oxydation puis sa cyclisation en HNA-lactone-GSH, ou les AKRs, qui vont permettre sa réduction en DHN-GSH. Mais ce sont les ALDHs qui contribuent à la voie prépondérante. A noter que, bien avant son entrée dans la cellule, le HNE peut aussi être piégé à l'extérieur de la cellule par la cystéine que celle-ci

excrète, et qui va contribuer à neutraliser le HNE sous la forme d'un conjugué HNE-cystéine (SIEMS and GRUNE 2003) (figure 15).

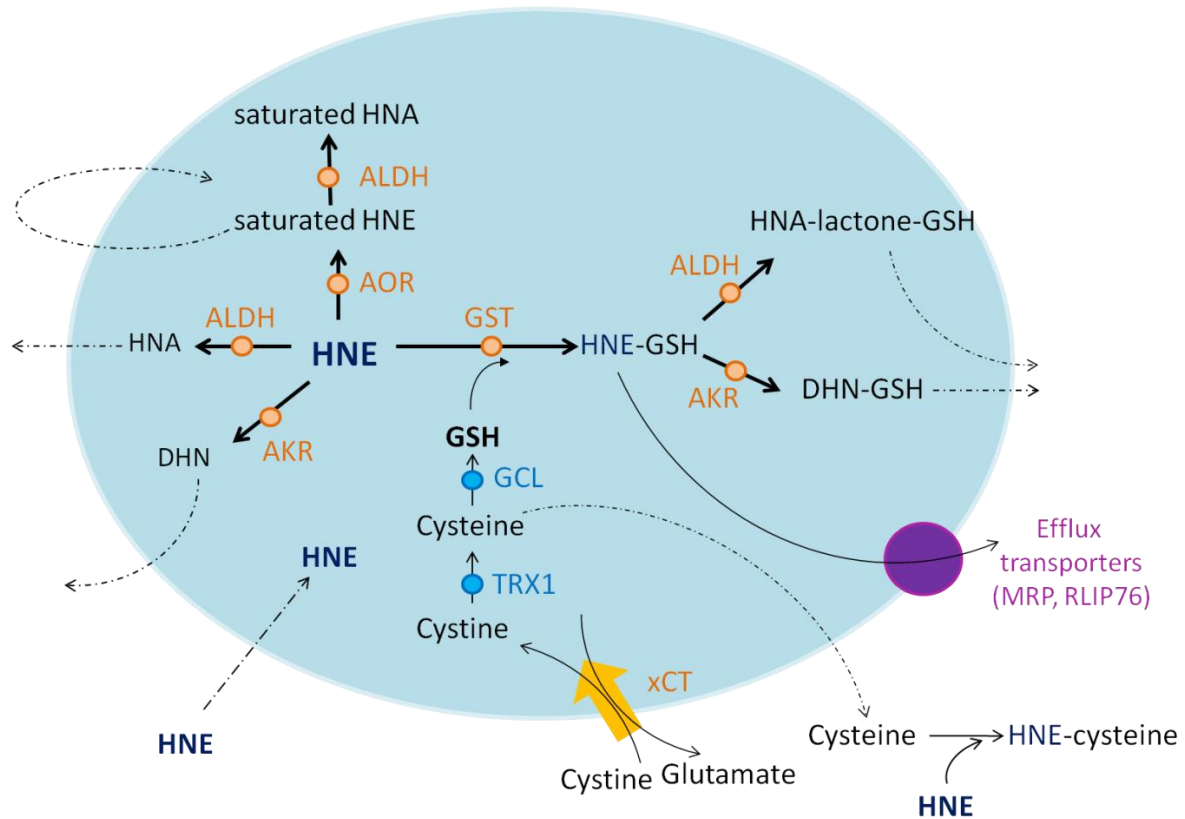


Figure 15 : Voies de détoxification du HNE. ALDH : aldéhyde déshydrogénase ; AKR : aldo/kéto réductase ; AOR : alkenal/one oxydoréductase; DHN : 4-dihydroxynonène; GCL : glutamate cystéine ligase; GSH : glutathion ; GST : glutathion-S-transférase ; HNA : acide 4-hydroxynonenicoic; NRF2 ; nuclear factor (erythroid 2)-related factor; TRX1 : thioredoxine réductase 1; xCT : cystein/glutamate exchange transporter.

D.2 Le HNE, mort cellulaire, et physiopathologies

D.2.1 HNE et physiopathologies

Dans la plupart des maladies ayant une composante inflammatoire, une augmentation des niveaux de HNE est observée, sans pour autant qu'il soit possible de déterminer cette augmentation est une cause ou une conséquence de la maladie.

D.2.1.a Le syndrome métabolique

Le syndrome métabolique correspond à un ensemble de facteurs (résistance à l'insuline, tension artérielle élevée, cholestérolémie élevée) prédisposant à un certain nombre de physiopathologies, telles que le diabète de type II ou l'obésité, ayant en commun un métabolisme altéré. Dans le cadre de l'obésité, il a été montré que des souris 129/sv (normalement résistantes à l'obésité et au diabète) dans lesquelles le gène *GSTA4* est déficient, les concentrations en HNE dans les tissus augmentent, et les souris présentent obésité et insulino-résistance (SINGH *et al.* 2008). Par ailleurs, il a été mis en évidence que les niveaux de HNE sont élevés dans les adipocytes en cas d'obésité, et la conséquence pourrait en être une modification de l'anabolisme des lipides (GRIMSRUD *et al.* 2007). Dans le cadre du diabète, le HNE serait capable d'induire la mort des cellules β du pancréas (LENZEN 2008). Dans les cas de dommages hépatiques générés par l'alcool (ALDs ou Alcoholic Liver Diseases), les modifications de protéines du « soi » par adductions aux aldéhydes ont également été mises en évidence comme engendrant la production d'anticorps auto-immuns et des réactions auto-immunes (DURYEE *et al.* 2004), tandis la stéatose hépatique passerait également par une induction de la sécrétion de $\text{TNF}\alpha$ (Tumor Necrosis Factor α) par le HNE. Dans les cas de dommages hépatiques non engendrés par l'alcool (NAFLDs ou Non Alcoholic Fatty Liver Diseases), c'est l'activation persistante de la voie JNK par le HNE qui induirait la mort des hépatocytes (SINGH *et al.* 2009).

D.2.1.b Les maladies cardiovasculaires

Les maladies cardiovasculaires constituent un ensemble de troubles affectant le cœur et les vaisseaux sanguins parmi lesquelles on recense les cardiopathies coronariennes, les maladies cérébro-vasculaires, les artériopathies périphériques, ou encore les thromboses veineuses et les embolies pulmonaires. Il s'avère que les niveaux de HNE sont particulièrement élevés dans les lésions athérosclérotiques chez des patients atteints de maladies cardiovasculaires (YLA-HERTTUALA *et al.* 1989). Dans le cadre de l'athérosclérose, il a aussi été montré que le HNE est capable de se lier de façon covalente aux LDLs et que cette adduction active les macrophages responsables de l'inflammation vasculaire (HOFF *et al.* 1989). En outre, des études plus récentes montrent que le HNE pourrait induire la transcription de récepteurs *Scavengers* de classe A, ce qui favorise la formation de « cellules spumeuses » (ou *foam cells*), des macrophages enrichis en lipides capables de promouvoir la mort cellulaire (VINDIS *et al.* 2006). Enfin, durant les stades précoces de la maladie, le HNE pourrait stimuler l'adhésion au niveau des parois vasculaires de cellules immunitaires pro-inflammatoires, telles que les lymphocytes (Go *et al.* 2007). Une autre pathologie cardiovasculaire des plus fréquentes est l'infarctus du myocarde. Or il a été mis en évidence que les cellules du myocarde présentaient une accumulation élevée de HNE durant le processus d'ischémie-reperfusion (BLASIG *et al.* 1995). Par ailleurs, le HNE pourrait aussi contribuer à la mort des cellules du myocarde par perturbation du réseau d'actine et altération des niveaux intracellulaires de calcium (VANWINKLE *et al.* 1994).

D.2.1.c Les maladies neurodégénératives

Parmi les maladies neurodégénératives les plus répandues, on peut citer la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson. La maladie d'Alzheimer, qui constitue la forme la plus courante de démence, est sous-tendue par deux types de lésions neuronales: au niveau extracellulaire, la formation de plaques amyloïdes due à l'accumulation de peptides β -amyloïde, et au niveau intracellulaire, la formation de neurofibrilles dus à l'accumulation de protéines Tau. Des analyses immunohistochimiques réalisées sur le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer a révélé des taux élevés de HNE associés à la présence classique de plaques amyloïdes (SAYRE *et al.* 1997; WILLIAMS *et al.* 2006), tandis que

l'exposition de neurones en cultures à des peptides β -amyloïdes a pour conséquence une augmentation du niveau de HNE et une modification de l'activité des transporteurs du glutamate et du glucose (KELLER *et al.* 1997a; KRUMAN *et al.* 1997), ce qui, *in vivo*, pourrait modifier les capacités de communications neuronales. La maladie de Parkinson est quant à elle causée par la mort des neurones producteurs de dopamine dans la *substantia nigra* du cerveau, et est souvent associée à la présence de corps de Lewy, des inclusions cytoplasmiques neuronales de protéines alpha-synucléine. Or du HNE a été retrouvé dans les corps de Lewy (HATTORIA *et al.* 2009), et il pourrait former des adduits avec des protéines protéasomales et conduire à la mort neuronale (JENNER 2003). Par ailleurs, des expériences *in vitro* ont prouvé que l'incubation de neurones dopaminergiques avec du HNE conduit à une perte de l'activité de la pompe Na^+/K^+ (MOREL *et al.* 1998).

D.2.1.d Le cancer

Les conclusions divergent quant à la corrélation entre cancer et niveau de lipoperoxydation et par extension de HNE. Tandis que certaines études trouvent des niveaux plus bas dans les tissus tumoraux comparativement aux tissus sains (CHEESEMAN *et al.* 1984; TJALKENS *et al.* 1999), d'autres au contraire démontrent que les taux de HNE augmentent dans les tissus cancéreux (JURIC-SEKHAR *et al.* 2009; KARIHTALA *et al.* 2011; MARQUEZ-QUINONES *et al.* 2010; YOUNG *et al.* 2010). La réconciliation entre ces deux observations tiendrait aux différences existant entre les profils lipidiques de chaque type cellulaire, aux différences intrinsèques dans leurs capacités de métabolisation, et au fait que toutes les tumeurs étudiées ne seraient pas au même grade.

Par ailleurs, le HNE possède des propriétés génotoxiques et mutagènes (BURCHAM 1998; FENG *et al.* 2003) qui pourraient *in vivo* contribuer à la tumorigenèse.

➔ HNE et cancer colorectal

Dans le cadre du cancer du côlon, une augmentation des niveaux de HNE a été constaté (JUNG and KWAK 2013) et ce niveau semble être positivement corrélé à la progression du cancer puisque des cellules d'adénome au stade précoce présentent un marquage des adduits HNE similaire à celui de cellules épithéliales non-tumorales (KONDO *et al.* 1999). Dans

le côlon, le HNE pourrait promouvoir l'inflammation (WANG *et al.* 2012c), mais il pourrait aussi induire l'apoptose des cellules coliques saines et favoriser la survie des cellules coliques préneoplasiques (PIERRE *et al.* 2007). Dans des lignées tumorales RKO, le HNE active les voies de réponse au stress et induit la translocation nucléaire de HSF1 (Heat Shock Factor 1), ce qui favorise la survie cellulaire (JACOBS and MARNETT 2007; JACOBS and MARNETT 2009). Par ailleurs, il est à noter que l'effet du HNE sur des lignées coliques transformées HT29 serait sous la dépendance du niveau intracellulaire de GSH. En effet une déplétion en GSH entraîne une augmentation de la génotoxicité du HNE sur des HT29 classiques, tandis qu'il a été montré que le HNE est plus génotoxique chez des LT97 que chez des HT29, les premières exprimant moins de GST que les secondes (KNOLL *et al.* 2005; SCHAEFERHENRICH *et al.* 2003). Dans des tissus de côlon humains des adduits HNE-guanine ont été mis en évidence, à une « concentration » qui approcherait les 3-9 nmoles d'adduits par mole de guanine (CHUNG *et al.* 2000), et de nombreuses études ont mis en évidence la capacité du HNE de se lier à l'ADN (ex : formation d'adduits avec le codon 249 de p53) _ sans aller jusqu'à la mutagénicité _ en posant l'hypothèse que par ce biais le HNE pourrait participer à la fois à l'initiation et à la progression du cancer du côlon (GLEI *et al.* 2007). Cependant, les doses utilisées dans ces études, supérieures à 100µM, sont peu réalistes *in vivo*.

[D.2.2 HNE et mort cellulaire](#)

Participant à la promotion de la cancérogenèse colorectale par le biais notamment de l'hypothèse du fer héminique, le HNE a été montré comme ayant un effet délétère plus important chez des colonocytes sains que chez des colonocytes mutés pour APC. Cet effet participerait à un mécanisme de sélection des cellules préneoplasiques qui irait dans le sens de la promotion du cancer colorectal (PIERRE *et al.* 2007). De fait, un grand nombre des effets du HNE s'explique par sa capacité à induire la mort cellulaire.

D.2.2.a L'apoptose

Dans la cellule, l'apoptose peut notamment être induite par deux voies : la voie extrinsèque, et la voie intrinsèque. L'apoptose par voie extrinsèque est généralement induite par des signaux de stress extracellulaires transmis à la cellule via la liaison de ligands FASL, TNF α , TRAIL, à leurs récepteurs respectifs FAS, TNFR1, TRAILR. L'apoptose par voie intrinsèque résulte d'une catastrophe bioénergétique et métabolique, et se traduit par la formation de pores dans la membrane externe mitochondriale (MOMP ou Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization) s'accompagnant notamment du relargage du cytochrome C. Ces deux types d'apoptose ont pour effecteurs des caspases, qui sont des protéases à cystéine présentes en permanence dans le cytoplasme sous forme inactive, et activées en cascade par clivage suite au signal apoptotique. Le HNE a été montré comme étant capable d'induire l'expression de FAS (Li *et al.* 2006b). D'ailleurs des cellules épithéliales du cristallin déficientes pour Fas apparaissent résistantes à l'apoptose induite par le HNE (PATRICK *et al.* 2005). Cette apoptose passe par la formation d'un complexe DISC (Death Inducing Signaling Complex), et l'activation de la caspase activatrice 8 et de la caspase effectrice 3. Cependant, il se pourrait que le HNE puisse induire directement la voie FAS en se liant au récepteur de façon covalente (SHARMA *et al.* 2008b)_ ce qui a déjà été observé pour d'autres récepteurs tels que le récepteur à l'EGF (Epithelial Growth Factor) ou le récepteur au PDGF (Platelet-Derived Growth Factor)(NEGRE-SALVAYRE *et al.* 2003). Dans ce cas, la voie d'apoptose induite passerait par l'activation de la voie JNK avant activation de la caspase 3. Du point de vue de la voie mitochondriale, le HNE modifie l'activité d'ATPases, ce qui engendrerait une augmentation cytosolique des taux de Ca²⁺ et générerait le signal apoptotique (MARK *et al.* 1995). Ajouté à cela, le HNE peut également être un médiateur de l'apoptose dépendante de la mitochondrie en modifiant l'intégrité de la membrane mitochondriale constituée de cardiolipines. L'oxydation de cardiolipines par le cytochrome c, une molécule pro-apoptotique de l'espace inter-membranaire, peut produire du HNE (Liu W, FRBM 2011) qui va activer la formation de MOMP (Mitochondrial Outer Membrane Pores)(KAGAN *et al.* 2005) : c'est là l'une des premières étapes de la voie apoptotique intrinsèque. Enfin, il a été suggéré qu'en invalidant la GSTA4 (Glutathion S-Transférase A4) dans la cellule au cours de sa détoxication, le HNE affecterait le statut rédox cellulaire et engendrerait une crise mitochondriale (RAZA and JOHN 2006): effectivement, l'apoptose induite par le HNE peut être

bloquée en traitant les cellules avec des inhibiteurs de la chaîne respiratoire tels que la roténone ou la sigmatelline (LEE *et al.* 2006) (figure 16).

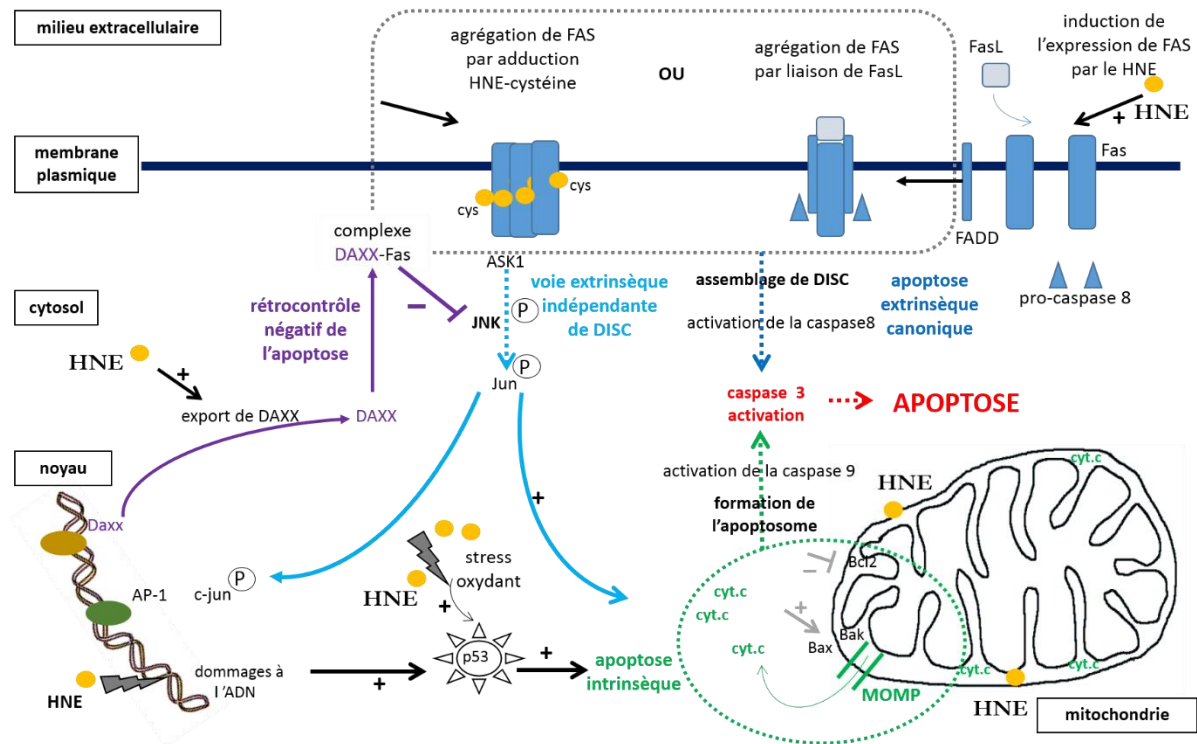


Figure 16 : Induction de l'apoptose par le HNE : les différentes voies empruntées. ASK1 : apoptosis signal-regulated kinase 1; CYT.C : cytochrome C ; DISC : death-inducing signaling complex; FADD : FAS-associated protein with death domain ; FasL : FAS ligand; JNK : JUN N-terminal kinase.

D.2.2.b Les autres voies de mort cellulaire

L'idée selon laquelle le HNE induit d'autres types de mort cellulaire que l'apoptose est venue du fait que la survie de cellules traitées avec des inhibiteurs des caspases effectrices (z-VAD-FMK ou DEVD-FMK par exemple) n'était pas complètement rétablie lors d'un traitement au HNE (CHOUDHARY *et al.* 2002; PENG *et al.* 2007). D'autres voies pourraient être activées, notamment celle des calpaïnes. Les calpaïnes sont des protéases dépendantes du calcium. Deux de leurs substrats types sont l' α -fodrine et la protéine de choc thermique HSP70. Or le HNE est connu pour moduler les stocks et la signalisation calcique : ainsi il a été montré qu'il

induisait le clivage de l' α -fodrine et la carbonylation de HSP70 (indispensable à son clivage subséquent par les calpaïnes)(SAHARA and YAMASHIMA 2010). Le HNE est aussi capable de faire des agrégats avec certaines sous-unités du protéasome, notamment la 20S, ce qui a pour effet d'inhiber l'activité peptidase du protéasome (FAROUT *et al.* 2006; FERRINGTON and KAPPAHN 2004; GRUNE and DAVIES 2003). Les adduits HNE-protéines s'accumulent alors, tout comme les protéines mal repliées, faute de protéines chaperonnes fonctionnelles, ce qui génère un stress du réticulum endoplasmique (RON and WALTER 2007) pouvant mener à la mort cellulaire par activation de la caspase 12 ou activation de la voie JNK. Enfin, à de très fortes concentrations, le HNE induirait la nécrose, comme cela a pu être mis en évidence dans des HepG2 exposées à des doses allant de 80 à 100 μ M (CHAUDHARY *et al.* 2010) ; de même pour des HeLa exposées à 100 μ M de HNE (Sovic *et al.* 2001).

→ Mort cellulaire régulée par le fer

Les mécanismes de mort cellulaire liés au fer font l'objet d'études récentes. La ferritine est une protéine permettant le transport et le stockage du fer. Il a été montré que l'endocytose de molécules de ferritine dans des lysosomes à pH acide conduit au relargage de Fe²⁺ libre dans le lysosome. Ce fer génère par le biais de réactions de Fenton la formation de ROS au niveau de la membrane lysosomale, qui va donc se perméabiliser, et engendrer aussi bien l'apoptose que la nécrose de la cellule, suite à l'induction de l'expression de FAS et de son ligand, ainsi que de p53, et à l'activation des cathepsines, protéases effectrices de la voie des calpaïnes. Il est à noter d'une part qu'une forte augmentation des adduits HNE localisés en périphérie du noyau est observée, et d'autre part qu'un dérivé de la vitamine E, le Trolox, est à même d'inhiber environ 50% des effets apoptotiques et nécrotiques observés. Ces données suggèrent que les espèces réactives de l'oxygène, et les produits de lipoperoxydation en particulier, pourraient jouer un rôle majeur dans ce nouveau mécanisme de mort cellulaire sous la dépendance du fer. Par ailleurs, il a été observé que des signaux prolifératifs envoyés par des facteurs de survie tels que EGF1 ou l'insuline peuvent également améliorer la survie cellulaire (BRESGEN *et al.* 2010a) (figure 17).

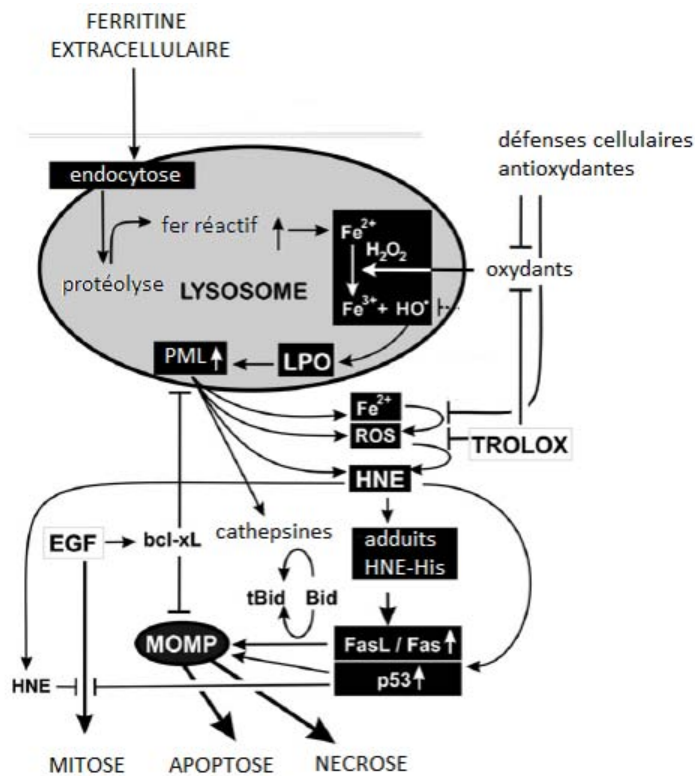


Figure 17 : Mort cellulaire induite par la ferritine. PML: perméabilisation de la membrane lysosomale; LPO: lipoperoxydation; MOMP: perméabilisation de la membrane externe mitochondriale; TROLOX: antioxydant dérivé de la vitamine E (adapté de Bresgen N. et al, *FRBM*, 2010).

D'autres modes de mort cellulaire régulés par le fer ont également été récemment identifiés : la ferroptose par exemple. Cette nouvelle forme de mort cellulaire serait uniquement dépendante de la concentration intracellulaire en fer, et est morphologiquement et biochimiquement différente de l'apoptose, de la nécrose, ou de l'autophagie. Il a été montré qu'elle peut être induite par l'*erastin*, un agent anti-tumoral capable d'induire sélectivement la mort des cellules humaines possédant une mutation *RAS*, et connu pour induire une augmentation du stress oxydant dans la cellule en inhibant xCT, le transporteur permettant l'entrée dans la cellule de la cystine qui servira de précurseur à la synthèse de glutathion. Aussi, il est très probable que l'un des mécanismes sous-tendant la mort par ferroptose soit la formation d'espèces oxydatives (DIXON *et al.* 2012). Néanmoins peu de données sont pour le moment disponibles à ce sujet.

D.3 Rôles physiologiques du HNE

D.3.1 HNE, prolifération et différenciation

Si des concentrations élevées de HNE sont associées à des effets délétères, de faibles concentrations, elles, (0.1 à 1 μ M) sont généralement associées à des effets cellulaires physiologiques. Historiquement, le premier rôle physiologique identifié du HNE a été son chimiotactisme *in vitro* envers les neutrophiles, en l'occurrence sa capacité à orienter leur migration dans une chambre de Boyden (DI MAURO *et al.* 1990), probablement en stimulant l'activité de la PLC (PhosphoLipase C)(ROSSI *et al.* 1990). Ensuite, le HNE a été montré comme contribuant à la réponse inflammatoire en activant la synthèse de la MCP-1 (Monocyte Chemotactic Protein-1) et en promouvant le recrutement de monocytes circulant vers le foie endommagé dans des modèles de dommages hépatiques aigus (MARRA *et al.* 1999). Puis l'idée est très rapidement apparue selon laquelle le HNE serait capable de moduler la croissance cellulaire, les tissus ayant un taux de renouvellement cellulaire élevé présentant de bas niveaux de lipoperoxydation (DIANZANI 1993). L'effet antiprolifératif de basses concentrations en HNE (1 à 10 μ M) a ainsi été mis en évidence chez des lignées myéloïdes humaines K562 et des HL-60, associée à une diminution de la synthèse d'ADN et de l'expression des oncogènes myc et myb (BARRERA *et al.* 1994; FAZIO *et al.* 1992). Par ailleurs, dans des HL-60 des traitements chroniques à très faibles concentrations de HNE engendrent un arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1 (BARRERA *et al.* 2005; BARRERA *et al.* 1996), ceci dû à une diminution de l'expression des cyclines D1, D2, et A (PIZZIMENTI *et al.* 1999), et une augmentation des niveaux du complexe inhibiteur pRb/E2F1 (BARRERA *et al.* 2002). D'autres proto-oncogènes pourraient également être inhibés tels que p53, p21, ou bax (LAURORA *et al.* 2005). Un autre mécanisme par lequel le HNE pourrait contrôler la croissance cellulaire repose sur la formation d'adduits HNE-PDGFR (Platelet-Derived Growth Factor Receptor). PDGF est un facteur de croissance et sa liaison à son récepteur PDGFR active une voie de signalisation mitogénique ; la formation d'adduits HNE-PDGFRs inhiberait l'autophosphorylation du récepteur nécessaire à sa propre activation (VINDIS *et al.* 2006). L'arrêt de la croissance cellulaire est souvent corrélé à la différenciation de la cellule :

aussi les cellules HL-60 chroniquement traitées au HNE finissent par présenter des marqueurs antigéniques et morphologiques de différenciation en granulocytes (BARRERA *et al.* 1991a; BARRERA *et al.* 1991b).

D.3.2 HNE et hormesis

Le HNE est un facteur de stress oxydant. Pouvant être généré par la respiration mitochondriale, il serait également capable en retour de modifier des protéines de découplage de la chaîne mitochondriale, ce qui aurait pour conséquence de diminuer la production de superoxydes et ainsi de réduire les dommages oxydatifs liés à la production d'énergie par la cellule (ECHTAY *et al.* 2005). En outre, le traitement d'hépatocytes de rat avec des concentrations croissantes de HNE s'accompagne de l'augmentation des niveaux de HSPs (Heat Shock Proteins)(CAJONE and BERNELLI-ZAZZERA 1988; CAJONE and BERNELLI-ZAZZERA 1989; HAMILTON *et al.* 1998), tandis que le traitement chronique de lignées cellulaires hépatiques de rat RL34 au HNE génère une activation soutenue de certaines GSTs (FUKUDA *et al.* 1997). L'idée sous-jacente est que l'exposition répétée de la cellule à de faibles doses de HNE pourrait lui être bénéfique au titre d'adaptation au stress oxydant, ou *hormesis*, en lui conférant une meilleure tolérance aux agressions oxydantes subséquentes (UCHIDA *et al.* 1999).

E. LUTTER CONTRE LE STRESS OXYDANT : LE CREDO DE LA CELLULE

La cellule d'un organisme aérobie est en permanence soumise à des facteurs de stress oxydant, à la fois endogènes (ex : la respiration mitochondriale) et exogènes (ex : les xénobiotiques), qui, s'ils ne sont pas maîtrisés, deviennent sources de dysfonctionnements. C'est en 1994, en cherchant des séquences polypeptidiques présentant une affinité avec la séquence NFE2/AP1 du promoteur du gène codant pour la β -globine, que Moï et ses collaborateurs découvrent NRF2 (Moï *et al.* 1994).

Vingt ans plus tard, extensivement étudié et caractérisé, ce facteur de transcription appartenant à la famille Cap'n'Collar est considéré comme le principal mécanisme de défense de la cellule contre le stress oxydant.

E.1 NRF2

E.1.1 NRF2 : structure

NRF2 est un gène situé au niveau du locus 2q31 chez l'homme. Il code pour une protéine de 605 acides aminés (~66kDa) composée de six domaines ([figure 18](#)) :

-Neh1 comporte un motif "leucine zipper" permettant la fixation à l'ADN, ainsi qu'une séquence NLS impliquée dans la localisation nucléaire (JAIN *et al.* 2005).

-Neh2 comporte deux sites de liaison avec les domaines Kelch de son inhibiteur Keap1, ainsi que sept résidus lysine impliqués dans la liaison aux ubiquitines nécessaire à la dégradation de NRF2 par le protéasome *via* la voie dépendante de Keap1 (KOBAYASHI *et al.* 2004; ZHANG *et al.* 2004).

-Neh3, Neh4, et Neh5 comportent des sites permettant le recrutement de protéines co-activatrices de la transcription telles que CHD6 (chromodomain helicase DNA binding protein 6)(NIOI *et al.* 2005), ou *CREB-binding protein* ((cAMP Responsive Element Binding protein)-binding protein) (KATOH *et al.* 2001).

-et enfin, Neh6, un domaine particulièrement riche en résidus sérines, cibles de phosphorylation par la glycogène synthase kinase 3 (GSK3) qui vont mener à la dégradation de NRF2 par une voie indépendante de Keap1.

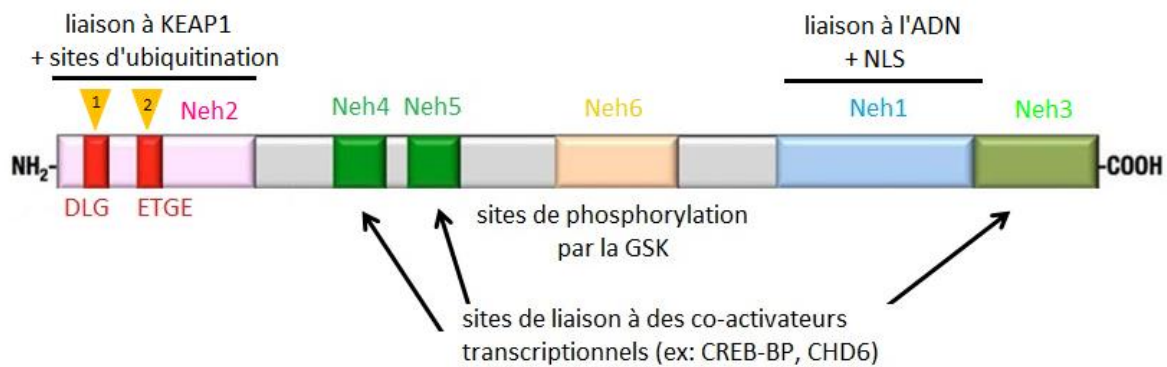


Figure 18 : Structure de la protéine NRF2. Les triangles 1 et 2 indiquent les mutations les plus fréquentes dans les cas de cancer, 43% dans le domaine DLG et 57% dans le domaine ETGE. CHD6 : chromodomain helicase DNA binding protein 6; CREB-BP: CREB binding protein ; GSK : glycogen synthase kinase ; NLS : nuclear localisation signal (librement adapté de Mitsuishi Y. et al, *Oncology* 2012).

E.1.2 NRF2 : fonctions

La principale fonction de NRF2 est d'induire la transcription d'un large panel de gènes codant pour des protéines capables de rétablir l'homéostasie redox de la cellule. Ces gènes possèdent dans leur région promotrice une séquence d'ADN spécifique reconnue par NRF2 appelée Antioxydant Response Element (ARE) : 5'-gagTcACaGTgAGtCggCAaaatt-3' (en majuscule, les nucléotides consensus). Parmi eux, on retrouve des gènes codant pour (ADACHI *et al.* 2007; Wu *et al.* 2012) :

- des enzymes de détoxification de phase I, qui catalysent des réactions d'oxydation, de réduction, ou d'hydrolyse : le cytochrome P450, les aldéhyde déshydrogénases (ALDHs), les aldo-keto réductases (AKRs), l'hème oxygénase (HO-1), ou encore la NAD(P)H quinone oxidoreductases (NQOs)...

- des enzymes de détoxification de phase II, ou enzymes de conjugaison, catalysant des réactions de conjugaison au glutathion, de rajouts de groupements glucuronides, methyls, acétyls, ou sulfates, afin de former des métabolites secondaires plus hydrophiles et moins réactifs que les composés initiaux: l'UDP-glucuronosyltransférases (UGTs), les

sulfotransférases (SULTs), les N-acétyltransférases, (NATs), les glutathion S-transférases (GSTs) ainsi que des méthyltransférases (essentiellement la thiopurine S-méthyl-transférase (TPMT) et la catéchol O-méthyl-transférase (COMT))...

-des transporteurs: ceux appartenant à la famille des ABC transporteurs et associés à la résistance à de nombreuses drogues tels que les *multidrug resistance associated proteins* (MRPs), ou les *breast cancer resistance associated protein* (BCRPs)...

NRF2 régule également l'expression d'autres gènes participant à des fonctions variées telles que l'apoptose (induction de l'expression de Bcl-2 (NITURE and JAISWAL 2012)), la réparation de l'ADN (induction de l'expression de p53 (KIM *et al.* 2012)), ou la prolifération cellulaire (HOMMA *et al.* 2009). De même, l'expression de la plupart des sous-unités des unités 19S et 20S du protéasome peut être induite en activant NRF2 (KWAK *et al.* 2003). Par ailleurs, il semblerait que la voie NRF2 puisse avoir une fonction régulatrice dans la biogenèse mitochondriale, la différenciation des adipocytes, et le métabolisme énergétique du foie, organe dans lequel il a été montré que l'activation de NRF2 augmente le métabolisme énergétique avec pour conséquence une inhibition de la synthèse des lipides (VOMHOF-DEKREY and PICKLO 2012). Enfin, NRF2 possède dans son promoteur des séquences ARE typiques et d'autres séquences très similaires : une liaison directe de NRF2 sur son propre promoteur a également pu être mise en évidence, suggérant que NRF2 est capable d'autoréguler sa propre expression (KWAK *et al.* 2002).

[E.1.3. NRF2 et pathologies : focus sur le lien NRF2-cancer](#)

La réponse anti-oxydante conduite par NRF2 participe à la protection contre de nombreuses pathologies (tableau 1). Parmi elles, une, le cancer, entretient avec NRF2 un lien ambivalent que l'étude de la souris *Nrf2*^{-/-} a permis de mieux appréhender: longtemps considéré comme participant à la prévention contre le cancer de par son rôle de maintien de l'intégrité cellulaire, NRF2 a récemment été suggéré comme pouvant également participer à la promotion. Cette dualité l'a amené à être considéré également comme un proto-oncogène (SHELTON and JAISWAL 2013).

pathologies	références
maladies neurodégénératives	Joshi G. <i>et al</i> , 2012 ; Li J. <i>et al</i> , 2007
Parkinson	Tufekci K.U. <i>et al</i> , 2011
Alzheimer	Kanninen K. <i>et al</i> , 2008 ; Kanninen K. <i>et al</i> , 2009
Huntington	Calkins M.J. <i>et al</i> , 2005
sclérose amiotrophique latérale	Petri S. <i>et al</i> , 2012
épilepsie	Mazzuferi M. <i>et al</i> , 2013
maladies infectieuses	Deramaudt T.D. <i>et al</i> , 2013
maladies cardiovasculaires	Howden R. <i>et al</i> , 2013
athérosclérose	Gupte A.A. <i>et al</i> , 2013
hypertension	Seymour E.M. <i>et al</i> , 2013; Vaziri N.D. <i>et al</i> , 2012
hépatites virales et cirrhose	Shin S.M. <i>et al</i> , 2013
diabète de type II	Uruno A. <i>et al</i> , 2013; Velmurugan G.V. <i>et al</i> , 2013
fibrose pulmonaire	Kikuchi N. <i>et al</i> , 2010
cancers	Rangasamy T. <i>et al</i> , 2004; Aoki Y. <i>et al</i> , 2004

Tableau 1 : Physiopathologies dans lesquelles NRF2 a été identifiée comme ayant un rôle protecteur.

E.1.3.a Apports de la souris KO Nrf2

Les études réalisées sur des souris KO pour Nrf2 ont contribué à asseoir sa fonction de suppresseur de tumeur, en montrant non seulement que les souris Nrf2 *-/-* présentent une sensibilité accrue aux toxiques, mais qu'elles sont également réfractaires à toute protection par des composés classiquement chimio-protecteurs. Ces souris KO ont notamment permis de mettre en évidence qu'une cinquantaine de gènes dépendants de Nrf2 sont impliqués dans la défense des cellules pulmonaires contre le stress oxydatif généré par la fumée de cigarette. Comparativement à des souris normales C57BL/6, ces souris KO développent un emphysème plus précoce et plus agressif en réaction à l'exposition à la fumée de cigarettes ainsi qu'une inflammation plus importante des alvéoles broncho-pulmonaires, ceci corrélé à un niveau d'oxo-déoxyguanosine _ adduits à l'ADN marqueurs de stress oxydatif _ plus élevé (RANGASAMY *et al*. 2004). De même, des études visant à déterminer le rôle de Nrf2 dans la défense contre les toxiques issus des émanations de pots d'échappement ont montré que les poumons de souris KO pour NRF2 présentaient un taux d'oxo-déoxyguanosine après exposition plus élevé que ceux des souris standards, corrélé, au niveau pathologique, à une hyperplasie plus sévère des tissus pulmonaires (AOKI *et al*. 2001). De plus, il a été montré que l'administration orale de DSS après une initiation à l'AOM induit plus de lésions préneoplasiques chez les souris KO Nrf2 que chez les souris sauvages, ceci associé à une

colite inflammatoire plus importante (KHOR *et al.* 2008; OSBURN *et al.* 2007). Enfin, il a été constaté que les poumons et la moelle osseuse de souris Nrf2 *-/-* dans lesquelles a été transplantée une lignée cancéreuse pulmonaire 3LL, et qui ont développé des tumeurs pulmonaires, contenaient un nombre très élevé de cellules inflammatoires, dont des MDSCs (Myeloïds-Derived Suppressor Cells) – une population de cellules immunosuppressives, tandis que des perturbations des fonctions immunitaires étaient observées. Ces dernières données suggèrent que l’absence de Nrf2 pourrait créer un microenvironnement cellulaire qui favoriserait le développement métastatique (SATO *et al.* 2010).

E.1.3.b NRF2 oncogénique

Dans de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses et dans plusieurs tissus tumoraux, sont observés une perte d’hétérozygotie ou des mutations affectant la fonction de KEAP1, ce qui conduit à une augmentation du niveau de NRF2 actif (NIOI and NGUYEN 2007; OHTA *et al.* 2008; SINGH *et al.* 2006). Cette suractivité de NRF2 amène à son tour à la surexpression des enzymes de détoxification reliées, ce qui conférerait à la cellule cancéreuse un avantage de survie et en même temps participerait à sa résistance à la chimiothérapie (OKAWA *et al.* 2006; OSBURN *et al.* 2008). Typiquement, des études réalisées sur une lignée murine de cancer mammaire résistante au Tamoxifène ont mis en évidence que ces cellules exprimaient des niveaux élevés de NRF2 et de ses gènes cibles tels que la thioredoxine, l’hème oxygénase 1, et la GCL (Glutamate Cysteine Ligase) impliquée dans la synthèse du glutathion, et qu’une inhibition de NRF2 par siRNA réduisait partiellement le phénotype de résistance (KIM *et al.* 2008b). De la même façon, il semblerait que les lignées humaines de cancer pulmonaires présentant une suractivation de NRF2 soient moins sensibles au cisplatine que celles ne suractivant pas NRF2 (KIM *et al.* 2008a). Par ailleurs, il s’avère que les fibroblastes issus de souris KO pour Nrf2 sont plus sensibles à la doxorubicine que les cellules de souris *wild type* (LEE *et al.* 2008a). Enfin, des oncogènes avérés tels que K-ras ou Myc sont capables d’induire l’expression de NRF2 (DENICOLA *et al.* 2011), tandis qu’en retour NRF2 serait capable d’induire l’expression de protéines anti-apoptotiques tels que Bcl-xL et Bcl2 dans des lignées cellulaires murines d’hépatocarcinome, et ainsi de favoriser leur survie en réponse à un stress oxydant (NITURE and JAISWAL 2012; NITURE and JAISWAL 2013). De plus, il semblerait que NRF2 puisse induire Notch1, un facteur de prolifération cellulaire qui possède un élément

ARE dans son promoteur (WAKABAYASHI *et al.* 2010a), et d'activer l'expression de MDM2 (Mouse Double Minute 2 homolog), l'inhibiteur de p53, ce qui aurait pour effet de favoriser la survie cellulaire dans des lignées cancéreuses (You *et al.* 2011). Enfin, d'un point de vue métabolique, une récente étude a mis en évidence qu'une activation soutenue de NRF2 conduit à une redirection des nutriments cellulaires que sont le glucose et la glutamine vers la voie anabolique du métabolisme (glycolyse, voie des pentoses phosphates, et génération de NADPH). Cette voie correspond à celle activée par les cellules en prolifération pour répondre à leurs besoins en énergie (MITSUSHI *et al.* 2012b), ce qui suggère que le niveau élevé de NRF2 actif dans les cellules cancéreuses pourrait jouer un rôle dans leur potentiel prolifératif, et donc moduler leur agressivité.

E.1.3.c NRF2, facteur protecteur contre le cancer

Tout d'abord, il a été montré que NRF2 est un facteur de protection contre les dommages géno- et cyto-toxiques. Ainsi des gènes suppresseurs de tumeur clairement identifiés tels que p21 ou PALB2 (Partner And Localizer of BRCA2) seraient capables de stabiliser NRF2 en agissant comme inhibiteurs compétitifs de la liaison entre NRF2 et son inhibiteur naturel Keap1 (CHEN *et al.* 2009b; MA *et al.* 2012). Ensuite, de nombreuses stratégies visant à prévenir la survenue de cancers sont basées sur l'induction de NRF2 par des composés chimiques ou naturels : c'est notamment le cas de l'Oltipraz et du cancer du foie (PRIMIANO *et al.* 1995), du sulforaphane et des cancers du côlon et de la prostate (CLARKE *et al.* 2008), du curcumin et du cancer du sein (NAGARAJU *et al.* 2012). Des essais cliniques ont montré que l'Oltipraz inhibe l'activité des cytochromes P450 (responsables de la bioactivation de nombreux cancérigènes) chez des individus sains (SOFOWORA *et al.* 2001) et augmente l'activité GST et la transcription de NQO1 dans des biopsies de colon (O'DWYER *et al.* 1996). En 1999, des volontaires chinois de la province de Qidong, soumis à une exposition alimentaire importante aux aflatoxines induisant un risque d'hépatocarcinome élevé, ont fait l'objet d'essais de phase II afin d'évaluer l'impact de l'Oltipraz sur le métabolisme des aflatoxines : il s'est avéré qu'un mois de traitement hebdomadaire avec 500mg d'Oltipraz réduisait de 51% le taux d'aflatoxine M1, le métabolite urinaire des aflatoxines (WANG *et al.* 1999). Cette étude n'a pas été directement reliée à une modulation de NRF2, mais indirectement *via* l'inhibition observée du cytochrome P450, et l'activation d'enzymes de phase II tels que la GST. Par ailleurs, des souris *nude* traitées avec de la 2-amino-3-

méthylimidazo[4,5-f]quinoline, une amine aromatique hétérocyclique communément retrouvée dans l'alimentation, présentent un taux de lésions prénéoplasiques coliques plus élevé que celles traitées additionnellement avec un polyphénol du thé vert, l'épigallocatechine gallate (YUAN *et al.* 2008). Or l'épigallocatechine gallate induit NRF2 et les gènes AREs, cette induction étant une voie majeure de sa capacité à inhiber la carcinogenèse colique (YUAN *et al.* 2007). En outre, le curcumin introduit en supplémentation dans la nourriture de rats induits à l'AOM, diminue l'incidence des lésions prénéoplasiques (VOLATE *et al.* 2005). De la même manière, des souris Min dont le régime a été complété en sulforaphane, un autre inducteur connu de NRF2 (HU *et al.* 2006b), développent significativement moins de polypes intestinaux que des souris nourries avec un régime contrôle (HU *et al.* 2006a). Enfin, une étude récente a montré que des souris Min KO pour Nrf2 présentaient une inflammation colique importante, et une cancérogenèse intestinale accrue liée à des capacités prolifératives accrues au sein des cryptes (CHEUNG *et al.* 2012). L'ensemble de ces données soulignent le fort potentiel d'une modulation de l'activité Nrf2 dans la prévention et le traitement des cancers chez l'homme (cf paragraphe G).

[E.1.4 NRF2 : régulation pré-induction transcriptionnelle](#)

La compréhension des mécanismes de régulation de NRF2 permet de mieux appréhender certaines questions : comment le facteur NRF2 contribue-t-il à activer les défenses cellulaires en cas de stress oxydant ? Comment retourne-t-il à son état initial lorsque l'intégrité cellulaire a été retrouvée ? Comment permet-il à l'expression basale de certains gènes même lorsque la balance redox est homéostatique ?

E.1.4.a KEAP1, la voie classique

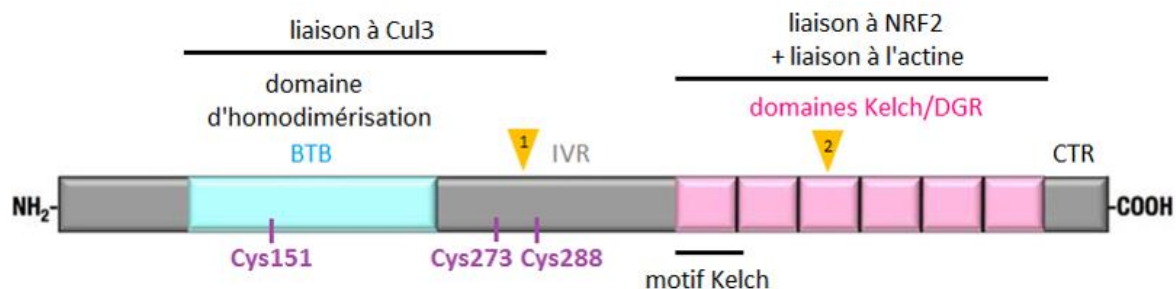
La principale voie de régulation de NRF2 passe par son inhibiteur KEAP1 (Kelch-like ECH-Associated Protein 1), une voie d'autant plus importante qu'elle est dérégulée dans de nombreux cancers, avec pour conséquence un facteur de transcription NRF2 constitutivement actif qui va contribuer à la promotion.

Cette dérégulation résulte essentiellement de mutations sur Keap1 causant une perte de sa fonction, ou d'une perte de l'hétérozygotie causant une diminution de son expression (PADMANABHAN *et al.* 2006; SHIBATA *et al.* 2008a; SINGH *et al.* 2006), même si plus récemment des mutations sur NRF2 ont aussi été identifiées (SASAKI *et al.* 2012). La structure de KEAP1 (~70kDa) est représentée [figure 19](#). Quatre domaines présentent un intérêt notable :

- le domaine Kelch, qui est en fait composé de 6 répétitions du motif Kelch et constitue le site de liaison à NRF2.

- les domaines BTB (Tramtrack and Bric-à-Brac) et IVR (InterVening Region), qui contiennent respectivement la cystéine 151 et les cystéines 273 et 288 déterminant la sensibilité de Keap1 au stress oxydant, et qui sont le site d'adaptation au complexe ubiquitine ligase E3.

- le domaine DGR (Double Glycine Repeat) qui permet à KEAP1 de se lier aux microfilaments d'actine.



[Figure 19](#) : Structure de la protéine KEAP1. Les triangles 1 et 2 indiquent les mutations les plus fréquentes dans les cas de cancer, respectivement 29% et 27% des cas. BTB : tramtrack and bric-à-brac; Cul3 : culine E3 ; DGR : double glycine repeat ; IVR :intervening region (librement adapté de Mitsuishi Y. et al, *Oncology* 2012).

Dans des conditions normales, NRF2 est associée à KEAP1 dans le cytoplasme, et KEAP1 recrute le complexe d'ubiquitination Cul3 –E3. Celui-ci catalyse l'addition d'une chaîne polyU sur NRF2, ce qui le dirige vers la voie de dégradation protéasomale. Concrètement, l'interaction entre les deux protéines lie les motifs ETGE et DLG du domaine Neh2 de NRF2 aux domaines Kelch d'un homodimère de KEAP1, selon un modèle « *hinge and latch* » (ou modèle charnière/verrou) ([figure 20](#)).

Dans ce modèle, en l'absence de stress oxydant, NRF2 est solidement attachée entre deux protéines KEAP1 qui se sont dimérisées, l'une liée à son domaine ETGE (domaine à forte affinité qui fait office de charnière), l'autre liée à son domaine DLG (domaine à faible affinité qui fait office de verrou). Dans cette conformation « tendue », les sept résidus lysine contenus dans le domaine Neh2 de NRF2, entre les motifs ETGE et DLG, sont clairement exposés et accessibles ; ils sont les cibles de l'ubiquitination catalysée par la protéine E3 recrutée par KEAP1.

Il s'avère que KEAP1 possède de nombreux résidus cystéines (4.3% des acides aminés qui le composent, soit le double de ce qu'on observe en moyenne chez une protéine (MISETA and CSUTORA 2000) qui agissent comme de véritables senseurs du stress oxydant. En cas de stress oxydant ces cystéines sont oxydées ou modifiées par adduction de composés électrophiles, avec pour conséquence un changement de la conformation de Keap1 (DINKOVA-KOSTOVA *et al.* 2002; KOBAYASHI *et al.* 2006). Ce changement conformationnel affecte d'une part sa liaison au complexe d'ubiquitination, et d'autre part sa liaison à NRF2. En effet, le motif DLG perd de son affinité avec le domaine Kelch de KEAP1 (verrou ouvert), NRF2 passe à une forme « relâchée » et l'accessibilité des résidus lysines à la ligase Cul3 est compromise. A noter, qu'en cas de stress oxydant prolongé, la modification conformationnelle de KEAP1 peut l'amener à exposer certains de ses propres résidus lysines et devenir à son tour cible du protéasome (ZHANG *et al.* 2005).

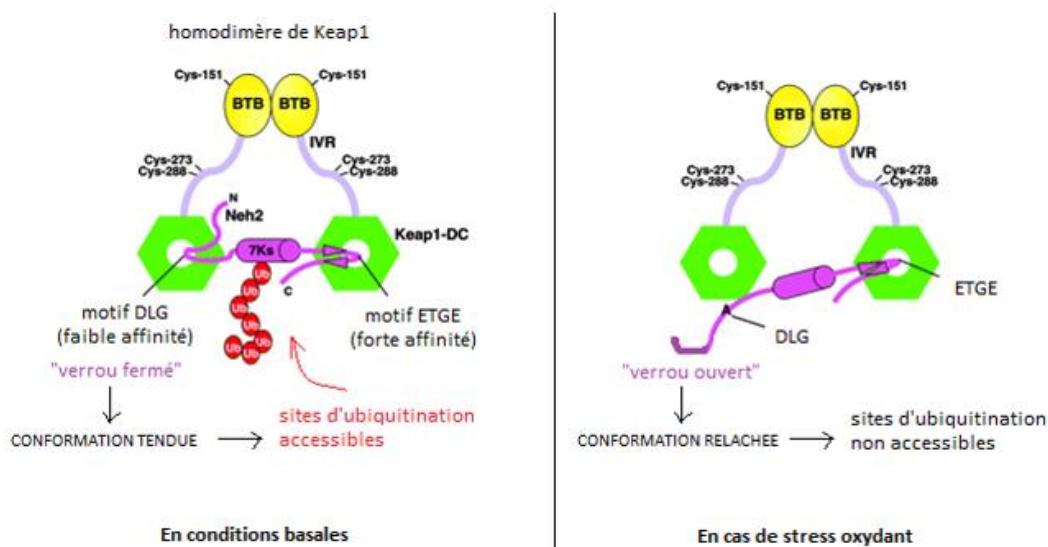


Figure 20 : modèle « hinge and latch » de l'interaction KEAP1-NRF2 (librement adapté de Tong K.I. *et al.*, *Molecular and Cellular Biology* 2007).

Par la suite, NRF2 a été identifié *in vitro* comme étant la cible de plusieurs kinases, l'export nucléaire de NRF2 nécessitant une activation par phosphorylation. La majorité des études tend à prouver que ces phosphorylations ont lieu dans le domaine Neh2. Ainsi, en cas de stress réticulaire dû à l'accumulation de protéines mal repliées, PERK, une sérine/thréonine kinase du réticulum endoplasmique pancréatique, peut phosphoryler NRF2, ce qui a pour effet, d'une part de dissocier NRF2 et Keap1 et d'empêcher toute réassociation, et d'autre part de provoquer la translocation de NRF2 dans le noyau (CULLINAN *et al.* 2003). En cas de stress oxydant, la protéine kinase C (PKC) a exactement le même effet sur NRF2 en phosphorylant le facteur de transcription sur sa sérine 40: dissociation de KEAP1, puis direction vers le noyau (HUANG *et al.* 2000a; HUANG *et al.* 2002), tandis que dans les mêmes conditions un mécanisme de phosphorylations activatrices en deux étapes conduite par la caséine kinase CK2 a également été mis en évidence (APOPA *et al.* 2008). Ces phosphorylations par la CK2 semblent cependant jouer un rôle majeur car l'accumulation nucléaire de NRF2 serait dépendante d'une activité CK2 constitutive, tandis que d'autres phosphorylations de NRF2 telles que celles régies par les MAP (mitogene activated protein) Kinases sembleraient avoir une contribution limitée (SUN *et al.* 2009).

Une fois libéré de KEAP1 et activé par phosphorylation, le facteur de transcription NRF2 peut entrer dans le noyau où il se lie aux séquences ARE situées dans les régions promotrices de ses gènes cibles. Cependant, pour activer leur transcription, il doit auparavant se complexer à un hétérodimère de petites protéines Maf (il en existe trois : MafF, MafG, ou MafK). Celles-ci contiennent également un domaine en *leucine zipper* leur permettant également de se lier à l'ADN. Cette interaction NRF2-Maf semble être indispensable car le KO des protéines Maf chez des fibroblastes embryonnaires murins abolit l'induction par le diméthylmaléate de la GSTA4 et de la GCL, de l'hème oxygénase 1, et de la thioredoxine réductase 1 (KATSUOKA *et al.* 2005) (figure 21).

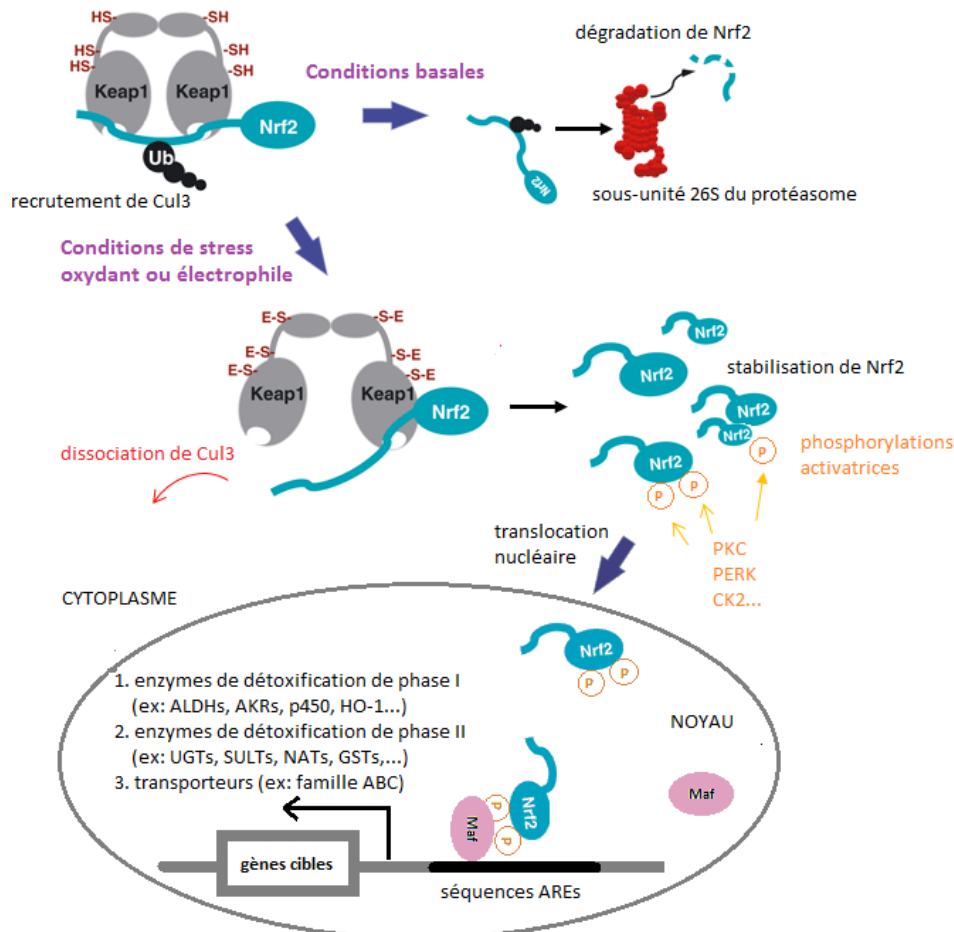


Figure 21 : Régulation de NRF2 par KEAP1 et activité transcriptionnelle de NRF2. ALDH : aldéhyde déshydrogénase; AKR : aldo-kéto reductase; CK2 : caséine kinase 2; Cul3 :culine E3; GST : glutathion S-transférase ; HO-1 : hème oxygenase 1 ; NAT : N-acetyltransférase ; UGT : UDP-glucuronosyltransférase ; PKC : protéine kinase C ; PERK : protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase ; SULT : sulfotransférase (librement adapté de Taguchi K. et al, *Genes to cell* 2011).

E.1.4.b p62/SQSTM1

p62, aussi appelée séquestosome1, est une protéine chaperonne ubiquitaire que l'on retrouve notamment localisée dans les autophagosomes, vésicules cellulaires caractéristiques de l'autophagie. p62 pourrait, entre autres fonctions, jouer le rôle d'un adaptateur facilitant la dégradation par la voie autophagique de certains substrats ubiquitinés. Cependant, il a récemment été montré que p62 est capable d'interagir avec KEAP1 au niveau de son site de liaison à NRF2 (LAU *et al.* 2010).

Cette situation engendrerait au niveau du site de fixation une compétition entre les deux molécules qui bénéficierait au facteur de transcription. Dans les souris *Atg7^{-/-}* présentant une déficience des mécanismes d'autophagie, le niveau élevé de p62 résultant a pu être corrélé à une activation importante de NRF2 (INAMI *et al.* 2011). Inversement, dans de nombreuses pathologies, l'activation observée de NRF2 a pu être corrélée à un niveau élevé de p62, accumulé dans le cytoplasme à cause d'un défaut dans les voies d'autophagie (KOMATSU *et al.* 2012). Par ailleurs, interagissant avec p62, Keap1 pourrait se retrouver séquestré dans des autophagosomes et donc dégradé, ce qui contribuerait également à la stabilisation de NRF2. Enfin, il a été montré que le gène codant pour p62 possède dans son promoteur une séquence ARE reconnue par NRF2, faisant le lit de l'hypothèse d'un rétrocontrôle positif de l'activation de NRF2 par p62 (PUISSANT *et al.* 2012).

E.1.4.c GSK3

Il existe également une voie moins explorée de dégradation de NRF2, indépendante de KEAP1. Elle fait appel à la glycogène synthase kinase 3 (GSK3). Bien avant que sa participation à la régulation de NRF2 ne soit suspectée, la GSK3 avait déjà été démontrée comme induisant l'ubiquitination et la dégradation protéasomale de plusieurs facteurs de transcription tels que la β -caténine (LATRES *et al.* 1999; PAKOFF and AIKAWA 1998) ou *cdc25a* (KANG *et al.* 2008). En pratique, la GSK3 phosphoryle un profil typique de résidus sérines et thréonines sur ces facteurs, ce qui va induire le recrutement de la culline Cul1 afin d'initier l'ubiquitination. Concernant NRF2, le phosphodégron (c'est-à-dire le profil spécifique de résidus phosphorylables par une kinase donnée) ciblé par la GSK3 serait un cluster de six sérines situées dans son domaine Neh6, mais pour l'instant peu d'études ont été publiées sur ce sujet (McMAHON *et al.* 2004). La preuve la plus pertinente d'une dégradation de NRF2 par la voie GSK3 a pour l'instant été apportée en 2011 par Rada et ses collaborateurs (RADA *et al.* 2011), qui ont montré qu'en traitant des cellules rénales embryonnaires humaines avec un puissant inhibiteur spécifique de la GSK3, ainsi qu'en utilisant des siRNAs dirigés contre la GSK3, on observe une augmentation du niveau protéique de NRF2, et ce totalement indépendamment de la liaison NRF2-KEAP1 ou de la présence de KEAP1. Ce mécanisme pourrait notamment participer à la régulation de la voie NRF2 en dehors des situations de stress oxydant.

E.1.4.d Epigénétique et micro-ARNs, les voies émergentes

La régulation épigénétique de NRF2 a notamment été étudiée chez la souris TRAMP (Transgenic Adenocarcinoma of Mouse Prostate)(Wu *et al.* 2013; Yu *et al.* 2010). La comparaison de deux types de cellules issues de ces souris, les TRAMP C3 qui ne sont pas tumorales et les TRAMP C1 qui le sont, montre que l'inhibition de l'expression de NRF2 observée dans les secondes est corrélée à un profil de méthylation particulier des îlots CpG du promoteur de NRF2, tandis qu'un traitement de ces mêmes cellules avec un inhibiteur des méthyltransférases de l'ADN en restaure l'expression. En outre, des inducteurs naturels de NRF2 agissent également en modulant son épigénome : c'est le cas du sulforaphane (ZHANG *et al.* 2013) et du curcumin (KHOR *et al.* 2011), capables de promouvoir la déméthylation des îlots CpG du promoteur de NRF2.

Les micro-ARNs sont une famille de courts ARNs simples brins non codants connus pour empêcher la traduction en interférant avec la machinerie de lecture de l'ARN lors de la traduction. Leur implication dans la régulation de NRF2 a été mise en évidence pour un petit nombre d'entre eux : miR-28 (YANG *et al.* 2011), miR-144 (SANGOKOYA *et al.* 2010), et miR-200a(EADES *et al.* 2011), même si peu de données sont actuellement disponibles sur cet aspect.

[E.1.5 NRF2 : régulation post-induction transcriptionnelle](#)

E.1.5.a KEAP1, le retour

Un des mécanismes émergents de la régulation post-induction de NRF2 repose sur la capacité qu'aurait Keap1 à venir le récupérer dans le noyau et l'escorter jusqu'au cytoplasme une fois l'homéostasie redox retrouvée dans la cellule. Ce mécanisme exclut toute liaison du complexe NRF2-KEAP1 à l'ADN et la traversée de la membrane nucléaire ferait appel au NES de KEAP1, et non à ceux de NRF2. Des expériences visant à empêcher le trafic de Keap1 ont eu pour conséquence un temps d'atténuation du signal NRF2 beaucoup plus long (SUN *et al.* 2007).

La question qui se pose encore est de savoir comment KEAP1 se redirige spontanément vers le noyau lorsque la signalisation NRF2 doit être éteinte, et s'il est possible que le NLS de KEAP1 soit sensible au stress oxydant.

E.1.5.b BACH1

BACH1 est un facteur de transcription répresseur qui appartient également à la famille Cap'n'Collar. La régulation de l'activité NRF2 par BACH1 repose sur une inhibition compétitive d'une part pour la liaison aux sites consensus AREs des promoteurs (ou similaire à AREs, tels que les séquences MAREs _ Maf Recognition Elements), d'autre part pour la liaison aux dimères de protéines Maf (DHAKSHINAMOORTHY *et al.* 2005).

De façon intéressante, il a été montré qu'en présence d'une concentration élevée en hème, l'hème vient se lier directement à BACH1 qui perd sa capacité de liaison à l'ADN, laissant la place à des facteurs de transcription activateurs reconnaissant les mêmes séquences génomiques, comme NRF2 (OGAWA *et al.* 2001) (figure 22).

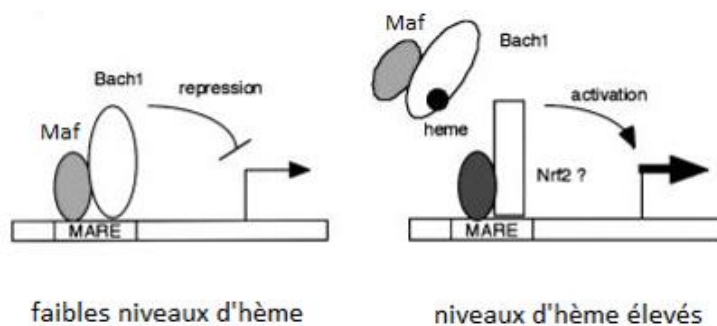


Figure 22 : Régulation des séquences similaires à ARE par BACH1 et NRF2 (d'après Ogawa K. et al, *EMBO J*, 2001). MARE : Maf recognition element.

E.1.5.c Les modifications de NRF2

Il semblerait que les résidus de NRF2 puissent aussi participer à son export nucléaire. Le seul mécanisme à ce jour identifié est le suivant : après phosphorylation et activation par la GSK3 dans le cytoplasme, Fyn, une kinase de la famille Src, est relocalisée dans le noyau. Là, elle phosphorylerait NRF2 sur sa tyrosine 568, ce qui aurait pour effet immédiat d'induire l'export de NRF2 vers le cytoplasme (JAIN and JAISWAL 2006).

E.2 Les autres gènes importants de la réponse anti-oxydante

E.2.1 NF- κ B

E.2.1.a NF- κ B et inflammation

NF- κ B (Nuclear Factor-kappa B) est un facteur de transcription impliqué dans de nombreuses fonctions cellulaires : la réponse inflammatoire, la réponse au stress oxydant, la régulation de l'apoptose ou encore la croissance cellulaire. C'est un homo- ou hétéro-dimère formé par combinaison à partir de 5 sous-unités : p50, p52, p65, RelB, et c-Rel ; même si la forme la plus fréquente est le dimère p50-p65. D'un point de vue structurel son domaine le plus important est le domaine RHD (Rel Homology Domain), nécessaire à sa liaison à l'ADN, à sa dimérisation, à sa localisation nucléaire, et à sa liaison à son inhibiteur cytoplasmique I κ B (Inhibitor of κ B). Dans des conditions standards, I κ B se lie à NF- κ B, causant sa rétention cytoplasmique et empêchant son entrée dans le noyau. Lorsque la voie NF- κ B doit être activée, des IKKs (I κ B kinases) phosphorylent I κ B, ce qui en fait une cible pour la polyubiquitination et la dégradation par voie protéasomale. NF- κ B libre est alors transloqué dans le noyau où il active l'expression de ses gènes cibles : le TNF α (Tumor Necrosis Factor α) et FAS, impliqués dans l'apoptose extrinsèque ; COX-2, impliquée dans la réponse inflammatoire ; la survivine, p53, et p21, gènes suppresseurs de tumeurs régulateurs de l'apoptose et du cycle cellulaire ; ou les cyclines D1 et E qui sont également des régulateurs du cycle cellulaire (BALDWIN 1996; BAUD and KARIN 2009; GHOSH and HAYDEN 2008; LEE *et al.* 2007). Par ailleurs NF- κ B serait aussi capable d'inhiber l'apoptose en induisant l'expression d'une famille de protéines inhibitrices de l'apoptose, les IAPs (Inhibitor of Apoptotic Proteins). L'activation de la voie IKK/NF- κ B est un mécanisme de survie majeur dans de nombreux cancers (KARIN *et al.* 2002; RICHMOND 2002), dont celui du côlon, où l'inhibition de NF- κ B conduit à une inhibition de la croissance tumorale (FERNANDEZ-MAJADA *et al.* 2007).

Un des liens entre NF- κ B et cancer colorectal est l'inflammation : chez des patients présentant des colites ulcéreuses ou atteints de la maladie de Crohn, une expression constitutive de NF- κ B (ARDITE *et al.* 1998; ROGLER *et al.* 1998) a été mise en évidence, et ceci est à corrélérer avec la probabilité plus grande qu'ont ces patients de développer un cancer colorectal. En effet, dans des modèles animaux de colites, l'inhibition de l'interleukine 6, diminue de façon drastique le nombre et la taille des tumeurs coliques, l'interleukine 6 étant un des effecteurs de la voie NF- κ B qui régule la croissance des cellules épithéliales préneoplasiques durant la tumorigenèse colorectale (VAKKILA and LOTZE 2004). Par ailleurs, des études sur des souris modèles de la colite ulcéreuse chez qui IKK est délété dans les cellules épithéliales intestinales ont montré que seul le nombre (et non la taille) de tumeurs était réduit après un traitement pro-inflammatoire AOM/DSS, tandis que les niveaux d'inflammation restait comparable à ceux de souris de type sauvage. Cette étude montre que NF- κ B est bien impliqué dans la promotion de la cancérogenèse colorectale, et que l'inflammation n'est qu'une partie du lien entre NF- κ B et cancer du côlon (GRETEN *et al.* 2004).

NF- κ B joue aussi un rôle non négligeable dans l'angiogenèse : il active l'expression du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), un facteur de croissance impliqué dans la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (HUANG *et al.* 2000b); et il active l'expression de COX-2, un facteur pro-inflammatoire capable lui aussi de promouvoir l'angiogenèse, et qui est connu pour être augmenté dans les formes agressives du cancer colorectal (TSUJII *et al.* 1998). D'ailleurs, parmi les agents protecteurs du cancer colorectal, l'aspirine, l'ibuprofène, ou le meloxicam, sont des inhibiteurs de COX-2 (figure 23).

Il est important de noter que NF- κ B fait partie des gènes dont le polymorphisme a été corrélé aux facteurs de risques liés à l'alimentation : concrètement, les porteurs d'un polymorphisme rs28362491 auraient une augmentation de 3% du risque de développer un cancer colorectal par 25 g consommé de viandes rouge et transformée (confondues)(ANDERSEN *et al.* 2010).

E.1.2.b NF- κ B et stress oxydant

Un des inducteurs de la voie NF- κ B est le stress oxydant. Cependant l'activation de NF- κ B en réponse au stress oxydant serait fortement dépendant du type cellulaire : ainsi, tandis que certaines études reportent l'activation de NF- κ B par le H₂O₂ dans des HeLa (MEYER *et al.* 1993), d'autres ne la détectent pas dans des fibroblastes ou des cellules de Jurkat (ANDERSON *et al.* 1994). Ces différences pourraient être dû au niveau de GSH (glutathion), qui est différent d'un type cellulaire à un autre : en effet, chez des cellules lymphocytaires, une pré-incubation avec la NAC (*N*-acétyl-cystéine) _ un précurseur de la GSH _ abolit l'induction de NF- κ B par le H₂O₂, tandis qu'une pré-incubation avec de la BSO (buthionine-sulfoximine) _ un inhibiteur de la synthèse de GSH _ active NF- κ B (SCHRECK *et al.* 1991). Par ailleurs, des études *in vitro* récentes ont montré que l'activité de NF- κ B est inhibée par de nombreux antioxydants tels que la vitamine C (BOWIE and O'NEILL 1997), la vitamine E (ISLAM *et al.* 1998), les flavonoïdes (MUSONDA and CHIPMAN 1998), ou encore la NAC et le GSH comme explicité précédemment, indiquant que le statut rédox de la cellule influence bien l'activation de NF- κ B. De manière directe, son activation en réponse à des conditions de stress oxydant a été plusieurs fois mise en évidence. Lorsque l'on mime chimiquement (acide iodoacétique) une ischémie-reperfusion sur des neurones en culture, ils présentent une diminution de 55 à 65% du niveau cellulaire d'I κ B, synonyme d'une activation augmentée de NF- κ B (KRATSOVNIK *et al.* 2005). De plus, des cellules vasculaires VSMCs traitées au HNE induisent une augmentation de la production de métallo-protéases MMP2, conséquence d'une activation de NF- κ B (LEE *et al.* 2008b); et des astrocytes traités au HNE induisent une réponse anti-oxydante qui passe par NRF2 certes, mais aussi par NF- κ B (MALONE and HERNANDEZ 2007) (figure 23).

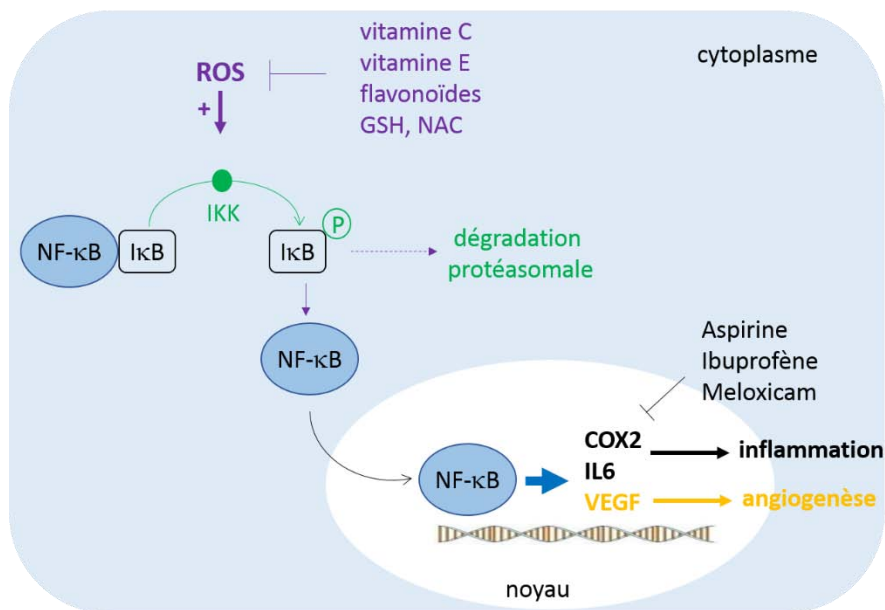


Figure 23 : NF-κB, stress oxydant, inflammation, et cancer. COX-2 : cyclooxygénase 2 ; GSH : glutathion ; IL-6 : interleukine 6 ; IKK : IκB kinase ; NAC : N-acétyl-cystéine ; VEGF : vascular endothelial growth factor.

E.2.2 MAP Kinases

Les MAP (Mitogen-Activated Protein) Kinases constituent une famille de sérine/thréonine kinases jouant un rôle essentiel dans le relai de signaux extracellulaires perçus au niveau de la membrane cellulaire vers le noyau, *via* une cascade de phosphorylations régulée par des MAPK phosphatases (MKPs). Il existe trois voies MAPKs : la voie ERK (Extracellular Regulated Kinases), la voie JNK (c-Jun N-terminal Kinases), et la voie activée par les isoformes de p38. Ces trois voies aboutissent à la phosphorylation de facteurs de transcriptions (Jun, Fos, ATF, Elk, Nrf2, CREB, p53, STAT, myc) qui vont être transloqués dans le noyau et se complexer à des co-activateurs pour induire l'expression de gènes régulant la prolifération, la différenciation, la migration cellulaires, les réponses inflammatoires, ainsi que l'apoptose. Parmi les activateurs de la voie des MAPKs, les mécanismes induits par les ROS restent en partie non élucidés. L'hypothèse la plus probable serait l'activation directe par les ROS de récepteurs connus pour induire en aval les voies MAPKs tels que l'EGFR, le PDGFR ou la famille des récepteurs au TNF (McCUBREY and FRANKLIN 2006; McCUBREY *et al.* 2006; MENG *et al.* 2007; RUFFELS *et al.* 2004; TORRES and FORMAN 2003).

Le H₂O₂ par exemple pourrait activer la voie des MAPK en activant des récepteurs aux facteurs de croissance par modifications conformationnelles; ceux-ci pourraient en retour phosphoryler des kinases ERKs (GUYTON *et al.* 1996). Par ailleurs, ASK-1 (Apoptosis Signal-regulating Kinase 1), un membre de la famille des MAPK intervenant dans les voies JNK et p38, est connu pour se fixer à la thioredoxine réduite en l'absence de stress oxydant, ce qui le rend inactif : en conditions de stress, la thioredoxine s'oxyderait et se dissocierait de ASK-1, activant ainsi les voies JNK et p38 (NAGAI *et al.* 2007). Enfin, l'autre mécanisme proposé serait que les ROS pourraient inactiver les MKPs en modifiant leur site catalytique, ce qui aurait pour conséquence une activation soutenue de la voie (HOU *et al.* 2008; KAMATA *et al.* 2005) (figure 24).

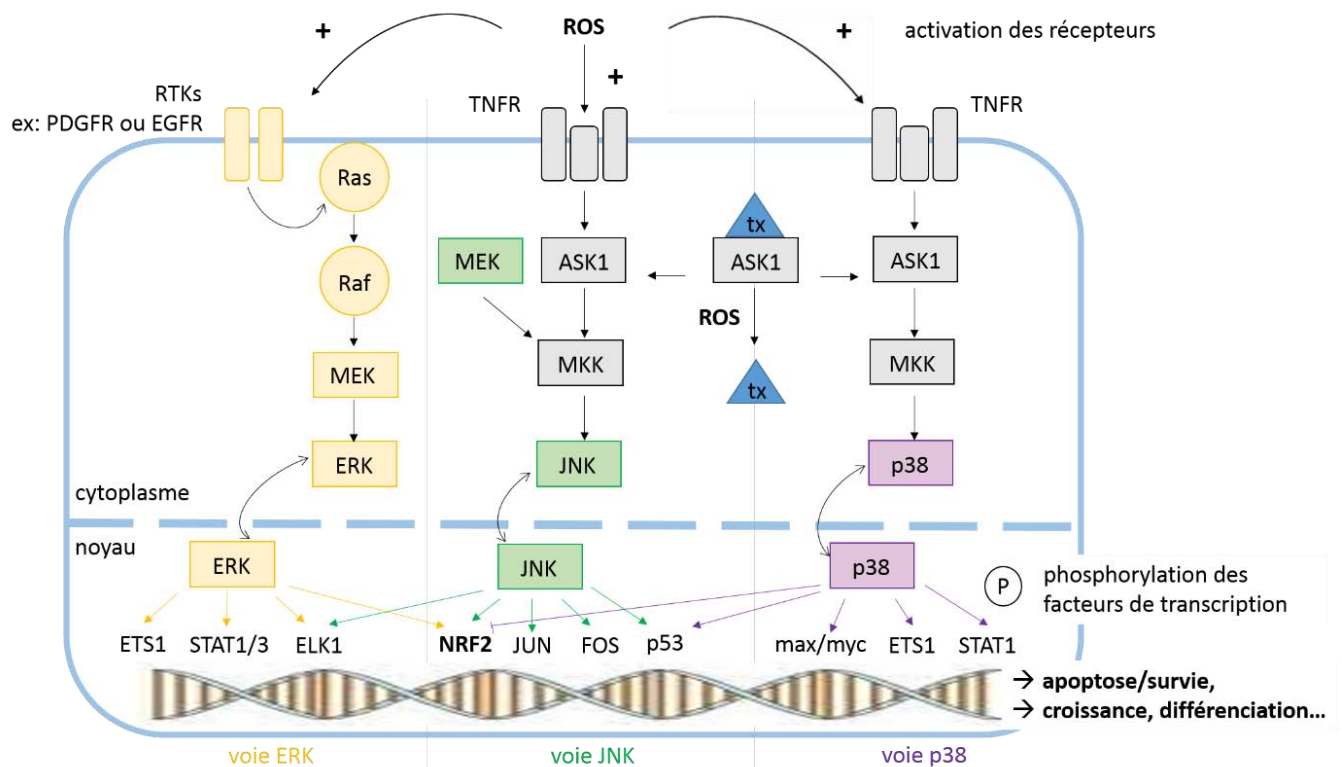


Figure 24 : MAPKs et stress oxydant. ASK1 : apoptosis signal-regulating kinase; ETS1 : extracellular signal-regulated kinase 1; JNK : Jun amino-terminal kinase; MKK/MEK : MAP kinase kinase ; NRF2 : nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2; RTK : récepteur à activité tyrosine kinase; STAT : signal transducers and activators of transcription; TNFR : tumor necrosis factor receptor; TX : thioredoxine.

Les MAPKs font également partie des gènes dont le polymorphisme influence le risque de déclarer un cancer colorectal. Ainsi plusieurs allèles critiques associés à sept gènes codant pour des protéines de la voie des MAPKs ont été identifiés par des études d'association pangénomique (LASCORZ *et al.* 2010). Enfin, relativement au cancer du côlon, la mutation de Ras est connue pour faire partie des étapes précoces de la transformation. Or Ras fait partie des activateurs amont de la voie ERKs selon la séquence RAS/RAF/MEK/ERK.

F. LES INDUCTEURS DE NRF2

F.1 Le HNE

Chimiquement, le HNE fait partie de la classe des accepteurs des réactions de Michael. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer la capacité du HNE à induire NRF2, parmi lesquels l'activation amont de kinases pléiotropes telles que la PKC (NUMAZAWA *et al.* 2003) ou la PI3K (CHEN *et al.* 2009a). Mais la partie consensuelle du mécanisme reste la modification du senseur de stress oxydant KEAP1. NRF2 est ancré dans le cytoplasme par KEAP1 lié à l'actine. La liaison du HNE aux cystéines réactives de KEAP1 engendre chez ce dernier un changement de conformation qui permet son détachement de NRF2. NRF2 se relocalise alors vers le noyau, ce qui a pour conséquence une activation des gènes codant pour les enzymes de détoxification du HNE, c'est-à-dire les GSTs, les ALDHs, et les AKRs). Il a été montré que l'interruption de la voie NRF2 met à mal la signalisation anti-oxydante et conduit à l'accumulation de HNE (SINGH *et al.* 2010a).

F.2 Les autres inducteurs

Les inducteurs de NRF2 peuvent être regroupés en quelques grandes classes selon leur chimie (BRYAN *et al.* 2013; TALALAY *et al.* 1988) (figure 25):

-les quinones, les phénylènediamines, et les diphénols oxydables, tels que le tert-butylhydroquinone (tBHQ, inducteur chimique extensivement utilisé dans de nombreuses études sur NRF2)

-les isothiocyanates et les sulfoxythiocarbamates, tels que le sulforaphane (trouvés dans les brocolis, les choux-fleurs, les choux chinois, ou la moutarde), ou le benzylisothiocyanate (BITC, retrouvé dans les choux, navet, colza, raifort, cresson...)

-les dithiolethiones, tels que l'Oltipraz (utilisé notamment dans le traitement du cancer du foie), ou l'acide (R)-lipoïque (naturellement fabriqué par l'organisme à partir de la cystéine)

-les polyènes, tels que la chlorophylle (dont les végétaux à feuilles vertes sont riches)

-les hydroperoxydes tels que le peroxyde d'hydrogène

-les métaux lourds, tels que le mercure, le cadmium, ou le zinc

-les accepteurs des réactions de Michael, tels que le curcumin (issu d'une racine, le curcuma), le zerumbone (issu d'une autre racine, le gingembre), le resvératrol (dont le vin, les raisins, les mûres, les cacahuètes, contiennent des quantités élevées), le ptérostilbène (dont les myrtilles regorgent), le citral _ ou gèranial (que l'on retrouve dans l'huile de citronnelle, de verveine, d'orange, et de citron entre autres).

-et bien d'autres encore, parmi lesquels on peut citer les thiocarbamates, ou les arsenics trivalents.

Parmi ces inducteurs, certains, tels que les stilbènes, ne sont pas intrinsèquement capables d'activer NRF2 car n'étant pas doté d'un caractère oxydant ou électrophile. Une bioactivation est alors nécessaire : c'est notamment le cas du resvératrol, qui est activé par une CYP3A4 pour former une benzoquinone réactive capable de liaisons covalentes (ex : avec KEAP1) (ZHOU *et al*, 2004).

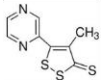



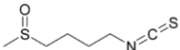

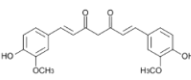

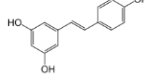

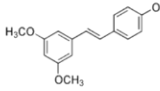

Inducteurs chimiques		Inducteurs naturels de Nrf2				
quinones	dithiolethiones	polyènes	sulfoxythiocarbamates	accepteurs des réactions de Michael		
ex: tBHQ	ex: Oltipraz	ex: chlorophylle	ex: sulforaphane	ex: curcumin	ex: resvératrol	ex: ptérostilbène
		 	 	 	 	 

Figure 25 : principales classes d'inducteurs de NRF2.

G. CANCER DU CÔLON : FOCUS SUR LE CURCUMIN ET LE PTEROSTILBENE

G.1 Le curcumin

Les effets du curcumin sur les cellules épithéliales coliques humaines cancéreuses sont multiples : inhiber les voies d'inflammation, activer les voies de détoxication, activer la mort cellulaire par apoptose ou autophagie, inhiber les capacités migratoires et prolifératives (RAVINDRAN *et al.* 2009; WILKEN *et al.* 2011).

Cependant, la principale propriété du curcumin semble être son aptitude à se comporter comme un électrophile (MINASSI *et al.* 2013; TURPAEV 2013), et ce serait par ce biais qu'il pourrait induire bon nombre de ses effets. Ainsi il a été montré chez des lignées humaines coliques COLO205 que le curcumin (<20µM) induisait l'apoptose via la production de ROS, une augmentation des niveaux de Ca²⁺, et une activation de la voie apoptotique mitochondriale; il inhiberait également la migration cellulaire via l'inhibition de la voie NF-κB, de la production de COX-2 et de certaines metalloprotéases indispensables à la digestion du tissu matriciel. Cette inhibition de COX-2 pourrait avoir pour effet physiologique de diminuer l'inflammation colique mais également contribuer à inhiber l'angiogenèse (BINION *et al.* 2008; PLUMMER *et al.* 1999; SU *et al.* 2006). Dans des HCT116, à des concentrations

inférieures à 10 μ M, il inhiberait la voie NF- κ B et la production d'IL-8, ainsi que la migration cellulaire (WANG *et al.* 2006) ; tandis qu'en générant des ROS il contribuerait aussi à ralentir le cycle cellulaire en modulant l'expression de gènes sous le contrôle de la famille de facteurs de transcription E2F (KIM and LEE 2010). Il a également été montré dans ces cellules que le curcumin (<20 μ M) pouvait induire la mort par autophagie (LEE *et al.* 2011). Dans des HT-29, il induirait l'apoptose en activant p53 et en induisant des protéines pro-apoptotiques telles que Bax et les pro-caspases 3 et 9 (SONG *et al.* 2005). Le curcumin, à des concentrations variant entre 10 μ M et 30 μ M selon le type cellulaire, pourrait également inhiber l'activité du protéasome *via* la formation d'adduits entre le curcumin et certaines sous-unités du protéasome, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, ce qui contribuerait à orienter le colono-carcinome vers la voie de l'apoptose (MILACIC *et al.* 2008). Enfin, le curcumin serait capable de moduler la méthylation de l'ADN dans les lignées coliques HCT116, HT29 et RKO (LINK *et al.* 2013), et notamment de promouvoir la déméthylation des îlots CpG du promoteur du gène NRF2, ce qui améliore sa transcription (KHOR *et al.* 2011). Cependant, peu d'études existent établissant un lien clair entre curcumin, NRF2 et cancer du côlon. De façon plus originale, il a été mis en évidence dans des Caco-2 que le curcumin pourrait être un ligand du récepteur à la vitamine D, et qu'ainsi il pourrait cibler l'expression de gènes codant pour des enzymes de détoxification telles que CYP3A4 ou CYP24, ainsi que des régulateurs du cycle cellulaire type p21 (BARTIK *et al.* 2010). La multitude d'effets positifs observés *in vitro* a très vite conduit à des expériences à succès sur modèles animaux (CARROLL *et al.* 2011; JOHNSON and MUKHTAR 2007), notamment des souris Min (MURPHY *et al.* 2011; PETTAN-BREWER *et al.* 2011) et des souris C57BL/6 induit au DSS (VILLEGAS *et al.* 2011), puis à des essais cliniques prometteurs chez des patients atteints de cancer colorectal (HE *et al.* 2011).

A noter que le curcumin s'est également révélé être un adjuvant de choix dans le cadre de chimiothérapies, agissant en synergie avec des molécules anti-cancéreuses reconnues: en combinaison avec le 5-Fluorouracil (5-FU), le 5-FU plus oxaliplatine (FOLFOX) ou le dasatinib notamment (NAUTIYAL *et al.* 2011; PATEL *et al.* 2008), effet qui pourrait être en partie dû au fait que ces associations permettraient d'éliminer les cellules souches cancéreuses coliques (Yu *et al.* 2009).

Néanmoins, il est intéressant de noter qu'alors que jusqu'à récemment la majeure partie des études sur le curcumin et le cancer du côlon employaient le curcumin comme traitement

après un cancer établi, à présent plusieurs études émergent qui s'intéressent plus à son potentiel rôle chimiopréventeur (AGGARWAL *et al.* 2013; PATEL *et al.* 2010; TAMMARIELLO and MILNER 2010). Chez des souris C57BL/KsJ-db/db obèse par exemple (chez qui un état d'inflammation chronique est observé en même temps qu'un risque élevé de cancer du côlon), une nourriture enrichie en curcumin (de 0.2% à 2.0%) mène à une diminution significative du nombre de lésions préneoplasiques lorsque ces souris sont traitées à l'AOM (KUBOTA *et al.* 2012).

G.2 Le ptérostilbène

L'intérêt pour le ptérostilbène dans la problématique du cancer est plus récent (sur PubMed par exemple, aucun article avant 2002), car il longtemps resté dans l'ombre du resvératrol, l'autre molécule phare de la famille des stilbènes (NUTAKUL *et al.* 2011). Dans des HT-29 il a été prouvé que le ptérostilbène pouvait ralentir la prolifération cellulaire en inhibant l'expression de protéines activatrices du cycle cellulaire telles que c-Myc ou la cycline D1, et pouvait diminuer le niveau de marqueurs d'inflammation tels que COX-2 en activant la voie des MAPKinases (PAUL *et al.* 2009). Dans ces mêmes cellules, le ptérostilbène serait également capable de provoquer la mort cellulaire par perméabilisation des membranes lysosomales. La sensibilité de chaque type cellulaire à cet effet serait cependant modulé par leurs niveaux respectifs de HSP70, une protéine responsable entre autres de la stabilité des membranes lysosomales (MENA *et al.* 2012). Par ailleurs, il a été montré que le ptérostilbène réduisait la formation de lésions coliques et d'adénomes chez des souris traitées à l'AOM, et que cette réduction s'accompagnait d'une réduction de l'expression du facteur pro-angiogénique VEGF, de la cycline D1, de plusieurs métalloprotéases et de COX-2 (CHIOU *et al.* 2010). Une étude similaire menée chez des rats F344 a abouti à des observations comparables (PAUL *et al.* 2010). Enfin, des études récentes suggèrent que le ptérostilbène, comme le resvératrol, a la capacité d'activer les défenses anti-oxydantes des cellules et pourrait ainsi diminuer le niveau de stress oxydant cellulaire, connu pour créer un environnement favorable à la promotion. Des lignées HT-29 traitées avec des concentrations allant jusqu'à 100µM n'ont présenté aucune cytotoxicité, tandis que l'activité d'enzymes

telles que NQO1 et GST étaient améliorées (HARUN and GHAZALI 2012). En 2011, Chiou et ses collaborateurs ont identifié NRF2 comme étant l'une des voies qui contribueraient à l'effet protecteur du ptérostilbène sur la tumorigenèse colorectale induite chez des souris BALB/c ayant reçu une injection d'AOM (CHIOU *et al.* 2011).

OBJECTIFS DE MA THESE

Comme le soulignent les rappels bibliographiques précédents, APC est une protéine pluripotente dont la seule mutation est susceptible d'initier la transformation du colonocyte en colonocyte préneoplasique. Elle est l'un des régulateurs majeurs de la voie Wnt, impliquée dans le maintien de l'état indifférencié et la prolifération cellulaire; elle interagit de façon déterminante avec plusieurs protéines du cytosquelette, dont le rôle dans la migration cellulaire est primordial; elle participe à la ségrégation des chromosomes mitotiques, et, à ce titre, une mutation sur ce gène génère une instabilité chromosomique conduisant à l'aneuploïdie; enfin elle possède un rôle dans la régulation du cycle cellulaire et l'induction de l'apoptose, et un lien non négligeable avec l'un des facteurs majeurs de développement du cancer colorectal, l'inflammation colique. Nous travaillons au laboratoire avec deux lignées épithéliales coliques: une lignée *wild type*, *Apc +/+*, et une lignée possédant la mutation *Apc*, appelée *Apc Min/+*, correspondant à la transition cellule normale/cellule préneoplasique, basée sur la mutation du gène *Apc* sur un seul allèle. L'intérêt de ces modèles est que nous étudions, non pas des lignées transformées classiques présentant de multiples mutations, mais des lignées se comportant comme des primocultures et une mutation avérée seulement sur *Apc*.

En Europe et en Amérique du Nord, l'alimentation est un facteur majeur de risque de développement du cancer du côlon. Elle se caractérise entre autres par une consommation importante de viande rouge. La viande rouge est riche en fer héminique, ce qui lui donne sa couleur. Lorsqu'elle est ingérée, le processus de digestion libère le fer de sa matrice protéique au niveau de l'intestin. Non complètement assimilé par l'organisme, ce fer est alors capable d'oxyder les lipides des membranes des cellules épithéliales intestinales tout comme les lipides du bol alimentaire transformé. Ces réactions de peroxydation lipidique conduisent à la formation de produits secondaires de lipoperoxydation, parmi lesquels le 4-hydroxynonéal est le mieux caractérisé, avec un panel d'activités biologiques étendu.

En 2007, des colonocytes *Apc +/+* et des colonocytes préneoplasiques *Apc Min/+* ont été exposés à différentes concentrations de HNE, puis leur réponse respective a été évaluée par MTT, un test de viabilité classique (PIERRE *et al.* 2007). Le résultat, présenté ci-dessous, a constitué l'un des points de départ de ma thèse (figure 26).

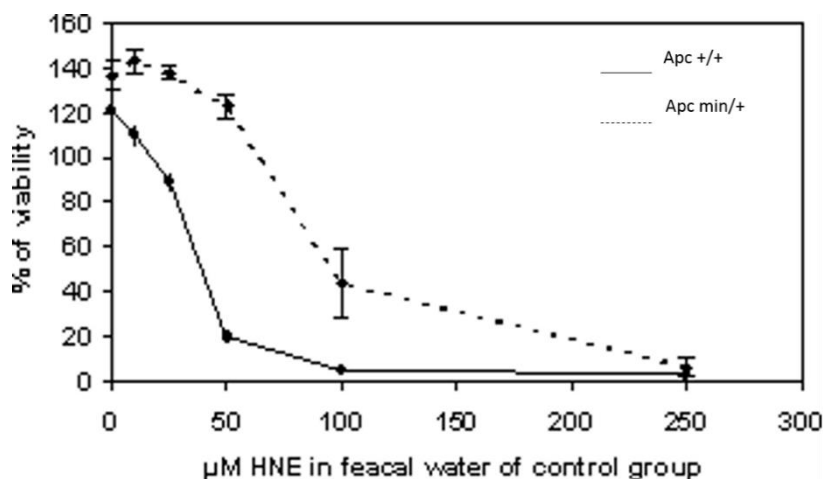


Figure 26 : Différentiel de survie à différentes concentrations de HNE entre les lignées Apc +/+ et Apc Min/+ établi par un test MTT (Pierre F. et al, *Carcinogenesis* 2007)

Le fait qu'*in vitro* des côlonocytes *wild type* survivent moins après une exposition au HNE que des côlonocytes mutés suggère qu'*in vivo*, dans le côlon, en conditions peroxydantes _ liées par exemple à une alimentation riche en fer héminique _ un mécanisme de sélection darwinienne pourraient promouvoir la sélection des cellules préneoplasiques à la défaveur des cellules saines (PIERRE *et al.* 2007). Cette sélection pourrait être un facteur majeur de la promotion tumorale (figure 27).

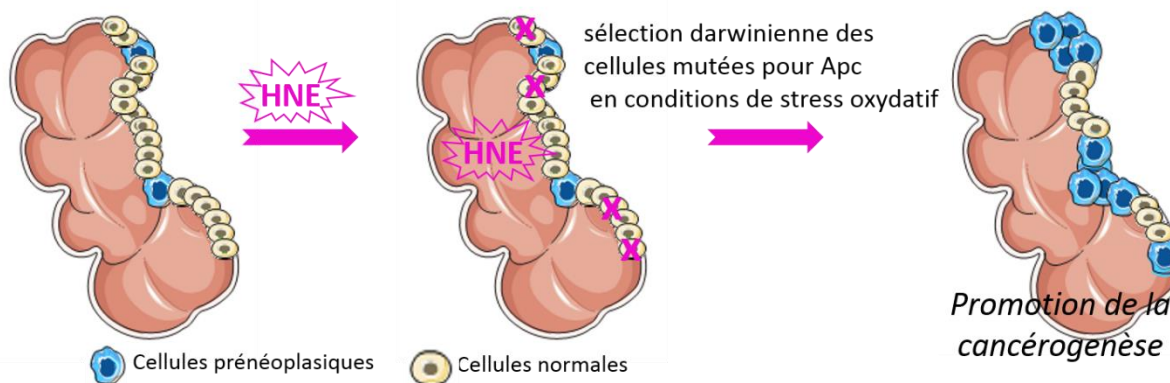


Figure 27 : Modèle de sélection darwinienne des cellules mutées pour APC dans le côlon en conditions de stress oxydant.

Dès lors, plusieurs questions ont émergé :

- I. Quelles sont les voies de signalisation susceptibles d'expliquer ce différentiel de survie entre cellules saines et cellules prénéoplasiques ?**

- II. Est-il possible, une fois ces voies identifiées, de favoriser la survie des cellules saines et la mort des cellules prénéoplasiques ?**

- III. Quel(s) type(s) de mort(s) cellulaire(s) sont initiés dans les deux lignées en réponse à l'exposition au HNE ?**

TRAVAUX ET RESULTATS

I. Quelles sont les voies de signalisation susceptibles d'expliquer pourquoi les cellules préneoplasiques survivent mieux au HNE que les cellules saines?

Article commenté (publié en 2011 dans *Chemical Research in Toxicology*):

[4-Hydroxy-2\(E\)-nonenal Metabolism Differs in Apc^{+/+} Cells and in Apc Min^{+/+} Cells: It May Explain Colon Cancer Promotion by Heme Iron](#)

Maryse Baradat, Isabelle Jouanin, Sabine Dalleau, Sylviane Taché, Mathilde Gieules, Laurent Debrauwer, Cécile Canlet, Laurence Huc, Jacques Dupuy, Fabrice H. F. Pierre, & Françoise Guéraud

Une alimentation riche en en fer héminique et en acides gras polyinsaturés génère la production d'aldéhydes génotoxiques, cytotoxiques, et réactifs, issus de la peroxydation des lipides par le fer. Cette réaction peut se dérouler spontanément au sein de la matrice alimentaire, mais également lors de la digestion. Parmi les aldéhydes les mieux étudiés : le HNE, est issu des acides gras n-6 comme l'acide linoléique et l'acide arachidonique. Des études antérieures avaient montré que les côlonocytes sains, les Apc ^{+/+}, étaient plus sensibles à la toxicité du HNE que des côlonocytes mutés pour Apc, les Apc Min^{+/+} (PIERRE *et al.* 2007). L'hypothèse la plus logique aurait été que la mutation Apc étant connue pour réduire le niveau des caspases 3, 7, et 9, ce différentiel de survie s'expliquait de lui-même du fait de l'incapacité des cellules Apc Min^{+/+} à induire l'apoptose en réponse au HNE. Pourtant, l'objet de cette première publication était de déterminer si la différence de survie observée n'était pas due à une différence dans la capacité des deux lignées à métaboliser et éliminer le HNE. Cette hypothèse tenait son origine du fait qu'une différence de métabolisme du PhIP, une amine hétérocyclique, là encore en faveur des Apc Min^{+/+}, avait déjà été précédemment observée (BELLOCQ *et al.* 2008).

Pour la confirmer, du HNE radiomarqué a été ajouté dans le milieu de culture, afin de pouvoir visualiser son élimination par radio-HLPC ; puis les métabolites obtenus à l'issue de la métabolisation du HNE par la cellule ont été analysés par spectrométrie de masse. Ces expériences ont été effectuées avant mon arrivée dans l'équipe : ma première tâche a été de réaliser les PCRs permettant d'évaluer le niveau transcriptionnel basal du panel de gènes codant pour les enzymes responsables du métabolisme du HNE, dans les deux lignées cellulaires.

Les résultats obtenus ont montré que l'hypothèse était plausible : une incubation avec 40 μ M de HNE s'est soldée par respectivement 6% et 38% de HNE métabolisé au bout de 30min, dans les cellules saines et les cellules prénéoplasiques; cela corrélé à une augmentation dans ces dernières des niveaux de HNA, de conjugués glutathion et de conjugués cystéine, trois métabolites majeurs du HNE. Un métabolite moins connu du HNE a également été identifié : le HNA saturé, issu de l'oxydation par l'AOR du HNE saturé. Nous nous sommes donc intéressés aux gènes codant pour les enzymes générant ces produits de métabolisation du HNE : l'AOR, les ALDHs et la GSTA4, mais aussi aux gènes codant pour les autres enzymes identifiées dans le métabolisme du HNE, c'est-à-dire les AKRs, les transporteurs types MRPs, MDRs, BCRP, RLIP76, ainsi que la thioredoxine réductase 1 et les GCLS/GCLM permettant indirectement la formation de glutathion. Parmi les gènes présentant un net différentiel d'expression entre les deux lignées : l'ALDH2, l'ALDH3A1, la GSTA4 et le transporteur glutamate/cystine xCT. Ces résultats ont confirmé que l'avantage de survie des cellules prénéoplasiques pourrait être dû à leur meilleure capacité de détoxification du HNE.

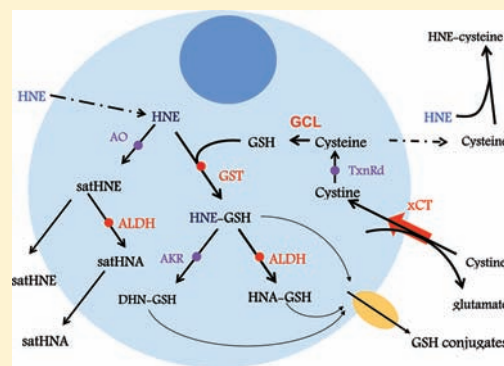
Néanmoins, cette publication ayant évalué les statuts basaux, elle n'a pas permis de déterminer si ces gènes étaient induits par le HNE. Par ailleurs, une zone d'ombre demeure : l'expression d'aucun de ces gènes n'a été identifiée comme étant reliée à la voie Wnt/ β -caténine. En revanche, ils sont tous sous le contrôle de Nrf2, un facteur de transcription qui fait office de gène maître de la réponse anti-oxydante. L'étape suivante a donc été d'une part d'observer le statut de Nrf2 à l'état basal et après un traitement au HNE, et d'autre part d'observer l'inductibilité des gènes du métabolisme du HNE par le HNE lui-même dans les deux lignées cellulaires.

4-Hydroxy-2(*E*)-nonenal Metabolism Differs in *Apc*^{+/+} Cells and in *Apc*^{Min/+} Cells: It May Explain Colon Cancer Promotion by Heme Iron

Maryse Baradat, Isabelle Jouanin, Sabine Dalleau, Sylviane Taché, Mathilde Gieules, Laurent Debrauwer, Cécile Canlet, Laurence Huc, Jacques Dupuy, Fabrice H. F. Pierre, and Françoise Guéraud*

INRA UMR1331, TOXALIM (Research Center in Food Toxicology), Université de Toulouse, ENVT, INP, UPS, ToxAlim, 180 chemin de Tournefeuille, F-31027 Toulouse, France

ABSTRACT: Animal and epidemiological studies suggest that dietary heme iron would promote colorectal cancer. Oxidative properties of heme could lead to the formation of cytotoxic and genotoxic secondary lipid oxidation products, such as 4-hydroxy-2(*E*)-nonenal (HNE). This compound is more cytotoxic to mouse wild-type colon cells than to isogenic cells with a mutation on the adenomatous polyposis coli (*APC*) gene. The latter thus have a selective advantage, possibly leading to cancer promotion. This mutation is an early and frequent event in human colorectal cancer. To explain this difference, the HNE biotransformation capacities of the two cell types have been studied using radiolabeled and stable isotope-labeled HNE. *Apc*-mutated cells showed better biotransformation capacities than nonmutated cells did. Thiol compound conjugation capacities were higher for mutated cells, with an important advantage for the extracellular conjugation to cysteine. Both cells types were able to reduce HNE to 4-hydroxynonanal, a biotransformation pathway that has not been reported for other intestinal cells. Mutated cells showed higher capacities to oxidize 4-hydroxynonanal into 4-hydroxynonanoic acid. The mRNA expression of different enzymes involved in HNE metabolism such as aldehyde dehydrogenase 1A1, 2 and 3A1, glutathione transferase A4-4, or cysteine transporter xCT was upregulated in mutated cells compared with wild-type cells. In conclusion, this study suggests that *Apc*-mutated cells are more efficient than wild-type cells in metabolizing HNE into thiol conjugates and 4-hydroxynonanoic acid due to the higher expression of key biotransformation enzymes. These differential biotransformation capacities would explain the differences of susceptibility between normal and *Apc*-mutated cells regarding secondary lipid oxidation products.



INTRODUCTION

Colorectal cancer (CRC) is the first cause of death by cancer in nonsmokers in affluent countries. Environmental factors such as food are believed to play a role in the development of CRC, as promoting or preventing agents. The intake of heme iron rich food, such as red or processed meat, is associated with an elevated risk of CRC.^{1–3} On the basis of meta-analyses of epidemiological studies, the World Cancer Research Fund panel (WCRF) in its 2007 report considers as convincing the risk associated with red and processed meat and recommends limiting red meat and avoiding processed meat consumption.⁴ In contrast, fish and white meat intake is not associated with an increase of CRC risk. As heme iron concentration is much higher in red meat than in white meat, it might be involved in the promoting effect of red meat. Indeed, we previously reported that dietary heme, in the form of either hemoglobin, hemin, red and processed meat, promotes the growth of precancerous lesions, aberrant crypt foci (ACF), and mucin depleted foci in the colon of rats given a low-calcium diet.^{5–8} The mechanisms underlying these observations are not known. It could be related to the pro-oxidative properties of heme iron, which induces the oxidation of dietary polyunsaturated fatty acids present in the diet. This oxidation

gives rise to reactive secondary lipid oxidation product formation, such as malondialdehyde and hydroxyalkenals. We and other authors have evidenced dietary heme-induced effects such as lipid peroxidation, increased proliferation, and genotoxicity.^{5,6,9,10}

Several secondary lipoperoxidation products have been characterized, especially concerning their biological roles. They can be found as food contaminants and are also endogenously formed under basal conditions, and their production increases under oxidative stress conditions. These reactive endogenous aldehydes are thus considered as “second messengers” of oxidative stress.^{11,12} The same aldehydes are present in the diet, particularly in heme-iron and polyunsaturated fat rich food,¹³ and probably also formed during digestion. They are cytotoxic and genotoxic. 4-Hydroxy-2(*E*)-nonenal (HNE) is one of the major alkenals formed upon linoleic and arachidonic acid oxidation and can play a role in the regulation of cell cycle.¹⁴

In a previous work, we have compared the effect of HNE treatment in immortalized mouse colonic epithelial normal cells (*Apc*^{+/+}) and in mouse colonic epithelial preneoplastic cells

Received: July 25, 2011

Published: October 03, 2011

(Apc^{Min/+}).¹⁵ Those cells deriving from wild type and Min mice crossed with Immortomouse mice represent an interesting *in vitro* model to investigate the mechanisms by which dietary components may impact colon cancer promotion and progression. Min mice, that are genetically predisposed to develop intestinal tumors, bear a mutation on the *Apc* gene, and loss of *Apc* function is known to be a frequent and early event in human CRC development. We have shown that HNE is more cytotoxic to normal cells than to preneoplastic cells at the same concentration.¹⁵ We thus suggest that HNE would promote colorectal carcinogenesis by selecting surviving mutated cells, as observed previously in rats with cholic acid.¹⁶

The aim of the present study was to evaluate the involvement of HNE metabolism in the differential cytotoxic effect in immortalized colonic epithelial mouse cell lines, mutated or not on the *Apc* gene. For this purpose, we have used HNE labeled with both radioactive (³H) and stable (¹³C) isotopes to get an accurate determination of HNE biotransformations. We report here a differential HNE biotransformation pathway regulation in both cell lines. In *Apc*-mutated cells, we showed higher HNE-thiol conjugates and 4-hydroxynonanoic acid levels due to the higher expression of key biotransformation enzymes. These differential biotransformation capacities would explain the differences of susceptibility in normal and preneoplastic cells regarding secondary lipid oxidation products.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Chemicals. γ -Nonalactone, ethyl 2-bromoacetate, and BHT were purchased from Aldrich (France). Solvents, 4-chlorothiophenol, hydrogen peroxide (30% in water), *n*-heptanal, and DIBAL (1 M in *n*-hexane) were purchased from Acros Organics (Belgium). *N*-Heptanal was distilled before use. Ethyl [1,2-¹³C₂]-2-bromoacetate (99% atom ¹³C) was purchased from Eurisotop (France). PBS and L-cystine hydrochloride were purchased from Sigma (France). DMEM was purchased from Gibco (Invitrogen, France).

[1,2-¹³C₂]-4-Hydroxy-2(*E*)-nonenal (¹³C-HNE). ¹³C-HNE was prepared according to our published method,¹⁷ with modifications. Ethyl [1,2-¹³C₂]-2-bromoacetate was converted to ethyl 4-hydroxy-2(*E*)-nonenoate by reacting consecutively with 4-chlorothiophenol, hydrogen peroxide, and *n*-heptanal as described.¹⁸ The remaining steps were unchanged, and the overall yield was improved to 20%.

4-Hydroxy-2(*E*)-nonenal (HNE). HNE was prepared from ethyl 2-bromoacetate by the same method as that for ¹³C-HNE.

Mixtures containing 2/3 molar amounts of HNE/¹³C-HNE were prepared for cell experimentation and were checked by NMR (¹H, CDCl₃).

4-Hydroxynonanal Hemiacetal (Saturated HNE (satHNE)). γ -Nonalactone was reduced to satHNE by DIBAL as described,¹⁹ with slight modifications. Briefly, 30 mL of DIBAL was added dropwise (1 h) to a cooled solution (−50 °C) of γ -nonalactone (3 mL) in 200 mL of petroleum ether (40–60 °C boiling range). After stirring for 1 h at −35 °C, methanol (10 mL), water (0.5 mL), silica, and magnesium sulfate were added. BHT was added to the crude mixture which was filtered and washed once with water. The satHNE sample was purified by preparative TLC (silica gel; elution with *n*-hexane/DCM/MeOH 70/30/2). Extraction with DCM containing methanol (4%) yielded satHNE (two diastereomers). The pure sample was analyzed by ¹H NMR (CDCl₃). It was stable for 4 days at +4 °C in water as checked by NMR (D₂O).

¹H NMR (CDCl₃). Diastereoisomer A: 5.54 (1H, d, *J* = 4.2 Hz, OCHOH); 4.18 (1H, m, OCH).

Diastereoisomer B: 5.45 (1H, d, *J* = 4.4 Hz, OCHOH); 3.98 (1H, m, OCH).

Both diastereoisomers: 2.14–1.25 (12H); 0.88 (3H, t, *J* = 6.2 Hz).

4-Hydroxynonanoic Acid (Saturated HNA (satHNA)). satHNA was synthesized by basic hydrolysis (1 M NaOH) of γ -nonalactone (+70 °C, 2 h). The mixture was acidified to pH 3 with 1 M phosphoric acid, then extracted 3 times with ethyl acetate, dried with magnesium sulfate, and evaporated in vacuo. The sample purity was checked by ¹H NMR (D₂O) and was stable for 4 days at +4 °C in water.

[4-³H]-4-Hydroxy-2(*E*)-nonenal (³H-HNE). ³H-HNE was synthesized as described in our published method.²⁰ The radiosynthesis of [4-³H]-4-hydroxy-2(*E*)-nonenal diethylacetal (aldehyde-protected precursor) was carried out at CEA, Service des Molecules Marquees, CEN, Saclay, France. The radiochemical purity was determined by HPLC (after acid hydrolysis with 1 mM HCl) and was found to be 95%, while its specific activity was 222 GBq/mol.

Cell Culture and Treatment. Apc^{+/+} and Apc^{Min/+} colon epithelial cells were established as described previously.^{21,22} Cells harbor a temperature-sensitive mutation of the simian virus 40 (SV40) large tumor antigen gene (tsA58), under the control of interferon γ . All cells of these mice are immortalized; they express active SV40 at the permissive temperature (33 °C) and proliferate. Cells were seeded at a permissive temperature of 33 °C in 6 well culture plates with 2 mL of Dulbecco's modified essential medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf sera, 1% penicillin/streptomycin, 2% glutamine, and 10 U/mL interferon γ . At subconfluence, i.e., 72 h after seeding, cells were placed for a 24-h period of adaptation at 37 °C without interferon γ to inhibit the SV40 transgene and limit proliferation, and without antibiotics. At nonpermissive temperatures, cell lines can be maintained in culture for 8 days, which is comparable with that of normal epithelial cells. Before experiments, cells were rinsed twice and preincubated for 15 min at 37 °C in 1 mL of DMEM without phenol red. [³H]-HNE was added to 2/3 molar amount of HNE/¹³C-HNE in water. Ten microliters of this solution was used for cell incubation. HNE concentration was checked spectrophotometrically (λ , 223 nm; ϵ , 13750 L mol^{−1} cm^{−1}) before cell treatment.

At the end of the incubation time, culture supernatants were collected in tubes containing 50 μ L of acetic acid and 10 μ g of BHT, in order to stabilize metabolites. Cells were rinsed 3 times with cold PBS and added with 900 μ L of 0.6 M perchloric acid in order to precipitate proteins. Precipitated cells were harvested and centrifuged for 5 min at 11600g. Supernatants were collected for further analysis. Precipitates were dissolved in 200 μ L of 1 M NaOH and counted for radioactivity in a Packard 2200CA scintillation counter (Packard, PerkinElmer, France) using Packard Ultima Gold as the scintillation cocktail.

Some experiments were done under the same conditions but with phosphate buffered saline (PBS) solution instead of DMEM (see the Results section).

Some experiments were done by treating cells with 0.2 mM L-cystine in PBS for 30 min at 37 °C and incubating the resulting supernatant with 40 μ M HNE for 30 min at 37 °C.

HPLC. HPLC analyses were carried out on a Kontron HPLC system (two Kontron 420 pumps (Kontron, Serlabo, France)) and the HPLC software Diamir (Agilent Technologies, France) equipped with a 100 μ L loop for radio-HPLC HNE metabolic profiles or with a 500 μ L loop for peak purification and connected to a Waters Spherisorb ODS2 column (5 μ m, 4.6 \times 250 mm) (Waters, France) in an oven set at 35 °C. This system was connected to an online radioactivity detector (Packard Flo-one Flow scintillation analyzer) using Flo-scint as the scintillation cocktail or connected to a Gilson FC 204 fraction collector (Gilson, France) and using Packard Ultima Gold as the scintillation cocktail and a Packard 2200CA as scintillation counter for peak purification. The separation of HNE metabolites was performed with 1 mL/min flow using two mobile phases. Mobile phase A contained water/acetonitrile/

acetic acid, 97.5/2.5/0.1; and mobile phase B contained water/acetonitrile/acetic acid, 40/60/0.1. The elution gradient was 0 min (15%B); 10 min (25%B); 20 min (26%B); and 40–50 min (65%B).

For the identification of the metabolite eluted at 41 min, culture supernatants were extracted by DCM, and the DCM phase was evaporated under vacuum. The dry extract was dissolved in 500 μL of HPLC mobile phase A and analyzed by HPLC. The peak at 41 min is collected and further purified using a 200 mg glass Chromabond SPE cartridge (Macherey-Nagel, France). The cartridge was eluted by CDCl_3 for further NMR analysis.

Mass Spectrometry Analyses. LC-MS: Cell culture supernatants were analyzed by LC-ESIMS using a Thermo Separation Products P1500 LC pump (Thermo Fisher, Les Ulis, France) fitted with the same column and using the same gradient elution as that described above (in the HPLC section). The flow rate was 1 mL/min with 1/5 post column splitting.

The liquid chromatograph was coupled to a Finnigan LCQ quadrupole ion trap mass spectrometer (Thermo Fisher) fitted with an electrospray ionization source operating in the negative mode. Typical ionization and ion transfer conditions were the following: electrospray needle, 4.5 kV; heated transfer capillary temperature, 220 $^{\circ}\text{C}$; heated transfer capillary voltage, -20 V ; and tube lens offset, 10 V. MS^2 experiments were carried out under automatic gain control using helium as the collision gas. Operating MS/MS ion excitation conditions (isolation width, excitation voltage, and excitation time) were adjusted to get maximum sensitivity and structural information for each compound of interest.

GC-MS: GC-MS analyses were achieved on a GC Trace (Thermo Electron, Les Ulis, France) gas chromatograph coupled to a Finnigan Polaris-Q ion trap mass spectrometer (Thermo Electron) by means of an AS2000 autosampler (Thermo Electron). The chromatographic separation was achieved on a BPX5 capillary column (25 m \times 0.22 mm ID, 0.25 μm film thickness) from SGE (Courtaboeuf, France). Samples purified by fraction collection (typically 50–200 ng) were evaporated to dryness, resolved in a BSTFA/TMCS (99:1) mixture and heated at 60 $^{\circ}\text{C}$ during 1 h for trimethylsilylation. The resulting solution was then evaporated to dryness under a gentle stream of nitrogen and retaken in 100 μL of hexane for GC-MS analysis. Injections (1–2 μL) were made in the splitless mode. Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 1 mL/min. The oven temperature was programmed as follows: 60 $^{\circ}\text{C}$ for 1 min, then 60 to 100 $^{\circ}\text{C}$ at 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, 100 to 250 $^{\circ}\text{C}$ at 25 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, and a final hold time of 13 min at 250 $^{\circ}\text{C}$. The injector and GC-MS interface were set at 220 and 250 $^{\circ}\text{C}$, respectively. Electron ionization mass spectra were acquired from m/z 50 to m/z 450 at a source temperature of 220 $^{\circ}\text{C}$.

NMR Analysis. Peak 41 isolated by HPLC and the 4-hydroxynonanal hemiacetal synthesized were analyzed by NMR spectroscopy. NMR spectra were obtained at 300 K using a Bruker Avance DRX-600 spectrometer (Bruker, Karlsruhe, Germany) operating at 600.13 MHz and equipped with a 5 mm ^1H - ^{13}C - ^{15}N inverse triple resonance cryoprobe attached to a Cryoplatfom (the preamplifier cooling unit). The sample isolated by HPLC and the synthesized standard were dissolved in 600 μL of deuterated chloroform (CDCl_3).

The one-dimensional spectrum was acquired using a standard pulse sequence for ^1H NMR; 2048 free induction decays (FIDs) were collected with a spectral width of 12 ppm into 32 K data points with a relaxation delay of 2 s and an acquisition time of 2.28 s. An exponential function equivalent to a line-broadening of 0.3 Hz was applied prior to Fourier transformation.

Quantitative RT-PCR. Cell RNA was isolated using TRI-REAGENT (Sigma, France) according to the manufacturer's instructions. Two-step Quantitative Reverse Transcriptase-PCR (RT-PCR) was performed using TBP (TATA Binding Protein) as the housekeeping gene. cDNA synthesis was obtained using the iScript cDNA Synthesis kit

(Bio-Rad, France) with 1 μg of RNA. After reverse transcription, cDNA was amplified using iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) by standard PCR with gene specific primers using a Bio-Rad CFX96 Real Time PCR detection system:

- xCT: (F)-5' TGA AAT TCC TGA ACT TGC AAT CA 3' / (R)-5' TGA CAC TCG TGC TAT TTA GGA CCA T 3'
- AOR: (F)-5' GAC AAA GCT GCC TGT AGA GTG G 3' / (R)-5' GCT GAC CAT CAC GGT TTC TCC A 3'
- GSTA4: (F)-5' GAT GAT TGC CGT GGC TCC ATT TA 3' / (R)-5' CTG GTT GCC AAC GAG AAA AGC C 3'
- ALDH1A1: (F)-5' GGA ATA CCG TGG TTG TCA AGC C 3' / (R)-5' CCA GGG ACA ATG TTT ACC ACG C 3'
- ALDH2: (F)-5' GCT GTT GTA CCG ATT GGC GGA T 3' / (R)-5' GCG GAG ACA TTT CAG GAC CAT G 3'
- ALDH3A1: (F)-5' GGT CCT TGT CAT AGG TGC TTG G 3' / (R)-5' GAA AGC AGG TCT GCC ATT TGA TC 3'
- TBP: (F)-5' ACT TCG TGC AAG AAA TGC TGA A 3' / (R)-5' GCA GTT GTC CGT GGC TCT CT 3'

Quantitative RT-PCR was conducted in a final reaction volume of 25 μL with 5 μL of cDNA, 7.5 μL of primers, and 12.5 μL of SYBR Green, using 0.2 mL of the thin wall PCR tube. Thermocycling conditions were set as follows: initial denaturation at 95 $^{\circ}\text{C}$ for 10 min, denaturation at 95 $^{\circ}\text{C}$ for 15 s, annealing at 60 $^{\circ}\text{C}$ for 30 s, and extension at 72 $^{\circ}\text{C}$ for 30 s.

Cytotoxicity Assay. Cells used for the cytotoxicity assay of HNE, satHNE, or satHNA were seeded into 96 well culture plates in DMEM culture medium. The cells were cultured at 33 $^{\circ}\text{C}$ with interferon γ until subconfluence and transferred at 37 $^{\circ}\text{C}$ without interferon γ for 24 h. After 24 h, cells were at confluence, and the culture medium was replaced with HNE, satHNE, or satHNA. Cells were incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 24 h. Cells were washed, then 100 μL of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide solution (MTT/0.45 mg/mL in PBS) was added to each well, and the cells were incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 4 h. The reaction product was solubilized in 100 μL of lysis buffer (10% SDS and 0.01 M NaOH) before the color of the reaction product was quantified using a plate reader at 570 and 690 nm. The results are expressed in % of dead cells relative to untreated wells. These assays were performed in triplicate.

Statistical Analyses. ANOVA and Student's t test were done using GraphPad Prism software.

RESULTS

HNE Uptake. After 5 min of incubation with 40 μM HNE, the radioactivity in the cellular content of $\text{Apc}^{\text{Min}/+}$ cells was 3 times more important than in $\text{Apc}^{+/+}$ cells (10% vs 3% of dose), although the radioactivity linked to cellular proteins was the same (1%). After 30 min, there was still more radioactivity in the cellular content of $\text{Apc}^{\text{Min}/+}$ cells, but the radioactivity linked to proteins was lower in preneoplastic cells (1.7%) than in normal cells (2.6%).

Time and Concentration-Dependent Overall Metabolism of HNE. Cells were treated with different concentrations of HNE (5–40 μM) for 30 min or during different times (5–90 min) at 40 μM . For each time or concentration point of the experiments, preneoplastic cells showed a higher biotransformation capacity than normal cells did (Figure 1). At 20–40 $\mu\text{M}/30$ min HNE treatment, $\text{Apc}^{\text{Min}/+}$ cells metabolized 6 times more HNE than $\text{Apc}^{+/+}$ cells did. After a 30 min period of treatment, the percentage of unmetabolized HNE remained low for $\text{Apc}^{\text{Min}/+}$ cells (3 to 6%) and increased from 15% to 36% for $\text{Apc}^{+/+}$ cells, when increasing the treatment from 5 to 40 μM .

HPLC Profiles and Metabolite Identifications. Various peaks have been observed after incubations of both cell types

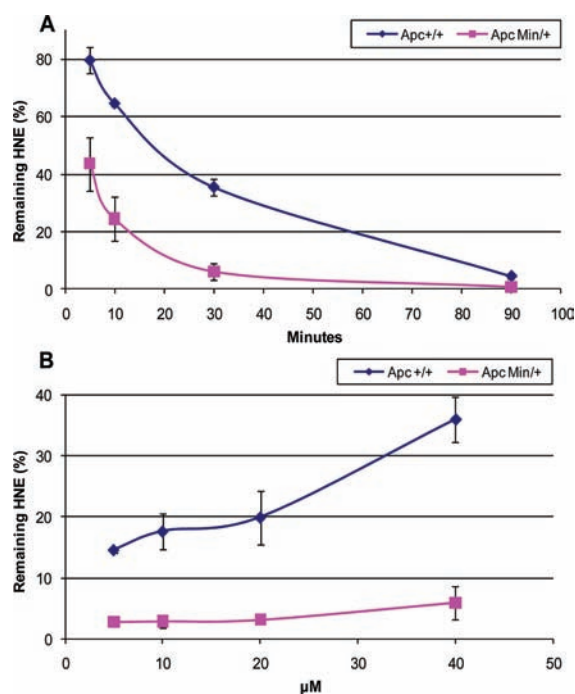


Figure 1. Time- and concentration-dependent metabolism of HNE. (A) For time-dependent studies, Apc^{+/+} and Apc^{Min/+} cells were treated with 40 μ M HNE. (B) For concentration-dependent studies, Apc^{+/+} and Apc^{Min/+} cells were exposed during 30 min to various concentrations of HNE. Data are expressed as the mean of three separate experiments \pm SD. All differences between Apc^{+/+} and Apc^{Min/+} cell lines are statistically significant (Student's *t* test) at $p < 0.01$.

after HNE treatment and radio-HPLC analyses of HNE metabolites (Figure 2). Minor peaks eluted at 3, 43, and 46 min were not further investigated since they were not quantitatively different between the two cell types.

As shown in Figure 2, a group of partially resolved peaks were eluted between 16 and 22 min. These retention times correspond to the isomers of the cysteine conjugate of HNE (HNE–cysteine) and to an unresolved mixture of the isomers of the glutathione conjugates of HNE (HNE–GSH) and its reduced form (DHN–GSH), respectively. Those conjugated metabolites were identified in a previous study on mouse colon epithelial cells (identical to Apc^{+/+} cells) using mass spectrometry,²³ on the basis of diagnostic fragment ions corresponding to the cysteine (m/z 189) or glutathione (m/z 254 and m/z 272) moiety of the metabolites analyzed in the negative electrospray ionization mode. The peak eluted at $R_t = 33$ min (Peak 33) exhibited partially coeluting $[M - H]^-$ ions at m/z 171 and m/z 460. Additional MS/MS experiments on these three precursor ions showed the presence of a mixture of HNA (fragment ions at m/z 71, 127, and 153) and HNA–GSH in its lactone form (fragment ions at m/z 254, 272, 306, and 442), already identified in a previous study.²³ A third metabolite exhibited $[M - H]^-$ ions at m/z 173, yielding fragment ions at m/z 155, 127, and 129 in a subsequent MS/MS analysis. This metabolite was identified as satHNA, the oxidized and saturated derivative of HNE.

In addition to the metabolites whose identification was confirmed by LC–MS, some other peaks detected by radio-HPLC gave no response on the corresponding LC–MS chromatograms. This was the case in particular for the peak eluted at 31.7 min. (Figure 2). For this metabolite, GC–MS analysis was carried out after silylation of the collected radio-HPLC peaks. This peak

eluted at the same retention time as DHN. After silylation, GC–MS analysis did not show any DHN in this fraction but revealed the presence of a metabolite exhibiting characteristic ions at m/z 321 ($[M - CH_3]^+$), and fragment ions resulting from α -cleavages of the OH group in position 4, at m/z 173 and m/z 265, respectively. On the basis of this information, this metabolite was tentatively identified as a thiol derivative of DHN, a metabolite that had not been identified in HNE metabolism studies until now.

Finally, the peak at $R_t = 41$ min (Peak 41) could not be evidenced using negative electrospray LC–MS. Thus, this peak has also been isolated and further analyzed by positive electrospray ionization, which gave weak peaks at m/z 159 (MH^+) and m/z 141 ($MH - H_2O]^+$). The complete characterization of this metabolite was achieved by NMR. By comparison with literature data,¹⁹ it corresponds to the saturated and cyclized form of HNE, 4-hydroxynonanal hemiacetal (saturated HNE; satHNE). Its identification was confirmed by comparison of its chemical shifts with those of a standard synthesized from γ -nonalactone (Figure 3). Apart from small peaks corresponding to BHT, solvent and small impurities in the synthesized standard, the chemical shifts matched with those of the isolated metabolite.

Metabolism Studies As a Function of Incubation Time and HNE Concentration. Table 1 shows the amount of the different metabolites as a function of incubation time and HNE concentration. In the present study, we have focused on metabolites or peaks that were quantitatively different between the two cell lines, as observed on radio-HPLC profiles (Figure 2). Those metabolites are HNE–cysteine ($R_t = 16.5$ min), satHNE ($R_t = 41$ min), peak at $R_t = 33$ min corresponding to a mixture of oxidized metabolites, as well as peaks eluted at R_t between 17.2 and 22 min corresponding to HNE and DHN glutathione conjugates.

HNE–cysteine formation was much higher for Apc^{Min/+} cells than for Apc^{+/+} cells, 13 nmol vs 2 nmol, respectively, after 30 min of incubation with 40 μ M HNE. A large difference remained present whatever the concentration or the incubation duration. On the contrary, satHNE formation was much higher for Apc^{+/+} cells than for Apc^{Min/+} cells, 9.5 nmol vs 1.8 nmol, respectively, after 90 min of incubation with 40 μ M HNE. However, when incubation time was short (5 min), satHNE was higher for Apc^{Min/+} cells. For HNE and DHN glutathione conjugates, the difference between cell types was less important and in favor of preneoplastic cells, especially when the concentration was high (40 μ M) and incubation times were long. For HNA and satHNA (peak 33), the difference was in favor of Apc^{Min/+} cells and only for high concentration (40 μ M) but low incubation times.

For some biotransformation pathways, namely, cysteine and HNE saturation and/or oxidation, we have performed several complementary experiments in order to identify the enzymes involved.

Radio-HPLC profiles of intracellular unbound metabolites, representing, respectively, 3 and 10% of radioactivity for Apc^{+/+} and Apc^{Min/+} cells after 5 min of 40 μ M HNE treatment and 2 and 5% after 30 min treatment, revealed essentially GSH conjugates (results not shown).

Conjugation Pathways. Cysteine conjugation to HNE has been observed by our group and other authors,^{24,25} but it is usually lower than GSH conjugation. As incubations with HNE were performed in DMEM, a culture medium that contains a relatively high concentration of cystine, the influence of medium

HNE metabolism (40 μ M, 30 minutes)

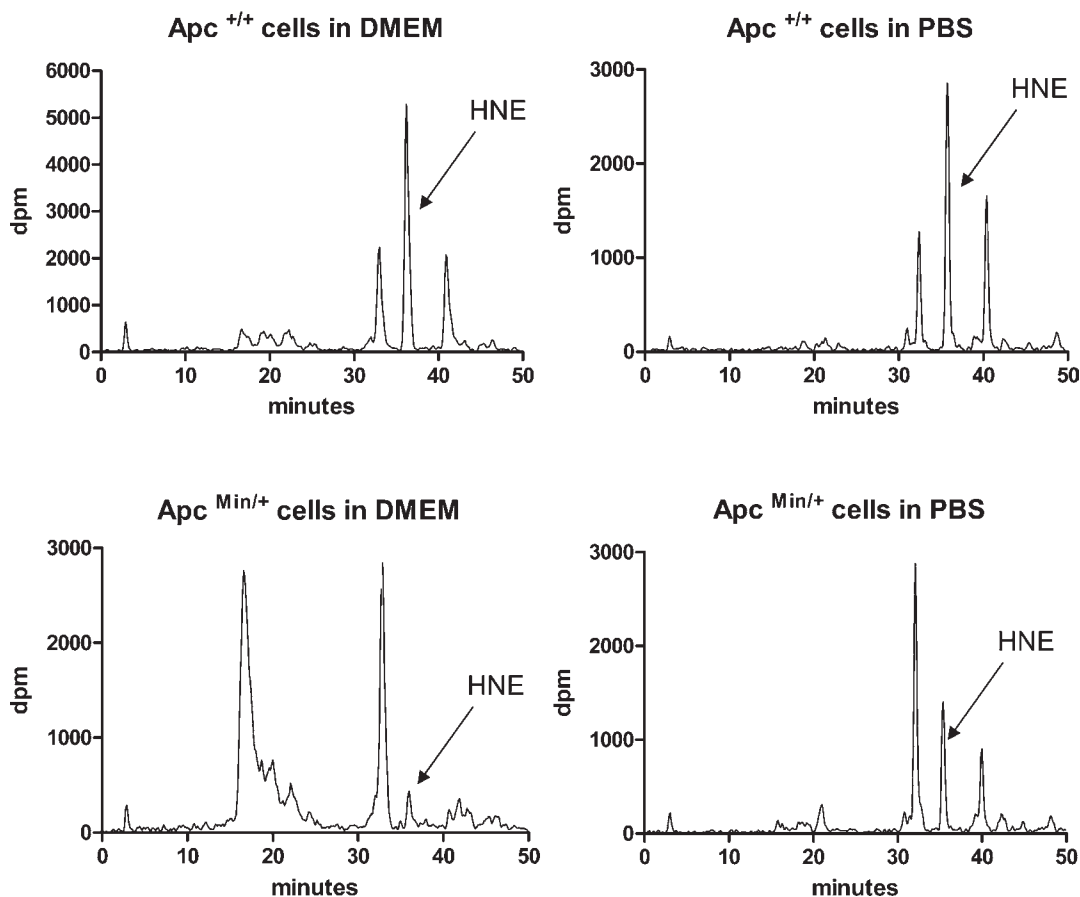


Figure 2. Radio-HPLC profiles of 30 min treatment with 40 μ M radiolabeled HNE of $Apc^{+/+}$ cells (top) and of $Apc^{Min/+}$ cells (bottom) in DMEM culture medium (left) or in PBS (right).

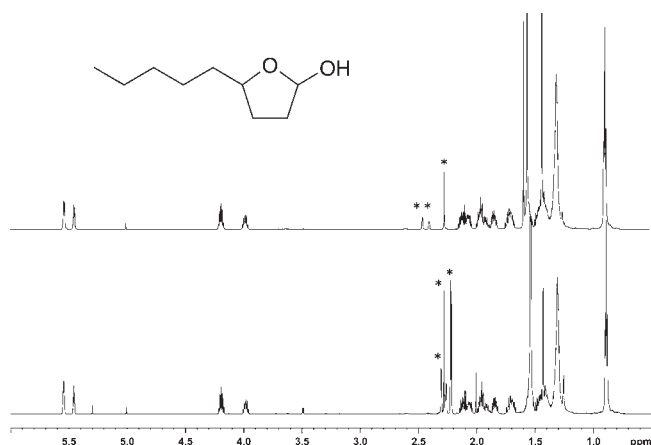


Figure 3. NMR spectra of synthesized 4-hydroxynonanal hemiacetal (satHNE) (top) and of collected Peak 41 (bottom). Sample isolated by HPLC and the standard synthesized were dissolved in 600 μ L of deuterated chloroform ($CDCl_3$). Peaks under * are impurities.

composition on HNE–cysteine formation was studied. We performed the same incubations, but we replaced DMEM by PBS buffer, and we observed a dramatic reduction in both GSH and cysteine conjugates (Figure 2). As such, a high cysteine conjugation is likely to occur mainly outside the cell because cells

do not contain high concentrations of cysteine due to its toxicity.²⁶ Then, we preincubated cells with cystine at the same concentration found in DMEM culture medium (0.2 mM) for 30 min, and we incubated the supernatant with 30 μ M HNE for 30 min. As expected, the amount of conjugates was much higher for $Apc^{Min/+}$ cell supernatants, 72% vs 32%, confirming that this conjugation would occur extracellularly.

As cystine must be reduced to give cysteine and because this is likely to occur intracellularly followed by an efflux step that is known to be nonlimiting, we studied the expression of the cystine transport systems in the two cell types. We first performed studies by replacing sodium by lithium in our culture medium to see whether the sodium pump was involved in the difference between cell types. As no difference was observed with this replacement (data not shown), we studied the expression of xCT (SLC7A11), which is a member of the heterodimeric amino acid transport system X_c^- , known to be involved in cystine entry in the cell in exchange for glutamate.²⁷ Quantitative RT-PCR analysis revealed an increased expression of the xCT transcript for preneoplastic cells, with no effect of 40 μ M HNE treatment (30 min) (Figure 4). We also analyzed the expression of the enzyme involved in HNE–GSH conjugation, namely, GSTA4-4, and we also observed an increased expression for $Apc^{Min/+}$ cells and no effect of HNE treatment.

HNE Saturation Pathway. SatHNE was quantitatively an important metabolite for $Apc^{+/+}$ cells. It was the major one after a 40 μ M HNE treatment, except when the incubation time was

Table 1. HNE Metabolism Studies^a

(A) As a Function of HNE Concentration (Incubation Time: 30 min)					
HNE (μM)	cell type	retention time			
		16.50 (HNE-cysteine)	[17.2; 22] (GSH conjugates)	33.00 (oxidized metabolites)	41.00 (SatHNE)
5	Apc ^{+/+}	367 \pm 121	1072 \pm 165	1475 \pm 272	702 \pm 33
	Apc ^{Min/+}	1733 \pm 333**	896 \pm 96	1653 \pm 349	283 \pm 31***
10	Apc ^{+/+}	787 \pm 136	2105 \pm 148	2493 \pm 235	1767 \pm 172
	Apc ^{Min/+}	3373 \pm 572**	2013 \pm 314	3103 \pm 766	360 \pm 252***
20	Apc ^{+/+}	1327 \pm 506	4113 \pm 237	4600 \pm 702	3613 \pm 528
	Apc ^{Min/+}	7233 \pm 863***	3787 \pm 666	5880 \pm 1427	687 \pm 372***
40	Apc ^{+/+}	1893 \pm 640	5120 \pm 1402	6787 \pm 1080	8173 \pm 1354
	Apc ^{Min/+}	13813 \pm 3698**	7747 \pm 201*	9467 \pm 522	2833 \pm 1040**

(B) As a Function of Incubation Time (HNE Concentration: 40 μM)					
time (min)	cell type	retention time			
		16.50 (HNE-cysteine)	[17.2; 22] (GSH conjugates)	33.00 (oxidized metabolites)	41.00 (SatHNE)
5	Apc ^{+/+}	467 \pm 321	1307 \pm 583	1640 \pm 418	2480 \pm 320
	Apc ^{Min/+}	7467 \pm 2854*	3547 \pm 1421	3907 \pm 760*	3840 \pm 382**
10	Apc ^{+/+}	1760 \pm 226	2700 \pm 1329	2440 \pm 396	4700 \pm 707
	Apc ^{Min/+}	11280 \pm 3338**	6080 \pm 1867*	6300 \pm 424***	4140 \pm 1556
30	Apc ^{+/+}	2107 \pm 699	4480 \pm 943	6973 \pm 1476	8400 \pm 1424
	Apc ^{Min/+}	12987 \pm 2560**	8400 \pm 773**	9453 \pm 189*	2493 \pm 1749*
90	Apc ^{+/+}	3180 \pm 674	7320 \pm 312	13440 \pm 917	9520 \pm 629
	Apc ^{Min/+}	10813 \pm 2580**	9573 \pm 660**	13653 \pm 824	1800 \pm 1035***

^a Radio-HPLC peaks are expressed as picomoles of metabolites. Data are expressed as the mean of three separate experiments \pm S.D. *, **, and *** show statistical differences (Student's *t* test) between Apc^{+/+} and Apc^{Min/+}, at $p < 0.05$, $p < 0.01$, and $p < 0.001$, respectively.

long. This result suggested that SatHNE was a primary metabolite that was further biotransformed, probably by oxidation: thus, the peak corresponding to oxidized metabolites was the most important at 90 min after HNE treatment in normal cells (Table 1). To determine the sequence of this putative pathway, we have isolated satHNE/peak 41, which was incubated with the two cell types. HPLC analysis of supernatants gave a peak corresponding to satHNA at $R_t = 33$ min (Figure 5), whose identification was further confirmed by LC/MS. This peak was much more important after incubations with preneoplastic cells indicating that these cells showed a better oxidative capacity toward this metabolite than normal cells. This could explain the low amount of satHNE observed for the preneoplastic cells in the metabolic profile (Figure 2). The reduction of the α,β -carbon-carbon double bond has been described by Dick et al.²⁸ for HNE and other α,β -unsaturated aldehydes and ketones. These authors showed that this reaction could be catalyzed by NAD(P)H-dependent alkenal/one oxidoreductase (AO). We have analyzed by quantitative RT-PCR the expression of AO and different aldehyde dehydrogenases (ALDH). We did not observe any difference in the expression of AO between the two cell lines (Figure 4). On the contrary, the expressions of ALDH 1A1, ALDH3A1, and ALDH2 were increased in preneoplastic cells, with no effect of HNE treatment (Figure 4).

Cytotoxicity Assays. As satHNE represented a major metabolite in normal cells, and as those cells were more susceptible to HNE cytotoxicity, synthesized satHNE and satHNA cytotoxicity was tested in both cell types. Both metabolites were not cytotoxic to the two cell types, with treatment concentrations ranging from 5 to 320 μM .

DISCUSSION

Although colon adenoma and carcinoma cell lines are well suited to demonstrate the chemoprotective properties of food components or drugs in CRC, those transformed cell lines do not model the physiological targets of promoting agents. Up to now, *in vitro* studies done on the effect of food originating components, and particularly HNE, on CRC development have been performed only on human or mouse colon carcinoma or adenoma cell lines. These transformed cell lines are poorly suited to investigate the biological effect of colon cancer promoters since normal or premalignant epithelial cells are the physiological targets of these components.²⁹ Hence, mechanistic conclusions for cancer promotion could not really be extrapolated from these *in vitro* studies. In colon carcinogenesis, mutations in the adenomatous polyposis coli (APC) gene on the chromosome 5q21 locus are considered to be one of the earliest events in the initiation and promotion of colorectal cancer.³⁰ APC is a tumor suppressor gene. Germline mutation of the APC gene determines the familial adenomatous polyposis (FAP) syndrome. Most colorectal cancers are sporadic (90%), but they share with FAP tumors the same early APC mutation in 50–80% of cases. In most sporadic colon cancers, like in FAP, a consequence of APC gene mutation is β -catenin accumulation. APC protein controls β -catenin activity through the canonical Wnt signaling pathway. APC mutation provokes the nuclear translocation of β -catenin and the subsequent activation of *c-myc*, cyclin D1, and *c-jun*, involved in cell-cycle regulation.³¹ The disruption of the Wnt/ β -catenin pathway is thus a major event in most colon cancers. The consequences of Apc mutation are well-documented, but few

studies have been conducted to explore the direct links between *Apc* mutation and the relationship of food/colon carcinogenesis. Thus, *in vitro* studies with *Apc*-mutated and nonmutated epithelial cells seem more suitable than carcinoma cell lines for drawing conclusions on the effect of food components in colon cancer promotion. We obtained an intestinal cell line derived from C57BL/6J mice (*Apc*^{+/+}) and *Min* mice (*Apc*^{Min/+}), which retains the heterozygous *Apc* genotype and the disordered actin cytoskeleton network for the *Apc*^{Min/+} cell line.^{21,22} This cellular model can contribute to a better understanding of biological effects of promoters on nonmutated (*Apc*^{+/+}) or premalignant cells (*Apc*^{Min/+}). The importance of such cell culture systems modeling different stages of tumorigenesis in the comprehension

of mechanisms by which dietary components impact cancer progression has been described by Fenton et al.³² In a previous work, we showed that HNE was more cytotoxic to *Apc*^{+/+} cells than to *Apc*^{Min/+} cells, at concentrations between 10 and 100 μM . This could be related to the fact that *Apc* mutation has been shown to reduce the level of caspases 3, 7, and 9 in mouse colonocytes, leading to a resistance to apoptosis.³³ However, the present study supports the involvement of a better biotransformation capacity in preneoplastic cells. The concentrations we used (0–40 μM) for HNE treatment of the cells were in the range of what was found in a previous work in the feces of rats fed on diets containing red meat.¹⁵

Few teams have investigated the impact of *Apc* mutation on metabolism. In fact, Bellocq et al.³⁴ investigated the metabolism of the prominent heterocyclic aromatic amine PhIP by the same cellular model, after induction by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. They described a higher metabolic bioactivation property toward ¹⁴C-PhIP for premalignant cells than for normal ones. More recently, the same authors reported again a higher biotransformation activity toward oestradiol-17 β for premalignant cells than for *Apc*^{+/+} cells, even in the absence of dioxin induction.³⁵ Giera et al.³⁶ reported an increased expression of glutathione transferases of the μ subfamily correlated to the activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway, a pathway activated by *Apc* mutation (see above).

In the present study, we chose different time and concentration courses within the range in which we previously observed a differential cytotoxicity between the two cell lines, 24 h after HNE treatment. We observed a rather low degradation rate of HNE by our two cell types, with 38% and 6% of unmetabolized HNE after 30 min of incubation, for normal and preneoplastic cells, respectively. In fact, this time course of 40 μM HNE degradation was quite similar to the one very recently reported by Siems et al.³⁷ for resting or stimulated polymorphonuclear leukocytes treated by 10 μM HNE, with 38% and 13% of remaining HNE after 30 min of incubation, respectively. It was, however, very different from what the same authors observed for other cell types, such as rat hepatocytes or rabbit fibroblasts, for which less than 1% of initial HNE could be found after 3 min of incubation.^{37,38} Grune et al.³⁹ reported a similar HNE utilization between rat enterocytes of the small intestine and hepatocytes, while Esterbauer et al.⁴⁰ reported a nearly undetectable HNE-metabolizing activity for the rat small intestine homogenate.

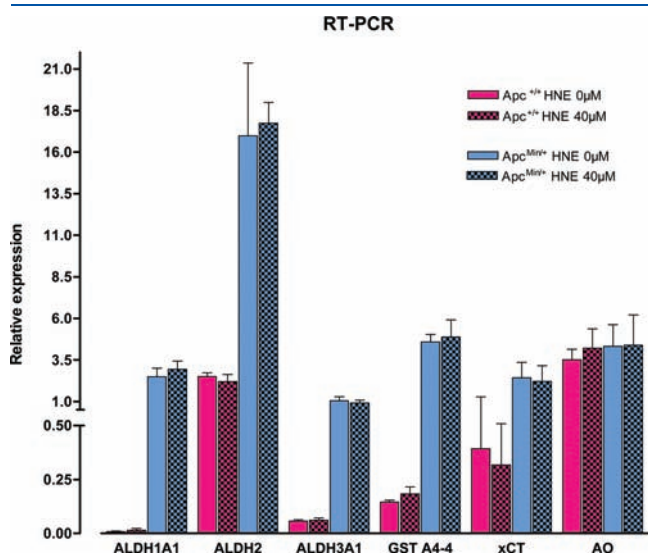


Figure 4. Relative expression of some HNE-related enzymes and transporters between *Apc*^{+/+} and *Apc*^{Min/+} cells, with or without 40 μM HNE treatment for 30 min, analyzed by quantitative RT-PCR. Data are expressed as the mean of three separate experiments \pm SD. Data were analyzed by ANOVA, and means were compared by the Newman–Keuls test. Except for AO for which no statistical difference was observed, all differences between cell lines are statistically significant at $p < 0.001$ except for xCT for which $p < 0.01$. HNE treatment has no statistically significant effect.

satHNE metabolism

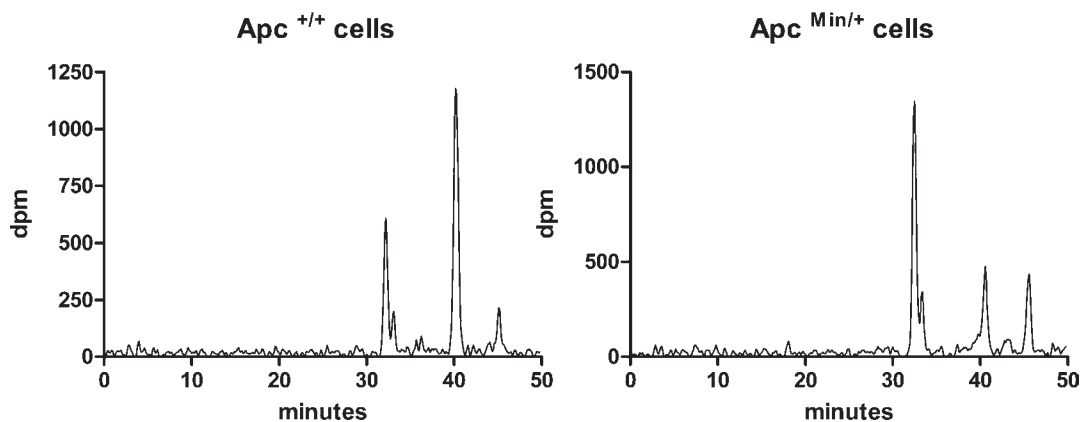


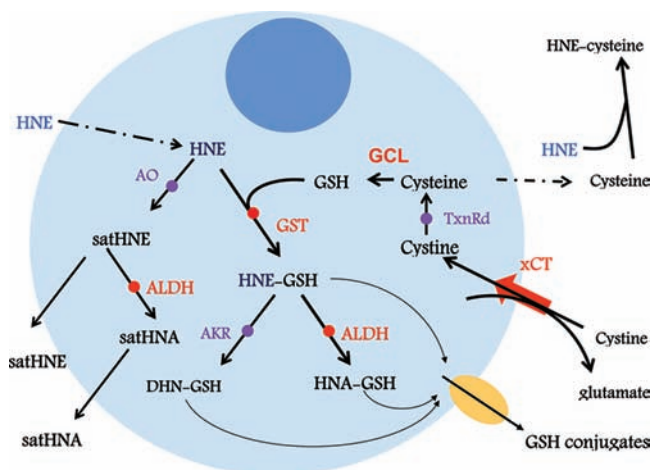
Figure 5. Radio-HPLC profiles of 30 min treatment with collected Peak 41/satHNE of *Apc*^{+/+} cells (left) and of *Apc*^{Min/+} cells (right).

We have observed an increased metabolism ability of preneoplastic cells compared to normal cells, which could explain the better resistance of preneoplastic cells toward HNE cytotoxic properties observed in our previous work.¹⁵ This difference can be attributed to a better capacity of using protective thiol-containing cysteine or glutathione to form unreactive conjugated metabolites and to a better capacity to form carboxylated metabolites from the aldehyde function.

The important amount of cysteine conjugates obtained, particularly in preneoplastic cells, is obviously due to the presence of cystine in the culture medium. Cysteine/cystine is a major low-molecular-weight thiol/disulfide redox system in most extracellular fluids. However, the redox potential found in culture medium, with 0.2 mM cystine and no cysteine, is rather oxidizing. CaCo-2 colonic epithelial cells were reported to be able to regulate this oxidizing redox potential to a more physiological one, by the use of sodium-dependent and independent systems that involve the uptake of extracellular cystine, its intracellular reduction, and the efflux of cysteine.⁴¹ Cysteine can then serve as an extracellular trap to scavenge potentially harmful electrophilic compounds, such as HNE, or be used for the *de novo* synthesis of intracellular GSH, also involved in HNE biotransformation. Those systems involve xCT, the substrate specific subunit of the cystine/glutamate antiporter. We report here that the expression of xCT is increased in preneoplastic cells compared to Apc^{+/+} cells and that could explain the better conjugation capacities for preneoplastic cells. This is in accordance with the fact that this cystine/glutamate antiporter is widely expressed in many cancer cell lines and in primary tumors (for a review see ref 42) including human colon CaCo-2 differentiated or undifferentiated cells.⁴³ These results are in agreement with a better resistance of those precancerous cells toward oxidative insults.

We report here the presence of 4-hydroxynonanal in its cyclic hemiacetal form (satHNE) as a major metabolite for normal colonocytes. This metabolite has been first evidenced by Dick et al.²⁸ after treatment by HNE of transfected human kidney embryonic cells with a rat liver NAD(P)H-dependent alkenal/one oxidoreductase (AO) expression vector, an enzyme also known as leukotriene B₄ 12-hydroxydehydrogenase, 15-oxo-prostaglandin 13-reductase, or dithiolethione-inducible gene-1. This metabolite has not been described in most of the HNE metabolism studies, probably because of its low stability. On the contrary, its oxidized metabolite (satHNA) has been evidenced before in our laboratory in rat precision-cut liver slices²⁴ and by others in astrocytes, but in its lactone form, namely, γ -nonalactone.⁴⁴ In the study in liver slices, the existence of satHNA was attributed to HNA reduction. Our present results indicate that satHNA might likely originate from the oxidation of satHNE. Because of the high formation of satHNE in normal colonocytes, we were able to identify it by means of NMR analysis together with the use of an authentic standard. This primary metabolite is rapidly oxidized in satHNA by preneoplastic cells. Hence, it is difficult to determine whether its formation is higher in normal cells compared to preneoplastic ones, or if the reason of this difference is due to a better secondary oxidative metabolism of this metabolite by preneoplastic colonocytes, as we were not able to resolve the HNA/satHNA peak. The fact that there is no difference between the two cell types in the expression of the AO enzyme and, on the contrary, a huge difference in the one of ALDH1A1 would be an argument for the second explanation. ALDH1A1 is known to have a substrate preference

Scheme 1. Proposed Metabolic Pathways for the Metabolism of HNE in Mouse Colonocytes^a



^a The red circles and arrow show up-regulated pathways in Apc^{Min+} cells. Purple circles show unchanged pathways in the two cell lines. Orange circle: glutathione conjugate transporter. Blue: extracellular HNE. AKR, aldo-keto reductase; ALDH, aldehyde dehydrogenase; AO, NAD(P)H-dependent alkenal/one oxidoreductase; GCL, glutamate cysteine ligase; GSH, glutathione; GST, glutathione transferase; SatHNA, 4-hydroxynonanoic acid; satHNE, 4-hydroxynonanal hemiacetal; TxnRd, thio-redoxin reductase; xCT, member of the heterodimeric amino acid transport system x_c^- .

for aldehydic lipid oxidation products such as HNE and malondialdehyde.⁴⁵

Our results show that some pathways involved directly (such as glutathione conjugation and HNE oxidation) or indirectly in HNE biotransformation (such as cystine uptake) are upregulated in preneoplastic cells when compared to normal ones (Scheme 1). To our knowledge, there is no direct link between the regulation of the expression of such enzymes and the Apc/Wnt pathway. The only known study concerned GSTs of the μ subfamily,³⁶ but HNE metabolism preferentially involves GSTs from the α subfamily, particularly GSTA4-4.⁴⁶ However, some of the enzymes probably involved in those metabolism pathways share a common induction by the nuclear erythroid related factor 2/antioxidant responsive element (Nrf2/ARE) pathway, a pathway that regulates the expression of many mammalian detoxification and antioxidant enzymes under conditions of oxidative or electrophilic stress.⁴⁷ GSTA4-4, a GST specific for HNE conjugation to GSH and γ -glutamylcysteine synthetase, the rate-limiting enzyme for GSH synthesis, were reported to be regulated by this pathway.^{48,49} Nrf2 activators were reported as inducers of ALDH1A1 expression.⁴⁵ The substrate specific subunit of the cystine/glutamate antiporter xCT is also under the regulation of this pathway.⁵⁰ Apc-mutated cells would be programmed to resist to HNE treatment, through the up-regulation of HNE metabolizing genes and possibly through a permanent activation of Nrf2. This is in accordance with the previous reports that describe a permanent activation of Nrf2 observed in some cancerous cells, either by inactivation of the Nrf2 repressor Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) observed in different tumor types (but not CRC) or by a direct mutation of Nrf2, evading Keap1 repression⁵¹ leading to increased Nrf2 translocation into the nucleus and subsequent upregulation of ARE-dependent cytoprotective genes. HNE itself is known to activate this pathway and to induce the expression of xCT in cardiomyocytes.⁵²

However, in the present study, we did not observe any effect of HNE treatment on the expression of the different tested enzymes. This could be due to the short treatment time we used (30 min) in relation to HNE-metabolizing activities. Further work will provide new data about the role of Nrf2 in Apc-mutated cells.

Apc mutation induces in cells a better capacity to get rid of potentially harmful dietary secondary lipid oxidation products through coordinated biotransformation pathways and a subsequent survival advantage for the mutated cells in a peroxidative environment. Such an environment is likely to be found in the colon lumen, when the diet is rich in heme iron but poor in counterbalancing compounds, such as antioxidants or heme-chelating agents. These new results could provide a relevant explanation of the epidemiologic relationship between red and processed meat intake and colorectal cancer risk.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Tel: 00-33-561-28-50-05. Fax: 00-33-561-28-52-44. E-mail: fgueraud@toulouse.inra.fr.

Funding Sources

Research on HNE metabolism in colon epithelial cells is supported by La Ligue Nationale contre le Cancer, Comité de Haute-Garonne.

DEDICATION

This work is dedicated to the memory of Dr. Jacques Alary, our colleague and friend, who started HNE metabolism studies in our group.

ABBREVIATIONS

ACF, aberrant crypt foci; ALDH, aldehyde dehydrogenase; AO, NAD(P)H-dependent alkenal/one oxidoreductase; Apc, adenomatous polyposis coli; BHT, 2,6-dibutyl-4-hydroxy-toluene; BSTFA, *N,O*-bis-trimethylsilyl-trifluoroacetamide; CRC, colorectal cancer; DCM, dichloromethane; DHN, 1,4-dihydroxy-2(*E*)-nonene; DIBAL, diisobutylaluminium hydride; DMEM, Dulbecco's-modified essential medium; FAP, familial adenomatous polyposis; GST, glutathione transferase; HNA, 4-hydroxy-2(*E*)-nonenoic acid; HNE, 4-hydroxy-2(*E*)-nonenal; satHNA, 4-hydroxynonanoic acid; satHNE, 4-hydroxynonanal hemiacetal; TMCS, trimethylchlorosilane; xCT, member of the heterodimeric amino acid transport system X_c⁻

REFERENCES

- (1) Larsson, S. C., and Wolk, A. (2006) Meat consumption and risk of colorectal cancer: a meta-analysis of prospective studies. *Int. J. Cancer* 119 (11), 2657–2664.
- (2) Norat, T., Lukanova, A., Ferrari, P., and Riboli, E. (2002) Meat consumption and colorectal cancer risk: dose-response meta-analysis of epidemiological studies. *Int. J. Cancer* 98 (2), 241–256.
- (3) Bastide, N. M., Pierre, F. H., and 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.* 4 (2), 177–184.
- (4) WCRF (2007) *Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: A Global Perspective*, WCRF and American Institute for Cancer Research, Washington, D.C.
- (5) Pierre, F., Freeman, A., Tache, S., Van der Meer, R., and Corpet, D. E. (2004) Beef meat and blood sausage promote the formation of azoxymethane-induced mucin-depleted foci and aberrant crypt foci in rat colons. *J. Nutr.* 134 (10), 2711–2716.

- (6) Pierre, F., Tache, S., Petit, C. R., Van der Meer, R., and Corpet, D. E. (2003) Meat and cancer: haemoglobin and haemin in a low-calcium diet promote colorectal carcinogenesis at the aberrant crypt stage in rats. *Carcinogenesis* 24 (10), 1683–1690.
- (7) Santarelli, R. L., Vendeuvre, J. L., Naud, N., Tache, S., Gueraud, F., Viau, M., Genot, C., Corpet, D. E., and Pierre, F. H. (2010) Meat processing and colon carcinogenesis: cooked, nitrite-treated, and oxidized high-heme cured meat promotes mucin-depleted foci in rats. *Cancer Prev. Res.* 3 (7), 852–864.
- (8) Pierre, F. H., Santarelli, R. L., Allam, O., Tache, S., Naud, N., Gueraud, F., and Corpet, D. E. (2010) Freeze-dried ham promotes azoxymethane-induced mucin-depleted foci and aberrant crypt foci in rat colon. *Nutr. Cancer* 62 (5), 567–573.
- (9) Sawa, T., Akaike, T., Kida, K., Fukushima, Y., Takagi, K., and Maeda, H. (1998) Lipid peroxyl radicals from oxidized oils and heme-iron: implication of a high-fat diet in colon carcinogenesis. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 7 (11), 1007–1012.
- (10) Sesink, A. L., Termont, D. S., Kleibeuker, J. H., and Van der Meer, R. (1999) Red meat and colon cancer: the cytotoxic and hyperproliferative effects of dietary heme. *Cancer Res.* 59 (22), 5704–5709.
- (11) Esterbauer, H., Schaur, R. J., and Zollner, H. (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biol. Med.* 11 (1), 81–128.
- (12) Forman, H. J. (2010) Reactive oxygen species and alpha,beta-unsaturated aldehydes as second messengers in signal transduction. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1203, 35–44.
- (13) Gasc, N., Tache, S., Rathahao, E., Bertrand-Michel, J., Roques, V., and Gueraud, F. (2007) 4-hydroxynonenal in foodstuffs: heme concentration, fatty acid composition and freeze-drying are determining factors. *Redox Rep.* 12 (1), 40–44.
- (14) Gueraud, F., Atalay, M., Bresgen, N., Cipak, A., Eckl, P. M., Huc, L., Jouanin, I., Siems, W., and Uchida, K. (2010) Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. *Free Radical Res.* 44 (10), 1098–1124.
- (15) Pierre, F., Tache, S., Gueraud, F., Rerole, A. L., Jourdan, M. L., and Petit, C. (2007) Apc mutation induces resistance of colonic cells to lipoperoxide-triggered apoptosis induced by faecal water from haem-fed rats. *Carcinogenesis* 28 (2), 321–327.
- (16) Corpet, D. E., Tache, S., and Peiffer, G. (1997) Colon tumor promotion: is it a selective process? Effects of cholate, phytate, and food restriction in rats on proliferation and apoptosis in normal and aberrant crypts. *Cancer Lett.* 114 (1–2), 135–138.
- (17) Jouanin, I., Sreevani, V., Rathahao, E., Gueraud, F., and Paris, A. (2008) Synthesis of the lipid peroxidation product 4-hydroxy-2(*E*)-nonenal with C-13 stable isotope incorporation. *J. Label. Compd. Radiopharm.* 51 (1–2), 87–92.
- (18) Tanikaga, R., Nozaki, Y., Tamura, T., and Kaji, A. (1983) Facile synthesis of 4-hydroxy-(*E*)-2-alkenoic esters from aldehydes. *Synthesis* 2, 134–135.
- (19) Long, E. K., Smoliakova, I., Honzatko, A., and Picklo, M. J. S. (2008) Structural characterization of α,β -unsaturated aldehydes by GC/MS is dependent upon ionization method. *Lipids* 43 (8), 765–774.
- (20) Bravais, F., Rao, D., Alary, J., Rao, R. C., Debrauwer, L., and Bories, G. (1995) Synthesis of 4-hydroxy[4-H-3]-2(*E*)-nonen-1-Al-diethylacetal. *J. Label. Compd. Radiopharm.* 36 (5), 471–477.
- (21) Forest, V., Clement, M., Pierre, F., Meflah, K., and Menanteau, J. (2003) Butyrate restores motile function and actin cytoskeletal network integrity in apc mutated mouse colon epithelial cells. *Nutr. Cancer* 45 (1), 84–92.
- (22) Pierre, F. (1999) Immunoprophylaxie des cancers colorectaux par des glucides indigestibles fermentables: études chez la souris Min, Université de Nantes, Nantes, France.
- (23) Jouanin, I., Baradat, M., Gieules, M., Taché, S., Pierre, F. H. F., Guéraud, F., and Debrauwer, L. (2011) LC/ESIMS tracking of 4-hydroxy-2(*E*)-nonenal biotransformations by mouse colon epithelial cells using [1,2-¹³C₂]-4-hydroxy-2(*E*)-nonenal as stable isotope tracer. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 25, 2675–2681.

- (24) Laurent, A., Perdu-Durand, E., Alary, J., Debrauwer, L., and Cravedi, J. P. (2000) Metabolism of 4-hydroxynonenal, a cytotoxic product of lipid peroxidation, in rat precision-cut liver slices. *Toxicol. Lett.* 114 (1–3), 203–214.
- (25) Siems, W., and Grune, T. (2003) Intracellular metabolism of 4-hydroxynonenal. *Mol. Aspects Med.* 24 (4–5), 167–175.
- (26) Wang, X. F., and Cynader, M. S. (2001) Pyruvate released by astrocytes protects neurons from copper-catalyzed cysteine neurotoxicity. *J. Neurosci.* 21 (10), 3322–3331.
- (27) Huang, Y., Dai, Z., Barbacioru, C., and Sadee, W. (2005) Cystine-glutamate transporter SLC7A11 in cancer chemosensitivity and chemoresistance. *Cancer Res.* 65 (16), 7446–7454.
- (28) Dick, R. A., Kwak, M. K., Sutter, T. R., and Kensler, T. W. (2001) Antioxidative function and substrate specificity of NAD(P)H-dependent alkenal/one oxidoreductase. A new role for leukotriene B4 12-hydroxydehydrogenase/15-oxoprostaglandin 13-reductase. *J. Biol. Chem.* 276 (44), 40803–40810.
- (29) Marian, B. (2002) In vitro models for the identification and characterization of tumor-promoting and protective factors for colon carcinogenesis. *Food Chem. Toxicol.* 40 (8), 1099–1104.
- (30) Narayan, S., and Roy, D. (2003) Role of APC and DNA mismatch repair genes in the development of colorectal cancers. *Mol. Cancer* 2, 41.
- (31) Clevers, H. (2004) Wnt breakers in colon cancer. *Cancer Cell* 5 (1), 5–6.
- (32) Fenton, J. I., and Hord, N. G. (2006) Stage matters: choosing relevant model systems to address hypotheses in diet and cancer chemoprevention research. *Carcinogenesis* 27 (5), 893–902.
- (33) Chen, T., Yang, L., Irby, R., Shain, K. H., Wang, H. G., Quackenbush, J., Coppola, D., Cheng, J. Q., and Yeatman, T. J. (2003) Regulation of caspase expression and apoptosis by adenomatous polyposis coli. *Cancer Res.* 63 (15), 4368–4374.
- (34) Bellocq, D., Molina, J., Rathahao, E., Canlet, C., Tache, S., Martin, P. G., Pierre, F., and Paris, A. (2008) High potency of bioactivation of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in mouse colon epithelial cells with Apc(Min) mutation. *Mutat. Res.* 653 (1–2), 34–43.
- (35) Bellocq, D., Molina, J., Rathahao-Paris, E., Tache, S., Pierre, F., and Paris, A. (2010) Metabolic bioactivation of oestradiol-17beta (E2beta) in mouse colon epithelial cells bearing ApcMin mutation. *Steroids* 75 (10), 665–675.
- (36) Giera, S., Braeuning, A., Kohle, C., Bursch, W., Metzger, U., Buchmann, A., and Schwarz, M. (2010) Wnt/beta-catenin signaling activates and determines hepatic zonal expression of glutathione S-transferases in mouse liver. *Toxicol. Sci.* 115 (1), 22–33.
- (37) Siems, W., Crifo, C., Capuozzo, E., Uchida, K., Grune, T., and Salerno, C. (2010) Metabolism of 4-hydroxy-2-nonenal in human polymorphonuclear leukocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 503 (2), 248–252.
- (38) Siems, W. G., Zollner, H., Grune, T., and Esterbauer, H. (1997) Metabolic fate of 4-hydroxynonenal in hepatocytes: 1,4-dihydroxynone is not the main product. *J. Lipid Res.* 38 (3), 612–622.
- (39) Grune, T., Siems, W., Kowalewski, J., Zollner, H., and Esterbauer, H. (1991) Identification of metabolic pathways of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal by enterocytes of rat small intestine. *Biochem. Int.* 25 (5), 963–971.
- (40) Esterbauer, H., Zollner, H., and Lang, J. (1985) Metabolism of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal by isolated hepatocytes and by liver cytosolic fractions. *Biochem. J.* 228 (2), 363–373.
- (41) Mannery, Y. O., Ziegler, T. R., Hao, L., Shyntum, Y., and Jones, D. P. (2010) Characterization of apical and basal thiol-disulfide redox regulation in human colonic epithelial cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 299 (2), G523–530.
- (42) Lo, M., Wang, Y. Z., and Gout, P. W. (2008) The x(c)-cystine/glutamate antiporter: a potential target for therapy of cancer and other diseases. *J. Cell. Physiol.* 215 (3), 593–602.
- (43) Bassi, M. T., Gasol, E., Manzoni, M., Pineda, M., Riboni, M., Martin, R., Zorzano, A., Borsani, G., and Palacin, M. (2001) Identification and characterisation of human xCT that co-expresses, with 4F2 heavy chain, the amino acid transport activity system xc. *Pflugers Arch.* 442 (2), 286–296.
- (44) Kubatova, A., Murphy, T. C., Combs, C., and Picklo, M. J., Sr. (2006) Astrocytic biotransformation of trans-4-hydroxy-2-nonenal is dose-dependent. *Chem. Res. Toxicol.* 19 (6), 844–851.
- (45) Alnouti, Y., and Klaassen, C. D. (2008) Tissue distribution, ontogeny, and regulation of aldehyde dehydrogenase (Aldh) enzymes mRNA by prototypical microsomal enzyme inducers in mice. *Toxicol. Sci.* 101 (1), 51–64.
- (46) Hubatsch, I., Ridderstrom, M., and Mannervik, B. (1998) Human glutathione transferase A4–4: an alpha class enzyme with high catalytic efficiency in the conjugation of 4-hydroxynonenal and other genotoxic products of lipid peroxidation. *Biochem. J.* 330 (Pt 1), 175–179.
- (47) Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I., Yamamoto, M., and Nabeshima, Y. (1997) An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236 (2), 313–322.
- (48) Hu, R., Xu, C., Shen, G., Jain, M. R., Khor, T. O., Gopalkrishnan, A., Lin, W., Reddy, B., Chan, J. Y., and Kong, A. N. (2006) Gene expression profiles induced by cancer chemopreventive isothiocyanate sulforaphane in the liver of C57BL/6J mice and C57BL/6J/Nrf2 (–/–) mice. *Cancer Lett.* 243 (2), 170–192.
- (49) Wild, A. C., Moinova, H. R., and Mulcahy, R. T. (1999) Regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase subunit gene expression by the transcription factor Nrf2. *J. Biol. Chem.* 274 (47), 33627–33636.
- (50) Sasaki, H., Sato, H., Kuriyama-Matsumura, K., Sato, K., Maehara, K., Wang, H., Tamba, M., Itoh, K., Yamamoto, M., and Bannai, S. (2002) Electrophile response element-mediated induction of the cystine/glutamate exchange transporter gene expression. *J. Biol. Chem.* 277 (47), 44765–44771.
- (51) Hayes, J. D., and McMahon, M. (2009) NRF2 and KEAP1 mutations: permanent activation of an adaptive response in cancer. *Trends Biochem. Sci.* 34 (4), 176–188.
- (52) Zhang, Y., Sano, M., Shinmura, K., Tamaki, K., Katsumata, Y., Matsuhashi, T., Morizane, S., Ito, H., Hishiki, T., Endo, J., Zhou, H., Yuasa, S., Kaneda, R., Suematsu, M., and Fukuda, K. (2010) 4-hydroxy-2-nonenal protects against cardiac ischemia-reperfusion injury via the Nrf2-dependent pathway. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 49 (4), 576–586.

II. Est-il possible, de rétablir l'équilibre entre cellules saines et cellules prénéoplasiques au regard du HNE?

Article commenté (en préparation en 2013) :

[Nuclear factor erythroid 2-related factor-2 activity modulate the differential sensitivity of normal and preneoplastic colonocytes to 4-hydroxynonenal](#)

Sabine Dalleau, Maryse Baradat, Thierry Gautier, Nathalie Naud, Fabrice Pierre, Françoise Guéraud & Laurence Huc

Les résultats obtenus précédemment quant au différentiel de métabolisme entre les lignées saines et mutées pour Apc nous ont encouragés à nous intéresser à Nrf2. Celui-ci, considéré comme le gène maître de la réponse anti-oxydante dans la cellule, est un facteur de transcription capable d'induire la transcription de la totalité des gènes identifiés dans la détoxification du HNE : la GSTA4, le transporteur xCT, et les ALDHs. L'hypothèse était que Nrf2 pourrait être plus exprimé dans les cellules prénéoplasiques, comparativement aux cellules saines ; Nrf2 étant un candidat d'autant plus intéressant que de nombreuses études sur les souris KO Nrf2 font de cette protéine un oncogène favorisant la croissance tumorale en accordant aux cellules cancéreuses un avantage face au stress oxydant. Si cette hypothèse s'avérait exacte, l'éventualité d'un rééquilibrage entre les capacités de défense des cellules Apc Min/+ et Apc +/+ contre le HNE en utilisant des inducteurs naturels de Nrf2 devenait envisageable.

L'évaluation des niveaux d'expression et des niveaux protéiques de Nrf2 et de son inhibiteur Keap1 ont été réalisés par RT-qPCR et par *westerns in cell*. Des siRNAs dirigés contre Nrf2 dans les Apc Min/+, et des plasmides permettant la surexpression de Nrf2 dans les Apc +/+, corrélés par la suite à des marquages au DAPI des noyaux apoptotiques de ces cellules traitées au HNE ont permis d'établir l'importance de Nrf2 dans l'apoptose induite par le HNE. La cinétique d'activation de Nrf2 par le HNE, ainsi que sa modulation par des inducteurs de Nrf2 tels que le curcumin et le ptérostilbène, ont été évalué par immunofluorescence. L'effet de pré-traitements au curcumin et au ptérostilbène sur les niveaux d'expression et sur les niveaux protéiques des enzymes de détoxification a également

été observé. Enfin, l'impact de ces inducteurs sur les capacités de détoxication de la cellule a été directement évalué par la mesure des métabolites du HNE par HPLC et par la mesure des adduits HNE-histidine par dot blots. Ceci a été corrélé à une mesure des taux d'apoptose par marquage des noyaux au DAPI.

Le niveau protéique de Nrf2 s'est avéré plus élevé chez les Apc Min/+ que chez les Apc +/+ ; tandis que le niveau protéique de Keap1, l'inhibiteur de Nrf2, s'est avéré plus bas. La confirmation du rôle central de Nrf2 nous a été donnée par des expériences de knockdown de Nrf2 par siRNA Nrf2 chez les Apc Min/+, qui se sont traduites par une augmentation de la sensibilité des cellules au HNE, et par des expériences de surexpression plasmidiques de Nrf2 chez les Apc +/+, qui se sont traduites par une meilleure résistance des cellules à l'apoptose induite HNE. Cependant, nous avons également montré que si les niveaux d'expression géniques sont, à l'état basal, plus importants chez les cellules prénéoplasiques que chez les cellules saines, en réponse au HNE l'induction génique s'est révélée plus forte chez les cellules saines. Ainsi, un prétraitement des cellules prénéoplasiques et des cellules saines avec des inducteurs naturels de Nrf2 tels que le curcumin ou le ptérostilbène, a eu des conséquences intéressantes. D'une part les cellules saines ont rétabli un niveau de défense contre le HNE similaire à celui des cellules mutées _ avec une meilleure détoxication en termes de conjugués glutathion et de conjugués cystéine et une diminution des adduits HNE-histidine, associées à une induction plus importante de Nrf2, de l'hème oxygénase 1, de la GSTA4, des ALDH2 et 5A1, notamment, ce qui a été favorable à leur survie en réponse au HNE. D'autre part les cellules prénéoplasiques ont présenté un taux d'apoptose plus élevé en réponse au HNE. Le ptérostilbène quant à lui a eu la particularité d'induire l'expression de BCRP (Breast Cancer Resistance associated Protein) dans les Apc Min/+, un transporteur connu pour être responsable de l'efflux de nombreuses drogues, qui en conditions basales n'est pas exprimé dans cette lignée, et qui n'est pas induit dans les Apc Min/+ ni par le HNE ni par le curcumin.

Ces travaux ont permis de mettre en évidence une surexpression de Nrf2 dans des cellules prénéoplasiques, ce qui est une notion originale : la surexpression de Nrf2 ayant jusque-là été observée dans des cellules et des lignées cancéreuses. Ils ont également placé la détoxication du HNE comme un mécanisme amont, dont l'efficacité détermine la mort ou la survie de la cellule dans un environnement peroxydant.

Le curcumin et le ptérostilbène se sont révélés être des adjuvants efficaces dans la lutte des cellules coliques saines contre le HNE, avec le double avantage d'induire l'apoptose des cellules coliques mutées pour Apc. Ajouté au fait qu'un lien existe entre ptérostilbène et répression de l'expression de β -caténine, ce composé encore neuf dans les études de chimioprévention pourrait devenir un objet d'étude de choix dans les prochaines investigations sur les aspects curatifs et préventifs du cancer du côlon. Le curcumin en revanche a été beaucoup mieux étudié, mais jusqu'à présent les études restent à perspectives curatives, et non préventives. Enfin, à l'issue de ces travaux, plusieurs questions demeurent, dont deux primordiales : quel est le lien entre mutation Apc et surexpression de Nrf2 ? L'apoptose est-il le seul mode de mort cellulaire induit par le HNE ?

Resistance of preneoplastic colonic cells exposed to 4-hydroxynonenal to the detriment of normal cells: Nrf2 involvement in the promotion of colorectal cancer by meat?

Sabine Dalleau¹, Nadia M. Bastide^{1,3}, Nathalie Naud¹, Thierry Gauthier¹, Maryse Baradat¹, Cécile Héliès-Toussaint¹, Julia Keller¹, Gilles Nassy², Sylviane Taché¹, Fabrice H.F Pierre¹, Françoise Guéraud¹, Laurence Huc¹.

Authors' Affiliations:

INRA UMR1331; TOXALIM (Research Center in Food Toxicology); Université de Toulouse; ENVT; INP; UPS; TOXALIM; 180 chemin de Tournefeuille, F-31027 Toulouse, France

²IFIP-Institut du Porc, 149 rue de Bercy, 75595 Paris Cedex, France

³ Present address : INSERM UMR-S1018; Gustave Roussy; Université Paris-Sud; 114, rue Edouard Vaillant, F- 94805 Villejuif, France

Running Title: 4-hydroxynonenal, Nrf2 and the promotion of colon cancer by meat.

Keywords: 4-hydroxynonenal, apoptosis, Nrf2, colorectal cancer, meat, heme iron, lipoperoxidation, Adenomatous Polyposis Coli gene

Financial support: This research was supported by grants from the French National Research Agency (ANR-10-ALIA-014 SecuriViande), the Institut National du Cancer ITMO Cancer (Plan cancer 2009-2013)/INCa/INSERM for financial support for the "NeoMeaTox" project, and the Ligue Régionale contre le Cancer (Midi Pyrénées). The funders had no role in study design, data collection and analysis, the decision to publish, or preparation of the manuscript.

Correspondence: Dr Laurence HUC; INRA UMR1331, 180 chemin de Tournefeuille, F-31027
Toulouse, France; Laurence.Huc@toulouse.inra.fr; + 33 (0)5 82 06 63 20.

Conflict of interest: G. Nassy was paid by Institut Français du Porc (IFIP). The other authors
disclosed no potential conflicts of interest.

ABSTRACT

In the context of colorectal cancer (CRC) promotion by red meat, our works demonstrate the primordial role of the luminal 4-hydroxynonenal (HNE), generated from heme iron provided by the red meat diet. To depict the mechanisms involved in the relationship between heme iron, HNE and CRC, we focus on the antioxidant response of normal and preneoplastic epithelial colonocytes regarding to HNE.

Here, we demonstrated that HNE induced a higher apoptotic response in normal cells than in preneoplastic cells. We showed that preneoplastic cells exhibited higher activation of Nrf2 at basal level that efficiently protect them against HNE, with up-regulation of detoxifying enzymes. The genetic manipulation of Nrf2 (downregulation in preneoplastic cells and overexpression in normal cells) reversed the balance survival/cell death between both cell lines, showing that Nrf2 could be an interesting preventive target. Consequently, we used curcumin or pterostilbene as Nrf2 natural inducers in pretreatment, before HNE onset in both cell lines. These compounds improved the survival in normal cells, with an increase of Nrf2 activity and higher HNE detoxification enzyme expression. In contrast, they promoted cell death in preneoplastic cells. To validate this preventive strategy, we included curcumin directly in meat given 100 days in a rat model of colon carcinogenesis, and compare with an unmodified meat diet. We demonstrated that curcumin limited the number of preneoplastic lesions, with a decrease in lipid peroxidation byproducts in feces and an increase in the expression of Nrf2-target genes in the colon mucosa that would favor HNE and other byproducts detoxification.

Abbreviations

ACF: Aberrant Crypt Foci; AKR : aldo-keto reductase ; ALDH : aldehyde dehydrogenase ; Apc : adenomatous polyposis coli; ARE: antioxidant responsive element; CCM: curcumin; CRC: colorectal cancer; DHN-MA : mercapturic acid of dihydroxynonane; GSH : glutathione ;GST: glutathione-S-transferase; HNE : 4-Hydroxy-2(E)-nonenal ; HO-1 : heme oxygenase 1 ; Keap1 : Kelch-like ECH-associated protein 1 ; MDF : Mucin Depleted Foci; MDR : multidrug resistance protein ; NQO1 : NAD(P)H dehydrogenase (quinone1) ; Nrf2 : Nuclear factor erythroid-2 related factor-2; PS: pterostilbene; PUFA : polyunsaturated fatty acid ; Rlip76 : Ral binding protein 1 ; TBARS: Thiobarbituric acid reactive substances; TBP : TATA binding protein ; TRX1 : thioredoxine reductase 1 ; xCT : cystine/glutamate exchanger

Introduction

In Western countries, colorectal cancer (CRC) is the second most common cancer in women after breast cancer and the third most common in men after lung and prostate cancer (1). Only 10% of the cases of CRC are inherited, the 90% remaining cases are sporadic. According to epidemiological studies, diet would strongly influence CRC risk. The consumption of red meat appears to be a convincing risk for CRC by the World Cancer Research Fund that recommends limiting the intake (2). Our experimental works confirm this epidemiological link and demonstrate that red and processed meats promote colonic preneoplastic lesions (aberrant crypt foci ACF and mucin-depleted foci, MDF) in chemically induced rats (3, 4).

Three main hypotheses have been suggested to explain how red meat intake is linked to CRC risk. Among them, fat and proteins hypothesis, heterocyclic amines, polycyclic aromatic hydrocarbons and N-nitroso-compounds hypothesis, have been extensively discussed (5). A very recent publication of our team highlighted the role of heme iron in the promotion of colon cancer by red meat, independently of dietary heterocyclic amines and NOC (6). Heme iron contained in red meat can catalyze the oxidation of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) contained in food and generate

secondary lipid peroxidation products, such as 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) in the colon(7). HNE is considered as an important oxidative stress messenger and could be a major factor in cancer progression by modulating apoptosis balance (8, 9), particularly in the case of CRC (10). Its toxicity arises from its ability to form adducts with macromolecules such as proteins.

The development of CRC is a multistep process involving somatic mutations; among them, adenomatous polyposis coli gene (*Apc*) mutation is the earliest and the most frequent in sporadic CRC. This mutation transforms normal colonocytes into preneoplastic colonocytes. Literature provides data about cancer cells (at advanced stages) and HNE, but little is known about the susceptibility of normal colonic cells and preneoplastic cells to extracellular lipid peroxidation products. Our team has developed two immortalized epithelial colonic cell lines derived from C57BL/6J mice and Min mice: wild type cells with wild type *Apc* gene (normal cells), and *Apc*-mutated cells that have heterozygous *Apc* mutation (preneoplastic cells) (11). In previous studies, we demonstrated that HNE was more toxic for normal cells than for preneoplastic cells (7). The analysis of the metabolic profiles of HNE in both cell lines showed that preneoplastic cells rapidly transform HNE into thiol conjugated and oxidized metabolites that are less toxic compounds compared with normal cells (12).

Among HNE detoxification pathways, Nrf2 (Nuclear factor erythroid-2 related factor-2), a transcription factor member of Cap'n'Collar family, has a key role. Nrf2 acts by binding the antioxidant responsive element (ARE) present in the promoter region of numerous genes *via* its basic leucine zipper domain and enhances their expression (13). Numerous detoxifying and anti-oxidant protein are under the control of Nrf2 regulation: multidrug resistance, xenobiotic detoxification, and several phase 2 detoxifying and antioxidant enzymes, such as NAD(P)H quinone reductase 1 (*NQO1*), glutathione-s-transferase (*GST*), glutathione synthetase, heme oxygenase 1 (*HO-1*), cystine/glutamate exchange transporter (*xCT*), aldehyde dehydrogenases (*ALDHs*), or aldo-keto-reductases (*AKRs*)(14). We showed that all these enzymes were upregulated in preneoplastic cells (12).

At the basal stage, Nrf2 is sequestered in the cytosol by its inhibitor Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1). HNE can activate Nrf2 *via* its adduction on the cysteines of Keap1 that induces conformational modifications, the release of Nrf2 and its translocation to the nucleus (15, 16).

Interestingly, Nrf2 has been shown to be induced by a wide range of dietary natural compounds including sulforaphane, curcumin (17), or pterostilbene (18).

In the present study, we demonstrated that HNE induced a higher apoptotic response in normal cells than in preneoplastic cells. We showed that preneoplastic cells exhibited higher activation of Nrf2 at basal level that efficiently protect them against HNE, with high expressions of detoxifying enzymes. The genetic manipulation of Nrf2 (downregulation in preneoplastic cells and overexpression in normal cells) reversed the balance survival/cell death between both cell lines, showing that Nrf2 could be an interesting preventive target. Consequently, we used curcumin or pterostilbene as Nrf2 natural inducers in pretreatment, before HNE onset in both cell lines. These compounds improved the survival in normal cells, with an increase of Nrf2 activity and higher HNE detoxification enzyme expression. In contrast, they promoted cell death in preneoplastic cells. To validate this preventive strategy, we included curcumin directly in meat given 100 days in a rat model of colon carcinogenesis, and compare with an unmodified meat diet. We demonstrated that curcumin limited the number of preneoplastic lesions, with a decrease in lipid peroxidation byproducts in feces and an increase in the expression of Nrf2-target genes in the colon mucosa that would favor HNE and other byproducts detoxification.

Materials & Methods:

Chemicals and antibodies

See supplemental data.

Cell culture

Wild type and *Apc*-mutated colon epithelial cells were established as described previously (6, 11). Cells were seeded at a permissive temperature of 33 °C in 75cm² culture plates with 12ml Dulbecco's modified essential medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf sera, 1% penicillin/streptomycin, 4mM glutamine, 10 ng/mL EGF and 10 U/mL interferon γ . At sub-confluence, 24 h after seeding, cells were placed for a 24h period at non-permissive temperature of 37

°C, in medium without EGF and interferon γ . Cells were treated with HNE in medium without serum and antibiotics.

Western in cell

After treatment, cells seeded into 96-well plates were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 20 min at 4°C and washed three times with PBS. Cells were permeabilized, blocked with MAXblock Blocking medium. Rabbit polyclonal anti Nrf2 and mouse anti- β -actin antibodies were incubated overnight. Secondary detection was carried out using an anti-rabbit infrared fluorescent dye-conjugated antibody (emission fluorescence: 770 nm, 1:2000 dilution). β -actin and Nrf2 stained contents were simultaneously quantified using an Odyssey Infrared Imaging Scanner (Li-Cor ScienceTec, Les Ulis, France) in the 700 nm and the 800 nm channels, respectively. Relative fluorescence Nrf2 staining is rationed with β -actin staining. The experiments were performed in duplicate at least 3 times independently.

Immunofluorescence and confocal imaging

See supplemental data.

Apoptosis detection: nuclei fragmentation, Annexin V and propidium iodide and caspase staining

After treatment, adherent and floating cells were washed fixed in 4% paraformaldehyde and directly mounted with Prolong Gold with DAPI. Analysis was performed with a fluorescent microscope (Zeiss Axioplan). Nuclear chromatin staining by DAPI allows the quantification of fragmented and condensed nuclei, as apoptotic nuclei. Apoptotic and alive nuclei were counted (minimum 3 independent experiments) and expressed as percentage of total population (n>400 nuclei).

Annexin V/PI were detected by flow cytometry using the AlexaFluor 488 Annexin V/Dead Cell Apoptosis assay (Molecular Probes, Madison, WI, USA).

Effector caspase activity was detected with CellEventTM Caspase-3/7 Green Detection Reagent (Molecular Probes, Madison, WI, USA) using confocal laser-scanning microscope (TCS SP8 DMI 6000, Leica) equipped with a 20x objective. The images were analyzed using ImageJ software.

siRNA and plasmid transfection

SiRNA and DharmaFECT3 were provided by Thermo Scientific Dharmacon (Courtaboeuf, France). At 37°C, medium was replaced by OptiMEM and cells transfected overnight with 100pmole Nrf2-specific siRNA (ON-TARGET plus SMART pool, mix of 4 siRNA), 100pmole lamin-specific siRNA (siGLO LaminaA/C control siRNA) to control the transfection rate, or 100pmole negative control siRNA (ON-TARGET plus siRNA Smart pool Non targeting control pool) using the DharmaFECT3 transfection reagent according to the manufacturer's instructions. The rate of transfection was more than 75% in each cell type after 18h of transfection. Then, after 72h (maximum of Nrf2 protein extinction), cells were exposed during 8h to HNE 40µM and apoptosis was quantified.

Plasmids were supplied by Biovalley (Marne-La-Vallée, France). At 37°C, medium was replaced by OptiMEM and cells transfected overnight with 10µg of the plasmids Nrf2 and DsRed and xTremGENE 9 DNA reagent (Roche, Meylan, France). After 48h (maximum of Nrf2 protein expression), cells were treated with 40µM HNE for 8h and apoptosis was quantified by DAPI staining.

HPLC analysis—determination of HNE metabolism

HPLC analyses were carried out as previously described (12).

Cystine uptake assay:

L-[¹⁴C]-Cystine uptake was measured according to Giraudi *et al* with some modifications(19). Normal and preneoplastic cells were treated with 4-HNE (20µM) for 6 hours in a serum free medium. Quisqualic acid (150µM) or an excess of glutamate (2.5 mM) were added during the incubation of the radioactivity when indicated.

The cells were rinsed three times with warmed uptake buffer (140 mM NaCl, 25 mM HEPES, 5.4 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 0.8 mM MgSO₄, 5 mM glucose (pH = 7.5). Cystine uptake was started by incubating the cells in uptake buffer containing 0.1µCi L-[¹⁴C]-Cystine at room temperature for 10 min. The uptake was terminated by rapidly rinsing the cells three times with ice-cold unlabelled uptake buffer. The cells were lysed by adding a 0.1N NaOH solution. An aliquot was taken for protein

determination, and another aliquot was mixed with scintillation cocktail (UltimaGold, Perking Elmer, France) and the radioactivity was determined using a scintillation counter (Hewlett Packard, USA). The results were expressed in nmol cystine/ mg protein.

GSH/GSSG assay

The GSH/GSSG ratio was evaluated with the GSH/GSSG-™ Assay (Promega, Charbonnières, France) based in a luminescence detection of the GSH-dependent conversion of a GSH probe, Luciferin-NT, to luciferin by a glutathione S-transferase enzyme coupled to a firefly luciferase reaction. Normal and preneoplastic cells were seeded into a 96-well plate. After treatment, total glutathione and oxidized glutathione were measured according to the instruction of the manufacturer. Results are expressed as the ratio of GSH/GSSG. Three independent experiments were achieved.

Dot Bot

HNE-histidine adducts in proteins were measured in total cell lysates as previously described (20). We thank DR G. Waeg and Dr N. Zarkovic for the generous gift of the anti-HNE-His antibody.

Nuclear fractionation and Western blot

After treatments, nuclear fractions were purified with Nuclear extract kit from Active Motif (Rixensart, Belgium) according to the protocol of the manufacturer. Western blot were performed after SDS-PAGE (gel 4-12%, Biorad) and blotting (nitrocellulose membrane 0.4µm), with monoclonal rabbit Nrf2 antibody.

Carcinogenesis study (100 day-long): Animals and design.

Animal care was in accordance with the guidelines of the European Council on animals used in experimental studies.

Twenty male Fisher 344 rats from Charles River (St Germain l'Arbresle, France) were housed single in stainless steel, wire-bottomed cages. After acclimatization each rat received a single i.p. injection of azoxymethane (20 mg/kg i.p.; Sigma Chemical) in NaCl (9 g/L). Seven days later, they were randomly

allocated to two groups (ten rats per group) and fed the experimental diets described below. Body weights were monitored every week for four weeks, then every two week. Food and water intakes were measured at days 20 and 80. Feces were collected between days 18, 21, 80 and 91 and frozen at -20°C . Between days 74 and 76 each rat was put in a metabolic cage and urine was collected and frozen at -20°C .

Animal care was in accordance with the guidelines of the European Council on animals used in experimental studies.

Rats were killed by CO_2 asphyxiation in a random order at day 96 to 98. Colons were removed and fixed in 10% buffered formalin (Sigma Chemical) between two sheets of filter paper with a blinding code. ACF and MDF were scored. Fecal water samples (preparation described below) were analyzed for heme, TBARS, cytotoxicity and ATNC. Urine samples were analyzed for DHN-MA.

Diet

Pork meat was cured by Fleury Michon (Pouzauges-France). The model of processed meat was DCNO (pork meat from a Dark muscle, cured with sodium Nitrite, Cooked and Oxidized), made from *Musculus vastus intermedius*. Curcumin (0.023%) was added to DCNO during the curing process.

Processed meats (moist piece) were divided in 30 g portions that were given to rats at 5:00 p.m.. A low-calcium powdered diet was given in a separated feeder, 7.6 g/d/rat, so that each rat would eat roughly half meat / half powder (dry matter). More precision on processed meats and low calcium diet were in Supplemental data.

Fecal and urinary measures

See supplemental data.

ACF (Aberrant Crypt Foci) and MDF (Mucin Depleted Foci) assays

Colons were fixed in 10% buffered formalin (Sigma Chemical) between two sheets of filter paper with a blinding code and ACF and crypts per ACF scored by Bird's procedure (21). Colons were then stained with the high-iron diamine alcian blue procedure, MDF and crypts per MDF were counted

under a microscope at x40 magnification, by a single observer blinded for the origin of the colon: MDF with more than two crypts per focus without mucin or with very little apparent mucin were counted (22)

Statistical analyses

Results were analyzed using GraphPad Prism software for Windows, and all data are reported as mean \pm SD. Values were considered firstly using one-way ANOVA. If a significant difference was found between all groups ($P < 0.05$), comparison of each experimental group with the control group was made using Dunnett's test. Secondly, the effect of the mutation effect at each condition was analyzed with the comparison between normal and preneoplastic cell lines using the Student's t-test.

RESULTS

Preneoplastic cells are more resistant to HNE-induced apoptosis than normal cells

The epithelial colon cell lines represented the phenotypes normal and preneoplastic (exhibiting *Apc* mutated gene). When both cell lines were exposed to HNE, a higher increase of fragmented and condensed nuclei was observed after 18h-treatment (HNE 40 and 100 μ M) in normal cells compared with preneoplastic cells (**Fig 1A**). The differential of cell death induction was confirmed by measuring the exposure of phosphatidylserine and the permeabilization of plasma membrane, by flow cytometry with AnnexinV and propidium iodide staining, after 6h of HNE treatment (**Fig 1B**). Finally, time lapse experiments with a fluorescent effective caspases substrate revealed a higher rate of caspase activation in normal cells exposed to 40 μ M HNE than in preneoplastic cells (**Fig 1C**). Then, based on several markers (DNA fragmentation, Annexin V, membrane permeabilization and caspases), HNE triggered cell death by apoptosis in a prominent way in normal cells, while the preneoplastic cells were more resistant.

Preneoplastic cells exhibit a higher level of Nrf2 protein, mainly localized in the nuclei

In order to understand the differential of apoptosis induction in normal and preneoplastic cells, and taking into account our previous studies dealing with HNE detoxification processes (12), we were interested in the transcription factor Nrf2, described to regulate the expression of HNE metabolizing enzymes. The immunolocalization of Nrf2 in the normal cells showed a mainly cytosolic localization under basal conditions (**Fig 2A**). In contrast, in preneoplastic cells, Nrf2 was mainly localized in the nuclei, as emphasized by the pictures and the intensity profiles (**Fig 2B**). The global quantification of Nrf2 protein in both cell lines by western in cell demonstrated that Nrf2 was twice more expressed in preneoplastic cells (**Fig 2C**). Then, we showed that preneoplastic cells have more active Nrf2 protein than normal cells.

In normal cells, HNE activates Nrf2 and induces the expression of some HNE-detoxification related enzymes

Since HNE was more toxic in normal cells than in preneoplastic cells, and because Nrf2 is involved in HNE detoxification (23), we would like to assess if HNE was able to activate Nrf2 in normal cells. To do so, Nrf2 protein translocation into the nucleus was followed by immunofluorescence and confocal analyses (**Fig 3A, B** and **Fig S1a, d** for normal cells; **Fig S1b, c,d** for preneoplastic cells) and western blots in nuclear fractions. In normal cells, Nrf2 was strongly translocated into the nuclei after 1h of treatment with HNE, and maintain such localization after 2h (**Fig 3A and B**) and 3h (**Fig S1a**). However, after 2h Nrf2 was also accumulated in the cytosol. After 4h, Nrf2 was still in the nuclei but cellular damage occurred (**Fig S1a**). The localization of Nrf2 in the nuclei was also supported by western blots in nuclear fractions (**Fig 3C**). Finally, western blot analysis showed that total Nrf2 was accumulated in the normal cells when treated with, reaching a maximum at 2h (**Fig 3D**). In preneoplastic cells, a slight induction of total Nrf2 was observed only after 3h (**Fig 3D**). However the level of Nrf2 expression was always higher preneoplastic cells when compared to normal cells. More precisely, in preneoplastic cells, Nrf2 remained localized in the nuclei after HNE exposure (**Fig S1 b, c,d**). When we examined the expression of key enzymes, regulated by Nrf2 and involved in HNE detoxification, we showed that xCT, ALDH3A1 and GSTA4 were significantly higher in normal cells

than in preneoplastic cells after 6h of HNE exposure (**Fig3E**), suggesting a higher ability of induction in normal cells than in preneoplastic cells.

Preneoplastic cells can maintain their GSH/GSSH ratio and activate cysteine uptake upon HNE exposure.

Our previous works demonstrated that preneoplastic cells expressed more HNE detoxification related enzymes than normal cells, like GSTA4 and the cysteine/glutamate exchanger xCT (32 times and 6 times more respectively). This suggested that the pathway of synthesis and conjugation of GSH was a prominent difference between both cell lines. Consequently, we measured the ratio of reduced/oxidized GSH after HNE treatment in both cell lines to check this hypothesis. At the basal level (**Fig 4A**), normal cells exhibited a significantly higher ratio of GSH/GSSG than preneoplastic cells.

However, the treatment with HNE (40 μ M, 6h) induced a drop of this ratio, significant only in normal cells (**Fig 4A**). Compared to buthionine sulfoximine, HNE did not trigger a strong depletion of GSH, underlying the involvement of other processes independent of GSH, like ALDH (12). At the same time, cystine can also be converted into cysteine to be extruded and trap HNE directly in the extracellular medium. Moreover, the exchanger xCT, that catalyzed the entry of cystine to an efflux of glutamate, was described to be upregulated in preneoplastic cells. Then, we measured the cystine uptake with radiolabelled cystine. When we compared basal cystine influx in normal and preneoplastic cells, we showed that preneoplastic cells had a higher rate than normal cells. The inhibition of this influx by quisqualic acid and an excess of glutamate supported the involvement of the transporter xCT (**Fig S2**). When the cells were treated with different concentrations of HNE (20-40 μ M) for 6h, we observed an important increase in cystine influx in both cell lines, with a higher extend in preneoplastic cells. At 100 μ M HNE, the uptake of cystine dropped in normal cells, while it was maintained at a maximal rate in preneoplastic cells. However, in **Fig 3E**, we observed a strong induction of xCT after 6h of HNE 40 μ M, suggesting that the normal cells activated their defense, but the physiological response took longer to occur and to limit HNE deleterious effects. Then, cystine influx appeared as central for epithelial cells to tackle with HNE reactivity.

Nrf2 is a main regulator of apoptosis/resistance balance of normal and preneoplastic cells regarding HNE

As the detoxification enzymes and Nrf2 were more active in preneoplastic cells than in normal cells, we challenged the expression of Nrf2 in both cell lines. Firstly, we downregulated Nrf2 in preneoplastic cells, using SiRNA. This downregulation diminished the level of Nrf2 in the nuclei, under basal conditions and after 2h of exposure to HNE (**Fig 5A**). It also inhibited the induction of GSTA4 by HNE, without affecting the basal level. Then, in SiNrf2 transfected cells treated with HNE, we observed an increase of apoptosis induction (**Fig 5B**). Secondly, we overexpressed Nrf2 in normal cells, with a 4-fold efficacy (**Fig 5C**). After treatment with HNE, apoptosis was decreased by half in those Nrf2-overexpressing cells (**Fig 5D**). In conclusion, the level of Nrf2 expression in both cell lines controlled their sensitivity or resistance to HNE.

The pharmacological targeting of Nrf2 with natural inducers improves the defense and the resistance of normal cells.

The genetic modifications of Nrf2 expression levels as well as the strong inducibility of Nrf2 response in normal cells suggested us to assess preventive strategies by targeting Nrf2 in normal cells. To do so, we used two compounds described to activate Nrf2: curcumin (CCM)(17) and pterostilbene (PS)(18) . We pre-treated normal and preneoplastic cells with CCM or PS (10 μ M) overnight and then, treated them with HNE. In **Fig 6A**, we controlled the effect of CCM on Nrf2 nuclear translocation by immunofluorescence. The data obtained with PS were presented in **Fig S3b**. Nrf2 was more expressed after CCM pre-treatment, both within the nuclei and in the perinuclear area in normal cells. After exposure to HNE (30 min and 1h), the same pattern was observed (**Fig S3a**). The pre-treatment with PS led to the same localization of Nrf2 into the nuclei and perinuclear areas (**Fig S3b**).

This increase in Nrf2 levels had consequences on the expression of HNE-detoxification enzymes (**Fig 6B**). The pre-treatment of normal cells with CCM increased the early expressions of ALDH5A1,

ALDH2, xCT, GSTA4 and Akr1b10 after 30 min of HNE. Some genes were induced later, after 3h of treatment, like GSTA4 and GCLM. Beyond the late induced genes, we noted HO1 and MDR1a. The pretreatment with PS activated the same genes, at different ranges. TRX, GCLC, RLIP76 and AOR were not affected by the pretreatments (**Fig S3d**).

We performed Western In Cell analysis to quantify the protein induction of Nrf2, ALDH2, MDR1a, GSTA4 and xCT by CCM or PS, with or without HNE (**Fig 6C**). CCM and PS increased the expression of Nrf2, ALDH2, MDR1a and GSTA4 without HNE. The exposure to HNE induced the expression of Nrf2 and ALDH2 in CCM or PS pre-treated cells. Concerning xCT protein, only PS had a slight inducing effect on its basal level, whereas the exposure to HNE tended to inhibit its expression.

Since CCM and PS activated Nrf2 and the expression of HNE detoxification enzymes, we characterized the conjugated metabolites of HNE after a pretreatment with CCM (**Fig 6D**) or PS (**Fig S3d**), by radio-HPLC. CCM increased the formation of HNE-cysteine, whereas PS favored the generation of GSH conjugates (**Fig S3d**). When we measured cystine uptake in the same conditions, we could not see any effect of CCM or PS in normal and preneoplastic cells (**Fig S3d**). However, the better detoxification of HNE in normal cells was confirmed by measuring HNE-histidine adducts by dot plots (**Fig 6E**). CCM decreased by two thirds the amount of HNE-protein adducts after 6 h of HNE exposure, while PS induced a one third decrease under the same conditions. These compounds had no significant effect on HNE-protein adducts in preneoplastic cells (**Fig S3d**).

Then, CCM and PS effects were assessed on apoptosis induction by HNE. In normal cells, CCM and PS prevented the induction of apoptosis by 40 μ M HNE (**Fig 6F**). In contrast, at the same concentrations (10 μ M), CCM and PS alone promoted apoptosis in preneoplastic cells but not in normal cells. HNE treatment amplified this effect in the case of PS. Consequently, we demonstrated a double effect of these Nrf2-targeting compounds, with an improvement of detoxification and survival in normal cells and a negative effect in preneoplastic cells.

Some complementary results could explain the deleterious effects of CCM or PS in preneoplastic cells. CCM and PS did not increase Nrf2 activity (**Fig S3 a, b**) and they did not induce the expression

of detoxification enzymes (**Fig S3d**), except for AOR early activated by CCM. At the protein levels, PS mediated Nrf2 expression after 6h of HNE. GSTA4 was modulated by both compounds after 6h of HNE. In terms of HNE conjugates, HNE-histidine adducts and cystine influx, CCM and PS had no significant effect. Then, in preneoplastic cells, the pro-apoptotic effects of CCM and PS appeared to be independent from Nrf2 activity.

To go further into the specificity of CCM and PS as protectors for normal cells regarding to HNE, we assessed the downregulation of Nrf2 in normal cells (see **Fig 5A**), pre-treated or not with CCM or PS. GSTA4 expression was repressed by SiNrf2, including in presence of CCM or PS (data not shown, ANOVA $p < 0.0001$). When we quantified apoptosis in normal cells, we showed that SiNrf2 prevented the protective effects of CCM or PS on HNE-induced apoptosis (**Fig 6G**). In contrast, in preneoplastic cells transfected with SiNrf2, we noticed a higher induction of apoptosis by CCM or PS, independently of HNE. Then, the absence of Nrf2 sensitized preneoplastic cells to CCM or PS (**Fig 6H**). In total, these data supported the specificity of CCM and PS to target Nrf2 in normal cells, whereas, in preneoplastic cells, CCM and PS were pro-apoptotic according to a Nrf2-independent pathway.

***In vivo* validation of Nrf2- targeted preventive strategy with real meat, supplemented or not with CCM**

Our previous studies demonstrated the importance of lipid peroxidation in the promotion of carcinogenesis by meat (6, 24). More precisely, heme contained in meat catalyzed the formation of secondary product of lipid peroxidation like HNE in colon lumen. Then, we wanted to assess whether the meat diet enriched with CCM could protect the colonic mucosa and prevent preneoplasia occurrence.

To do so, rats were chemically initiated for CRC with azoxymethane. One group was fed for 96 days with a model of cured meat that was previously described to promote CRC, called DCNO (for pork meat from a Dark muscle, cured with sodium Nitrite, Cooked and Oxidized)(3). Another group was fed for 96 days with DCNO in which was added CCM.

A DCNO-based diet increases the number of MDF and ACF in the colon of azoxymethane initiated rats, in comparison with a no-meat control diet (3, 25). Curcumin decreased significantly the number of MDF per colon in comparison with DCNO diet (**Table 1A**). Neither the number of ACF was different between groups, nor ACF multiplicity.

We have followed the fecal and urinary biomarkers (**Table 1B**). Curcumin reduced luminal TBARS concentration (representing a global state of lipid peroxidation), but not urinary DHN-MA, a marker of exogenous and endogenous peroxidation related to HNE. Curcumin did not decrease heme concentration in feces, indicating that the limitation of heme-induced peroxidation was not due to the binding of iron and thus the reduction of catalytic properties of heme.

Finally, we analyzed the expression of detoxification enzymes in mucosa. After 96 days of feeding, the curcumin-supplemented diet increased significantly the expression of Akr1b7 and Akr1b8 in the colonic mucosa of rats (**Table 1C**). The relative mRNA levels of Akr1b7 and Akr1b8 were respectively 2.3 and 2 times higher in the mucosa of rats submitted to a curcumin-supplemented DCNO diet compared with DCNO. HO1 expression was also induced by the DCNO-CCM diet. The expression of ALDH2, GSTA4 and Akr1b10 were not affected by CCM, whereas GCLM was decreased.

Then, *in vivo*, the prevention of preneoplastic lesions and the protection of colon mucosa mainly involved Akr enzymes, which were described to reduce HNE and limit its reactivity. This appeared as a double action of curcumin added to the meat, in which CCM limited in part the luminal lipid peroxidation and improved the anti-oxidant defense of the mucosa regarding the remaining lipid peroxidation byproducts.

DISCUSSION

Our previous studies *in vivo* demonstrated the role of lipid peroxidation in the promotion of CRC by red meat consumption and heme iron containing diet. In order to identify the molecular mechanisms involved in such an effect, we carried out *in vitro* experiments using non-cancerous colonic epithelial cell lines, corresponding to the first stage of CRC progression (normal/preneoplastic stages), including

the mutation on *Apc* gene. When normal and preneoplastic cells were exposed to HNE, a secondary product of lipid peroxidation, we observed a differential of sensitivity regarding to HNE toxicity, in favor of the survival of preneoplastic cells(7). The works of Baradat *et al* dealing with the metabolism of HNE clearly showed a difference of HNE detoxification, with a better elimination of HNE by preneoplastic cells(12). The aims of the present study were 1) to characterize the mechanisms of cell death in normal cells, 2) to identify the actors involved in the resistance of preneoplastic cells, 3) to modulate the balance cell death/ survival to promote normal cell survival 4) to validate *in vivo* the preventive strategy based on the modulation of the balance cell death/survival.

Here, we clearly demonstrated that normal cells underwent apoptosis when exposed to HNE, characterized by phosphatidyl serine exposure, plasma membrane permeabilization, caspase activation and DNA fragmentation.

Since preneoplastic cells exhibited a better HNE detoxification than normal cells, associated with a higher detoxification enzymes expression(12), we particularly focused on Nrf2, that was described to regulate these enzymes and to be activated by HNE (15, 16). Then, using different techniques, we demonstrated that preneoplastic cells had higher levels of Nrf2 protein that was mainly located in the nuclei at basal state. Then, the mutation of *Apc* gene would affect the stabilization of Nrf2 protein. The relationships between *Apc* mutation and Nrf2 up-regulation are under investigation. If the effects of mutations on proto-oncogenes and suppressors of tumor on Nrf2 activation were previously described (26), it is the first time that Nrf2 activation has be related to *Apc* mutation.

As it was previously shown, HNE triggered the activation of Nrf2, with its translocation to the nuclei in normal cells, after 30 min of treatment and a maximum after 2h. In contrast, Nrf2 was barely activated in preneoplastic cells, with a small increase of total protein at 3h (Fig 3C and D). We hypothesized that the level of activation of Nrf2 in preneoplastic cells was already high, that is why those cells could not further activate Nrf2. Moreover, they have basically more detoxification enzymes to directly tackle with HNE, which is very reactive. In a previous study, we showed that free HNE amount felt to zero after 30 min only in preneoplastic cells, revealing the very efficient detoxification process(12). In normal cells, the activation of Nrf2 by HNE was higher than in preneoplastic cells, associated with the

induction of xCT, ALDH3A1 and GSTA4 after 6h. However, such an induction should occur too late to limit the deleterious effects of HNE. After 6h of treatment, we also evidenced that cystine influx, necessary for GSH synthesis and subsequent cysteine efflux, dropped in normal cells, whereas it was stable and still efficient in preneoplastic cells, even at 100 μ M. The use of inhibitors (quisqualic acid and an excess of glutamate) prompted us to think that the cystine influx reflected xCT activity. This is in accordance with our previous results showing the great differential of xCT basal expression and the higher basal cystine influx in preneoplastic cells rather than in normal cells (Fig 4)(12). The prominent activity and key regulation of xCT could explain why the GSH/GSSG ratio was well maintained in preneoplastic cells, compared with normal in which this ratio slightly decreased.

HNE detoxification involved several pathways but they appeared to be regulated by a central actor: Nrf2. In order to identify new preventive strategies, we first wanted to assess if the modulation of Nrf2 activity had an impact on the differential of apoptosis between normal and preneoplastic cells regarding HNE. Indeed, we showed that the downregulation of Nrf2 in preneoplastic cells led them to be more sensitive to HNE, while the overexpression of Nrf2 in normal cells was protective. In total, we identified Nrf2 activity as key factor in the regulation of the balance survival/ apoptosis in preneoplastic and normal cells.

In contrast to preneoplastic cells whose Nrf2 pathway appeared to be basically overactivated and barely inducible, the antioxidant defense of normal cells can be inducible. Then by using natural Nrf2 inducers, we hypothesized that we could boost normal cells and make them more efficient in metabolizing HNE. We have chosen CCM and PS, whose efficacy was demonstrated *in vivo* and whose applicability regarding diet and CRC prevention was relevant (17, 18). *In vitro*, CCM and PS strongly activated Nrf2 in normal cells (in comparison with preneoplastic in which Nrf2 was not induced). This was associated with the increase of HO1 expression, a canonical Nrf2 target gene. Concerning HNE detoxification enzymes, different pathways were stimulated: xCT, GCLM and GSTA4, relative to GSH synthesis and conjugation and cysteine efflux; ALDH (5A1, 2) and Akr1b10 that respectively oxidize and reduced the aldehyde function of HNE and MDR1A for metabolites and conjugates efflux. Interestingly, CCM and PS increased the generation of HNE-cysteine and HNE-

GSH conjugates respectively and this neutralization of HNE was associated with the limitation of the formation of HNE-histidine adducts. However, these processes were not associated with an increase in cystine influx. Finally, apoptosis induction in normal cells by HNE was drastically decreased by the pretreatment with CCM or PS. CCM and PS should have off target effects, by stimulating other pathways like PXR(27), AhR(28) or PPAR(29). We checked the expression of some nuclear transporters as well as their relative target genes but we were not able to see any modulation (data not shown). However, to establish the specificity of CCM and PS on Nrf2 activity, we carried out experiments in which Nrf2 was downregulated prior to CCM or PS pretreatments (Fig 6H). Then, in normal cells, the low Nrf2 content did not allow the protection against apoptosis by CCM or PS. In conclusion, Nrf2 was a pertinent target of CCM or PS to promote HNE detoxification and apoptosis resistance in normal cells.

Concerning preneoplastic cells, at the same concentrations, CCM and PS were toxic by themselves. When HNE was added, we demonstrated an increase in apoptosis induction. Some previous works already described the pro-apoptotic effects of these compounds on colorectal cancer cells, notably by acting on the translational machinery (30). Here it was the first time that it was showed in preneoplastic cells. Moreover, when we examined the expression of detoxification enzymes, they were not induced by CCM and PS and the conjugated HNE metabolites stayed unchanged. Consequently, the rate of HNE-histidine adducts was not affected. Then, preneoplastic cells did not appear to be sensitive to the Nrf2-targeted pretreatment, but they were quite sensitive to the toxicity of CCM and PS. Nrf2, at the end, should not have a role at all in this process. Indeed, the downregulation of Nrf2 in preneoplastic cells made them highly sensitive to CCM and PS pretreatment, as the activity of Nrf2 in preneoplastic cells was a factor of chemoresistance, as already described in high graded tumoral cells (13). After that, HNE did not even potentialize apoptosis. Taken together, we demonstrated that CCM and PS were effective to trigger apoptosis of preneoplastic cells and that the downregulation of Nrf2 could amplify such phenomenon.

These *in vitro* studies are of interest in terms of applicability since these antioxidants could have a dual effect, by stimulating normal cells and weakening preneoplastic cells. These conclusions prompted us

to assess the efficacy of Nrf2-target inducers in an *in vivo* context in which chemically-induced rats were fed with real meat, supplemented or not with curcumin. Indeed, no serious adverse events (SAE) were attributable to curcumin even in a clinical study with a high intake of curcumin. Furthermore, acceptability of curcumin by patients or consumers is high (31). And, in terms of applicability and adding in meat or processed meat, the cost of curcumin is largely in favor of its choice, in comparison with pterostilbene. After about 100 days of feeding, there were less preneoplastic lesions in the colon of rats fed with meat diet enriched with CCM. Impact of colon carcinogenesis was evidenced on a surrogate endpoint biomarker, mucin depleted foci. MDF, formed by dysplastic crypts devoid of mucin, have been identified in the colon of humans at high risk for colon cancer (32). Like tumors, MDF harbor mutations in genes affecting colon carcinogenesis (*Apc* and *K-ras*) and show Wnt signaling activation (33), a dramatic reduction of MUC2 expression (34), and a strong activation of the inflammatory process (35), all features suggesting that MDF are precancerous. Rodents studies suggest that MDF are better predictors of colorectal cancer than ACF are, this is why we focused on MDF data (36). The fecal biomarkers analyses showed that CCM did not modulate heme iron content, but decreased in part luminal lipid peroxidation. This could be due to the antioxidant activity of curcuma, which could be attributed to the phenolic and methoxy groups in conjunction with the 1,3-diketone-conjugated diene system, for scavenging of the oxygen radicals. Curcumin can thus scavenge oxygen radicals, preventing the damage towards macromolecules and peroxidation of fatty acids(37). Moreover, the lower preneoplastic incidence of the diet meat and CCM was associated with an increase of the expression of HNE detoxification enzymes, like Akr1b7 and 1b8 that could explain that DHN-MA, which is a lipid oxidation biomarker but also a reduced metabolite of HNE, was not diminished by the antioxidant effect of curcumin. The expression of HO1, as Nrf2 canonical target gene, was up-regulated by meat diet and this induction was amplified by curcumin. In contrast to *in vitro* studies, Akr appeared to have a more prominent role in detoxification *in vivo*. Activation of Akr1b7 gene expression in the mouse colon decreases the intestinal accumulation of malondialdehyde (38), and cells over-expressing AKR7A5 resist to 4-hydroxynonenal toxicity (39).Based on the literature, we think that Akr enzymes represented a long-term detoxification system, whereas GSH and cysteine pathways or ALDH dependent- oxidation were more mobilized for acute lipid peroxidation

assault. The expression of GSTA4 strongly low in the colon of meat-fed rats and CCM had no effect. In conclusion, the supplementation of the meat diet by curcumin enabled the decrease of preneoplastic incidence, associated with the activation of Nrf2 pathway and the induction of HNE detoxification enzymes like Akr1b7 and 1b8.

In conclusion, our study went from the molecular mechanisms of HNE detoxification, the regulation of the balance apoptosis/survival in normal and preneoplastic cells, to the proposition of Nrf2-targeted chemopreventive strategy that was efficient *in vivo*. Curcumin exhibits beneficial effect according to the phenotype of the colonocytes, with the protection of normal cells and the apoptosis of preneoplastic cells. This win- win outcome opens new perspectives of the limitations of the deleterious effect of meat consumption on CRC promotion by supplementation of diet with curcumin. It could limit the deleterious effects of lipid peroxidation secondary products, like HNE, that are neoformed in the lumen because of heme iron provided by meat.

Legends of figures

Figure 1: HNE triggers more apoptosis in normal cells than in preneoplastic cells.

Normal and preneoplastic cells were exposed to HNE 40 μ M (**A, B, C**) and 100 μ M (**A**). Apoptosis was quantified according three endpoints. (**A**) Nuclei fragmentation and condensation analyses were performed after 18h of treatment. Nuclei were stained with Hoechst 33342 and apoptotic nuclei were counted using inversed fluorescence microscope. (**B**) Exposure of phosphatidylserine and membrane permeabilization were detected by flow cytometry after 6h of treatment. Dot plots are represented of 3 independent experiments. (**C**) Caspase activation was followed by time lapse microscopy for 12h, simultaneously in untreated, treated normal and preneoplastic cells, by using Cell Event green, a fluorescent substrate of effective caspases. After image analyses, caspase positive cells were represented after 6h of treatment. Significant differences: **: $p < 0.01$, and ***: $p < 0.001$, treated *vs* control. ####: $p < 0.001$ normal treated cells *vs* preneoplastic treated cells. Value are means \pm SD, n=3.

Figure 2: Nrf2 is more accumulated in preneoplastic cells.

Nrf2 protein was localized in normal (A) and preneoplastic (B) cells under basal conditions. DAPI was used to stain nuclei. Images were acquired by confocal imaging according to a stacking mode. The pictures presented NRF2 (red) in the same confocal plan than nuclei (blue). Magnification scale bars were showed in the merge picture. Fluorescence intensity profiles were performed according to a line drawn in the blue and the red channels (but represented in white on the small blue channel image). The projection of DAPI staining (nuclei) on the intensity graph of NRF2 staining allowed the visualization of the nuclei to discriminate nuclear and cytosolic NRF2. (C) Total Nrf2 protein levels were quantified by western in cell (see material and methods), relative to the level of the housekeeping protein β -actin.

Figure 3: NRF2 is strongly activated in normal cells after HNE treatment

Nrf2 protein was localized in normal cells after exposure to HNE 40 μ M for 1h (A) and 2h (B). DAPI was used to stain nuclei. Images were acquired by confocal imaging according to a stacking mode. The pictures presented NRF2 (red) in the same confocal plan than nuclei (blue). Magnification scale bars were showed in the merge picture. Fluorescence intensity profiles were performed according to a line drawn in the blue and the red channels (but represented in white on the small blue channel image). The projection of DAPI staining (nuclei) on the intensity graph of NRF2 staining allowed the visualization of the nuclei to discriminate nuclear and cytosolic NRF2. (C) Normal and preneoplastic cells were treated or not with HNE (40 μ M) during 1, 2 and 3h. Nuclear fractions were purified and western blots were performed. Nrf2 protein was detected near 100kDa band standard and lamin A/C was a loading control of nuclear fractions (apparent weight 67-72kDa). The blot was representative of 3 independent experiments. (D) Total Nrf2 protein levels in normal and preneoplastic cells (treated with 40 μ M HNE during 30 min, 1-4h) were quantified by western in cell (see material and methods), relative to the level of the housekeeping protein β -actin. (E) Normal and preneoplastic cells were treated with HNE 40 μ M for 6h. RNA were extracted and relative levels of induction of xCT,

ALDH3A1 and GSTA4 were analyzed by RT-qPCR and reported to control. Significant differences*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, and ***: $p < 0.001$ treated *vs* control. #: $p < 0.05$ and ###: $p < 0.001$ normal treated cells *vs* preneoplastic respective treated cells. Value are means \pm SD, $n=3$.

Figure 4: Efficient maintenance of GSH/GSSG ratio and cysteine influx in preneoplastic cells upon HNE treatment

(A) Reduced GSH and oxidized GSSG ratios were measured by luminescent assay (see in Materials and Methods section) in normal and preneoplastic cells, treated or not with 0.2mM L-buthionine S,R-sulfoximine (BSO), a depletor of GSH, and HNE 40 μ M for 6h. (B) Normal and preneoplastic cells were treated or not with HNE (20-40-100 μ M) for 6h and cysteine influx was measured using L-¹⁴C-cystine. After lysis, the radioactive content was measured by scintillation counting and the cysteine uptake was normalized with protein content. Cystine influx was expressed in nmoles/mg protein. Significant differences*: $p < 0.05$, and ***: $p < 0.001$ treated *vs* control. #: $p < 0.05$ and ###: $p < 0.001$ normal treated cells *vs* preneoplastic respective treated cells. Value are means \pm SD, $n=3$.

Figure 5: Nrf2 is essential for the resistance of colonocytes regarding HNE exposure

Nrf2 expression was downregulated in preneoplastic cells by a pool of SiRNA directed against Nrf2. Si Neg was a pool of non-targeting SiRNA. The rate of transfection was controlled with a fluorescent SiGlo (transfection rate of 75% minimum for 4 independent experiments) (A) After 72h of transfection, preneoplastic cells were treated or not for 2h with HNE 40 μ M. On the one side, RNAs were extracted and the expression of GSTA4 (as HNE inducible and Nrf2-targeted gene) was analyzed by RT-qPCR. On the other side, nuclear proteins were extracted and Nrf2 expression was analyzed by western blot. (B) After 72h of transfection, preneoplastic cells were treated with HNE 40 μ M for 8h. Then, nuclei were stained with Hoeschst 33342 and normal and apoptotic nuclei were counted.

Nrf2 protein was overexpressed in normal cells by transfection of pcDNA3-Nrf2 plasmid, tagged or not with myc. The rate of transfection was checked with a GFP-pcDNA plasmid (minimum 80%) (C) The overexpression of Nrf2 was validated by western in cell 24h post-transfection and normalized to β -actin protein level. (D) After 24h post-transfection, normal cells were treated with 40 μ M HNE for 8h. Then, nuclei were stained with Hoeschst 33342 and normal and apoptotic nuclei were counted. Significant differences *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, and ***: $p < 0.001$ treated vs control. #: $p < 0.05$ and ##: $p < 0.01$ transfected cells vs respective negative control transfected. Value are means +/- SD, n=3.

Figure 6: CCM and PS boosted Nrf2-dependent antioxidant defense and protect normal cells from HNE-induced cell death

Normal cells were pretreated or not (NPT for non-pretreated) overnight with CCM or PS (10 μ M), before being exposed to HNE. (A) DAPI was used to stain nuclei. Images were acquired by confocal imaging according to a stacking mode. The pictures presented NRF2 (red) in the same confocal plan than nuclei (blue). Magnification scale bars were showed in the merge picture. Fluorescence intensity profiles were performed according to a line drawn in the blue and the red channels (but represented in white on the small blue channel image). The projection of DAPI staining (nuclei) on the intensity graph of NRF2 staining allowed the visualization of the nuclei to discriminate nuclear and cytosolic NRF2. (B) After pretreatments with CCM or PS, normal were treated with HNE 40 μ M for 30min, 3h and 6h. RNA were extracted and relative levels of induction of HO1, ALDH5A1, ALDH2, xCT, GSTA4, AKR1B10, GCLM and MDR1A were analyzed by RT-qPCR. Significant differences *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, and ***: $p < 0.001$ treated vs respective control. Value are means +/- SD, n=3. (C) After pretreatments with CCM or PS, normal were treated with HNE 40 μ M for 6h. Westerns in cell were performed to analyze protein expression of Nrf2, ALDH2, MDR1A, GSTA4 and xCT. Significant differences*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, and ***: $p < 0.001$ non pretreated vs CCM or PS with HNE. (D) Conjugated metabolites of HNE were analyzed in normal and preneoplastic cells, by radio-HPLC as previously described (see materials and methods). Significant differences ***: $p < 0.001$ non pretreated vs CCM; ### : $p < 0.001$, same treatment, normal vs preneoplastic cells. (E) After CCM pretreatment and HNE exposure (6h) of both cell lines, HNE-histidine adducts were quantified by dot-

plot. Data are the percentage of diminution of HNE-his adducts with CCM, in comparison with HNE alone, after 6h of exposure. Significant differences *: $p < 0.05$ Control HNE vs CCM HNE (**F**) After CCM or PS pretreatment and HNE exposure (9h), apoptotic nuclei are counted by Hoechst 33342 staining and fluorescence microscopy. Significant differences*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, and ***: $p < 0.001$ treated vs respective control. $\alpha\alpha\alpha$: $p < 0.001$ NPT vs CCM/ NPT vs PS. #: $p < 0.05$, ##: $p < 0.01$, and ###: $p < 0.001$, same treatment, normal vs preneoplastic cells (**G**) (**H**) Normal (**G**) and preneoplastic (**H**) cells were invalidated for Nrf2 by SiNrf2. After 48h post-transfection, cells were pretreated with CCM or PS overnight and treated with HNE for 8h. Apoptotic nuclei are counted by Hoechst 33342 staining and fluorescence microscopy. Significant differences*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, and ***: $p < 0.001$ treated vs respective control. #: $p < 0.05$, ##: $p < 0.01$. ###: $p < 0.001$, same treatment, SiNeg vs SiNrf2 transfected cells. α : $p < 0.05$, $\alpha\alpha\alpha$: $p < 0.001$ Si control vs Si CCM or Si PS.

Acknowledgments

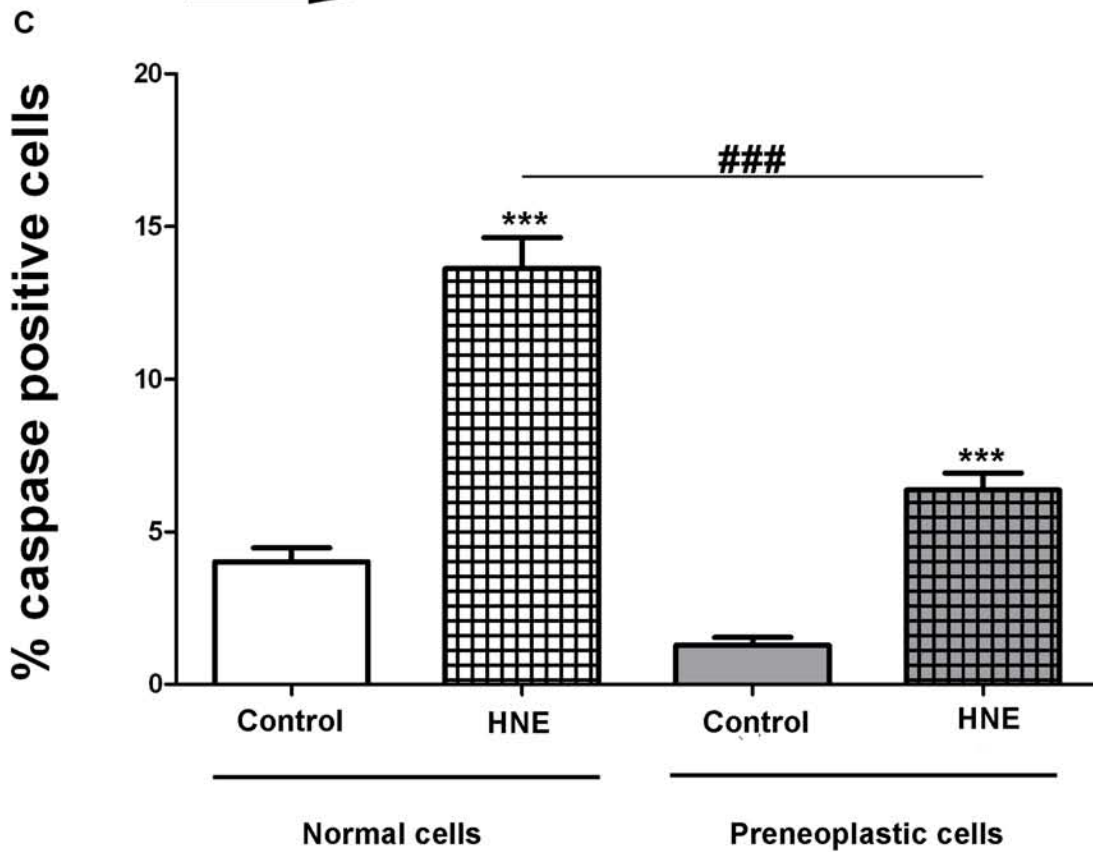
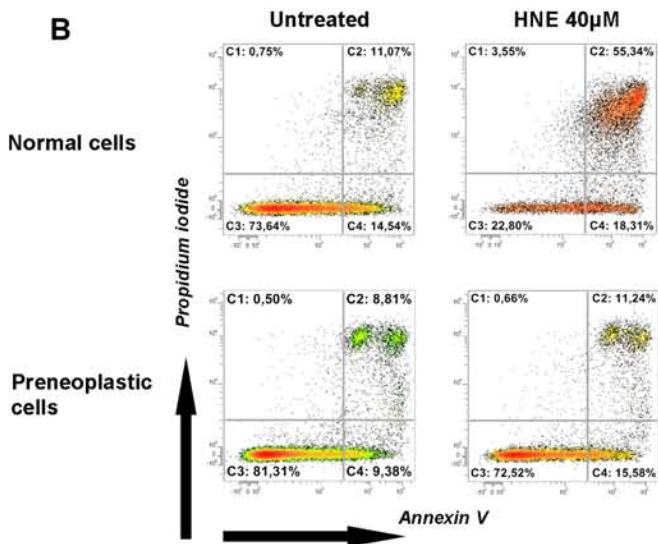
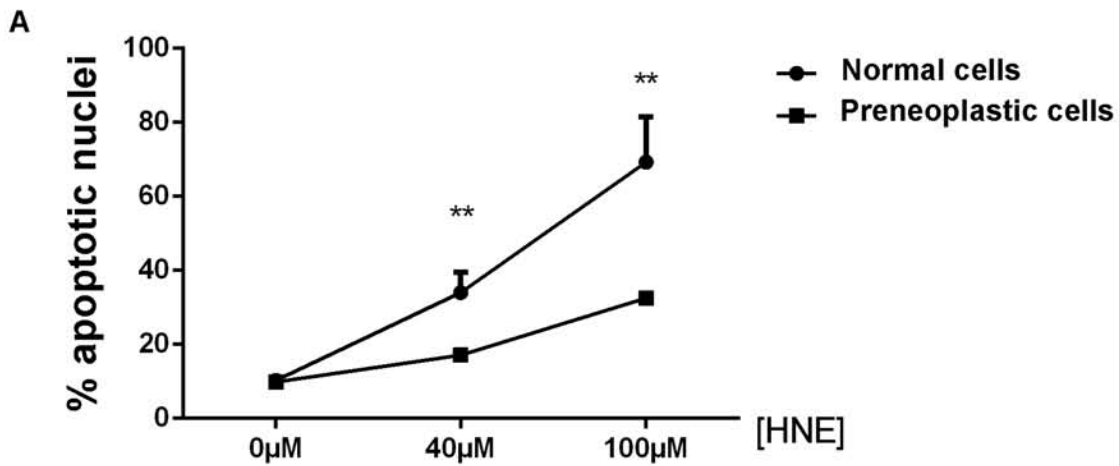
The authors thank Florence Blas-Y-Estrada for animal care. We thank Sophie Allart and Astrid Canivet for technical assistance at the cellular imaging facility of INSERM UMR 1043, Toulouse

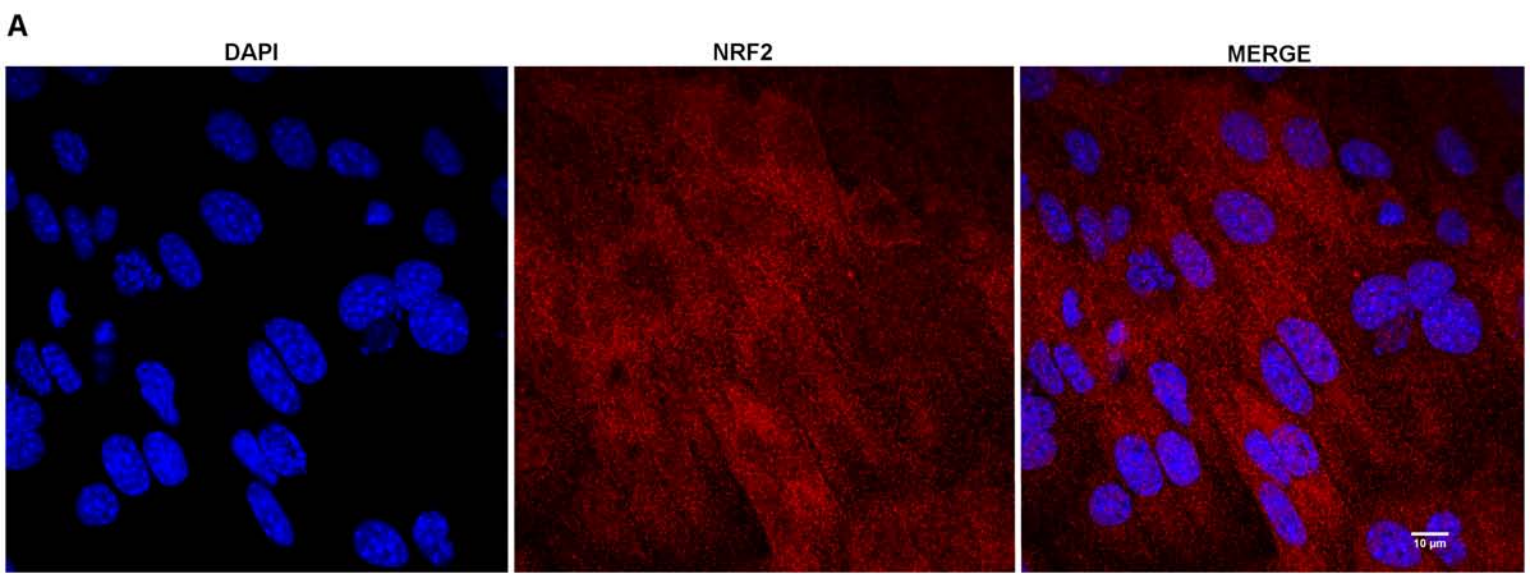
References

1. Ballinger AB, Anggiansah C. Colorectal cancer. *Bmj* 2007; 335: 715-8.
2. World Cancer Research Fund AIfC. Food, nutrition, physical activity and the prevention of colorectal cancer. Continuous update project report summary 2011: 41.
3. Santarelli RL, Vendevre JL, Naud N, et al. Meat processing and colon carcinogenesis: cooked, nitrite-treated, and oxidized high-heme cured meat promotes mucin-depleted foci in rats. *Cancer Prev Res (Phila)* 2010; 3: 852-64.
4. Pierre F, Freeman A, Tache S, Van der Meer R, Corpet DE. Beef meat and blood sausage promote the formation of azoxymethane-induced mucin-depleted foci and aberrant crypt foci in rat colons. *J Nutr* 2004; 134: 2711-6.
5. Norat T, Bingham S, Ferrari P, et al. Meat, fish, and colorectal cancer risk: the European Prospective Investigation into cancer and nutrition. *Journal of the National Cancer Institute* 2005; 97: 906-16.
6. Bastide N, Chenni F, Audebert M, et al. A central role for heme iron in colon carcinogenesis associated with red meat intake. *Cancer Res* 2015.
7. Pierre F, Tache S, Gueraud F, Rerole AL, Jourdan ML, Petit C. Apc mutation induces resistance of colonic cells to lipoperoxide-triggered apoptosis induced by faecal water from haem-fed rats. *Carcinogenesis* 2007; 28: 321-7.
8. Barrera G. Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy. *ISRN oncology* 2012; 2012: 137289.
9. Dalleau S, Baradat M, Gueraud F, Huc L. Cell death and diseases related to oxidative stress: 4-hydroxynonenal (HNE) in the balance. *Cell Death Differ* 2013; 20: 1615-30.

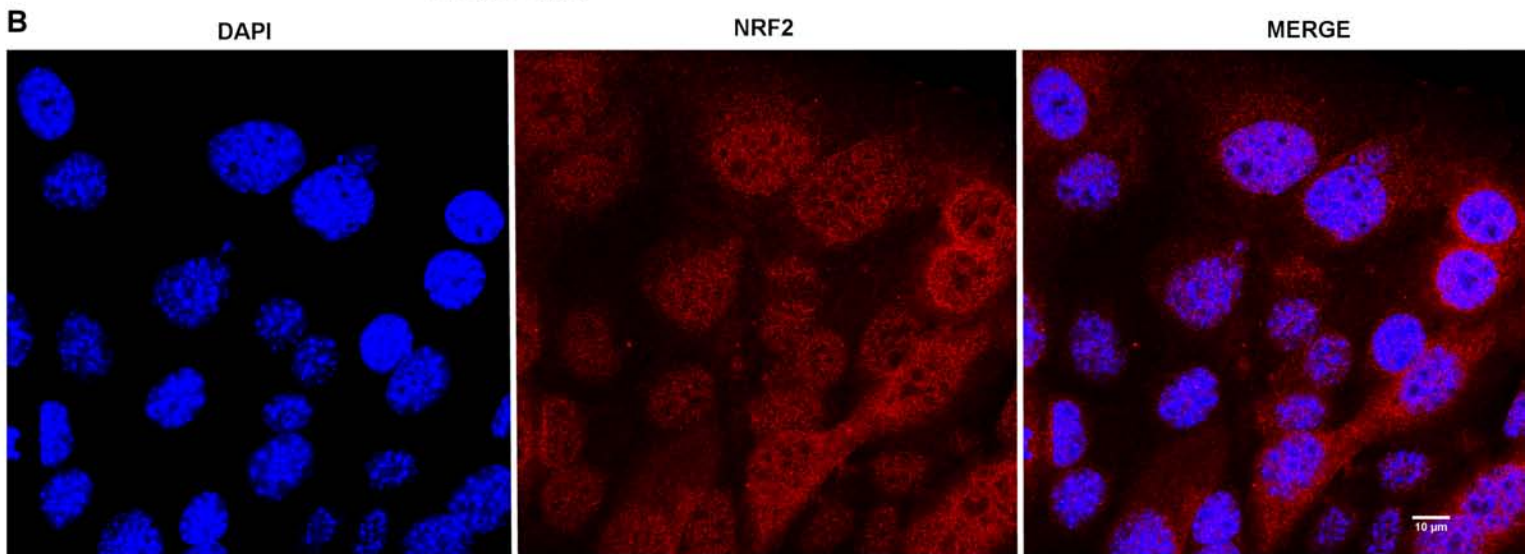
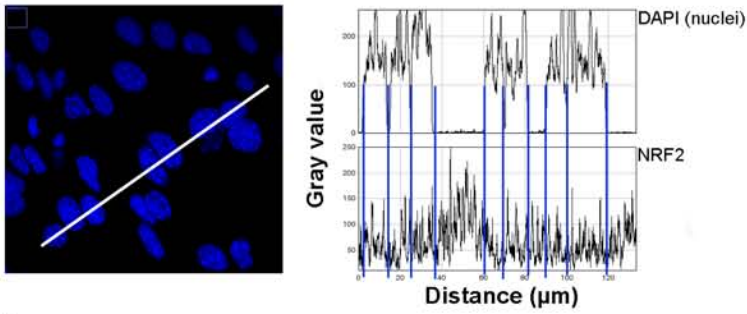
10. Skrzydlewska E, Stankiewicz A, Sulkowska M, Sulkowski S, Kasacka I. Antioxidant status and lipid peroxidation in colorectal cancer. *Journal of toxicology and environmental health Part A* 2001; 64: 213-22.
11. Forest V, Clement M, Pierre F, Meflah K, Menanteau J. Butyrate restores motile function and actin cytoskeletal network integrity in apc mutated mouse colon epithelial cells. *Nutr Cancer* 2003; 45: 84-92.
12. Baradat M, Jouanin I, Dalleau S, et al. 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* 2011; 24: 1984-93.
13. Sporn MB, Liby KT. NRF2 and cancer: the good, the bad and the importance of context. *Nat Rev Cancer* 2012; 12: 564-71.
14. Hayes JD, Dinkova-Kostova AT. The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends in biochemical sciences* 2014; 39: 199-218.
15. Siow RC, Ishii T, Mann GE. Modulation of antioxidant gene expression by 4-hydroxynonenal: atheroprotective role of the Nrf2/ARE transcription pathway. *Redox report : communications in free radical research* 2007; 12: 11-5.
16. Tong KI, Padmanabhan B, Kobayashi A, et al. Different electrostatic potentials define ETGE and DLG motifs as hinge and latch in oxidative stress response. *Molecular and cellular biology* 2007; 27: 7511-21.
17. Zhao SG, Li Q, Liu ZX, et al. Curcumin attenuates insulin resistance in hepatocytes by inducing Nrf2 nuclear translocation. *Hepatogastroenterology* 2011; 58: 2106-11.
18. Chiou YS, Tsai ML, Nagabhushanam K, et al. Pterostilbene is more potent than resveratrol in preventing azoxymethane (AOM)-induced colon tumorigenesis via activation of the NF-E2-related factor 2 (Nrf2)-mediated antioxidant signaling pathway. *Journal of agricultural and food chemistry* 2011; 59: 2725-33.
19. Giraudi PJ, Bellarosa C, Coda-Zabetta CD, Peruzzo P, Tiribelli C. Functional induction of the cystine-glutamate exchanger system Xc(-) activity in SH-SY5Y cells by unconjugated bilirubin. *PLoS One* 2011; 6: e29078.
20. Huc L, Lemarie A, Gueraud F, Helies-Toussaint C. Low concentrations of bisphenol A induce lipid accumulation mediated by the production of reactive oxygen species in the mitochondria of HepG2 cells. *Toxicol In Vitro* 2012; 26: 709-17.
21. Bird RP. Observation and quantification of aberrant crypts in murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Lett* 1987; 37: 147-51.
22. Caderni G, Femia AP, Giannini A, et al. Identification of mucin-depleted foci in the unsectioned colon of azoxymethane-treated rats: correlation with carcinogenesis. *Cancer Research* 2003; 63: 2388-92.
23. Forman HJ, Dickinson DA, Iles KE. HNE--signaling pathways leading to its elimination. *Mol Aspects Med* 2003; 24: 189-94.
24. Pierre F, Peiro Gr, TachÃ© S, et al. New marker of colon cancer risk associated with heme intake: 1,4-dihydroxynonane mercapturic acid. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 2006; 15: 2274-9.
25. Pierre FH, Santarelli RL, Allam O, et al. Freeze-dried ham promotes azoxymethane-induced mucin-depleted foci and aberrant crypt foci in rat colon. *Nutr Cancer* 2010; 62: 567-73.
26. DeNicola GM, Karreth FA, Humpton TJ, et al. Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature* 2011; 475: 106-9.
27. Kluth D, Banning A, Paur I, Blomhoff R, Brigelius-Flohe R. Modulation of pregnane X receptor- and electrophile responsive element-mediated gene expression by dietary polyphenolic compounds. *Free Radic Biol Med* 2007; 42: 315-25.
28. Rinaldi AL, Morse MA, Fields HW, et al. Curcumin activates the aryl hydrocarbon receptor yet significantly inhibits (-)-benzo(a)pyrene-7R-trans-7,8-dihydrodiol bioactivation in oral squamous cell carcinoma cells and oral mucosa. *Cancer Res* 2002; 62: 5451-6.
29. Rimando AM, Nagmani R, Feller DR, Yokoyama W. Pterostilbene, a new agonist for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha-isoform, lowers plasma lipoproteins and cholesterol in hypercholesterolemic hamsters. *J Agric Food Chem* 2005; 53: 3403-7.

30. Chakravarti N, Kadara H, Yoon DJ, et al. Differential inhibition of protein translation machinery by curcumin in normal, immortalized, and malignant oral epithelial cells. *Cancer Prev Res (Phila)* 2010; 3: 331-8.
31. Irving GR, Howells LM, Sale S, et al. Prolonged biologically active colonic tissue levels of curcumin achieved after oral administration--a clinical pilot study including assessment of patient acceptability. *Cancer Prev Res (Phila)* 2013; 6: 119-28.
32. Femia AP, Giannini A, Fazi M, et al. Identification of mucin depleted foci in the human colon. *Cancer Prev Res (Phila)* 2008; 1: 562-7.
33. Femia AP, Dolara P, Giannini A, Salvadori M, Biggeri A, Caderni G. Frequent mutation of Apc gene in rat colon tumors and mucin-depleted foci, preneoplastic lesions in experimental colon carcinogenesis. *Cancer Res* 2007; 67: 445-9.
34. Femia AP, Tarquini E, Salvadori M, et al. K-ras mutations and mucin profile in preneoplastic lesions and colon tumors induced in rats by 1,2-dimethylhydrazine. *Int J Cancer* 2008; 122: 117-23.
35. Femia AP, Dolara P, Luceri C, Salvadori M, Caderni G. Mucin-depleted foci show strong activation of inflammatory markers in 1,2-dimethylhydrazine-induced carcinogenesis and are promoted by the inflammatory agent sodium dextran sulfate. *Int J Cancer* 2009; 125: 541-7.
36. Caderni G, Femia AP, Giannini A, et al. Identification of mucin-depleted foci in the unsectioned colon of azoxymethane-treated rats: correlation with carcinogenesis. *Cancer Res* 2003; 63: 2388-92.
37. Perron NR, Brumaghim JL. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochem Biophys* 2009; 53: 75-100.
38. Liu MJ, Takahashi Y, Wada T, et al. The aldo-keto reductase Akr1b7 gene is a common transcriptional target of xenobiotic receptors pregnane X receptor and constitutive androstane receptor. *Mol Pharmacol* 2009; 76: 604-11.
39. Li D, Hinshelwood A, Gardner R, McGarvie G, Ellis EM. Mouse aldo-keto reductase AKR7A5 protects V79 cells against 4-hydroxynonenal-induced apoptosis. *Toxicology* 2006; 226: 172-80.

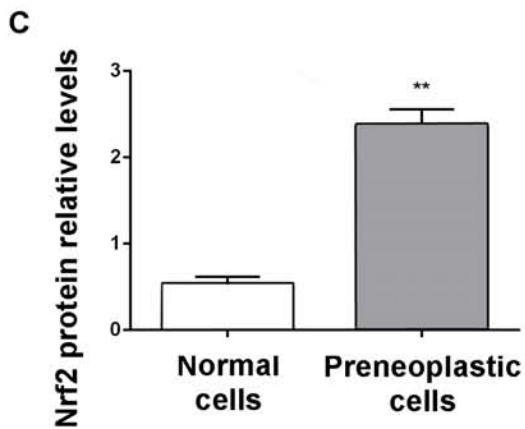
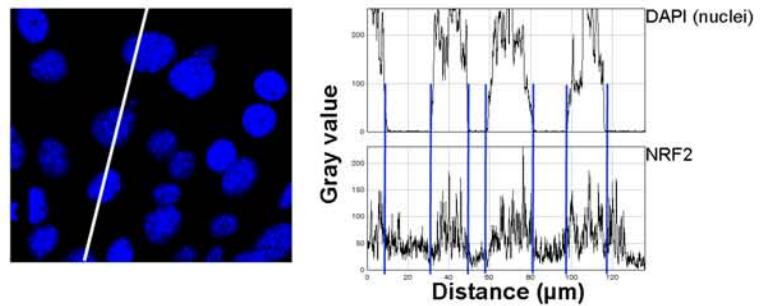


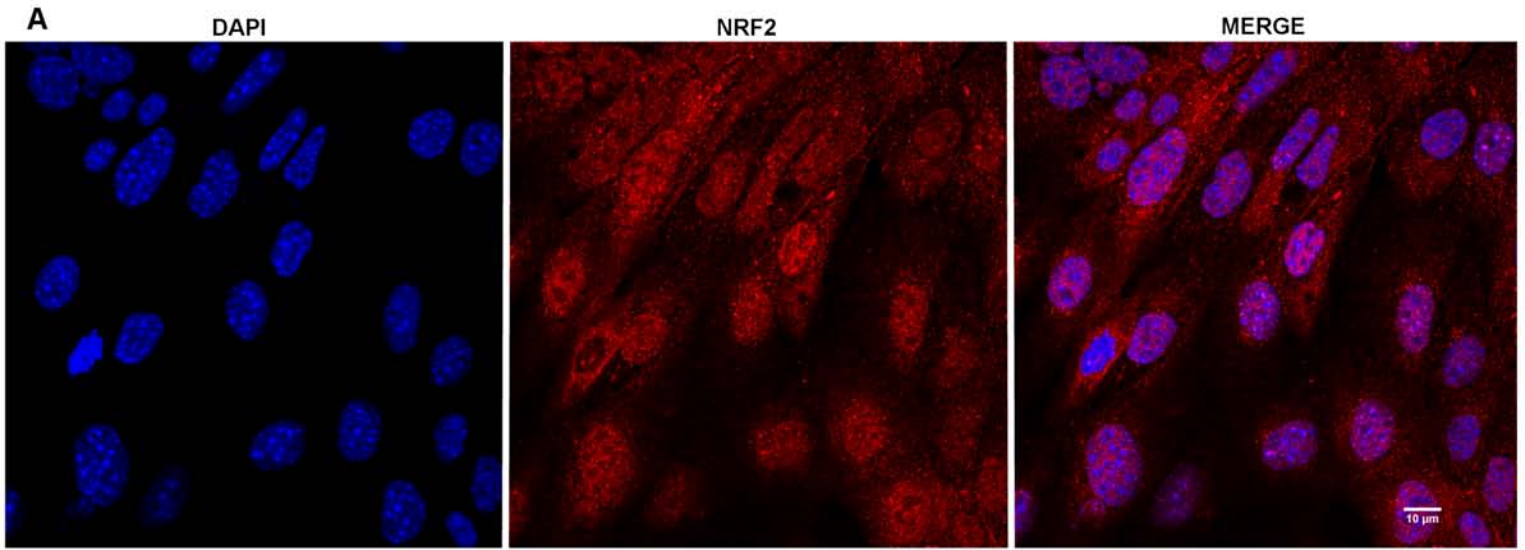


Normal cells

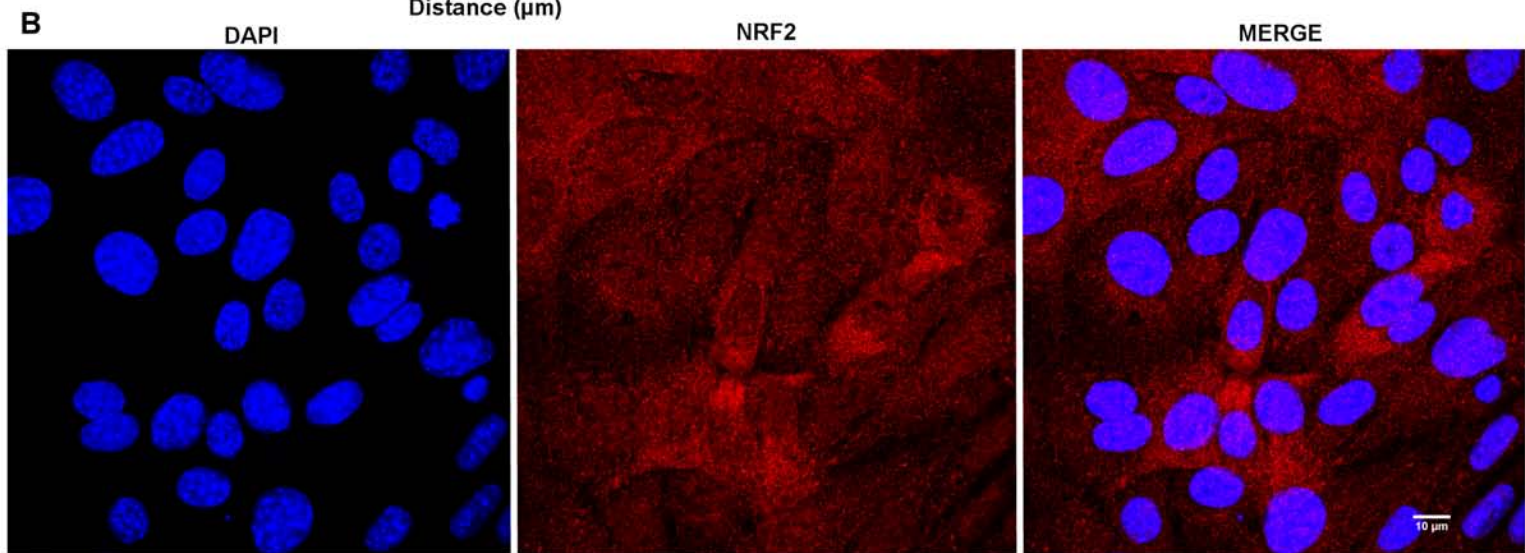
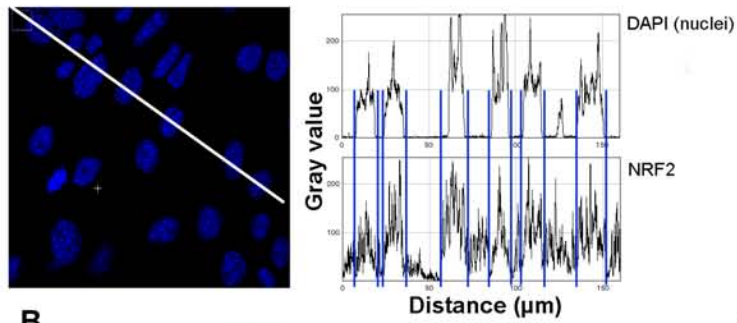


Prenoplastic cells

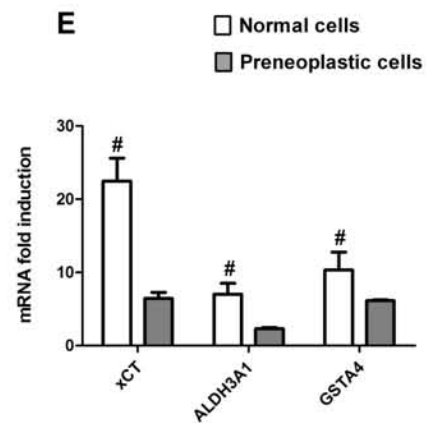
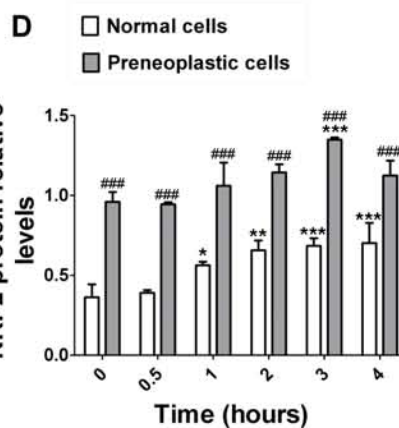
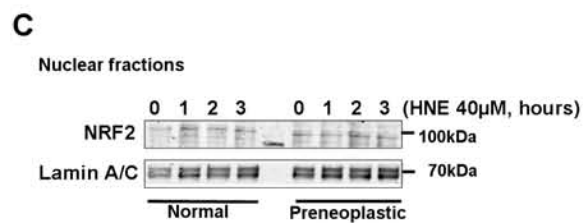
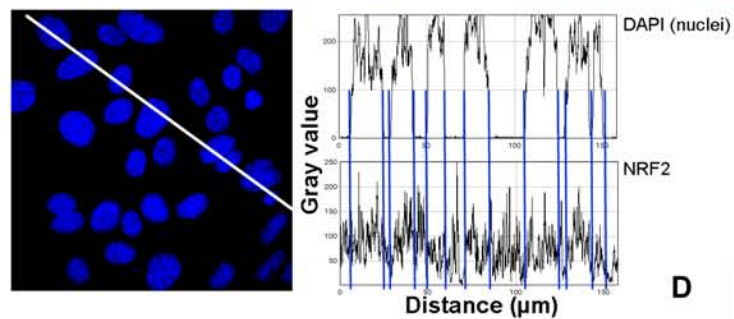




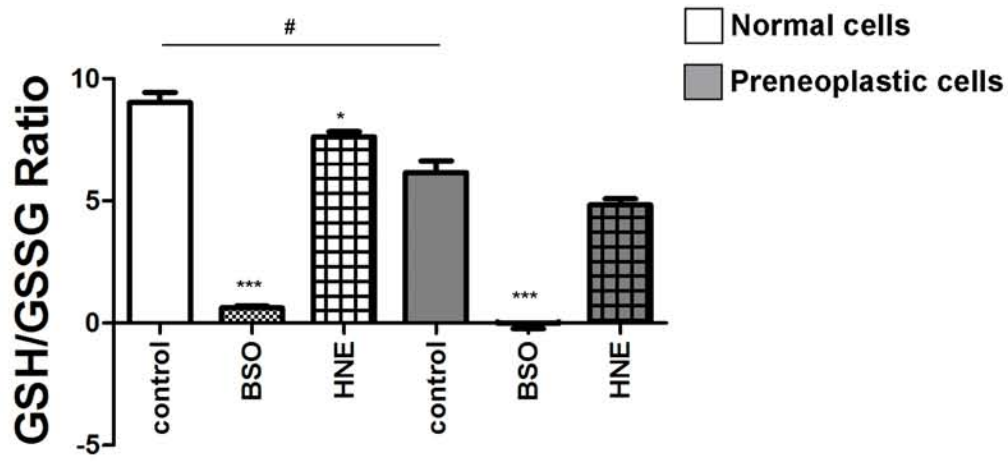
Normal cells
HNE, 40µM, 1h



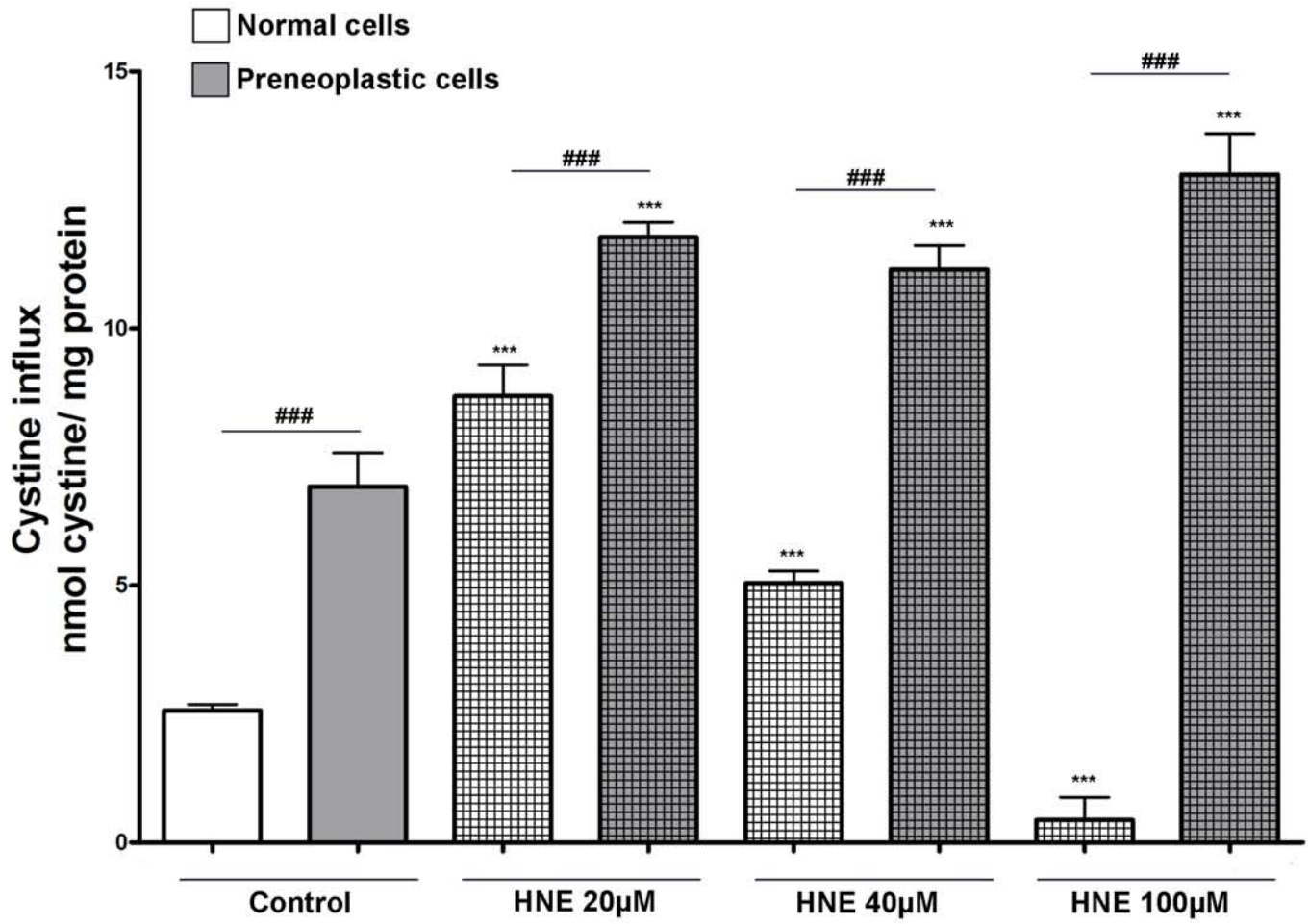
Normal cells
HNE, 40µM, 2h

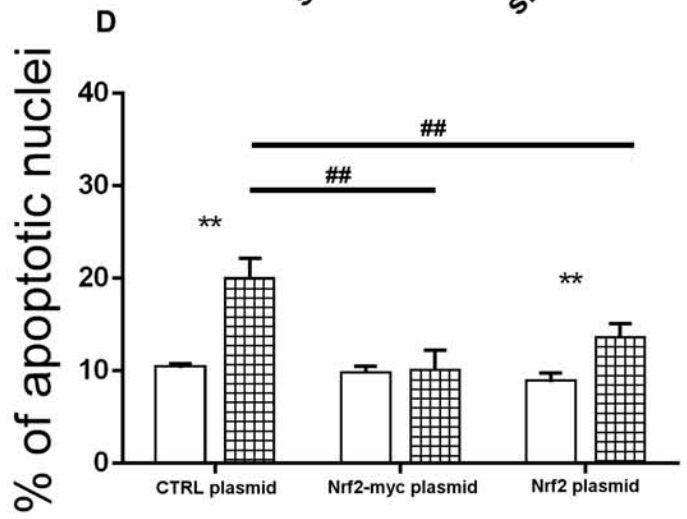
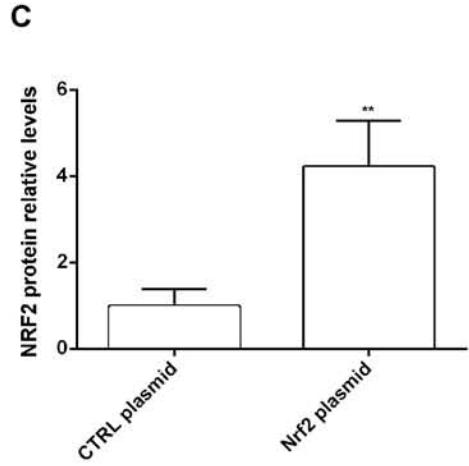
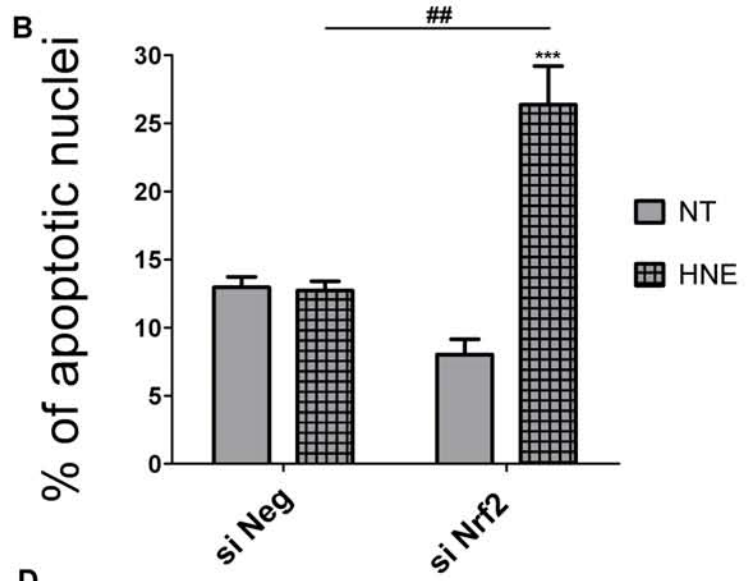
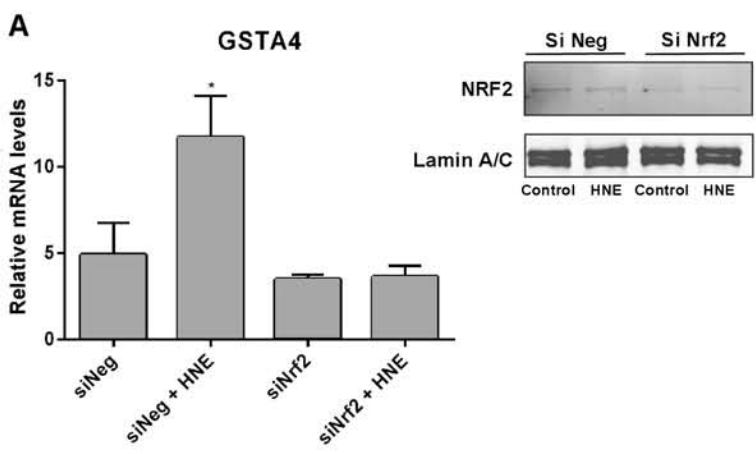


A



B





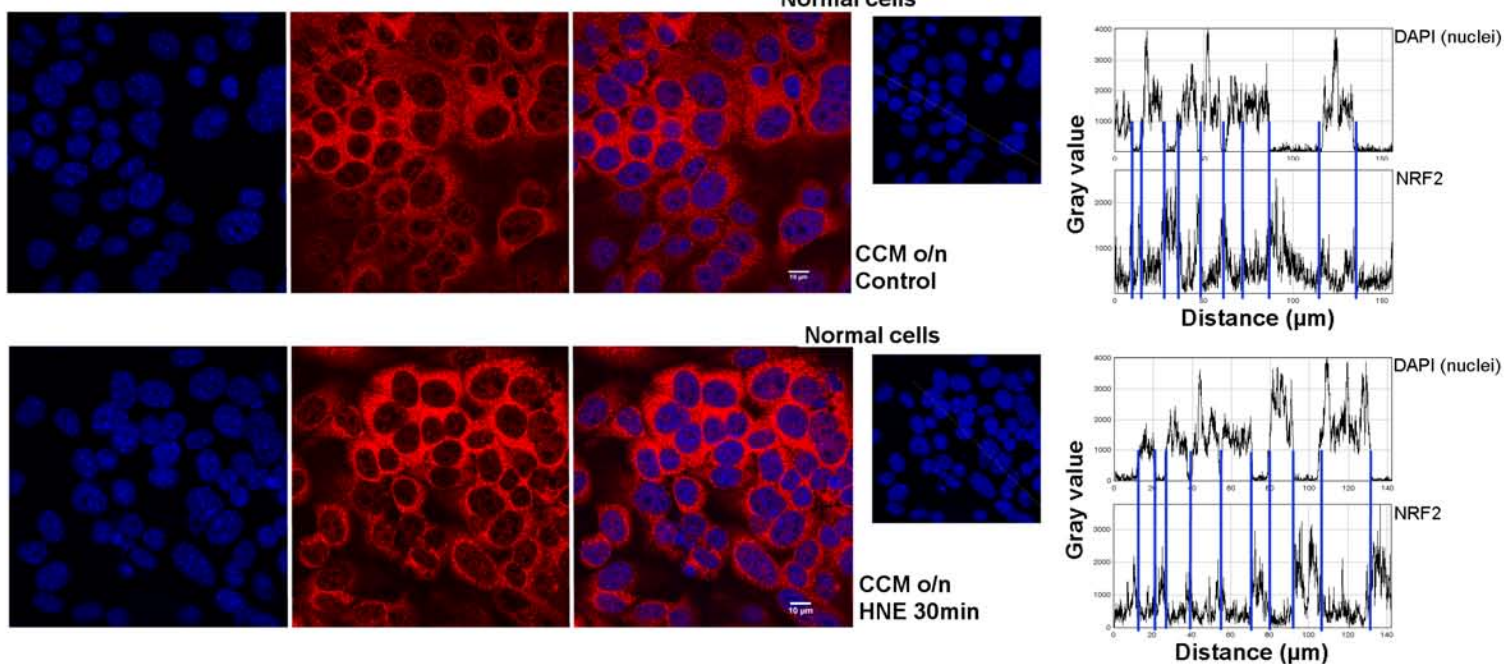
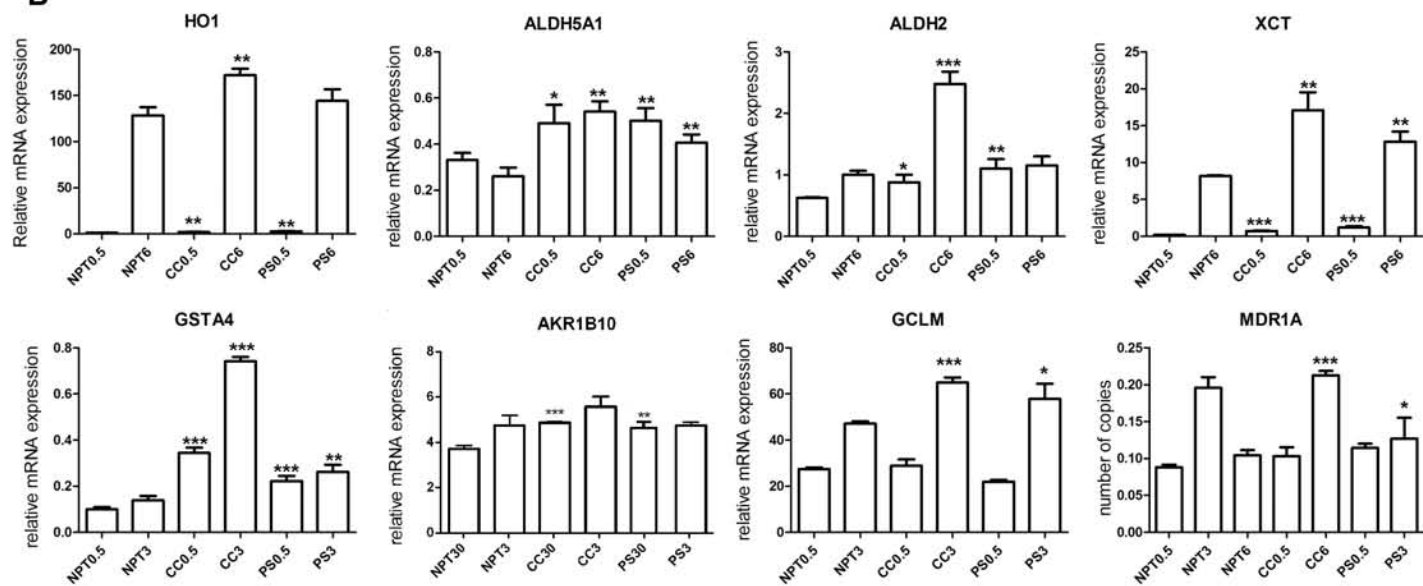
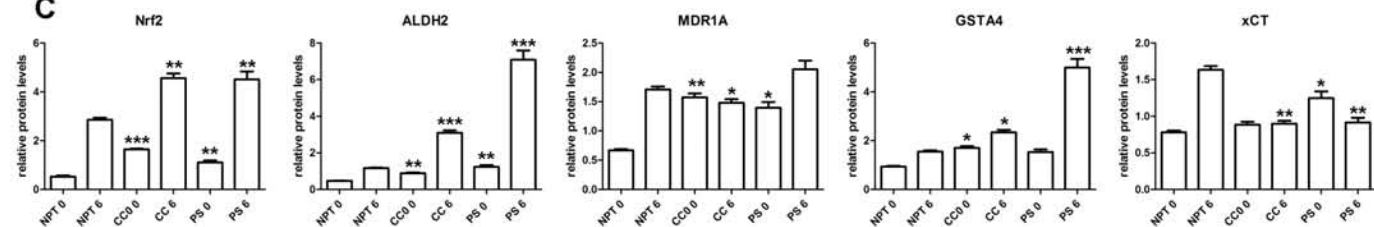
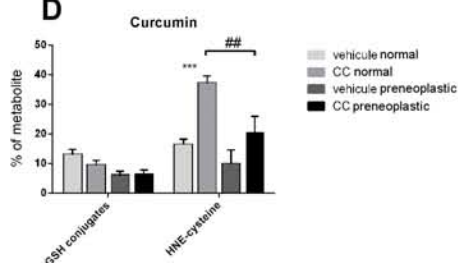
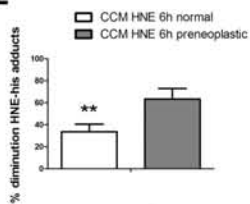
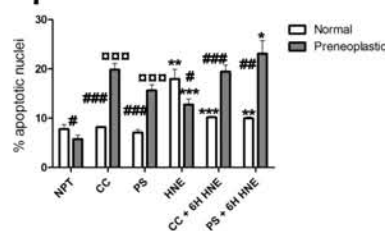
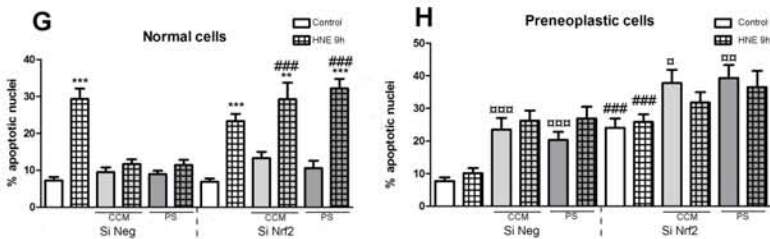
A**B****C****D****E****F****G**

Table 1: Meat supplemented with curcumin limited preneoplastic lesions in AOM-chemically induced rats, by limiting partly luminal lipid peroxidation and by increasing Nrf2-related HNE detoxification enzymes expression.

A- Preneoplastic lesions (ACF and MDF) in the colon of rats fed cured meat added with CCM for 98 days, 105 days after an azoxymethane injection.

Diet	No. of rats	MDF/Colon	Crypt/MDF	ACF/colon	Crypt/ACF
DCNO	10	17.0±6.8	2.8±0.7	110±28	3.4±0.2
DCNO + Curcumin	10	10.2±4.9**	2.9±0.6	117±29	3.4±0.2

NOTE: ACF: aberrant crypt foci. MDF: mucin depleted foci. Significantly different from the DCNO control diet : ** P < 0.01.

B- Fecal and urinary biomarkers in rats given cured meat added with curcumin for 80 days

Diet	No. of rats	FW Heme (nmol/24h)	FW TBARS (MDA eq. nmol/24h)	Urinary DHN-MA (ng/24h)
DCNO	10	254±95	165±16	243±99
DCNO + Curcumin	10	242±89	112±19***	263±91

Significantly different from the DCNO control diet : *** P < 0.001.

C- Relative expression of Nrf2-target genes in mucosa of rats given a cured meat (DCNO) added or not with curcumin (DCNO+curcumin) for 96 days (mean ±SD, n=3)

Nrf2-target genes	DCNO	DCNO+ curcumin
HO1	0.472 ±0.042	1.834 ±0.114 ^{###}
ALDH2	3.382 ±0.715	3.217 ±0.913
GCLM	7.894 ±2.564	5.693 ±2.453 [#]
xCT	0.602 ±0.726	0.876 ±0.600
GSTA4	0.052 ±0.059	0.059±0.040
Akr1b7	4.481 ±0.140	10.569 ±1.105 ^{###}
Akr1b8	4.142 ±0.086	8.275 ±1.429 ^{##}
Ark1b10	4.674 ±1.743	5.434 ±1.947

Significant differences ^{##}: <0.01, and ^{###}: p<0.001 DCNO CCM vs DCNO.

III. Quel(s) type(s) de mort(s) cellulaire(s) sont initiés dans les deux lignées en réponse au HNE ?

Revue commentée (acceptée en 2013 dans *Cell Death and Differentiation*) :

[4-hydroxynonenal and mechanisms of cell death](#)

Sabine Dalleau, Maryse Baradat, Françoise Guéraud, & Laurence Huc

Cette revue explore un champ relativement différent des deux précédents, même si lié à la thématique du différentiel de survie observé entre les deux lignées. Elle s'intéresse essentiellement aux différents types de mort cellulaire que peut induire le HNE.

Les adduits HNE-protéines font partie des marqueurs classiques du stress oxydant dans une pléiade de pathologies associées au stress oxydant: maladies neurodégénératives, maladies cardiovasculaires, cancers, ou encore syndrome métabolique. Or dans nombre de ces maladies, le HNE est aussi un facteur proactif qui induit la mort cellulaire : mort des cellules hépatiques dans le cas de stéatoses, mort des cellules β des îlots de Langerhans dans les cas de diabète, mort des cellules coliques dans le cas de cancers colorectaux, mort de neurones dans les cas de dégénération neuronale. Cette revue s'attache à montrer que le lien entre HNE et mort cellulaire a de multiples facettes.

Il est dans un premier temps à considérer comme un inducteur de mort cellulaire. Le HNE est tout d'abord capable d'induire l'apoptose par voie extrinsèque. Il peut promouvoir l'expression du récepteur de mort FAS, ce qui d'une part le rendrait plus disponible pour son ligand, et d'autre part le rend activable par le HNE lui-même *via* la formation d'agrégats HNE-récepteurs, FAS étant riche en cystéine dans son domaine cytoplasmique. Il pourrait également induire la voie extrinsèque par activation de la voie JNK MAPK indépendamment de la formation du DISC. Le HNE peut ensuite induire l'apoptose par voie intrinsèque, d'une part en modifiant les canaux ioniques ATPases dépendants, ce qui génère notamment une perturbation de l'homéostasie calcique à l'origine d'un signal apoptotique, d'autre part en oxydant les lipides mitochondriaux provoquant un stress mitochondrial. De plus, générant des dommages géno- et cytotoxiques, il pourrait également activer la voie intrinsèque par activation de p53.

Par ailleurs, la propension du HNE à former des adduits et des agrégats avec les protéines a pour conséquence de les rendre impossibles à dégrader par le protéasome. Ces protéines s'accumulent d'autant plus que le protéasome lui-même peut être inhibé par le HNE : ces phénomènes combinés engendrent un stress du réticulum endoplasmique qui, lorsqu'il est prolongé, se traduit par une entrée en apoptose. Outre l'apoptose, le HNE a la capacité d'induire la mort cellulaire sous le contrôle des calpaïnes. Les calpaïnes sont des protéases dépendantes du calcium. Cette induction passerait à la fois par le potentiel du HNE à modifier la concentration intracellulaire de Ca^{2+} et par son potentiel à modifier chimiquement certaines protéines pour les rendre « aptes » à induire la mort par les calpaïnes : c'est le cas de HSP70, une protéine dont le HNE induit la carbonylation, ce qui va permettre son clivage par les calpaïnes, clivage amenant généralement à la perméabilisation de la membrane lysosomale et au relargage dans le cytoplasme de protéases effectrices qui vont conduire à la mort de la cellule. Enfin, le HNE à des concentrations élevées peut induire la nécrose de la cellule, tandis qu'il a récemment été mis en évidence qu'il pouvait participer à des voies de mort cellulaire contrôlées par le fer comme développé dans les rappels bibliographiques.

Cependant, le HNE est aussi capable de limiter les processus de mort qu'il engage dans la cellule. Effectivement, il induit aussi l'activation de facteurs protecteurs tels que HSF1. Même si la meilleure opportunité de survie qu'il offre à la cellule reste encore sa capacité à induire sa propre métabolisation via son activation par adduction au senseur de stress oxydant KEAP1, KEAP1 qui va en retour activer le facteur de transcription NRF2 qui permettra sa détoxification. Cette opportunité dépend néanmoins des capacités de métabolisation intrinsèques de la cellule, ce qui fait que chacune n'est pas égale devant la réponse au HNE. Dans un autre registre, le HNE peut également inhiber le cycle cellulaire en inhibant les cyclines activatrices des transitions G0/G1 et G2/M notamment. Il peut aussi induire la sénescence cellulaire dans la même veine que la corrélation faite entre stress oxydant et vieillissement, et cela en inhibant hTERT ou en modifiant des oncogènes tels que p21. Enfin, le HNE peut activer la voie de l'autophagie. Ce processus permet à la cellule de rassembler ses organites endommagés par le stress oxydant dans des structures vésiculaires appelées autophagosomes et de les éliminer via un processus ciblé peu coûteux en énergie.

Dans de nombreux types cellulaires, le HNE peut induire les changements morphologiques caractéristiques de l'autophagie, cela associé à une augmentation classique des niveaux de LC3-II.

Cependant, le regard porté sur le stress oxydant évolue : alors que jusqu'à présent toutes les études arguaient la lutte contre le stress oxydant comme le *credo* de la cellule aérobie, aujourd'hui le stress oxydant est de plus en plus considéré comme bénéfique lorsqu'il est récurrent et à faible dose. C'est le concept émergent d'*hormesis*. Ce concept veut que des cellules _ et à grande échelle, l'organisme _ régulièrement exposées à de basses doses de stress oxydant soient mieux préparées, par un phénomène adaptatif, à répondre à des stress oxydatifs majeurs.

Review

Cell death and diseases related to oxidative stress: 4-hydroxynonenal (HNE) in the balance

S Dalleau^{1,2}, M Baradat^{1,2}, F Guéraud^{1,2} and L Huc^{*1,2}

During the last three decades, 4-hydroxy-2-nonenal (HNE), a major α,β -unsaturated aldehyde product of n-6 fatty acid oxidation, has been shown to be involved in a great number of pathologies such as metabolic diseases, neurodegenerative diseases and cancers. These multiple pathologies can be explained by the fact that HNE is a potent modulator of numerous cell processes such as oxidative stress signaling, cell proliferation, transformation or cell death. The main objective of this review is to focus on the different aspects of HNE-induced cell death, with a particular emphasis on apoptosis. HNE is a special apoptotic inducer because of its abilities to form protein adducts and to propagate oxidative stress. It can stimulate intrinsic and extrinsic apoptotic pathways and interact with typical actors such as tumor protein 53, JNK, Fas or mitochondrial regulators. At the same time, due to its oxidant status, it can also induce some cellular defense mechanisms against oxidative stress, thus being involved in its own detoxification. These processes in turn limit the apoptotic potential of HNE. These dualities can imbalance cell fate, either toward cell death or toward survival, depending on the cell type, the metabolic state and the ability to detoxify.

Cell Death and Differentiation (2013) 20, 1615–1630; doi:10.1038/cdd.2013.138; published online 4 October 2013

Bullet Points

- 4-hydroxy-2-nonenal (HNE), a secondary product of lipoperoxidation, can form protein adducts and modifies cell signaling.
- Because of its chemical reactivity, HNE can exert pleiotropic effects particularly in cell death.
- HNE is accumulated in numerous oxidative stress-related diseases, such as neurodegenerative diseases (NDD), cardiovascular diseases, metabolic syndrome and cancer.
- The regulation of cell death by HNE can impact the development of diseases associated with oxidative damage.

Open Questions

- What are the mechanisms of cell death induced by HNE?
- What is the relative importance of the canonical apoptotic pathways compared with atypical cell deaths in HNE-exposed cells?

- Upon HNE exposure, what are the processes to avoid death?
- How do the detoxification pathways modulate the cell fate upon HNE exposure?

4-Hydroxynonenal: a Highly Reactive Product of Lipoperoxidation

Non-enzymatic lipoperoxidation (LPO) is an autocatalytic process, initiated by the attack of free radicals on membrane polyunsaturated fatty acids (PUFAs). The α,β -unsaturated aldehyde 4-hydroxynonenal (HNE) is a major end product that is derived from the oxidation of n-6 PUFAs such as linoleic, γ -linolenic or arachidonic acids. HNE belongs to the advanced lipid peroxidation end products (ALEs). Despite its relative stability compared with free radicals, the chemical structure of HNE possesses three reactive functions: a C2 = C3 double bond, a C1 = O carbonyl group and a hydroxyl group on

¹INRA, TOXALIM (Research Centre in Food Toxicology), 180 chemin de Tournefeuille, F-31027 Toulouse, France and ²Université de Toulouse III, INP, ENVT, UPS, TOXALIM, F-31027 Toulouse, France

*Corresponding author: L Huc, INRA, TOXALIM (Research Centre in Food Toxicology), 180 chemin de Tournefeuille, F-31027 Toulouse, France. Tel: +33 561285014; Fax: +33 561285244; E-mail: Laurence.Huc@toulouse.inra.fr

Keywords: lipoperoxidation; apoptosis; detoxification; protein adduct; oxidative stress

Abbreviations: AIF, apoptosis-inducing factor; AKR, aldo-keto reductase; ALDH, aldehyde dehydrogenase; ALE, advanced lipid peroxidation end product; AP-1, activator protein 1; ASK1, apoptosis signal-regulating kinase 1; Bcl2, B-cell lymphoma 2; Cdc, cell division cycle homolog; CDK, cyclin-dependent kinase; cyt.c, cytochrome c; Daxx, death domain-associated protein; DHN, 1,4-dihydroxy-2-nonenal; DISC, death-inducing signaling complex; ER, endoplasmic reticulum; FADD, Fas-associated protein with death domain; FasL, Fas ligand; GSH, glutathione; GST, glutathione S-transferase; HNA, 4-hydroxynonenal; HNE, 4-hydroxy-2-nonenal; HO-1, heme oxygenase 1; HSF, heat shock factor; Hsp, heat shock protein; hTERT, human telomerase reverse transcriptase; I κ B, inhibitor of kappa B; IKK, I κ B kinase; JNK, c-Jun N-terminal kinase; Keap-1, Kelch-like ECH-associated protein 1; LDL, low-density lipoprotein; LMP, lysosomal membrane permeabilization; LPO, lipoperoxidation; MCP-1, monocyte chemoattractant protein 1; MOMP, mitochondrial outer membrane permeabilization; MRP, multidrug-resistant protein; NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease; NDD, neurodegenerative diseases; NF κ B, nuclear factor-kappa B; NQO1, NAD(P)H dehydrogenase (quinone) 1; Nrf2, Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2; p53, tumor protein 53; PDGFR, platelet-derived growth factor receptor; PUFA, polyunsaturated fatty acid; Rb, retinoblastoma protein; RLIP76, RalA-binding protein 16 encoded 76-kDa splice variant; ROS, reactive oxygen species; TGF β , transforming growth factor β ; Trx1, thioredoxin reductase 1; TNF, tumor necrosis factor; TRAIL, TNF-related apoptosis-inducing ligand; UPR, unfolded protein response; VSMC, vascular smooth muscle cells; XIAP, X-linked inhibitor of apoptosis protein

Received 03.4.13; revised 22.7.13; accepted 29.7.13; Edited by RA Knight; published online 04.10.13

C4 (Figure 1). These reactive functions make this electrophilic molecule highly reactive toward nucleophilic thiol and amino groups. This reactivity relies upon both the Michael addition of thiol or amino compounds on the C3 of the C2=C3 double bond and the formation of Schiff bases between the C1 carbonyl group and primary amines. The kinetics of the Schiff base formation are inherently slow and reversible, making Michael-adducts predominant. HNE can then react with a large number of macromolecules such as proteins, principally those containing histidine, cysteine and lysine residues; lipids, which contains an amino group; and with nucleic acids, mostly with the guanosine moiety of DNA.¹ These interactions with proteins, called HNE-protein adduction, modify their activity (for a review, see Schaur *et al.*¹). Because of its double reactivity (Michael addition and Schiff bases), HNE can contribute to protein cross-linking and induce a carbonyl stress.

Under physiological conditions, cells have to cope with HNE stemming from different sources. The most common source is the endogenous one, coming from the reactive oxygen species (ROS) produced by the mitochondrial electron transport chain, which triggers lipid oxidation. When the cells are exposed to xenobiotics, the cytochrome P450 biotransformation activities can also generate ROS that are able to induce LPO. Thus, HNE generation has been associated with drugs or exposure to environmental contaminants, such as ethanol.² Inflammation-related ROS are also a prominent source of HNE, and HNE-protein adducts are biomarkers in inflammatory diseases.³ Exogenous HNE is another way for the cells to be exposed. It can be produced by peroxidation of plasma low-density lipoproteins (LDL)⁴ or generated during food processing: the heme iron present in red meat can oxidize dietary polyunsaturated lipids.⁵ Intestinal cells are also major targets of exogenous HNE because they are at the

interface with the lumen and can be directly exposed to high concentrations of HNE. Moreover, HNE can be produced by macrophages infected by gut microbiota and such generated HNE can be toxic for colon cells.⁶ As HNE is a highly diffusible molecule, it can spread beyond its initial production site. Based upon its diffusion capacity, it has been suggested that HNE can act as a paracrine signal molecule.⁷

Because of the basal level of ROS inherent to life under aerobic conditions, there should be a basal level of HNE in the cell. The HNE concentration in human blood and serum was estimated to be about 0.05–0.15 μM ,^{8,9} but in pathological situations and close to the core of LPO sites, its concentration can be greatly increased (more than 100 μM).¹⁰ Thus, high levels of HNE have been detected in a large number of diseases.^{11,12} Nevertheless, even if HNE can be detected by several methods, acquiring reliable values of HNE *in vivo* is considerably compromised by its rapid metabolism, its efflux and its steady-state concentration in specific tissues.¹³ All cells are not equal regarding HNE detoxification. As an example, colonocytes metabolize 100% of 40 μM HNE in 90 min,¹⁴ whereas hepatocytes metabolize 95% of 100 μM HNE in 3 min.¹⁵ Therefore, the concentration of HNE and the duration of exposure can be modulated by the rate of detoxification in target organs.

Depending on its concentration and its targets, HNE can contribute to many biological functions: for example, stimulating or inhibiting enzymatic functions, such as kinases (PKC (protein kinase C)).¹⁶ HNE interaction with key amino acids of catalytic sites could explain the inhibition of these enzymes.¹⁶ Although HNE-dependent protein modulation relies mainly on post-translational modifications, the regulation of gene expression by HNE has also been described notably by modulation of NF- κ B (nuclear factor-kappa B) and AP-1 (activator protein 1) transcription factors, which are related to

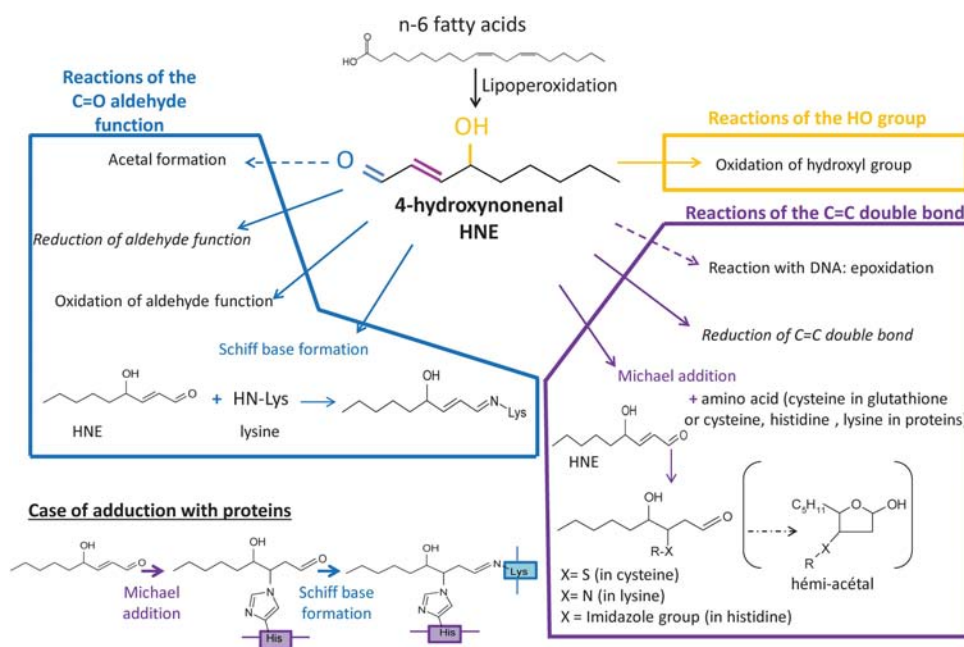


Figure 1 Reactivity of HNE. Here are represented the potential reactions of HNE on the hydroxyl, carbonyl and double bond groups. HNE is biotransformed, but it can also react with proteins according to the Michael addition and the Schiff base formation and DNA by epoxidation

Table 1 Involvement of HNE in diseases related to oxidative stress

Pathologies	<i>In vivo</i> and <i>in vitro</i> data	References
Alzheimer's disease	HNE-modified proteins ↗, proteasome activity ↘, inflammation ↗, neurodegeneration ↗	28,29
	HNE-synaptosomal proteins conjugation, glucose transport ↘, mitochondrial ROS ↗, synaptic degeneration ↗	30
Parkinson's disease	HNE-induced ion homeostasis disturbance, Na ⁺ /K ⁺ ATPase activity ↘, free Ca ²⁺ ↗, cell degeneration ↗	31
	HNE-modified proteins ↗, proteasome activity ↘, free radical generation ↗, oxidative stress ↗, dopaminergic cell death ↗	32
	HNE-modified proteins ↗, proteasome activity ↘, free radical generation ↗	33
Cancer	Dopamine uptake ↘, Na ⁺ /K ⁺ ATPase activity ↘	35
	HNE-guanosine adducts, G C to T.A mutations on p53 ↗, DNA repair mechanisms ↘	60–62
	Low levels of HNE in tumor tissues compared with healthy tissues, ↘ TGFβ1	46–48,49
	High levels of HNE in cancer tissues	50–55
Atherosclerosis	Luminal HNE triggers the positive selection of preneoplastic cells in colorectal cancer	14,59
	HNE-induced oxidative stress, IL-8 ↘, ICAM-1 ↘, cytotoxicity ↗, endothelial barrier abilities ↘, apoptosis ↗	40
Liver diseases	HNE-induced class A scavenger receptor synthesis, macrophage foam cells formation ↗, lipid cores formation ↗	37,38
	HNE-induced JNK pathway, hepatocytes cell death ↗ (NAFLD)	43
	HNE modification of 'self'-proteins, autoimmune reactions ↗ (ALD)	2,44

HNE, 4-hydroxy-2-nonenal; JNK, c-Jun N-terminal kinase; NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease; ROS, reactive oxygen species; TGFβ1, transforming growth factor β. Special character for 'arrow going up': increase; special character for 'arrow going down': decrease.

stress responses. It is particularly involved in the activation of the transcription factor Nrf2 (nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2), which transactivates the antioxidant responsive element (ARE). By doing so, it stimulates the cellular antioxidant defenses and the regulation of the oxidative stress, via the upregulation of the expression of various genes such as for heme oxygenase 1 (HO-1), aldehyde dehydrogenases (ALDH), glutathione S-transferase (GST), multidrug-resistant proteins (MRPs), aldose reductase (aldo-keto reductase, AKR), NADPH dehydrogenase quinone 1 (NQO1) or glutamate–cysteine ligase (GCL).¹⁷ Some of these genes were shown to be involved in HNE biotransformation.¹⁸ The physiological levels of HNE also have to be taken into account, as the depletion of HNE can affect gene expression such as *Fas*, *Tp53*, *p21*, *c-myc* or *connexin 43*.¹⁹

By its multiple impacts on protein regulation through transcriptional and post-translational modifications, HNE has a role in the maintenance of cellular homeostasis, during normal aerobic metabolism (low levels of ROS). However, higher and longer oxidative stress can lead to HNE accumulation thereby compromising cellular functions, as is the case in some pathological disorders.²⁰

HNE and Diseases Associated with Oxidative Damage: Links to Cell Death

High levels of HNE have been associated with diseases involving redox imbalance: NDD,²¹ macular degeneration,²² cardiovascular diseases, atherosclerosis,²³ metabolic syndrome²⁴ and cancers.²⁵ In these diseases, HNE is not only a simple marker of oxidative stress but also a causative agent. The modalities of HNE involvement in these oxidative stress-related diseases are detailed below and summarized in the Table 1.

Neurodegenerative diseases. In Alzheimer's disease, where increased oxidative damage in neuronal cell bodies is one of the earliest changes, HNE-adducts to neurofilaments have been found.²⁶ It is the amyloid β-peptide that would induce oxidative stress and the consequent lipoperoxidation. High levels of HNE have been detected in amyloid β plaques and in the cerebrospinal fluid in Alzheimer's patients.²⁷ The accumulation of HNE-modified amyloid β-peptides has been

shown to inhibit the proteasome,²⁸ and the resulting accumulation of ubiquitinated modified proteins leads to a pro-inflammatory response (cyclo-oxygenase 2, prostaglandins). This contributes to neurodegeneration.²⁹ Moreover, by modifying membranes, HNE could impair Na⁺/Ca²⁺ pumps and glucose and glutamate transporters, leading to ionic and energetic disturbances and neuronal cell death.^{30,31}

In Parkinson's disease, oxidative stress is known to contribute to mitochondrial dysfunction and degeneration of dopaminergic cells.²¹ HNE can form adducts with proteins involved in the proteasome system, leading to its failure and neuronal cell death.³² HNE has been shown to be present in the mitochondria and Lewy bodies. *In vitro* experiments have revealed that the incubation of dopaminergic neurons with HNE leads to a decrease in dopamine uptake and a loss of Na⁺/K⁺ pump activity.³³ Lipoperoxidation end product accumulation is not a simple tracer of oxidative stress but it can have a major role in the pathogenesis of Parkinson disease. HNE accumulation could be due to the impairment of the aldehyde detoxification system, among which are ALDH 1 and 2, both isoforms expressed in substantia nigra dopamine neurons.³⁴ Null mice for ALDH1 and ADLH2 have high levels of HNE and HNE-adducted proteins in the midbrain, and this could be directly correlated to a reduction in dopamine and metabolites in the striatum. Lastly, a recent study clearly demonstrates that intracerebral injection of HNE results in neurodegeneration.³⁵ Therefore, HNE can impair key areas in the brain, leading to neuronal cell death. Carnosine, as a carbonyl scavenger and antioxidant, can provide protection against HNE and decrease neurodegenerative disorders,³⁶ but its action is not limited to HNE-dependent damage.

Cardiovascular diseases. HNE has been shown to be implicated in cardiovascular diseases, as an accumulation of HNE was described in atherosclerotic lesions in both human and animals. LDLs can be oxidized by ROS from vascular cells. This leads to the formation of HNE and other aldehydes. HNE can form adducts with apoB. Oxidized-LDL bound to HNE-adducted apoB has a lower affinity for the apoB/E receptors that are expressed in most cell lines, except macrophages. Such modified LDLs are then re-oriented toward scavenger receptors, expressed at the surface of macrophages and smooth muscle cells, leading to the

formation of foam cells. The accumulation of foam cells promotes apoptosis induction and the formation of lipid cores.³⁷ The subsequent atheromatous plaque formation involves macrophage infiltration and activation of smooth muscle cells leading to fibrogenesis. HNE can particularly form adducts with PDGFR (platelet-derived growth factor receptor) in atherosclerotic aortas and the use of the antioxidant hydralazine prevents HNE-related adduction and slows the progression of the disease.³⁸

HNE could also promote chronic inflammation by stimulating the expression and the synthesis of MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1) and TGF β (transforming growth factor β) in macrophages and smooth muscle cells.³⁹ Moreover, HNE could affect the vascular cells' barrier integrity, leading to apoptosis of endothelial cells.^{40,41}

HNE is also involved in myocardial infarction. After the ischemia/reperfusion sequence, ROS are produced and accumulated. They promote the generation of HNE, which can then disrupt the actin cytoskeleton, alter Ca²⁺ homeostasis and trigger cardiomyocyte cell death.⁴²

Metabolic syndrome. Metabolic syndrome is a combination of metabolic disorders that may include impaired glucose tolerance, insulin resistance, dyslipidemia, obesity and liver disease. In diabetes, pancreatic β cells have been described to be highly sensitive to ROS. Therefore, HNE, which can trigger β cell apoptosis, may induce glucose intolerance and the development of diabetes.²⁴

In non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), the persistent JNK (c-jun N-terminal kinase) activation by oxidative stress and HNE in hepatocytes induces cell death.⁴³ In alcohol liver damage, protein modifications (adduction, haptentation) by aldehydes modify self-proteins and thus, stimulate the production of auto-antibodies and autoimmune reactions.² More precisely, during the early phases of cirrhosis, antibodies against serum albumin adducted to MDA and HNE are detected in patients' sera. The antibody levels are higher in heavy drinkers with cirrhosis or extensive fibrosis than in those with fatty liver only. The formation of antigens derived from lipid peroxidation contributes to the development of immune responses associated with alcoholic liver disease.⁴⁴ Finally, the importance of HNE in ethanol-induced steatosis was underlined by some studies relative to TNF α (tumor necrosis factor alpha)-induced apoptosis. Ethanol feeding appears to induce HNE-protein adducts, linked to an increase in TNF α secretion and apoptosis induction (TUNEL-caspase activation). When mice are coexposed to ethanol and antioxidants such N-acetyl-cysteine (NAC),⁴⁵ the decrease in HNE-protein adducts protects hepatocytes against cell death.

When hepatotoxicity is induced by chemical treatments *in vivo*, such as acetaminophen, the supplementation with S-adenosylmethionine protects the liver, prevents lipoperoxidation and GSH (glutathione) depletion and decreases centrilobular necrosis.⁴⁶

Cancer. Redox homeostasis appears to be modified in cancer cells.⁴⁷ The activation of oncogenes, the modification of energy metabolism, the mitochondrial dysfunction and the inflammation in the surrounding tissues lead to the increase

in oxidative stress during carcinogenesis. However, the level of lipid peroxidation products in cancer cells is still debated. On one hand, early studies have shown low HNE levels in tumor tissues compared with healthy tissues.^{48–50} Low levels of HNE have been shown to be linked with a decrease in TGF β 1, a cell growth inhibitory cytokine known to be downregulated in a large number of human malignant colon tumors. The decrease in TGF β 1 has been correlated with an increase in carcinogenesis progression.⁵¹ On the other hand, some studies have demonstrated increased HNE levels in cancer tissues,^{25,52,53} and the HNE-adduct levels seem to be positively correlated to progression in both the grade of malignancy in brain cancers⁵⁴ and the stages of hepatitis.⁵⁵ Several hypotheses can be formulated to explain these divergences. First, the considerable heterogeneity of tumor cells implies different patterns of the lipid composition of membranes, with an increase in cholesterol and a decrease in PUFA content and therefore, a lower formation of HNE.⁵⁶ Moreover, tumor cells can exhibit higher expression of detoxification enzymes and antioxidant proteins that permit a better HNE extrusion.⁵⁷ Finally, different grades of the tumors studied with a low lipoperoxidation level have also been related to better proliferative potential.⁵⁸

In the case of the carcinogenic effect of HNE as an exogenous compound, during the promotion of colorectal carcinogenesis by heme iron, HNE has been shown to be produced in the colon lumen. It has been shown that normal cells are highly sensitive to HNE, whereas preneoplastic cells are resistant. Thus, it can promote the positive selection of preneoplastic cells, finally leading to the development of colorectal cancer.^{14,59}

As HNE can bind to guanine bases, it is mutagenic and genotoxic *in vitro*⁶⁰ and that might contribute to cancer initiation *in vivo*.⁶¹ It may also contribute to cancer promotion by inhibiting DNA repair⁶² or by promoting inflammation.⁶

A strong induction of oxidative stress with HNE formation in advanced stage cancer cells using natural and chemical drugs is a therapeutic strategy to trigger apoptosis.⁴⁷ However, the acquisition of high antioxidant defense by cancer cells can also be a limiting factor for radiotherapy and chemotherapy. The use of a combination of drugs that target cancer cells and break down their antioxidant defenses can be a promising strategy to specifically induce cell death in cancer cells.⁴⁷

Diseases occurring due to oxidative stress notably involve cell death processes, such as apoptosis. Our goal here is to focus on the HNE regulation of cell death/survival, related to oxidative stress-dependent disorders. These relationships are complex. First, apoptosis can be mediated by different pathways and is not the only process of the induction of cell death. Second, HNE has dose-dependent effects, and the consequences on the cell are strongly modulated by the ability of the oxidative stress defenses to metabolize HNE. Lastly, based on the intrinsic nature of the cells, their responses regarding HNE could be multiple and in favor of the emergence of pathologies.

HNE: a Serial Killer

Apoptosis is a major pathway of cell death characterized by cell shrinkage, cell surface blebbing, chromatin condensation

and DNA fragmentation. It is an active and programmed cell death that occurs via two main pathways: the extrinsic pathway, also called 'death receptor pathway' and the intrinsic pathway or 'mitochondrial pathway'. HNE can directly induce apoptosis but it can also be a mediator of apoptosis, as it can be generated by ROS (hydrogen peroxide), heat stress,⁶³ UVA irradiations⁶⁴ and pro-oxidant compounds like ethanol.⁶⁵

HNE induces the extrinsic apoptotic pathway. The extrinsic apoptotic pathway transmits a death signal from the cell surface to the intracellular compartment and is initiated by the activation of death receptors like receptors of TNF, Fas/CD95 or TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand). Basically, the canonical signaling pathway involves the binding of their respective cytokines (TNF α , Fas Ligand (FasL), TRAIL), which triggers the aggregation of the receptors and the recruitment of adaptator proteins leading to the activation of initiator caspases (8 and 10). Executioner caspases (3 and 7) are then activated, promoting the cleavage of many substrates contributing to the execution of apoptosis, but the recruitment of the signaling proteins is dependent on the nature of the death receptor. As a relevant example for HNE-mediated apoptosis, the binding of FasL on its receptor Fas triggers its aggregation that leads to the formation of DISC (death-inducing signaling complex) involving the adaptator protein Fas-associated protein with death domain (FADD) and pro-caspase 8/10.⁶⁶ The promiscuity of all these proteins triggers the activation and the autocatalytic cleavage of caspase 8/10. Consequently, the caspase-dependent cascade leads to apoptosis.

In the case of the impact of HNE on the extrinsic pathway, in the eye, it promotes the expression of Fas, allowing a sensitization of the lens epithelial cells to apoptosis when FasL is present in the microenvironment as a soluble cytokine or expressed on the neighboring in cells' membrane as a transmembrane form. The induction of Fas by HNE is associated with JNK activation and apoptosis induction⁶⁷ but the modalities of Fas transcriptional regulation are still to be established. The links between HNE and Fas are of interest because they rely on physiological levels of HNE. One strategy to modulate basal HNE concentrations has been developed by the Awasthi's group, based on the over-expression or the downregulation of GSTA4, the main HNE-detoxifying enzyme. When human GSTA4 was over-expressed in lens epithelial cells, the levels of HNE decreased and Fas was strongly downregulated.⁶⁸ Moreover, when GSTA4 was downregulated or invalidated *in vivo* in mice, the levels of HNE were increased⁶⁸ and Fas expression was induced.⁶⁷ The basal levels of HNE in the cell can then contribute to their sensitivity or their resistance regarding FasL stimulation or even HNE. For this latter point, it is worth noting that Fas-deficient lens epithelial cells are resistant to HNE-induced apoptosis according to the mechanism detailed below.

The main pathway of Fas-signaling activation by HNE appears to be DISC-independent^{67,69} (without caspase 8 and FADD). Indeed, HNE can induce Fas-dependent apoptosis in pro-caspase 8-deficient Jurkat cells.⁶⁹ The hypothetical mechanism can be dependent on the capacity of HNE to form protein adducts. The HNE-adduct formation with a

membrane receptor could mimic ligand-cell surface receptor binding, which could then activate the related-signaling pathway. This model was proposed for EGFR (epidermal growth factor receptor) or PDGFR.²³ Fas is a death receptor with a cysteine-enriched extracellular domain and HNE has been shown to form adducts with Fas *in vitro*.⁶⁹ The binding of HNE on Fas seems primordial, as cell pretreatment with a Fas antagonizing antibody induces resistance to apoptosis triggered by HNE.

HNE activation of Fas without DISC involvement is enabled by the downstream activation of ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1), JNK and caspase 3. Interestingly, HNE also activates a negative feedback on Fas activation, by a mechanism involving Daxx (death domain-associated protein). Daxx is a nuclear protein which is associated with DNA-binding transcription factors involved in stress response and known to repress their activities.⁷⁰ After its export from the nucleus to the cytosol, it can interact with Fas. The pathway involving ASK1, JNK and caspase 3 is then inhibited and leads to the repression of apoptosis.⁷¹ Daxx silencing induces an exacerbation of the HNE-induced apoptosis suggesting the prominent role of Daxx as a negative regulator of apoptosis, thus avoiding massive cell death.⁶⁹ In 2010, the Awasthi's team demonstrated that HNE induced both expression of Fas and Daxx. HNE can create covalent links with Daxx via some histidine residues, and in this way increase its export from the nucleus to the cytoplasm. The Fas-Daxx binding could have a negative effect on the ASK1-JNK signaling pathway and apoptosis induction. These mechanisms could be relevant for apoptosis induction by oxidative stress. If the stress is moderate, the couple Daxx-Fas limits apoptosis induction, whereas if the oxidative stress is massive, the pathway mediated by Fas-ASK1 and JNK is major and triggers massive cell death. Taking into account that HNE is diffusible, this negative loop can preserve the tissue integrity, as has been observed *in vivo*.⁷² This self-regulatory function for Daxx has also been described in Fas-dependent apoptosis after UV- and doxorubicin treatments, conditions that are commonly associated with oxidative stress. However, the role of Daxx as an apoptosis regulator is still controversial.⁷⁰ On the contrary, some studies demonstrate that Daxx binding on Fas promotes cell death: the process being independent of DISC formation.⁷³ The differences in Daxx activity as a pro- or an anti-apoptotic factor can arise from the fact that Daxx has a role both in the cytosol and in the nucleus. The complexity of its regulation can also depend on the cell types and the relative importance of Fas and JNK pathways. Lastly, contributing to the negative feedback of apoptosis regulation, it has also been shown that HNE treatment induces the downregulation of pro-apoptotic-associated genes such as IER3 (immediate early response 3), TRAF3 (tumor necrosis factor- α receptor-associated factor 3) in RKO human colorectal carcinoma cells,⁷⁴ CAD (caspase-activated DNase), FAST K (Fas-activated serine/threonine kinase) and DFF45 (DNA fragmentation factor 45) in ARPE-19 human retinal pigmented epithelium cell line.⁷⁵

HNE-induced extrinsic apoptosis has been described in various cell models, and especially in human eye epithelial cell lines (HLE-B3 and ARPE-19) and leukemia cell lines (Jurkat, CRL2571). These models are very relevant from a clinical

point of view. Retina is one of the organs most sensitive to HNE, first, because of the high consumption of oxygen by photoreceptors that generates high levels of ROS, and because its membranes contain one of the highest percentages of PUFAs. The pathways by which HNE induces apoptosis are relevant for understanding retinal damage and vision degradation in retinopathies.⁷⁶ In the case of leukemia cells and HNE-induced extrinsic apoptosis, numerous studies have shown that patients at all stages of illness present an abnormally elevated oxidative status,⁷⁷ whereas elevated ROS levels have been detected in chronic and acute myeloid malignancies. The efficacy of molecules with therapeutic potential, such as dithiolethione,⁷⁸ was shown using HNE as a potent oxidative stress mediator in derived leukemia cell lines. These preventive strategies are based on HNE scavenging or on an improvement of cell detoxification regarding HNE (see last part of this review). The extrinsic apoptotic pathway mediated by HNE is summarized in Figure 2.

HNE induces the intrinsic apoptotic pathway. The intrinsic apoptotic pathway, also called the mitochondrial pathway, is the major apoptotic pathway highly conserved in vertebrates. Mitochondria have the capacity to integrate the pro-apoptotic signals from a large panel of extra- and intracellular stimuli (oxidative stress, starvation, radiation, DNA damage and toxins). These signals lead to mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP), which results in the release of different factors from the inter-membrane space into the cytosol. Depending on the nature

of the released pro-apoptotic factors, the mitochondria trigger caspase-dependent or caspase-independent apoptosis. The release of cytochrome c (cyt c) leads to the formation of the apoptosome, with the cytosolic proteins APAF1 (apoptosis protease-activating factor-1) and the initiator caspase 9. This complex initiates the autocatalytic cleavage of caspase 9, its activation and the subsequent cleavage of executioner caspases such as caspases 3, 6 and 7. In the cytosol, some endogenous caspase inhibitors like IAP (inhibitor of apoptosis protein) prevent caspase activation. The mitochondrial release of the proteins Smac/Diablo (second mitochondrial activator of caspases) and Omi/htrA2 prevents XIAP (X-linked IAP) activity and by this means mediates caspase activation. Mitochondria are also major actors in caspase-independent apoptosis. This process also involves MOMP but the release of killer proteins like AIF (apoptosis-inducing factor) and endonuclease G from the mitochondria to the nucleus triggers a caspase-independent DNA fragmentation.⁷⁹

There are some examples showing that HNE can induce mitochondria-dependent apoptosis: mouse leukemic macrophage cell line⁸⁰ exposed to HNE show the classical hallmarks of intrinsic apoptosis such as anti-apoptotic protein downregulation, pro-apoptotic protein upregulation, cyt c/AIF release and DNA fragmentation. During muscle cell apoptosis in age-related sarcopenia, the increase in HNE generation leads to anti-apoptotic protein inactivation and JNK and caspase 2/9 activation.⁸¹ The same observation was made in the RKO colon cancer cell line⁸² and in the PC12 neuronal cell line.⁸³

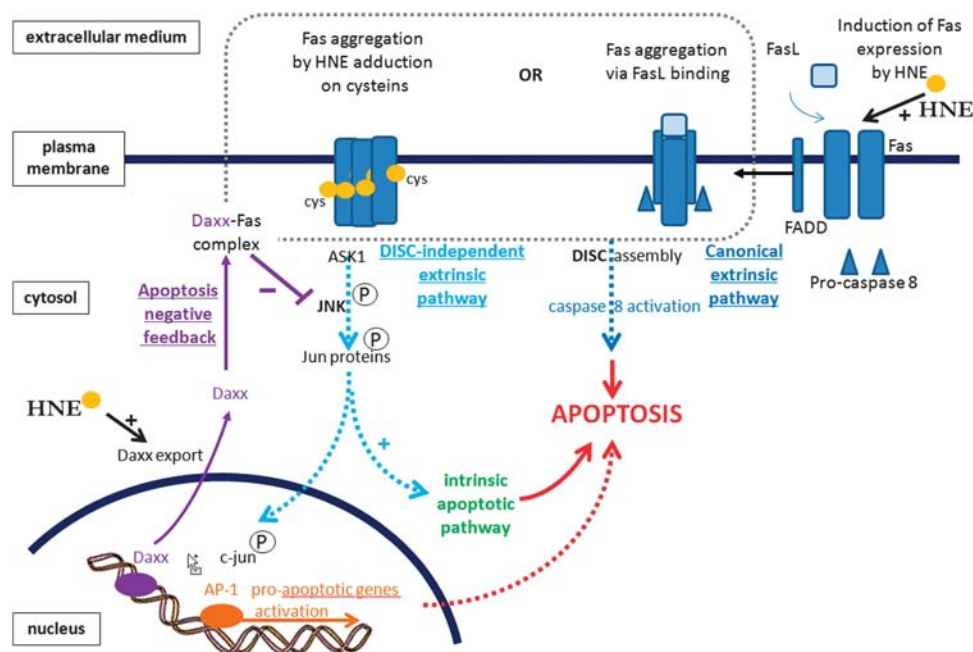


Figure 2 Main extrinsic apoptotic pathway induced by HNE and Daxx-dependent-negative feedback. Extrinsic cell death can be mediated by Fas receptor, via the induction of Fas expression at the membrane or the direct binding of HNE on Fas, leading to its aggregation, independent on FasL and DISC formation. This latter process involves the ASK1/JNK pathway triggering AP-1-dependent transcription. In purple is represented the negative feedback with Daxx, modulating Fas-apoptotic signal. AP-1: activator protein 1; ASK1: apoptosis signal-regulating kinase 1; Daxx: death domain-associated protein; FADD: Fas-associated protein with death domain; FasL: Fas ligand; HNE: hydroxynonenal; and JNK: c-Jun N-terminal kinase

The early events upstream of mitochondria targeting are diverse and are highly dependent on the initial stimulus. Cardiomyocytes treated with physiological concentrations of HNE show a progressive depletion in their mitochondrial bioenergetic reserve that leads to respiratory failure and cell death. This pathway is supposed to be important in myocardial pathologies where HNE could contribute to tissue damage by the increase in oxygen consumption, the subsequent mitochondrial failure and finally the depletion of energetic capacity.⁸⁴ In cultured hippocampal neurons, HNE exposure can cause impairment of ATPase activities and a subsequent abnormal increase in $[Ca^{2+}]$. This disruption acts as an apoptotic signal. Whatever the apoptotic stimulus, the Bcl2 (B-cell lymphoma 2) protein family has the role of an integration crossroad. Some of Bcl2 family members are pro-apoptotic: Bax, Bak and the BH3-only proteins like Bid; whereas others are anti-apoptotic such as Bcl2, Mcl1 or Bcl-xl. The balance between these pro-apoptotic and anti-apoptotic factors determines the fate of the cell. Upon a stress signal, the pro-apoptotic Bax and Bak proteins multimerize and are inserted into the mitochondrial outer membrane, forming pores at the origin of the MOMP. The phosphorylation of Bcl2 at its interaction site with the other members can modulate its activity. HNE has recently been shown to stabilize the interaction between Bcl2 and IKK (inhibitor of kappa B ($I\kappa B$) kinase). The IKK is then able to phosphorylate Bcl2 on its critical site, thereby altering its anti-apoptotic function.⁸⁵

Moreover, HNE can directly affect mitochondrial integrity. Mitochondrial membranes contain a critical phospholipid called cardiolipin. Cardiolipin oxidation by cyt c can produce HNE.⁸⁶ It has been shown that cardiolipin oxidation is necessary for the subsequent steps of intrinsic apoptosis. It activates MOMP and enables the activation of apoptogenic Bcl2 proteins. Finally, HNE can directly affect the cellular redox status by depleting GSH, which can then induce a mitochondrial crisis with mitochondrial ROS production⁸⁷ and subsequent activation of caspases.⁸⁸ HNE-induced apoptosis can then be prevented by mitochondrial respiratory chain inhibitors such as rotenone or stigmatellin.⁸⁹

The intrinsic apoptotic pathway activated by HNE is summarized in Figure 3.

HNE and JNK activation during apoptosis. Depending on the cell type, HNE-induced apoptosis can involve both extrinsic and intrinsic pathways, but the respective contribution of the two pathways remains elusive. However, there is some evidence to show that strong JNK activation is a common step in HNE-induced programmed cell death.⁹⁰

Generally, JNK is known to have a central role in both intrinsic and extrinsic pathways. This kinase belongs to the mitogen-activated protein kinases (MAP kinases) family and can be activated in response to diverse stimuli such as oxidative stress, lipopolysaccharides, TNF α or endoplasmic reticulum (ER) stress. After being activated by phosphorylation, JNK can translocate to the nucleus and then transactivate transcription factors (c-jun and c-myc) that regulate the expression of pro-apoptotic genes such as FasL, Bak and TNF α .⁹¹

HNE was shown to interact directly with JNK by forming adducts. This leads to nuclear translocation of JNK in human hepatic stellate cells.⁹² Moreover, HNE-induced apoptosis in neuronal PC12 cells is clearly mediated by the JNK pathway and not by other MAP kinases p38 or ERK pathways.^{93,94} In sympathetic neurons, the specific neuron-associated JNK3 is activated during HNE-induced apoptosis. This is accompanied by c-jun phosphorylation and these effects can be suppressed in JNK3-deficient neurons.⁹⁵ The pretreatment of leukemic cells with JNK inhibitor makes these cells resistant to HNE-induced apoptosis.⁶⁹ Finally, well-known antioxidant molecules like resveratrol and piceatannol prevent HNE-induced apoptosis by blocking the JNK pathway and subsequently c-jun phosphorylation and AP-1 signaling.^{96,97} Further experiments should be carried out in order to evaluate the role of JNK in HNE-induced apoptosis to clarify the orientation of the cell death pathway: extrinsic pathway by the regulation of c-jun/AP-1 signaling or intrinsic pathway by modulation of mitochondrial proteins.

HNE and p53: relationship between genotoxicity and cell death. Tumor protein 53 (p53) is a tumor suppressor and a transcription factor that regulates gene expression related to the cell cycle, DNA repair and apoptosis. p53 is activated upon DNA damage and oxidative stress to protect and repair the cell, but if the stress or damage reach a threshold, p53 triggers cell death.

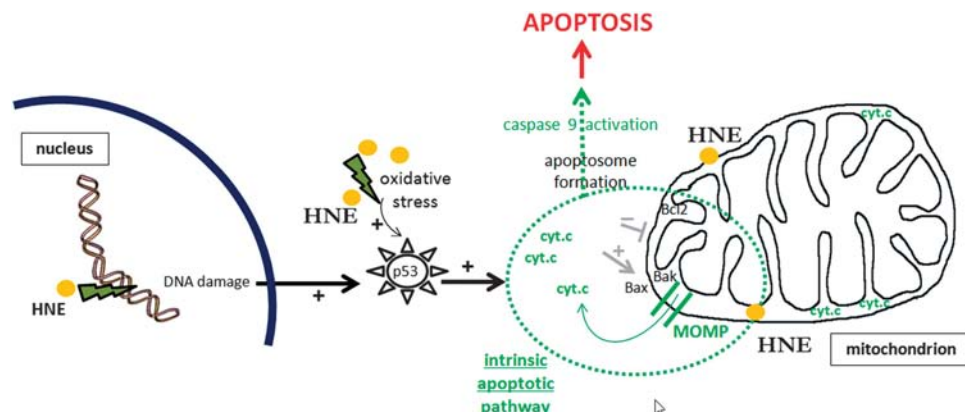


Figure 3 Intrinsic apoptotic pathway is induced by oxidative stress, p53 and mitochondrial membrane disturbances. cyt.c: cytochrome c; HNE: hydroxynonenal; and MOMP: mitochondrial outer membrane permeabilization

Sharma *et al.*⁹⁸ showed that exogenous HNE results in the phosphorylation of p53 (on Ser 15) and its nuclear translocation in retinal epithelial cells. Such activation is involved in apoptosis induction. On the other hand, the simple accumulation of p53 in HNE-treated mouse macrophages was not associated with apoptosis induction.⁸⁰ As the degradation of p53 is proteasome-dependent and as HNE is able to inhibit proteasome activity,²⁰ one may suggest that p53 accumulation is the result of defective proteolysis rather than an active stabilization of p53. Moreover, HNE is known to be genotoxic^{99,100} and the activation of p53 upon HNE-mediated DNA damage appears relevant in a context of apoptosis, to trigger the expression of Bax, caspase 3 and inhibit Bcl2.

A recent study has examined the conformational modifications of p53 in NDD.¹⁰¹ It showed that the formation of HNE-p53 adducts did not affect the native conformation of p53, unlike nitration. The nitrated and so unfolded p53 directly decreases its pro-apoptotic activity and favors the survival of damaged neurons. Therefore, in this study, HNE adduction did not have a major impact on p53 function but could constitute an aggravating factor.

On the contrary, as p53 is a master regulator of the anti-oxidative response, it can directly act on HNE-induced toxicity: a study performed on p53 (–/–) mice brains showed that the lack of p53 reduced endogenous HNE levels and protein adduction.¹⁰² Consequently, p53 should be involved in the generation of HNE and this positive feedback can have a major role in NDD in which the levels of p53 bound to HNE are elevated and correlated to neuronal cell death.¹⁰³

Other Pathways of Cell Death: One Killer, Several Weapons

HNE-induced apoptosis appears to be caspase-dependent. However, cells treated with caspase inhibitors such as z-VAD-FMK or DEVD-FMK do not present a completely rescued phenotype,¹⁰⁴ suggesting the involvement of caspase-independent apoptotic mechanisms.

Calpain-mediated cell death. Intracellular Ca^{2+} levels are tightly regulated and Ca^{2+} is stored mainly in the ER and mitochondria under normal conditions. ROS attack can lead to the loss of ER membrane integrity, which is associated with a release of Ca^{2+} into the cytoplasm. Thus, lipid oxidation and notably through HNE, can be a signal for Ca^{2+} mobilization¹⁰⁵ and subsequent calpain activation. Calpain is a Ca^{2+} -dependent protease, located in the cytosol as an inactive precursor. In response to increased levels of cytosolic Ca^{2+} , it translocates to the intracellular membranes and is activated by autocatalytic hydrolysis. Heat shock protein 70 (Hsp70), a chaperone protein and α -fodrin, a structural cytoskeletal protein, are known to be common substrates for calpains. Calpain-dependent Hsp70 cleavage is associated with lysosomal membrane permeabilization (LMP), which leads to the release of proteases called cathepsins into the cytoplasm, then triggering cell death. Actually, it has been shown that HNE induces α -fodrin cleavage¹⁰⁶ and also the upregulation of Hsp70 expression and its carbonylation.^{69,107} This post-translational modification is necessary for its cleavage by calpain, suggesting

the participation of calpains in the cell death cascade.¹⁰⁷ This link is still to be clearly established.

ER stress, proteasome inhibition and apoptosis induction. Because of its propensity to aggregate with proteins in the cell, HNE triggers the accumulation of protein aggregates in the cell that can overcome the proteasome. This can be amplified by a direct inhibition of proteolytic subunits: specific subunits of the 20S proteasome are targeted by HNE and the thus modified proteasome has impaired peptidase activity.^{20,108}

Moreover, ER stress and the activation of the unfolded protein response (UPR) are triggered when the ER is overwhelmed and cannot manage the processing and the folding of newly synthesized proteins and the elimination of unfolded or misfolded proteins. In atherosclerotic plaques, the protein modifications by LPO secondary products like aldehydes affect protein conformation and their activities. The accumulation of misfolded and undergraded proteins can lead to ER stress. If the ER stress is prolonged, it can turn into apoptosis induction. HNE was described as inducing ER stress and an UPR in human endothelial cells that had HNE-adducts with proteins colocalizing with ER.¹⁰⁹ These adducted proteins directly affect ER function, especially protein disulfide isomerase.¹¹⁰ In support of this idea, it was shown that the folding of protein to allow optimal formation of disulfide bonds is highly redox-dependent in the ER.¹¹¹ Thus, the accumulation of misfolded proteins with HNE-adducts in ER could compromise cell survival. The UPR is an adaptive process but the non-re-establishment of cell homeostasis strongly compromises tissue integrity and can initiate or promote pathologies.

Necrosis. To understand the effects of HNE, it is necessary to highlight the importance of the doses tested in each experiment. In the experiments of Chaudhary *et al.*¹⁰⁷ on HepG2 cells exposed to 5–40 μM of HNE, the cells died by apoptosis, but the same cells exposed to 80–100 μM HNE underwent necrosis, a non-programmed and deleterious form of cell death in which organelles are damaged and the plasma membrane disrupted. Respectively 31.8% of the cell population that was exposed to 80 μM HNE and 55.4% for the 100 μM HNE treatment died by necrosis. Similarly, necrosis is induced by HNE at 100 μM in HeLa cells¹¹² as well as in colorectal cell lines. All these *in vitro* data suggest a dose-dependent effect of HNE, with the induction of apoptosis at low doses and necrosis induction at high doses. The level of antioxidant defense has also to be taken into account (see chapter 7). However, because of the difficulty of quantifying free HNE *in vivo*, the data are limited concerning the possibility that such high concentrations of HNE could be reached *in vivo* and notably in oxidative stress-related pathologies.¹⁰

Iron-regulated cell death. Among the emerging cell death pathways closely related to HNE, iron-regulated cell death carves out a growing place. Ferritin is a protein involved in iron storage. The endocytosis of ferritin into lysosomes induces the release of free redox active Fe^{2+} which promotes ROS formation and subsequent lysosomal LPO.

This generation of HNE leads to LMP. HNE-adducts were also detected in the cytosol, suggesting the spreading of LPO from the lysosome to the cytosol. Moderate LMP can result in apoptosis, whereas the total loss of lysosomal integrity triggers necrosis.¹¹³ However, the involvement of HNE in the balance of apoptosis/necrosis has to be reconsidered in the light of the recent studies on a new iron-regulated cell death mechanism called ferroptosis.¹¹⁴ This newly identified route of cell death is dependent not only on iron metabolism but also on fatty acid synthesis and cystine transport (involved in GSH synthesis). All these processes can be directly linked to HNE generation and to its detoxification-induced pathways. That is why further studies should be carried out to establish the importance of HNE in the cell sabotage leading to cell death.¹¹⁵

HNE Self Limits Apoptosis: Keeping Cool Under Pressure

Interestingly, HNE induces apoptosis but also initiates mechanisms that attenuate it. In respect to this latter aspect, the work by Jacobs and Marnett¹¹⁶ is particularly relevant. They demonstrated that the treatment of the RKO colorectal cancer cell line with HNE leads to a dose-dependent activation of HSF1 (heat shock factor 1), a transcription factor that protects cells against stress insults such as heat shock and oxidative stress. After HNE exposure, HSF1 is translocated from the cytoplasm to the nucleus and reduces HNE-induced apoptosis. The underlying mechanisms were identified by siRNA and overexpression, and they can be summed up as follow: first, HNE triggers the release of HSF1 from the regulator chaperones Hsp70 and Hsp90 (heat shock proteins), allowing its translocation to the nucleus. HSF1 activates the transcription of genes containing HSE (heat shock responsive element) via their promoters, such as Hsp40 and Hsp 70.1; the induced Hsp attenuates JNK-dependent apoptosis signaling and stabilizes Bcl-xL. The protective activation of HSF1 in HNE-induced apoptosis was also confirmed in HepG2 cells.¹⁰⁷ Further experiments have demonstrated that the stabilization of Bcl2 anti-apoptotic proteins (like Mcl1, Bcl-xL and Bcl2) is dependent on the induction of BAG3 (Bcl2-associated athanogene domaine 3) that interacts with Hsp70 and Bcl-xL.¹¹⁷ The degree of protection gained by this pathway is thought to be superior to the protection afforded by the detoxification pathways like Nrf2.¹¹⁶

HNE Assault: The Choice to Stay Alive... Under Conditions

HNE as a cell cycle brake. The cell cycle is traditionally divided into four phases: G1, S, G2 and M, with a particular status for G1 cells, which can enter a resting state called G0. These quiescent cells represent the major part of the non-growing, non-proliferating cells in the organism. The transition from one cell cycle phase to another is regulated by CDK (cyclin-dependent kinase). Specific cyclins/CDK couples constitute checkpoints at each step of the cell cycle, and are influenced by pro-mitotic factors (like cdc25) and anti-mitotic factors (like cyclin-dependent

kinases inhibitors). For an exhaustive review see Vermeulen *et al*.¹¹⁸

Several large scale studies performed using microarrays show that HNE is able to downregulate cell cycle promoting genes such as cell division cycle homologs (cdc20, cdc25), cyclins (A2, B1, B2, D1, F and K), topoisomerase II α , DNA polymerase δ , TGF α .^{74,75} HNE also upregulates some cell cycle-arresting genes such as Gadd34 (growth arrest and DNA damage) or cyclin G2.⁷⁴ However, the induction of cell cycle arrest by HNE has been known for a long time.^{119,120} In HL60 cells, the way to limit HNE toxicity also seems to be based on the ability to stop cell cycle arrest in G0/G1 via the inhibition of cyclins D1, D2 and A and the hypophosphorylation of retinoblastoma protein (Rb). In 1998, Esterbauer *et al*.¹²¹ showed that treating the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* with HNE resulted in its temporary arrest in G1 phase. More recently, in prostate PC3 cells, HNE treatment was shown to trigger cell cycle arrest in G2/M, with dephosphorylation of cdc2.¹²² Finally, we have previously seen that HNE can self-limit its apoptosis by modulating Daxx activity.⁶⁹ Moreover, Daxx is also known to interact with cell cycle regulatory proteins like HSF1, smad4 or p53.¹²³ We can hypothesize that a Daxx-dependent-negative loop on HNE-induced apoptosis can also be dependent on the direct effect of Daxx on the cell cycle.

This ability of HNE to slow down cell proliferation at apoptosis-inducing concentrations can be interpreted as an alternative route to apoptosis, a possibility for slightly damaged cells attain self-rescue survival and for the tissue to maintain homeostasis in case of low grade injury.

Senescence. HNE-adducts are accumulated with aging *in vivo* and *in vitro*.^{124,125} Senescence is a process associated with aging. Senescent cells are metabolically active cells in which growth is arrested in transition between the G1 and S phases. As senescent cells, these cells can no longer replicate, cannot re-enter the cell cycle and are characterized by shorter telomeres. Telomeres are repetitive sequences localized at the end of eukaryotic chromosomes. The synthesis of telomeric repeats is necessary for DNA replication and is ensured by a ribonucleoprotein called telomerase, only expressed in regenerative tissues. The length of telomeres decreases at each cell cycle division and constitutes a marker of somatic cell aging. Telomerase activity is reported to be reactivated during carcinogenesis and cancer cells escape senescence.¹²⁶

It is well-described that oxidative stress accelerates telomere loss due to a decrease in telomerase activity *in vitro*.¹²⁷ It has been reported that HNE (at non-lethal low doses) can downregulate expression of hTERT (human telomerase reverse transcriptase), the catalytic subunit of human telomerase, in leukemia cells and colon cancer cells. More precisely, HNE inhibits c-myc (an activator of the hTERT promoter) and activates Mad1 (a repressor of the hTERT promoter).¹²⁸ Moreover, the activity of hTERT upon HNE exposure was also studied in endothelial cells isolated from patients with coronary artery disease. In this study, chronic treatment with NAC (an HNE scavenger and also a cysteine supplier for GSH synthesis¹²⁹) led to a decrease in HNE levels and an activation of hTERT.¹²⁵

Telomere shortening is a main cause of cellular senescence but very few studies have been done to characterize HNE-induced senescence, independently of its action on telomeres. This alternative pathway of senescence is characterized by the activity of β -galactosidase in the cytoplasm, the expression of cell cycle regulatory proteins p16 and p21 and the hypophosphorylation of Rb. Very recent experiments have characterized HNE-induced senescence in the development of atherosclerotic lesions in the blood vessels. HNE is secreted by activated macrophages and then induces senescence in vascular endothelial cells.¹³⁰ Senescence will be of a great interest in the future as a major HNE-mediated aging mechanism.

Autophagy. Autophagy is a process that governs catabolic reactions and especially the clearance of long-lived proteins and organelles. It is characterized by autophagosome formation when the edges of the membrane initially fuse together to generate a large vacuole containing diverse macromolecules and cellular structures that will fuse with lysosomal membranes. This leads to the degradation of the contents of the autophagic vacuole.

After oxidative stress and HNE generation, the HNE-protein Michael-adducts are accumulated in the cell, and autophagy is a mechanism by which such defective proteins can be degraded. In vascular smooth muscle cells (VSMC), HNE was shown to induce autophagy (50 μ M for 30 min). This was characterized by cellular ultrastructural changes (identified by electron microscopy) and by the increase in LC-3-II levels (microtubule-associated protein 1 light chain 3 under the phosphatidylethanolamine-conjugated activated form).¹³¹ Such an induction could be dependent on mTOR inhibition through yet still unknown mechanisms. However, it appears that the inhibition of autophagy can trigger apoptosis, which supports the fact that autophagy is probably a defense system for survival.

Finally, the case of age-related macular degeneration is interesting because of the high specificity of the retinal pigment epithelium (RPE). This tissue is the site of high and permanent oxidative stress because the cells are prominent oxygen consumers and exposed to light. When LPO is high, it increases HNE adduction to proteins,¹³² among which are proteins of the photoreceptor outer segments (POS). HNE-adducted POS proteins are much less degraded by lysosomes and global proteolysis is decreased in RPE cells. Regarding that point, Krohne *et al.*¹³³ have demonstrated that HNE-adducted POS directly reduces autophagy in RPE cells, leading to apoptosis induction.¹³⁴

Therefore, VSMC exhibit a more adaptive capacity to survive HNE and oxidative stress than RPE cells.¹³⁵ Retinal cells cannot sustain autophagy during massive LPO and finally die. In this context, autophagy is clearly a defense mechanism against HNE-protein adducts to maintain cell survival.

The Battle of Wills Between Detoxification and Death

For HNE, the balance between cell death and cell survival is largely dependent on the cells' abilities to cope with oxidative stress and especially to detoxify HNE.

Nrf2 and the antioxidant defense. *Nrf2* is a master gene of antioxidant response. Under normal conditions, Nrf2 is in the cytosol, complexed with its inhibitor, Keap-1 (Kelch-like ECH-associated protein 1), which is an oxidant sensor. Cullin 3 ubiquitin ligase is attached to Keap-1 and is responsible for conjugating ubiquitin molecules to Nrf2, giving the signal to proteasome to degrade Nrf2 consecutively.¹³⁶ In the presence of HNE, adducts on cysteines are formed in Keap-1 protein. This modifies the affinity of Keap-1 for Nrf2, which induces the release of Nrf2 and its export to the nucleus.^{137,138} The nuclear Nrf2 recognizes consensus *cis* sequences called EpRE (electrophile response element) sequences. These sequences are present in the promoter region of genes coding for a great number of detoxification enzymes. Nrf2 can also form a heterodimer with c-jun and act independently or in synergy to activate antioxidant gene expression.¹³⁹ The main genes which are regulated by Nrf2 are those that code for HO-1, NQO1, xCT (glutamate/cystine transporter), GCL, GSTs, ALDH, thioredoxin reductase 1 (Trx1) and AKR.¹³⁶

Nrf2 is a major sensor of oxidative stress, and the disruption of Nrf2 abrogates antioxidant signaling, leading to the accumulation of HNE.¹⁴⁰ Its activation is protective against oxidative stress and aging in vascular cells.¹⁴¹ However, the Nrf2 pathway is also a way for cancer cells to survive in a pro-oxidant environment⁵⁷ and represents an important factor of resistance regarding chemotherapies in cancer.^{18,142}

Mechanisms of HNE detoxification. The half-life of HNE is less than 2 min. This short half-life underlines the importance of HNE detoxification as a cell defense system against HNE cytotoxicity.

The key enzymes involved in HNE metabolism are GSTs, ALDHs and AKRs. GSTs have a major role in HNE detoxification:¹⁴³ isoforms GSTA4–4 and GST5–8 have high catalyzing activity and allow the conjugation of HNE with the reduced form of glutathione. This favors GSH-HNE export outside the cell via RLIP76 (Rala-binding protein 16 encoded 76-kDa splice variant) and/or MRPs (see Figure 4). The conjugation of HNE to GSH is primordial to neutralize HNE reactivity with proteins but also with DNA.

The GSH-HNE conjugates can be metabolized by two types of enzymes. The ALDH superfamily contributes to their oxidation in 4-hydroxynonenoic acid (HNA)-lactone-GSH (HNA: 4-hydroxynonenoic acid), whereas the AKR superfamily contributes to their reduction in DHN-GSH (DHN: 1,4-dihydroxy-2-nonene). ALDHs have a prominent role. They can be downregulated in some disorders such as Parkinson disease. The recent study by Kong *et al.*¹⁴⁴ shows that ALDH1A1 is a major HNE-detoxification enzyme in PC12 cells. Its overexpression results in reduced HNE toxicity, and its inhibition is neurotoxic, with a high accumulation of HNE-protein adducts. Other isoforms of ALDH, such as mitochondrial isoforms (ALDH5A and ALDH2), can also be determinant in HNE-mediated cell death. ALDH5A was described as metabolizing HNE in the brain.¹⁴⁵ Finally, HNE itself can also be reduced by AOR (NAD(P)H-dependent alkenal/one oxidoreductase), and the generated metabolites (oxidized or not) can diffuse across the plasma membrane. xCT is the transporter subunit of the heterodimeric amino-acid

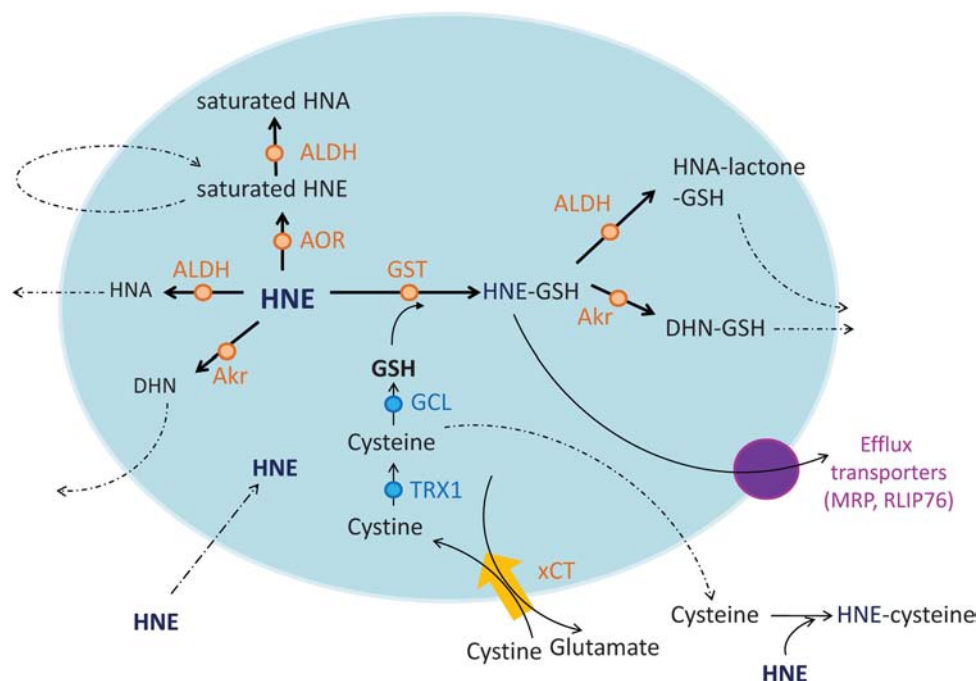


Figure 4 Putative pathways involved in HNE detoxification. The conjugation of HNE with glutathione by GST is the main step of detoxification. The renewal of cellular GSH pool is dependent on cysteine content, regulation by xCT. The oxidation pathway via ALDHs family is supposed to be activated when stress is moderate. The reduction pathway with AKRs family is thought to be activated in case of acute stress. 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: RalA-binding protein 16 encoded 76-kDa splice variant; and Trx1: thioredoxine reductase 1

transporter system xc-. It functions as an exchange transporter for cystine/glutamate, catalyzing the entry of cystine and the exit of glutamate at 1 : 1 ratio. Cystine is rapidly reduced by Trx into cysteine, which is the limiting substrate for GSH synthesis by γ -glutamylcysteine synthetase (γ -GCS) and GSH synthetase. Cells can also excrete cysteine to neutralize extra-cellular HNE by the formation of HNE-cysteine conjugates.¹⁴

The enzymes involved in HNE detoxification are essential in regulating its biological role, and it is worth noting that HNE can positively regulate its own metabolism by activating Nrf2. According to a consensus model, HNE consumes the bioavailable GSH in the cell during the detoxification process to form non-reactive GSH-HNE. The decrease in GSH levels in association with Nrf2 activation triggers GSH synthesis by a positive feedback mechanism.

Links between detoxification and cell death. The ability of HNE to form adducts with proteins is the major deleterious event it promotes. According to this, the extent of apoptosis is directly dependent on the yield of HNE-adducts that are accumulated in the cells.¹¹² These effects are absent when cells are pretreated with the HNE scavenger NAC. NAC acts as a precursor of GSH synthesis as well as a stimulator of the cytosolic enzymes involved in GSH regeneration. It mediates protection by direct reaction between its reducing thiol groups and ROS.¹⁴⁶ So a part of its anti-apoptotic activity could be due to its ability to modify the GSH/GSSG redox balance in the cell in favor of the reduced form. Indeed GSH/GSSG balance in favor of the oxidized species (that is, GSSG) constitutes an important signal that could decide the fate of a cell.¹⁴⁷ However, a large number of

HNE sequestering agents such as carnosine or carnitine, act only by inhibiting the formation of HNE-protein adducts with a preferential formation of nontoxic scavenger-HNE adducts.

GSH conjugation is dependent on GST activity. The silencing of GSTA4-4 in human osteoarthritic chondrocytes increases HNE-induced cell death.¹⁴⁸ On the contrary, HepG2 cells transfected with GSTA4-4 become resistant to HNE-induced apoptosis.¹⁴⁹ The protective effect of GST overexpression against HNE-induced cell death has been observed in numerous cell lines (leukemia cells, retinal and lens epithelial cells). These cells acquire enhanced capacities to eliminate HNE, even after a prolonged treatment.

The entry of cystine, mediated by xCT, is also crucial for detoxification and cell death. Ferroptosis cell death is notably dependent on xCT inhibition and iron-mediated oxidative stress (see 4.4). The involvement of HNE in this death process has still to be determined.¹¹⁴ In 2006, Li *et al.*¹⁵⁰ generated a murine transgenic cell line with stable expression of the AKR isoform AKR7A5. These cells were four times more resistant to HNE than the parental cell line. Similarly, Matsunaga *et al.*¹⁵¹ showed that stable transfection of AKR1C15 suppressed apoptosis induced by HNE in endothelial cells. All these data underline the importance of AKRs in the prevention of HNE-induced apoptosis.

Targeting the inhibition of ALDH isoforms also diminish the abilities of the cell to survive deleterious concentrations of HNE. On the contrary, the use of a pharmacological ALDH2 activator notably decreases HNE-adducts, prevents cell death and induces angiogenesis in human endothelial cells exposed to β -amyloid peptides.¹⁵² Finally, the cytosolic ALDH3A1

isoform, specialized in HNE-detoxification in the ocular tissue, ensures protection of the cornea in the case of UV-induced oxidative stress.¹⁵³

Finally, it is worth noting that detoxification, like apoptosis, mobilizes energy. The intrinsic bioenergetic reserve capacity is determinant for the cellular response.⁸⁴ That is why the basal level of antioxidant enzymes cannot be sufficient to tackle a chronic exposure to HNE. The induction of Nrf2 and the adaptability of the metabolic reserve directly impact on the cellular resistance regarding HNE assault. The new data about the involvement of Nrf2 in the metabolic reprogramming in cancer cells¹⁵⁴ open new perspectives concerning the regulation of antioxidant defenses in response to HNE but also about the global fitness of the cell after HNE exposure.

Discussion

HNE is a 'crossroads' molecule regulating signal transduction, gene expression, cell proliferation, stress-mediated signaling and cell death. However, the specificity of HNE is highly dependent on its concentration, the duration of exposure and the cell type. The threshold of oxidative stress tolerance is intrinsic to each cell type in a particular environment. At low concentrations (less than 5 μM), HNE has been reported to promote proliferation,¹⁵⁵ and a silent stimulation of antioxidant responses by low levels of HNE (hormesis) can be protective⁷² against more drastic assaults such as by carcinogens.¹⁴² At higher concentrations (20–100 μM), HNE causes

cell cycle arrest,^{120–122} disturbs differentiation^{156,157} and triggers cell death. The modalities of apoptosis induction pathways are governed by the inherent nature of the cell, prone or not to ROS generation, the level of antioxidant defense and the induction of HNE metabolizing enzymes (summarized in Figure 5).

However, precise methods for quantifying HNE are lacking *in vivo*. HNE is a highly reactive aldehyde and because of the multiplicity of its metabolites and adducts, we get just a trace of its presence and not the real value of its concentration in a free-reactive state. As an example, the *in vitro* data obtained in leukemia cell lines show that 15-fold higher concentrations of HNE are required to induce apoptosis in primary leukocytes.¹⁵⁸ We can conclude that primary cells are more resistant to HNE but we can also speculate as to whether the methods of cell culture modify the intrinsic antioxidant responses and the sensitivity toward HNE.

The pleiotropy of HNE targets (death receptors, mitochondria, p53 and transcription factors) makes it a real cell signaling molecule. Moreover, its half-life is longer than ROS such as H_2O_2 or $\text{O}_2\cdot^-$; HNE is therefore a good signal propagator that leads to the cellular sabotage, fatal for cells. Interestingly, physiological levels of HNE are also able to affect the expression of genes involved in cell adhesion, cell cycle control, proliferation, cell growth and apoptosis.¹⁹ Thus, we should consider not only intracellular HNE concentrations after diverse stimuli/exposure but also the basal level inherent to the cell.

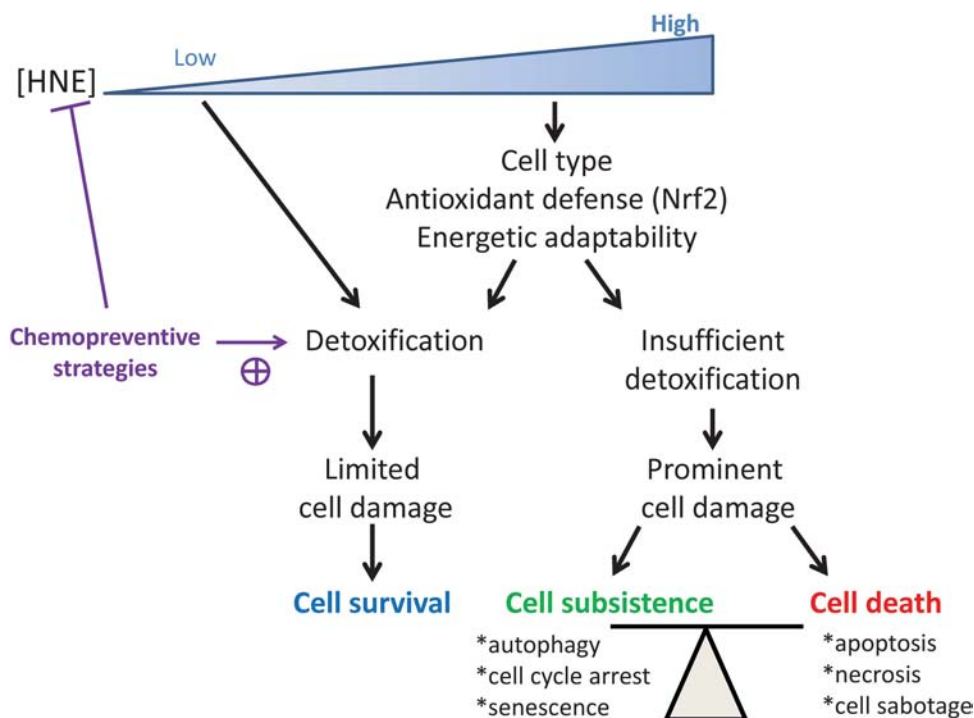


Figure 5 Summary of cell fate upon HNE exposure. When a cell is exposed to a low dose of HNE, HNE can be removed by detoxification processes and the viability is not compromised. Upon a high dose of HNE, the response will depend on the capacity of the cell to eliminate HNE by detoxification. This capacity is controlled by three parameters: the cell type, the antioxidant defense (notably Nrf2) and the energetic adaptability. If the damages are important, the cells can only 'subsist' by autophagy; senescence or cell cycle arrest. Otherwise, cell death is induced according to different pathways like apoptosis, necrosis or atypical cell death, sum up as 'cell sabotage'. Chemopreventive strategies can directly target the detoxification process to eliminate HNE or directly prevent its formation. Nrf2: nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2

To go further down this road: under physiological conditions, linked to oxidative stress, HNE levels have been shown to positively correlate with aging, and may be responsible for various aging-related diseases (cancer, NDD, macular degeneration and atherosclerosis) through DNA and protein damage. Therefore, HNE is a key target for the chemoprevention of these pathologies. Several strategies are possible: decreasing the exposure to pro-oxidant inducers, quenching the HNE-generating ROS or increasing the detoxification capacity of the cells. The overexpression of SOD (superoxide dismutase) or catalase, the use of natural antioxidants (vitamin C, vitamin E and β -carotene) or an increase in GSH synthesis have positive impacts on cellular protection. The improvement of cellular defenses is a relevant topic, with the use of natural compounds such as curcumin, sulforaphane, resveratrol or with chemical compounds such as tBHQ (tert-butylhydroquinone). They notably target the Nrf2 pathway.

To extend lifespan, a decrease in oxidative stress is recommended, by improving ROS and LPO sensing and maximizing the cellular antioxidant defenses.¹⁵⁹ High-calorie diets (high fat and high carbohydrates) are linked to a high oxidant status in the organism, and recommended calorie restriction involves a decrease in total caloric intake while maintaining adequate nutrition, to extend the lifespan or improve health. Some enzymes, like HSP70, HO-1 or TRX1, involved in HNE detoxification belong to the vitagenes, a group of genes involved in the adaptation to oxidative stress and allow a greater resistance to long-lived animals.¹⁵⁹ They are also regulated by Nrf2, which appears as a key protein in longevity.¹⁶⁰ However, a chronic low level of HNE appears to be positive for longevity by continuously stimulating Nrf2 and antioxidant defense.⁷² Therefore, the links between HNE, detoxification pathways and diseases constitute a vast area of research for the understanding and the prevention of the major diseases of public health.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements. We thank Dr. Cecile Hélie-Toussaint, Dr. Dominique Lagadic-Gossmann, Dr. Anthony Lemarié, Dr. Fabrice Pierre, Dr. Sylviane Tâché and John Woodley for critical reading and English corrections of the manuscript. Research in authors' laboratory is supported by grants from the Agence Nationale pour la Recherche (ANR SecuriViande); Ligue Régionale Midi-Pyrénées (contre le Cancer) and Institut National du Cancer (INCA NeoMeaTox).

- Schaub RJ. Basic aspects of the biochemical reactivity of 4-hydroxynonenal. *Mol Aspects Med* 2003; **24**: 149–159.
- Duryee MJ, Willis MS, Freeman TL, Kuszynski CA, Tuma DJ, Klassen LW *et al*. Mechanisms of alcohol liver damage: aldehydes, scavenger receptors, and autoimmunity. *Front Bio sci* 2004; **9**: 3145–3155.
- Poli G, Schaub RJ, Siems WG, Leonarduzzi G. 4-hydroxynonenal: a membrane lipid oxidation product of medicinal interest. *Med Res Rev* 2008; **28**: 569–631.
- Uchida K, Toyokuni S, Nishikawa K, Kawakishi S, Oda H, Hiai H *et al*. Michael addition-type 4-hydroxy-2-nonenal adducts in modified low-density lipoproteins: markers for atherosclerosis. *Biochemistry* 1994; **33**: 12487–12494.
- Pierre F, Peiro G, Tache S, Cross AJ, Bingham SA, Gasc N *et al*. New marker of colon cancer risk associated with heme intake: 1,4-dihydroxynonane mercapturic acid. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; **15**: 2274–2279.
- Wang X, Yang Y, Moore DR, Nimmo SL, Lightfoot SA, Huycke MM. 4-hydroxy-2-nonenal mediates genotoxicity and bystander effects caused by *Enterococcus faecalis*-infected macrophages. *Gastroenterology* 2012; **142**: 543–551 e7.
- Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991; **11**: 81–128.
- Parola M, Bellomo G, Robino G, Barrera G, Dianzani MU. 4-Hydroxynonenal as a biological signal: molecular basis and pathophysiological implications. *Antioxid Redox Signal* 1999; **1**: 255–284.
- Dwivedi S, Sharma A, Patrick B, Sharma R, Awasthi YC. Role of 4-hydroxynonenal and its metabolites in signaling. *Redox Rep* 2007; **12**: 4–10.
- Smathers RL, Fritz KS, Galligan JJ, Shearn CT, Reigan P, Marks MJ *et al*. Characterization of 4-HNE modified L-FABP reveals alterations in structural and functional dynamics. *PLoS One* 2012; **7**: e38459.
- Grune T, Michel P, Sitte N, Eggert W, Albrecht-Nebe H, Esterbauer H *et al*. Increased levels of 4-hydroxynonenal modified proteins in plasma of children with autoimmune diseases. *Free Radic Biol Med* 1997; **23**: 357–360.
- Siems WG, Brenke R, Beier A, Grune T. Oxidative stress in chronic lymphoedema. *CJM* 2002; **95**: 803–809.
- Siems W, Grune T. Intracellular metabolism of 4-hydroxynonenal. *Mol Aspects Med* 2003; **24**: 167–175.
- Baradat M, Jouanin I, Dalleau S, Tache S, Gieules M, Debrauer L *et al*. 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* 2011; **24**: 1984–1993.
- Siems WG, Zollner H, Grune T, Esterbauer H. Metabolic fate of 4-hydroxynonenal in hepatocytes: 1,4-dihydroxynonene is not the main product. *J Lipid Res* 1997; **38**: 612–622.
- Chiarpotto E, Domenicotti C, Paola D, Vitali A, Nitti M, Pronzato MA *et al*. Regulation of rat hepatocyte protein kinase C beta isoenzymes by the lipid peroxidation product 4-hydroxy-2,3-nonenal: A signaling pathway to modulate vesicular transport of glycoproteins. *Hepatology* 1999; **29**: 1565–1572.
- Zhang H, Forman HJ. Signaling pathways involved in phase II gene induction by alpha, beta-unsaturated aldehydes. *Toxicol Ind Health* 2009; **25**: 269–278.
- Pettazoni P, Ciamporcerio E, Medana C, Pizzimenti S, Dal Bello F, Minero VG *et al*. Nuclear factor erythroid 2-related factor-2 activity controls 4-hydroxynonenal metabolism and activity in prostate cancer cells. *Free Radic Biol Med* 2011; **51**: 1610–1618.
- Patrick B, Li J, Jayabal PV, Reddy PM, Yang Y, Sharma R *et al*. Depletion of 4-hydroxynonenal in hGSTA4-transfected HLE B-3 cells results in profound changes in gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **334**: 425–432.
- Grune T, Davies KJ. The proteasomal system and HNE-modified proteins. *Mol Aspects Med* 2003; **24**: 195–204.
- Zarkovic K. 4-hydroxynonenal and neurodegenerative diseases. *Mol Aspects Med* 2003; **24**: 293–303.
- Choudhary S, Xiao T, Srivastava S, Zhang W, Chan LL, Vergara LA *et al*. Toxicity and detoxification of lipid-derived aldehydes in cultured retinal pigmented epithelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; **204**: 122–134.
- Negre-Salvayre A, Vieira O, Escargueil-Blanc I, Salvayre R. Oxidized LDL and 4-hydroxynonenal modulate tyrosine kinase receptor activity. *Mol Aspects Med* 2003; **24**: 251–261.
- Mattson MP. Roles of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in obesity, the metabolic syndrome, and associated vascular and neurodegenerative disorders. *Exp Gerontol* 2009; **44**: 625–633.
- Karihtala P, Kauppila S, Puistola U, Jukkola-Vuorinen A. Divergent behaviour of oxidative stress markers 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) and 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) in breast carcinogenesis. *Histopathology* 2011; **58**: 854–862.
- Perry EA, Castellani RJ, Moreira PI, Nunomura A, Lui Q, Harris PL *et al*. Neurofilaments are the major neuronal target of hydroxynonenal-mediated protein cross-links. *Free Radic Res* 2013; **47**: 507–510.
- Butterfield DA, Swomley AM, Sultana R. Amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress in alzheimer disease: importance in disease pathogenesis and progression. *Antioxid Redox Signal* 2013; **19**: 823–835.
- Shringarpure R, Grune T, Sitte N, Davies KJ. 4-Hydroxynonenal-modified amyloid-beta peptide inhibits the proteasome: possible importance in Alzheimer's disease. *Cell Mol Life Sci* 2000; **57**: 1802–1809.
- Rockwell P, Yuan H, Magnusson R, Figueiredo-Pereira ME. Proteasome inhibition in neuronal cells induces a proinflammatory response manifested by upregulation of cyclooxygenase-2, its accumulation as ubiquitin conjugates, and production of the prostaglandin PGE(2). *Arch Biochem Biophys* 2000; **374**: 325–333.
- Keller JN, Pang Z, Geddes JW, Begley JG, Germeyer A, Waeg G *et al*. Impairment of glucose and glutamate transport and induction of mitochondrial oxidative stress and dysfunction in synaptosomes by amyloid beta-peptide: role of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. *J Neurochem* 1997; **69**: 273–284.
- Mark RJ, Lovell MA, Markesbery WR, Uchida K, Mattson MP. A role for 4-hydroxynonenal, an aldehydic product of lipid peroxidation, in disruption of ion homeostasis and neuronal death induced by amyloid beta-peptide. *J Neurochem* 1997; **68**: 255–264.
- Jenner P. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2003; **53**(Suppl 3): S26–S36; discussion S36–8.
- Morel P, Tallineau C, Pontcharraud R, Piriou A, Huguet F. Effects of 4-hydroxynonenal, a lipid peroxidation product, on dopamine transport and Na⁺/K⁺ ATPase in rat striatal synaptosomes. *Neurochem Int* 1998; **33**: 531–540.

34. Westerlund M, Galter D, Carmine A, Olson L. Tissue- and species-specific expression patterns of class I, III, and IV Adh and Aldh 1 mRNAs in rodent embryos. *Cell Tissue Res* 2005; **322**: 227–236.
35. Al Nimer F, Strom M, Lindblom R, Aeinehband S, Bellander BM, Nyengaard JR *et al*. Naturally occurring variation in the glutathione-S-transferase 4 gene determines neurodegeneration after traumatic brain injury. *Antioxid Redox Signal* 2013; **18**: 784–794.
36. Hipkiss AR. Carnosine and its possible roles in nutrition and health. *Adv Food Nutr Res* 2009; **57**: 87–154.
37. Hegyi L, Skepper JN, Cary NR, Mitchinson MJ. Foam cell apoptosis and the development of the lipid core of human atherosclerosis. *J Pathol* 1996; **180**: 423–429.
38. Vindis C, Escargueil-Blanc I, Elbaz M, Marcheix B, Grazide MH, Uchida K *et al*. Desensitization of platelet-derived growth factor receptor-beta by oxidized lipids in vascular cells and atherosclerotic lesions: prevention by aldehyde scavengers. *Circ Res* 2006; **98**: 785–792.
39. Leonarduzzi G, Chiarpotto E, Biasi F, Poli G. 4-Hydroxynonenal and cholesterol oxidation products in atherosclerosis. *Mol Nutr Food Res* 2005; **49**: 1044–1049.
40. Herbst U, Toborek M, Kaiser S, Mattson MP, Hennig B. 4-Hydroxynonenal induces dysfunction and apoptosis of cultured endothelial cells. *J Cell Physiol* 1999; **181**: 295–303.
41. Hajjar DP, Haberland ME. Lipoprotein trafficking in vascular cells. Molecular Trojan horses and cellular saboteurs. *J Biol Chem* 1997; **272**: 22975–22978.
42. VanWinkle WB, Snuggs M, Miller JC, Buja LM. Cytoskeletal alterations in cultured cardiomyocytes following exposure to the lipid peroxidation product, 4-hydroxynonenal. *Cell Motil Cytoskeleton* 1994; **28**: 119–134.
43. Singh R, Wang Y, Schattenberg JM, Xiang Y, Czaja MJ. Chronic oxidative stress sensitizes hepatocytes to death from 4-hydroxynonenal by JNK/c-Jun overactivation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; **297**: G907–G917.
44. Mottaran E, Stewart SF, Rolla R, Vay D, Cipriani V, Moretti M *et al*. Lipid peroxidation contributes to immune reactions associated with alcoholic liver disease. *Free Radic Biol Med* 2002; **32**: 38–45.
45. Dou X, Li S, Wang Z, Gu D, Shen C, Yao T *et al*. Inhibition of NF-kappaB activation by 4-hydroxynonenal contributes to liver injury in a mouse model of alcoholic liver disease. *Am J Pathol* 2012; **181**: 1702–1710.
46. Valentovic M, Terneus M, Harmon RC, Carpenter AB. S-Adenosylmethionine (SAME) attenuates acetaminophen hepatotoxicity in C57BL/6 mice. *Toxicol Lett* 2004; **154**: 165–174.
47. Barrera G. Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy. *ISRN Oncol* 2012; **2012**: 137289.
48. Cheeseman KH, Burton GW, Ingold KU, Slater TF. Lipid peroxidation and lipid antioxidants in normal and tumor cells. *Toxicol Pathol* 1984; **12**: 235–239.
49. Tjalkens RB, Cook LW, Petersen DR. Formation and export of the glutathione conjugate of 4-hydroxy-2, 3-E-nonenal (4-HNE) in hepatoma cells. *Arch Biochem Biophys* 1999; **361**: 113–119.
50. Oberley TD, Toyokuni S, Szweda LI. Localization of hydroxynonenal protein adducts in normal human kidney and selected human kidney cancers. *Free Radic Biol Med* 1999; **27**: 695–703.
51. Biasi F, Tessitore L, Zanetti D, Cutrin JC, Zingaro B, Chiarpotto E *et al*. Associated changes of lipid peroxidation and transforming growth factor beta 1 levels in human colon cancer during tumour progression. *Gut* 2002; **50**: 361–367.
52. Skrzydlewska E, Stankiewicz A, Sulkowska M, Sulkowski S, Kasacka I. Antioxidant status and lipid peroxidation in colorectal cancer. *J Toxicol Environ Health A* 2001; **64**: 213–222.
53. Young O, Crotty T, O'Connell R, O'Sullivan J, Curran AJ. Levels of oxidative damage and lipid peroxidation in thyroid neoplasia. *Head Neck* 2010; **32**: 750–756.
54. Juric-Sekhar G, Zarkovic K, Waeg G, Cipak A, Zarkovic N. Distribution of 4-hydroxynonenal-protein conjugates as a marker of lipid peroxidation and parameter of malignancy in astrocytic and ependymal tumors of the brain. *Tumori* 2009; **95**: 762–768.
55. Marquez-Quinones A, Cipak A, Zarkovic K, Fattel-Fazenda S, Villa-Trevino S, Waeg G *et al*. HNE-protein adducts formation in different pre-carcinogenic stages of hepatitis in LEC rats. *Free Radic Res* 2010; **44**: 119–127.
56. Dianzani MU. Lipid peroxidation and cancer: a critical reconsideration. *Tumori* 1989; **75**: 351–357.
57. DeNicola GM, Karreth FA, Humpton TJ, Gopinathan A, Wei C, Frese K *et al*. Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature* 2011; **475**: 106–109.
58. Dianzani MU. Lipid peroxidation and cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 1993; **15**: 125–147.
59. Pierre F, Tache S, Gueraud F, Ferole AL, Jourdan ML, Petit C. Apc mutation induces resistance of colonic cells to lipoperoxide-triggered apoptosis induced by faecal water from haem-fed rats. *Carcinogenesis* 2007; **28**: 321–327.
60. Feng Z, Hu W, Amin S, Tang MS. Mutational spectrum and genotoxicity of the major lipid peroxidation product, trans-4-hydroxy-2-nonenal, induced DNA adducts in nucleotide excision repair-proficient and -deficient human cells. *Biochemistry* 2003; **42**: 7848–7854.
61. Hu W, Feng Z, Eveleigh J, Iyer G, Pan J, Amin S *et al*. The major lipid peroxidation product, trans-4-hydroxy-2-nonenal, preferentially forms DNA adducts at codon 249 of human p53 gene, a unique mutational hotspot in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 2002; **23**: 1781–1789.
62. Feng Z, Hu W, Tang MS. Trans-4-hydroxy-2-nonenal inhibits nucleotide excision repair in human cells: a possible mechanism for lipid peroxidation-induced carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 8598–8602.
63. Cheng JZ, Sharma R, Yang Y, Singhal SS, Sharma A, Saini MK *et al*. Accelerated metabolism and exclusion of 4-hydroxynonenal through induction of RLP76 and hGST5.8 is an early adaptive response of cells to heat and oxidative stress. *J Biol Chem* 2001; **276**: 41213–41223.
64. Yang Y, Sharma A, Sharma R, Patrick B, Singhal SS, Zimniak P *et al*. Cells preconditioned with mild, transient UVA irradiation acquire resistance to oxidative stress and UVA-induced apoptosis: role of 4-hydroxynonenal in UVA-mediated signaling for apoptosis. *J Biol Chem* 2003; **278**: 41380–41388.
65. Ramachandran V, Watts LT, Maffi SK, Chen J, Schenker S, Henderson G. Ethanol-induced oxidative stress precedes mitochondrially mediated apoptotic death of cultured fetal cortical neurons. *J Neurosci Res* 2003; **74**: 577–588.
66. Wallach D, Kang TB, Kovalenko A. The extrinsic cell death pathway and the elan mortel. *Cell Death Differ* 2008; **15**: 1533–1541.
67. Li J, Sharma R, Patrick B, Sharma A, Jeyabal PV, Reddy PM *et al*. Regulation of CD95 (Fas) expression and Fas-mediated apoptotic signaling in HLE B-3 cells by 4-hydroxynonenal. *Biochemistry* 2006; **45**: 12253–12264.
68. Engle MR, Singh SP, Czernik PJ, Gaddy D, Montague DC, Ceci JD *et al*. Physiological role of mGSTA4-4, a glutathione S-transferase metabolizing 4-hydroxynonenal: generation and analysis of mGsta4 null mouse. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004; **194**: 296–308.
69. Sharma R, Sharma A, Dwivedi S, Zimniak P, Awasthi S, Awasthi YC. 4-Hydroxynonenal self-limits fas-mediated DISC-independent apoptosis by promoting export of Daxx from the nucleus to the cytosol and its binding to Fas. *Biochemistry* 2008; **47**: 143–156.
70. Salomoni P, Khelifi AF. Daxx: death or survival protein? *Trends Cell Biol* 2006; **16**: 97–104.
71. Yang X, Khosravi-Far R, Chang HY, Baltimore D. Daxx a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell* 1997; **89**: 1067–1076.
72. Singh SP, Niemczyk M, Saini D, Sadovov V, Zimniak L, Zimniak P. Disruption of the mGsta4 gene increases life span of C57BL mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2010; **65**: 14–23.
73. Torii S, Egan DA, Evans RA, Reed JC. Human Daxx regulates Fas-induced apoptosis from nuclear PML oncogenic domains (PODs). *EMBO J* 1999; **18**: 6037–6049.
74. West JD, Marnett LJ. Alterations in gene expression induced by the lipid peroxidation product, 4-hydroxy-2-nonenal. *Chem Res Toxicol* 2005; **18**: 1642–1653.
75. Weigel AL, Handa JT, Hjelmeland LM. Microarray analysis of H2O₂-, HNE-, or tBH-treated ARPE-19 cells. *Free Radic Biol Med* 2002; **33**: 1419–1432.
76. Marchette LD, Wang H, Li F, Babizhayev MA, Kasus-Jacobi A. Carcinine has 4-hydroxynonenal scavenging property and neuroprotective effect in mouse retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012; **53**: 3572–3583.
77. Battisti V, Maders LD, Bagatini MD, Santos KF, Spanevello RM, Maldonado PA *et al*. Measurement of oxidative stress and antioxidant status in acute lymphoblastic leukemia patients. *Clin Biochem* 2008; **41**: 511–518.
78. Khanna S, Sen CK, Roy S, Christen MO, Packer L. Protective effects of anethole dithiolethione against oxidative stress-induced cytotoxicity in human Jurkat T cells. *Biochem Pharmacol* 1998; **56**: 61–69.
79. Galluzzi L, Joza N, Tasdemir E, Maiuri MC, Hengartner M, Abrams JM *et al*. No death without life: vital functions of apoptotic effectors. *Cell Death Differ* 2008; **15**: 1113–1123.
80. Haynes RL, Brune B, Townsend AJ. Apoptosis in RAW 264.7 cells exposed to 4-hydroxy-2-nonenal: dependence on cytochrome C release but not p53 accumulation. *Free Radic Biol Med* 2001; **30**: 884–894.
81. Braga M, Sinha Hikim AP, Datta S, Ferrini MG, Brown D, Kovacheva EL *et al*. Involvement of oxidative stress and caspase 2-mediated intrinsic pathway signaling in age-related increase in muscle cell apoptosis in mice. *Apoptosis* 2008; **13**: 822–832.
82. Ji C, Amarnath V, Pietenpol JA, Marnett LJ. 4-hydroxynonenal induces apoptosis via caspase-3 activation and cytochrome c release. *Chem Res Toxicol* 2001; **14**: 1090–1096.
83. Siddiqui MA, Kumar V, Kashyap MP, Agarwal M, Singh AK, Khanna VK *et al*. Short-term exposure of 4-hydroxynonenal induces mitochondria-mediated apoptosis in PC12 cells. *Hum Exp Toxicol* 2012; **31**: 336–345.
84. Hill BG, Dranka BP, Zou L, Chatham JC, Darley-Usmar VM. Importance of the bioenergetic reserve capacity in response to cardiomyocyte stress induced by 4-hydroxynonenal. *Biochem J* 2009; **424**: 99–107.
85. Bodur C, Kutuk O, Tezil T, Basaga H. Inactivation of Bcl-2 through IkkappaB kinase (IKK)-dependent phosphorylation mediates apoptosis upon exposure to 4-hydroxynonenal (HNE). *J Cell Physiol* 2012; **227**: 3556–3565.
86. Liu W, Porter NA, Schneider C, Brash AR, Yin H. Formation of 4-hydroxynonenal from cardiolipin oxidation: Intramolecular peroxy radical addition and decomposition. *Free Radic Biol Med* 2011; **50**: 166–178.
87. Raza H, John A. 4-hydroxynonenal induces mitochondrial oxidative stress, apoptosis and expression of glutathione S-transferase A4-4 and cytochrome P450 2E1 in PC12 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006; **216**: 309–318.
88. Liu W, Kato M, Akhand AA, Hayakawa A, Suzuki H, Miyata T *et al*. 4-hydroxynonenal induces a cellular redox status-related activation of the caspase cascade for apoptotic cell death. *J Cell Sci* 2000; **113**(Pt 4): 635–641.

89. Lee JY, Jung GY, Heo HJ, Yun MR, Park JY, Bae SS *et al*. 4-Hydroxynonenal induces vascular smooth muscle cell apoptosis through mitochondrial generation of reactive oxygen species. *Toxicol Lett* 2006; **166**: 212–221.
90. Uchida K, Shiraiishi M, Naito Y, Torii Y, Nakamura Y, Osawa T. Activation of stress signaling pathways by the end product of lipid peroxidation. 4-hydroxy-2-nonenal is a potential inducer of intracellular peroxide production. *J Biol Chem* 1999; **274**: 2234–2242.
91. Dhanasekaran DN, Reddy EP. JNK signaling in apoptosis. *Oncogene* 2008; **27**: 6245–6251.
92. Parola M, Robino G, Marra F, Pinzani M, Bellomo G, Leonarduzzi G *et al*. HNE interacts directly with JNK isoforms in human hepatic stellate cells. *J Clin Invest* 1998; **102**: 1942–1950.
93. Song BJ, Soh Y, Bae M, Pie J, Wan J, Jeong K. Apoptosis of PC12 cells by 4-hydroxy-2-nonenal is mediated through selective activation of the c-Jun N-terminal protein kinase pathway. *Chem Biol Interact* 2001; **130–132**: 943–954.
94. Kutuk O, Basaga H. Apoptosis signalling by 4-hydroxynonenal: a role for JNK-c-Jun/AP-1 pathway. *Redox Rep* 2007; **12**: 30–34.
95. Bruckner SR, Estus S. JNK3 contributes to c-jun induction and apoptosis in 4-hydroxynonenal-treated sympathetic neurons. *J Neurosci Res* 2002; **70**: 665–670.
96. Kutuk O, Poli G, Basaga H. Resveratrol protects against 4-hydroxynonenal-induced apoptosis by blocking JNK and c-JUN/AP-1 signaling. *Toxicol Sci* 2006; **90**: 120–132.
97. Jang YJ, Kim JE, Kang NJ, Lee KW, Lee HJ. Piceatannol attenuates 4-hydroxynonenal-induced apoptosis of PC12 cells by blocking activation of c-Jun N-terminal kinase. *Ann N Y Acad Sci* 2009; **1171**: 176–182.
98. Sharma A, Sharma R, Chaudhary P, Vatsyayan R, Pearce V, Jeyabal PV *et al*. 4-Hydroxynonenal induces p53-mediated apoptosis in retinal pigment epithelial cells. *Arch Biochem Biophys* 2008; **480**: 85–94.
99. Knoll N, Ruhe C, Veeriah S, Sauer J, Gleit M, Gallagher EP *et al*. Genotoxicity of 4-hydroxy-2-nonenal in human colon tumor cells is associated with cellular levels of glutathione and the modulation of glutathione S-transferase A4 expression by butyrate. *Toxicol Sci* 2005; **86**: 27–35.
100. Eckl PM. Genotoxicity of HNE. *Mol Aspects Med* 2003; **24**: 161–165.
101. Buizza L, Prandelli C, Bonini SA, Delbarba A, Cenini G, Lanni C *et al*. Conformational altered p53 affects neuronal function: relevance for the response to toxic insult and growth-associated protein 43 expression. *Cell Death Dis* 2013; **4**: e484.
102. Barone E, Cenini G, Sultana R, Di Domenico F, Fiorini A, Perluigi M *et al*. Lack of p53 decreases basal oxidative stress levels in the brain through upregulation of thioredoxin-1, biliverdin reductase-A, manganese superoxide dismutase, and nuclear factor kappa-B. *Antioxid Redox Signal* 2012; **16**: 1407–1420.
103. Cenini G, Sultana R, Memo M, Butterfield DA. Elevated levels of pro-apoptotic p53 and its oxidative modification by the lipid peroxidation product, HNE, in brain from subjects with amnesic mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med* 2008; **12**: 987–994.
104. Choudhary S, Zhang W, Zhou F, Campbell GA, Chan LL, Thompson EB *et al*. Cellular lipid peroxidation end-products induce apoptosis in human lens epithelial cells. *Free Radic Biol Med* 2002; **32**: 360–369.
105. Kruman II, Mattson MP. Pivotal role of mitochondrial calcium uptake in neural cell apoptosis and necrosis. *J Neurochem* 1999; **72**: 529–540.
106. Peng ZF, Koh CH, Li QT, Manikandan J, Melendez AJ, Tang SY *et al*. Deciphering the mechanism of HNE-induced apoptosis in cultured murine cortical neurons: transcriptional responses and cellular pathways. *Neuropharmacology* 2007; **53**: 687–698.
107. Chaudhary P, Sharma R, Sharma A, Vatsyayan R, Yadav S, Singhal SS *et al*. Mechanisms of 4-hydroxy-2-nonenal induced pro- and anti-apoptotic signaling. *Biochemistry* 2010; **49**: 6263–6275.
108. Ferrington DA, Kappahn RJ. Catalytic site-specific inhibition of the 20S proteasome by 4-hydroxynonenal. *FEBS Lett* 2004; **578**: 217–223.
109. Vladyskovskaya E, Sithu SD, Haberzettl P, Wickramasinghe NS, Merchant ML, Hill BG *et al*. Lipid peroxidation product 4-hydroxy-trans-2-nonenal causes endothelial activation by inducing endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem* 2012; **287**: 11398–11409.
110. Muller C, Bandemer J, Vindis C, Camare C, Mucher E, Gueraud F *et al*. Protein disulfide isomerase modification and inhibition contribute to ER stress and apoptosis induced by oxidized low density lipoproteins. *Antioxid Redox Signal* 2013; **18**: 731–742.
111. Santos CX, Tanaka LY, Wosniak J, Laurindo FR. Mechanisms and implications of reactive oxygen species generation during the unfolded protein response: roles of endoplasmic reticulum oxidoreductases, mitochondrial electron transport, and NADPH oxidase. *Antioxid Redox Signal* 2009; **11**: 2409–2427.
112. Sovic A, Borovic S, Loncaric I, Kreuzer T, Zarkovic K, Vukovic T *et al*. The carcinostatic and proapoptotic potential of 4-hydroxynonenal in HeLa cells is associated with its conjugation to cellular proteins. *Anticancer Res* 2001; **21**: 1997–2004.
113. Bresgen N, Jaksch H, Lacher H, Ohlenschlager I, Uchida K, Eckl PM. Iron mediated oxidative stress plays an essential role in ferritin induced cell death. *Free Radic Biol Med* 2010; **48**: 1347–1357.
114. Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE *et al*. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* 2012; **149**: 1060–1072.
115. Green DR, Victor B. The pantheon of the fallen: why are there so many forms of cell death? *Trends Cell Biol* 2012; **22**: 555–556.
116. Jacobs AT, Marnett LJ. Heat shock factor 1 attenuates 4-hydroxynonenal-mediated apoptosis: critical role for heat shock protein 70 induction and stabilization of Bcl-XL. *J Biol Chem* 2007; **282**: 33412–33420.
117. Jacobs AT, Marnett LJ. HSF1-mediated BAG3 expression attenuates apoptosis in 4-hydroxynonenal-treated colon cancer cells via stabilization of anti-apoptotic Bcl-2 proteins. *J Biol Chem* 2009; **284**: 9176–9183.
118. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* 2003; **36**: 131–149.
119. Barrera G, Pizzimenti S, Laurora S, Briatore F, Toaldo C, Dianzani MU. 4-hydroxynonenal and cell cycle. *Biofactors* 2005; **24**: 151–157.
120. Pizzimenti S, Barrera G, Dianzani MU, Brusselbach S. Inhibition of D1, D2, and A-cyclin expression in HL-60 cells by the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. *Free Radic Biol Med* 1999; **26**: 1578–1586.
121. Wonisch W, Kohlwein SD, Schaur J, Tatzber F, Guttenberger H, Zarkovic N *et al*. Treatment of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* with the lipid peroxidation product 4-HNE provokes a temporary cell cycle arrest in G1 phase. *Free Radic Biol Med* 1998; **25**: 682–687.
122. Pettazzoni P, Pizzimenti S, Toaldo C, Sotomayor P, Tagliavacca L, Liu S *et al*. Induction of cell cycle arrest and DNA damage by the HDAC inhibitor panobinostat (LBH589) and the lipid peroxidation end product 4-hydroxynonenal in prostate cancer cells. *Free Radic Biol Med* 2010; **50**: 313–322.
123. Laurora S, Tamagno E, Briatore F, Bardini P, Pizzimenti S, Toaldo C *et al*. 4-Hydroxynonenal modulation of p53 family gene expression in the SK-N-BE neuroblastoma cell line. *Free Radic Biol Med* 2005; **38**: 215–225.
124. Ahmed EK, Rogowska-Wrzęsinska A, Roepstorff P, Bulteau AL, Friguet B. Protein modification and replicative senescence of WI-38 human embryonic fibroblasts. *Aging Cell* 2010; **9**: 252–272.
125. Voghel G, Thorin-Trescases N, Farhat N, Mamarbachi AM, Villeneuve L, Fortier A *et al*. Chronic treatment with N-acetyl-cysteine delays cellular senescence in endothelial cells isolated from a subgroup of atherosclerotic patients. *Mech Ageing Dev* 2008; **129**: 261–270.
126. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL *et al*. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994; **266**: 2011–2015.
127. von Zglinicki T. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem Sci* 2002; **27**: 339–344.
128. Pizzimenti S, Menegatti E, Berardi D, Toaldo C, Pettazzoni P, Minelli R *et al*. 4-hydroxynonenal, a lipid peroxidation product of dietary polyunsaturated fatty acids, has anticarcinogenic properties in colon carcinoma cell lines through the inhibition of telomerase activity. *J Nutr Biochem* 2010; **21**: 818–826.
129. Neely MD, Zimmerman L, Picklo MJ, Ou JJ, Morales CR, Montine KS *et al*. Congeners of N(alpha)-acetyl-L-cysteine but not aminoguanidine act as neuroprotectants from the lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal. *Free Radic Biol Med* 2000; **29**: 1028–1036.
130. Riahi Y, Kaiser N, Leibowitz G, Sima AV, Simionescu M, Sasson S. Mechanism of foam cell-induced endothelial cell senescence in atherosclerosis. *EAS Congress Abstract book*. 80th European Atherosclerosis Society Congress, 2012, p 831.
131. Hill BG, Haberzettl P, Ahmed Y, Srivastava S, Bhatnagar A. Unsaturated lipid peroxidation-derived aldehydes activate autophagy in vascular smooth-muscle cells. *Biochem J* 2008; **410**: 525–534.
132. Schutt F, Bergmann M, Holz FG, Kopitz J. Proteins modified by malondialdehyde, 4-hydroxynonenal, or advanced glycation end products in lipofuscin of human retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; **44**: 3663–3668.
133. Krohne TU, Stratmann NK, Kopitz J, Holz FG. Effects of lipid peroxidation products on lipofuscinogenesis and autophagy in human retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res* 2010; **90**: 465–471.
134. Sparrow JR, Boulton M. RPE lipofuscin and its role in retinal pathobiology. *Exp Eye Res* 2005; **80**: 595–606.
135. Salabei JK, Cummins TD, Singh M, Jones SP, Bhatnagar A, Hill BG. PDGF-mediated autophagy regulates vascular smooth muscle cell phenotype and resistance to oxidative stress. *Biochem J* 2013; **451**: 375–388.
136. Wakabayashi N, Slocum SL, Skoko JJ, Shin S, Kensler TW. When NRF2 talks, who's listening? *Antioxid Redox Signal* 2010; **13**: 1649–1663.
137. Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Cole RN, Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y *et al*. Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 11908–11913.
138. Levonen AL, Landar A, Ramachandran A, Ceaser EK, Dickinson DA, Zanoni G *et al*. Cellular mechanisms of redox cell signalling: role of cysteine modification in controlling antioxidant defences in response to electrophilic lipid oxidation products. *Biochem J* 2004; **378**(Pt 2): 373–382.
139. Levy S, Jaiswal AK, Forman HJ. The role of c-Jun phosphorylation in EpRE activation of phase II genes. *Free Radic Biol Med* 2009; **47**: 1172–1179.
140. Singh S, Vrishni S, Singh BK, Rahman I, Kakkur P. Nrf2-ARE stress response mechanism: a control point in oxidative stress-mediated dysfunctions and chronic inflammatory diseases. *Free Radic Res* 2010; **44**: 1267–1288.

141. Siow RC, Ishii T, Mann GE. Modulation of antioxidant gene expression by 4-hydroxynonenal: atheroprotective role of the Nrf2/ARE transcription pathway. *Redox Rep* 2007; **12**: 11–15.
142. Sporn MB, Liby KT. NRF2 and cancer: the good, the bad and the importance of context. *Nat Rev Cancer* 2012; **12**: 564–571.
143. Awasthi YC, Ansari GA, Awasthi S. Regulation of 4-hydroxynonenal mediated signaling by glutathione S-transferases. *Methods Enzymol* 2005; **401**: 379–407.
144. Kong D, Kotraiah V. Modulation of aldehyde dehydrogenase activity affects (+/-)-4-hydroxy-2E-nonenal (HNE) toxicity and HNE-protein adduct levels in PC12 cells. *J Mol Neurosci* 2012; **47**: 595–603.
145. Murphy TC, Amarnath V, Gibson KM, Picklo MJ Sr. Oxidation of 4-hydroxy-2-nonenal by succinic semialdehyde dehydrogenase (ALDH5A). *J Neurochem* 2003; **86**: 298–305.
146. Banaclocha MM. Therapeutic potential of N-acetylcysteine in age-related mitochondrial neurodegenerative diseases. *Med Hypotheses* 2001; **56**: 472–477.
147. Circu ML, Aw TY. Glutathione and apoptosis. *Free Radic Res* 2008; **42**: 689–706.
148. Vaillancourt F, Fahmi H, Shi Q, Lavigne P, Ranger P, Fernandes JC *et al*. 4-Hydroxynonenal induces apoptosis in human osteoarthritic chondrocytes: the protective role of glutathione-S-transferase. *Arthritis Res Ther* 2008; **10**: R107.
149. Gallagher EP, Huisden CM, Gardner JL. Transfection of HepG2 cells with hGSTA4 provides protection against 4-hydroxynonenal-mediated oxidative injury. *Toxicol In Vitro* 2007; **21**: 1365–1372.
150. Li D, Hinshelwood A, Gardner R, McGarvie G, Ellis EM. Mouse aldo-keto reductase AKR7A5 protects V79 cells against 4-hydroxynonenal-induced apoptosis. *Toxicology* 2006; **226**: 172–180.
151. Matsunaga T, Shinoda Y, Inoue Y, Endo S, El-Kabbani O, Hara A. Protective effect of rat aldo-keto reductase (AKR1C15) on endothelial cell damage elicited by 4-hydroxy-2-nonenal. *Chem Biol Interact* 191: 364–370.
152. Solito R, Chen CH, Mochly-Rosen D, Giachetti A, Ziche M, Donnini S. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase-2 activation prevents beta amyloids induced endothelial cell dysfunction and restores angiogenesis. *J Cell Sci* 2013; **126**(Pt 9): 1952–1961.
153. Pappa A, Chen C, Koutalos Y, Townsend AJ, Vasiliou V. Aldh3a1 protects human corneal epithelial cells from ultraviolet- and 4-hydroxy-2-nonenal-induced oxidative damage. *Free Radic Biol Med* 2003; **34**: 1178–1189.
154. Mitsuishi Y, Taguchi K, Kawatani Y, Shibata T, Nukiwa T, Aburatani H *et al*. Nrf2 redirects glucose and glutamine into anabolic pathways in metabolic reprogramming. *Cancer Cell* 2012; **22**: 66–79.
155. Ruef J, Rao GN, Li F, Bode C, Patterson C, Bhatnagar A *et al*. Induction of rat aortic smooth muscle cell growth by the lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal. *Circulation* 1998; **97**: 1071–1078.
156. Barrera G, Di Mauro C, Muraca R, Ferrero D, Cavalli G, Fazio VM *et al*. Induction of differentiation in human HL-60 cells by 4-hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation. *Exp Cell Res* 1991; **197**: 148–152.
157. Pizzimenti S, Laurora S, Briatore F, Ferretti C, Dianzani MU, Barrera G. Synergistic effect of 4-hydroxynonenal and PPAR ligands in controlling human leukemic cell growth and differentiation. *Free Radic Biol Med* 2002; **32**: 233–245.
158. Zhang W, He Q, Chan LL, Zhou F, El Naghy M, Thompson EB *et al*. Involvement of caspases in 4-hydroxy-alkenal-induced apoptosis in human leukemic cells. *Free Radic Biol Med* 2001; **30**: 699–706.
159. Calabrese V, Cornelius C, Mancuso C, Pennisi G, Calafato S, Bellia F *et al*. Cellular stress response: a novel target for chemoprevention and nutritional neuroprotection in aging, neurodegenerative disorders and longevity. *Neurochem Res* 2008; **33**: 2444–2471.
160. Sykietis GP, Bohmann D. Keap1/Nrf2 signaling regulates oxidative stress tolerance and lifespan in *Drosophila*. *Dev Cell* 2008; **14**: 76–85.

DISCUSSION & PERSPECTIVES

→A la question : « Quelles sont les voies de signalisation susceptibles d'expliquer que les côlonocytes prénéoplasiques résistent mieux que les côlonocytes sains au HNE, produit réactif de la peroxydation lipidique? », nous avons apporté une réponse originale. Les cellules prénéoplasiques mutées pour Apc surexpriment Nrf2, le gène maître de la réponse anti-oxydante, ainsi que les enzymes de détoxification qui sont sous son contrôle : la GSTA4, les ALDH2 et 5A1, et le transporteur cystine/glutamate xCT. Ce différentiel explique que les cellules mutées pour Apc sont mieux à même de se défendre contre le stress oxydant _ et le HNE en particulier _ car leurs capacités basales de détoxification et de défense sont plus élevées.

Cependant, nous n'avons pas encore clairement identifié le lien entre la mutation Apc et la suractivité de Nrf2. Une des hypothèses les plus pertinentes s'appuie sur le fait que les cellules mutées pour Apc présentent un réseau d'actine déstructuré. Or Keap1, l'inhibiteur de Nrf2, se lie normalement au cytosquelette. Une modification du cytosquelette pourrait expliquer, d'une part que Keap1 non stabilisé par son interaction classique avec l'actine soit plus facilement dégradé, et d'autre part que Nrf2 étant moins « solidement » ancré dans le cytoplasme, il soit plus facilement transloqué vers le noyau. Ceci expliquerait les niveaux plus bas de Keap1 et les niveaux plus élevés de Nrf2 (dont Nrf2 nucléaire) dans les cellules Apc Min/+ comparativement aux cellules Apc +/+. Il serait possible de tester cette hypothèse en déstructurant le réseau d'actine des cellules Apc +/+ par un traitement à la cytochalasine B afin d'en observer l'impact sur les niveaux cytoplasmiques de Nrf2 et Keap1, ainsi que sur la translocation nucléaire de Nrf2.

Une autre hypothèse pourrait être émise, basée sur le niveau de ROS plus élevé dans les tissus coliques tumoraux que dans les tissus coliques sains (JUNG and KWAK 2013). Si cela s'avérait vrai dans les lésions prénéoplasiques, cela pourrait expliquer que NRF2 soit plus actif dans les côlonocytes prénéoplasiques par adaptation à un niveau basal de stress oxydant plus élevé. Une évaluation des taux de ROS dans les deux lignées cellulaires pourrait être réalisée en utilisant des sondes sensibles en cytométrie.

Par ailleurs, des expériences préliminaires d'immunomarquage par fluorescence de la protéine p62 indiquent qu'il y a plus de p62 cytoplasmique dans les cellules Apc Min/+ que chez les cellules Apc +/+ (figure 28). Or il a été montré que p62 inhibe Keap1, et par conséquent active Nrf2, et qu'en retour Nrf2 est capable d'activer l'expression p62 (JAIN et

al. 2010; NEZIS and STENMARK 2012). Si l'hypothèse était confirmée, elle constituerait un premier pas vers la mise en évidence de l'existence un rétrocontrôle positif de régulation de NRF2 chez les cellules mutées.

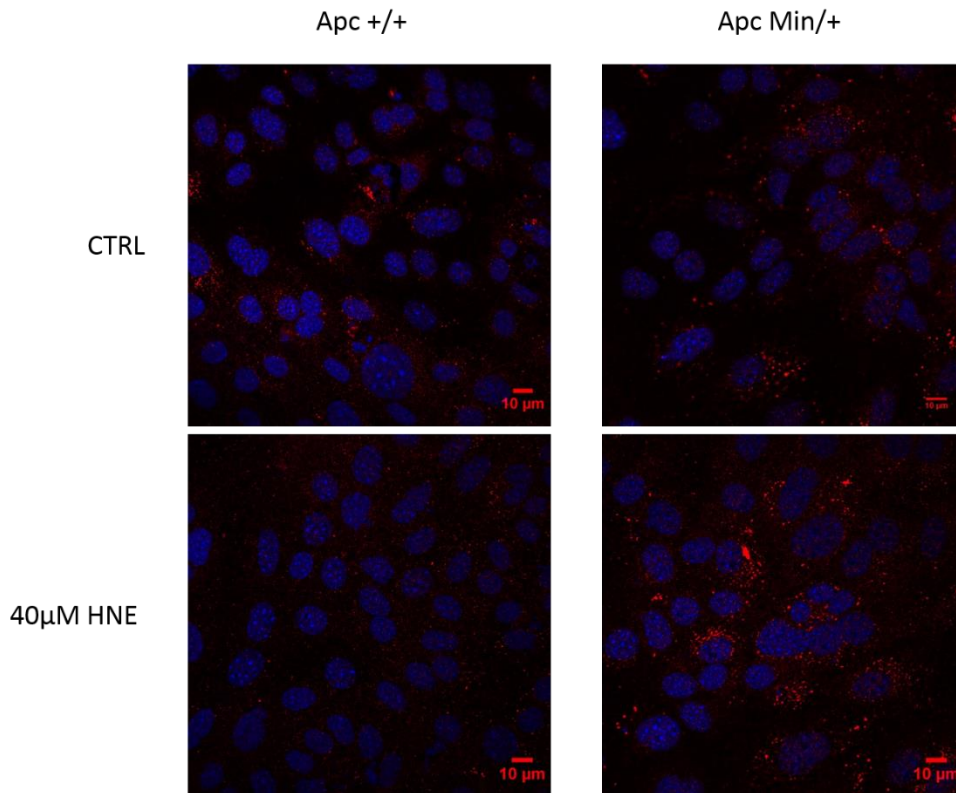


Figure 28 : Immunolocalisation de p62 dans les cellules Apc +/+ et Apc Min/+, traitées ou non au HNE (40μM, 18h). Marquage du noyau au DAPI (bleu), et immunomarquage de la protéine cytoplasmique p62 (rouge), analysés par microscopie confocale. Les cellules Apc Min/+ semblent présenter un marquage vésiculé de p62 après traitement au HNE 40μM 18H.

Enfin il a été montré que la mutation APC s'accompagne d'une inhibition de la synthèse de l'acide rétinoïque (NADAULD *et al.* 2006). Or l'acide rétinoïque est un inhibiteur de NRF2 (WANG *et al.* 2007). Si cette filiation était vérifiée chez les cellules Apc Min/+, elle permettrait également d'expliquer en partie la surexpression de Nrf2 que l'on observe dans cette lignée.

Au-delà de l'aspect mécanistique, il serait intéressant d'observer le statut de Nrf2 et des enzymes de détoxification qui sont sous son contrôle à la fois en immunohistochimie et par extraction de protéines et d'ARNs chez des côlons de souris Min (dont dérive le modèle Apc

Min/+), *versus* des souris C57BL/6 (dont dérivent le modèle Apc +/+); de même chez des côlons de souris C57BL/6 nourris avec une alimentation riche en hémine et ω -6 (huile de carthame). Ces résultats pourraient confirmer ce qui a été observé *in vitro*. Enfin, des études similaires pourraient idéalement être réalisées sur des biopsies humaines de patients atteints de cancer colorectal.

→A la question: «Est-il possible de rétablir l'équilibre entre cellules préneoplasiques et cellules saines face au HNE?», nous avons répondu par l'affirmative et mis en place une stratégie s'appuyant sur des inducteurs naturels de NRF2, le curcumin et le ptérostilbène. Ces deux molécules ont montré leurs capacités à potentialiser la réponse anti-oxydante des cellules saines et à être délétères pour les cellules mutées.

L'intention d'utiliser des inducteurs naturels de NRF2 plutôt que des inducteurs chimiques reconnus tels que le tBHQ est en accord avec la thématique de prévention du cancer colorectal développée par l'équipe. Une charcuterie modèle enrichie en hème, oxydée, nitritée, mimant du jambon et enrichie en curcumin incorporé à l'alimentation de rats a montré son potentiel à décroître le nombre de lésions préneoplasiques coliques comparativement à des animaux ayant reçu la charcuterie modèle contrôle. Les PCRs que j'ai réalisées sur les ARNs extraits des muqueuses coliques de ces animaux ont montré une induction des AKRs (enzymes majeures des voies de détoxification de HNE), lors de la supplémentation en curcumin, tandis qu'une diminution de la toxicité des eaux fécales extraites des côlons a été évaluée *in vitro* en traitement sur des colonocytes (figure 29)

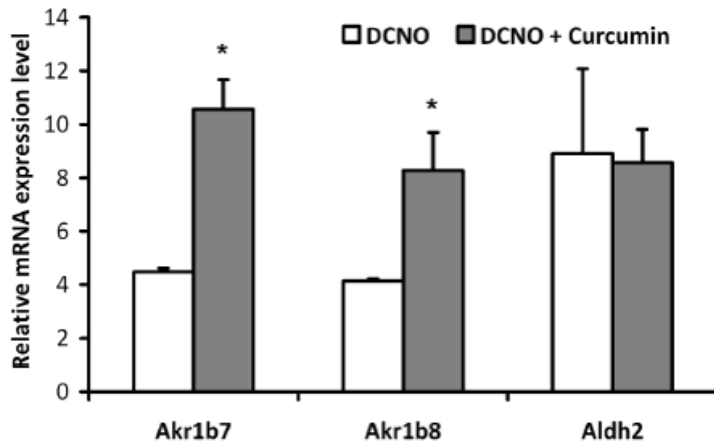


Figure 29 : PCRs évaluant le niveau d'expression de l'Aldh2, et des Akkr 1B7 et 1b8 dans des muqueuses coliques de rats nourris avec une charcuterie modèle, enrichie ou non en curcumin. DCNO: Dark Cooked Nitrite-treated and Oxidized high heme meat.

Il est important de noter que chez les cellules murines *Apc +/+* et *Apc Min/+*, un prétraitement au curcumin a préférentiellement induit les ALDHs responsables de réactions d'oxydations du HNE et de ses métabolites; tandis que chez le rat, la nourriture enrichie en curcumin a induit dans leurs côlonocytes une expression accrue des AKRs, responsables de réactions de réduction du HNE et de ses dérivés. Par ailleurs, jusqu'à présent, seule l'étude sur le jambon avait été menée dans l'équipe _ et non sur la viande rouge, la charcuterie étant une autre cause majeure de risque de cancer du côlon lié à l'alimentation. Cependant à l'heure actuelle une étude de réduction de la promotion de la cancérogenèse par le curcumin chez des rats dont le régime est enrichi en hémine vient de débiter.

Quant au ptérostilbène, une étude in vivo pourrait être envisagée. En 2010 une équipe taïwanaise ayant donné du ptérostilbène à des souris mâles BALB/c dont la cancérogenèse avait été induite par de l'AOM ont constaté une diminution des lésions prénéoplasiques, des nodules lymphoïdes et du nombre de tumeurs, et ce de façon encore plus probante que ce qui pouvait être observé pour le resvératrol (CHIOU *et al.* 2011). Là où cette molécule devient plus intéressante qu'un simple inducteur de Nrf2 c'est parce qu'elle induit une diminution de l'expression de la β -caténine chez des rats F344 induits à l'AOM (PAUL *et al.* 2010), et ce en plus de la diminution déjà observée de l'initiation tumorale. Des études in vivo sur un

modèle animal développant spontanément des tumeurs dans le côlon, pourraient ouvrir la voie à des études sur des volontaires souffrant de FAP chez qui l'activité β -caténine constitutive des colonocytes préneoplasiques serait un mécanisme majeur de croissance tumorale. Ce modèle ne pourrait pas être la souris Min car celle-ci développe des tumeurs spontanées essentiellement dans le grêle. En revanche un meilleur modèle serait le rat PIRC (Polyposis In the Rat Colon), celui-ci présentant le double avantage de posséder une mutation hétérozygote du gène Apc générant des tumeurs dans le côlon et d'être de taille suffisante pour permettre l'endoscopie.

Enfin, d'un point de vue mécanistique, il serait intéressant de déterminer comment le curcumin et le ptérostilbène favorisent la survie des cellules saines en même temps que de favoriser la mort des cellules mutées pour Apc. Chimiquement ces deux composés sont classés dans la catégorie des accepteurs de Michael et se comporteraient comme des électrophiles. Aussi un prétraitement avec ces composés à faibles doses (10 μ M en l'occurrence) pourrait générer un stress oxydant, ce qui en réponse induirait Nrf2 (comme cela a effectivement été observé), et par un phénomène adaptatif à court terme permettrait à la cellule de métaboliser plus efficacement le HNE (40 μ M) introduit par la suite. Chez les cellules préneoplasiques, la logique serait différente. Comme soulevé précédemment, on peut supposer que les cellules préneoplasiques présentent un statut rédox déséquilibré en faveur d'un niveau stress oxydant basalement élevé. L'introduction dans le milieu de composés générant un stress oxydant additionnel pourrait être à l'origine de la mort cellulaire observée. Pour confirmer ou infirmer cette hypothèse, il faudrait évaluer le niveau de ROS dans la cellule en conditions basales, après prétraitements, et après prétraitement et traitement au HNE, en utilisant par exemple une sonde fluorescente 2',7'-Dichlorodihydrofluorescéine Diacétate.

→A la question « Quelles types de morts cellulaires sont initiées par le HNE dans nos deux lignées ? », nous n'avons pas encore apporté de réponse définitive. Une part de mort par apoptose a néanmoins été identifiée (Dalleau S. et al, article 2 en voie de publication)

Cependant le marquage des noyaux condensés et fragmentés, même s'il s'agit d'une méthode fiable de détection de l'apoptose, devra être corrélée à d'autres techniques classiques de mise en évidence de l'apoptose : western blots marquant le cytochrome c, ou les protéines de la famille Bcl2, ainsi que détection des caspases 3, 8, et 9 clivées.

Néanmoins le différentiel entre le pourcentage de mort cellulaire indiqué par les différents tests de viabilité, et les pourcentages obtenus par comptage des noyaux apoptotiques après traitement au HNE nous laisse supposer que d'autres voies de mort cellulaire sont activées. Parmi elles, l'autophagie tient une place de choix. Identifiée comme un mode de mort cellulaire par lequel la cellule se digère elle-même dans un souci d'économie énergétique, elle a récemment été identifiée comme un moyen de survie lorsque la cellule l'utilise afin de n'éliminer que ses organites endommagés. Des expériences préliminaires que j'ai réalisées consistant en un prétraitement des deux lignées avec différents inhibiteurs d'autophagie nous ont montré que les cellules mutées devenaient moins sensible au HNE, comparativement aux cellules saines chez qui aucune différence significative n'est observable (figure 30). Toutefois, cette première expérience repose sur un test de viabilité, le test WST. Aussi afin de suivre cette piste, des expériences complémentaires doivent encore être réalisées : détection du clivage typique de LC3-I (Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3) par western blot, mise en évidence par microscopie de la formation d'autophagosomes, et de l'acidification des vacuoles de phagocytose en utilisant des sondes immunofluorescentes ciblant ces vacuoles et sensibles au pH (ex : LysoSensor Yellow/Blue DND-160, en combinaison avec un lysotracker).

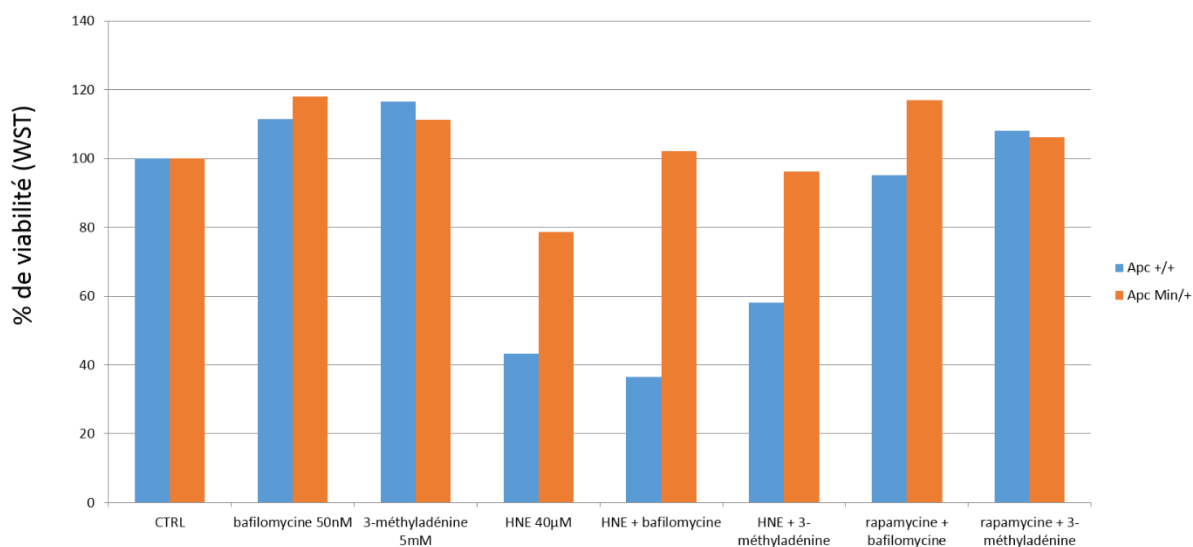


Figure 30 : Survie de cellules Apc +/+ et Apc Min/+ à un inducteur (rapamycine) et des inhibiteurs (bafilomycine et 3-méthyladénine) d'autophagie, avec ou sans traitement HNE 40µM 24H évaluée par un test WST.

D'autres expériences préliminaires nous ont montré que les cellules mutées pour Apc expriment à la fois PPAR γ et de PPAR δ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor), contrairement aux cellules saines qui expriment PPAR δ et n'expriment quasiment pas PPAR γ (figure 31). Or le ratio PPAR δ /PPAR γ serait déterminant dans la chimiosensibilité des lignées humaines de cancer du côlon (WANG *et al.* 2012a). L'intérêt des PPARs est renforcé par le fait que le HNE serait un agoniste de PPAR δ : en effet, une étude réalisée en 2007 a montré que le HNE était capable d'activer PPAR δ (COLEMAN *et al.* 2007). Cette activation ferait partie de la réponse des cellules à la lipoperoxydation. Allant dans ce sens, les PCRs présentées en figure 31 montrent une activation de PPAR δ en réponse au HNE (et pas au curcumin ou au ptérostilbène), chez les cellules saines uniquement. Là encore, des expériences supplémentaires sont nécessaires ; notamment confirmer au niveau protéique ce qui a été observé au niveau transcriptionnel. Si la confirmation est obtenue, évaluer la part des PPARs dans la mort cellulaire induite par le HNE pourrait être envisageable en effectuant des extinctions par si/shRNA et des surexpressions plasmidiques typiques.

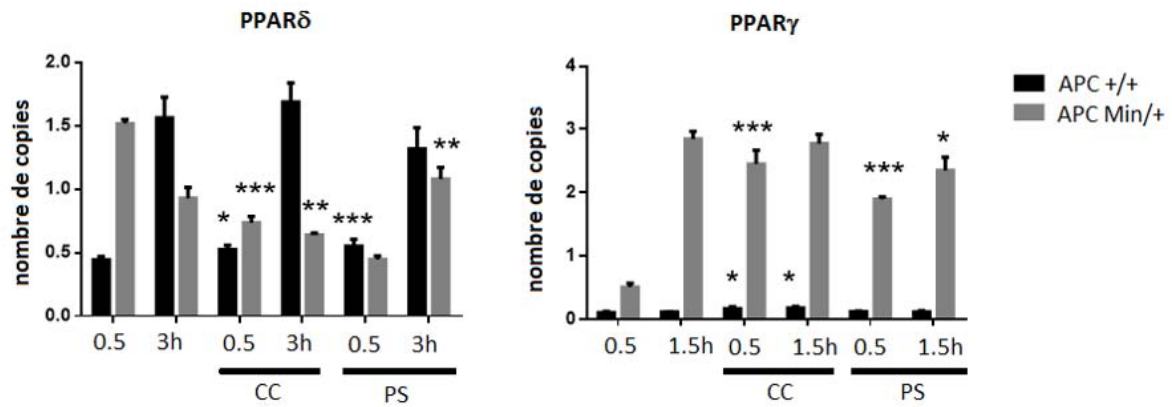


Figure 31 : PCRs évaluant le niveau d'expression des PPAR γ et δ en conditions basales et en réponse au HNE 40 μ M _ avec et sans prétraitement au curcumine (CC) ou au pterostilbène (PS) chez des Apc +/+ et des Apc Min/+.

➔ En outre, comme il a été mentionné dans les rappels bibliographiques, deux facteurs sont notamment capables d'activer NRF2 : le HNE de manière directe, et l'hème de manière indirecte en inhibant la fixation de l'inhibiteur compétitif BACH1 aux éléments similaires à AREs. Corrélié à l'hypothèse selon laquelle le fer hémique catalyse la formation de HNE, cette synergie de l'hème et du HNE relativement à l'activation de NRF2 pourrait aller encore un peu plus en faveur de la promotion tumorale dans un environnement colique oxydant. Dans le cas de fonds génétiques APC muté, la capacité de APC, via la voie β -caténine, à activer un NRF2 oncogénique et à promouvoir l'inflammation par activation COX-2 serait un facteur additionnel. Ces observations contribuent à faire du fer, notamment du fer hémique alimentaire, un levier de choix dans la prévention de la cancérogenèse colorectale chez l'individu sain, et le définissent comme un facteur potentiellement aggravant chez les individus atteints de FAP.

➔ Enfin un aspect important prêtant à discussion est le phénotype des cellules mutées pour Apc que nous utilisons. En effet, chez ces cellules, la mutation Apc engendre plusieurs conséquences : activation de la voie Wnt, modification du cytosquelette, instabilité chromosomique. L'idéal serait de disposer d'un modèle cellulaire ON/OFF

pour la mutation Apc : par exemple un modèle Apc +/+ transfecté avec un shRNA Apc inducible. Ce type de modèle nous permettrait d'observer l'effet immédiat de la mutation Apc. Pour conclure, il est à noter que plusieurs modèles humains immortalisés de cancérogenèse colorectale sont actuellement en développement dans l'équipe, présentant soit la mutation *APC* seule, soit la mutation Apc en addition séquentielle avec les mutations KRAS et p53, ainsi que des instabilités chromosomiques. L'intérêt de mettre en place ces modèles est de pouvoir disposer de cellules humaines prénéoplasiques immortelles, présentant différents stades de mutations correspondant à la séquence de mutations présumée la plus courante chez l'homme.

CONCLUSION

Le cancer du côlon est la troisième cause de mortalité par cancer dans le monde. Derrière ce cancer se cachent une mutation, celle du gène APC, et un facteur environnemental majeur, l'alimentation. Plusieurs études épidémiologiques ont mis en évidence que la consommation de viande rouge représentait un risque convaincant dans l'étiologie du cancer du côlon. Ce lien passerait en partie par le HNE, molécule modèle des produits de lipoperoxydation secondaire pouvant se former spontanément dans la matrice alimentaire ou être issus de l'oxydation des acides gras de la famille n-6 par le fer libéré lors de la digestion ; fer libre qui possède également un effet cytotoxique sur la membrane colique. NRF2 est le gène maître de la réponse anti-oxydante dans la cellule. Ce travail de thèse a permis pour la première fois d'établir l'existence d'un niveau de NRF2 plus élevé dans des cellules prénéoplasiques mutées pour APC comparativement à des cellules saines, et a mis en évidence que cette surexpression leur confère un avantage de survie lors d'une exposition au HNE. Ce différentiel a pu être inversé en utilisant des inducteurs naturels de NRF2, tels que le ptérostilbène et le curcumin, qui ont eu pour effet d'améliorer la survie des cellules saines au HNE, et d'augmenter la mort cellulaire dans les cellules mutées par un mécanisme encore non élucidé. Par ailleurs, l'utilisation du curcumin ou du ptérostilbène, si leurs effets étaient confirmés *in vivo*, permettraient de mettre en place à l'échelle humaine des stratégies préventives telles que des recommandations nutritionnelles ou des enrichissements alimentaires en composés protecteurs. Mais le curcumin et le ptérostilbène ne sont pas les seuls en lice. Dans cette veine, plusieurs études récemment publiées sur le parthénolide, un sesquiterpène extrait de la grande camomille, montre qu'il est capable d'induire un arrêt du cycle cellulaire et une apoptose massive dans les cellules myéloïdes cancéreuses et leurs progénitrices par activation de la voie JNK, inhibition de NF- κ B et induction d'un fort stress oxydant générant une déplétion en GSH, tout en épargnant les cellules saines (GUZMAN *et al.* 2007; KOPROWSKA and CZYZ 2010; NAKSHATRI *et al.* 2004). S'ils ont permis de répondre aux questions initialement posées, les résultats que j'ai obtenu laissent également la porte ouverte à d'autres enjeux : en effet dans le cadre d'un épithélium colique dont la fonction le prédispose au renouvellement cellulaire, l'utilisation de composés naturels possédant la double propriété d'épargner les cellules saines et d'éliminer les cellules mutées, sans avoir à se baser sur leur capacité à proliférer pour les différencier, pourrait s'avérer être une stratégie de choix dans les années à venir.

REFERENCES

- ADACHI, T., H. NAKAGAWA, I. CHUNG, Y. HAGIYA, K. HOSHIJIMA *et al.*, 2007 Nrf2-dependent and -independent induction of ABC transporters ABCC1, ABCC2, and ABCG2 in HepG2 cells under oxidative stress. *J Exp Ther Oncol* **6**: 335-348.
- AGGARWAL, B., S. PRASAD, B. SUNG, S. KRISHNAN and S. GUHA, 2013 Prevention and Treatment of Colorectal Cancer by Natural Agents From Mother Nature. *Curr Colorectal Cancer Rep* **9**: 37-56.
- AHMED, E. K., A. ROGOWSKA-WRZESINSKA, P. ROEPSTORFF, A. L. BULTEAU and B. FRIGUET, 2010 Protein modification and replicative senescence of WI-38 human embryonic fibroblasts. *Aging Cell* **9**: 252-272.
- AL NIMER, F., M. STROM, R. LINDBLOM, S. AEINEHBAND, B. M. BELLANDER *et al.*, 2013 Naturally occurring variation in the glutathione-s-transferase 4 gene determines neurodegeneration after traumatic brain injury. *Antioxid Redox Signal* **18**: 784-794.
- ALBERICI, P., E. DE PATER, J. CARDOSO, M. BEVELANDER, L. MOLENAAR *et al.*, 2007 Aneuploidy arises at early stages of Apc-driven intestinal tumorigenesis and pinpoints conserved chromosomal loci of allelic imbalance between mouse and human. *Am J Pathol* **170**: 377-387.
- ALEXANDER, D. D., C. A. CUSHING, K. A. LOWE, B. SCEURMAN and M. A. ROBERTS, 2009 Meta-analysis of animal fat or animal protein intake and colorectal cancer. *Am J Clin Nutr* **89**: 1402-1409.
- ALLEN, W. E., G. E. JONES, J. W. POLLARD and A. J. RIDLEY, 1997 Rho, Rac and Cdc42 regulate actin organization and cell adhesion in macrophages. *J Cell Sci* **110 (Pt 6)**: 707-720.
- ANDERSEN, V., J. CHRISTENSEN, K. OVERVAD, A. TJONNELAND and U. VOGEL, 2010 Polymorphisms in NFkB, PXR, LXR and risk of colorectal cancer in a prospective study of Danes. *BMC Cancer* **10**: 484.
- ANDERSON, M. T., F. J. STAAL, C. GITLER, L. A. HERZENBERG and L. A. HERZENBERG, 1994 Separation of oxidant-initiated and redox-regulated steps in the NF-kappa B signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 11527-11531.
- ANDREU, P., S. COLNOT, C. GODARD, S. GAD, P. CHAFEY *et al.*, 2005 Crypt-restricted proliferation and commitment to the Paneth cell lineage following Apc loss in the mouse intestine. *Development* **132**: 1443-1451.
- AOKI, K., M. AOKI, M. SUGAI, N. HARADA, H. MIYOSHI *et al.*, 2007 Chromosomal instability by beta-catenin/TCF transcription in APC or beta-catenin mutant cells. *Oncogene* **26**: 3511-3520.
- AOKI, Y., H. SATO, N. NISHIMURA, S. TAKAHASHI, K. ITOH *et al.*, 2001 Accelerated DNA adduct formation in the lung of the Nrf2 knockout mouse exposed to diesel exhaust. *Toxicol Appl Pharmacol* **173**: 154-160.
- APOPA, P. L., X. HE and Q. MA, 2008 Phosphorylation of Nrf2 in the transcription activation domain by casein kinase 2 (CK2) is critical for the nuclear translocation and transcription activation function of Nrf2 in IMR-32 neuroblastoma cells. *J Biochem Mol Toxicol* **22**: 63-76.
- ARAKAWA, H., 2004 Netrin-1 and its receptors in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* **4**: 978-987.
- ARDITE, E., J. PANES, M. MIRANDA, A. SALAS, J. I. ELIZALDE *et al.*, 1998 Effects of steroid treatment on activation of nuclear factor kappaB in patients with inflammatory bowel disease. *Br J Pharmacol* **124**: 431-433.

- ARMSTRONG, B., and R. DOLL, 1975 Environmental factors and cancer incidence and mortality in different countries, with special reference to dietary practices. *Int J Cancer* **15**: 617-631.
- AWASTHI, Y. C., G. A. ANSARI and S. AWASTHI, 2005 Regulation of 4-hydroxynonenal mediated signaling by glutathione S-transferases. *Methods Enzymol* **401**: 379-407.
- BACH, S. P., A. G. RENEHAN and C. S. POTTEN, 2000 Stem cells: the intestinal stem cell as a paradigm. *Carcinogenesis* **21**: 469-476.
- BACOT, S., N. BERNOUD-HUBAC, N. BADDAS, B. CHANTEGREL, C. DESHAYES *et al.*, 2003 Covalent binding of hydroxy-alkenals 4-HDDE, 4-HHE, and 4-HNE to ethanolamine phospholipid subclasses. *J Lipid Res* **44**: 917-926.
- BAEG, G. H., A. MATSUMINE, T. KURODA, R. N. BHATTACHARJEE, I. MIYASHIRO *et al.*, 1995 The tumour suppressor gene product APC blocks cell cycle progression from G0/G1 to S phase. *EMBO J* **14**: 5618-5625.
- BAIRD, L., and A. T. DINKOVA-KOSTOVA, 2011 The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway. *Arch Toxicol* **85**: 241-272.
- BALDWIN, A. S., JR., 1996 The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* **14**: 649-683.
- BALLINGER, A. B., and C. ANGGIANSAH, 2007 Colorectal cancer. *BMJ* **335**: 715-718.
- BALTGALVIS, K. A., F. G. BERGER, M. M. PENA, J. MARK DAVIS, J. P. WHITE *et al.*, 2010 Activity level, apoptosis, and development of cachexia in Apc(Min/+) mice. *J Appl Physiol* **109**: 1155-1161.
- BANACLOCHA, M. M., 2001 Therapeutic potential of N-acetylcysteine in age-related mitochondrial neurodegenerative diseases. *Med Hypotheses* **56**: 472-477.
- BARADAT, M., I. JOUANIN, S. DALLEAU, S. TACHE, M. GIEULES *et al.*, 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.
- BARONE, E., G. CENINI, R. SULTANA, F. DI DOMENICO, A. FIORINI *et al.*, 2012 Lack of p53 decreases basal oxidative stress levels in the brain through upregulation of thioredoxin-1, biliverdin reductase-A, manganese superoxide dismutase, and nuclear factor kappa-B. *Antioxid Redox Signal* **16**: 1407-1420.
- BARRERA, G., 2012 Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy. *ISRN Oncol* **2012**: 137289.
- BARRERA, G., O. BROSSA, V. M. FAZIO, M. G. FARACE, L. PARADISI *et al.*, 1991a Effects of 4-hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation, on cell proliferation and ornithine decarboxylase activity. *Free Radic Res Commun* **14**: 81-89.
- BARRERA, G., C. DI MAURO, R. MURACA, D. FERRERO, G. CAVALLI *et al.*, 1991b Induction of differentiation in human HL-60 cells by 4-hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation. *Exp Cell Res* **197**: 148-152.
- BARRERA, G., R. MURACA, S. PIZZIMENTI, A. SERRA, C. ROSSO *et al.*, 1994 Inhibition of c-myc expression induced by 4-hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation, in the HL-60 human leukemic cell line. *Biochem Biophys Res Commun* **203**: 553-561.
- BARRERA, G., S. PIZZIMENTI, S. LAURORA, F. BRIATORE, C. TOALDO *et al.*, 2005 4-hydroxynonenal and cell cycle. *Biofactors* **24**: 151-157.
- BARRERA, G., S. PIZZIMENTI, S. LAURORA, E. MORONI, B. GIGLIONI *et al.*, 2002 4-Hydroxynonenal affects pRb/E2F pathway in HL-60 human leukemic cells. *Biochem Biophys Res Commun* **295**: 267-275.

- BARRERA, G., S. PIZZIMENTI, R. MURACA, G. BARBIERO, G. BONELLI *et al.*, 1996 Effect of 4-Hydroxynonenal on cell cycle progression and expression of differentiation-associated antigens in HL-60 cells. *Free Radic Biol Med* **20**: 455-462.
- BARTIK, L., G. K. WHITFIELD, M. KACZMARSKA, C. L. LOWMILLER, E. W. MOFFET *et al.*, 2010 Curcumin: a novel nutritionally derived ligand of the vitamin D receptor with implications for colon cancer chemoprevention. *J Nutr Biochem* **21**: 1153-1161.
- BASTIDE, N. M., F. H. PIERRE and D. E. CORPET, 2011 Heme iron from meat and risk of colorectal cancer: a meta-analysis and a review of the mechanisms involved. *Cancer Prev Res (Phila)* **4**: 177-184.
- BATTISTI, V., L. D. MADERS, M. D. BAGATINI, K. F. SANTOS, R. M. SPANEVELLO *et al.*, 2008 Measurement of oxidative stress and antioxidant status in acute lymphoblastic leukemia patients. *Clin Biochem* **41**: 511-518.
- BAUD, V., and M. KARIN, 2009 Is NF-kappaB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nat Rev Drug Discov* **8**: 33-40.
- BELLOCQ, D., J. MOLINA, E. RATHAHO, C. CANLET, S. TACHE *et al.*, 2008 High potency of bioactivation of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in mouse colon epithelial cells with Apc(Min) mutation. *Mutat Res* **653**: 34-43.
- BERESFORD, S. A., K. C. JOHNSON, C. RITENBAUGH, N. L. LASSER, L. G. SNETSELAAR *et al.*, 2006 Low-fat dietary pattern and risk of colorectal cancer: the Women's Health Initiative Randomized Controlled Dietary Modification Trial. *JAMA* **295**: 643-654.
- BEROUD, C., and T. SOUSSI, 1996 APC gene: database of germline and somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res* **24**: 121-124.
- BESTERVELT, L. L., A. D. VAZ and M. J. COON, 1995 Inactivation of ethanol-inducible cytochrome P450 and other microsomal P450 isozymes by trans-4-hydroxy-2-nonenal, a major product of membrane lipid peroxidation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 3764-3768.
- BIASI, F., L. TESSITORE, D. ZANETTI, J. C. CUTRIN, B. ZINGARO *et al.*, 2002 Associated changes of lipid peroxidation and transforming growth factor beta1 levels in human colon cancer during tumour progression. *Gut* **50**: 361-367.
- BIASI, F., B. VIZIO, C. MASCIA, E. GAIA, N. ZARKOVIC *et al.*, 2006 c-Jun N-terminal kinase upregulation as a key event in the proapoptotic interaction between transforming growth factor-beta1 and 4-hydroxynonenal in colon mucosa. *Free Radic Biol Med* **41**: 443-454.
- BINION, D. G., M. F. OTTERSON and P. RAFIEE, 2008 Curcumin inhibits VEGF-mediated angiogenesis in human intestinal microvascular endothelial cells through COX-2 and MAPK inhibition. *Gut* **57**: 1509-1517.
- BLASIG, I. E., T. GRUNE, K. SCHONHEIT, E. ROHDE, M. JAKSTADT *et al.*, 1995 4-Hydroxynonenal, a novel indicator of lipid peroxidation for reperfusion injury of the myocardium. *Am J Physiol* **269**: H14-22.
- BLOOM, D. A., and A. K. JAISWAL, 2003 Phosphorylation of Nrf2 at Ser40 by protein kinase C in response to antioxidants leads to the release of Nrf2 from I κ Nrf2, but is not required for Nrf2 stabilization/accumulation in the nucleus and transcriptional activation of antioxidant response element-mediated NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1 gene expression. *J Biol Chem* **278**: 44675-44682.
- BODUR, C., O. KUTUK, T. TEZIL and H. BASAGA, 2012 Inactivation of Bcl-2 through I κ kinase (IKK)-dependent phosphorylation mediates apoptosis upon exposure to 4-hydroxynonenal (HNE). *J Cell Physiol* **227**: 3556-3565.

- BONADONA, V., B. BONAÏTI, S. OLSCHWANG, S. GRANDJOUAN, L. HUIART *et al.*, 2011 Cancer risks associated with germline mutations in MLH1, MSH2, and MSH6 genes in Lynch syndrome. *JAMA* **305**: 2304-2310.
- BOROVIC, S., F. RABUZIN, G. WAEG and N. ZARKOVIC, 2006 Enzyme-linked immunosorbent assay for 4-hydroxynonenal-histidine conjugates. *Free Radic Res* **40**: 809-820.
- BOUGNOUX, P., and J. MENANTEAU, 2005 [Dietary fatty acids and experimental carcinogenesis]. *Bull Cancer* **92**: 685-696.
- BOWIE, A., and L. A. O'NEILL, 1997 Vitamin C inhibits NF kappa B activation in endothelial cells. *Biochem Soc Trans* **25**: 131S.
- BRAGA, M., A. P. SINHA HIKIM, S. DATTA, M. G. FERRINI, D. BROWN *et al.*, 2008 Involvement of oxidative stress and caspase 2-mediated intrinsic pathway signaling in age-related increase in muscle cell apoptosis in mice. *Apoptosis* **13**: 822-832.
- BRESEGEN, N., H. JAKSCH, H. LACHER, I. OHLENSCHLAGER, K. UCHIDA *et al.*, 2010a Iron-mediated oxidative stress plays an essential role in ferritin-induced cell death. *Free Radic Biol Med* **48**: 1347-1357.
- BRESEGEN, N., H. JAKSCH, H. LACHER, I. OHLENSCHLAGER, K. UCHIDA *et al.*, 2010b Iron mediated oxidative stress plays an essential role in ferritin induced cell death. *Free Radic Biol Med*.
- BRITTAN, M., and N. A. WRIGHT, 2002 Gastrointestinal stem cells. *J Pathol* **197**: 492-509.
- BRUCKNER, S. R., and S. ESTUS, 2002 JNK3 contributes to c-jun induction and apoptosis in 4-hydroxynonenal-treated sympathetic neurons. *J Neurosci Res* **70**: 665-670.
- BRYAN, H. K., A. OLAYANJU, C. E. GOLDRING and B. K. PARK, 2013 The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and -independent mechanisms of regulation. *Biochem Pharmacol* **85**: 705-717.
- BUIZZA, L., C. PRANDELLI, S. A. BONINI, A. DELBARBA, G. CENINI *et al.*, 2013 Conformational altered p53 affects neuronal function: relevance for the response to toxic insult and growth-associated protein 43 expression. *Cell Death Dis* **4**: e484.
- BURCHAM, P. C., 1998 Genotoxic lipid peroxidation products: their DNA damaging properties and role in formation of endogenous DNA adducts. *Mutagenesis* **13**: 287-305.
- BURGESS, A. W., M. C. FAUX, M. J. LAYTON and R. G. RAMSAY, 2011 Wnt signaling and colon tumorigenesis--a view from the periphery. *Exp Cell Res* **317**: 2748-2758.
- BUTLER, L. M., R. SINHA, R. C. MILLIKAN, C. F. MARTIN, B. NEWMAN *et al.*, 2003 Heterocyclic amines, meat intake, and association with colon cancer in a population-based study. *Am J Epidemiol* **157**: 434-445.
- BUTTERFIELD, D. A., A. M. SWOMLEY and R. SULTANA, 2013 Amyloid beta-Peptide (1-42)-Induced Oxidative Stress in Alzheimer Disease: Importance in Disease Pathogenesis and Progression. *Antioxid Redox Signal*.
- CADIGAN, K. M., and Y. I. LIU, 2006 Wnt signaling: complexity at the surface. *J Cell Sci* **119**: 395-402.
- CAJONE, F., and A. BERNELLI-ZAZZERA, 1988 Oxidative stress induces a subset of heat shock proteins in rat hepatocytes and MH1C1 cells. *Chem Biol Interact* **65**: 235-246.
- CAJONE, F., and A. BERNELLI-ZAZZERA, 1989 The action of 4-hydroxynonenal on heat shock gene expression in cultured hepatoma cells. *Free Radic Res Commun* **7**: 189-194.
- CALABRESE, V., C. CORNELIUS, C. MANCUSO, G. PENNISI, S. CALAFATO *et al.*, 2008 Cellular stress response: a novel target for chemoprevention and nutritional neuroprotection in aging, neurodegenerative disorders and longevity. *Neurochem Res* **33**: 2444-2471.

- CARROLL, R. E., R. V. BENYA, D. K. TURGEON, S. VAREED, M. NEUMAN *et al.*, 2011 Phase IIa clinical trial of curcumin for the prevention of colorectal neoplasia. *Cancer Prev Res (Phila)* **4**: 354-364.
- CASTELLONE, M. D., H. TERAMOTO, B. O. WILLIAMS, K. M. DRUEY and J. S. GUTKIND, 2005 Prostaglandin E2 promotes colon cancer cell growth through a Gs-axin-beta-catenin signaling axis. *Science* **310**: 1504-1510.
- CENINI, G., R. SULTANA, M. MEMO and D. A. BUTTERFIELD, 2008 Elevated levels of pro-apoptotic p53 and its oxidative modification by the lipid peroxidation product, HNE, in brain from subjects with amnesic mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med* **12**: 987-994.
- CERBONE, A., C. TOALDO, S. LAURORA, F. BRIATORE, S. PIZZIMENTI *et al.*, 2007 4-Hydroxynonenal and PPARgamma ligands affect proliferation, differentiation, and apoptosis in colon cancer cells. *Free Radic Biol Med* **42**: 1661-1670.
- CHANG, L. C., C. W. FAN, W. K. TSENG, J. R. CHEN, H. P. CHEIN *et al.*, 2013 Immunohistochemical Study of the Nrf2 Pathway in Colorectal Cancer: Nrf2 Expression is Closely Correlated to Keap1 in the Tumor and Bach1 in the Normal Tissue. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*.
- CHAUDHARY, P., R. SHARMA, A. SHARMA, R. VATSYAYAN, S. YADAV *et al.*, 2010 Mechanisms of 4-hydroxy-2-nonenal induced pro- and anti-apoptotic signaling. *Biochemistry* **49**: 6263-6275.
- CHEESEMAN, K. H., G. W. BURTON, K. U. INGOLD and T. F. SLATER, 1984 Lipid peroxidation and lipid antioxidants in normal and tumor cells. *Toxicol Pathol* **12**: 235-239.
- CHEN, J., L. WANG, Y. CHEN, P. STERNBERG and J. CAI, 2009a Phosphatidylinositol 3 kinase pathway and 4-hydroxy-2-nonenal-induced oxidative injury in the RPE. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **50**: 936-942.
- CHEN, T., I. YANG, R. IRBY, K. H. SHAIN, H. G. WANG *et al.*, 2003 Regulation of caspase expression and apoptosis by adenomatous polyposis coli. *Cancer Res* **63**: 4368-4374.
- CHEN, W., Z. SUN, X. J. WANG, T. JIANG, Z. HUANG *et al.*, 2009b Direct interaction between Nrf2 and p21(Cip1/WAF1) upregulates the Nrf2-mediated antioxidant response. *Mol Cell* **34**: 663-673.
- CHEN, Z. H., and E. NIKI, 2006 4-hydroxynonenal (4-HNE) has been widely accepted as an inducer of oxidative stress. Is this the whole truth about it or can 4-HNE also exert protective effects? *IUBMB Life* **58**: 372-373.
- CHENG, J. Z., R. SHARMA, Y. YANG, S. S. SINGHAL, A. SHARMA *et al.*, 2001a Accelerated metabolism and exclusion of 4-hydroxynonenal through induction of RLIP76 and hGST5.8 is an early adaptive response of cells to heat and oxidative stress. *J Biol Chem* **276**: 41213-41223.
- CHENG, J. Z., S. S. SINGHAL, A. SHARMA, M. SAINI, Y. YANG *et al.*, 2001b Transfection of mGSTA4 in HL-60 cells protects against 4-hydroxynonenal-induced apoptosis by inhibiting JNK-mediated signaling. *Arch Biochem Biophys* **392**: 197-207.
- CHEUNG, K. L., J. H. LEE, T. O. KHOR, T. Y. WU, G. X. LI *et al.*, 2012 Nrf2 knockout enhances intestinal tumorigenesis in Apc(min/+) mice due to attenuation of anti-oxidative stress pathway while potentiates inflammation. *Mol Carcinog*.
- CHIARPOTTO, E., C. DOMENICOTTI, D. PAOLA, A. VITALI, M. NITTI *et al.*, 1999 Regulation of rat hepatocyte protein kinase C beta isoenzymes by the lipid peroxidation product 4-hydroxy-2,3-nonenal: A signaling pathway to modulate vesicular transport of glycoproteins. *Hepatology* **29**: 1565-1572.

- CHIOU, Y. S., M. L. TSAI, K. NAGABHUSHANAM, Y. J. WANG, C. H. WU *et al.*, 2011 Pterostilbene is more potent than resveratrol in preventing azoxymethane (AOM)-induced colon tumorigenesis via activation of the NF-E2-related factor 2 (Nrf2)-mediated antioxidant signaling pathway. *J Agric Food Chem* **59**: 2725-2733.
- CHIOU, Y. S., M. L. TSAI, Y. J. WANG, A. C. CHENG, W. M. LAI *et al.*, 2010 Pterostilbene inhibits colorectal aberrant crypt foci (ACF) and colon carcinogenesis via suppression of multiple signal transduction pathways in azoxymethane-treated mice. *J Agric Food Chem* **58**: 8833-8841.
- CHOUDHARY, S., T. XIAO, S. SRIVASTAVA, W. ZHANG, L. L. CHAN *et al.*, 2005 Toxicity and detoxification of lipid-derived aldehydes in cultured retinal pigmented epithelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol* **204**: 122-134.
- CHOUDHARY, S., W. ZHANG, F. ZHOU, G. A. CAMPBELL, L. L. CHAN *et al.*, 2002 Cellular lipid peroxidation end-products induce apoptosis in human lens epithelial cells. *Free Radic Biol Med* **32**: 360-369.
- CHUNG, F. L., R. G. NATH, J. OCANDO, A. NISHIKAWA and L. ZHANG, 2000 Deoxyguanosine adducts of t-4-hydroxy-2-nonenal are endogenous DNA lesions in rodents and humans: detection and potential sources. *Cancer Res* **60**: 1507-1511.
- CIRCU, M. L., and T. Y. AW, 2008 Glutathione and apoptosis. *Free Radic Res* **42**: 689-706.
- CLARKE, J. D., R. H. DASHWOOD and E. HO, 2008 Multi-targeted prevention of cancer by sulforaphane. *Cancer Lett* **269**: 291-304.
- COLEMAN, J. D., K. S. PRABHU, J. T. THOMPSON, P. S. REDDY, J. M. PETERS *et al.*, 2007 The oxidative stress mediator 4-hydroxynonenal is an intracellular agonist of the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta (PPARbeta/delta). *Free Radic Biol Med* **42**: 1155-1164.
- COPPLE, I. M., C. E. GOLDRING, R. E. JENKINS, A. J. CHIA, L. E. RANDLE *et al.*, 2008 The hepatotoxic metabolite of acetaminophen directly activates the Keap1-Nrf2 cell defense system. *Hepatology* **48**: 1292-1301.
- COPPLE, I. M., C. E. GOLDRING, N. R. KITTERINGHAM and B. K. PARK, 2010 The keap1-nrf2 cellular defense pathway: mechanisms of regulation and role in protection against drug-induced toxicity. *Handb Exp Pharmacol*: 233-266.
- CRABB, J. W., J. O'NEIL, M. MIYAGI, K. WEST and H. F. HOFF, 2002 Hydroxynonenal inactivates cathepsin B by forming Michael adducts with active site residues. *Protein Sci* **11**: 831-840.
- CRIFO, C., E. CAPUZZO, W. SIEMS and C. SALERNO, 2005a Inhibition of ion transport ATPases by HNE. *Biofactors* **24**: 137-140.
- CRIFO, C., W. SIEMS, S. SORO and C. SALERNO, 2005b Inhibition of defective adenylosuccinate lyase by HNE: a neurological disease that may be affected by oxidative stress. *Biofactors* **24**: 131-136.
- CROSNIER, C., D. STAMATAKI and J. LEWIS, 2006 Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nat Rev Genet* **7**: 349-359.
- CROSS, A. J., L. M. FERRUCCI, A. RISCH, B. I. GRAUBARD, M. H. WARD *et al.*, 2010 A large prospective study of meat consumption and colorectal cancer risk: an investigation of potential mechanisms underlying this association. *Cancer Res* **70**: 2406-2414.
- CULLINAN, S. B., D. ZHANG, M. HANNINK, E. ARVISAIS, R. J. KAUFMAN *et al.*, 2003 Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival. *Mol Cell Biol* **23**: 7198-7209.

- DALERBA, P., S. J. DYLLA, I. K. PARK, R. LIU, X. WANG *et al.*, 2007 Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 10158-10163.
- DE BOTH, N. J., M. VERMEY, N. GROEN, W. N. DINJENS and F. T. BOSMAN, 1997 Clonal growth of colorectal-carcinoma cell lines transplanted to nude mice. *Int J Cancer* **72**: 1137-1141.
- DE CRAENE, B., and G. BERX, 2013 Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat Rev Cancer* **13**: 97-110.
- DE SOUSA, E. M. F., L. VERMEULEN, E. FESSLER and J. P. MEDEMA, 2013 Cancer heterogeneity-a multifaceted view. *EMBO Rep* **14**: 686-695.
- DE VOGEL, J., W. B. VAN-ECK, A. L. SESINK, D. S. JONKER-TERMONT, J. KLEIBEUKER *et al.*, 2008 Dietary heme injures surface epithelium resulting in hyperproliferation, inhibition of apoptosis and crypt hyperplasia in rat colon. *Carcinogenesis* **29**: 398-403.
- DEBINSKI, H. S., S. LOVE, A. D. SPIGELMAN and R. K. PHILLIPS, 1996 Colorectal polyp counts and cancer risk in familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology* **110**: 1028-1030.
- DENICOLA, G. M., F. A. KARRETH, T. J. HUMPTON, A. GOPINATHAN, C. WEI *et al.*, 2011 Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature* **475**: 106-109.
- DHAKSHINAMOORTHY, S., A. K. JAIN, D. A. BLOOM and A. K. JAISWAL, 2005 Bach1 competes with Nrf2 leading to negative regulation of the antioxidant response element (ARE)-mediated NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene expression and induction in response to antioxidants. *J Biol Chem* **280**: 16891-16900.
- DHANASEKARAN, D. N., and E. P. REDDY, 2008 JNK signaling in apoptosis. *Oncogene* **27**: 6245-6251.
- DI MAURO, C., G. CAVALLI, M. C. AMPRIMO, L. PARADISI, G. SCANO *et al.*, 1990 Influence of 4-hydroxynonenal on chemiluminescence production by unstimulated and opsonized zymosan-stimulated human neutrophils. *Cell Biochem Funct* **8**: 147-155.
- DIANZANI, M. U., 1989 Lipid peroxidation and cancer: a critical reconsideration. *Tumori* **75**: 351-357.
- DIANZANI, M. U., 1993 Lipid peroxidation and cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* **15**: 125-147.
- DINKOVA-KOSTOVA, A. T., W. D. HOLTZCLAW, R. N. COLE, K. ITOH, N. WAKABAYASHI *et al.*, 2002 Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 11908-11913.
- DIXON, S. J., K. M. LEMBERG, M. R. LAMPRECHT, R. SKOUTA, E. M. ZAITSEV *et al.*, 2012 Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* **149**: 1060-1072.
- DOBDELSTEIN, M., and J. ROTH, 1998 The large T antigen of simian virus 40 binds and inactivates p53 but not p73. *J Gen Virol* **79 (Pt 12)**: 3079-3083.
- DOU, X., S. LI, Z. WANG, D. GU, C. SHEN *et al.*, 2012 Inhibition of NF-kappaB activation by 4-hydroxynonenal contributes to liver injury in a mouse model of alcoholic liver disease. *Am J Pathol* **181**: 1702-1710.
- DURYEE, M. J., M. S. WILLIS, T. L. FREEMAN, C. A. KUSZYNSKI, D. J. TUMA *et al.*, 2004 Mechanisms of alcohol liver damage: aldehydes, scavenger receptors, and autoimmunity. *Front Biosci* **9**: 3145-3155.
- DWIVEDI, S., A. SHARMA, B. PATRICK, R. SHARMA and Y. C. AWASTHI, 2007 Role of 4-hydroxynonenal and its metabolites in signaling. *Redox Rep* **12**: 4-10.
- EADES, G., M. YANG, Y. YAO, Y. ZHANG and Q. ZHOU, 2011 miR-200a regulates Nrf2 activation by targeting Keap1 mRNA in breast cancer cells. *J Biol Chem* **286**: 40725-40733.

- EBERT, B., A. SEIDEL and A. LAMPEN, 2007 Phytochemicals induce breast cancer resistance protein in Caco-2 cells and enhance the transport of benzo[a]pyrene-3-sulfate. *Toxicol Sci* **96**: 227-236.
- ECHTAY, K. S., J. L. PAKAY, T. C. ESTEVES and M. D. BRAND, 2005 Hydroxynonenal and uncoupling proteins: a model for protection against oxidative damage. *Biofactors* **24**: 119-130.
- ECKL, P. M., 2003 Genotoxicity of HNE. *Mol Aspects Med* **24**: 161-165.
- ECKL, P. M., A. ORTNER and H. ESTERBAUER, 1993 Genotoxic properties of 4-hydroxyalkenals and analogous aldehydes. *Mutat Res* **290**: 183-192.
- EISINGER, A. L., L. D. NADAULD, D. N. SHELTON, P. W. PETERSON, R. A. PHELPS *et al.*, 2006 The adenomatous polyposis coli tumor suppressor gene regulates expression of cyclooxygenase-2 by a mechanism that involves retinoic acid. *J Biol Chem* **281**: 20474-20482.
- EISINGER, A. L., L. D. NADAULD, D. N. SHELTON, S. M. PRESCOTT, D. M. STAFFORINI *et al.*, 2007 Retinoic acid inhibits beta-catenin through suppression of Cox-2: a role for truncated adenomatous polyposis coli. *J Biol Chem* **282**: 29394-29400.
- EKBOM, A., C. HELMICK, M. ZACK and H. O. ADAMI, 1990 Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *N Engl J Med* **323**: 1228-1233.
- ENGLE, M. R., S. P. SINGH, P. J. CZERNIK, D. GADDY, D. C. MONTAGUE *et al.*, 2004 Physiological role of mGSTA4-4, a glutathione S-transferase metabolizing 4-hydroxynonenal: generation and analysis of mGsta4 null mouse. *Toxicol Appl Pharmacol* **194**: 296-308.
- ESTERBAUER, H., R. J. SCHAUR and H. ZOLLNER, 1991 Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* **11**: 81-128.
- FAROUT, L., J. MARY, J. VINH, L. I. SZWEDA and B. FRIGUET, 2006 Inactivation of the proteasome by 4-hydroxy-2-nonenal is site specific and dependant on 20S proteasome subtypes. *Arch Biochem Biophys* **453**: 135-142.
- FAZIO, V. M., G. BARRERA, S. MARTINOTTI, M. G. FARACE, B. GIGLIONI *et al.*, 1992 4-Hydroxynonenal, a product of cellular lipid peroxidation, which modulates c-myc and globin gene expression in K562 erythroleukemic cells. *Cancer Res* **52**: 4866-4871.
- FEARON, E. R., and B. VOGELSTEIN, 1990 A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**: 759-767.
- FENG, Z., W. HU, S. AMIN and M. S. TANG, 2003 Mutational spectrum and genotoxicity of the major lipid peroxidation product, trans-4-hydroxy-2-nonenal, induced DNA adducts in nucleotide excision repair-proficient and -deficient human cells. *Biochemistry* **42**: 7848-7854.
- FENG, Z., W. HU and M. S. TANG, 2004 Trans-4-hydroxy-2-nonenal inhibits nucleotide excision repair in human cells: a possible mechanism for lipid peroxidation-induced carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 8598-8602.
- FERLAY, J., H. R. SHIN, F. BRAY, D. FORMAN, C. MATHERS *et al.*, 2010 Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* **127**: 2893-2917.
- FERNANDEZ-MAJADA, V., C. AGUILERA, A. VILLANUEVA, F. VILARDELL, A. ROBERT-MORENO *et al.*, 2007 Nuclear IKK activity leads to dysregulated notch-dependent gene expression in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 276-281.
- FERRINGTON, D. A., and R. J. KAPPAHN, 2004 Catalytic site-specific inhibition of the 20S proteasome by 4-hydroxynonenal. *FEBS Lett* **578**: 217-223.

- FIOCCHI, C., 2001 TGF-beta/Smad signaling defects in inflammatory bowel disease: mechanisms and possible novel therapies for chronic inflammation. *J Clin Invest* **108**: 523-526.
- FLINT, H. J., P. W. O'TOOLE and A. W. WALKER, 2010 Special issue: The Human Intestinal Microbiota. *Microbiology* **156**: 3203-3204.
- FLOOD, A., E. M. VELIE, R. SINHA, N. CHATERJEE, J. V. LACEY, JR. *et al.*, 2003 Meat, fat, and their subtypes as risk factors for colorectal cancer in a prospective cohort of women. *Am J Epidemiol* **158**: 59-68.
- FODDE, R., J. KUIPERS, C. ROSENBERG, R. SMITS, M. KIELMAN *et al.*, 2001 Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. *Nat Cell Biol* **3**: 433-438.
- FOREST, V., M. CLEMENT, F. PIERRE, K. MEFLAH and J. MENANTEAU, 2003a Butyrate restores motile function and actin cytoskeletal network integrity in *apc* mutated mouse colon epithelial cells. *Nutr Cancer* **45**: 84-92.
- FOREST, V., F. PIERRE, E. BASSONGA, K. MEFLAH, C. OLIVIER *et al.*, 2003b *Apc*⁺/*Min* colonic epithelial cells express TNF receptors and ICAM-1 when they are co-cultured with large intestine intra-epithelial lymphocytes. *Cell Immunol* **223**: 70-76.
- FREEMAN, H. J., 2008 Colorectal cancer risk in Crohn's disease. *World J Gastroenterol* **14**: 1810-1811.
- FRIEDL, W., R. CASPARI, M. SENGTELLER, S. UHLHAAS, C. LAMBERTI *et al.*, 2001 Can APC mutation analysis contribute to therapeutic decisions in familial adenomatous polyposis? Experience from 680 FAP families. *Gut* **48**: 515-521.
- FUKUDA, A., Y. NAKAMURA, H. OHIGASHI, T. OSAWA and K. UCHIDA, 1997 Cellular response to the redox active lipid peroxidation products: induction of glutathione S-transferase P by 4-hydroxy-2-nonenal. *Biochem Biophys Res Commun* **236**: 505-509.
- GALLAGHER, E. P., C. M. HUISDEN and J. L. GARDNER, 2007 Transfection of HepG2 cells with hGSTA4 provides protection against 4-hydroxynonenal-mediated oxidative injury. *Toxicol In Vitro* **21**: 1365-1372.
- GALLUZZI, L., N. JOZA, E. TASDEMIR, M. C. MAIURI, M. HENGARTNER *et al.*, 2008 No death without life: vital functions of apoptotic effectors. *Cell Death Differ* **15**: 1113-1123.
- GHOSH, S., and M. S. HAYDEN, 2008 New regulators of NF-kappaB in inflammation. *Nat Rev Immunol* **8**: 837-848.
- GILSING, A. M., S. I. BERNDT, E. H. RUDER, B. I. GRAUBARD, L. M. FERRUCCI *et al.*, 2012 Meat-related mutagen exposure, xenobiotic metabolizing gene polymorphisms and the risk of advanced colorectal adenoma and cancer. *Carcinogenesis* **33**: 1332-1339.
- GIOVANNUCCI, E., and W. C. WILLETT, 1994 Dietary factors and risk of colon cancer. *Ann Med* **26**: 443-452.
- GLEI, M., S. KLENOW, J. SAUER, U. WEGEWITZ, K. RICHTER *et al.*, 2006 Hemoglobin and heme induce DNA damage in human colon tumor cells HT29 clone 19A and in primary human colonocytes. *Mutat Res* **594**: 162-171.
- GLEI, M., A. SCHAEFERHENRICH, U. CLAUSSEN, A. KUECHLER, T. LIEHR *et al.*, 2007 Comet fluorescence in situ hybridization analysis for oxidative stress-induced DNA damage in colon cancer relevant genes. *Toxicol Sci* **96**: 279-284.
- GO, Y. M., P. J. HALVEY, J. M. HANSEN, M. REED, J. POHL *et al.*, 2007 Reactive aldehyde modification of thioredoxin-1 activates early steps of inflammation and cell adhesion. *Am J Pathol* **171**: 1670-1681.

- GOLDBOHM, R. A., P. A. VAN DEN BRANDT, P. VAN 'T VEER, H. A. BRANTS, E. DORANT *et al.*, 1994 A prospective cohort study on the relation between meat consumption and the risk of colon cancer. *Cancer Res* **54**: 718-723.
- GRADY, W. M., and S. D. MARKOWITZ, 2002 Genetic and epigenetic alterations in colon cancer. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **3**: 101-128.
- GREEN, D. R., and B. VICTOR, 2012 The pantheon of the fallen: why are there so many forms of cell death? *Trends Cell Biol* **22**: 555-556.
- GRETEN, F. R., L. ECKMANN, T. F. GRETEN, J. M. PARK, Z. W. LI *et al.*, 2004 IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* **118**: 285-296.
- GRIMSRUD, P. A., M. J. PICKLO, SR., T. J. GRIFFIN and D. A. BERNLOHR, 2007 Carbonylation of adipose proteins in obesity and insulin resistance: identification of adipocyte fatty acid-binding protein as a cellular target of 4-hydroxynonenal. *Mol Cell Proteomics* **6**: 624-637.
- GRUNE, T., and K. J. DAVIES, 2003 The proteasomal system and HNE-modified proteins. *Mol Aspects Med* **24**: 195-204.
- GRUNE, T., P. MICHEL, N. SITTE, W. EGGERT, H. ALBRECHT-NEBE *et al.*, 1997 Increased levels of 4-hydroxynonenal modified proteins in plasma of children with autoimmune diseases. *Free Radic Biol Med* **23**: 357-360.
- GUYTON, K. Z., Y. LIU, M. GOROSPE, Q. XU and N. J. HOLBROOK, 1996 Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂. Role in cell survival following oxidant injury. *J Biol Chem* **271**: 4138-4142.
- GUZMAN, M. L., R. M. ROSSI, S. NEELAKANTAN, X. LI, C. A. CORBETT *et al.*, 2007 An orally bioavailable parthenolide analog selectively eradicates acute myelogenous leukemia stem and progenitor cells. *Blood* **110**: 4427-4435.
- HA, N. C., T. TONOZUKA, J. L. STAMOS, H. J. CHOI and W. I. WEIS, 2004 Mechanism of phosphorylation-dependent binding of APC to beta-catenin and its role in beta-catenin degradation. *Mol Cell* **15**: 511-521.
- HAENSZEL, W., and P. CORREA, 1973 Cancer of the large intestine: epidemiologic findings. *Dis Colon Rectum* **16**: 371-377.
- HAJJAR, D. P., and M. E. HABERLAND, 1997 Lipoprotein trafficking in vascular cells. Molecular Trojan horses and cellular saboteurs. *J Biol Chem* **272**: 22975-22978.
- HAMILTON, R. F., JR., L. LI, W. L. ESCHENBACHER, L. SZWEDA and A. HOLIAN, 1998 Potential involvement of 4-hydroxynonenal in the response of human lung cells to ozone. *Am J Physiol* **274**: L8-16.
- HAMMOUD, S. S., B. R. CAIRNS and D. A. JONES, 2013 Epigenetic regulation of colon cancer and intestinal stem cells. *Curr Opin Cell Biol* **25**: 177-183.
- HARAMIS, A. P., A. HURLSTONE, Y. VAN DER VELDEN, H. BEGTHEL, M. VAN DEN BORN *et al.*, 2006 Adenomatous polyposis coli-deficient zebrafish are susceptible to digestive tract neoplasia. *EMBO Rep* **7**: 444-449.
- HARMS, J. S., and G. A. SPLITTER, 1995 Interferon-gamma inhibits transgene expression driven by SV40 or CMV promoters but augments expression driven by the mammalian MHC I promoter. *Hum Gene Ther* **6**: 1291-1297.
- HARUN, Z., and A. R. GHAZALI, 2012 Potential Chemoprevention Activity of Pterostilbene by Enhancing the Detoxifying Enzymes in the HT-29 Cell Line. *Asian Pac J Cancer Prev* **13**: 6403-6407.

- HATTORIA, N., M. WANGA, H. TAKA, T. FUJIMURA, A. YORITAKA *et al.*, 2009 Toxic effects of dopamine metabolism in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* **15 Suppl 1**: S35-38.
- HAYNES, R. L., B. BRUNE and A. J. TOWNSEND, 2001 Apoptosis in RAW 264.7 cells exposed to 4-hydroxy-2-nonenal: dependence on cytochrome C release but not p53 accumulation. *Free Radic Biol Med* **30**: 884-894.
- HE, Z. Y., C. B. SHI, H. WEN, F. L. LI, B. L. WANG *et al.*, 2011 Upregulation of p53 expression in patients with colorectal cancer by administration of curcumin. *Cancer Invest* **29**: 208-213.
- HEGYI, L., J. N. SKEPPER, N. R. CARY and M. J. MITCHINSON, 1996 Foam cell apoptosis and the development of the lipid core of human atherosclerosis. *J Pathol* **180**: 423-429.
- HERBST, U., M. TOBOREK, S. KAISER, M. P. MATTSON and B. HENNIG, 1999 4-Hydroxynonenal induces dysfunction and apoptosis of cultured endothelial cells. *J Cell Physiol* **181**: 295-303.
- HILL, B. G., B. P. DRANKA, L. ZOU, J. C. CHATHAM and V. M. DARLEY-USMAR, 2009 Importance of the bioenergetic reserve capacity in response to cardiomyocyte stress induced by 4-hydroxynonenal. *Biochem J* **424**: 99-107.
- HILL, B. G., P. HABERZETTL, Y. AHMED, S. SRIVASTAVA and A. BHATNAGAR, 2008 Unsaturated lipid peroxidation-derived aldehydes activate autophagy in vascular smooth-muscle cells. *Biochem J* **410**: 525-534.
- HIPKISS, A. R., 2009 Carnosine and its possible roles in nutrition and health. *Adv Food Nutr Res* **57**: 87-154.
- HOFF, H. F., J. O'NEIL, G. M. CHISOLM, 3RD, T. B. COLE, O. QUEHENBERGER *et al.*, 1989 Modification of low density lipoprotein with 4-hydroxynonenal induces uptake by macrophages. *Arteriosclerosis* **9**: 538-549.
- HOMMA, S., Y. ISHII, Y. MORISHIMA, T. YAMADORI, Y. MATSUNO *et al.*, 2009 Nrf2 enhances cell proliferation and resistance to anticancer drugs in human lung cancer. *Clin Cancer Res* **15**: 3423-3432.
- HORTIGON-VINAGRE, M. P., S. CHARDONNET, C. MONTIGNY, Y. GUTIERREZ-MARTIN, P. CHAMPEIL *et al.*, 2011 Inhibition by 4-hydroxynonenal (HNE) of Ca²⁺ transport by SERCA1a: low concentrations of HNE open protein-mediated leaks in the membrane. *Free Radic Biol Med* **50**: 323-336.
- HORVAY, K., F. CASAGRANDA, A. GANY, G. R. HIME and H. E. ABUD, 2011 Wnt signaling regulates Snai1 expression and cellular localization in the mouse intestinal epithelial stem cell niche. *Stem Cells Dev* **20**: 737-745.
- HOU, N., S. TORII, N. SAITO, M. HOSAKA and T. TAKEUCHI, 2008 Reactive oxygen species-mediated pancreatic beta-cell death is regulated by interactions between stress-activated protein kinases, p38 and c-Jun N-terminal kinase, and mitogen-activated protein kinase phosphatases. *Endocrinology* **149**: 1654-1665.
- HU, R., T. O. KHOR, G. SHEN, W. S. JEONG, V. HEBBAR *et al.*, 2006a Cancer chemoprevention of intestinal polyposis in ApcMin/+ mice by sulforaphane, a natural product derived from cruciferous vegetable. *Carcinogenesis* **27**: 2038-2046.
- HU, R., C. XU, G. SHEN, M. R. JAIN, T. O. KHOR *et al.*, 2006b Gene expression profiles induced by cancer chemopreventive isothiocyanate sulforaphane in the liver of C57BL/6J mice and C57BL/6J/Nrf2 (-/-) mice. *Cancer Lett* **243**: 170-192.
- HU, W., Z. FENG, J. EVELEIGH, G. IYER, J. PAN *et al.*, 2002 The major lipid peroxidation product, trans-4-hydroxy-2-nonenal, preferentially forms DNA adducts at codon 249 of human

- p53 gene, a unique mutational hotspot in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* **23**: 1781-1789.
- HUANG, H. C., T. NGUYEN and C. B. PICKETT, 2000a Regulation of the antioxidant response element by protein kinase C-mediated phosphorylation of NF-E2-related factor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 12475-12480.
- HUANG, H. C., T. NGUYEN and C. B. PICKETT, 2002 Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription. *J Biol Chem* **277**: 42769-42774.
- HUANG, S., A. DEGUZMAN, C. D. BUCANA and I. J. FIDLER, 2000b Nuclear factor-kappaB activity correlates with growth, angiogenesis, and metastasis of human melanoma cells in nude mice. *Clin Cancer Res* **6**: 2573-2581.
- HUANG, Y., W. LI and A. N. KONG, 2012 Anti-oxidative stress regulator NF-E2-related factor 2 mediates the adaptive induction of antioxidant and detoxifying enzymes by lipid peroxidation metabolite 4-hydroxynonenal. *Cell Biosci* **2**: 40.
- INAMI, Y., S. WAGURI, A. SAKAMOTO, T. KOUNO, K. NAKADA *et al.*, 2011 Persistent activation of Nrf2 through p62 in hepatocellular carcinoma cells. *J Cell Biol* **193**: 275-284.
- ISHIDATE, T., A. MATSUMINE, K. TOYOSHIMA and T. AKIYAMA, 2000 The APC-hDLG complex negatively regulates cell cycle progression from the G0/G1 to S phase. *Oncogene* **19**: 365-372.
- ISHIKAWA, S., S. TAMAKI, M. OHATA, K. ARIHARA and M. ITOH, 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.
- ISLAM, K. N., S. DEVARAJ and I. JIALAL, 1998 alpha-Tocopherol enrichment of monocytes decreases agonist-induced adhesion to human endothelial cells. *Circulation* **98**: 2255-2261.
- JACOBS, A. T., and L. J. MARNETT, 2007 Heat shock factor 1 attenuates 4-Hydroxynonenal-mediated apoptosis: critical role for heat shock protein 70 induction and stabilization of Bcl-XL. *J Biol Chem* **282**: 33412-33420.
- JACOBS, A. T., and L. J. MARNETT, 2009 HSF1-mediated BAG3 expression attenuates apoptosis in 4-hydroxynonenal-treated colon cancer cells via stabilization of anti-apoptotic Bcl-2 proteins. *J Biol Chem* **284**: 9176-9183.
- JAIN, A., T. LAMARK, E. SJOTTEM, K. B. LARSEN, J. A. AWUH *et al.*, 2010 p62/SQSTM1 is a target gene for transcription factor NRF2 and creates a positive feedback loop by inducing antioxidant response element-driven gene transcription. *J Biol Chem* **285**: 22576-22591.
- JAIN, A. K., D. A. BLOOM and A. K. JAISWAL, 2005 Nuclear import and export signals in control of Nrf2. *J Biol Chem* **280**: 29158-29168.
- JAIN, A. K., and A. K. JAISWAL, 2006 Phosphorylation of tyrosine 568 controls nuclear export of Nrf2. *J Biol Chem* **281**: 12132-12142.
- JANG, Y. J., J. E. KIM, N. J. KANG, K. W. LEE and H. J. LEE, 2009 Piceatannol attenuates 4-hydroxynonenal-induced apoptosis of PC12 cells by blocking activation of c-Jun N-terminal kinase. *Ann N Y Acad Sci* **1171**: 176-182.
- JENNER, P., 2003 Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol* **53 Suppl 3**: S26-36; discussion S36-28.

- JETTE, C., P. W. PETERSON, I. T. SANDOVAL, E. J. MANOS, E. HADLEY *et al.*, 2004 The tumor suppressor adenomatous polyposis coli and caudal related homeodomain protein regulate expression of retinol dehydrogenase L. *J Biol Chem* **279**: 34397-34405.
- Ji, C., V. AMARNATH, J. A. PIETENPOL and L. J. MARNETT, 2001a 4-hydroxynonenal induces apoptosis via caspase-3 activation and cytochrome c release. *Chem Res Toxicol* **14**: 1090-1096.
- Ji, C., K. R. KOZAK and L. J. MARNETT, 2001b I κ B kinase, a molecular target for inhibition by 4-hydroxy-2-nonenal. *J Biol Chem* **276**: 18223-18228.
- JOHNSON, J. J., and H. MUKHTAR, 2007 Curcumin for chemoprevention of colon cancer. *Cancer Lett* **255**: 170-181.
- JONES, R. M., J. W. MERCANTE and A. S. NEISH, 2012 Reactive oxygen production induced by the gut microbiota: pharmacotherapeutic implications. *Curr Med Chem* **19**: 1519-1529.
- JUNG, K. A., and M. K. KWAK, 2013 Enhanced 4-hydroxynonenal resistance in KEAP1 silenced human colon cancer cells. *Oxid Med Cell Longev* **2013**: 423965.
- JURIC-SEKHAR, G., K. ZARKOVIC, G. WAEG, A. CIPAK and N. ZARKOVIC, 2009 Distribution of 4-hydroxynonenal-protein conjugates as a marker of lipid peroxidation and parameter of malignancy in astrocytic and ependymal tumors of the brain. *Tumori* **95**: 762-768.
- KAGAN, V. E., V. A. TYURIN, J. JIANG, Y. Y. TYURINA, V. B. RITOV *et al.*, 2005 Cytochrome c acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors. *Nat Chem Biol* **1**: 223-232.
- KAMATA, H., S. HONDA, S. MAEDA, L. CHANG, H. HIRATA *et al.*, 2005 Reactive oxygen species promote TNF α -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell* **120**: 649-661.
- KANG, T., Y. WEI, Y. HONAKER, H. YAMAGUCHI, E. APPELLA *et al.*, 2008 GSK-3 β targets Cdc25A for ubiquitin-mediated proteolysis, and GSK-3 β inactivation correlates with Cdc25A overproduction in human cancers. *Cancer Cell* **13**: 36-47.
- KAPLAN, K. B., A. A. BURDS, J. R. SWEDLOW, S. S. BEKIR, P. K. SORGER *et al.*, 2001 A role for the Adenomatous Polyposis Coli protein in chromosome segregation. *Nat Cell Biol* **3**: 429-432.
- KARIHTALA, P., S. KAUPPILA, U. PUISTOLA and A. JUKKOLA-VUORINEN, 2011 Divergent behaviour of oxidative stress markers 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) and 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) in breast carcinogenesis. *Histopathology* **58**: 854-862.
- KARIM, B. O., and D. L. HUSO, 2013 Mouse models for colorectal cancer. *Am J Cancer Res* **3**: 240-250.
- KARIN, M., Y. CAO, F. R. GRETEN and Z. W. LI, 2002 NF- κ B in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer* **2**: 301-310.
- KARLHUBER, G. M., H. C. BAUER and P. M. ECKL, 1997 Cytotoxic and genotoxic effects of 4-hydroxynonenal in cerebral endothelial cells. *Mutat Res* **381**: 209-216.
- KATOH, Y., K. ITOH, E. YOSHIDA, M. MIYAGISHI, A. FUKAMIZU *et al.*, 2001 Two domains of Nrf2 cooperatively bind CBP, a CREB binding protein, and synergistically activate transcription. *Genes Cells* **6**: 857-868.
- KATSUOKA, F., H. MOTOHASHI, T. ISHII, H. ABURATANI, J. D. ENGEL *et al.*, 2005 Genetic evidence that small maf proteins are essential for the activation of antioxidant response element-dependent genes. *Mol Cell Biol* **25**: 8044-8051.
- KAWASAKI, Y., R. SATO and T. AKIYAMA, 2003 Mutated APC and Asef are involved in the migration of colorectal tumour cells. *Nat Cell Biol* **5**: 211-215.

- KAWASAKI, Y., T. SENDA, T. ISHIDATE, R. KOYAMA, T. MORISHITA *et al.*, 2000 Asef, a link between the tumor suppressor APC and G-protein signaling. *Science* **289**: 1194-1197.
- KELLER, J. N., R. J. MARK, A. J. BRUCE, E. BLANC, J. D. ROTHSTEIN *et al.*, 1997a 4-Hydroxynonenal, an aldehydic product of membrane lipid peroxidation, impairs glutamate transport and mitochondrial function in synaptosomes. *Neuroscience* **80**: 685-696.
- KELLER, J. N., Z. PANG, J. W. GEDDES, J. G. BEGLEY, A. GERMEYER *et al.*, 1997b Impairment of glucose and glutamate transport and induction of mitochondrial oxidative stress and dysfunction in synaptosomes by amyloid beta-peptide: role of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. *J Neurochem* **69**: 273-284.
- KEMP, Z., C. THIRLWELL, O. SIEBER, A. SILVER and I. TOMLINSON, 2004 An update on the genetics of colorectal cancer. *Hum Mol Genet* **13 Spec No 2**: R177-185.
- KENSLER, T. W., and N. WAKABAYASHI, 2010 Nrf2: friend or foe for chemoprevention? *Carcinogenesis* **31**: 90-99.
- KERR, S. E., C. B. THOMAS, S. N. THIBODEAU, M. J. FERBER and K. C. HALLING, 2013 APC germline mutations in individuals being evaluated for familial adenomatous polyposis: a review of the Mayo Clinic experience with 1591 consecutive tests. *J Mol Diagn* **15**: 31-43.
- KHANNA, S., C. K. SEN, S. ROY, M. O. CHRISTEN and L. PACKER, 1998 Protective effects of anethole dithiolethione against oxidative stress-induced cytotoxicity in human Jurkat T cells. *Biochem Pharmacol* **56**: 61-69.
- KHOR, T. O., M. T. HUANG, A. PRAWAN, Y. LIU, X. HAO *et al.*, 2008 Increased susceptibility of Nrf2 knockout mice to colitis-associated colorectal cancer. *Cancer Prev Res (Phila)* **1**: 187-191.
- KHOR, T. O., Y. HUANG, T. Y. WU, L. SHU, J. LEE *et al.*, 2011 Pharmacodynamics of curcumin as DNA hypomethylation agent in restoring the expression of Nrf2 via promoter CpGs demethylation. *Biochem Pharmacol* **82**: 1073-1078.
- KIM, H. R., S. KIM, E. J. KIM, J. H. PARK, S. H. YANG *et al.*, 2008a Suppression of Nrf2-driven heme oxygenase-1 enhances the chemosensitivity of lung cancer A549 cells toward cisplatin. *Lung Cancer* **60**: 47-56.
- KIM, K. C., and C. LEE, 2010 Curcumin Induces Downregulation of E2F4 Expression and Apoptotic Cell Death in HCT116 Human Colon Cancer Cells; Involvement of Reactive Oxygen Species. *Korean J Physiol Pharmacol* **14**: 391-397.
- KIM, N. W., M. A. PIATYSZEK, K. R. PROWSE, C. B. HARLEY, M. D. WEST *et al.*, 1994 Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* **266**: 2011-2015.
- KIM, S. B., R. K. PANDITA, U. ESKIOCAK, P. LY, A. KAISANI *et al.*, 2012 Targeting of Nrf2 induces DNA damage signaling and protects colonic epithelial cells from ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: E2949-2955.
- KIM, S. K., J. W. YANG, M. R. KIM, S. H. ROH, H. G. KIM *et al.*, 2008b Increased expression of Nrf2/ARE-dependent anti-oxidant proteins in tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Free Radic Biol Med* **45**: 537-546.
- KIM, T. H., E. G. HUR, S. J. KANG, J. A. KIM, D. THAPA *et al.*, 2011 NRF2 blockade suppresses colon tumor angiogenesis by inhibiting hypoxia-induced activation of HIF-1 α . *Cancer Res* **71**: 2260-2275.
- KIM, Y. R., J. E. OH, M. S. KIM, M. R. KANG, S. W. PARK *et al.*, 2010 Oncogenic NRF2 mutations in squamous cell carcinomas of oesophagus and skin. *J Pathol* **220**: 446-451.

- KNOLL, N., C. RUHE, S. VEERIAH, J. SAUER, M. GLEI *et al.*, 2005 Genotoxicity of 4-hydroxy-2-nonenal in human colon tumor cells is associated with cellular levels of glutathione and the modulation of glutathione S-transferase A4 expression by butyrate. *Toxicol Sci* **86**: 27-35.
- KNUDSON, A. G., JR., 1971 Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**: 820-823.
- KOBAYASHI, A., M. I. KANG, H. OKAWA, M. OHTSUJI, Y. ZENKE *et al.*, 2004 Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol Cell Biol* **24**: 7130-7139.
- KOBAYASHI, A., M. I. KANG, Y. WATAI, K. I. TONG, T. SHIBATA *et al.*, 2006 Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1. *Mol Cell Biol* **26**: 221-229.
- KOMATSU, M., S. KAGEYAMA and Y. ICHIMURA, 2012 p62/SQSTM1/A170: physiology and pathology. *Pharmacol Res* **66**: 457-462.
- KONDO, S., S. TOYOKUNI, Y. IWASA, T. TANAKA, H. ONODERA *et al.*, 1999 Persistent oxidative stress in human colorectal carcinoma, but not in adenoma. *Free Radic Biol Med* **27**: 401-410.
- KONG, D., and V. KOTRAIAH, 2012 Modulation of aldehyde dehydrogenase activity affects (+/-)-4-hydroxy-2E-nonenal (HNE) toxicity and HNE-protein adduct levels in PC12 cells. *J Mol Neurosci* **47**: 595-603.
- KOPROWSKA, K., and M. CZYZ, 2010 [Molecular mechanisms of parthenolide's action: Old drug with a new face]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* **64**: 100-114.
- KRATSOVNIK, E., Y. BROMBERG, O. SPERLING and E. ZOREF-SHANI, 2005 Oxidative stress activates transcription factor NF- κ B-mediated protective signaling in primary rat neuronal cultures. *J Mol Neurosci* **26**: 27-32.
- KRESO, A., C. A. O'BRIEN, P. VAN GALEN, O. I. GAN, F. NOTTA *et al.*, 2013 Variable clonal repopulation dynamics influence chemotherapy response in colorectal cancer. *Science* **339**: 543-548.
- KROHNE, T. U., N. K. STRATMANN, J. KOPITZ and F. G. HOLZ, 2010 Effects of lipid peroxidation products on lipofuscinogenesis and autophagy in human retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res* **90**: 465-471.
- KRUMAN, II, and M. P. MATTSON, 1999 Pivotal role of mitochondrial calcium uptake in neural cell apoptosis and necrosis. *J Neurochem* **72**: 529-540.
- KRUMAN, I., A. J. BRUCE-KELLER, D. BREDESEN, G. WAEG and M. P. MATTSON, 1997 Evidence that 4-hydroxynonenal mediates oxidative stress-induced neuronal apoptosis. *J Neurosci* **17**: 5089-5100.
- KUBOTA, M., M. SHIMIZU, H. SAKAI, Y. YASUDA, D. TERAKURA *et al.*, 2012 Preventive effects of curcumin on the development of azoxymethane-induced colonic preneoplastic lesions in male C57BL/KsJ-db/db obese mice. *Nutr Cancer* **64**: 72-79.
- KUHNERT, F., C. R. DAVIS, H. T. WANG, P. CHU, M. LEE *et al.*, 2004 Essential requirement for Wnt signaling in proliferation of adult small intestine and colon revealed by adenoviral expression of Dickkopf-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 266-271.
- KUISMANEN, S. A., M. T. HOLMBERG, R. SALOVAARA, A. DE LA CHAPPELLE and P. PELTOMAKI, 2000 Genetic and epigenetic modification of MLH1 accounts for a major share of microsatellite-unstable colorectal cancers. *Am J Pathol* **156**: 1773-1779.
- KUNE, S., G. A. KUNE and L. WATSON, 1986 The Melbourne colorectal cancer study: incidence findings by age, sex, site, migrants and religion. *Int J Epidemiol* **15**: 483-493.

- KUTUK, O., and H. BASAGA, 2007 Apoptosis signalling by 4-hydroxynonenal: a role for JNK-c-Jun/AP-1 pathway. *Redox Rep* **12**: 30-34.
- KUTUK, O., G. POLI and H. BASAGA, 2006 Resveratrol protects against 4-hydroxynonenal-induced apoptosis by blocking JNK and c-JUN/AP-1 signaling. *Toxicol Sci* **90**: 120-132.
- KWAK, M. K., K. ITOH, M. YAMAMOTO and T. W. KENSLE, 2002 Enhanced expression of the transcription factor Nrf2 by cancer chemopreventive agents: role of antioxidant response element-like sequences in the nrf2 promoter. *Mol Cell Biol* **22**: 2883-2892.
- KWAK, M. K., N. WAKABAYASHI, J. L. GREENLAW, M. YAMAMOTO and T. W. KENSLE, 2003 Antioxidants enhance mammalian proteasome expression through the Keap1-Nrf2 signaling pathway. *Mol Cell Biol* **23**: 8786-8794.
- LABORDE, E., 2010 Glutathione transferases as mediators of signaling pathways involved in cell proliferation and cell death. *Cell Death Differ* **17**: 1373-1380.
- LAMLUM, H., M. ILYAS, A. ROWAN, S. CLARK, V. JOHNSON *et al.*, 1999 The type of somatic mutation at APC in familial adenomatous polyposis is determined by the site of the germline mutation: a new facet to Knudson's 'two-hit' hypothesis. *Nat Med* **5**: 1071-1075.
- LARSSON, S. C., and A. WOLK, 2006 Meat consumption and risk of colorectal cancer: a meta-analysis of prospective studies. *Int J Cancer* **119**: 2657-2664.
- LASCORZ, J., A. FORSTI, B. CHEN, S. BUCH, V. STEINKE *et al.*, 2010 Genome-wide association study for colorectal cancer identifies risk polymorphisms in German familial cases and implicates MAPK signalling pathways in disease susceptibility. *Carcinogenesis* **31**: 1612-1619.
- LATRES, E., D. S. CHIAUR and M. PAGANO, 1999 The human F box protein beta-Trcp associates with the Cul1/Skp1 complex and regulates the stability of beta-catenin. *Oncogene* **18**: 849-854.
- LAU, A., X. J. WANG, F. ZHAO, N. F. VILLENEUVE, T. WU *et al.*, 2010 A noncanonical mechanism of Nrf2 activation by autophagy deficiency: direct interaction between Keap1 and p62. *Mol Cell Biol* **30**: 3275-3285.
- LAURORA, S., E. TAMAGNO, F. BRIATORE, P. BARDINI, S. PIZZIMENTI *et al.*, 2005 4-Hydroxynonenal modulation of p53 family gene expression in the SK-N-BE neuroblastoma cell line. *Free Radic Biol Med* **38**: 215-225.
- LEE, C. H., Y. T. JEON, S. H. KIM and Y. S. SONG, 2007 NF-kappaB as a potential molecular target for cancer therapy. *Biofactors* **29**: 19-35.
- LEE, H. R., J. M. CHO, D. H. SHIN, C. S. YONG, H. G. CHOI *et al.*, 2008a Adaptive response to GSH depletion and resistance to L-buthionine-(S,R)-sulfoximine: involvement of Nrf2 activation. *Mol Cell Biochem* **318**: 23-31.
- LEE, J. M., and J. A. JOHNSON, 2004 An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism. *J Biochem Mol Biol* **37**: 139-143.
- LEE, J. Y., G. Y. JUNG, H. J. HEO, M. R. YUN, J. Y. PARK *et al.*, 2006 4-Hydroxynonenal induces vascular smooth muscle cell apoptosis through mitochondrial generation of reactive oxygen species. *Toxicol Lett* **166**: 212-221.
- LEE, S. J., K. W. SEO, M. R. YUN, S. S. BAE, W. S. LEE *et al.*, 2008b 4-Hydroxynonenal enhances MMP-2 production in vascular smooth muscle cells via mitochondrial ROS-mediated activation of the Akt/NF-kappaB signaling pathways. *Free Radic Biol Med* **45**: 1487-1492.
- LEE, Y. J., N. Y. KIM, Y. A. SUH and C. LEE, 2011 Involvement of ROS in Curcumin-induced Autophagic Cell Death. *Korean J Physiol Pharmacol* **15**: 1-7.
- LENZEN, S., 2008 Oxidative stress: the vulnerable beta-cell. *Biochem Soc Trans* **36**: 343-347.

- LEONARDUZZI, G., E. CHIARPOTTO, F. BIASI and G. POLI, 2005 4-Hydroxynonenal and cholesterol oxidation products in atherosclerosis. *Mol Nutr Food Res* **49**: 1044-1049.
- LEVONEN, A. L., A. LANDAR, A. RAMACHANDRAN, E. K. CEASER, D. A. DICKINSON *et al.*, 2004 Cellular mechanisms of redox cell signalling: role of cysteine modification in controlling antioxidant defences in response to electrophilic lipid oxidation products. *Biochem J* **378**: 373-382.
- LEVY, S., A. K. JAISWAL and H. J. FORMAN, 2009 The role of c-Jun phosphorylation in EpRE activation of phase II genes. *Free Radic Biol Med* **47**: 1172-1179.
- LI, D., A. HINSHELWOOD, R. GARDNER, G. MCGARVIE and E. M. ELLIS, 2006a Mouse aldo-keto reductase AKR7A5 protects V79 cells against 4-hydroxynonenal-induced apoptosis. *Toxicology* **226**: 172-180.
- LI, J., R. SHARMA, B. PATRICK, A. SHARMA, P. V. JEYABAL *et al.*, 2006b Regulation of CD95 (Fas) expression and Fas-mediated apoptotic signaling in HLE B-3 cells by 4-hydroxynonenal. *Biochemistry* **45**: 12253-12264.
- LIAO, G. Z., G. Y. WANG, X. L. XU and G. H. ZHOU, 2010 Effect of cooking methods on the formation of heterocyclic aromatic amines in chicken and duck breast. *Meat Sci* **85**: 149-154.
- LINK, A., F. BALAGUER, Y. SHEN, J. J. LOZANO, H. C. LEUNG *et al.*, 2013 Curcumin modulates DNA methylation in colorectal cancer cells. *PLoS One* **8**: e57709.
- LIU, W., M. KATO, A. A. AKHAND, A. HAYAKAWA, H. SUZUKI *et al.*, 2000 4-hydroxynonenal induces a cellular redox status-related activation of the caspase cascade for apoptotic cell death. *J Cell Sci* **113 (Pt 4)**: 635-641.
- LIU, W., N. A. PORTER, C. SCHNEIDER, A. R. BRASH and H. YIN, 2011 Formation of 4-hydroxynonenal from cardiolipin oxidation: Intramolecular peroxy radical addition and decomposition. *Free Radic Biol Med* **50**: 166-178.
- LOBO, N. A., Y. SHIMONO, D. QIAN and M. F. CLARKE, 2007 The biology of cancer stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* **23**: 675-699.
- MA, J., H. CAI, T. WU, B. SOBHIAN, Y. HUO *et al.*, 2012 PALB2 interacts with KEAP1 to promote NRF2 nuclear accumulation and function. *Mol Cell Biol* **32**: 1506-1517.
- MAHMOUD, N. N., S. K. BOOLBOL, R. T. BILINSKI, C. MARTUCCI, A. CHADBURN *et al.*, 1997 Apc gene mutation is associated with a dominant-negative effect upon intestinal cell migration. *Cancer Res* **57**: 5045-5050.
- MALONE, P. E., and M. R. HERNANDEZ, 2007 4-Hydroxynonenal, a product of oxidative stress, leads to an antioxidant response in optic nerve head astrocytes. *Exp Eye Res* **84**: 444-454.
- MARCHETTE, L. D., H. WANG, F. LI, M. A. BABIZHAYEV and A. KASUS-JACOBI, Carcinine has 4-hydroxynonenal scavenging property and neuroprotective effect in mouse retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **53**: 3572-3583.
- MARK, R. J., K. HENSLEY, D. A. BUTTERFIELD and M. P. MATTSON, 1995 Amyloid beta-peptide impairs ion-motive ATPase activities: evidence for a role in loss of neuronal Ca²⁺ homeostasis and cell death. *J Neurosci* **15**: 6239-6249.
- MARK, R. J., M. A. LOVELL, W. R. MARKESBERY, K. UCHIDA and M. P. MATTSON, 1997 A role for 4-hydroxynonenal, an aldehydic product of lipid peroxidation, in disruption of ion homeostasis and neuronal death induced by amyloid beta-peptide. *J Neurochem* **68**: 255-264.

- MARQUEZ-QUINONES, A., A. CIPAK, K. ZARKOVIC, S. FATTEL-FAZENDA, S. VILLA-TREVINO *et al.*, 2010 HNE-protein adducts formation in different pre-carcinogenic stages of hepatitis in LEC rats. *Free Radic Res* **44**: 119-127.
- MARRA, F., R. DEFRANCO, C. GRAPPONE, M. PAROLA, S. MILANI *et al.*, 1999 Expression of monocyte chemotactic protein-1 precedes monocyte recruitment in a rat model of acute liver injury, and is modulated by vitamin E. *J Investig Med* **47**: 66-75.
- MATSUNAGA, T., Y. SHINODA, Y. INOUE, S. ENDO, O. EL-KABBANI *et al.*, Protective effect of rat aldo-keto reductase (AKR1C15) on endothelial cell damage elicited by 4-hydroxy-2-nonenal. *Chem Biol Interact* **191**: 364-370.
- MATTSON, M. P., 2009 Roles of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in obesity, the metabolic syndrome, and associated vascular and neurodegenerative disorders. *Exp Gerontol* **44**: 625-633.
- MCCART, A. E., N. K. VICKARYOUS and A. SILVER, 2008 Apc mice: models, modifiers and mutants. *Pathol Res Pract* **204**: 479-490.
- MCCONNELL, E. J., and B. U. RAESS, 2002 Intracellular Ca²⁺ homeostatic regulation and 4-hydroxynonenal-induced aortic endothelial dysfunction. *Endothelium* **9**: 45-53.
- MCCUBREY, J. A., and R. A. FRANKLIN, 2006 Reactive oxygen intermediates and signaling through kinase pathways. *Antioxid Redox Signal* **8**: 1745-1748.
- MCCUBREY, J. A., M. M. LAHAIR and R. A. FRANKLIN, 2006 Reactive oxygen species-induced activation of the MAP kinase signaling pathways. *Antioxid Redox Signal* **8**: 1775-1789.
- MCMAHON, M., N. THOMAS, K. ITOH, M. YAMAMOTO and J. D. HAYES, 2004 Redox-regulated turnover of Nrf2 is determined by at least two separate protein domains, the redox-sensitive Neh2 degron and the redox-insensitive Neh6 degron. *J Biol Chem* **279**: 31556-31567.
- MEHLEN, P., and E. R. FEARON, 2004 Role of the dependence receptor DCC in colorectal cancer pathogenesis. *J Clin Oncol* **22**: 3420-3428.
- MENA, S., M. L. RODRIGUEZ, X. PONSODA, J. M. ESTRELA, M. JAATTELA *et al.*, 2012 Pterostilbene-induced tumor cytotoxicity: a lysosomal membrane permeabilization-dependent mechanism. *PLoS One* **7**: e44524.
- MENG, D., X. SHI, B. H. JIANG and J. FANG, 2007 Insulin-like growth factor-I (IGF-I) induces epidermal growth factor receptor transactivation and cell proliferation through reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* **42**: 1651-1660.
- MEYER, M., R. SCHRECK and P. A. BAEUERLE, 1993 H₂O₂ and antioxidants have opposite effects on activation of NF-kappa B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. *EMBO J* **12**: 2005-2015.
- MILACIC, V., S. BANERJEE, K. R. LANDIS-PIWOWAR, F. H. SARKAR, A. P. MAJUMDAR *et al.*, 2008 Curcumin inhibits the proteasome activity in human colon cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* **68**: 7283-7292.
- MINASSI, A., G. SANCHEZ-DUFFHUES, J. A. COLLADO, E. MUNOZ and G. APPENDINO, 2013 Dissecting the pharmacophore of curcumin. Which structural element is critical for which action? *J Nat Prod* **76**: 1105-1112.
- MIRANDA, C. L., R. L. REED, H. C. KUIPER, S. ALBER and J. F. STEVENS, 2009 Ascorbic acid promotes detoxification and elimination of 4-hydroxy-2(E)-nonenal in human monocytic THP-1 cells. *Chem Res Toxicol* **22**: 863-874.
- MISETA, A., and P. CSUTORA, 2000 Relationship between the occurrence of cysteine in proteins and the complexity of organisms. *Mol Biol Evol* **17**: 1232-1239.

- MITSUISHI, Y., H. MOTOHASHI and M. YAMAMOTO, 2012a The Keap1-Nrf2 system in cancers: stress response and anabolic metabolism. *Front Oncol* **2**: 200.
- MITSUISHI, Y., K. TAGUCHI, Y. KAWATANI, T. SHIBATA, T. NUKIWA *et al.*, 2012b Nrf2 redirects glucose and glutamine into anabolic pathways in metabolic reprogramming. *Cancer Cell* **22**: 66-79.
- MIYOSHI, Y., H. ANDO, H. NAGASE, I. NISHISHO, A. HORII *et al.*, 1992 Germ-line mutations of the APC gene in 53 familial adenomatous polyposis patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 4452-4456.
- MOI, P., K. CHAN, I. ASUNIS, A. CAO and Y. W. KAN, 1994 Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 9926-9930.
- MOREL, P., C. TALLINEAU, R. PONTCHARRAUD, A. PIRIOU and F. HUGUET, 1998 Effects of 4-hydroxynonenal, a lipid peroxidation product, on dopamine transport and Na⁺/K⁺ ATPase in rat striatal synaptosomes. *Neurochem Int* **33**: 531-540.
- MORRISON, E. E., B. N. WARDLEWORTH, J. M. ASKHAM, A. F. MARKHAM and D. M. MEREDITH, 1998 EB1, a protein which interacts with the APC tumour suppressor, is associated with the microtubule cytoskeleton throughout the cell cycle. *Oncogene* **17**: 3471-3477.
- MOSELEY, J. B., F. BARTOLINI, K. OKADA, Y. WEN, G. G. GUNDERSEN *et al.*, 2007 Regulated binding of adenomatous polyposis coli protein to actin. *J Biol Chem* **282**: 12661-12668.
- MOSER, A. R., E. M. MATTES, W. F. DOVE, M. J. LINDSTROM, J. D. HAAG *et al.*, 1993 ApcMin, a mutation in the murine Apc gene, predisposes to mammary carcinomas and focal alveolar hyperplasias. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 8977-8981.
- MOSER, A. R., H. C. PITOT and W. F. DOVE, 1990 A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. *Science* **247**: 322-324.
- MOTTARAN, E., S. F. STEWART, R. ROLLA, D. VAY, V. CIPRIANI *et al.*, 2002 Lipid peroxidation contributes to immune reactions associated with alcoholic liver disease. *Free Radic Biol Med* **32**: 38-45.
- MULLER, C., J. BANDEMER, C. VINDIS, C. CAMARE, E. MUCHER *et al.*, 2013 Protein Disulfide Isomerase Modification and Inhibition Contribute to ER Stress and Apoptosis Induced by Oxidized Low Density Lipoproteins. *Antioxid Redox Signal* **18**: 731-742.
- MURPHY, E. A., J. M. DAVIS, J. L. MCCLELLAN, B. T. GORDON and M. D. CARMICHAEL, 2011 Curcumin's effect on intestinal inflammation and tumorigenesis in the ApcMin/+ mouse. *J Interferon Cytokine Res* **31**: 219-226.
- MURPHY, T. C., V. AMARNATH, K. M. GIBSON and M. J. PICKLO, SR., 2003 Oxidation of 4-hydroxy-2-nonenal by succinic semialdehyde dehydrogenase (ALDH5A). *J Neurochem* **86**: 298-305.
- MUSONDA, C. A., and J. K. CHIPMAN, 1998 Quercetin inhibits hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced NF-kappaB DNA binding activity and DNA damage in HepG2 cells. *Carcinogenesis* **19**: 1583-1589.
- NADAULD, L. D., S. CHIDESTER, D. N. SHELTON, K. RAI, T. BROADBENT *et al.*, 2006 Dual roles for adenomatous polyposis coli in regulating retinoic acid biosynthesis and Wnt during ocular development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 13409-13414.
- NAGAI, H., T. NOGUCHI, K. TAKEDA and H. ICHIJO, 2007 Pathophysiological roles of ASK1-MAP kinase signaling pathways. *J Biochem Mol Biol* **40**: 1-6.
- NAGARAJU, G. P., S. ALIYA, S. F. ZAFAR, R. BASHA, R. DIAZ *et al.*, 2012 The impact of curcumin on breast cancer. *Integr Biol (Camb)* **4**: 996-1007.

- NAKAMURA, M., X. Z. ZHOU and K. P. LU, 2001 Critical role for the EB1 and APC interaction in the regulation of microtubule polymerization. *Curr Biol* **11**: 1062-1067.
- NAKSHATRI, H., S. E. RICE and P. BHAT-NAKSHATRI, 2004 Antitumor agent parthenolide reverses resistance of breast cancer cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand through sustained activation of c-Jun N-terminal kinase. *Oncogene* **23**: 7330-7344.
- NAUTIYAL, J., S. S. KANWAR, Y. YU and A. P. MAJUMDAR, 2011 Combination of dasatinib and curcumin eliminates chemo-resistant colon cancer cells. *J Mol Signal* **6**: 7.
- NEELY, M. D., L. ZIMMERMAN, M. J. PICKLO, J. J. OU, C. R. MORALES *et al.*, 2000 Congeners of N(alpha)-acetyl-L-cysteine but not aminoguanidine act as neuroprotectants from the lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal. *Free Radic Biol Med* **29**: 1028-1036.
- NEGRE-SALVAYRE, A., O. VIEIRA, I. ESCARGUEIL-BLANC and R. SALVAYRE, 2003 Oxidized LDL and 4-hydroxynonenal modulate tyrosine kinase receptor activity. *Mol Aspects Med* **24**: 251-261.
- NEUFELD, K. L., 2009 Nuclear APC. *Adv Exp Med Biol* **656**: 13-29.
- NEZIS, I. P., and H. STENMARK, 2012 p62 at the interface of autophagy, oxidative stress signaling, and cancer. *Antioxid Redox Signal* **17**: 786-793.
- NIHO, N., M. TAKAHASHI, T. KITAMURA, Y. SHOJI, M. ITOH *et al.*, 2003 Concomitant suppression of hyperlipidemia and intestinal polyp formation in Apc-deficient mice by peroxisome proliferator-activated receptor ligands. *Cancer Res* **63**: 6090-6095.
- NIOI, P., and T. NGUYEN, 2007 A mutation of Keap1 found in breast cancer impairs its ability to repress Nrf2 activity. *Biochem Biophys Res Commun* **362**: 816-821.
- NIOI, P., T. NGUYEN, P. J. SHERRATT and C. B. PICKETT, 2005 The carboxy-terminal Neh3 domain of Nrf2 is required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* **25**: 10895-10906.
- NITURE, S. K., and A. K. JAISWAL, 2012 Nrf2 protein up-regulates antiapoptotic protein Bcl-2 and prevents cellular apoptosis. *J Biol Chem* **287**: 9873-9886.
- NITURE, S. K., and A. K. JAISWAL, 2013 Nrf2-induced antiapoptotic Bcl-xL protein enhances cell survival and drug resistance. *Free Radic Biol Med* **57**: 119-131.
- NITURE, S. K., R. KHATRI and A. K. JAISWAL, 2013 Regulation of Nrf2-an update. *Free Radic Biol Med*.
- NORAT, T., S. BINGHAM, P. FERRARI, N. SLIMANI, M. JENAB *et al.*, 2005 Meat, fish, and colorectal cancer risk: the European Prospective Investigation into cancer and nutrition. *J Natl Cancer Inst* **97**: 906-916.
- NORAT, T., A. LUKANOVA, P. FERRARI and E. RIBOLI, 2002 Meat consumption and colorectal cancer risk: dose-response meta-analysis of epidemiological studies. *Int J Cancer* **98**: 241-256.
- NORAT, T., and E. RIBOLI, 2001 Meat consumption and colorectal cancer: a review of epidemiologic evidence. *Nutr Rev* **59**: 37-47.
- NOUGAYREDE, J. P., and E. OSWALD, 2011 [Microbiota and colorectal cancer: genotoxic bacteria in the intestinal tract]. *Bull Acad Natl Med* **195**: 1295-1304; discussion 1304-1295.
- NUMAZAWA, S., M. ISHIKAWA, A. YOSHIDA, S. TANAKA and T. YOSHIDA, 2003 Atypical protein kinase C mediates activation of NF-E2-related factor 2 in response to oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol* **285**: C334-342.
- NUTAKUL, W., H. S. SOBERS, P. QIU, P. DONG, E. A. DECKER *et al.*, 2011 Inhibitory effects of resveratrol and pterostilbene on human colon cancer cells: a side-by-side comparison. *J Agric Food Chem* **59**: 10964-10970.

- O'BRIEN, C. A., A. POLLETT, S. GALLINGER and J. E. DICK, 2007 A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* **445**: 106-110.
- O'DWYER, P. J., C. E. SZARKA, K. S. YAO, T. C. HALBHERR, G. R. PFEIFFER *et al.*, 1996 Modulation of gene expression in subjects at risk for colorectal cancer by the chemopreventive dithiolethione oltipraz. *J Clin Invest* **98**: 1210-1217.
- OBERLEY, T. D., S. TOYOKUNI and L. I. SZWEDA, 1999 Localization of hydroxynonenal protein adducts in normal human kidney and selected human kidney cancers. *Free Radic Biol Med* **27**: 695-703.
- OGAWA, K., J. SUN, S. TAKETANI, O. NAKAJIMA, C. NISHITANI *et al.*, 2001 Heme mediates derepression of Maf recognition element through direct binding to transcription repressor Bach1. *EMBO J* **20**: 2835-2843.
- OHTA, T., K. IJIMA, M. MIYAMOTO, I. NAKAHARA, H. TANAKA *et al.*, 2008 Loss of Keap1 function activates Nrf2 and provides advantages for lung cancer cell growth. *Cancer Res* **68**: 1303-1309.
- OKAWA, H., H. MOTOHASHI, A. KOBAYASHI, H. ABURATANI, T. W. KENSLER *et al.*, 2006 Hepatocyte-specific deletion of the Keap1 gene activates Nrf2 and confers potent resistance against acute drug toxicity. *Biochem Biophys Res Commun* **339**: 79-88.
- OLLBERDING, N. J., L. R. WILKENS, B. E. HENDERSON, L. N. KOLONEL and L. LE MARCHAND, 2012 Meat consumption, heterocyclic amines and colorectal cancer risk: the Multiethnic Cohort Study. *Int J Cancer* **131**: E1125-1133.
- OSBURN, W. O., B. KARIM, P. M. DOLAN, G. LIU, M. YAMAMOTO *et al.*, 2007 Increased colonic inflammatory injury and formation of aberrant crypt foci in Nrf2-deficient mice upon dextran sulfate treatment. *Int J Cancer* **121**: 1883-1891.
- OSBURN, W. O., M. S. YATES, P. D. DOLAN, S. CHEN, K. T. LIBY *et al.*, 2008 Genetic or pharmacologic amplification of Nrf2 signaling inhibits acute inflammatory liver injury in mice. *Toxicol Sci* **104**: 218-227.
- OSHIMA, H., M. OSHIMA, M. KOBAYASHI, M. TSUTSUMI and M. M. TAKETO, 1997 Morphological and molecular processes of polyp formation in Apc(delta716) knockout mice. *Cancer Res* **57**: 1644-1649.
- PADMANABHAN, B., K. I. TONG, T. OHTA, Y. NAKAMURA, M. SCHARLOCK *et al.*, 2006 Structural basis for defects of Keap1 activity provoked by its point mutations in lung cancer. *Mol Cell* **21**: 689-700.
- PAPKOFF, J., and M. AIKAWA, 1998 WNT-1 and HGF regulate GSK3 beta activity and beta-catenin signaling in mammary epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **247**: 851-858.
- PAPPA, A., C. CHEN, Y. KOUTALOS, A. J. TOWNSEND and V. VASILIOU, 2003 Aldh3a1 protects human corneal epithelial cells from ultraviolet- and 4-hydroxy-2-nonenal-induced oxidative damage. *Free Radic Biol Med* **34**: 1178-1189.
- PAROLA, M., G. BELLOMO, G. ROBINO, G. BARRERA and M. U. DIANZANI, 1999 4-Hydroxynonenal as a biological signal: molecular basis and pathophysiological implications. *Antioxid Redox Signal* **1**: 255-284.
- PAROLA, M., G. ROBINO, F. MARRA, M. PINZANI, G. BELLOMO *et al.*, 1998 HNE interacts directly with JNK isoforms in human hepatic stellate cells. *J Clin Invest* **102**: 1942-1950.
- PATEL, B. B., R. SENGUPTA, S. QAZI, H. VACHHANI, Y. YU *et al.*, 2008 Curcumin enhances the effects of 5-fluorouracil and oxaliplatin in mediating growth inhibition of colon cancer cells by modulating EGFR and IGF-1R. *Int J Cancer* **122**: 267-273.

- PATEL, V. B., S. MISRA, B. B. PATEL and A. P. MAJUMDAR, 2010 Colorectal cancer: chemopreventive role of curcumin and resveratrol. *Nutr Cancer* **62**: 958-967.
- PATRICK, B., J. LI, P. V. JEYABAL, P. M. REDDY, Y. YANG *et al.*, 2005 Depletion of 4-hydroxynonenal in hGSTA4-transfected HLE B-3 cells results in profound changes in gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* **334**: 425-432.
- PAUL, S., A. J. DECASTRO, H. J. LEE, A. K. SMOLAREK, J. Y. So *et al.*, 2010 Dietary intake of pterostilbene, a constituent of blueberries, inhibits the beta-catenin/p65 downstream signaling pathway and colon carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis* **31**: 1272-1278.
- PAUL, S., A. M. RIMANDO, H. J. LEE, Y. JI, B. S. REDDY *et al.*, 2009 Anti-inflammatory action of pterostilbene is mediated through the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in colon cancer cells. *Cancer Prev Res (Phila)* **2**: 650-657.
- PENEGAR, S., W. WOOD, S. LUBBE, I. CHANDLER, P. BRODERICK *et al.*, 2007 National study of colorectal cancer genetics. *Br J Cancer* **97**: 1305-1309.
- PENG, Z. F., C. H. KOH, Q. T. LI, J. MANIKANDAN, A. J. MELENDEZ *et al.*, 2007 Deciphering the mechanism of HNE-induced apoptosis in cultured murine cortical neurons: transcriptional responses and cellular pathways. *Neuropharmacology* **53**: 687-698.
- PERRY, E. A., R. J. CASTELLANI, P. I. MOREIRA, A. NUNOMURA, Q. LUI *et al.*, 2013 Neurofilaments are the major neuronal target of hydroxynonenal-mediated protein cross-links. *Free Radic Res* **47**: 507-510.
- PETTAN-BREWER, C., J. MORTON, R. MANGALINDAN and W. LADIGES, 2011 Curcumin suppresses intestinal polyps in APC Min mice fed a high fat diet. *Pathobiol Aging Age Relat Dis* **1**.
- PETTAZZONI, P., E. CIAMPORCERO, C. MEDANA, S. PIZZIMENTI, F. DAL BELLO *et al.*, 2011 Nuclear factor erythroid 2-related factor-2 activity controls 4-hydroxynonenal metabolism and activity in prostate cancer cells. *Free Radic Biol Med* **51**: 1610-1618.
- PETTAZZONI, P., S. PIZZIMENTI, C. TOALDO, P. SOTOMAYOR, L. TAGLIAVACCA *et al.*, Induction of cell cycle arrest and DNA damage by the HDAC inhibitor panobinostat (LBH589) and the lipid peroxidation end product 4-hydroxynonenal in prostate cancer cells. *Free Radic Biol Med* **50**: 313-322.
- PHILLIPS, D. H., 1999 Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. *Mutat Res* **443**: 139-147.
- PIERRE, F., A. FREEMAN, S. TACHE, R. VAN DER MEER and D. E. CORPET, 2004 Beef meat and blood sausage promote the formation of azoxymethane-induced mucin-depleted foci and aberrant crypt foci in rat colons. *J Nutr* **134**: 2711-2716.
- PIERRE, F., G. PEIRO, S. TACHE, A. J. CROSS, S. A. BINGHAM *et al.*, 2006 New marker of colon cancer risk associated with heme intake: 1,4-dihydroxynonane mercapturic acid. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **15**: 2274-2279.
- PIERRE, F., S. TACHE, F. GUERAUD, A. L. REROLE, M. L. JOURDAN *et al.*, 2007 Apc mutation induces resistance of colonic cells to lipoperoxide-triggered apoptosis induced by faecal water from haem-fed rats. *Carcinogenesis* **28**: 321-327.
- PIETINEN, P., N. MALILA, M. VIRTANEN, T. J. HARTMAN, J. A. TANGREA *et al.*, 1999 Diet and risk of colorectal cancer in a cohort of Finnish men. *Cancer Causes Control* **10**: 387-396.
- PIZZIMENTI, S., G. BARRERA, M. U. DIANZANI and S. BRUSSELBACH, 1999 Inhibition of D1, D2, and A-cyclin expression in HL-60 cells by the lipid peroxydation product 4-hydroxynonenal. *Free Radic Biol Med* **26**: 1578-1586.
- PIZZIMENTI, S., S. LAURORA, F. BRIATORE, C. FERRETTI, M. U. DIANZANI *et al.*, 2002 Synergistic effect of 4-hydroxynonenal and PPAR ligands in controlling human leukemic cell growth and differentiation. *Free Radic Biol Med* **32**: 233-245.

- PIZZIMENTI, S., E. MENEGATTI, D. BERARDI, C. TOALDO, P. PETTAZZONI *et al.*, 2010 4-hydroxynonenal, a lipid peroxidation product of dietary polyunsaturated fatty acids, has anticarcinogenic properties in colon carcinoma cell lines through the inhibition of telomerase activity. *J Nutr Biochem* **21**: 818-826.
- PLUMMER, S. M., K. A. HOLLOWAY, M. M. MANSON, R. J. MUNKS, A. KAPTEIN *et al.*, 1999 Inhibition of cyclo-oxygenase 2 expression in colon cells by the chemopreventive agent curcumin involves inhibition of NF-kappaB activation via the NIK/IKK signalling complex. *Oncogene* **18**: 6013-6020.
- POLI, G., R. J. SCHAUR, W. G. SIEMS and G. LEONARDUZZI, 2008 4-hydroxynonenal: a membrane lipid oxidation product of medicinal interest. *Med Res Rev* **28**: 569-631.
- PRETLOW, T. P., B. J. BARROW, W. S. ASHTON, M. A. O'RIORDAN, T. G. PRETLOW *et al.*, 1991 Aberrant crypts: putative preneoplastic foci in human colonic mucosa. *Cancer Res* **51**: 1564-1567.
- PRIMIANO, T., P. A. EGNER, T. R. SUTTER, G. J. KELLOFF, B. D. ROEBUCK *et al.*, 1995 Intermittent dosing with oltipraz: relationship between chemoprevention of aflatoxin-induced tumorigenesis and induction of glutathione S-transferases. *Cancer Res* **55**: 4319-4324.
- PUISSANT, A., N. FENOUILLE and P. AUBERGER, 2012 When autophagy meets cancer through p62/SQSTM1. *Am J Cancer Res* **2**: 397-413.
- RADA, P., A. I. ROJO, S. CHOWDHRY, M. MCMAHON, J. D. HAYES *et al.*, 2011 SCF/ β -TrCP promotes glycogen synthase kinase 3-dependent degradation of the Nrf2 transcription factor in a Keap1-independent manner. *Mol Cell Biol* **31**: 1121-1133.
- RADULESCU, S., M. J. BROOKES, P. SALGUEIRO, R. A. RIDGWAY, E. MCGHEE *et al.*, 2012 Luminal iron levels govern intestinal tumorigenesis after Apc loss in vivo. *Cell Rep* **2**: 270-282.
- RAMACHANDRAN, V., L. T. WATTS, S. K. MAFFI, J. CHEN, S. SCHENKER *et al.*, 2003 Ethanol-induced oxidative stress precedes mitochondrially mediated apoptotic death of cultured fetal cortical neurons. *J Neurosci Res* **74**: 577-588.
- RAMOS-GOMEZ, M., M. K. KWAK, P. M. DOLAN, K. ITOH, M. YAMAMOTO *et al.*, 2001 Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 3410-3415.
- RANGASAMY, T., C. Y. CHO, R. K. THIMMULAPPA, L. ZHEN, S. S. SRISUMA *et al.*, 2004 Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice. *J Clin Invest* **114**: 1248-1259.
- RAVINDRAN, J., S. PRASAD and B. B. AGGARWAL, 2009 Curcumin and cancer cells: how many ways can curry kill tumor cells selectively? *AAPS J* **11**: 495-510.
- RAZA, H., and A. JOHN, 2006 4-hydroxynonenal induces mitochondrial oxidative stress, apoptosis and expression of glutathione S-transferase A4-4 and cytochrome P450 2E1 in PC12 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* **216**: 309-318.
- REN, J., C. FAN, N. CHEN, J. HUANG and Q. YANG, 2011 Resveratrol pretreatment attenuates cerebral ischemic injury by upregulating expression of transcription factor Nrf2 and HO-1 in rats. *Neurochem Res* **36**: 2352-2362.
- RIahi, Y., N. KAISER, G. LEIBOWITZ, A. V. SIMA, M. SIMIONESCU *et al.*, 2012 Mechanism of foam cell-induced endothelial cell senescence in atherosclerosis. *EAS Congress Abstract book* **80th European Atherosclerosis Society Congress**.
- RICCI-VITIANI, L., D. G. LOMBARDI, E. PILOZZI, M. BIFFONI, M. TODARO *et al.*, 2007 Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* **445**: 111-115.

- RICHMOND, A., 2002 Nf-kappa B, chemokine gene transcription and tumour growth. *Nat Rev Immunol* **2**: 664-674.
- ROBERTS-THOMSON, I. C., W. J. BUTLER and P. RYAN, 1999 Meat, metabolic genotypes and risk for colorectal cancer. *Eur J Cancer Prev* **8**: 207-211.
- ROCKWELL, P., H. YUAN, R. MAGNUSSON and M. E. FIGUEIREDO-PEREIRA, 2000 Proteasome inhibition in neuronal cells induces a proinflammatory response manifested by upregulation of cyclooxygenase-2, its accumulation as ubiquitin conjugates, and production of the prostaglandin PGE(2). *Arch Biochem Biophys* **374**: 325-333.
- ROGLER, G., K. BRAND, D. VOGL, S. PAGE, R. HOFMEISTER *et al.*, 1998 Nuclear factor kappaB is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology* **115**: 357-369.
- RON, D., and P. WALTER, 2007 Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 519-529.
- ROSE, D. P., A. P. BOYAR and E. L. WYNDR, 1986 International comparisons of mortality rates for cancer of the breast, ovary, prostate, and colon, and per capita food consumption. *Cancer* **58**: 2363-2371.
- ROSSI, M. A., F. FIDALE, A. GARRAMONE, H. ESTERBAUER and M. U. DIANZANI, 1990 Effect of 4-hydroxylalkenals on hepatic phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate-phospholipase C. *Biochem Pharmacol* **39**: 1715-1719.
- RUEF, J., G. N. RAO, F. LI, C. BODE, C. PATTERSON *et al.*, 1998 Induction of rat aortic smooth muscle cell growth by the lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal. *Circulation* **97**: 1071-1078.
- RUFFELS, J., M. GRIFFIN and J. M. DICKENSON, 2004 Activation of ERK1/2, JNK and PKB by hydrogen peroxide in human SH-SY5Y neuroblastoma cells: role of ERK1/2 in H2O2-induced cell death. *Eur J Pharmacol* **483**: 163-173.
- SAHARA, S., and T. YAMASHIMA, 2010 Calpain-mediated Hsp70.1 cleavage in hippocampal CA1 neuronal death. *Biochem Biophys Res Commun* **393**: 806-811.
- SALABEI, J. K., T. D. CUMMINS, M. SINGH, S. P. JONES, A. BHATNAGAR *et al.*, 2013 PDGF-mediated autophagy regulates vascular smooth muscle cell phenotype and resistance to oxidative stress. *Biochem J* **451**: 375-388.
- SALOMONI, P., and A. F. KHELIFI, 2006 Daxx: death or survival protein? *Trends Cell Biol* **16**: 97-104.
- SANDHU, M. S., I. R. WHITE and K. MCPHERSON, 2001 Systematic review of the prospective cohort studies on meat consumption and colorectal cancer risk: a meta-analytical approach. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **10**: 439-446.
- SANGOKOYA, C., M. J. TELEN and J. T. CHI, 2010 microRNA miR-144 modulates oxidative stress tolerance and associates with anemia severity in sickle cell disease. *Blood* **116**: 4338-4348.
- SANTOS, C. X., L. Y. TANAKA, J. WOSNIAK and F. R. LAURINDO, 2009 Mechanisms and implications of reactive oxygen species generation during the unfolded protein response: roles of endoplasmic reticulum oxidoreductases, mitochondrial electron transport, and NADPH oxidase. *Antioxid Redox Signal* **11**: 2409-2427.
- SASAKI, H., H. SATO, K. KURIYAMA-MATSUMURA, K. SATO, K. MAEBARA *et al.*, 2002 Electrophile response element-mediated induction of the cystine/glutamate exchange transporter gene expression. *J Biol Chem* **277**: 44765-44771.

- SASAKI, H., M. SHITARA, K. YOKOTA, Y. HIKOSAKA, S. MORIYAMA *et al.*, 2012 Increased NRF2 gene (NFE2L2) copy number correlates with mutations in lung squamous cell carcinomas. *Mol Med Rep* **6**: 391-394.
- SATOH, H., T. MORIGUCHI, K. TAGUCHI, J. TAKAI, J. M. MAHER *et al.*, 2010 Nrf2-deficiency creates a responsive microenvironment for metastasis to the lung. *Carcinogenesis* **31**: 1833-1843.
- SAYRE, L. M., D. A. ZELASKO, P. L. HARRIS, G. PERRY, R. G. SALOMON *et al.*, 1997 4-Hydroxynonenal-derived advanced lipid peroxidation end products are increased in Alzheimer's disease. *J Neurochem* **68**: 2092-2097.
- SCHAEFERHENRICH, A., G. BEYER-SEHLMAYER, G. FESTAG, A. KUECHLER, N. HAAG *et al.*, 2003 Human adenoma cells are highly susceptible to the genotoxic action of 4-hydroxy-2-nonenal. *Mutat Res* **526**: 19-32.
- SCHATZKIN, A., E. LANZA, D. CORLE, P. LANCE, F. IBER *et al.*, 2000 Lack of effect of a low-fat, high-fiber diet on the recurrence of colorectal adenomas. Polyp Prevention Trial Study Group. *N Engl J Med* **342**: 1149-1155.
- SCHAUR, R. J., 2003 Basic aspects of the biochemical reactivity of 4-hydroxynonenal. *Mol Aspects Med* **24**: 149-159.
- SCHRECK, R., P. RIEBER and P. A. BAEUERLE, 1991 Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J* **10**: 2247-2258.
- SCHUTT, F., M. BERGMANN, F. G. HOLZ and J. KOPITZ, 2003 Proteins modified by malondialdehyde, 4-hydroxynonenal, or advanced glycation end products in lipofuscin of human retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**: 3663-3668.
- SEELING, J. M., J. R. MILLER, R. GIL, R. T. MOON, R. WHITE *et al.*, 1999 Regulation of beta-catenin signaling by the B56 subunit of protein phosphatase 2A. *Science* **283**: 2089-2091.
- SHARMA, A., R. SHARMA, P. CHAUDHARY, R. VATSYAYAN, V. PEARCE *et al.*, 2008a 4-Hydroxynonenal induces p53-mediated apoptosis in retinal pigment epithelial cells. *Arch Biochem Biophys* **480**: 85-94.
- SHARMA, R., A. SHARMA, S. DWIVEDI, P. ZIMNIAK, S. AWASTHI *et al.*, 2008b 4-Hydroxynonenal self-limits fas-mediated DISC-independent apoptosis by promoting export of Daxx from the nucleus to the cytosol and its binding to Fas. *Biochemistry* **47**: 143-156.
- SHARMA, R., A. SHARMA, Y. YANG, S. AWASTHI, S. S. SINGHAL *et al.*, 2002 Functional reconstitution of Ral-binding GTPase activating protein, RLIP76, in proteoliposomes catalyzing ATP-dependent transport of glutathione conjugate of 4-hydroxynonenal. *Acta Biochim Pol* **49**: 693-701.
- SHELTON, P., and A. K. JAISWAL, 2013 The transcription factor NF-E2-related factor 2 (Nrf2): a protooncogene? *FASEB J* **27**: 414-423.
- SHIBATA, T., A. KOKUBU, M. GOTOH, H. OJIMA, T. OHTA *et al.*, 2008a Genetic alteration of Keap1 confers constitutive Nrf2 activation and resistance to chemotherapy in gallbladder cancer. *Gastroenterology* **135**: 1358-1368, 1368 e1351-1354.
- SHIBATA, T., T. OHTA, K. I. TONG, A. KOKUBU, R. ODOGAWA *et al.*, 2008b Cancer related mutations in NRF2 impair its recognition by Keap1-Cul3 E3 ligase and promote malignancy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 13568-13573.
- SHRINGARPURE, R., T. GRUNE, N. SITTE and K. J. DAVIES, 2000 4-Hydroxynonenal-modified amyloid-beta peptide inhibits the proteasome: possible importance in Alzheimer's disease. *Cell Mol Life Sci* **57**: 1802-1809.

- SIDDIQUI, M. A., V. KUMAR, M. P. KASHYAP, M. AGARWAL, A. K. SINGH *et al.*, 2012 Short-term exposure of 4-hydroxynonenal induces mitochondria-mediated apoptosis in PC12 cells. *Hum Exp Toxicol* **31**: 336-345.
- SIEMS, W., and T. GRUNE, 2003 Intracellular metabolism of 4-hydroxynonenal. *Mol Aspects Med* **24**: 167-175.
- SIEMS, W. G., R. BRENKE, A. BEIER and T. GRUNE, 2002 Oxidative stress in chronic lymphoedema. *QJM* **95**: 803-809.
- SIEMS, W. G., H. ZOLLNER, T. GRUNE and H. ESTERBAUER, 1997 Metabolic fate of 4-hydroxynonenal in hepatocytes: 1,4-dihydroxynonene is not the main product. *J Lipid Res* **38**: 612-622.
- SIES, H., 1993 Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* **215**: 213-219.
- SINGH, A., V. MISRA, R. K. THIMMULAPPA, H. LEE, S. AMES *et al.*, 2006 Dysfunctional KEAP1-NRF2 interaction in non-small-cell lung cancer. *PLoS Med* **3**: e420.
- SINGH, R., Y. WANG, J. M. SCHATTENBERG, Y. XIANG and M. J. CZAJA, 2009 Chronic oxidative stress sensitizes hepatocytes to death from 4-hydroxynonenal by JNK/c-Jun overactivation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **297**: G907-917.
- SINGH, R. K., R. TSAN and R. RADINSKY, 1997 Influence of the host microenvironment on the clonal selection of human colon carcinoma cells during primary tumor growth and metastasis. *Clin Exp Metastasis* **15**: 140-150.
- SINGH, S., S. VRISHNI, B. K. SINGH, I. RAHMAN and P. KAKKAR, 2010a Nrf2-ARE stress response mechanism: a control point in oxidative stress-mediated dysfunctions and chronic inflammatory diseases. *Free Radic Res* **44**: 1267-1288.
- SINGH, S. P., T. CHEN, L. CHEN, N. MEI, E. MCLAIN *et al.*, 2005 Mutagenic effects of 4-hydroxynonenal triacetate, a chemically protected form of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal, as assayed in L5178Y/Tk+/- mouse lymphoma cells. *J Pharmacol Exp Ther* **313**: 855-861.
- SINGH, S. P., M. NIEMCZYK, D. SAINI, Y. C. AWASTHI, L. ZIMNIAK *et al.*, 2008 Role of the electrophilic lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in the development and maintenance of obesity in mice. *Biochemistry* **47**: 3900-3911.
- SINGH, S. P., M. NIEMCZYK, D. SAINI, V. SADOVOV, L. ZIMNIAK *et al.*, 2010b Disruption of the mGsta4 gene increases life span of C57BL mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **65**: 14-23.
- SINHA, R., M. G. KNIZE, C. P. SALMON, E. D. BROWN, D. RHODES *et al.*, 1998a Heterocyclic amine content of pork products cooked by different methods and to varying degrees of doneness. *Food Chem Toxicol* **36**: 289-297.
- SINHA, R., N. ROTHMAN, C. P. SALMON, M. G. KNIZE, E. D. BROWN *et al.*, 1998b Heterocyclic amine content in beef cooked by different methods to varying degrees of doneness and gravy made from meat drippings. *Food Chem Toxicol* **36**: 279-287.
- SIOW, R. C., T. ISHII and G. E. MANN, 2007 Modulation of antioxidant gene expression by 4-hydroxynonenal: atheroprotective role of the Nrf2/ARE transcription pathway. *Redox Rep* **12**: 11-15.
- SKRZYDLEWSKA, E., A. STANKIEWICZ, M. SULKOWSKA, S. SULKOWSKI and I. KASACKA, 2001 Antioxidant status and lipid peroxidation in colorectal cancer. *J Toxicol Environ Health A* **64**: 213-222.
- SMATHERS, R. L., K. S. FRITZ, J. J. GALLIGAN, C. T. SHEARN, P. REIGAN *et al.*, 2012 Characterization of 4-HNE modified L-FABP reveals alterations in structural and functional dynamics. *PLoS One* **7**: e38459.

- SOFOWORA, G. G., E. F. CHOO, G. MAYO, Y. SHYR and G. R. WILKINSON, 2001 In vivo inhibition of human CYP1A2 activity by oltipraz. *Cancer Chemother Pharmacol* **47**: 505-510.
- SOH, Y., K. S. JEONG, I. J. LEE, M. A. BAE, Y. C. KIM *et al.*, 2000 Selective activation of the c-Jun N-terminal protein kinase pathway during 4-hydroxynonenal-induced apoptosis of PC12 cells. *Mol Pharmacol* **58**: 535-541.
- SOLITO, R., C. H. CHEN, D. MOCHLY-ROSEN, A. GIACHETTI, M. ZICHE *et al.*, 2013 Mitochondrial aldehyde dehydrogenase-2 activation prevents beta amyloids induced endothelial cell dysfunction and restores angiogenesis. *J Cell Sci*.
- SONG, B. J., Y. SOH, M. BAE, J. PIE, J. WAN *et al.*, 2001 Apoptosis of PC12 cells by 4-hydroxy-2-nonenal is mediated through selective activation of the c-Jun N-terminal protein kinase pathway. *Chem Biol Interact* **130-132**: 943-954.
- SONG, G., Y. B. MAO, Q. F. CAI, L. M. YAO, G. L. OUYANG *et al.*, 2005 Curcumin induces human HT-29 colon adenocarcinoma cell apoptosis by activating p53 and regulating apoptosis-related protein expression. *Braz J Med Biol Res* **38**: 1791-1798.
- SOVIC, A., S. BOROVIC, I. LONCARIC, T. KREUZER, K. ZARKOVIC *et al.*, 2001 The carcinostatic and proapoptotic potential of 4-hydroxynonenal in HeLa cells is associated with its conjugation to cellular proteins. *Anticancer Res* **21**: 1997-2004.
- SPARROW, J. R., and M. BOULTON, 2005 RPE lipofuscin and its role in retinal pathobiology. *Exp Eye Res* **80**: 595-606.
- SPORN, M. B., and K. T. LIBY, 2012 NRF2 and cancer: the good, the bad and the importance of context. *Nat Rev Cancer* **12**: 564-571.
- SU, C. C., J. G. LIN, T. M. LI, J. G. CHUNG, J. S. YANG *et al.*, 2006 Curcumin-induced apoptosis of human colon cancer colo 205 cells through the production of ROS, Ca²⁺ and the activation of caspase-3. *Anticancer Res* **26**: 4379-4389.
- SUN, Z., Z. HUANG and D. D. ZHANG, 2009 Phosphorylation of Nrf2 at multiple sites by MAP kinases has a limited contribution in modulating the Nrf2-dependent antioxidant response. *PLoS One* **4**: e6588.
- SUN, Z., S. ZHANG, J. Y. CHAN and D. D. ZHANG, 2007 Keap1 controls postinduction repression of the Nrf2-mediated antioxidant response by escorting nuclear export of Nrf2. *Mol Cell Biol* **27**: 6334-6349.
- SYKIOTIS, G. P., and D. BOHMANN, 2008 Keap1/Nrf2 signaling regulates oxidative stress tolerance and lifespan in *Drosophila*. *Dev Cell* **14**: 76-85.
- SZWEDA, L. I., K. UCHIDA, L. TSAI and E. R. STADTMAN, 1993 Inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase by 4-hydroxy-2-nonenal. Selective modification of an active-site lysine. *J Biol Chem* **268**: 3342-3347.
- TAGUCHI, K., H. MOTOHASHI and M. YAMAMOTO, 2011 Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes Cells* **16**: 123-140.
- TALALAY, P., M. J. DE LONG and H. J. PROCHASKA, 1988 Identification of a common chemical signal regulating the induction of enzymes that protect against chemical carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 8261-8265.
- TAMMARIELLO, A. E., and J. A. MILNER, 2010 Mouse models for unraveling the importance of diet in colon cancer prevention. *J Nutr Biochem* **21**: 77-88.
- TIBBLES, L. A., and J. R. WOODGETT, 1999 The stress-activated protein kinase pathways. *Cell Mol Life Sci* **55**: 1230-1254.
- TJALKENS, R. B., L. W. COOK and D. R. PETERSEN, 1999 Formation and export of the glutathione conjugate of 4-hydroxy-2, 3-E-nonenal (4-HNE) in hepatoma cells. *Arch Biochem Biophys* **361**: 113-119.

- TONG, K. I., B. PADMANABHAN, A. KOBAYASHI, C. SHANG, Y. HIROTSU *et al.*, 2007 Different electrostatic potentials define ETGE and DLG motifs as hinge and latch in oxidative stress response. *Mol Cell Biol* **27**: 7511-7521.
- TORII, S., D. A. EGAN, R. A. EVANS and J. C. REED, 1999 Human Daxx regulates Fas-induced apoptosis from nuclear PML oncogenic domains (PODs). *EMBO J* **18**: 6037-6049.
- TORLAKOVIC, E., E. SKOVLUND, D. C. SNOVER, G. TORLAKOVIC and J. M. NESLAND, 2003 Morphologic reappraisal of serrated colorectal polyps. *Am J Surg Pathol* **27**: 65-81.
- TORRES, M., and H. J. FORMAN, 2003 Redox signaling and the MAP kinase pathways. *Biofactors* **17**: 287-296.
- TORTI, S. V., and F. M. TORTI, 2013 Iron and cancer: more ore to be mined. *Nat Rev Cancer* **13**: 342-355.
- TOWNSEND, D. M., and K. D. TEW, 2003 The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene* **22**: 7369-7375.
- TOYOKUNI, S., 1996 Iron-induced carcinogenesis: the role of redox regulation. *Free Radic Biol Med* **20**: 553-566.
- TSUJII, M., S. KAWANO, S. TSUJI, H. SAWAOKA, M. HORI *et al.*, 1998 Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* **93**: 705-716.
- TURPAEV, K. T., 2013 Keap1-Nrf2 signaling pathway: mechanisms of regulation and role in protection of cells against toxicity caused by xenobiotics and electrophiles. *Biochemistry (Mosc)* **78**: 111-126.
- UCHIDA, K., M. SHIRAIISHI, Y. NAITO, Y. TORII, Y. NAKAMURA *et al.*, 1999 Activation of stress signaling pathways by the end product of lipid peroxidation. 4-hydroxy-2-nonenal is a potential inducer of intracellular peroxide production. *J Biol Chem* **274**: 2234-2242.
- UCHIDA, K., S. TOYOKUNI, K. NISHIKAWA, S. KAWAKISHI, H. ODA *et al.*, 1994 Michael addition-type 4-hydroxy-2-nonenal adducts in modified low-density lipoproteins: markers for atherosclerosis. *Biochemistry* **33**: 12487-12494.
- VAILLANCOURT, F., H. FAHMI, Q. SHI, P. LAVIGNE, P. RANGER *et al.*, 2008 4-Hydroxynonenal induces apoptosis in human osteoarthritic chondrocytes: the protective role of glutathione-S-transferase. *Arthritis Res Ther* **10**: R107.
- VAIOPOULOS, A. G., I. D. KOSTAKIS, M. KOUTSILIERIS and A. G. PAPAVALASSIOU, 2012 Colorectal cancer stem cells. *Stem Cells* **30**: 363-371.
- VAKKILA, J., and M. T. LOTZE, 2004 Inflammation and necrosis promote tumour growth. *Nat Rev Immunol* **4**: 641-648.
- VALENTOVIC, M., M. TERNEUS, R. C. HARMON and A. B. CARPENTER, 2004 S-Adenosylmethionine (SAME) attenuates acetaminophen hepatotoxicity in C57BL/6 mice. *Toxicol Lett* **154**: 165-174.
- VANWINKLE, W. B., M. SNUGGS, J. C. MILLER and L. M. BUJA, 1994 Cytoskeletal alterations in cultured cardiomyocytes following exposure to the lipid peroxidation product, 4-hydroxynonenal. *Cell Motil Cytoskeleton* **28**: 119-134.
- VERMEULEN, K., D. R. VAN BOCKSTAELE and Z. N. BERNEMAN, 2003 The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* **36**: 131-149.
- VILLEGAS, I., S. SANCHEZ-FIDALGO and C. A. DE LA LASTRA, 2011 Chemopreventive effect of dietary curcumin on inflammation-induced colorectal carcinogenesis in mice. *Mol Nutr Food Res* **55**: 259-267.
- VINDIS, C., I. ESCARGUEIL-BLANC, M. ELBAZ, B. MARCHEIX, M. H. GRAZIDE *et al.*, 2006 Desensitization of platelet-derived growth factor receptor-beta by oxidized lipids in vascular cells and atherosclerotic lesions: prevention by aldehyde scavengers. *Circ Res* **98**: 785-792.

- VIZIO, B., G. POLI, E. CHIARPOTTO and F. BIASI, 2005 4-hydroxynonenal and TGF-beta1 concur in inducing antiproliferative effects on the CaCo-2 human colon adenocarcinoma cell line. *Biofactors* **24**: 237-246.
- VLADYKOVSKAYA, E., S. D. SITHU, P. HABERZETTL, N. S. WICKRAMASINGHE, M. L. MERCHANT *et al.*, 2012 Lipid peroxidation product 4-hydroxy-trans-2-nonenal causes endothelial activation by inducing endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem* **287**: 11398-11409.
- VOGELSTEIN, B., E. R. FEARON, S. R. HAMILTON, S. E. KERN, A. C. PREISINGER *et al.*, 1988 Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* **319**: 525-532.
- VOGHEL, G., N. THORIN-TRESCASES, N. FARHAT, A. M. MAMARBACHI, L. VILLENEUVE *et al.*, 2008 Chronic treatment with N-acetyl-cystein delays cellular senescence in endothelial cells isolated from a subgroup of atherosclerotic patients. *Mech Ageing Dev* **129**: 261-270.
- VOLATE, S. R., D. M. DAVENPORT, S. J. MUGA and M. J. WARGOVICH, 2005 Modulation of aberrant crypt foci and apoptosis by dietary herbal supplements (quercetin, curcumin, silymarin, ginseng and rutin). *Carcinogenesis* **26**: 1450-1456.
- VOMHOF-DEKREY, E. E., and M. J. PICKLO, SR., 2012 The Nrf2-antioxidant response element pathway: a target for regulating energy metabolism. *J Nutr Biochem* **23**: 1201-1206.
- VON ZGLINICKI, T., 2002 Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem Sci* **27**: 339-344.
- WAEG, G., G. DIMSITY and H. ESTERBAUER, 1996 Monoclonal antibodies for detection of 4-hydroxynonenal modified proteins. *Free Radic Res* **25**: 149-159.
- WAKABAYASHI, N., S. SHIN, S. L. SLOCUM, E. S. AGOSTON, J. WAKABAYASHI *et al.*, 2010a Regulation of notch1 signaling by nrf2: implications for tissue regeneration. *Sci Signal* **3**: ra52.
- WAKABAYASHI, N., S. L. SLOCUM, J. J. SKOKO, S. SHIN and T. W. KENSLER, 2010b When NRF2 talks, who's listening? *Antioxid Redox Signal* **13**: 1649-1663.
- WALLACH, D., T. B. KANG and A. KOVALENKO, 2008 The extrinsic cell death pathway and the elan mortel. *Cell Death Differ* **15**: 1533-1541.
- WANG, D., W. NING, D. XIE, L. GUO and R. N. DUBOIS, 2012a Peroxisome proliferator-activated receptor delta confers resistance to peroxisome proliferator-activated receptor gamma-induced apoptosis in colorectal cancer cells. *Oncogene* **31**: 1013-1023.
- WANG, J., A. D. JOSHI, R. CORRAL, K. D. SIEGMUND, L. L. MARCHAND *et al.*, 2012b Carcinogen metabolism genes, red meat and poultry intake, and colorectal cancer risk. *Int J Cancer* **130**: 1898-1907.
- WANG, J. S., X. SHEN, X. HE, Y. R. ZHU, B. C. ZHANG *et al.*, 1999 Protective alterations in phase 1 and 2 metabolism of aflatoxin B1 by oltipraz in residents of Qidong, People's Republic of China. *J Natl Cancer Inst* **91**: 347-354.
- WANG, X., Q. WANG, K. L. IVES and B. M. EVERS, 2006 Curcumin inhibits neurotensin-mediated interleukin-8 production and migration of HCT116 human colon cancer cells. *Clin Cancer Res* **12**: 5346-5355.
- WANG, X., Y. YANG, D. R. MOORE, S. L. NIMMO, S. A. LIGHTFOOT *et al.*, 2012c 4-hydroxy-2-nonenal mediates genotoxicity and bystander effects caused by *Enterococcus faecalis*-infected macrophages. *Gastroenterology* **142**: 543-551 e547.
- WANG, X. J., J. D. HAYES, C. J. HENDERSON and C. R. WOLF, 2007 Identification of retinoic acid as an inhibitor of transcription factor Nrf2 through activation of retinoic acid receptor alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 19589-19594.
- WATANABE, T., S. WANG, J. NORITAKE, K. SATO, M. FUKATA *et al.*, 2004 Interaction with IQGAP1 links APC to Rac1, Cdc42, and actin filaments during cell polarization and migration. *Dev Cell* **7**: 871-883.

- WEIGEL, A. L., J. T. HANDA and L. M. HJELMELAND, 2002 Microarray analysis of H₂O₂-, HNE-, or tBH-treated ARPE-19 cells. *Free Radic Biol Med* **33**: 1419-1432.
- WEST, J. D., C. JI, S. T. DUNCAN, V. AMARNATH, C. SCHNEIDER *et al.*, 2004 Induction of apoptosis in colorectal carcinoma cells treated with 4-hydroxy-2-nonenal and structurally related aldehydic products of lipid peroxidation. *Chem Res Toxicol* **17**: 453-462.
- WEST, J. D., and L. J. MARNETT, 2005 Alterations in gene expression induced by the lipid peroxidation product, 4-hydroxy-2-nonenal. *Chem Res Toxicol* **18**: 1642-1653.
- WESTERLUND, M., D. GALTER, A. CARMINE and L. OLSON, 2005 Tissue- and species-specific expression patterns of class I, III, and IV Adh and Aldh 1 mRNAs in rodent embryos. *Cell Tissue Res* **322**: 227-236.
- WILKEN, R., M. S. VEENA, M. B. WANG and E. S. SRIVATSAN, 2011 Curcumin: A review of anti-cancer properties and therapeutic activity in head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Cancer* **10**: 12.
- WILLIAMS, T. I., B. C. LYNN, W. R. MARKESBERY and M. A. LOVELL, 2006 Increased levels of 4-hydroxynonenal and acrolein, neurotoxic markers of lipid peroxidation, in the brain in Mild Cognitive Impairment and early Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **27**: 1094-1099.
- WONG, M. H., M. L. HERMISTON, A. J. SYDER and J. I. GORDON, 1996 Forced expression of the tumor suppressor adenomatosis polyposis coli protein induces disordered cell migration in the intestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 9588-9593.
- WONG, W. M., and N. A. WRIGHT, 1999 Cell proliferation in gastrointestinal mucosa. *J Clin Pathol* **52**: 321-333.
- WONISCH, W., S. D. KOHLWEIN, J. SCHAUR, F. TATZBER, H. GUTTENBERGER *et al.*, 1998 Treatment of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* with the lipid peroxidation product 4-HNE provokes a temporary cell cycle arrest in G1 phase. *Free Radic Biol Med* **25**: 682-687.
- WU, K. C., J. Y. CUI and C. D. KLAASSEN, 2012 Effect of graded Nrf2 activation on phase-I and -II drug metabolizing enzymes and transporters in mouse liver. *PLoS One* **7**: e39006.
- WU, T. Y., T. O. KHOR, Z. Y. SU, C. L. SAW, L. SHU *et al.*, 2013 Epigenetic modifications of Nrf2 by 3,3'-diindolylmethane in vitro in TRAMP C1 cell line and in vivo TRAMP prostate tumors. *AAPS J* **15**: 864-874.
- YANG, M., Y. YAO, G. EADES, Y. ZHANG and Q. ZHOU, 2011 MiR-28 regulates Nrf2 expression through a Keap1-independent mechanism. *Breast Cancer Res Treat* **129**: 983-991.
- YANG, X., R. KHOSRAVI-FAR, H. Y. CHANG and D. BALTIMORE, 1997 Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell* **89**: 1067-1076.
- YANG, Y., A. SHARMA, R. SHARMA, B. PATRICK, S. S. SINGHAL *et al.*, 2003 Cells preconditioned with mild, transient UVA irradiation acquire resistance to oxidative stress and UVA-induced apoptosis: role of 4-hydroxynonenal in UVA-mediated signaling for apoptosis. *J Biol Chem* **278**: 41380-41388.
- YLA-HERTTUALA, S., W. PALINSKI, M. E. ROSENFELD, S. PARTHASARATHY, T. E. CAREW *et al.*, 1989 Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J Clin Invest* **84**: 1086-1095.
- YOU, A., C. W. NAM, N. WAKABAYASHI, M. YAMAMOTO, T. W. KENSLER *et al.*, 2011 Transcription factor Nrf2 maintains the basal expression of Mdm2: An implication of the regulation of p53 signaling by Nrf2. *Arch Biochem Biophys* **507**: 356-364.
- YOUNG, O., T. CROTTY, R. O'CONNELL, J. O'SULLIVAN and A. J. CURRAN, 2010 Levels of oxidative damage and lipid peroxidation in thyroid neoplasia. *Head Neck* **32**: 750-756.

- YU, S., T. O. KHOR, K. L. CHEUNG, W. LI, T. Y. WU *et al.*, 2010 Nrf2 expression is regulated by epigenetic mechanisms in prostate cancer of TRAMP mice. *PLoS One* **5**: e8579.
- YU, Y., S. S. KANWAR, B. B. PATEL, J. NAUTIYAL, F. H. SARKAR *et al.*, 2009 Elimination of Colon Cancer Stem-Like Cells by the Combination of Curcumin and FOLFOX. *Transl Oncol* **2**: 321-328.
- YUAN, J. H., Y. Q. LI and X. Y. YANG, 2007 Inhibition of epigallocatechin gallate on orthotopic colon cancer by upregulating the Nrf2-UGT1A signal pathway in nude mice. *Pharmacology* **80**: 269-278.
- YUAN, J. H., Y. Q. LI and X. Y. YANG, 2008 Protective effects of epigallocatechin gallate on colon preneoplastic lesions induced by 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f] quinoline in mice. *Mol Med* **14**: 590-598.
- ZANETTI, D., G. POLI, B. VIZIO, B. ZINGARO, E. CHIARPOTTO *et al.*, 2003 4-hydroxynonenal and transforming growth factor-beta1 expression in colon cancer. *Mol Aspects Med* **24**: 273-280.
- ZARKOVIC, K., 2003 4-hydroxynonenal and neurodegenerative diseases. *Mol Aspects Med* **24**: 293-303.
- ZHANG, C., Z. Y. SU, T. O. KHOR, L. SHU and A. N. KONG, 2013 Sulforaphane enhances Nrf2 expression in prostate cancer TRAMP C1 cells through epigenetic regulation. *Biochem Pharmacol* **85**: 1398-1404.
- ZHANG, D. D., S. C. LO, J. V. CROSS, D. J. TEMPLETON and M. HANNINK, 2004 Keap1 is a redox-regulated substrate adaptor protein for a Cul3-dependent ubiquitin ligase complex. *Mol Cell Biol* **24**: 10941-10953.
- ZHANG, D. D., S. C. LO, Z. SUN, G. M. HABIB, M. W. LIEBERMAN *et al.*, 2005 Ubiquitination of Keap1, a BTB-Kelch substrate adaptor protein for Cul3, targets Keap1 for degradation by a proteasome-independent pathway. *J Biol Chem* **280**: 30091-30099.
- ZHANG, H., and H. J. FORMAN, 2009 Signaling pathways involved in phase II gene induction by alpha, beta-unsaturated aldehydes. *Toxicol Ind Health* **25**: 269-278.
- ZHANG, T., T. OTEVREL, Z. GAO, Z. GAO, S. M. EHRlich *et al.*, 2001a Evidence that APC regulates survivin expression: a possible mechanism contributing to the stem cell origin of colon cancer. *Cancer Res* **61**: 8664-8667.
- ZHANG, W., Q. HE, L. L. CHAN, F. ZHOU, M. EL NAGHY *et al.*, 2001b Involvement of caspases in 4-hydroxy-alkenal-induced apoptosis in human leukemic cells. *Free Radic Biol Med* **30**: 699-706.
- ZHAO, S. G., Q. LI, Z. X. LIU, J. J. WANG, X. X. WANG *et al.*, 2011 Curcumin attenuates insulin resistance in hepatocytes by inducing Nrf2 nuclear translocation. *Hepatology* **58**: 2106-2111.
- ZHENG, W., and S. A. LEE, 2009 Well-done meat intake, heterocyclic amine exposure, and cancer risk. *Nutr Cancer* **61**: 437-446.
- ZHU, Q., R. GAO, W. WU and H. QIN, 2013 The role of gut microbiota in the pathogenesis of colorectal cancer. *Tumour Biol* **34**: 1285-1300.

Red meat consumption and colorectal cancer: is 4-hydroxynonenal the missing link?

Red meat consumption is associated with an increased risk of colorectal cancer. This link is meant to imply secondary products of lipoperoxidation. These byproducts are spontaneously formed in food matrix or result from the oxidation of unsaturated fatty acids in the gut by the heme iron liberated during digestion process. Derived from n-6 fatty acids, HNE is one of them.

NRF2 is a master gene of antioxidant response, inducing the expression of some genes coding for detoxification enzymes in the cell, included those involved in HNE detoxification. NRF2 is known to be upregulated in various cancer cell types and tumors and is supposed to confer to these cells a survival advantage to manage oxidative stress.

This work establishes for the first time that a higher level of NRF2 can already be detected in preneoplastic colonocytes mutated on *Apc*, and this status was shown to confer a gain of survival to preneoplastic cells against HNE compared to wild type colonocytes. We also show that the differential can be partially reversed pretreating these cells with curcumin or pterostilbene, two natural inducers of NRF2. These two compounds selectively generated strong apoptosis in *Apc*-mutated and better survival in wild type cells after HNE exposure.

* **Keywords:** colorectal cancer, *Apc*, red meat, heme, iron, lipoperoxidation, HNE, NRF2, antioxidant, curcumin, pterostilbene, preneoplastic colonocyte, cell death

AUTEUR : Sabine Dalleau

TITRE : Viande rouge et cancer colorectal: le 4-hydroxynonéal est-il le chaînon manquant?

DIRECTEUR DE THESE : Dr Françoise Guéraud et Dr Laurence Huc

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : 06.12.2013, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

RESUME

La consommation de viande rouge augmente le risque de cancer colorectal. Cette association impliquerait des produits de peroxydation lipidique secondaires, formés spontanément à partir de la matrice alimentaire, ou pouvant résulter de l'oxydation des acides gras insaturés dans l'intestin par le fer héminique libéré pendant le processus de digestion. Parmi ces produits, le HNE, qui est un dérivé des acides gras n-6.

NRF2 est un gène maître de la réponse antioxydante, capable d'induire l'expression de certains gènes codant pour des enzymes de détoxification de la cellule, y compris ceux qui sont impliqués dans la détoxification du HNE. NRF2 est connu pour être surexprimé dans divers types de cellules cancéreuses et dans les tumeurs, et est censé conférer à ces cellules un avantage de survie face au stress oxydatif.

Ce travail établit pour la première fois qu'un haut niveau de NRF2 peut déjà être détecté dans des colonocytes pré-néoplasiques mutés pour Apc, ce qui leur confèrerait un gain de survie en présence de HNE par rapport aux colonocytes sains. Nous montrons également que cette différence de réponse peut être partiellement inversée en prétraitant ces cellules avec du curcumin ou du ptérostilbène, deux inducteurs naturels de NRF2. Ces deux composés engendrent de manière sélective une apoptose accrue chez les cellules mutées pour Apc et une meilleure survie des cellules de type sauvage après l'exposition au HNE.

*** MOTS-CLES**

cancer colorectal, APC, viande rouge, fer, hème, lipoperoxydation, HNE, NRF2, anti-oxydant, curcumin, ptérostilbène, cellules coliques préneoplasiques, mort cellulaire

ED SEVAB: axe Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

INRA, UMR 1331 ToxAlim

Equipe PPCA (Prévention et Promotion de la Cancérogenèse par l'Alimentation)

183 Chemin de Tournefeuille, BP.93173, 31027 Toulouse cedex 3, FRANCE