CORE
Metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
Provided by Open Archive Toulouse Archive Ouverte

UNIVERSITE DE NANTES

UFR DE MEDECINE ET TECHNIQUES MEDICALES

IMMUNOPROPHYLAXIE DES CANCERS COLORECTAUX PAR DES GLUCIDES INDIGESTIBLES FERMENTABLES: ETUDES CHEZ LA SOURIS *MIN*.

IMMUNOPROPHYLAXY of COLORECTAL CANCER by FERMENTABLE INDIGESTIBLE CARBOHYDRATES: STUDIES in *MIN* MICE.

THESE DE DOCTORAT

Science de la Vie et de la Santé
Spécialité: Cancérologie Biologique

Présentée et soutenue publiquement par

PIERRE FABRICE

Le 13 Décembre 1999

devant le jury:

Rapporteurs:	Pr. Pierrette CASSAND
	Pr. Jacques BELLEVILLE
Examinateurs:	Dr. Eric PRINGAULT
	Pr. Khaled MEFLAH
Membre invité:	Dr. Francis BORNET
Directeur de thèse:	Dr. Jean MENANTEAU

"....Le cancer est une vrai saloperie. Il ne ressemble pas aux autres maladies. Il n'obéit pas aux règles des médecins. Il triche. Les cellules normales sont de petites choses sans prétention. Elles ne foutent pas le bordel, elles ne cherchent pas la célébrité. Les cellules normales sont toutes semblables, bien obéissantes et démocratiques. Elles s'inclinent devant la bureaucratie du corps. Elles ressemblent aux Suédois. Mais les cellules néoplasiques constituent une espèce différente de micro-organismes. Elles sont particulièrement méchantes, laides et cruelles. Ce sont des vandales. Des cinglés psychopathes. Elles conviennent admirablement au désordre, à l'anarchie, au pillage éhonté du cancer.
Personne ne sait comment réagir face à ces terroristes du corps. Personne ne sait pourquoi elles détestent si violemment la vie. Personne ne sait comment s'en débarrasser. Ce sont des guérilléros sans pitié, implacables et toujours victorieux. Elles font la nique à l'humanité. Elles nous acculent le dos au mur....."

Robert Mcliam Wilson "**Ripley Bogle**" (Christian Bourgeois Editeur 1996)

A mes parents

et à toute ma famille

Je tiens à remercier le Professeur Khaled Meflah de m'avoir accueilli au sein de l'unité INSERM U419.

Je remercie Madame le Professeur Pierrette Cassand et Monsieur le Professeur Jacques Belleville d'avoir accepté de juger ce travail et monsieur le Docteur Pringault Eric pour avoir accepté de participer au jury

Je tiens également à remercier tout particulièrement le Docteur Jean Menanteau, qui m'a encadré et soutenu tout au long de ma thèse. Je tiens tout particulièrement à le remercier pour sa disponibilté, sa patience et pour avoir su me guider dans les moments difficiles. Je le remercie enfin, d'avoir pris le risque voilà quatre ans d'accepter, parmi son équipe, un inconnu éxilé en pays nantais et de surcroît "bourguignon ".

Je remercie Danièle Lassort, dite dada, pour avoir supporté tous mes états d'âme scientifiques et privés. Elle aura toujours su me "remettre les neurones en place".

Je remercie aussi François Vallette pour les discussions scientifiques et celles sur notre région natale et ses "produits du terroir"; Marc Grégoire, Jacques Lependu et Jean Harb pour leurs conseils judicieux.

Je remercie Pascale Perrin pour l'émulation scientifique qu'elle sait apporter, et Euphémie Bassonga pour sa participation aux travaux in-vivo et sa gentillesse.

Je tiens à remercier toute l'équipe de l'U419, tout particulièrement Jezabel Rocher mais aussi Annie Combalot et Sabine Goude nos deux secrétaires de choc. Je n'oublie pas bien sur Isabelle Barbieux pour ses dégustations de confiture et son soutien pendant les 3 ans passés au labo, ainsi que Marie-Thérèse Lecabellec pour la découverte des palourdes bretonnes.

Je remercie également mes collègues de Pasteur, Sandrine, Julie, Audrey, Carmen, Laurent, Christophe et Martial pour leur gentillesse pendant la rédaction de ce manuscrit.

Enfin, comment ne pas remercier Marc (dit meumeuche), Fredéric (dit fred), Laurent (dit Tatayo), Olivier (dit olive), Fabien pour tous les bons moments passés au labo et en-dehors et pour avoir su m'aider dans des moments difficiles. Je n'oublie pas Virginie qui a du me supporter pendant son DEA, ainsi que Karine, Pierre-François, Maude avec qui j'ai partagé de nombreux moments.

Et enfin, je crois que je ne remercierai jamais assez mes parents, sans qui je n'aurai jamais pu effectuer mes études dans de bonnes conditions. Ils ont toujours su, et je sais qu'ils sauront toujours être présents à mes côtés. Merci.

SOMMAIRE

(dans la version online / pdf cette thèse, la pagination est décalée après la page 67)

Liste des abréviations **p.9**
Liste des tableaux **p.11**
Liste des figures **p.12**

INTRODUCTION

INTRODUCTION GENERALE

I- INCIDENCE DU CANCER DU COLON..... p.15
1) Fréquence et distribution géographique..... p.15
2) Evolution de l'incidence des cancers du côlon..... p.15

II- LA SEQUENCE ADENOME-CARCINOME..... p.16

III- CLASSIFICATION DES SUJETS A RISQUE..... p.17
1) Sujets à risque moyen..... p.17
2) Sujets à risque élevé..... p.17
2-1) Antécédents familiaux..... p.17
2-2) Sujets ayant déjà développé un adénome ou une tumeur rectocolique..... p.17
2-3) Rectocolite ulcéro-hémorragique..... p.18
2-4) Maladie de Crohn..... p.18
3) Sujets à risque très élevé..... p.18
3-1) La polypose adénomateuse familiale (PAF)..... p.18
3-2) Le syndrome HNPCC ou syndrome de Lynch..... p.19

SITUATION ACTUELLE DE LA THERAPIE DU CANCER DU COLON

I-LA CHIMIOTHERAPIE ADJUVANTE..... p.20
1) Chimiothérapie par 5FU seul ou en association..... p.20
2) Ces chimiothérapies adjuvantes présentent-elles une efficacité contre les cancers de type II?..... p.21
3) La chimiothérapie loco-régionale..... p.21
3) Mécanismes d'action..... p.21

II-L'IMMUNOTHERAPIE..... p.22
1) Les immunothérapies non spécifiques..... p.22
2) Les immunothérapies spécifiques..... p.22
2-1) Les vaccins autologues..... p.22
2-2) Les anticorps monoclonaux..... p.23

III-SITUATION ACTUELLE ET CONCLUSION..... p.23

LA PREVENTION PRIMAIRE DU CANCER COLORECTAL

EST-ELLE POSSIBLE?

I-PREVENTION DU CANCER COLORECTAL PAR DEPISTAGE..... p.24

II-LA CHEMOPREVENTION PAR LES AGENTS ANTI-INFLAMMATOIRES NON STEROIDIENS..... p.25

1) Prévention primaire..... p.25
   1-1) Données épidémiologiques..... p.25
   1-2) Données expérimentales..... p.25
2) Prévention secondaire, Sulindac et polypose familiale..... p.26
3) Limites et mécanismes..... p.26
   3-1) Limites des AINS: les effets secondaires..... p.26
   3-2) Les mécanismes d'action..... p.27
4) Conclusions..... p.27

III-LA PREVENTION DU CANCER COLORECTAL PAR MODIFICATION DU REGIME ALIMENTAIRE: LES DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES..... p.28

1) Résultats et limites des études épidémiologiques nutritionnelles..... p.28

2) Facteurs alimentaires modifiant la carcinogenèse colorectale..... p.28

   2-1) Facteurs associés à une augmentation du risque de tumeurs colorectales..... p.28
      Rôle des graisses, des viandes et des protéines..... p.28
      Rôle de l'alcool..... p.29
      Rôle du sucre et des hydrates de carbone..... p.29
      Rôle des calories, de l'obésité et de l'activité physique.... p.30
   2-2) Facteurs associés à une diminution du risque de tumeurs colorectales..... p.30
      Effet protecteur des fibres alimentaires..... p.30
      Rôle protecteur des végétaux..... p.31
      Effet protecteur du calcium et de la vitamine D..... p.31
      Effet protecteur des vitamines antioxydantes..... p.31
      Rôle des folates..... p.32
      Effet protecteur du café..... p.32
3) Etudes cliniques..... p.32
      Intervention sur des marqueurs de cancérogenèse..... p.32
      Intervention sur les tumeurs colorectales..... p.33
4) Conclusions des études épidémiologiques et cliniques..... p.33
5) Mécanismes..... p.34

IV-LES OLIGOSACCHARIDES NON DIGESTIBLES: ALIMENTS FONCTIONNELS?..... p.35

1) Définition..... p.35

2) Effet sur la flore colique..... p.36
2-1) Production d'acides gras à chaîne courte (AGCC)..... p.36
2-2) Effet prébiotique..... p.36
3) Effet sur l'absorption des minéraux..... p.37
4) Effet des OND sur le métabolisme lipidique..... p.37
5) Effets des pré et probiotiques sur la carcinogenèse colique et l'immunité..... p.38

LES MODELES ANIMAUX

I- INDUCTION CHIMIQUE CHEZ LES RONGEURS..... p.42

II- LES MODELES GENETIQUES p.43
1) Altérations de p53..... p.43
2) Altérations d'*Apc*..... p.43
2-1) La souris *Min* : phénotype et génotype..... p.43
2-2) Les autres modèles *Apc*..... p.44
2-3) *APC* et carcinogenèse colique chez l'Homme..... p.44
2-4) Les autres lésions..... p.45
3) La protéine APC : structure-fonction..... p.45
3-1) Les différents domaines de la protéine APC..... p.45
3-2) Les protéines associées et les fonctions d'APC..... p.46
APC et adhésion..... p.46
APC et prolifération..... p.47
4) Le modèle *Min* : un outil pour l'étude de la cancérogenèse colique... p.50
4-1) Importance du fond génétique : le cas du gène Mom..... p.50
4-2) Initiation de la cancérogenèse colique: où et quand?..... p.52
4-3) Inactivation des deux allèles *APC*..... p.53
4-4) PPAR γ-β-catenine-cancérogenèse colique..... p.53
4-5) Les autres gènes de la séquence épithélium-cancer..... p.54
4-6) L'expression du génome : méthylation de l'ADN..... p.54
4-7) Immunité et cancérogenèse colique..... p.55
4-8) Cyclo-oxygénase et cancérogenèse colique : la définition de l'action des AINS..... p.56
4-9) Alimentation et cancérogenèse..... p.59
5) Comparaison Min/PAF: Phénotype-Génotype-Mécanismes..... p.59

OBJECTIFS DU TRAVAIL

I- FIBRES ET CANCEROGENESE COLIQUE CHEZ LA SOURIS *MIN*..... p.62

II- QUEL EST L'IMPACT DE LA SUPPLEMENTATION EN FIBRES SUR LA REPONSE IMMUNITAIRE A LA CARCINOGENESE COLIQUE..... p.63

III- MODELISATION DES INTERACTIONS LYMPHO-EPITHELIALES..... p.63

IV- ETAPES METHODOLOGIQUES..... p.64

1) Lésions précancéreuses..... p.64
2) Réponse immunitaire non spécifique..... p.64
3) Réponse immunitaire spécifique..... p.64
3-1) Implication du système immunitaire..... p.64
3-2) Réaction immunitaire locale..... p.65
4) Interactions lympho-épithéliales..... p.65

RESULTATS-PERSPECTIVES

GLUCIDES INDIGESTIBLES ET CARCINOGENESE COLIQUE: IMPLICATION DU SYSTEME IMMUNITAIRE

I- ARTICLE 1..... p.67
Short Chain Fructooligosaccharides Reduce the Occurrence of Colon Tumors and Develop Gut -Associated Lymphoid Tissue in *Min* mice.
Pierre F., Perrin P., Champ M., Bornet F., Meflah K., Menanteau J. *Cancer Research* 1997; 57: 225-228.

(dans la version online / pdf cette thèse, la pagination est décalée après la page 67)

II-ARTICLE 2..... p.72
Two different kind of resistant starch reduce the number of small colon tumors in *Min* mice.
Pierre F, Perrin P, Bassonga E, Bornet F, Meflah K and Menanteau J

III-ARTICLE 3..... p.82
T cell status influences colon tumor occurence in *Min* mice fed short chain fructo-oligosaccharides as a diet supplement.
Pierre F, Perrin P, Bassonga E, Bornet F, Meflah K and Menanteau J. *Carcinogenesis* 1999; 20: 1953-1956

IV-CONCLUSIONS..... p.87

INTERACTIONS LYMPHO-EPITHELIALES ET GLUCIDES INDISGESTIBLES

I- LE SYSTEME IMMUNITAIRE LOCAL..... p.90

II- ETUDE PRELIMINAIRE *IN VIVO*..... p.93

1) Les glucides indigestibles ont un impact sur certains paramètres de l'immunité systémique..... p.94
2) La protection des souris *Min* par les scFos est corrélée à une baisse de l'expression de recepteur à l'IL2 à la surface des lymphocytes intra-épithéliaux..... p.95
3) Deux amidons résistants diminuent l'incidence des petites

tumeurs sans baisse du recepteur à l'IL2 à la surface des LIE..... p.101
4) Perspectives *in vivo* et *ex vivo*..... p.102

III- MISE EN PLACE D'UN MODELE D'ETUDE *IN VITRO*..... p103.
1) Etablissement de lignées de cellules épithéliales coliques..... p.103
2) Matériels et méthodes..... p.105
3) Résultats..... p.107
4) Perspectives *in vitro*..... p.110

CONCLUSIONS GENERALES..... p.114

REFERENCES..... p.117

Abréviations:

AAPC: Attenuated Adenomatous Polyposis Coli
AGCC: Acides Gras à Chaîne Courte
AgT SV40: Antigène T du virus 40 de singe
AINS: Agents Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens
AOM: azoxymethane
APC: Adenomatous Polyposis Coli
AR: Amidon Résistant
    ccAR: Amidon Résistant à chaîne courte
    lcAR: Amidon Résistant à longue chaîne
5-ASA: Acide 5-Aminosalicylique
CD: Cluster of Differentiation
CHRPE: Congenital Hypertrophy of the Retinal Pigment Epithelium
COX: Cyclo-Oxygénase
DLG: Drosophila Discs Large Gene
DMAB: 3,2'-diméthyl-4-aminobipheny1
DMH2: dimethylhydrazine
DPPIV: DiPeptidyl Peptidase IV
ENU: éthylnitrosourée
FSC: Forward Scatter
5-FU: 5-Fluorouracile
GSK: serine-threonine Glycogen Synthase Kinase
HNPCC: Hereditary Non Polyposis Colon Cancer
IFABP: Intestinal Faty Acid Binding Protein
IL2Rα: Sous Unité α du recepteur à l'interleukine 2
IL: Interleukine
IQ: 2-amino-3-methyl-imidazo(4,5p)quinoline
Lef/Tcf (Lymphoïd Enhancer Factor/ T Cell Factor
LIE: Lymphocytes Intra-épithéliaux
    cLIE: Lymphocytes Intra-épithéliaux du côlon
    gLIE: Lymphocytes Intra-épithéliaux de l'intestin grêle
LLP: Lymphocytes de la Lamina Propria
LOH: Loss of heterozygosity
MCR: Mutation Cluster Region
Min: Multiple Intestinal Neoplasia

MNNG: n-Methyl-n-Nitro-n-Nitrosoguanidine
Mom-1: Modifier of *Min*-1
ODC: Ornithine Décarboxylase
OND: Oligosaccharides Non Digestibles
PAF: Polypose Adénomateuse Familiale
PAL: Phosphatse Alcaline
PBS: Phosphate-Buffered Saline
PhIP: 2-Amino-1-méthyl-6-phenyl{4,5-b}pyridine
Pla2s: secretory type Phospholipase A2
PP: Plaques de Peyer
PPAR-γ: Peroxison Proliferator-Activated Receptor gamma
RER: Replication Error
scFOS: Fructo-oligosaccharides à chaîne courte
scid: Severe Combined Immunodeficient
SSC: Side Scatter
TCR: T Cell Receptor
Th 1 et 2: Lymphocytes T Helper 1 et 2

Liste des tableaux:

Introduction:

Tableau 1: Classification des cancers colorectaux par stade p.20
Tableau 2: Composition chimique d'OND p.35
Tableau 3: Pro et prébiotiques et carcinogenèse p.39
Tableau 4: Incidence tumorale en fonction des croisements p.50
Tableau 5 : corrélation phénotype Mom-1 et expression de Pla2s p.51
Tableau 6: Nombre de tumeurs dans les greffes d'intestin grêle *Min*/+ p.52
Tableau 7: Effet de l'aspirine sur la carcinogenèse de la souris *Min*/+ p.57
Tableau 8: Effet de la supplémentation au Nimesulide sur la carcinogenèse de la souris *Min* p.58

Résultats et Perspectives:
(dans la version online / pdf cette thèse, la pagination est décalée après la page 67)

Tableau 9: Incidence d'une supplémentation en scFOS sur le nombre d'IEL p.101
Tableau 10: Mesure des activités enzymatiques associées à la bordure en brosse phosphatase alkaline (PAL), dipeptidyle peptidase IV (DPPIV) dans les primocultures épithéliales et une lignée de fibroblastes immortalisés p.109

Liste des figures:

Introduction:

Figure 1: Structure chimique des fructo-oligosaccharides p.36

Figure 2: Les différents domaines de la proteine APC p.46

Figure 3: Implication de APC dans des cellules normales stimulées ou non par Wnt-1 et dans les cellules mutées pour *APC* p.49

Figure 4: Traitement à la 5-aza-boxyxytidine chez des souris *Min* homo (+/+) et hétérozygote (S/+) pour Dnmt p.55

Figure 5: Effet de la supplémentation en sulindac sur l'incidence tumorale et la concentration tissulaire en PGE2 p.56

Figure 6: Effet du piroxicam sur le nombre de tumeurs coliques et la concentration en thromboxane B2 p.56

Figure 7: Cinétique d'action du sulindac sur des tumeurs établies p.57

Objectifs du travail:

Figure 8: Coupe d'un adénome de souris *Min* à 12 semaines (x10) p.62

Figure 9: Mise en évidence des adénomes par une coloration du côlon dans une solution de bleu de méthylène (0.1%) p.64

Résultats et Perspectives:

(dans la version online / pdf cette thèse, la pagination est décalée après la page 67)

Figure 10: Effet des régimes enrichis en fibres sur l'incidence tumorale au niveau de l'intestin grêle chez la souris *Min* p.87

Figure 11: Système immunitaire associé aux muqueuses p.91

Figure 12: Origine des lymphocytes intra-épithéliaux p.92

Figure 13: Définition de la région des IEL sur les dot-plot FSC / SSC p.94

Figure 14: Effet d'une supplémentation en glucides indigestibles fermentables sur le phénotype des splémocytes chez la souris *Min* p.95

Figure 15: Effet d'une supplémentation en glucides indigestibles fermentables sur le phénotype des lymphocytes intra-épithéliaux (IEL) coliques chez la souris *Min* p.96

Figure 16: Effet des régimes sur l'expression du récepteur à l'interleukine 2 à la surface des lymphocytes intra-épithéliaux chez la souris *Min* p.97

Figure 17: Phénotypage par cytométrie de flux des lymphocytes CD3/CD4+ intra-épithéliaux en fonction des régimes alimentaires chez

la souris *Min*. p.98

Figure 18: Phénotypage par cytométrie de flux des lymphocytes CD3/CD8+ intra-épithéliaux en fonction des régimes alimentaires chez la souris *Min* p.99

Figure 19: Effet d'une supplémentation en fructo-oligosaccharides à chaînes courtes sur le phénotype des lymphocytes intra-épithéliaux chez les souris C57BL6 (+/+) et *Min* (*Min*/+) p.100

Figure 20: Monocouche de cellules épithéliales immortalisées p.107

Figure 21: Marquage des cellules épithéliales immortalisées +/+ avec l'anticorps monoclonal anti-cytokératine 18 (clone Ks 18.04) p.108

Figure 22: Cellules épithéliales immortalisées après 10 jours de culture à 37°C p.109

Figure 23: Produits de PCR des primocultures dérivées des souris F1 Immortomouse / C57Bl6 et Immortomouse / *Min* p.110

Figure 24: Représentation schématique du système de co-culture sur filtre p.111

INTRODUCTION

INTRODUCTION GENERALE

I- INCIDENCE DU CANCER DU COLON

1) Fréquence et distribution géographique

En France, le cancer colorectal se situe au 1er rang des cancers pour les deux sexes, représentant près de 15% des nouveaux cas dans tous les départements couverts par un registre. On estime à près de 33 000 le nombre de nouveaux cas de cancers colorectaux pour 1995 (Menegoz et coll 1997) dont 65% localisés au côlon, soit près de 21500 cas, avec un nombre de décès moyen de l'ordre de 15000 à 16000 par an. Les variations d'incidence sont très faibles entre les deux sexes et les différents départements. A l'inverse, l'incidence est largement modifiée par l'âge puisque les cancers colorectaux avant 50 ans ne représentent que 6% de l'ensemble. L'incidence augmente ensuite régulièrement à partir de cet âge : la proportion des cas diagnostiqués double chaque décennie entre 40 et 70 ans chez les hommes et chez les femmes. L'âge moyen au diagnostic est de 69,5 ans pour les hommes et de 72,8 ans pour les femmes.
La France est une région à risque élevé de cancer colique; les taux sont voisins de ceux des autres pays de l'Europe Occidentale, un peu plus faibles que ceux de l'Australie, de la Côte Ouest des Etats-Unis, et surtout inférieurs à ceux de la Côte Est des Etats-Unis. Les pays d'Europe de l'Est et d'Europe du Nord sont des régions à risque intermédiaire, et ce cancer est rare en Amérique du Sud, en Asie et surtout en Afrique. L'incidence du cancer du côlon varie dans un rapport de 1 à 30 entre les régions à risque élevé et les régions à risque faible (Parkin et coll 1997).

2) Evolution de l'incidence des cancers du côlon

En France, de nombreuses études épidémiologiques ont été effectuées au niveau départemental. En Côte-d'Or, l'incidence du cancer colique a augmenté de 1976 à 1990 puis diminué légèrement ensuite (1991-95). Chez la femme, l'incidence a moins varié. Au niveau international, il semble que le cancer du côlon ait été en augmentation dans les pays à taux d'incidence élevée jusqu'au milieu des années 80, puis qu'il se soit stabilisé. Son incidence a diminué aux Etats-Unis après 1985, une dizaine d'années plus tôt qu'en Côte-d'Or (Devesa et coll 1995). Les études sur 1988-1992, font état d'une augmentation du nombre de cas de cancers coliques en Europe et en Chine, ainsi qu'au Japon qui est maintenant un pays à risque

élevé. Son incidence a moins varié aux Etats-Unis, au Canada ou en Amérique du Sud, et a diminué en Afrique (Parkin et coll 1997).
De plus, il apparaît que le risque d'être atteint d'un cancer colique est différent en fonction de la décennie de naissance, par exemple le risque de développer un cancer colique en Côte-d'Or est passé chez les hommes de 1,9% (naissance entre 1897 et 1905) à 3,4% (1937-1945), et chez les femmes de 1,5% à 1,6%. En fait, il ressort que le risque de développer un cancer du côlon gauche a peu varié en fonction de l'âge de naissance, à l'inverse du cancer du côlon droit dont l'incidence a doublé chez les plus jeunes. L'évolution au cours du temps n'est donc pas la même entre côlon droit et côlon gauche. L'étude des altérations génétiques dans les cancers vient compléter les données de l'épidémiologie descriptive (Laurent-Puig et coll 1997). Les cancers du côlon gauche, correspondent dans 80% des cas au groupe des tumeurs LOH+ (loss of heterozygosity). Ils se caractérisent par des pertes alléliques notamment sur le bras court du chromosome 17 et le bras long du chromosome 18, associées à une hyperploïdie. Dans le côlon droit, ce mécanisme est plus rare (40% des cas) : par contre, un tiers des cancers du côlon droit présente un taux élevé d'erreurs de réplication des loci microsatellites, c'est le groupe des cancers RER+. Ce type d'altérations est pratiquement absent dans le côlon gauche. Ces données suggèrent que l'étiologie du cancer du côlon droit pourrait être différente de celle du cancer du côlon gauche.

II- LA SEQUENCE ADENOME-CARCINOME

Les adénomes sont des tumeurs épithéliales bénignes souvent désignées sous le terme de polype. On a pu, chez des malades refusant l'exérèse de leur adénome, assister à leur augmentation de taille et à leur transformation maligne. Mais la fréquence des cancers développés sur un adénome reste mal connue. Les études de suivi après exérèse d'adénomes suggèrent que l'incidence du cancer colorectal est diminuée de 85 à 90% (Gilbertsen et coll 1974; Winaver et coll 1993). L'étude des reliquats adénomateux dans les cancers invasifs représente un moyen indirect d'estimer la proportion des cancers développés sur un adénome. En Côte-d'Or près de 80% des cancers limités à la sous-muqueuse contiennent des reliquats adénomateux (Bedenne et coll 1992). On peut à priori considérer ce chiffre comme la fréquence minimum des cancers développés sur un adénome.
Les adénomes sont très fréquents. Une étude réalisée en 1977 et 1979 suggère que la prévalence des adénomes varie entre 7% dans la tranche d'âge 45-49 ans et 20% dans la tranche d'âge 65-69 ans (Grepithe 1981). Les cancers étant beaucoup plus rares, il semble que seule une petite proportion des adénomes se transforme en cancer. Les facteurs qui influencent le risque de transformation maligne sont principalement la taille et le degré de dysplasie (Morson et coll 1990). Une étude américaine laissait supposer qu'un quart des adénomes

ayant atteint 1 centimètre de diamètre deviendront des cancers au cours de la vie du sujet (Stryker et coll 1987).
Très peu de données permettent d'estimer la durée de la séquence adénome-cancer. Le suivi de patients atteints de polypose fait apparaître une durée moyenne de 12 ans entre le diagnostic de la maladie et l'apparition du cancer, avec des extrêmes allant de 5 à 20 ans (Muto et coll 1975).
Un cancer invasif peut aussi se développer sur un adénome très petit (moins de 1 centimètre) et à peine surélevé: on parle "d'adénome plan". La dysplasie survient rapidement et fréquemment (environ 40% des cas). Il s'agit donc d'adénomes de haut grade de malignité, qui pourraient se transformer en cancers en 2 à 3 ans.

III- CLASSIFICATION DES SUJETS A RISQUE

1) Sujets à risque moyen

Le cancer du côlon étant rare avant 50 ans et l'incidence augmentant rapidement avec l'âge, les sujets de plus de 50 ans des 2 sexes sont considérés comme la population à risque moyen.

2) Sujets à risque élevé

2-1) Antécédents familiaux:

Les sujets ayant un ou plusieurs parents du premier degré (pères, mères, frères, soeurs, enfants) atteints d'un cancer colorectal ont un risque d'être atteint de ce cancer plus élevé que ceux de la population générale. 15 à 20% des patients qui ont développé un cancer présentent un parent de premier degré ayant aussi développé cette pathologie: il semble que le risque soit multiplié environ par 2 par rapport à la population générale (St John et coll 1993; Carstensen et coll 1996). En effet, l'étude de Winawer et coll (1996), dans laquelle les porteurs d'adénomes avaient pour témoins leurs conjoints, suggère que le risque relatif des parents ainsi que des frères et soeurs des sujets porteurs d'adénomes, soit de 1,78 par rapport à celui des conjoints.

2-2) Sujets ayant déjà développé un adénome ou une tumeur rectocolique.

Chez les sujets atteints d'adénomes intestinaux le risque de cancer colorectal dépend des caractéristiques des adénomes découverts initialement. Le risque de cancer colorectal est multiplié par 3,6 chez les sujets ayant développé un adénome avec structures villeuses ou de plus d'un centimètre de diamètre et multiplié par 6,6 si ces adénomes sont multiples. Par contre, pour les sujets atteints d'un ou plusieurs adénomes de moins de 1 cm de diamètre, le

risque de cancer colorectal ne diffère pas significativement de celui de la population générale (Atkin et coll 1992).

2-3) Rectocolite ulcéro-hémorragique

Le risque diffère fortement en fonction de l'étendue de la rectocolite ulcéro-hémorragique (RCH), de son ancienneté et de l'âge au moment du diagnostic. Par rapport à un sujet de la population générale, une étude de 1990 proposait que le risque de survenue d'un cancer colorectal est multiplié par 14,8 en cas de pancolite et par 2,8 en cas d'atteinte limitée au côlon gauche (Ekbom et coll 1990).

2-4) Maladie de Crohn

Le risque de développer le cancer du côlon lié à la maladie de Crohn reste encore discuté. Il semble en fait que les sujets ne sont à risque élevé que si la maladie de Crohn est étendue et diagnostiquée avant 30 ans (Weedon et coll 1973).

3) Sujets à risque très élevé

Dans 2 à 5% des cas, selon les statistiques, le cancer colique survient dans un contexte familial, évoquant le rôle d'un facteur génétique. Ces prédispositions sont en fait des maladies héréditaires, dont la transmission est autosomique dominante (1 sujet sur 2 est atteint), à forte pénétrance (plus de 90% des sujets atteints d'une mutation constitutionnelle présentent un cancer colorectal), et à expressivité variable. Actuellement, deux maladies associées aux gènes majeurs de susceptibilité du cancer colorectal ont été identifiées : la polypose adénomateuse familiale (PAF) et le syndrome de Lynch ou syndrome HNPCC, (hereditary non polyposis colorectal cancer).

3-1) La polypose adénomateuse familiale (PAF)

Moins de 1 % des cancers colorectaux sont liés à la PAF. Cette maladie est caractérisée par le développement, surtout après la puberté, de plusieurs centaines de polypes adénomateux répartis tout au long de la muqueuse intestinale. La transformation maligne est inéluctable si une coloproctectomie totale n'est pas faite au début de l'âge adulte. Cette prédisposition est due à une mutation constitutionnelle d'un gène *APC* (adenomatous polyposis coli) situé sur le bras long du chromosome 5. Le phénotype varie en fonction du siège de la mutation (Olschwang et coll 1997). Plus de 300 mutations ont été identifiées: les mutations survenant entre les codons 1250 et 1464 sont associées à la forme la plus défavorable de la PAF. Une polypose du tractus digestif haut est plutôt associée à des mutations au-delà du codon 1444. Les mutations survenant sur le codon 1309 induisent une forme clinique particulièrement sévère, avec transformation maligne des adénomes particulièrement précoces. Les mutations les plus proches du codon initiateur sont associées à un phénotype atténué, le phénotype AAPC, correspondant à une forme purement colique et tardive avec moins de 100 adénomes.

Il existe aussi plusieurs manifestations extracoliques, comme par exemple des taches visibles au fond d'oeil, dues à une hypertrophie de la couche pigmentaire de la rétine, mais aussi des manifestations beaucoup plus graves comme des tumeurs desmoïdes et les adénomes duodénaux, qui peuvent parfois dégénérer.

3-2) Le syndrome HNPCC ou syndrome de Lynch

Selon les études, 1 à 5% des cancers colorectaux surviennent dans le cadre d'un syndrome HNPCC (Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer) avec un risque moyen de 3,4% (Ponz de Leon et coll 1993). Ce type de cancer se localise préférentiellement au niveau du côlon droit. Ces cancers sont souvent précédés d'adénomes qui ont pour caractéristiques d'être souvent de petite taille, d'être moins nombreux, d'avoir un aspect plan et de présenter des signes de dysplasie sévère. Dans le syndrome HNPCC, les gènes mutés appartiennent à la famille des gènes impliqués dans le système de réparation des mésappariements de l'ADN. Les gènes MSH2, MLHI, PMSI et PMS2 sont impliqués dans respectivement 31%, 33%, 2% et 4% des cas (Lothe et coll 1993). Ces cancers sont le siège d'altérations génétiques dues à une instabilité des loci microsatellites ou phénotype RER (Replication Error). On estime que les tumeurs se développant chez les sujets HNPCC ont dans 95% des cas un phénotype RER.

SITUATION ACTUELLE DE LA THERAPIE DU CANCER DU COLON

Jusqu'en 1989 la chirurgie (colectomie) était le seul traitement efficace des cancers coliques. Toutefois, depuis 1990 la chimiothérapie adjuvante présente une efficacité dans le cas des cancers avec métastases ganglionnaires. Ces traitements adjuvants sont utilisés dans le cadre de cancer du côlon à haut risque de rechute, après colectomie (stade III ou stade C de Dukes) (tableau 1). En 1997 la chimiothérapie postopératoire est devenue un standard dans les stades III mais son efficacité n'est pas encore démontrée dans les cancers du côlon de stade II.

Tableau 1: Classification des cancers colorectaux par stade (NIH Consensus Conference 1990)

Stade 0	Carcinome in situ	Pas de métastases ganglionnaires	Pas de métastases à distance	
Stade I	Invasion de la sous-muqueuse	Pas de métastases ganglionnaires	Pas de métastases à distance	**Dukes A**
Stade II	Invasion des tissus péricoliques	Pas de métastases ganglionnaires	Pas de métastases à distance	**Dukes B**
Stade III	Invasion directe d'autres organes	Métastases ganglionnaires (1 à 4)	Pas de métastases à distance	**Dukes C**
Stade IV	Invasion d'autres organes	Métastases ganglionnaires (>4)	Métastases à distance	

I- LA CHIMIOTHERAPIE ADJUVANTE :

1) Chimiothérapie par 5FU seul ou en association:

Dès 1988, des travaux ont permis d'observer que le traitement au 5FU (5-fluorouracile) pouvait engendrer une augmentation modeste de la survie, de l'ordre de 3% à 5 ans (Buyse et coll 1988), toutefois l'analyse par sous-groupe mettait en évidence que ce bénéfice disparaissait si l'on retirait les cancers du rectum de l'analyse.

Les associations 5FU-Lévamisole: les associations 5FU-Lévamisole ont donné des résultats positifs. Dès 1987, l'utilisation de 5FU *per os* pendant 6 mois associé à du Lévamisole *per os* les 3 premiers jours postopératoires a entraîné une augmentation de la survie des patients traités. Suite à une conférence de consensus en 1990 (NIH consensus conference 1990),

l'association 5FU-Lévamisole était recommandée comme traitement standard pour tous les patients opérés d'un cancer du côlon de Stade III.

Les associations 5FU-Acide Folinique (5FU-AF): Cette association est devenue à partir de 1993 une alternative à l'association 5FU-Lévamisole. Plusieurs études mettent en évidence que cette chimiothérapie postopératoire engendre une augmentation de la survie ainsi qu'une diminution du risque de rechute. En 1995, une étude publiée dans Lancet mit en évidence qu'un traitement au 5FU-AF a entraîné une augmentation de la survie sans récidive à 3 ans (71 % pour le groupe traité contre 62% pour le groupe contrôle). De plus, le risque de rechute diminuait de 35 ± 9%. La survie brute à trois ans était également améliorée (83% vs 78%) (Labianca et coll, 1995).

5FU-Lévamisole ou 5FU-AF ? Dès 1994 il y avait donc 2 protocoles différents utilisables pour la chimiothérapie adjuvante des cancers du côlon stade III: l'association 5FU-Lévamisole pendant un an et l'association 5FU-AF pendant 6 mois. Plusieurs études comparant les deux termes de cette alternative thérapeutique montrent une efficacité comparable des deux protocoles avec parfois un avantage en faveur de l'association 5FU-AF (Wolmark et coll 1996). En fait, il semble que l'association 5FU-AF pendant 6 mois ou 8 mois est équivalente en terme d'efficacité à l'association 5FU-Lévamisole pendant 1 an, et même supérieure à celle 5FU-Lévamisole pendant 6 mois. L'association 5FU-AF est actuellement le nouveau traitement standard des cancers coliques de stade III . En bilan, le gain absolu de survie à 5 ans est compris entre 12 et 26%.

2) Ces chimiothérapies adjuvantes présentent-elles une efficacité contre les cancers de type II?

Peu d'études concernent l'efficacité des chimiothérapies dans les stades II. Dans une étude de survie à 7 ans à la suite d'un traitement 5FU-Levamisole publiée en 1995 (Moertel et coll 1995), il apparaît que le bénéfice de la chimiothérapie adjuvante pour les stades II reste très faible par rapport à celui des stades III.

3) La chimiothérapie loco-régionale:

Cette stratégie a été tentée dans l'espoir d'éviter la dissémination hépatique par voie portale des carcinomes péritonéaux. Les résultats de l'administration intra-péritonéale ou intra-portale de 5FU sont encourageants (Scheithauer et coll 1996; Rougier et coll 1998).

4) Mécanismes d'action:

Le 5FU est une molécule inactive dont l'activation métabolique correspond à différentes étapes de transformation enzymatique conduisant à trois composés responsables, à

des degrés divers, de la cytoxicité de ce médicament (Parker et coll 1990). Le métabolite actif le plus important est le fluorodésoxyuridine-monophosphate (FdUMP) formé grâce à l'action de la thymidine kinase. Le FdUMP inhibe la thymidinate synthase qui est une enzyme clef du métabolisme des bases pyrimidiques, ce qui aboutit une diminution de production de thymidine nécessaire à la synthèse d'ADN. L'action inhibitrice est majorée par la présence d'acide folique (Santi et coll 1974).
Le 5FU peut aussi être métabolisé en fluorouridine-triphosphate (FUTP) qui bloque la transduction en s'intégrant à l'ARN (Ghoshal et Jacob 1994). Le dernier métabolite du 5FU est le fluorodésoxyridine-triphosphate (FdUTP) qui engendre des coupures simple brin cytotoxiques pour les cellules (Pinedo et Peters 1988).

II- L'IMMUNOTHERAPIE:

L'immunothérapie est une alternative à la chimiothérapie adjuvante, et la recherche est toujours active dans ce domaine.

1) Les immunothérapies non spécifiques:

Plusieurs études concernent des stratégies d'immunothérapie non spécifique, toutes négatives à l'image des résultats obtenus avec le BCG (Wolmark et coll 1988). L'acide Polyadénylique-Polyuridylique (Poly-A-Poly-U qui module l'activité des cellules NK) provoque même à l'inverse une réduction significative de la survie à 5 ans chez les patients traités (Lacour et coll 1992).
Efficaces dans le traitement des mélanomes et des tumeurs du rein, les interférons ne le sont pas dans le cadre des cancers coliques présentant, là encore, parfois un effet délétère avec accroissement du pouvoir métastasiant (Wiesenfeld et coll 1995).
Ainsi, l'immunothérapie non spécifique n'a pas d'efficacité démontrée et peut même se révéler néfaste.

2) Les immunothérapies spécifiques:

Cette technique consiste à faciliter l'établissement d'une réponse immunitaire spécifique en utilisant des cellules tumorales autologues mortes ou des anticorps monoclonaux spécifiques des cellules tumorales.

2-1) Les vaccins autologues

Les résultats sont certes contrastés mais cette piste semble intéressante puisqu'une étude débutée en 1985 met en évidence des résultats encourageants avec l'utilisation d'un "vaccin" préparé à partir de la tumeur du patient et réinjecté en postopératoire (Hoover et coll 1993). Toutefois, ce type de thérapie reste très lourd puisqu'il met en jeu des vaccins "personnalisés".

2-2) les anticorps monoclonaux

L'identification d'antigènes à la surface des cellules de cancers colorectaux (comme l'ACE et le 17-1A) a été une aide précieuse au diagnostic sur biopsies par exemple. L'anticorps Ab 17-1A a aussi été utilisé à des fins thérapeutiques dans une étude de 1994 (Riethmuller et coll 1994). Après 5 ans, la récidive était diminuée significativement de 17,8%, et le taux de décès de 15% ($p = 0,043$) par rapport aux patients traités par chirurgie seule.

En conclusion, l'immunothérapie ne constitue pas actuellement une alternative à la chimiothérapie mais demeure une voie de recherche importante.

III- SITUATION ACTUELLE ET CONCLUSION:

Certains traitements adjuvants ont donc fait la preuve de leur efficacité et font maintenant partie de la stratégie thérapeutique des cancers du côlon réséqués. En 1990, la FNLCC (Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer) recommandait la chimiothérapie adjuvante pour les cancers du côlon de stade III. Cette chimiothérapie peut-être une association 5-FU-acide folinique ou l'association 5-FU-Lévamisole. La chimiothérapie intra-portale est reconnue comme une option. Pour les cancers de stade Il , il n'y avait pas de recommandations.

Actuellement, il apparaît que les traitements adjuvants après colectomie pour cancer sont efficaces et sont indiqués dans les stades III. L'administration pendant 6 mois d'une chimiothérapie systémique 5FU-AF est au moins aussi efficace et mieux tolérée que l'administration pendant 1 an de l'association 5FU-Levamisole. Toutefois, pour les cancers coliques de stade II le bénéfice d'un traitement adjuvant ne semble pas présenter d'effet bénéfique significatif.

LA PREVENTION PRIMAIRE DU CANCER COLORECTAL EST-ELLE POSSIBLE?

Malgré les progrès thérapeutiques, le nombre de décès par an lié au cancer colorectal reste très élevé. De plus, même après une prise en charge efficace (chirurgie et traitement adjuvant), la possibilité de récidive demeure importante. La prévention reste une approche essentielle pour la réduction de l'incidence de ces cancers. Elle peut être définie comme la mise en oeuvre de stratégies destinées à protéger l'organisme contre le développement et la progression tumorale. Il pourra s'agir de dépistage ou bien de l'utilisation de nutriments (par modification ou supplémentation de l'alimentation) ou d'agents pharmaceutiques.

I- PREVENTION DU CANCER COLORECTAL PAR DEPISTAGE:

Une forme de prévention possible est le dépistage systématique de la population pour établir un diagnostic précoce pouvant permettre d'éviter l'apparition du cancer par polypectomie ou bien un traitement plus efficace. Les limites de cette approche sont liées à la fiabilité discutable des méthodes disponibles. Ces techniques de dépistage sont le test de recherche de saignement occulte dans les selles et l'endoscopie souple.

Toutefois, deux études concernant le dépistage par recherche des saignements ont mis en évidence que le nombre de cancers diagnostiqués après un test négatif était supérieur au nombre de cancers dépistés grâce à un test positif (Hardcastle et coll 1996; Kronborg et coll 1996).

De plus, aucune étude ne permet actuellement de juger de l'efficacité d'un programme de dépistage de la population générale basé sur la pratique régulière d'une endoscopie.

Un programme pour tester l'efficacité de la pratique d'une sigmoïdoscopie souple entre 55 et 64 ans est en cours. Il s'agit de randomiser 195.000 hommes et femmes dans 10 centres de soins anglais en 2 groupes: 1 groupe témoin de 130.000 individus et un groupe de 65.000 individus auxquels il est proposé une sigmoïdoscopie souple, les sujets chez qui on découvre des polypes à haut-risque (plus de 3 adénomes, taille supérieure à 10 mm) se voyant proposer une coloscopie complète puis un protocole de surveillance adapté. Les premières études de faisabilité sont encourageantes (Atkin et coll 1993).

Compte tenu du coût d'une telle politique de prévention il est vraisemblable qu'elle reste limitée aux populations à risque.

II- LA CHEMOPREVENTION PAR LES AGENTS ANTI-INFLAMMATOIRES NON STEROIDIENS:

La chemoprévention peut être définie comme l'inhibition du développement tumoral par l'administration de molécules naturelles ou synthétiques non toxiques avant ou pendant le développement tumoral (prévention primaire) ou après un acte chirurgical et thérapeutique pour éviter une rechute (prévention secondaire).

La stratégie de chemoprevention du cancer du côlon par les agents anti-inflammatoires non stéroïdiens est particulièrement attractive. En effet, de nombreuses données épidémiologiques et expérimentales supportent cette hypothèse, les traitements à long terme chez l'Homme sont bien acceptés et leurs conséquences bien documentées.

1) Prévention primaire:

1-1) Données épidémiologiques:

Beaucoup de données proviennent du suivi de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, consommateurs réguliers d'AINS et d'aspirine. Dans deux études, suédoise et finlandaise, portant sur respectivement 11.863 et 9.469 patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, les risques de cancer colique et rectal étaient respectivement de 40% et 30% inférieurs aux risques attendus (Gridley et coll 1993; Kauppi et coll 1996).

Plusieurs études rendent compte de l'impact de la prise d'aspirine ou d'AINS sur le risque de survenue de cancers (Evans et coll 1995; La Vecchia et coll 1997) et de polypes rectocoliques (Breuer-Katschinski et coll 1996; Sandler et coll 1997). La consommation régulière d'aspirine et/ou d'AINS est associée à une diminution significative de ces risques. Toutefois, cette diminution du risque disparaît lorsque la prise (même à long terme) est interrompue depuis plus d'un an (Rosenberg et coll 1991). Cette observation suggère que l'effet de l'aspirine et des AINS ne serait que suspensif.

L'amplitude de cette diminution varie de 21 à 68% selon les études mais est le plus souvent de l'ordre de 40 à 50%. Cet effet est observé tant chez les hommes que chez les femmes. De plus ces études semblent mettre en évidence un effet dose. Une consommation supérieure à 325 mg d'aspirine par jour et/ou d'une durée supérieure à 5 ans pourrait représenter le seuil limite d'efficacité. Toutefois une étude de cohorte concluait à un seuil limite d'efficacité beaucoup plus tardif: en effet, la diminution du risque est plus marquée pour une durée d'exposition supérieure à 10 ans, et elle ne devient significative qu'au delà de 20 ans (Giovanucci et coll 1995c).

1-2) Données expérimentales:

Les données disponibles concernant l'aspirine (Barnes et coll 1999), le sulindac (Piazza et col 1997), le piroxicam (Morishita et coll 1997) et l'ibuprofen (Wargovich et coll 1995)

permettent de conclure que ces drogues diminuent significativement la carcinogenèse colique co-induite chez le rongeur. Cet effet est dose-dépendant. Bien qu'il soit plus intense lorsque l'AINS est donné précocement par rapport à l'administration du carcinogène, il peut être observé même lorsque le traitement est administré plusieurs semaines après le carcinogène, ce qui suggère alors un blocage au niveau de la promotion tumorale. L'aspirine agit aussi sur l'initiation tumorale. Cet effet semble cependant n'être que suspensif .

2) Prévention secondaire, Sulindac et polypose familiale:

De nombreuses études permettent de conclure que le sulindac administré à la dose de 100 à 400 mg par jour entraîne une diminution du nombre et de la taille des polypes chez les patients atteints de polypose familiale, préalablement colectomisés (Nugent et coll 1992; Giardello et coll 1993; Debinski et coll 1995). Dans l'étude de Labayle et coll. (Labayle et coll 1991), le sulindac administré par voie orale à la dose de 100 mg trois fois par jour entraîne la disparition complète des polypes rectaux dont le diamètre est inférieur ou égal à 5 mm après seulement 4 mois de traitement. Toutefois, la disparition est incomplète chez 3 patients sur 9. Cet effet est observé même lorsque le nombre de polypes avant traitement est supérieur à 20. Dans un second travail (Giardello et coll 1993) réalisé chez 22 patients dont 18 n'étaient pas colectomisés , le sulindac administré à la dose de 150 mg deux fois par jour pendant 9 mois entraîne une diminution de 44% du nombre des polypes et de 35% de leur diamètre moyen mais aucune régression complète n'est observée. L'administration par voie rectale plus récemment évaluée permet d'obtenir des résultats similaires avec un traitement initial de 2 suppositoires de 150 mg par jour (Hirota et coll 1996).
Les données sur l'efficacité du sulindac sur de plus longues périodes sont limitées. Dans la série de Waddell et coll (1989), 7 patients ont été traités pendant 19 à 85 mois par du sulindac à la dose de 300 à 400 mg par jour. Une disparition complète et durable des polypes a été observée dans 5 de ces 7 cas pendant la durée du traitement. Cependant, l'effet du sulindac n'est que suspensif et après l'arrêt du traitement les polypes réapparaissent en quelques mois. Toutefois, les polypes régressent à nouveau si le traitement est repris. Il est à noter que 3 cas de cancer rectal apparus sous sulindac ont été rapportés (Niv et coll 1994; Thorson et coll 1994; Lynch et coll 1995) malgré la disparition des autres polypes, ce qui suggèrent que cette drogue pourrait être inefficace lorsque la prolifération tumorale est déjà trop avancée. Enfin, dans le cadre de tels traitements à long terme, la décroissance progressive des doses de sulindac est envisageable, la dose minimale efficace étant alors de 50 à 100 mg par jour (Winde et coll 1997).

3) Limites et mécanismes:

3-1) Limites des AINS: les effets secondaires

La limite de ce type de stratégie est due aux effets secondaires (Ishikawa et coll 1997) provoqués par des traitements à long terme. Les effets secondaires principaux concernent le tractus digestif supérieur avec des saignements dus à des ulcères. D'autres effets secondaires plus rares peuvent toucher la peau (photosensibilité) les reins (néphrite) et le foie (hépatites).
En effet, dans le cadre d'une étude d'intervention sur des patients atteints de polypose sporadique, de nombreux arrêts de traitement pour effets secondaires ainsi que la survenue d'accidents hémorragiques potentiellement sévères ont été nécessaires (Ishikawa et coll 1997).
Toutefois, l'apparition récente de nouveaux types d'AINS, inhibiteurs spécifiques de l'activité COX-2, ne présentant pas d'effets secondaires, ouvrent de nouvelles perspectives.

3-2) Les mécanismes d'action:

A partir des données des expérimentations animales, plusieurs mécanismes d'action potentiels des AINS sont étudiés actuellement. Le mécanisme le plus fréquemment proposé implique l'inhibition de l'activité cyclo-oxygénase (COX). L'activité COX, et plus particulièrement COX-2, est augmentée au cours de la carcinogenèse colique. L'expression de COX-2 est augmentée au niveau des adénomes et carcinomes par rapport au tissu sain (Kargman et coll 1995).
L'implication de COX dans le mécanisme de protection est cependant controversée puisque deux métabolites du sulindac, sulfone et sulfide, présentent des effets antinéoplastiques comparables alors que seul le dérivé sulfide inhibe l'activité COX (Piazza et coll 1995).

4) Conclusions:

Dans la majorité des études épidémiologiques incluant plus de 18 000 cas de cancers et plus de 2000 cas de polypes rectocoliques, la consommation d'aspirine et/ou d'AINS est associée à une diminution du risque de polypes et de cancers rectocoliques. Cet effet apparaît d'autant plus important que la consommation est ancienne et régulière.
Une étude d'intervention (Gann et coll 1993) a évalué l'effet de l'aspirine à la dose de 325 mg prise un jour sur deux chez 22 071 médecins américains volontaires engagés dans un essai de prévention des maladies cardio-vasculaires. L'incidence des cancers ou des polypes rectocoliques n'était pas modifiée après 5 ans de traitement. Cependant, 6 ans après l'inclusion, le risque relatif avait diminué tant pour les cancers que pour les polypes bien que cette diminution n'atteigne pas le seuil de significativité.

III- LA PREVENTION DU CANCER COLORECTAL PAR MODIFICATION DU REGIME ALIMENTAIRE: LES DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES

1) Résultats et limites des études épidémiologiques nutritionnelles:

Les données d'incidence sur le cancer colorectal à travers le monde font apparaître des différences considérables, avec des rapports de 1 à 15, entre pays à risque faible comme les régions rurales d'Afrique, la Chine et l'Inde, et les régions à risque élevé comme l'Australie, l'Amérique du Nord et la plupart des pays d'Europe occidentale et nordique (Parkin 1992). De plus, l'incidence du cancer colorectal augmente dans les pays qui adoptent un régime alimentaire occidental, comme cela a été le cas pour le Japon (Boyle 1993). Les pays à bas risque ont une prédominance de cancers du côlon droit, tandis que les pays à haut risque sont caractérisés par une large prépondérance des localisations distales; ce qui laisse là aussi supposer l'influence de facteurs alimentaires.

Mais, les résultats des études épidémiologiques ne sont pas suffisamment clairs pour justifier des mesures de prévention. Une des difficultés d'interprétation des études sur les facteurs alimentaires résulte des interactions qui existent entre les différents nutriments . Une autre limite est due au fait que les premières étapes de l'évolution tumorale sont le plus souvent asymptomatiques. Ainsi les groupes témoins servant de comparaison avec les groupes de patients atteints de cancer peuvent comporter une proportion variable et non évaluée de porteurs d'adénomes.

Toutefois, l'analyse d'ensemble des données épidémiologiques, cliniques et expérimentales suggère une corrélation (positive et négative) entre alimentation et carcinogenèse.

2) Facteurs alimentaires modifiant la carcinogenèse colorectale:

2-1) Facteurs associés à une augmentation du risque de tumeurs colorectales:

Rôle des graisses, des viandes et des protéines

Potter et coll ont observé une association positive entre la consommation de lipides et le risque de cancer (Potter et coll 1993). Dans une étude réalisée en Côte-d'Or (Faivre 1997), il apparaissait que c'est essentiellement la consommation de matières grasses animales ajoutées à l'alimentation (beurre, crème, saindoux) qui était associée au risque de cancer colorectal. Toutefois, d'autres études présentent des résultats plus contrastés concernant cette association positive.

Les résultats sont plus intéressants lorsque les études sont focalisées sur des nutriments. Les lipides saturés sont le plus souvent concernés: la consommation d'acides gras saturés augmenterait le risque de cancer, celle d'acide oléique présenterait un effet inverse. Une

consommation élevée d'acide gras poly-insaturés de type linoléique augmenterait le risque de cancer du rectum. Cette différence d'effet en fonction du type de graisse a été retrouvée dans les modèles animaux, avec un effet protecteur des acides gras poly-insaturés de type ω-3.
En ce qui concerne les viandes (Potter et coll 1993), plusieurs études montrent une relation positive entre consommation de viande et risque de cancer mais les résultats sont très contrastés avec même, parfois, la mise en évidence d'association négative. Une étude conduite chez des infirmières américaines suggère qu'une forte consommation de viande rouge est un facteur de risque et qu'à l'inverse les forts consommateurs de poisson et de poulet sont à bas risque (Willett et coll 1990). Il a été également suggéré que la cuisson des aliments en particulier celle des graisses et des viandes entraînerait la production de composés carcinogènes. Les protéines de la viande seraient à l'origine d'amines hétérocycliques, tandis que la cuisson de graisses à haute température produirait des promoteurs de la cancérogenèse. Une étude suédoise montre une augmentation du risque de cancer du côlon pour les consommateurs réguliers de viande longtemps cuite dans la graisse, avec un risque encore plus élevé pour le rectum (Gerhardsson de Verdier et coll 1991).

Rôle de l'alcool

Une étude de corrélation au Pays Bas avait attiré l'attention sur le rôle possible de la bière dans la survenue du cancer colorectal (Goldbohm et coll 1994). Cette étude fait apparaître un lien statistiquement significatif mais faible entre cancer colorectal et consommation d'alcool; cette relation existe quelle que soit la localisation colique ou rectale du cancer et quel que soit le type d'alcool. Cependant les études cas-témoin et les études de cohorte restent très discordantes.
Une étude réalisée en Côte-d'Or (Boutron et coll 1995) met en évidence une liaison spécifique entre alcool et risque d'adénome de taille supérieure à 1 cm. L'alcool interviendrait alors sur une étape précoce de promotion du cancer: la croissance de l'adénome. Les mécanismes par lesquels l'alcool pourrait intervenir ne sont pas clairement établis. Si l'alcool ne semble pas avoir d'effet carcinogène direct, son métabolite, l'acétaldéhyde, a un effet cytotoxique prouvé. Il a été suggéré que l'éthanol aurait une action directe sur la flore intestinale, avec production de divers métabolites, en particulier des concentrations élevées d'acétaldéhyde (Seitz et coll 1998).

Rôle du sucre et des hydrates de carbone

Dans une étude de 1994, Bostick et coll (Bostick et coll 1994) observaient une association positive entre la consommation de sucre et le risque de tumeurs intestinales. De même, dans cette étude, il existait une relation dose-effet entre risque de cancers colorectaux et consommation de produits sucrés. Les études réalisées en France mettent en évidence une association positive avec les sucres aussi bien pour les cancers (Macquart-Moulin et coll 1986) que pour les adénomes (Macquart-Moulin et coll 1987).

Les mécanismes invoqués pour expliquer ces associations passent en particulier par l'hyperinsulinisme (Giovannucci et coll 1995a; McKeown-Eyssen et coll 1994).

Rôle des calories, de l'obésité et de l'activité physique

Enfin, de nombreuses études ont mis en évidence une association positive entre apport calorique élevé et risque de cancer colorectal (Giovannucci et coll 1995a). Une telle association a également été observée avec les adénomes (Little et coll 1993a). Ces études ont fait apparaître un risque élevé de cancer colorectal chez les obèses; le type d'obésité préférentiellement associé avec un risque élevé de tumeur étant l'obésité de type abdominal (Giovannucci et coll 1995b).

La sédentarité joue également un rôle favorisant vis à vis des tumeurs colorectales. De nombreuses études ont mis en évidence un effet protecteur net de l'activité physique sur le risque de cancer colorectal (Thune et coll 1996), mais également, plus modestement, sur le risque d'adénome (Neugut et coll 1996).

2-2) Facteurs associés à une diminution du risque de tumeur colorectale :

Effet protecteur des fibres alimentaires

Si les études de corrélation géographique avaient permis de soupçonner le rôle important joué par les fibres alimentaires dans la protection vis à vis des tumeurs colorectales, les données au niveau individuel (étude de cas témoins) sont plus discordantes. Une étude américaine a mis en évidence une relation inverse entre le risque de cancer colorectal et la consommation de fibres pour des patients consommant plus de 27g. de fibres par jour (Howe et coll 1992). En extrapolant ces résultats à la population américaine entière, les auteurs estimaient même que la consommation de 13g par jour de fibres pouvait réduire de 21% par an le nombre de cancers colorectaux aux USA (soit 50000 cas). Au niveau des adénomes, plusieurs études ont également observé une corrélation négative avec la consommation de fibres (Little et coll 1993b). Très récemment le The New England Journal of Medicine publiait les résultats d'une étude épidémiologique (Fuchs et coll 1999) portant sur 88757 femmes âgées de 34 à 59 ans mettant en évidence l'absence de relation entre la consommation de fibres et l'apparition d'adénomes ou de cancers colorectaux. La conclusion de cette étude a toutefois été pondérée notamment dans une lettre à Gastroenterology (Walsh 1999) qui insistait sur le fait que l'étude excluait la période de vie (au delà de 59 ans) ou l'incidence tumorale dans la population générale est la plus importante. De plus, les études épidémiologiques ne rendent pas compte de l'hétérogénéité physico-chimique des fibres alors que différents types de fibres peuvent exercer des effets différents comme en témoigne une étude d'intervention chez des femmes pré-ménopausées (Reddy et coll 1992).

Rôle protecteur des végétaux

L'effet protecteur des légumes est un des résultats les plus constants des études à visée étiologique. Un bilan des études épidémiologiques jusqu'en 1990 a montré qu'une majorité de travaux étaient en faveur d'un effet protecteur (Trock et coll 1990). Ces études suggèrent que l'effet protecteur serait dû aux crucifères : choux, choux de Bruxelles, choux-fleurs, navets, brocolis. Dans les autres études, l'ensemble des légumes semble intervenir dans la diminution du risque. Le rôle protecteur des légumes verts crus est un peu plus net que celui des légumes verts cuits (Tuyns et coll 1988). Parmi les études les plus récentes, une étude australienne (Steinmetz et coll 1993) a mis en évidence un effet protecteur des oignons, des légumineuses, ainsi que les fruits crus et les choux.
Un effet protecteur des fruits et/ou des légumes sur le risque d'adénome a été également mis en évidence dans plusieurs études cas-témoin. Dans l'étude réalisée en Côte-d'Or, l'effet protecteur des fruits était spécifique du risque de gros adénomes (Faivre et coll 1997).
Plusieurs composants des légumes peuvent expliquer leur effet protecteur. Ils sont riches en vitamines antioxydantes et en fibres alimentaires. Ils jouent également un rôle de lest qui diminue la concentration des carcinogènes au niveau du bol fécal.

Effet protecteur du calcium et de la vitamine D:

De nombreuses données épidémiologiques, cliniques et expérimentales, suggèrent que la consommation de calcium peut être protectrice contre le cancer colorectal. Le potentiel préventif du calcium a été initialement suggéré par des études mettant en évidence une relation inverse entre la consommation de calcium et vitamine D et l'incidence tumorale (Garland et coll 1985; Bostick et coll 1993a). Toutefois, cette corrélation inverse n'a pas toujours été observée (Kleibeuker et coll 1995). Plusieurs études chez des rongeurs mettaient aussi en évidence un effet protecteur du calcium dans le cadre d'une supplémentation en calcium associée à une induction à la DMH (Sitrin et coll 1991). Suite à une étude de 1998, il apparaît que l'effet d'une augmentation de la prise de calcium ait des effets très limités sur des marqueurs intermédiaires de la carcinogenèse colique (prolifération et différenciation cellulaire) (Holt et coll 1998). Les études sur les adénomes (Boutron et coll 1996) ne mettent pas en évidence d'association avec la consommation de calcium.
Enfin, plusieurs études suggèrent un effet protecteur spécifique des produits laitiers fermentés; dans l'étude de Côte-d'Or, la consommation de yaourt était associée à un risque moindre des adénomes (Boutron et coll 1996).

Effet protecteur des vitamines antioxydantes

Il a été suggéré par des études expérimentales chez l'animal et par quelques études cas-témoin chez l'Homme que les vitamines (vitamines A, C, E et β-carotène) et minéraux (sélénium) à effet antioxydant pourraient diminuer le risque de tumeurs colorectales, mais les résultats disponibles sont discordants. Une étude de cohorte américaine a mis en évidence un effet protecteur de la vitamine E en particulier consommée sous forme de suppléments

alimentaires, c'est à dire à des doses supérieures à celles contenues habituellement dans l'alimentation (Bostick et coll 1993b). Cet effet n'était pas observé pour d'autres vitamines comme la vitamine C ou le β-carotène.

Rôle des folates

Quelques études font apparaître un rôle protecteur des folates contre le risque de tumeurs colorectales. Il est à noter que les légumes sont une des sources importantes de folates dans l'alimentation. Une étude cas-témoin (Freudenheim et coll 1991) a montré un effet protecteur sur le risque de cancer du rectum lorsque l'on contrôlait l'apport calorique mais aucune association avec le cancer du côlon. L'effet protecteur observé était maximal dans la catégorie de consommation d'alcool la plus élevée, suggérant une interaction entre l'effet des folates et celui de l'alcool. Une étude de cohorte américaine (Giovannucci et coll 1993) a également mis en évidence une relation significative entre la consommation alimentaire de folates et un faible risque d'adénomes colorectaux.

Effet protecteur du café

Plusieurs études ont mis en évidence une relation inverse entre consommation de café et risque de cancer ou d'adénomes colorectaux. Le mécanisme impliqué n'est pas clair et pourrait faire intervenir une réduction de l'excrétion fécale du cholestérol (Rosenberg et coll 1989). Plus récemment une étude confirmait cette relation inverse entre consommation de café et incidence tumorale (Giovannuci et coll 1998).

3) Etudes cliniques:

Un des grands progrès réalisé ces dernières années est le passage des études d'observation à des essais de prévention (Vargas et coll 1992) qui testent les hypothèses les plus solides des études antérieures. Ce type d'études est le seul moyen de démontrer s'il est réellement possible, en modifiant des facteurs alimentaires, d'influencer l'incidence des tumeurs colorectales.

Intervention sur des marqueurs de risque de cancérogenèse

Les marqueurs les plus étudiés sont la prolifération cellulaire colique et les acides biliaires fécaux. Dans une étude contrôlée contre placebo chez 52 sujets, les sujets recevant un supplément de 13,5 g de son de blé ou 1500 mg/j de calcium avaient à 9 mois, une réduction de 52% des concentrations d'acides biliaires totaux et de 48% de l'acide déoxycholique dans les selles (Alberts et coll 1996). Une étude d'intervention avec des suppléments de vitamine E, de β-carotène ou de vitamine C chez des sujets porteurs d'adénomes colorectaux a permis de rétablir des niveaux de prolifération cellulaire similaires à ceux de témoins normaux avec la vitamine C à la dose de 750 mg/j pendant un mois. Le β-carotène réduisait l'hyperprolifération

seulement à la base des cryptes tandis que la vitamine E n'avait aucun effet (Cahill et coll 1993). Il est également possible d'étudier les enzymes bactériennes fécales associées au risque de cancer colorectal: β glucuronidase, nitroréductase et 7 α déshydroxylase, enzyme clé de la conversion des acides biliaires primaires en secondaires. Une étude chez des femmes préménopausées ayant pris 15 g de fibres par jour pendant 8 semaines a mis en évidence une hétérogénéité de l'effet selon le type de fibre. Le son de blé réduisait tous les marqueurs étudiés, β glucuronidase, azoréductase et nitroréductase, et 7 α déshydroxylase, ainsi que les concentrations fécales d'acide désoxycholique, lithocholique et de stérols neutres. Le son d'avoine ne diminuait que les taux de β glucuronidase, azoréductase et nitroréductase, et le son de maïs avait des effets dissociés augmentant même le taux d'acide lithocholique et l'activité de la 7 α déshydroxylase (Reddy et coll 1992).

Intervention sur les tumeurs colorectales

Le critère de jugement de l'efficacité de l'intervention a rarement été jusqu'à présent le cancer. Les études d'intervention prennent donc comme critère de jugement un "marqueur de risque" du cancer colorectal. Plus celui-ci est proche du cancer lui-même, plus convaincante est la démonstration. L'étape précédant le cancer est celle de croissance d'un adénome. Toutefois, devant les difficultés de l'étude de croissance des adénomes, la plupart des études d'intervention en cours ont pris la récidive d'adénomes comme critère de jugement de l'efficacité de l'intervention.

L'une (McKeown-Eyssen et coll 1988) indique que la vitamine C (400 mg/j) et la vitamine E (400 mg/j) pendant 2 ans ne diminuent pas le risque de récidive des adénomes. L'autre fait intervenir l'association d'une réduction de l'apport en graisses associée à un supplément de fibres (50g/j) comparée à un régime occidental "normal". Globalement, il n'existait aucune différence entre les deux groupes en ce qui concerne le taux de récidive des adénomes. Il faut cependant signaler que chez les femmes, le taux de récidive était réduit de moitié (différence non significative), associé à une diminution des acides biliaires fécaux, tandis que l'inverse était observé chez les hommes, doublement du taux de récidive et augmentation des concentrations d'acides biliaires fécaux (McKeown-Eyssen et coll 1994).

L'étude australienne (MacLennan 1995) utilisant des suppléments de β -carotène (20 mg/j), de fibres, ou un apport réduit en graisses pendant 4 ans a mis en évidence un effet néfaste des suppléments de β-carotène (augmentation du risque d'adénomes), et une réduction du risque de gros adénomes avec moins de graisses et une supplémentation en fibres, l'effet maximal étant obtenu avec une combinaison des deux interventions.

4) Conclusions des études épidémiologiques et cliniques:

Grâce aux études épidémiologiques, des progrès ont été réalisés au cours de ces dernières années sur la connaissance des facteurs impliqués dans la cancérogenèse colorectale

et sur leurs mécanismes d'action. Les données parfois discordantes des études épidémiologiques ne permettent cependant pas encore de faire des recommandations reposant sur des bases indiscutables. Le rôle protecteur des légumes verts est de fait le mieux établi. Le rôle protecteur de (certaines?) fibres reste à confirmer. Il y a également des données convergentes suggérant qu'un apport calorique élevé, une vie sédentaire et un excès de poids sont des facteurs de risque.

Plutôt que des supplémentations nutritionnelles pouvant entraîner une pérennisation de mauvaises habitudes alimentaires, certains auteurs préféreraient favoriser une véritable éducation nutritionnelle, en corrigeant essentiellement les apports excessifs en graisses et les carences d'apport en végétaux.

Différentes stratégies de prévention primaire des cancers colorectaux restent donc envisageables. Elles pourraient dépasser le simple stade du conseil alimentaire si les agents effecteurs présents dans l'alimentation et leur mode d'action étaient identifiés de manière indiscutable.

5) Mécanismes

Sous le terme de fibre se regroupe une grande variété de substances provenant principalement de la paroi cellulaire des végétaux qui vont résister aux enzymes du tractus digestif supérieur pour arriver intacts au niveau du côlon et pour y être dégradé par les bactéries coliques. La définition proposée en 1987 par Englyst et coll limite les fibres aux polysaccharides non amylacés. Il semble pourtant indispensable d'y adjoindre les amidons qui vont échapper à la digestion et ainsi atteindre intacts le côlon (amidons résistants). Parler de glucides indigestibles permet de regrouper ces différentes familles en fonction de leur devenir dans le tube digestif.

Le mécanisme d'action des fibres sur la carcinogenèse intestinale dépend vraisemblablement de plusieurs mécanismes. Un de ces mécanismes concerne les interactions entre fibres, bactéries intestinales et acides biliaires (Potter et coll 1992). Les fibres insolubles ou peu solubles ne sont pas dégradées au niveau de l'intestin grêle et servent de substrat à certains types de bactéries. Leur dégradation produit une acidification intestinale peu favorable à l'action des enzymes nécessaires à la conversion des acides biliaires primaires en acides biliaires secondaires, en particulier, la 7-α déshydroxylase (Potter et coll 1993). Cette enzyme, n'agit pas en dessous d'un pH de 6,5. L'effet protecteur des fibres alimentaires pourrait également s'exercer par l'intermédiaire de leurs produits de dégradation sous l'action des bactéries intestinales, les acides gras à chaîne courte. Parmi ceux-ci, le butyrate qui est une source d'énergie pour les colonocytes, joue un rôle majeur comme agent de contrôle des processus de prolifération-différenciation-d'apoptose (Hague et coll 1996), et agit sur les mécanismes intracellulaires de régulation de l'expression de certains gènes (Basson et coll 1998).

IV- LES OLIGOSACCHARIDES NON DIGESTIBLES: ALIMENTS FONCTIONNELS ?

Le professeur Roberfroid M. a proposé la définition suivante d'un aliment fonctionnel: "*aliment qui renferme un ingrédient, un micro-nutriment ou un produit chimique naturel pour lesquels on dispose de résultats scientifiques démontrant des interactions significatives et bénéfiques avec une ou un nombre limité de fonctions dans l'organisme*".

Et parmi les fibres alimentaires, les oligosaccharides non digestibles (OND) semblent jouer un rôle nutritionnel particulièrement important. En effet, depuis une dizaine d'année, de nombreuses données expérimentales impliquent les OND dans plusieurs phénomènes biologiques bénéfiques pour la santé: effet prébiotique, absorption des minéraux, métabolisme des lipides et interférence avec la carcinogenèse colique.

1) Définition:

Les OND sont naturellement présents dans l'alimentation humaine, toutefois la quantité assimilée quotidiennement dans un régime type "Western diet" est faible et très mal connue. Les OND sont présents dans de nombreuses plantes comestibles mais aussi dans le lait maternel. On les retrouve naturellement dans les oignons, les artichauts et la chicorée.

Les OND sont composés d'une moyenne de 2 à 10 monosaccharides: on parle de degré de polymérisation de 2 à 10 (cf tableau 2). Il existe plusieurs classes d'OND comme l'inuline et ses dérivés les fructo-oligosaccharides, les galacto-oligosaccharides et gluco-oligosaccharides etc.

Oligosaccharides Non Digestibles	Composition chimique
Fructo-oligosaccharides	> 95% d'oligosaccharides ß 2-1 fructan: sucrose, fructose (dp: 2 à 5, 4 en moyenne)
Inuline	> 99% d'oligosaccharides ß 2-1 fructan (dp: 10 à 12 en moyenne)
Galacto-oligosaccharides	85% d'oligogalactose: petite quantité de glucose, galactose et lactose
Xylo-oligosaccharides	70% de xylose, liaison ß 1-4 (dp 2 à 4)
Isomalto-oligosaccharides	Mélange d'oligomères de glucose, liaison α 1-6 (isomaltose, panose)

Tableau 2: Composition chimique d'OND (dp: degrés de polymérisation)

Les fructo-oligosaccharides sont composés d'unités de fructose (F) liées en ß 2-1 au sucrose (G) pour former principalement le 1-Kestose (GF2), le Nystose (GF3) et Fructosylnytose (GF4) (cf figure 1). Les fructo-oligosaccharides ont une valeur énergétique de 6KJ par gramme et ne présentent pas d'effet génotoxique, carcinogénique ou toxicologique. Ils présentent un léger effet laxatif et peuvent à haute quantité ingérée provoquer des problèmes de flatulence (Yun et coll 1996).

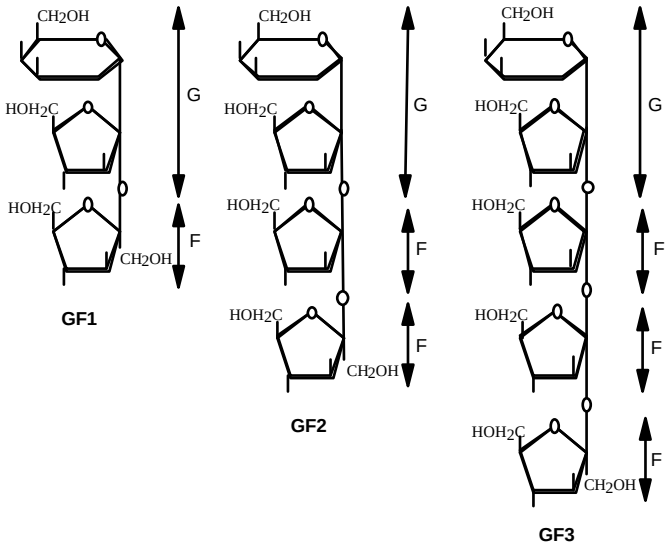


Figure 1: Structure chimique des fructo-oligosaccharides. G: sucrose, F: fructose

2) Effet sur la flore colique:

2-1) Production d'acides gras à chaîne courte (AGCC):

Les OND, échappant à la dégradation le long du tractus digestif supérieur, vont être convertis en AGCC par la flore anaérobie du côlon. En fonction de l'OND, cette fermentation va aboutir à la production de différentes proportions d'acétate, propionate et butyrate. La dégradation des oligosaccharides aboutit aussi à la génération de gaz (hydrogène, dioxyde de carbone et méthane) et d'acides organiques comme le lactate. Ceci engendre la réduction du pH et fournit une source d'énergie pour les bactéries.

In vitro, la fermentation avec des bactéries coliques humaines de fructo-oligosaccharides et inuline augmente la proportion de propionate et butyrate, celle de galacto-oligosaccharides favorise la production d'acétate et propionate alors que les xylo-oligosaccharides augmente préférentiellement celle d'acétate (Campbell et coll 1997; Djouzi et coll 1997).

2-2) Effet prébiotique:

On définit un prébiotique comme une molécule, qui en échappant aux enzymes digestives du tractus intestinal supérieur, atteint le côlon pour y être sélectivement utilisé et ainsi favoriser la croissance d'un groupe limité de micro-organismes présentant des propriétés bénéfiques (Macfarlane et coll 1999). Les bifidobactéries et les bactéries lactiques sont considérées

comme les marqueurs de l'effet prébiotique, une littérature abondante mettant en évidence leur effet bénéfique.

Tous les OND ne présentent pas des propriétés prébiotiques; l'inuline et les fructo-oligosaccharides sont les plus étudiés (Bouhnik et coll 1993). Dans une étude chez des volontaires sains, la prise quotidienne de 8g. de fructo-oligosaccharides augmente la proportion de bifidobactéries dans les fèces de 10 fois, tout en réduisant la proportion de clostridia et d'entérobactéries (Hidaka et coll 1986). Plusieurs autres études ont observé un effet bifidogénique significatif de l'inuline et fructo-oligosaccharides (Roberfroid et coll 1998). Les études concernant l'effet bifidogénique des galacto-oligosaccharides sont plus contrastées (Ito et coll 1993; Alles et coll 1999).

Cet effet fortement bifidogénique des oligosaccharides ß 1-2 fructan type inuline et fructo-oligosaccharides peut être attribué à leur structure biochimique: leur chaîne oligosaccharidique est principalement formée de fructose branché en ß 1-2. Ce type de branchement est plus accessible à l'hydrolyse bactérienne.

3) Effet sur l'absorption des minéraux:

De nombreuses études ont mis en évidence que les OND augmentent la biodisponibilité des minéraux (Scholz-Arhens et coll 1998). Chez le rat, l'absorption de calcium et de magnésium est augmentée par la consommation de fructo-oligosaccharides (Lemort et coll 1997). Baba et coll (1996) avaient formulé l'hypothèse que cet effet des OND sur l'absorption minérale se déroulait au niveau du côlon: ce qui est une hypothèse originale puisqu'il est admis que l'absorption s'effectue au niveau de l'intestin grêle.

Une étude chez des volontaires sains adolescents avec des isotopes stables, montre une augmentation de l'absorption de 25% suite à la consommation pendant une semaine de 15g. par jour d'oligofructose (Van de Heuvel et coll 1999).

Cette augmentation de l'absorption minérale ouvre de nouvelles perspectives. En effet, Scholz-Arhenset coll (1998), en utilisant des rats ovariectomisés comme modèle animal de femmes ménopausées, mettent en évidence une augmentation de l'absorption de calcium après consommation d'inuline. De plus, ils démontrent que ce calcium est effectivement utilisé à l'augmentation de la densité osseuse, faisant donc de l'inuline un outil contre l'ostéoporose.

4) Effet des OND sur le métabolisme lipidique:

Plusieurs expérimentations animales suggèrent que le métabolisme lipidique est affecté par la consommation d'inuline et de fructo-oligosaccharides. En effet, les travaux de Fiordaliso en 1995 (Fiordaliso et coll 1995), ont permis de mettre en évidence une hypolipidémie (plus particulièrement triglycéridémie) associée à la consommation d'oligofructose chez le rat. Plusieurs études donnent des résultats similaires chez le rat à la

dose de 100g/kg d'oligofructose (Delzenne et coll 1993; Hata et coll 1983). Par contre le taux de cholestérol n'est pas toujours réduit dans un modèle animal.
Enfin, une intervention chez des patients atteints d'hypercholestérolémie (LDL-cholestérol) avec de l'oligofructose à 8g/jour (Yamashita et coll 1984) ou de l'inuline à 8g/jour (Davidson et coll 1998) régule leur taux de cholestérol circulant.

5) Effet des pré et probiotiques sur la carcinogenèse colique et l'immunité:

Aujourd'hui, il est généralement admis qu'un probiotique est une préparation d'un ou plusieurs micro-organismes vivants qui, administrée à l'Homme ou l'animal, engendre des effets bénéfiques en améliorant les propriétés de la flore endogène (Havenaar et coll 1992). Les bactéries les plus utilisées pour leur propriété probiotique sont les bactéries lactiques: *Lactobacillus acidophilus, L. casei, Bifidobacterium bifidum, B. longum* (Conway et coll 1998).
Dans le cadre des études des propriétés bénéfiques des bactéries lactiques, deux stratégies sont possibles: administrer directement la bactérie d'intérêt (Probiotique) ou la fibre (Prébiotique) qui favorisera préférentiellement la croissance de la bactérie. Plusieurs travaux ont étudié l'effet des pré et probiotiques sur la carcinogenèse colique et sur le système immunitaire.

Depuis les années 1980, de nombreux groupes se sont intéressés à une potentielle action anti-tumorale des probiotiques. De nombreuses études chez l'animal et dans une moindre mesure chez l'Homme ont permis de valoriser cette hypothèse. En effet, dès 1979, le nombre de tumeurs hépatiques, chez une souris avec une flore intestinale comprenant *Eschericia coli, Enterococcus faecalis* et *Clostridium paraputrificum*, est considérablement diminué si *B. longum* est présent (Mitzutani et coll 1979). Des travaux plus récents, confirmèrent cette action anti-tumorale des probiotiques chez des souris porteuses de tumeurs Meth-A (fribrosarcomes): les résultats mirent en évidence que l'injection intra-pleurale de *L. casei* augmentait la survie des souris porteuses de tumeurs, avec certains cas de guérisons. Les études d'immunodéplétion permirent de mettre en évidence que les lymphocytes CD8+ participaient à cet effet bénéfique (Matsuzaki et coll 1996).

Toutefois, d'autres groupes se sont concentrés spécifiquement sur cet effet anti-tumoral dans le cadre du cancer colique dans des modèles animaux chimio-induits (DMH et AOM) (cf Tableau 3).
Au début des années 80, Goldin et coll (1980) utilisent le modèle de rat induit à la DMH pour étudier l'impact d'une supplémentation en Lactobacilli sur l'incidence tumorale colique: une supplémentation orale en L. acidophilus provoque une réduction de 77% à 40% du nombre de rats porteurs de tumeurs coliques pour le groupe supplémenté. D'autres travaux présentés dans le tableau 3 confirment cette observation avec d'autres probiotiques comme *B. longum*.. Très récemment, le groupe de Reddy (Rao et coll 1999) montre une réduction du nombre total et

par cm2 de cryptes aberrantes (lésion potentiellement précancéreuse) chez des rats traités à l'AOM lorsqu'ils sont nourris avec un régime alimentaire standardisé contenant 0,2 ou 4% de *L. acidophilus,* cette réduction significative étant dose dépendante (P<0,05).

Chez le rat induit à l'AOM, la consommation séparée de Bifidobactéries et d'inuline provoque une diminution du nombre de cryptes aberrantes de respectivement 26 et 41%. Par contre, la combinaison fibre + probiotique (symbiotique) provoque une chute de 80% des cryptes aberrantes totales et de 59% des foyers de cryptes aberrantes (>4 cryptes par foyer) par rapport au groupe témoin (Rowland et coll 1998). Puisque la supplémentation en *B. longum* débutait 1 semaine après l'injection du carcinogène, les auteurs concluaient à un effet protecteur contre les stades précoces de la carcinogenèse. Toutefois, le protocole utilisé (supplémentation très proche de l'induction) ne permet pas d'étudier l'effet protecteur contre des stades plus avancés. Enfin, Reddy et Rivenson en 1993 ont utilisé le modèle du rat induit à l'IQ (2 amino-3-methylimidazo quinolone) pour induire des tumeurs coliques, hépatiques, et mammaires. Une supplémentation de 0,5% de *B. longum* réduit l'incidence tumorale colique de 100%, celle des tumeurs hépatiques de 80% et celle des tumeurs mammaires de 50%.

Références	**Modèle animal**	**Pro et prébiotiques**	**Effet sur la carcinogenèse colique**
Goldin (1980)	Rat DMH	*L. acidophilus*	Diminution du pourcentage de rats porteurs de tumeurs de 77 à 44%.
Shakelford (1983)	Rat DMH	*L. bulgaris*	Diminution de 28 à 7% de rats morts à 36 semaines
Takano (1985)	Rat DMH	*L. helveticus*	Diminution du % de rats porteurs de tumeurs et de tumeurs/animal
Koo (1991)	Souris DMH	*B. longum* + 5% oligofructose	Diminution du nombre de cryptes aberrantes à 20 et 30 semaines
Kulkami (1994)	Rat AOM	*B. longum* (1,5 et 3% du régime)	Diminution du nombre de cryptes aberrantes (effet dose sensible)
Rowland (1998)	Rat AOM	Inuline + *B. longum*	Réduction du nombre de cryptes aberrantes totales
Rao (1998)	Rat AOM	Inuline (10% du régime)	Pas d'effet sur cryptes aberrantes totales, diminution du nombre /cm^2
Rao (1999)	Rat AOM	*L. casei* (0,2 et 4% du régime)	Réduction du nombre de cryptes aberrantes totales (effet dose)
			Autres types de cancers
Matsuzaki (1996)	Souris + tumeurs Meth-A (fibrosarcome)	*L. casei* (injection intra-pleurale)	Guérison et survie augmentée (implication des L.T CD8+)
Taper (1997)	Souris + tumeurs en i.m. (TLT et EMT6)	15% oligofructose ou inuline	Diminution de la croissance tumorale

Tableau 3: Pro et prébiotiques et carcinogenèse

Ainsi de nombreuses études animales valident l'hypothèse de la protection exercée par des probiotiques contre la carcinogenèse colique. Ces résultats *in vivo* ont été confirmés par des travaux *in vitro* de Baricault et coll (1995) montrant une inhibition de la croissance de cellules tumorales coliques (HT-29) par des bifidobactéries. Toutefois une étude de la flore de patients américains et japonais par Moore et coll (1995) a mis en évidence une corrélation positive entre concentration de Bifidobactéries et le risque de cancer colique.

Même si les résultats expérimentaux sont nombreux, les mécanismes mis en jeu ne sont pas clairement définis. Plusieurs équipes, qui ont mis en évidence un effet protecteur des probiotiques, ont observé simultanément à la baisse de l'incidence tumorale une diminution de l'activité de plusieurs enzymes bactériennes potentiellement impliquées dans la carcinogenèse colique comme la β-glucuronidase. Ainsi, Rowland et coll observèrent une baisse de cette activité enzymatique ainsi qu'une baisse du pH, parallèle à l'effet protecteur de la supplémentation en *B. longum* (Rowland et coll 1998). Rao et coll (1999) mettent en évidence une baisse dose dépendante de l'activité β–glucuronidase faisant suite à l'addition de *L. acidophilus* dans la nourriture chez le rat chimio-induit. Ling et coll (1994) confirmèrent ces résultats chez l'Homme et montrèrent une diminution de 40% de l'activité de nombreuses enzymes bactériennes dont la β–glucuronidase après une supplémentation orale de 4 semaines avec des lactobacilli.

D'autres hypothèses ont été proposées pour expliquer cet "effet probiotique". Plusieurs groupes ont rapporté que l'expression de l'Ornithine Décarboxylase (ODC: enzyme clef de la synthèse des polyamines) était significativement diminuée par le traitement avec des bifidobactéries de rats induits à l'AOM. L'ODC semble être impliquée dans la carcinogenèse colique puisqu'une forte expression d'ODC est retrouvée dans les adénocarcinomes. Un traitement au difluoromethylornithine qui est un inhibiteur spécifique de l'ODC inhibe le développement des tumeurs coliques induites par l'AOM chez le rat (Shinge et coll 1992). Enfin, Reddy (1999) rapporte que l'effet inhibiteur de la carcinogenèse provoqué par une supplémentation en bifidobactéries est associé à une baisse de l'expression d'ODC, sans toutefois en expliquer le mécanisme.

Une autre hypothèse implique les bactéries lactiques en tant que possible immunomodulateur. L'administration de bifidobactéries et autres bactéries lactiques (viables ou non) est capable dans certains cas d'induire une réponse anti-tumorale *in-vitro* et *in-vivo*. Kohwi et coll (1978) montrent que l'injection de bifidobactéries dans la lésion inhibe la croissance de cellules tumorales Meth-A injectées en sous-cutanée. De plus, *in-vitro*, Sekine et coll (1995) observent qu'un extrait de paroi de Bifidobactéries est capable d'augmenter l'activité anti-tumorale *in-vitro* de cellules immunocompétentes de souris. Lee et coll (1993) étudient la réponse immunitaire de souris BALB/C et C57BL/6 à l'absorption de différents types de bactéries lactiques et mettent en évidence une activité mitogénique forte des bifidobactéries (*B. longum*,

bifidum et *adolescentis*) tout particulièrement sur les cellules issues des plaques de Peyer. Suite à ces travaux préliminaires, les auteurs proposaient qu'une supplémentation en bifidobactéries pouvait aboutir à une stimulation du système immunitaire du tractus digestif contre des bactéries pathogènes ou contre des cellules tumorales. Pour aborder plus précisément l'effet des probiotiques sur le système immunitaire, d'autres auteurs se sont focalisés sur la production de cytokines suite à une supplémentation *in vivo* et *in vitro* en bactéries lactiques. La production de deux cytokines proinflammatoires, le TNF alpha et L'IL-6, par des leucocytes mononucléaires sanguins est stimulée par des bactéries lactiques vivantes ou fixées au glutaraldehyde (*Bifidobacterium* et *Lactobacillus*) (Miettinen et coll 1996). Dans tous les cas, les bactéries vivantes stimulent plus fortement la production de cytokines. La production de TNF α et IL-6 induite par l'addition de bactéries vivantes est supérieure à celle obtenue par l'addition de LPS alors que ce dernier est classiquement reconnu comme un stimulateur de la production de ces cytokines. Les auteurs concluent à une capacité des bactéries lactiques à stimuler l'immunité non spécifique. D'autres études montrent aussi une stimulation de la production de cytokines par les bactéries lactiques (Pereyra et coll 1993, Matsuzaki et coll 1996).

Les travaux concernant l'effet des prébiotiques sur la carcinogenèse colique sont beaucoup plus limités. Reddy et coll (1997) supplémentent le régime de rats traités à l'AOM à hauteur de 100g/kg d'inuline ou d'oligofructose. Dans les deux cas, cette supplémentation, débutée avant l'induction, engendre une diminution statistiquement significative du nombre de foyers de cryptes aberrantes démontrant une action protectrice contre les stades très précoces de la carcinogenèse. Rowland et coll (1998) ont aussi observé un effet protecteur de l'inuline (50g/kg) mais cette fois contre la phase de promotion de la tumorigenèse puisque la supplémentation débutait après l'injection de l'agent chimio-inducteur. Enfin, Taper et coll (1997) montrent un effet protecteur d'oligofructose et de l'inuline (150g/kg) contre le développement de cellules tumorales hépatiques (TLT) et mammaires (MT6) injectées en sous-cutané à des souris, effet associé à une survie augmentée. Enfin, des galacto-oligosaccharides limitent le développement de cryptes aberrantes (rats traités à DMH) dans le cadre d'un régime riche en graisse, alors que la cellulose, fibre non fermentescible est sans effet (Wijnands et coll 1999).

En résumé, de nombreuses données expérimentales mettent en évidence un effet bénéfique potentiel des pré et probiotiques sur la santé: absorption des minéraux, métabolisme des lipides et protection contre le développement tumoral. Beaucoup de résultats sont encourageants, en particulier avec les OND type ß 2-1 fructan (fructo-oligosaccharides et inuline) et les bifidobactéries, mais ils demandent à être validés chez l'Homme.

LES MODELES ANIMAUX

I- INDUCTION CHIMIQUE CHEZ LES RONGEURS

Le modèle le plus souvent utilisé est l'induction par injection de carcinogènes chimiques par voie sous-cutanée(*sc*) ou intrapéritonéale (*ip*) chez le rat et la souris. Les carcinogènes peuvent être classés en trois catégories:

Les pro-carcinogènes (Hawks et coll 1971) comme le 3,2'-dimethyl-4-aminobipheny1 (DMAB), la 2-dimethylhydrazine (DMH) (Thurnherr et coll 1973) et son métabolite l'azoxymethane (AOM). Ces carcinogènes sont convertis en molécules électrophiles par le foie.

Les carcinogènes directs comme l'éthylnitrosourée (ENU) et la n-Methyl-n-Nitro-n-Nitrosoguanidine (MNNG) (Narisawa et coll 1971) .

Ces deux types de carcinogènes gagnent l'intestin par la circulation sanguine ou par la bile conjugués à l'acide glucuronique. Des enzymes du côlon où de la flore conduisent à la formation de l'agent électrophile, carcinogène ultime qui interagit avec l'ADN. La méthylation de l'ADN qui en résulte provoque des mutations par des mésappariements au niveau G-T au cours des réplications ultérieures.

L'injection de ce type de carcinogène engendre à court terme des foyers de cryptes aberrantes (dès deux semaines, Archer et coll 1992) qui sont considérés comme des marqueurs pré-néoplastiques. A plus long terme, l'injection hebdomadaire de DMH (10 à 20 mg/kg) provoque l'apparition de tumeurs coliques après une période de 6 mois (Lamont et coll 1978). Les tumeurs obtenues avec ce type de modèle partagent avec les tumeurs humaines de nombreuses similarités histologiques et biologiques. Toutefois, la séquence d'apparition de ces tumeurs chimiquement induites ne suit pas toujours la séquence adénome-carcinome qui est la plus fréquente chez l'Homme. Enfin, ils sont probablement différents des carcinogènes qui sont responsables des cancers colorectaux chez l'Homme, et la pertinence des événements génétiques qui conduisent au cancer n'est pas clairement établie.

Une troisième catégorie de carcinogènes est formée par les amines hétérocycliques (PhIP: 2-Amino -1- méthyl -6- phenyl {4,5-b} pyridine, ou IQ: 2- amino -3- methyl-imidazo (4,5p) quinoline) qui sont des molécules mutigènes produites par la pyrolyse des viandes, sans doute plus proches des carcinogènes chez l'Homme (Sugimura, 1994). L'apparition des lésions précancéreuses et des tumeurs est toutefois lente, et l'incidence est faible, ce qui explique que ces modèles soient moins utilisés.

II- LES MODELES GENETIQUES

Jusqu'au début des années 90, les modèles animaux de carcinogenèse colique étaient donc principalement des rongeurs soumis à des injections de carcinogènes chimiques. Les modèles génétiques sont apparus plus récemment, favorisés par une très bonne connaissance de la séquence des altérations génétiques qui conduisent aux cancers colorectaux. L'implication précoce de mutations ou troncations du gène *APC* dans tous les cancers de type PAF (polypose adénomateuse familiale) et dans la majorité des cancers de type sporadique, faisait de ce gène une cible privilégiée pour l'obtention d'un modèle animal. Toutefois une tentative a concerné le gène p53 dont l'implication est fréquente mais tardive dans la cancérogenèse colique.

1) Altérations de p53

Un modèle de souris dont les deux allèles de p53 étaient inactivés a été mis au point. Ces souris meurent précocement de lymphomes et sarcomes sans présenter de tumeurs coliques (Pories et coll 1993). Ce modèle murin correspond plutôt au rare syndrome Li-Fraumeni qui prédispose à une incidence tumorale multiple où sont également impliquées des mutations d'*Apc*.

2) Altérations d'*Apc*

2-1) La souris *Min* : phénotype et génotype:

Moser et coll (1990) ont été les premiers à obtenir (sans le rechercher) un modèle génétique impliquant le gène *Apc*. Une lignée de souris a été obtenue dans le cadre d'une chimio-induction à l'éthylnitrosourée (ENU) de souris mâles C57BL/6. Pour tester l'héréditabilité de ce caractère, ces souris mâles ont été croisées avec des souris femelles C57BL/6. Il s'est avéré que ce phénotype était transmissible: cette lignée est caractérisée par l'apparition spontanée de 29 +/- 10 adénomes répartis dans l'intestin grêle et le côlon, certains progressant en adénocarcinomes chez les souris les plus âgées: la durée de vie étant de 119 +/- 31 jours. L'anémie apparaissant à partir du 150^{éme} jour est un caractère associé au phénotype *Min*.

Les souris *Min* femelles ne peuvent pas mener une portée à terme et les souris homozygotes meurent in-utero. La lignée est donc maintenue en croisant des souris *Min* mâles avec des femelles C57BL/6. Avant la mise au point du test de détection par PCR de la mutation, l'anémie était utilisée comme marqueur de la mutation pour détecter les souris porteuses de la mutation *Min*.

Les travaux de Luongo et coll (1993) ont permis d'établir que la mutation *Min* était associée au chromosome murin 18 qui porte *Apc*. Su et coll (1992), par séquençage des 8535 paires de

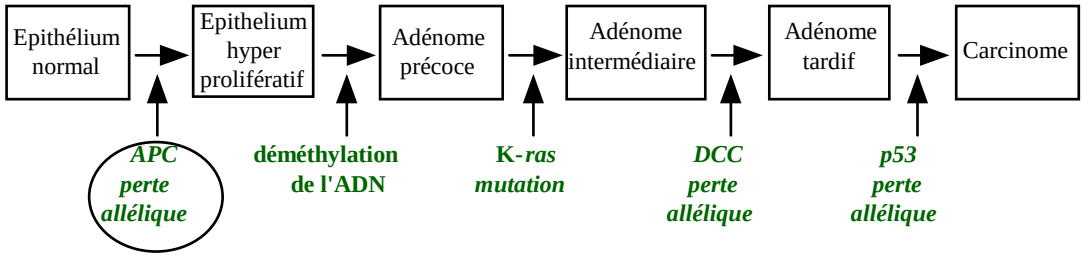
bases de l'ADN complémentaire de *Apc*, ont identifié une mutation germinale dominante non sens au niveau du codon 850 du gène *Apc*: transition T->A, qui engendre la transformation d'une leucine (TTG) en codon stop (TAG) et la synthèse d'une protéine tronquée.
Particularité d'espèce, chez la souris *Min*, la majorité des adénomes apparaissent dans l'intestin grêle alors que chez l'Homme leur répartition est essentiellement colique.

2-2) Les autres modèles *Apc*:

Fodde et coll (1994) introduisirent une mutation stop dans le 15ème exon du gène *Apc* et par recombinaison homologue établirent une lignée de souris hétérozygotes pour cette mutation. Cette modification en C-terminal au niveau de l'acide aminé 1638 de la protéine Apc aboutit à la formation de nombreux adénomes intestinaux. Pour les souris âgées de plus de 20 semaines, certains adénomes ont évolué en carcinomes au niveau du duodenum et jejunum avec infiltration de la sous-muqueuse. De plus, deux souris ayant survécu plus d'un an (la durée de vie moyenne étant de 32 semaines) présentaient aussi des carcinomes gastriques. Enfin, cette mutation est létale pour les souris homozygotes.
De la même manière, Oshima et coll (1995a) ont établi une lignée de souris C57BL/6 mutées pour un allèle d'*Apc* par recombinaison homologue. Ce gène muté code pour une protéine tronquée au niveau de l'acide aminé 716 qui donne son nom à la lignée: ApcΔ716. Cette mutation est, comme pour la souris Apc 1638, létale pour les souris homozygotes dès le stade embryonnaire. Les souris hétérozygotes portent des adénomes tout le long du tractus intestinal avec une localisation préférentielle dans l'intestin grêle: le nombre d'adénomes est de 256 +/- 55 pour des souris de 16 semaines. Les premiers adénomes apparaissent dès la troisième semaine et présentent tous la perte de l'allèle sauvage, indiquant que la perte de l'hétérozygotie est responsable de la formation des adénomes chez ces souris.

2-3) *APC* et carcinogenèse colique chez l'Homme

Ces modèles sont très proches de la polypose adénomateuse familiale (PAF) qui résulte de mutations germinales au niveau du gène *Apc* porté par le chromosome 5q21.



Cascade génétique de la carcinogenèse colique (d'après Volgenstein et coll 1993)

Chez l'Homme, tout comme chez la souris, alors que toutes les cellules portent la mutation, seules quelques unes d'entre elles formeront des adénomes, et parmi ces adénomes, seuls

certains évolueront en carcinomes. La fréquence des mutations somatiques d'*APC* dans les cancers coliques sporadiques (entre 60 et 80 %), et Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer, font de ces souris des modèles pour tous les cancers coliques (Bonneton et coll 1996, Shoemaker et coll 1997a) .

Chez l'Homme, que ce soit dans le cadre de la PAF ou des cancers sporadiques, plusieurs centaines de mutations ont été identifiées. La majorité de ces mutations aboutissent à la formation d'un polypeptide tronqué. Dans la PAF, les mutations sont réparties dans la moitié 5' avec deux points chauds au niveau des codons 1061 et 1309, alors que les mutations somatiques sont concentrées sur MCR (pour mutation cluster région) située entre les codons 1286 et 1513. Les formes les plus sévères de polypose étant associées à des mutations situées dans MCR, plusieurs auteurs ont suggéré que ces mutations sont plus tumorigènes que toutes les autres mutations réparties sur le reste du gène. A l'inverse, les mutations germinales avant le codon 157 engendrent souvent des phénotypes atténués avec un nombre de tumeurs inférieur et une apparition plus tardive. Ces formes atténuées ont été nommées AAPC pour Attenuated Adenomatous Polyposis Coli. La localisation de la mutation aurait donc une influence prépondérante sur le phénotype engendré comme dans les modèles souris (Polakis 1997).

2-4) Les autres lésions:

On observe des lésions extra-intestinales dans la PAF comme chez la souris *Min*.

Chez l'Homme, on observe quelquefois des tumeurs desmoïdes. Les lésions oculaires sont fréquentes chez les patients PAF (CHRPE pour Congenital hypertrophy of the retinal pigment epithelium) dont la sévérité est liée à la position de la mutation sur le gène *Apc* (Bunyan et coll 1995).

Chez la souris *Min* on observe parfois des kystes épidermoïdes dont l'incidence est significativement augmentée (60% des souris) par un traitement à l'ENU. 5% des souris *Min* femelles développent des tumeurs mammaires et leur fréquence est là aussi fortement augmentée par l'ENU. Les tumeurs desmoïdes sont, par contre, très rares chez les souris *Min* traitées ou non à l'ENU. Enfin, les souris *Min* peuvent présenter des cryptes kystiques dans l'intestin grêle dont le nombre est amplifié par l'ENU et qui ne sont pas des lésions prénéoplasiques (Shoemaker et coll 1995).

3) La protéine APC : structure-fonction

3-1) Les différents domaines de la protéine APC:

Chez l'Homme, le gène *APC* qui comporte 15 exons, code pour une protéine de 2844 aa qui partage 90% d'identité avec la protéine murine de 2845 aa.

La protéine APC présente dans sa partie amino terminale un site d'homodimérisation. Les protéines mutantes d'APC conservent ce domaine et peuvent s'associer *in vivo* à la protéine sauvage (Su et coll 1993).

La partie C-terminale présente un domaine d'association aux microtubules qui est souvent délété dans les cancers, ainsi que des domaines d'association à l'homologue humain du Drosophila discs large gene (DLG) et à une protéine à la fonction inconnue nommée EB1 (Su et coll 1995). De plus, la protéine peut dans sa partie centrale se lier à la β-catenine, protéine intracellulaire pouvant interagir avec l'E-cadherine pour réguler l'adhésion cellulaire (Polakis et coll 1997). Ce site de liaison est entouré par un site important dans la régulation de la β-catenine ainsi que sept domaines arm (arm pour armadillo homologue de la β-catenine chez la drosophile) (cf Figure 2)

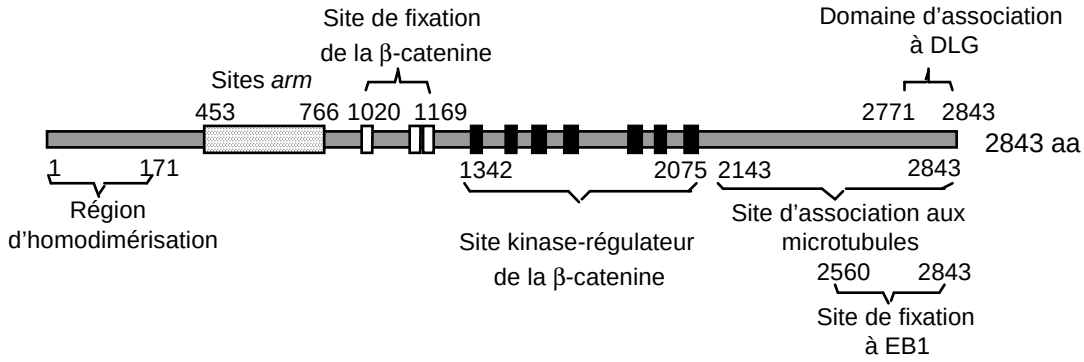


Figure 2: Les différents domaines de la proteine APC (adapté de Shoemaker et coll 1997a)

3-2) Les protéines associées et les fonctions d'APC :

- APC et adhésion

Bien qu'il soit encore impossible d'expliquer comment des pertes de fonctionnalité d'APC aboutissent à la formation de tumeurs, plusieurs hypothèses impliquant les protéines associées à APC ont été proposées.

L'hypothèse la plus ancienne implique APC dans le processus d'adhésion cellulaire: cette protéine peut se lier à la β-catenine par le domaine de fixation situé entre les acides aminés 1020 et 1169. Un double marquage chez la souris a permis de mettre en évidence une co-localisation d'Apc et de la β-catenine le long de la paroi latérale des cellules épithéliales (Senda et coll 1996). La β-catenine est une protéine cytoplasmique qui régule les adhésions homotypiques entre les cellules épithéliales via son interaction avec l'E-cadherine. Les E-cadherines sont des protéines membranaires responsables de liaisons calcium dépendantes dans la région apicale des cellules, et leurs interactions directes avec la β-catenine sont indispensables à leur fonction normale.

APC et E-cadherine forment des complexes indépendants avec la β-catenine (Shoemaker et coll 1997a). Ainsi, le complexe cytoplasmique APC/β-caténine interviendrait dans le contrôle

du pool E-cadhérine/β-caténine, par compétition directe entre APC et E-cadhérine pour la formation des complexes avec la β-caténine et par interaction entre APC et la serine-thréonine glycogen synthase kinase (GSK)-3β en régulant le niveau de β-catenine libre par dégradation une fois celle-ci liée au complexe APC/GSK-3β/conductine. La GSK-3β assure la phosphorylation (Munemitsu et coll 1995), d'un domaine aminoterminal de la β-caténine et d'un deuxième domaine de liaison entre APC et β-caténine. Cette phosphorylation est indispensable à la dégradation de la β-caténine, tout comme l'adhésion de la conductine (Rubinfeld et coll 1996). Dans des conditions normales, le niveau de β-caténine est faible et puisqu'APC forme avec celle-ci un complexe cytoplasmique exclusif du complexe membranaire β-caténine/E-cadhérine, l'expression d'APC pourrait diminuer la formation du complexe β-caténine/E-cadhérine et ainsi jouer un rôle de régulateur négatif de l'adhésion.
A l'inverse lorsqu'APC est muté, la dégradation de la β-catenine est impossible, aboutissant à une accumulation cytoplasmique de β-catenine. La conséquence pourrait en être l'augmentation de la formation des complexes β-caténine/E-cadhérine, favorisant l'adhésion des cellules transformées et limitant leur exfoliation. D'autres molécules associées impliquent APC dans le processus d'adhésion cellulaire. APC interagit ainsi avec l'homologue humain du gène supresseur de tumeur DLG (Drosophila Discs Large) en formant un complexe au niveau des "tight-junctions" (Matsumine et coll 1996). Son adhésion aux microtubules semble impliquer APC dans des processus de régulation de la migration et de l'adhésion cellulaire. L'intéraction d'APC avec les microtubules pourrait permettre la transmission du signal du complexe β-catenine/E-cadhérine au cytosquelette. APC peut contribuer au mécanisme de migration cellulaire puisque cette protéine est colocalisée avec les microtubules au niveau des régions de la membrane cytoplasmique impliquées dans la migration cellulaire (Näthke et coll 1996), et qu'une mutation au niveau de APC s'oppose à ce mécanisme. Les cellules épithéliales, incapables de migrer, s'accumuleraient dans les cryptes au lieu d'être éliminées dans la lumière intestinale conduisant ainsi à la formation de l'adénome.

-APC et prolifération

Les relations APC-prolifération ont été mises en évidence il y a plusieurs années par la perte de répression de la prolifération des cellules coliques chez les patients atteints de PAF qui présentent une mutation au niveau de ce gène. Baeg et coll montrent qu'une transfection du gène *APC* sauvage diminue l'activité kinase du complexe cycline-E /cdk2 (cyclin dependant kinase 2) qui est impliqué dans le contrôle du passage en phase G1/S (Baeg et coll 1995): une mutation au niveau de *APC* engendre par arrêt de cette régulation négative de l'activité kinase une augmentation de la prolifération. Zhang et coll (1997) confirment chez l'Homme et la souris *Min* en montrant au niveau des adénomes une augmentation de l'expression de cycline D1 et cdk4 associée à une hausse de la prolifération des cellules néoplasiques. Toutefois, ces auteurs ne concluent pas à une relation directe entre ces effets et la mutation *APC*.

Plus récemment, APC a été impliqué dans la régulation de la prolifération via son appartenance à la voie Wnt-1. Wnt-1, équivalent du gène Wingless chez la drosophile, intervient dans le développement du système nerveux central des mammifères et a été impliqué dans la formation de tumeurs mammaires chez la souris. Le facteur de croissance Wnt-1, qui est une glycoprotéine sécrétée entraîne, comme chez la drosophile, l'inhibition de la GSK-3β via l'homologue de la DSH entrainant ainsi l'accumulation de la β-catenine par stabilisation du complexe APC/β-catenine (Papkoff et coll 1996). APC serait donc un régulateur négatif de la voie Wnt-1. En aval du complexe APC/β-catenine, une interaction entre la β-catenine et le facteur de transcription de la famille Lef / Tcf (Lymphoid enhancer factor / T cell factor) confère à la β-catenine un potentiel d'activateur transcriptionnel. L'association β-catenine / Tcf permet à la β-catenine d'être transloquée dans le noyau et d'y jouer son rôle de transactivateur, Tcf servant à la reconnaissance de l'ADN (Polakis et coll 1997). Plus tard, l'équipe de Vogelstein (He et coll 1998) identifie c-Myc, un régulateur essentiel de la prolifération cellulaire, comme étant une cible de ce complexe transactivateur. Cette théorie a été confirmée par les travaux de Sheng et coll (1998) qui, par immunohistochimie, ont mis en évidence que la β-catenine présente une localisation préférentiellement nucléaire dans les cellules coliques cancéreuses humaines SW48, et s'accumule au niveau du nucleus chez les souris *Min* et Apc Δ716. Ces résultats confirment la translocation et la stabilisation nucléaire de la β-catenine dans les cancers coliques avec perte de fonction de APC.

APC se trouve donc dans le système suivant (figure 3): dans une cellule normale (figure 3A) non stimulée par Wnt-1, GSK-3β n'est pas inactivée et peut provoquer la phosphorylation du complexe APC/β-caténine aboutissant à la dégradation de la β-caténine. Cette dernière ne peut donc former avec Tcf le complexe activateur de c-Myc, ce qui bloque la prolifération. Dans une cellule normale activée par Wnt-1 (figure 3B), celui-ci inhibe la GSK-3β et ainsi stabilise le complexe APC/β-caténine entraînant l'augmentation de β-caténine libre qui se lie à Tcf entraînant la prolifération sous contrôle du facteur de croissance Wnt-1. Par contre, dans une cellule tumorale (figure 3C) où le taux de β-caténine n'est plus régulé par APC, le complexe β-caténine/ Tcf va activer en permanence c-Myc, ce qui engendre une prolifération incontrôlée pouvant aboutir à la carcinogenèse.

La protéine APC est donc impliquée à la fois dans des mécanismes d'adhésion, de migration et de prolifération cellulaire, ce qui peut rendre compte du rôle clef que joue sa perte de fonctionnalité dans la cancérogenèse. Dans les tumeurs où APC n'est pas mutée, plusieurs études ont mis en évidence des mutations de la β-caténine (Miyaki et coll 1999).

Enfin, APC interagit avec EB1, une protéine de 268 aa sans aucune homologie avec des protéines aux fonctions connues. Su et coll en 1995 proposent que des mutations affectant l'un ou l'autre gène et qui se traduisent par l'impossibilité pour les deux protéines d'interagir, peut conduire à la tumorigenèse.

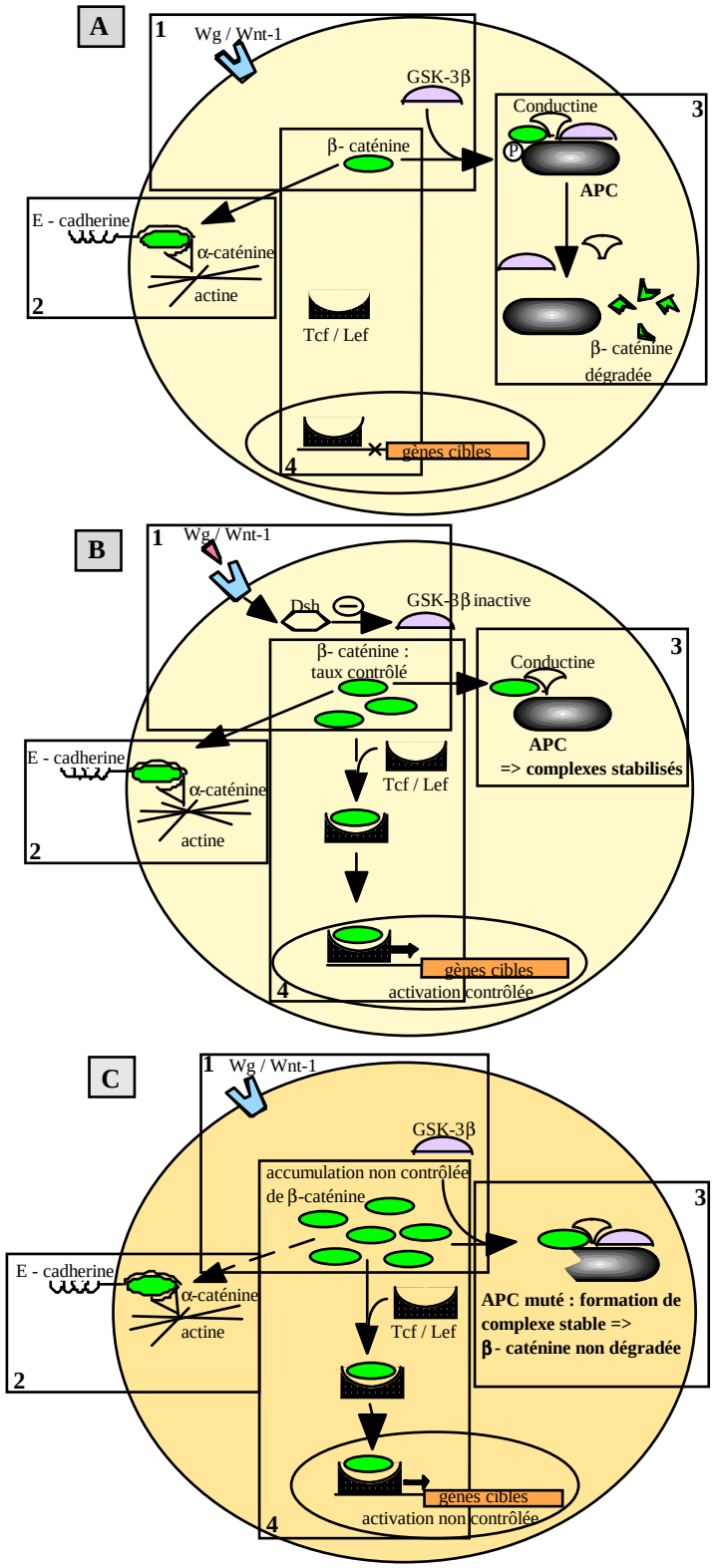


Figure 3: Implication de APC dans des cellules normales stimulées ou non par Wnt-1 et dans les cellules mutées pour *APC*. A: Dans une cellule normale non stimulée par Wnt-1(1), la GSK-3b n'est pas inactivée et peut provoquer la phosphorylation du complexe APC/β-caténine. La β-caténine est dégradée (3) et ne peut former avec Tcf le complexe activateur de c-Myc, d'où l'absence de prolifération (4). B: Dans une cellule normale activée par Wnt-1(1), la GSK-3b est inhibée ce qui stabilise le complexe APC/β-caténine (3) et engendre l'augmentation de β-caténine libre favorisant la formation du complexe β-caténine/Tcf: ce qui provoque une prolifération sous contrôle du facteur de croissance Wnt-1 (4). C: Dans une cellule tumorale où le taux de β-caténine n'est plus régulé par APC (3), le complexe β-caténine/Tcf va activer en permanence c-Myc, ce qui engendre une prolifération incontrôlée (4).

4) Le modèle *Min* : un outil pour l'étude de la cancérogenèse colique

Les similarités phénotypiques et génotypiques entre la souris *Min* et les cancers humains de type PAF, et de façon plus large les cancers sporadiques, font de ce modèle murin un bon instrument pour l'étude de la carcinogenèse d'un point de vue fondamental. Ce modèle est aussi un outil puissant pour étudier l'impact des facteurs environnementaux sur la carcinogenèse intestinale, et pour tester des agents pharmaceutiques et alimentaires dans le traitement ou la prévention des cancers colorectaux.

4-1) Importance du fond génétique : le cas du gène Mom.

Moser et coll (1992) remarquent que le nombre de tumeurs chez les souris *Min*/+ est dépendant du fond génétique des souris. Ainsi, la souche parentale C57BL/6 *Min*/+ (B6-*Min*) porte en moyenne 29 tumeurs contre 6 pour la souris F1 issue du croisement B6-*Min* avec la souris AKR. Le fond génétique serait un déterminant du degré d'expression de la mutation *Min*. La souche AKR porterait un allèle qui agirait de manière dominante en modifiant l'effet tumorigène de la mutation *Min*. En 1993, Dietrich et coll confirment ces résultats en croisant des souris *Min* avec des souris MA/MyJ. L'allèle responsable est alors baptisé Mom-1 pour modifier of *Min*-1.

Le croisement de souris F1(B6-*Min*/AKR) avec des souris B6 montre que Mom-1 agit de manière semi-dominante puisque les souris homozygotes pour Mom-1 portent moins de tumeurs que les souris hétérozygotes (cf tableau 4). Mom-1 rend compte de 50% des variations génétiques du nombre de tumeurs au sein des deux types de croisement, ce qui laisse supposer l'existence d'autres loci influençant le phénotype *Min*. Cette hypothèse semble se confirmer puisqu'un croisement entre souris *Min* et souris CAST (Mus musculus castaneus) entraîne une diminution du nombre de tumeurs plus important.

Tableau 4: Incidence tumorale en fonction des croisements (d'après Dietrich et al, 1993):

Souris Min/+		Nombre de tumeurs Moyenne ± SD	Nombre d'individus
Lignée parentale	B6 Min	28,5 ± 7,9	n = 26
Hybrides F1	(AKR x B6 *Min*)F1	5,8 ± 4,3	n = 40
	(MA x B6 *Min*)F1	5,7 ± 4,0	n = 15
	(CAST x B6 *Min*)F1	3,0 ± 1,8	n = 12
Croisements	B6 x (AKR x B6 *Min*)F1	17,7 ± 11,7	n = 110
F1 avec B6	B6 x (MA x B6 *Min)*F1	15,9 ± 11,0	n = 82
	B6 x (CAST x B6 *Min*)F1	14,4 ± 11,9	n = 142

Plusieurs hypothèses sont possibles pour expliquer cette différence de modulation de l'incidence tumorale dépendante du fond génétique. Ou bien Mom-1 chez les souris CAST est différent du fait de l'éloignement dans l'évolution (ce serait donc un atténuateur moins fort du phénotype *Min*), ou bien le locus est le même mais il est affecté par d'autres facteurs du fond génétique CAST.

Le gène de la secretory type II phospholipase A2 (Pla2s) qui se trouve dans la région qui contient Mom-1, a été très vite identifié comme gène candidat (MacPhee et coll 1995; Gould et coll 1996a). Des souris B6 porteuses d'un nombre de tumeurs élevé et d'un allèle Mom-1 qualifié de facilitant (Mom-1f) expriment faiblement Pla2s, alors que les souris AKR ou CAST avec une incidence tumorale plus faible et donc un allèle Mom-1 résistant (Mom-1r) expriment fortement Pla2s. Il existe donc une corrélation entre type allèlique et incidence tumorale, confirmée dans le système souris 129/SvJ (Laird et coll 1995). Les souris de phénotype Mom-1f expriment une forme mutée de Pla2s, alors que les souris Mom-1r ne portent pas la mutation au niveau du gène Pla2s (tableau 5)

Tableau 5 : corrélation phénotype Mom-1 et expression de Pla2s (d'après Laird et coll 1995):

Lignée	Mom-1	Pla2s
B6	f	-
129	f	-
AKR	r	+
CAST	r	+
MA	r	+
SWR	r	+
DBA	r	+
BALB	r	+

f: Mom-1f soit, Mom-1 facilitant; r: Mom-1r soit, Mom-1 résistant;
+: expression normale de Pla2s; -: faible expression de Pla2s

La phospholipase A2 pancréatique sécrétoire de type I est impliquée dans la digestion des graisses alimentaires. Les études épidémiologiques et les interventions nutritionnelles dans les modèles expérimentaux de cancérogenèse colique, montrent qu'un régime alimentaire riche en graisses est associé à une incidence accrue des cancers colorectaux. Pla2s pourrait donc agir sur la carcinogenèse intestinale via le métabolisme des acides gras. Pla2s est également un agent bactéricide (Harwig et coll 1995) qui pourrait contrôler la croissance de bactéries anaérobies capables de convertir les acides biliaires en carcinogènes (Rumney et coll 1993).

Cependant, le phénotype Mom de l'hôte n'influence pas l'incidence tumorale dans un modèle de greffe intestinale *Min*/+ ce qui va à l'encontre d'une action systémique (Gould et coll 1996b) (cf tableau 6).

Tableau 6: Nombre de tumeurs dans les greffes d'intestin grêle *Min*/+ (d'après Gould et al, 1996b)

Génotype de l'hôte	Nombre moyen de tumeurs par cm2	
	Génotype de la greffe	
	Mom-1 $^{B6/B6}$	Mom-1 $^{AKR/B6}$
Mom-1 $^{B6/B6}$	7,7 ± 5,4	1,9 ± 1,5
Mom-1 $^{AKR/AKR}$	5,1 ± 4,3	ND

ND: non déterminé

Pla2s est aussi impliquée dans le métabolisme des prostaglandines puisqu'elle participe à la synthèse d'acide arachidonique qui est le substrat limitant de leur production, prostaglandines dont la production est altérée dans la cancérogenèse colique.

Le locus Mom-1 est situé au niveau de la région distale du chromosome 4 pour les souris F1 issues des croisements B6/AKR ou B6/MA/MyJ. Cette région chromosomique de la souris présente une forte conservation avec le chromosome humain 1p35-36, qui est une région fréquemment délétée dans plusieurs types de cancers chez l'Homme, en particulier le cancer colique (Gould et coll 1996c). Un homologue humain de Mom-1 pourrait donc se situer dans la région 1p35-36 qui expliquerait la variabilité du nombre de polypes dans le syndrome PAF. La phospholipase A2 n'est pas responsable des variations phénotypiques de la PAF (Dobbie et coll 1996). Il existe cependant une corrélation entre la sévérité de la polypose duodénale et la transmission de marqueurs alléliques au niveau du bras court du chromosome 1 au sein de 28 familles atteintes de PAF (Tomlinson et coll 1996). Enfin, puisque la région codant pour l'homologue humain de Mom-1 ne joue pas de rôle dans l'apparition des tumeurs colorectales sporadiques (Kahlenberg et coll 1998), l'équivalent humain de Mom-1 reste à identifier.

4-2) Initiation de la cancérogenèse colique: où et quand ?

La mise en évidence de plusieurs types cellulaires (cellules épithéliales, cellules caliciformes et cellules de paneths) dans les adénomes de souris *Min* suggère qu'ils dérivent d'une cellule unique et multipotente, c'est à dire d'une cellule souche de la base de la crypte (Moser et coll 1992; Su et coll 1992; Kim et coll 1993).

Puisque l'injection d'ENU chez des souris *Min* âgées de 5 à 14 jours multiplie par 3,8 le nombre de tumeurs alors que le même traitement sur des souris de 20 à 35 jours ne le multiplie que par 1,8 (Shoemaker et coll 1995) beaucoup d'adénomes sont probablement formés dans les toutes premières semaines de la vie des souris, sans doute en raison de l'augmentation du nombre de cryptes par fission, caractéristique de cet âge, et qui est de plus amplifié chez la souris *Min* (Wasan et coll 1998). Cette amplification est plus forte dans le côlon (75%) que dans le grêle (61%), ce qui expliquerait la taille plus importante des tumeurs coliques dans ce modèle.

La mise en place progressive des systèmes de réparation de l'ADN (Nakatsuru et coll 1989), et des défenses immunitaires (Crabbé et coll 1970, Doherty et coll 1984) peuvent aussi participer à cette apparition précoce des tumeurs chez la souris *Min* .

4-3) Inactivation des deux allèles *APC*:

Chez l'Homme, la perte du second allèle ou du produit du gène est observée dans 31 à 71% des adénomes coliques et 81% des carcinomes coliques, indiquant que l'inactivation des deux allèles est un événement important de la tumorigenèse. L'inactivation du deuxième allèle est le plus souvent la conséquence de mutations "ponctuelles": mutation non-sens, délétion faible ou insertion. Par contre, les observations étant réalisés sur des tumeurs visibles, il est difficile de conclure à un rôle précoce de la perte allélique .

Luongo et coll (1994 et 1996) ainsi que Levy et coll (1994) mettent en évidence une perte allélique dans 100% des adénomes de la souris *Min*, y compris dans les lésions les plus petites, en faveur d'un phénomène précoce. Chez la souris *Min* traitée à l'ENU (Shoemaker et coll 1997b) 25% des tumeurs ne présentent pas de perte allélique, mais, comme chez l'Homme, des mutations sporadiques aboutissent à l'inactivation du deuxième allèle. De plus, et de façon plus surprenante, 12% des tumeurs de ces souris ne présentent pas de mutation au niveau du deuxième allèle. Il existerait donc une voie de carcinogenèse indépendante de l'inactivation des deux allèles d'*Apc*. Pour vérifier cette hypothèse, ces auteurs ont recherché des mutations au niveau N ou K-ras puisque des mutations de ce type interviennent souvent dans les cancers colorectaux humains mais ils n'ont pu en mettre en évidence.

Chez l'Homme comme chez la souris, ces résultats sont en accord avec l'hypothèse de Knudson, qui propose que deux événements (un germinal et un sporadique ou deux sporadiques) sont nécessaires à la formation de tumeurs. Il apparaît que l'inactivation des deux allèles est un événement précoce et nécessaire à la tumorigenèse chez la souris *Min*.

4-4) PPAR γ-β-catenine-cancérogenèse colique

Le peroxisome proliferator-activated receptor gamma est un médiateur transcriptionnel des prostaglandines fortement exprimé dans le côlon; il est également impliqué dans la sensibilisation à l'insuline (Tontonoz et coll 1994). Cette dernière propriété aurait une influence sur l'équilibre énergétique dans le côlon, en modulant l'utilisation des deux substrats majeurs que sont le glucose et le butyrate (acide gras à chaîne courte issu de la fermentation des glucides indigestibles par la flore). Cette modulation intervient dans l'équilibre prolifération/apoptose dans la muqueuse (Sing et coll 1997). L'activation de ce gène par des agonistes augmente significativement le nombre et la taille des adénomes dans le côlon des souris *Min* (Lefebvre et coll 1998). L'élévation parallèle de la concentration de β-caténine suggère un mécanisme analogue à celui qui suit l'inactivation du gène *Apc*. La β-caténine est également augmentée lorsque l'on traite la lignée cancéreuse colique humaine HT29 avec ces mêmes agonistes.

4-5) Les autres gènes de la séquence épithélium-cancer

Chez l'Homme, les mutations de gènes de la famille ras, de façon précoce, et des gènes p53 et DCC de façon tardive, sont très fréquentes dans les cancers du côlon et du rectum.

Kim et coll (1993) croisent des souris *Min* avec des souris transgéniques pour IFABP (intestinal fatty acid binding protein), gène lié à des phases ouvertes de lecture codant pour des formes mutées de K-ras et p53. Dans ce système, l'expression des gènes étrangers est limitée aux entérocytes des villosités intestinales, c'est à dire aux entérocytes différenciés qui ne prolifèrent plus. La co-expression de l'antigène T de SV40 permet aux entérocytes de re-rentrer dans le cycle cellulaire. L'incidence des tumeurs dans les souris F1 issues de ces croisements (porteuses de SV40 seul, associé à K-ras$_{12}$ ou p53$_{43}$) est très faiblement augmentée dans l'intestin grêle mais pas du tout dans le côlon, sans modification du statut histo-pathologique des lésions. Shoemaker et coll (1997b) ne détectent pas de mutations au niveau des codons 12,13 ou 61 de H ou K-ras dans les adénomes des souris *Min* même après un traitement à l'ENU. Il en est de même dans les adénomes de la souris Apc 1638 (Smits et coll 1997). Par contre, *in vitro*, une mutation de H-ras sur des cellules portant une mutation sur *Apc* suffit à les rendre tumorigènes chez la souris nude, et cela , en dehors de toute inactivation du deuxième allèle.

En 1997, Fazeli et coll étudient l'effet de l'inactivation de p53 sur l'apoptose dans les adénomes de souris *Min* en les croisant avec des souris *Apc*+/+ p53+/-. L'inactivation de p53 n'entraîne aucune modification du nombre et de la taille des tumeurs, ni de l'apoptose.

Enfin, Luongo et coll (1996), en induisant des événements somatiques subchromosomaux, montrent que la perte des gènes MCC et DCC n'est pas nécessaire à la formation des adénomes.

La séquence des altérations génétiques postérieures à celles qui affectent *Apc* dans les modèles murins ne semble pas comparable à celle qui se produit chez l'Homme.

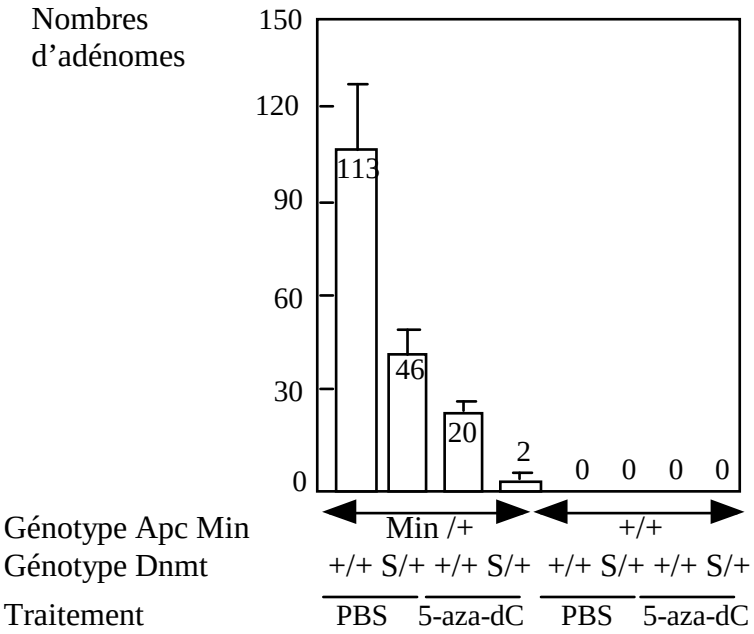
4-6) L'expression du génome : méthylation de l'ADN

Chez l'Homme, la tumorigenèse est souvent associée à des modifications du statut de méthylation de l'ADN. Certains loci sont hyperméthylés alors que globalement l'ADN est hypométhylé malgré une tendance à l'augmentation de l'expression des DNA méthyltransférases. Ces changements de méthylation de l'ADN pourraient participer à la tumorigenèse en modifiant l'expression des proto-oncogènes et gènes supresseurs de tumeurs: l'hypométhylation globale de l'ADN serait un avantage pour les cellules tumorales en favorisant l'expression des proto-oncogènes alors que l'hyperméthylation ponctuelle modifierait l'expression de certains loci comme les gènes supresseurs de tumeurs.

Une autre hypothèse est que l'activité élevée des DNA méthyltransférases favoriserait la transition cytosine-thymidine augmentant ainsi les mutations au niveau des dinucléotides CpG.

La réduction de l'activité de la DNA méthyltransférase chez la souris *Min* (due à l'hétérozygotie pour le gène Dnmt) associée à un traitement hebdomadaire avec un inhibiteur de la DNA méthyltransférase (5-aza-doxycytidine) provoque une diminution drastique du nombre d'adénomes de 113 à 2. Le traitement à la 5-aza-doxycytidine seule sur des souris homozygotes pour Dnmt provoque à lui seul une baisse du nombre d'adénomes à 20 par Souris (cf figure 4) (Laird et coll 1995).

Figure 4: Traitement à la 5-aza-boxyxytidine chez des souris *Min* homo (+/+) et hétérozygote (S/+) pour Dnmt. (d'après Laird et coll 1995)



La diminution de la formation des polypes par la réduction de la DNA méthyltransférase et du taux de méthylation de l'ADN va à l'encontre de l'hypothèse de l'hypométhylation globale favorisant l'expression des proto-oncogènes. Ces résultats vont plutôt dans le sens de l'importance de l'hyperméthylation ponctuelle. Ils confirment à la fois le modèle de l'hyperméthylation des gènes supresseurs de tumeurs, mais aussi l'importance de la méthylation de la cytosine favorisant la transition C->T. En faveur de cette deuxième hypothèse, les mutations au niveau du dinucléotide CpG sont multipliées par 7 dans les tumeurs colorectales humaines (Greenblatt et coll 1994) et 47% des mutations de p53 sont des transitions au niveau du dinucléotide CpG. Limiter le taux de transition C->T diminuerait le nombre d'adénomes en réduisant les mutations additionnelles à la perte allèlique d'*Apc*. Enfin, une diminution significative des adénomes est limitée aux seuls traitements commencés dans les premières semaines de vie, ce qui semble impliquer les modifications de méthylation dans les étapes d'initiation.

4-7) Immunité et cancérogenèse colique

La théorie de l'immunosurveillance des cancers reste controversée. Initialement, plusieurs études épidémiologiques limitaient la notion d'immunosurveillance aux tumeurs viro-

induites. Toutefois, des études plus récentes mettent en évidence une augmentation (ou une diminution) de certains cancers chez des patients immunodéprimés dans le cadre de greffes rénales et cardiaques qui pourrait être soit liée à l'immunodépression soit à une action directe de l'agent pharmacologique (cyclosporine) (Nabel 1999).
Dubley et coll (1996) croisent des souris *Min* avec des souris scid (severe combined immunodeficient) et n'observent aucune effet sur l'incidence tumorale.
De la même manière la déficience en cellule T de type NK (natural killer) du phénotype beige n'a pas de conséquence sur l'apparition des tumeurs (Dove et coll 1997).

4-8) Cyclo-oxygénase: la définition de l'action des AINS

Les deux formes de COX, COX-1 (constitutive) et COX-2 (inductible) convertissent l'acide arachidonique en prostaglandine endoperoxide H2 qui est le substrat des prostaglandines synthases. Chez l'Homme, COX-2 est surexprimée dans les adénomes et adénocarcinomes coliques (Sano et coll 1995) et une étude chez la souris *Min* montre que son implication serait relativement précoce (Hull et coll 1999) . L'ARNm et la protéine COX-2 sont multipliés par trois dans les adénomes de souris *Min* (William et coll 1996) et l'expression de la protéine est limitée aux cellules épithéliales néoplasiques et displasiques.
L'implication de COX semble confirmée par Oshima et coll (1996a) qui observent une forte augmentation de l'incidence tumorale dans les souris issues du croisement de souris *Apc* Δ*716* avec des knock-out pour COX-2**.**
Le traitement de patients atteints de PAF avec des inhibiteurs de COX, les anti-inflammatoires non steroïdiens (AINS), réduit l'incidence des polypes (taille et nombre) (Giardiello et coll 1993).
Des AINS ont été utilisés en prévention chez la souris *Min*, (Jacoby et coll 1996; Boollbol et coll 1996; Barnes et coll 1998). Dans ces trois études, la baisse du nombre des tumeurs est corrélée à une baisse du taux de prostaglandines (mesurée dans un cas par le thromboxane sérique et dans les autres par PGE2)(figure 5, 6 Tableau 7)

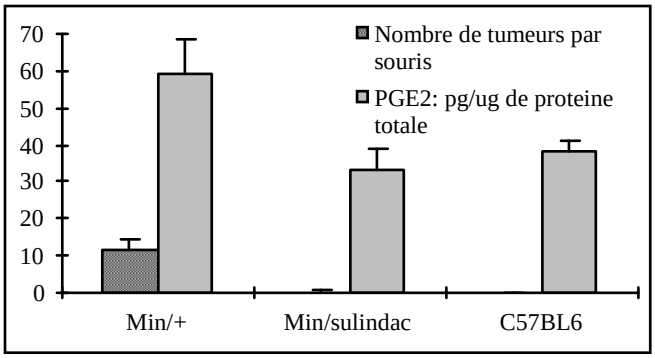


Figure 5: Effet de la supplémentation en sulindac sur l'incidence tumorale et la concentration tissulaire en PGE2 (d'après Bollbolet coll 1996)

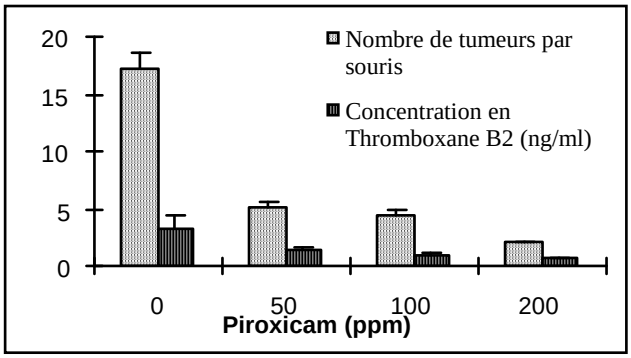


Figure 6: Effet du piroxicam sur le nombre de tumeurs coliques et la concentration en thromboxane B2 (d'après Jacoby et coll 1996)

Tableau 7: Effet de l'aspirine sur la carcinogenèse de la souris *Min*/+
(d'après Barnes et coll 1998)

	Aspirine		
	O ppm	250 ppm	500 ppm
Intestin grêle			
Proximal	8±1,7	3,8±0,6[a]	5,5±0,7 [a]
Médian	10,8±2,6	3,3±0,6 [a]	5,2±0,8 [a]
Distal	16,0±2,0	8,3±1,4 [a]	7,0±2,0 [a]
Côlon	1,0±0,4	0,5±0,2	0,8±0,3
Total	35,8±4,4	16,0±2,3 [a]	18,5±2,4 [a]

[a] Différence statistiquement significative en comparaison avec le régime sans aspirine (P<0,05)

La protection par AISN dans le modèle *Min* est confirmée par Chiu et coll en 1997 (figure 7). L'effet est cependant indépendant de COX car le métabolite sulfone du sulindac est aussi efficace que le métabolite sulfide alors qu'il n'est pas un inhibiteur de COX. Les taux de PGE2 et d'écosanoïdene ne sont pas modifiés, ce qui confirme que le mécanisme est indépendant de la synthèse des prostaglandines. Le traitement qui est efficace chez les souris âgées, est capable d'entraîner la régression des tumeurs.

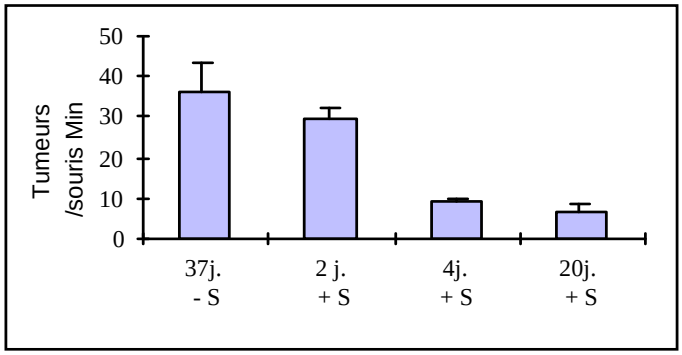


Figure 7: Cinétique d'action du sulindac sur des tumeurs établies

La supplémentation en sulindac de l'eau de boisson de souris *Min* diminue l'incidence tumorale, élève la concentration cytoplasmique de β-caténine dans la muqueuse intestinale de la souris *Min*, et abaisse l'apoptose et la migration le long de l'axe crypte-villosité (Mahmoud et coll 1997). Le sulindac agirait donc précocement en diminuant le taux de β-caténine et en restaurant le renouvellement normal de l'épithélium intestinal.

Ritland et coll (1999) documentent la cinétique et la durée d'action du piroxicam chez la souris *Min*. Avec le sulindac, un autre AINS, l'effet est réversible à l'arrêt du traitement chez l'Homme comme chez la souris *Min* .

La plupart de ces traitements sont plus efficaces sur la localisation dans le grêle que dans le côlon, ce qui suggère l'établissement d'un gradient de concentration de l'AINS le long du tractus intestinal. De plus, comme chez l'Homme on remarque souvent des effets secondaires chez la souris *Min* avec des ulcérations qui apparaissent de manière précoce.

Les AINS, inhibent les deux types de Cox (Cox1 et Cox2), et préférentiellement Cox-1. C'est l'inhibition de Cox-1 qui déclenche des effets secondaires de type ulcères gastriques et saignement intestinaux. Nakatsugi et coll (1997) ont utilisé un inhibiteur préférentiel de Cox2 le nimesulide (4-nitro-phenoxymethansulfonanilide) qui appartient à la classe des sulfonanides d'AINS, qui est utilisé depuis 1985 en Europe comme anti-inflammatoire et ne présente que très peu d'effets secondaires. Le traitement entraîne une baisse significative du nombre de tumeurs dans le grêle comme dans le côlon. (cf tableau 8)

Tableau 8: Effet de la supplémentation au Nimesulide sur la carcinogenèse de la souris *Min*

	Groupe contrôle	Groupe Nimesulide
Intestin grêle		
Proximal	10,5 ± 1,4	9,2 ± 1,4
Médian	15,5 ± 2,0	6,8 ± 1,4 [a]
Distal	22,7 ± 2,9	9,3 ± 1,5 [a]
Côlon	0,6 ± 0,2	0,2 ± 0,1 [a]
Total	49,5 ± 4,4	25,5 ± 3,8 [a]

La taille des tumeurs est également diminuée, tout comme dans l'étude conduite avec un autre inhibiteur préférentiel de la Cox2 chez la souris Apc Δ716 (Oshima et coll 1996a)
L'acide 5-aminosalicylique, un membre de la famille des AINS, utilisé dans le traitement des patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin qui sont prédisposés aux cancers colorectaux, ne déclenche pas d'effets secondaires indésirables et réduit le risque de cancers. Utilisé chez la souris *Min*, avec des formulations qui permettent de moduler la localisation où est libéré le 5-ASA libre actif, ce produit n'a aucune action sur le nombre et la taille des tumeurs (Ritland et coll 1999).
Le même médicament, lié à un transporteur inerte le 4-aminobenzoil-beta alanine, réduit de manière importante le nombre de tumeurs de façon dose dépendante. La taille n'est pas affectée et l'effet est plus faible dans la partie proximale de l'intestin grêle ce qui pourrait refléter la libération progressive du produit actif par la flore intestinale. Les conditions de libération du 5-ASA libre semble être un élément décisif de l'efficacité de ces dérivés pharmacologiques.

La piste des AINS dans la chemo-prévention des cancers colorectaux est donc prometteuse, les deux facteurs limitants restant la délivrance du composé actif sur les sites les plus exposés et les effets secondaires associés.

4-9) Alimentation et cancérogenèse

La PhIP (2-Amino-1-méthyl-6-phenyl{4,5-b}pyridine) est une amine hétérocyclique mutagène (Thompson et coll 1987) abondante dans les viandes cuites. Injectée à des souris, cette substance génère quelques cryptes aberrantes dans le côlon. Chez la souris *Min* la même substance multiplie le nombre de ces cryptes aberrantes coliques et fait apparaître des petites tumeurs et des cryptes kystiques dans l'intestin grêle des souris mâles (Steffensen et coll 1997). Cette amine augmente également le nombre et la taille des tumeurs dans le modèle Apc Δ716 (Oshima et coll 1996b).

L'enrichissement du régime alimentaire de souris *Min* avec de l'huile de maïs de 3 à 10% augmente l'incidence tumorale dans le côlon et de 3 à 15% dans le côlon et le grêle (Wasan et coll 1997). Dans une autre intervention Van Kranen et coll (1998) ne mesurent pas de différence dans le nombre de tumeurs portées par des souris *Min* nourries avec 8,5% ou 20 % de lipides.

La cholecystectomie ou la consommation riche en graisse sont associées à un excès d'acide biliaire et augmentent l'incidence tumorale. Chez la souris *Min*, un acide biliaire non-conjugué, le chenodesoxycholate (Mahmoud et coll 1999) augmente le nombre de tumeurs dans le duodenum, augmentation qui est associée à celle de la β-caténine et de la prostaglandine E2 (PGE2).

Enfin il semble que la nature chimique des lipides soit déterminante dans leur intéraction avec la carcinogenèse colique: chez la souris Δ716 les acide gras polyinsaturés w3 sont protecteurs (Oshima et coll 1995b) alors le régime de type "western diet" pauvre en acide gras polyinsatuté est carcinogène (Hioki et coll 1997).

Les deux études réalisées dans les modèles génétiques murins ne montre pas d'effet protecteur des fruits et des légumes que ce soit dans le contexte d'un régime pauvre ou enrichi en graisses Van Kranen et coll (1998) ou encore d'un amidon résistant associé ou non à un AINS (Williamson et coll 1999).

5) Comparaison Min/PAF: Phénotype-Génotype-Mécanismes.

En conclusion, la caractérisation et les premières études de la carcinogenèse chez la souris *Min* ont permis de mettre en évidence de nombreuses similarités avec la carcinogenèse colique humaine.

La PAF résulte de mutations germinales au niveau du gène *APC* porté par le chromosome 5q21 (Polakis et coll 1997) et le phénotype *Min* est du à une mutation non-sens au niveau de l'homologue murin de *APC* porté par le chromosome 18 (Su et coll 1992; Luongo et coll 1993). Ces deux protéines partagent 90% d'identité.

Tout comme chez l'Homme dans le cadre de la PAF, toutes les cellules de l'organisme portent la mutation, mais seules quelques unes donneront des adénomes. Parmi ces adénomes, seuls quelques uns évolueront en carcinomes. De plus, la localisation de la mutation *APC* influence la sévérité de la polypose chez l'Homme (Polakis et coll 1997). Chez la souris la comparaison de l'incidence tumorale entre la souris *Min*, la souris Δ716 et Apc 1638 met en évidence la même importance de la localisation de la mutation (Moser et coll 1990; Oshima et coll 1995; Fodde et coll 1994).

De plus, il existe chez la souris *Min* et chez l'Homme lors de la PAF plusieurs manifestations extra-coliques: des tumeurs desmoïdes et des lésions oculaires chez l'Homme (Bunyan et coll 1995); et des kystes épidermoïdes et tumeurs mammaires chez la souris *Min* (Shoemaker et coll 1995).

Enfin, l'importance des mutations *APC* dans les cancers coliques sporadiques et HNPCC chez l'Homme fait aussi de la souris *Min* un modèle de ces deux autres formes de cancer colique, même si la répartition des lésions est sensiblement différente.

Au niveau des mécanismes moléculaires impliqués dans la carcinogenèse, la perte allélique (inactivation du deuxième allèle) est un événement précoce et indispensable chez l'Homme et la souris *Min*, ce qui est en accord avec l'hypothèse de Knudson (Levy et coll 1994). Toutefois, la séquence des altérations génétiques, après l'inactivation des deux allèles d'*APC*, n'apparaît pas comparable chez l'Homme et la souris *Min* (Shoemaker et coll 1997; Fazeli et coll 1997) bien que les modifications du statut de méthylation de l'ADN apparaissent, chez l'Homme comme la souris, impliqué dans le déroulement de la tumorigenèse (Laird et coll 1995).

Par contre, la translocation nucléaire de la β-caténine, en conséquence à la mutation de *APC*, a été observée chez l'Homme et la souris *Min* (Sheng et coll 1999). De plus, il existe une corrélation entre la sévérité de la polypose humaine et murine et un locus présent sur la région 1p35-36 et son homologue murin (Gould et coll 1996c). Toutefois, le candidat proposé chez la souris *Min* (Mom-1) ne semble pas impliqué dans les variations d'incidence tumorale observée chez l'Homme (Dobbie et coll 1996). L'équivalent humain de Mom-1 reste donc à déterminer.

Enfin, la surexpression de la COX-2 est observée au niveau des adénomes humains et murins (Sano et coll 1995; Hull et coll 1999), et les inhibiteurs de l'activité cyclo-oxygénase réduisent l'incidence tumorale chez la souris *Min* et les patients atteints de PAF (Giardiello et coll 1993; Jacoby et coll 1996).

Donc, l'importance des similarités phénotypiques et génotypiques entre la souris *Min* et la PAF (et les cancers coliques sporadiques et de type HNPCC) font de ce modèle un outil pertinent pour l'étude de l'influence de facteurs environnementaux sur la tumorigenèse. L'incidence tumorale de la souris *Min* est sensible aux facteurs alimentaires tels que l'huile de maïs (Wasan et coll 1997) et la PhIp qui est fortement présente dans les viandes cuites (Steffensen et coll 1997), mais aussi aux suppléments à la composition des aliments utilisés par les différents laboratoires.

OBJECTIFS

OBJECTIFS DU TRAVAIL

I- FIBRES ET CANCEROGENESE COLIQUE CHEZ LA SOURIS *MIN*:

Certaines données épidémiologiques et expérimentales ne permettent pas d'exclure l'utilisation de glucides indigestibles alimentaires dans la prévention des cancers colorectaux. Des travaux chez le rat traité à l'AOM établissent un lien entre la production de butyrate issu de la fermentation des fibres et les phases d'initiation du cancer colorectal et une possible modulation de l'immunogénicité des tumeurs coliques par le butyrate. Dans ce type de modèles on ne peut pas exclure des interférences avec le carcinogène, qui n'est pas pertinent par rapport à la cancérogenèse colique humaine, et qui est utilisé à forte dose. De plus, ils concernent souvent les phases précoces de la carcinogenèse compte tenu de la durée nécessaire au développement de tumeurs et à leur petit nombre. Enfin, leur pertinence sur le plan des altérations génétiques qui conduisent aux cancers colo-rectaux chez l'Homme n'est pas claire.

Quelle que soit l'utilité de ce modèle pour les études de prévention, celles-ci peuvent bénéficier maintenant aussi et de façon complémentaire des modèles génétiques murins apparus récemment.

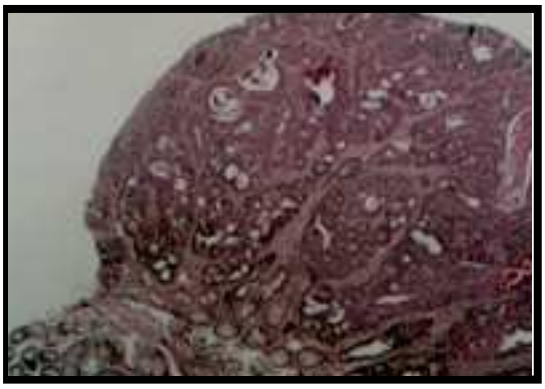


Figure 8: Coupe d'un adénome de souris *Min* à 12 semaines (x10). Coloration hemalun-eosin-safran

Nous avons choisi de comparer l'effet de régimes supplémentés en fibres alimentaires à un régime témoin pauvre en fibres (qui contient tout de même 2% de cellulose pour maintenir un transit intestinal normal). Tous les régimes utilisés sont isocaloriques. L'effet d'une "fibre non productrice de butyrate" est évalué par la supplémentation en son de blé préalablement désamidonné, traitement qui permet d'éliminer l'amidon résistant piégé dans les fibres de son de blé.

Pour quantifier l'impact des glucides indigestibles non fermentables sur la carcinogenèse génétiquement déterminée de la souris *Min*, deux types différents de fibres butyrogènes (Perrin et coll 1999) ont été utilisés. D'une part, des amidons résistants aux caractéristiques physico-chimiques différentes: un amidon de maïs rétrogradé (article 1) fréquemment utilisé dans ce type d'étude, un amidon résistant à chaîne courte (ccAR) et un amidon résistant à chaîne longue (lcAR) (article 2). D'autre part, les fructo-oligosaccharides à chaîne courte (scFOS: Actilight®) utilisés comme agent édulcorant non calorique et documentés pour exercer un effet probiotique (bifidogénique chez l'Homme).

II- QUEL EST L'IMPACT DE LA SUPPLEMENTATION EN FIBRES SUR LA REPONSE IMMUNITAIRE A LA CARCINOGENESE COLIQUE:

Des travaux menés préalablement dans le laboratoire (Perrin et coll 1994) ont permis de mettre en évidence que l'association du butyrate à l'IL2 engendre la régression complète de carcinomes établis chez le rat. A l'opposé aucun des deux composés utlilisé séparément n'est efficace. Cette régression complète des carcinomes a été attibuée à une synergie butyrate / IL2: le butyrate augmentant l'immunogénicité des cellules cancéreuses et l'IL2 stimulant la réponse anti-tumorale. Ces résultats suggèrent une implication du système immunitaire dans les interférences des fibres butyrogènes avec la carcinogenèse.
Un modèle murin est particulièrement adapté à l'étude de la réponse immunitaire à la carcinogenèse dans le contexte des fibres puisque la souris est l'animal référence en immunologie.

III- MODELISATIONS DES INTERACTIONS LYMPHO-EPITHELIALES:

Pour pouvoir aborder les mécanismes au niveau moléculaires, un modèle cellulaire utilisable *in vitro* est indispensable. Pour mettre en place un système de coculture, mon objectif était d'une part d'adapter les méthodes de préparation des LIE du grêle à la préparation des LIE du côlon et d'autre part d'établir des lignées épithéliales coliques normales et précancéreuses.

IV- ETAPES METHODOLOGIQUES:

1) Lésions précancéreuses:

A la suite de l'intervention nutritionnelle, les côlons sont examinés après (article 1) ou sans (article2) coloration au bleu de méthylène (cf figure 9) pour les lésions précancéreuses et cancéreuses et l'intestin grêle pour les plaques de Peyer (article 1)

Nous n'avons pas observé de lésions précancéreuses du type cryptes aberrantes lors de la première expérience et cela semble être une caractéristique de ce type de modèle. Dans la deuxième série, seul le comptage des adénomes, qui n'exige pas de coloration, est effectué ce qui permet d'utiliser le tissu après le comptage.

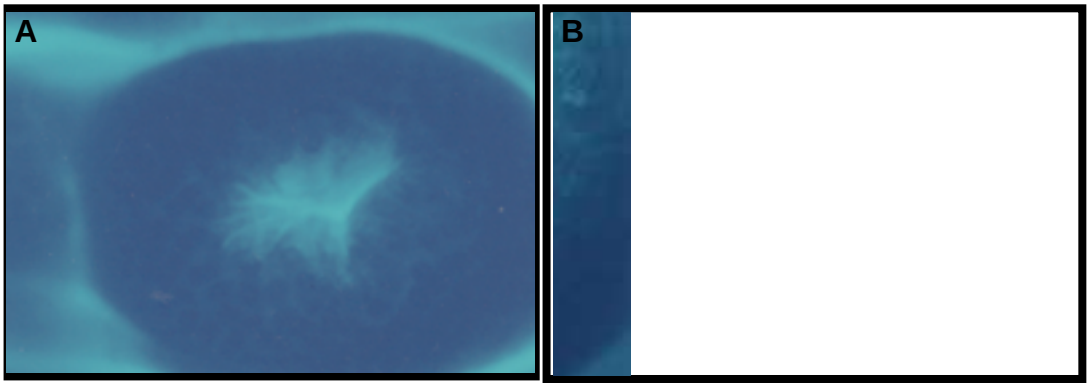


Figure 9: Mise en évidence des adénomes par une coloration du côlon dans une solution de bleu de méthylène (0.1%). **A**: diamètre inférieur à 1 mm; **B**: diamètre supérieur à 1 mm.

2) Réponse immunitaire non spécifique:

L'examen des plaques de Peyer par comptage des nodules lymphoïdes dans la première expérimentation n'a pas été poursuivi dans la deuxième série mais remplacé par l'analyse des splénocytes.

Les différentes expériences nutritionnelles réalisées sont présentées sous forme d'articles publiés (article1 et 3) ou soumis (article 2).

3) Réponse immunitaire spécifique:

3-1) Implication du système immunitaire:

L'implication du système immunitaire est évaluée par déplétion en lymphocytes T CD4+ et CD8+ par injection en intra-péritonéal d'anticorps mono clonaux anti-CD4 et anti-CD8 purifiés à partir de surnageants d'hybrydomes.

3-2) Réaction immunitaire locale:

La purification des lymphocytes intra-épithéliaux coliques a été acquise lors d'un atelier INSERM (n°85) dans le laboratoire du Pr. D. Boult (Phaculté de Pharmacie, Tours): elle est basée sur l'adaptation d'une technique mise au point par Ibraghimov et coll 1994. Le phénotypage par cytométrie en flux des LIE et splénocytes permet de mettre en évidence les modifications du système immunitaire sous influence des glucides indigestibles.

4) Intéractions lympho-épithéliales:

L'obtention des primo-cultures de cellules coliques a été possible grâce au croisement de souris Immortomouse avec des souris *Min* et C57BL6. Cette méthode permet d'établir des lignées de cellules saines et mutées conditionellement immortalisées.

Cette dernière partrie des résultats, non publiée, est présentée dans le chapitre *Interactions Lympho-Epithéliales et Glucides Indigestibles.*

RESULTATS
ET
PERSPECTIVES

GLUCIDES INDIGESTIBLES ET CARCINOGENESE COLIQUE: IMPLICATION DU SYSTEME IMMUNITAIRE

I- ARTICLE 1

Short Chain Fructooligosaccharides Reduce the Occurrence of Colon Tumors and Develop Gut -Associated Lymphoid Tissue in *Min* mice.

Pierre F., Perrin P., Champ M., Bornet F., Meflah K., Menanteau J.
Cancer Research 1997; 57: 225-228.

Une version intégrale de cet article est disponible sur le site de la revue *Cancer Research,* et accessible par un lien direct depuis le site « PubMed » de la *National Library of Medicine* des EUA.

II- ARTICLE 2

Two different kind of resistant starch reduce the number of small colon tumors in *Min* mice.

Pierre F, Perrin P, Bassonga E, Bornet F, Meflah K and Menanteau J

Manuscrit reporté intégralement dans les pages suivantes

Two different kind of resistant starches reduce the number of small colon tumors in Min mice

Fabrice PIERRE[§], **Pascale PERRIN**[§], **Euphémie BASSONGA**[§], **Francis BORNET**[¶], **Khaled MEFLAH**[§] **and Jean MENANTEAU**[§,2]

[§] HNRC of Nantes (Human Nutrition Research Center), INSERM U 419, Institut de Biologie, 9 quai Moncousu, F-44035 Nantes, France.
[¶] Eridania Beghin-Say, Vilvoorde Research & Development Centre, Nutrition and Health Service, Havenstraat 84, B-1800 Vilvoorde, Belgium.

Running title: Resistant starches reduce colon tumors in Min mice

Key Words: *Min* mice, colon cancer, nutrition, resistant starch, Bifidobacteria.

Absract:

The protective properties of fibers against colorectal cancers is still the object of intense controversies. In a previous experiment, conduced *Min* mice, a genetic model for spontaneously arising tumors, we showed that short-chain fructo-oligosaccharides were protective but not type III resistant starch (RS) . To further document the effect of RS, we tested in *Min* mice two resistant starches with different physico-chemical properties, one of them being or not associated with a prebiotic (bifidobacteria) to mimic the probiotic property of sc-FOS (symbiotic). Our experiment showed that the number of small tumors was significantly reduced in the colons of the animals fed both RS. Unexpectidly, the number of large tumors was significantly increased and they were highly vascularized in animals supplemented with the symbiotic. This observation may reflect a passage from immunosurveillance to immunofacilitation, since these bacteria are potent immunostimulators.

Introduction:

Since the Burkitt's hypothesis on the protective properties of fibers against colorectal cancers, the subject has been largely investigated and is still the object of intense controversies **(1,2)**. One of the major shortcommings of these studies is frequently the lack of a precise chemical definition of the food investigated. Although this requirement is difficult to reach in epidemiological studies, it is not the case in animal studies according to recent advances in food sciences. The extended definition of fibers is presently : carbohydrates which are not digested in the upper part of the digestive tract for any reason and are delivered intact in the colon thus including compounds such as fructo-oligosaccharides or starches resistant to amylase (RS) **(3)**. Some of them are extensively fermented by the flora a mechanism that can account for some of their physiological properties **(4,5)**. The particular role that starches may play in colon cancer protection was deduced from the epidemiological study of Cassidy et al **(6)**.

However few studies have been conducted in animal models and the results are heterogeneous, probably because the protocols and the products were different. It is likely that the characteristics of fermentation (velocity, localization, fermentary profiles) and the stage of carcinogenesis (initiation,promotion, progression) are crucial points. Recently evidences came from our group and another one that resistant starch may be protective of the colonic mucosa looking to AOM induced ACF in rats **(7,8)**. In a parallel experiment, conduced in Min mice, a genetic model for spontaneously arising tumors, we showed that the same compound was not protective although sc-FOSs another kind of non-digestible carbohydrate was protective **(9)**. This observation was interpretated as the consequence of different incidences on the whole colonic ecosystem, the sc-FOSs being for exemple documented as prebiotIcs although the RS used was not. Probiotics favour the growth of lactic acid producing bacteria **(10)** which are suspected to prevent carcinogenesis **(11)**. An alternative explanation could be that the particular physico-chemical propertie of the resistant starch used, interfered negatively or too slowly with already engaged carcinogenesis. To further document interferences between RS and carcinogenesis, we are using in the present experiment two resistant starches with

different physico-chemical properties, and the association of one of them with a prebiotic (generating a synbiotic).

Materials and Methods

Animals.

Six-week-old C57BL/6J-*Min*/+ mice (*Min* mice) were obtained from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Three deliveries of 16 animals each and one of 12 animals (n=60) were divided randomly into four groups upon reception and housed one group per cage.

Diets

Mice were fed controlled energy-balanced powdered experimental diets. The control diet (CD) was a low fiber diet containing 2% cellulose (Durieux, France). The two high fiber diets contained in addition 6% (w/w) tested fiber: short chain and long chain resistant starch (scRS and lcRS). The diet scRS-Bifid contained 2% (w/w) of lyophyllised Bifidobacterium longum

1-1.4 10e9 CFU/g) in addition to the scRS diet.

Protocol.

Mice were 7 weeks old at the beginning of the nutritional experiment. Each group was fed a diet ad libidum in protected feeders that was renewed daily for 42 days. Animals were weighed per cage every week throughout the experiment.

Scoring of tumors.

The mice were killed, and the number and size of tumors were scored blindly under a dissection microscope. Excised colons were stored in refrigerated PBS.

Results

Animal growth was unaffected by the composition of the different diets (data not shown). The diets did not change the number of tumor-bearing animals and also not significantly the number of total tumors.

The localization of the tumors along the large intestine was not dependant of the diet. However, when looking to the size of the tumors the picture became clearly different between the control group and the fiber-supplemented ones. The number of small tumors was dramatically reduced in the colons of the animals fed diets enriched with both types of resistant starch (from 0.53 to 0.13). In addition, a particular feature appeared looking specifically to large tumors which were significantly more numerous and highly vascularized in the group supplemented with resistant starch and bifidobacteria(table 1)

Discussion

In the present experiment, resistant starches added to the food of Min mice in the quantitative range of recommended consumption for humans reduced the rate of small tumors in the colon. The size of the glycanic chains does not seem to affect this property because the two experimental diets were equally effective. Many epidemiological studies failed to distinguish non-starch polysaccharides from resistant starch. The study of Cassidy et al **(5)** clearly put in light a correlation between starch and colorectal cancer. Some data from animal studies conducted in our laboratory and others are also available and depicted a protection against the formation of aberrant crypt foci considered as potential preneoplasic lesions **(6,7),** but other experiments enlighted opposite results looking to preneoplasic or neoplasic lesions **(12)**. We previously discussed the possible reasons to account for these discrepancies. In Apc models, the results are rare but also somewhat unclear. In a previous study we did not evidence any protection in Min mice with another kind of resistant starch (**9**) and more intriguously, the same compound increased the number of small intestinal tumours in Apc1638N mice (**13**). The latter observation was not repeated in our study but we are using lower intake of resistant starch. It is likely that the protective properties of RS are linked to fermentation and consequently not operative in the small intestine. Because RS alone were protective, the

present experiment does not permit to investigate the synergy between indigestible carbohydrates and probiotics depicted by others **(14)** (the number of tumors is too low with the RS alone). However, our results are consistant with such a process because the total number of small tumors was reduced from two to one when bifidobacteria were added to the diet, values evidently too low for any statistical treatment.

An unexpected finding of this study was that in addition to reduce the number of small tumors bifidobacteria induced a slight but significative increase in the number of big tumors, increase which was in addition associated with enhanced vascularization. That angiogenesis favors the growth of solid tumors is highly documented **(15)**. However the relationship between bifidobacteria and angiogenesis is not at all documented. On the other hand, these strains of bacteria have been constantly depicted as beneficial for health, included the prevention of colon cancer **(16, 17)**. These bacteria are potent immunostimulators and the immune system may interferes with colon carcinogenesis . These nterferences may be frequently favourable, counteracting anergization and allowing the rejection of precancerous lesions (immunosurveillance) but may also promote the development of tumors (immunofacilitation) **(18)**. Such a mechanism has been suspected for breast cancers looking to immunodepressed patients which developed less tumors. In the same study the results were opposite for the colon and the rectum **(19)**. The key factor would be the immunogenicity of the pre-cancerous or cancerous lesions. Our observation may reflect a passage from one side of the balance to the other. If this observation would be repeated in other models, perhaps it could be useful to document that question before using combinations such as symbiotics in at risk humans and particularly FAP patients.

On the whole, some resistant starches may be of interest in the prevention of colonic cancer but their efficacy could be limited to early steps of the development of tumors.

References

1. Fuchs C S, Giovannucci E L, Colditz G A (1999) Dietary fiber and the risk of colorectal cancer and adenoma in women. *New Engl J Med* **340**:169-177.

2.Wasan HS, Goodlad RA (1996) Fibre-supplemented food may dammage your health. *Lancet* **348**: 319-320

3. Englyst HN, Trowell H, Southgate DA, Cummings JH.(1987) Dietary fiber and resistant starch. *Am J Clin Nutr* 46: 873-874.

4. Jeanteur P. (1999) Dietary fibre intake and colon cancer. *Bull Cancer* **86**: 611-613

5. Sheppach W, Richter F (1995) Role of short-chain fatty acids in the prevention of colorectal cancer. *Eur J Cancer* **31A**: 177-208.

6. Cassidy A, Bingham SA, Cummings JH. (1994) Starch intake and colorectal cancer risk: an international comparison. *Br J Cancer* **69** :937-42.

7. Perrin P, Pierre F, Patry Y, Champ M, Berreur M, Pradal G, Bornet F, Meflah K, Menanteau J.(1999) Only fibers promoting a stable butyrate-producing colonic ecosystemdecrease the rate of aberrant crypt foci in rats. Submited to *Gut*

8. Cassand P, Maziere S, Champ M, Meflah K, Bornet F, Narbonne JF. (1997) Effects of resistant starch- and vitamin A-supplemented diets on the promotion of precursor lesions of colon cancer in rats. *Nutr Cancer* **27**: 53-59

9. Pierre F, Perrin P, Champ M., Bornet F., Meflah K., Menanteau J. (1997) Short Chain Fructooligosaccharides Reduce the Occurrence of Colon Tumors and Develop Gut - Associated Lymphoid Tissue in *Min* mice. *Cancer Res* **57**: 225-228.

10. Macfarlane GH, Cummings JH.(1999) Probiotis and prebiotics: can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health? *Br Med J* **318**: 999-1003.

11. Rao CV, Sanders ME, Indranie C, Simi B and Reddy BS. (1999) Prevention of colonic preneoplastic lesions by the probiotic Lactobacillus acidophilus NCFMTM in F344 rats. *Int J Oncology* **14**: 939-944.

12. Sakamoto J, Nakaji S, Sugawara K, Iwane S, Munakata A. (1996) Comparison of resistant starch with cellulose diet on 1,2-dimethylhydrazine-induced colonic carcinogenesis in rats. *Gastroenterology* 1996; 110: 116-120

13. Williamson SL, Kartheuser A, Coaker J, Kooshkghazi MD, Fodde R, Burn J, Mathers JC. (1999) Intestinal tumorigenesis in the Apc1638N mouse treated with aspirin and resistant starch for up to 5 months.*Carcinogenesis* **20**: 805-810.

14. Silvi S, Rumney CJ, Cresci A, Rowland IR. (1999) Resistant starch modifies gut microflora and microbial metabolism in human flora-associated rats inoculated with faeces from Italian and UK donors. *J Appl Microbiol* **86**: 521-530.

15.Saclarides TJ (1997) Angiogenesis in colorectal cancer. *Surg Clin North Am*; **77**: 253-260.

16. Rowland IR, Rummey CJ, Coutts JT and Lievense LC. (1998) Effect of Bifidobacterium longum and inulin on gut bacterial metabolism and carcinogen-induced aberrant crypt foci in rats. *Carcinogenesis* **19**: 281-285.

17. Kulkarni N. Reddy BS. (1994) Inhibitory effect of Bifidobacterium longum cultures on the azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation and fecal bacterial beta-glucuronidase. *Proceedings of the Society for Experimental Biology & Medicine* **207**: 278-83.

18. Prehn RT, Prehn LM. (1996) Immunostimulation of cancer versus immunosurveillance. Medicina **56**: 65-73.

19.Stewart T, Henderson R, Grayson H, Opelz G.(1997) Reduced incidence of rectal cancer, compared to gastric and colonic cancer, in a population of 73,076 men and women chronically immunosuppressed. *Clin Cancer Res* **3** :51-55.

Table 1: Effect of the diets on the tumor occurence in the large intestine

Diet	Tumor occurence in the large intestine			
	number of mice with tumors	total tumors mean (SD)	small tumors mean (SD)	large tumors mean (SD)
CD	10/15	1,13 (1,02)	0,53 (0,72)	0,26 (0,57)
scRS	9/15	0,66 (0,59)	0,13 (0,33) [a]	0,26 (0,44)
lcRS	10/15	0,93 (0,77)	0,13 (0,33) [a]	0,26 (0,57)
scRS + Bifid	8/15	0,86 (0,95)	0,06 (0,25) [a]	0,6 (0,72) [a]

[a] comparisons between fiber-enriched diets and control diet (CD) were significant ($p < 0.05$)

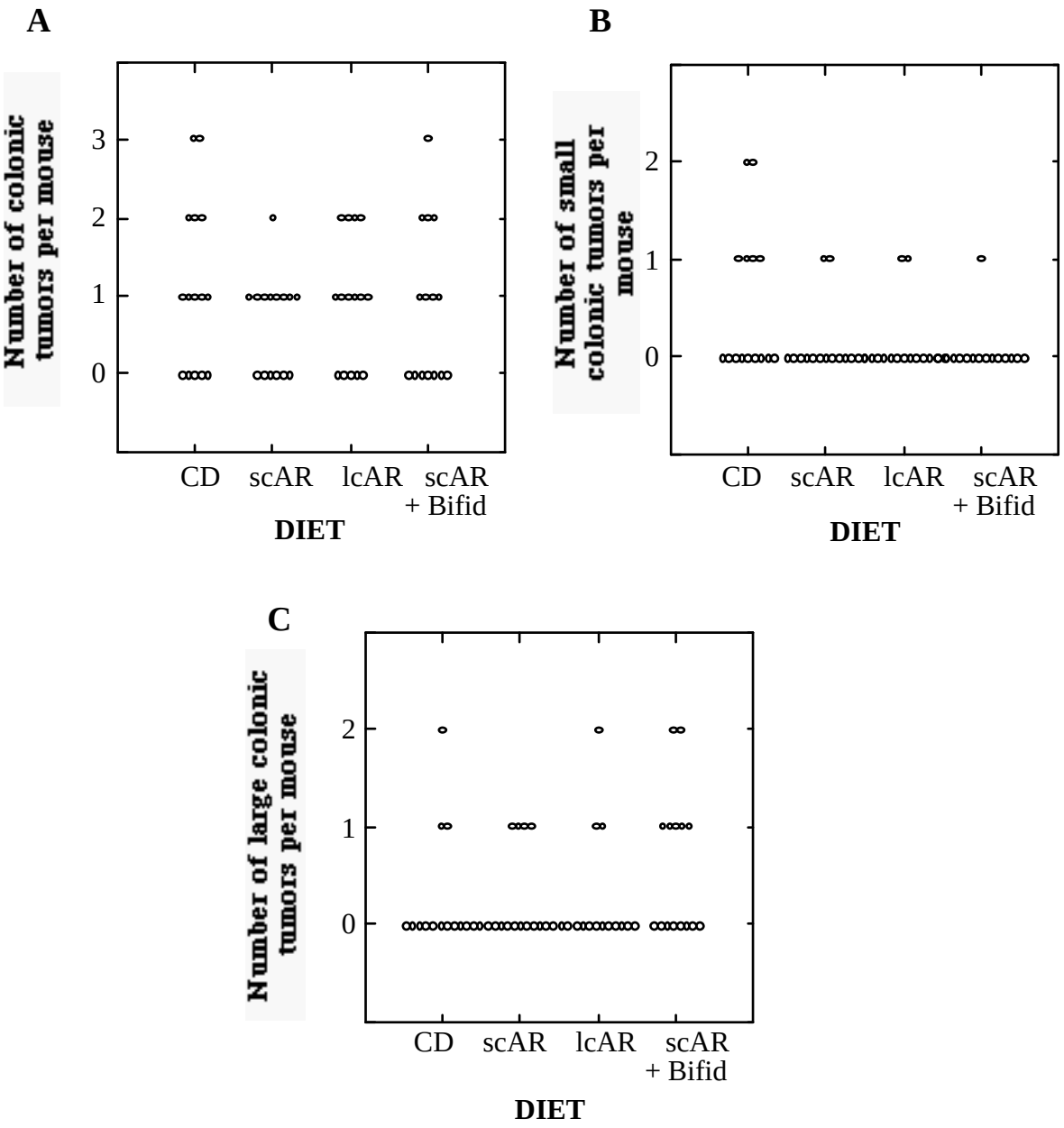


Fig. 1: Effect of dietary supplementation on the number of colonic tumors in Min mice. **A**: Effect on the number of total colonic tumors. **B**: Effect on the number of small colonic tumors. **C**: Effect on the number of large colonic tumors.h

III- ARTICLE 3

T cell status influences colon tumor occurence in *Min* mice fed short chain fructo-oligosaccharides as a diet supplement.

Pierre F, Perrin P, Bassonga E, Bornet F, Meflah K and Menanteau J. *Carcinogenesis* 1999; 20: 1953-1956

Une version intégrale de cet article est disponible sur le site de la revue *Carcinogenesis*, et accessible par un lien direct depuis le site « PubMed » de la *National Library of Medicine* des EUA.

IV- CONCLUSIONS:

A la suite de ces trois expériences nutritionnelles, il apparaît clairement que les glucides indigestibles sont capables d'interférer avec la carcinogenèse génétiquement induite de la souris *Min*.

Dans les deux séries d' expérimentations impliquant les scFOS, cette dernière entraîne une diminution du nombre de tumeurs coliques totales avec un effet drastique pour les petites tumeurs. Cet effet n'est par contre pas accompagné d'un impact sur les tumeurs de l'intestin grêle. Cette différence d'effet entre le côlon et l'intestin grêle implique donc un événement limité au côlon dans la protection médiée par les scFOS, lié au processus de fermentation ou à la modulation de l'écosystème.

L'effet des amidons résistants est moins clair puisque, d'une part, l'un d'entre eux est neutre (alors qu' il est efficace en prévention des cryptes aberrantes dans le modèle rat (Perrin et coll 1999)) et que, d'autre part, la baisse d'incidence tumorale pour les deux autres n'est significative que lorsque l'on ne prend en compte que les petites tumeurs. Cette observation pourrait être liée à la nature de l' étape de la cancérogénèse où s'exerce l'effet protecteur. Les FOS protégeraient tout au long de la séquence muqueuse-cancer, deux des amidons résistants seraient efficaces jusqu'à l'apparition des petits adénomes et enfin un amidon résistant (amidon de maïs rétrogradé) n'agirait que sur les stades très précoces de l'initiation. Ce dernier type d'amidon résistant est également inopérant dans un autre modèle *Apc* muté, où il entraîne même une légère augmentation de l'incidence tumorale dans le grêle, phénomène que nous n'avons pas observé chez la souris *Min* (cf figure 10) (Williamson et coll 1999).

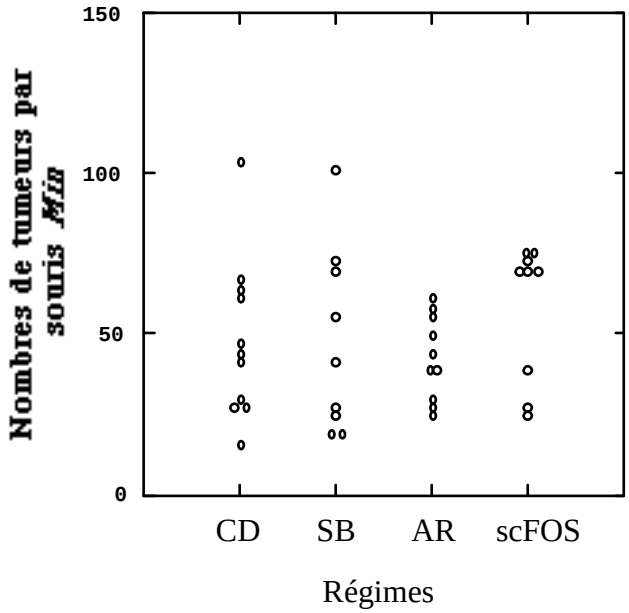


Figure 10: Effet des régimes enrichis en fibres sur l'incidence tumorale au niveau de l'intestin grêle chez la souris *Min*.

Le régime le plus efficace (FOS) est également un stimulateur puissant non spécifique de l'immunité locale. L'augmentation du nombre de nodules lymphoïdes de l'intestin grêle peut refléter une stimulation antigénique au niveau du côlon puisque les cellules immunocompétentes (thymo dépendantes) stimulées dans les plaques de Peyer repeuplent l'ensemble du tractus intestinal après passage dans la circulation sanguine générale. Ce qui n'était qu'une corrélation lors de la première étude, s'est révélé d'ordre mécanistique, puisque des animaux alimentés avec le régime FOS immunodéprimés par déplétion en lymphocytes T ne sont plus protégés par ce régime.

L' implication du système immunitaire n'est démontrée que pour le régime FOS. Elle n'est cependant pas exclue pour l'ensemble des observations si l'on fait appel au concept d'immunogénicité. Cette dernière peut être définie comme l'ensemble des paramètres moléculaires qui détermineront la manière dont les cellules (épithéliales dans le cas présent) intéragiront avec les cellules immunocompétentes au cours du processus de cancérogenèse.

En imaginant que le butyrate soit un modulateur positif de l'immunogénicité des cellules épithéliales coliques (Perrin et coll 1994) et les bactéries lactiques un modulateur positif non spécifique de l'immunité locale (Lee et coll 1993), nous pourrions établir le tableau prédictif:

	Butyrate		Bactéries lactiques	Foyers de cryptes aberrantes	Petites tumeurs	Grosses tumeurs
scFOS	++		++	↘	↘	↘
ccAR	+	ou	++	↘	↘	-
lcAR	++		+	↘	↘	-
Amidon de maïs (type III)	++		-	↘	-	-
Son de blé	-		-	-	-	-

Ce tableau est certes très spéculatif puisque beaucoup d'éléments ne sont pas établis, mais il a justifié, à notre sens, la poursuite de la documentation de l'effet de tous les types de fibres fermentées sur le système immunitaire, dans ses aspects locaux mais aussi dans les répercussions au niveau de l'immunité systémique. Il est cependant évident que même dans ce modèle expérimental contrôlé, d'autres mécanismes indépendants du système immunitaire peuvent interférer avec la cancérogénèse et rendre compte de l'hétérogéneité des résultats pour les amidons résistants.

Le second concept lié à celui de l'immunogénicié qui est sous-entendu dans notre interprétation est celui de l'immunosurveillance des cancers non-viraux induits. L'existence d'un tel mécanisme est très controversé. Toutefois, des résultats récents concernant l'incidence de ces cancers chez des patients immuno-déprimés ont réactivé la réflexion dans ce domaine. Chez les greffés du coeur et du rein, Stewart et coll (1997) notent une diminution de

l'incidence des cancers du sein et du rectum et une augmentation du nombre des tumeurs coliques. Cet effet bimodal met en lumière que la réponse du système immunitaire à la cancérisation n'est pas nécessairement favorable. Non seulement il peut être mis en anergie à certaines étapes mais il peut peut-être aussi stimuler la croissance tumorale (en produisant des facteurs solubles par exemple). C'est sans doute une interprétation possible pour l'augmentation de l'incidence des tumeurs de grande taille que nous avons mesuré lorsque des bifidobactéries lyophillisées sont ajoutées à un régime enrichi en amidon résistant. Le fait que ces tumeurs soient plus vascularisées suggère l'implication de facteurs angiogéniques.

L'existence d'une balance immunosurveillance-immunofacilitation implique une certaine prudence dans l'amplitude de la manipulation de la réponse immunitaire à la cancérogénèse.

La piste de l'immunoprophylaxie par les glucides indigestibles reste cependant prometteuse et nous conduit d'une part, à analyser plus en détail la réponse immunitaire locale, et d'autre part, à mettre en place un modèle pour l'étude in vitro des interactions lympho-épithéliales dans le contexte de la cancérogénèse et des glucides indigestibles alimentaires.

INTERACTIONS LYMPHO-EPITHELIALES ET GLUCIDES INDISGESTIBLES

Nous avons montré que le système immunitaire intestinal peut interférer avec la carcinogenèse colique dans le modèle *Min*. Les études préliminaires décrites dans ce chapitre sont destinées à documenter les mécanismes responsables de ces interférences.

I- LE SYSTEME IMMUNITAIRE LOCAL:

Le système immunitaire local est l'organe lymphoïde le plus important du corps. Il est constitué de cellules immunocompétentes regroupées en organes lympoïdes secondaires (les plaques de Peyer) et de cellules isolées (les lymphocytes intra-épithéliaux: LIE et lymphocytes de la lamina propria: LLP) (cf Figure 11). Les lymphocytes de chacun de ces compartiments ont des origines, des phénotypes et des fonctions (qui restent discutés) différentes (Abreu-Martin et coll 1996).

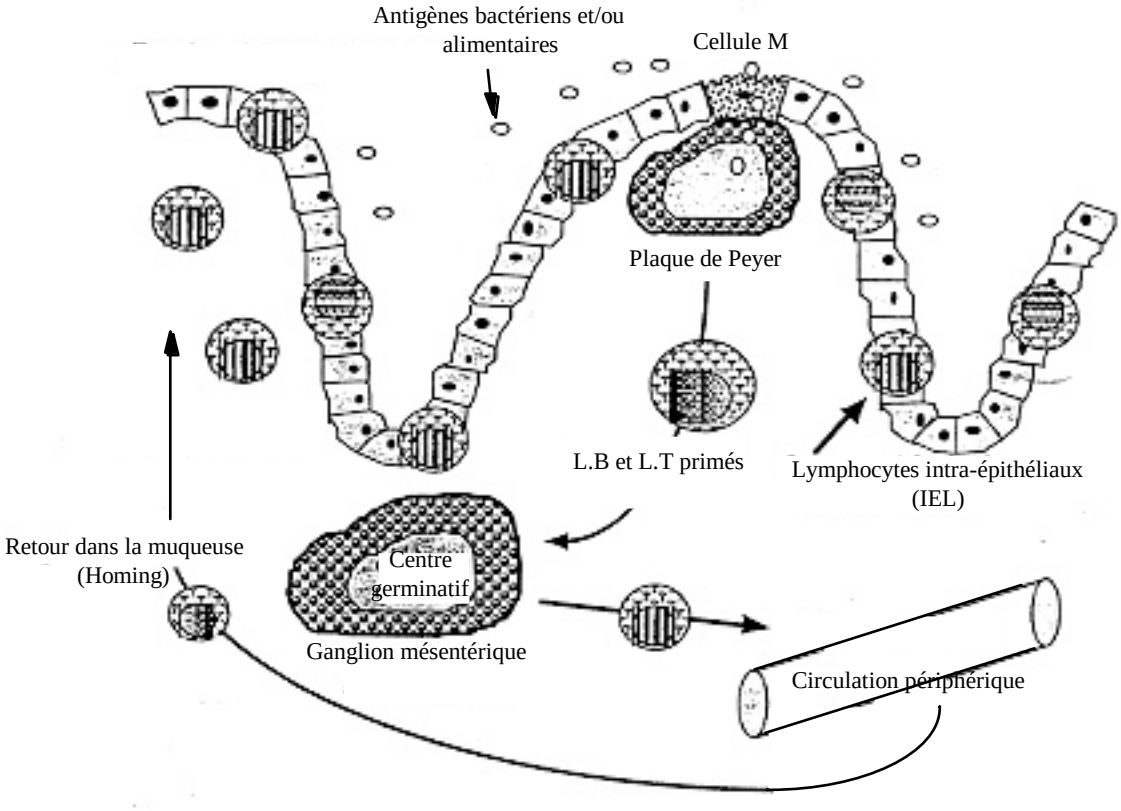


Figure 11: Système immunitaire associé aux muqueuses (d'après Abreu-Martin et coll 1996)

Les plaques de Peyer (PP) que l'on retrouve tout au long du tractus intestinal sont formées d'un centre germinatif de lymphocytes B entourés d'une couronne de lymphocytes T. Les PP sont recouvertes de cellules épithéliales intestinales parmi lesquelles environ 10% sont des

cellules M: cellules vouées au transfert et à la présentation des antigènes depuis la lumière intestinale jusqu'aux cellules immunocompétentes de la PP. Cet organe lymphoïde secondaire forme ainsi un “site d’échantillonnage” des antigènes de la lumière intestinale (Abreu-Martin et coll 1996).

Les LLP forment une population de lymphocytes dérivés du thymus répartis dans la lamina propria. Chez la souris, environ 90% des LLP sont des lymphocytes T, le reste de la population étant formé de plasmocytes. Approximativement, 65 à 80% de ces cellules exprimant le CD3 sont CD4+. Environ 95% des LLP T expriment le TCR αβ, et seulement 3% le TCR γδ. Ce phénotype les rapproche donc assez fortement des lymphocytes périphériques (PBL): même rapport CD4/CD8 et TCR αβ/ γδ. Toutefois, malgré ces similarités phénotypiques, les LLP se différencient des lymphocytes périphériques par une forte expression de CD45RO (66 à 95% contre 30 à 40%), marqueur des lymphocytes mémoires. De plus, ces lymphocytes présentent un statut d’activation élevé, résultant probablement d’un "challenge" antigénique continu dû à l’environnement intestinal. Le profil de sécrétion des cytokines des LLP (T helper 1 ou 2) est plutôt de type Th2. Enfin, la voie d’activation des LLP est différente des lymphocytes mémoires périphériques: elle fait principalement intervenir des intéractions CD2/CD28 plutôt que TCR/CD3. (Abreu-Martin et coll 1996)

Les LIE représentent une population unique de cellules immunocompétentes intimement associées aux épithélia. On retrouve des LIE au niveau des muqueuses respiratoires, génitales et de la peau. Toutefois, le nombre le plus important de LIE se retrouve au niveau de la muqueuse intestinale. Les LIE se localisent entre les cellules épithéliales au niveau du pôle basal et sont ainsi les premières cellules immunocompétentes au contact de bactéries ou antigènes pouvant provenir de la lumière intestinale.(Beagley et coll 1998)
La majorité des études sur les lymphocytes intraépithéliaux ont été effectuées chez la souris et au niveau de l’intestin grêle (gLIE). Toutefois, quelques études comparatives du phénotype des LIE coliques (cLIE) montrent que ces deux populations présentent des phénotypes différents et donc potentiellement des fonctions différentes. En effet, les gLIE sont principalement des lymphocytes T (CD3+) et environ 80% de ces lymphocytes T expriment le CD8. Les cLIE CD3+ expriment de manière plus importante le marqueur CD4, avec une grande variabilité suivant les souches (75% de CD3+/CD4+ chez les souris BALB/C et 30% chez les souris C57BL/6). (Camerini et coll 1993; Beagley et coll 1995; Ohtsuka et coll 1996)
Les lymphocytes intra-épithélaux CD8+ peuvent exprimer la forme hétérodimérique CD8 αβ ou la forme monomérique αα. Au niveau des gLIE, les CD8 αα expriment à la fois le TCR αβ et γδ, les CD8 αβ exprimant uniquement le TCR αβ. Au niveau du grêle, les gLIE à TCR γδ (donc CD8 αα) représentent jusqu’à 50% de la population totale, alors que dans le côlon, les cLIE à TCR γδ sont principalement CD4-/CD8- et réprésentent 5 à 15% des cLIE. De plus, au

niveau colique, les cLIE expriment fortement CD69, ce qui suggère que ces lymphocytes sont activés chroniquement (Abreu-Martin et coll 1996; Beagley et coll 1998).
Les LIE coliques et de l'intestin grêle se caractérisent par une forte expression du CD103 (αEβ7) intégrine très rare à la surface des lymphocytes circulants (2%) (Cerf-Bensussan et coll 1987). Le récepteur du CD103 est l'E-cadherine qui est exprimée à la surface basolatérale des cellules épithéliales. Cette intégrine servirait à "l'adressage" des lymphocytes intra-épithéliaux au niveau de l'épithélium (écotaxie ou "homing") (Salmi et coll 1999).
La présence maintenue de cellules T au niveau de l'épithélium intestinal malgré leur absence au niveau périphérique chez les souris nude suggère que l'épithélium intestinal peut permettre le développement de lymphocytes T en l'absence de thymus fonctionnel (Emoto et coll 1996). De plus, le suivi de reconstitution de la population des lymphocytes intra-épithéliaux chez des souris athymiques met en évidence une population des IEL CD8 αα ou à TCR γδ quasiment normale, confirmant l'origine extrathymique de ces populations lymphocytaires. En effet, il est généralement admis que les IEL à TCR αβ (CD4+ et CD8+ αβ) dérivent directement du thymus où ils ont subi la sélection positive et négative permettant d'éliminer les lymphocytes auto-réactifs. Par contre, les populations atypiques (TCR γδ et TCR αβ CD8 αα) dérivent directement de la moelle sans subir la différenciation positive et négative, ce qui laisse supposer la présence de lymphocytes auto-réactifs parmi cette population extrathymique (cf figure 12) (Cerf-Bensussan et coll 1993).
Les LIE CD8 αα et à TCR γδ (d'origine extrathymique) sont peu réactifs à une stimulation CD3/TCR alors que les lymphocytes thymodépendants (TCR αβ CD4+ et CD8 αβ) prolifèrent en réponse à une activation TCR. L'apparente anergie de la population extrathymique peut constituer un avantage pour l'hôte puisque cette population contient potentiellement des lymphocytes auto-réactifs. Enfin, si les LIE réagissent peu à l'activation TCR, ils sont sensibles à une voie d'activation alternative passant par CD2 (Beagley et coll 1998). La forte expression de CD58 (LFA-3) au niveau des cellules épithéliales conforte cette hypothèse (Framson et coll 1999).

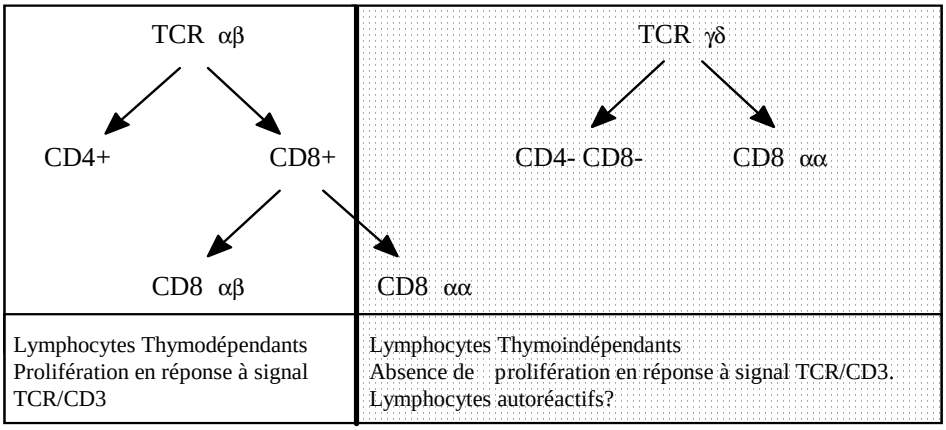


Figure 12: Origine des lymphocytes intra-épithéliaux.

Les fonctions des LIE sont encore mal connues. Les LIE à TCR αβ et TCR γδ exercent une activité cytotoxique constitutive antigène-spécifique ou non. En relation avec la localisation des LIE, cette activité cytotoxique pourrait être un mécanisme de défense immédiate de l'hôte contre l'invasion de pathogènes et peut-être contre les cellules épithéliales anormales. *In vitro*, les LIE peuvent se lier fortement à des cellules épithéliales tumorales, par l'intermédiaire de CD103 et CD11a (Roberts et coll 1993a), et exercer contre ces cellules une activité cytotoxique (Roberts et coll 1993b) qui ne semble pas être de type NK (les LIE n'expriment pas CD16 et CD56). Les LIE sont capables de produire les cytokines associées à la fonction Th1 et Th2 (Beagley et coll 1998).

II- ETUDE PRELIMINAIRE *IN VIVO*:

L' impact de la supplémentation en glucides indigestibles (5,8%) de l'alimentation de souris *Min* sur les LIE a été examiné en même temps que l'incidence tumorale. Cette étude confirme les résultats de la première intervention en ce qui concerne l'effet protecteur des sc-FOS (Pierre et coll 1999b). Par contre, les deux nouveaux amidons résistants utilisés diminuent le nombre de petites tumeurs alors que celui utilisé dans la première expérimentation était sans effet (Pierre et coll 1999a).

Purification des LIE et des splénocytes:

Les lymphocytes intra-épithéliaux coliques sont préparés à partir d'une méthode adaptée de la technique utilisée par Ibraghimov et coll en 1994. Pour la purification des LIE, le côlon et le caecum sont considérés comme un organe unique, puisque plusieurs travaux montrent qu'ils présentent des populations de LIE identiques (Camerini et coll 1993). Le côlon et le caecum sont isolés de la souris, ouverts longitudinalement et lavés dans un bain de PBS pour éliminer les contenus. Les plaques de Peyer sont ensuite éliminées aux ciseaux, et le mucus est enlevé grâce à un léger nettoyage de la muqueuse au pinceau. Le côlon (côlon + caecum) est ensuite lavé dans cinq bains de PBS sous agitation et découpé en morceaux d'un demi centimètre environ. Ces morceaux sont transférés dans un tube de 15 ml contenant 5 ml de PBS / 5 mM EDTA / 5 mM DTT (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO) pour une incubation de 30 mn sous agitation constante à 37°C. La dissociation de l'épithélium est terminée par une dissociation mécanique: une série de 20 pipettages à l'aide d'une pipette de 5ml. Les débris muqueux sont éliminés par une sédimentation de 60 s et le surnageant est collecté. L'opération de la dissociation mécanique par pipettage est répétée plusieurs fois par ajout de RPMI (Gibco, Grand Island, NY) + 4% SVF + 1% Hepes (Gibco, Grand Island, NY) jusqu'à obtention d'un surnageant clair. Les surnageants sont regroupés et centrifugés pendant 10 mn à 1500 rpm à température ambiante. Le culot cellulaire est récupéré et lavé deux fois dans 10 ml de RPMI / 4% SVF / 1% Hepes. Après le dernier lavage, le culot est repris dans 5 ml de milieu et est vortexé pendant deux minutes pour optimiser la dissociation tissulaire. Les cellules sont

ensuite culotées par une centrifugation (1500 rpm / 10 mn / température ambiante) et sont remises en suspension dans 25 ml de Percoll 67% (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ) recouvert de 25 ml de Percoll 44%. Une centrifugation à 600g pendant 30 mn à température ambiante de ce gradient différentiel permet la récupération des LIE à l'interface. Les LIE récupérés par pipettage de l'interface sont lavés dans 50 ml de milieu par trois centrifugations (1500 rpm / 10 mn / température ambiante) pour éliminer les résidus de Percoll toxique pour les cellules.

Les splénocytes sonr récupérés par perfusion de la rate avec du RPMI. Les cellules obtenues sont culotées, et lavées dans du RPMI + 10% SVF. Les cellules reprises dans 4 ml sont ensuite déposées sur Ficoll (Seromed, Berlin, Allemagne) et centrifugées 30mn à 500g. Les lymphocytes sont récupérés à l'interface RPMI/Ficoll et lavés en RPMI +10% SVF.

Marquage pour cytométrie en flux:

Après purification, 10^5 lymphocytes intra-épithéliaux ou splénnocytes sont incubés pendant 30 mn à 4°C dans 50 µl de PBS + 0,1% gelatine (poids/volume) avec l'anticorps approprié conjugué à un fluorochrome. Les lymphocytes sont ensuite lavés avec 200 µl de PBS / 0,1% gélatine par trois centrifugations à 1500g pendant 30 s à 4°C, et fixés avec 200 µl de PBS + 1% paraformaldéhyde (volume/volume). Un témoin négatif sans anticorps est utilisé pour quantifier l'autofluorescence des lymphocytes. Les anticorps utilisés proviennent de Pharmingen Co (San Diego, CA): FITC-CD3 (145-2C11), PE-CD4 (RM4-5) and Cy-chrome-CD8a (53-6.7), FITC-TCR γδ (GL2), FITC-CD25 (7D4), FITC-CMH II (AF6-120.1). Les marquages CD3, CD4 et CD8 sont réalisés en double marquage avec les couplets CD3/CD4 et CD3/CD8. Pour les autres anticorps, les marquages sont réalisés en simple marquage. L'expression antigénique à la surface des lymphocytes est analysée par cytométrie en flux grâce à un FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA) en utilisant le logiciel CELLQuest (Becton Dickinson, San Jose, CA). Pour l'analyse, les LIE sont définis par une région R1 sur le dot-plot FSC/SSC (Fig 13).

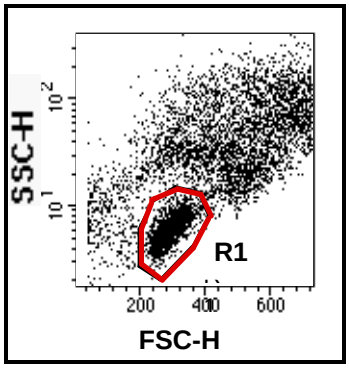


Figure 13: Définition de la région des IEL sur les dot-plot FSC / SSC .

1) Les glucides indigestibles ont un impact sur certains paramètres de l'immunité systémique:

Le fait observé dans la première intervention, que le régime FOS ait un impact sur le GALT, posait la question d'une possible répercussion sur l'immunité systémique compte tenu de son importance quantitative. La deuxième série d'intervention a été l'occasion de mesurer ce paramètre. La réponse aux trois régimes (FOS et les deux amidons résistants) est très proche. La plupart des paramètres étudiés ne sont pas modifiés (CD4, CD8, CD25, CD28, CD54), seule la présentation antigénique est affectée avec un accroissement de l'expression du CMH de classe II (cf Fig 14)

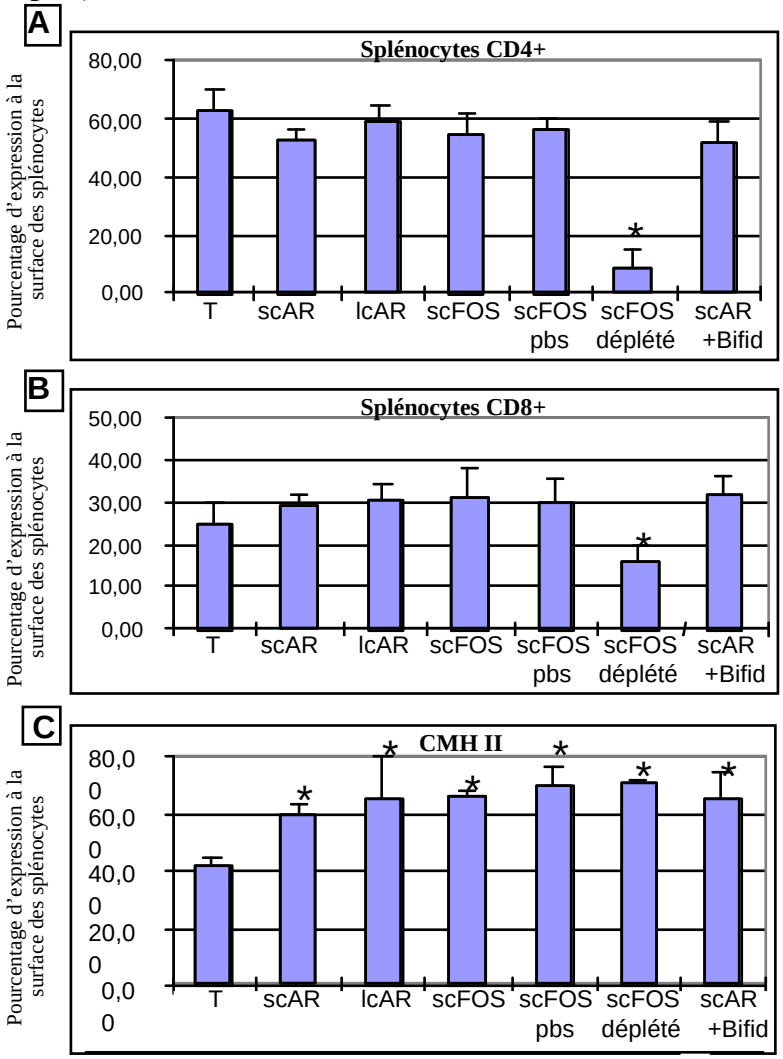


Figure 14: Effet d'une supplémentation en glucides indigestibles fermentables sur le phénotype des splémocytes chez la souris *Min*. **A**: CD4+; **B**: IEL CD8+; **C**: CMH II. *: résultat significatif par rapport au régime Témoin (T) (P<0,05).

2) La protection des souris *Min* par les scFos est corrélée à une baisse de l'expression de récepteur à l'IL2 à la surface des lymphocytes intra- épithéliaux:

En ce qui concerne le régime scFOS, où la protection implique clairement le système immunitaire local, la supplémentation se traduit par une diminution statistiquement

significative de l'expression du récepteur à l'interleukine 2 (sous unité α: IL2Rα, CD25) à la surface des LIE (P<0,05) (cf Fig 15 et 16) sans impact sur la population CD4+ et CD8+ (cf Fig 17 et 18).

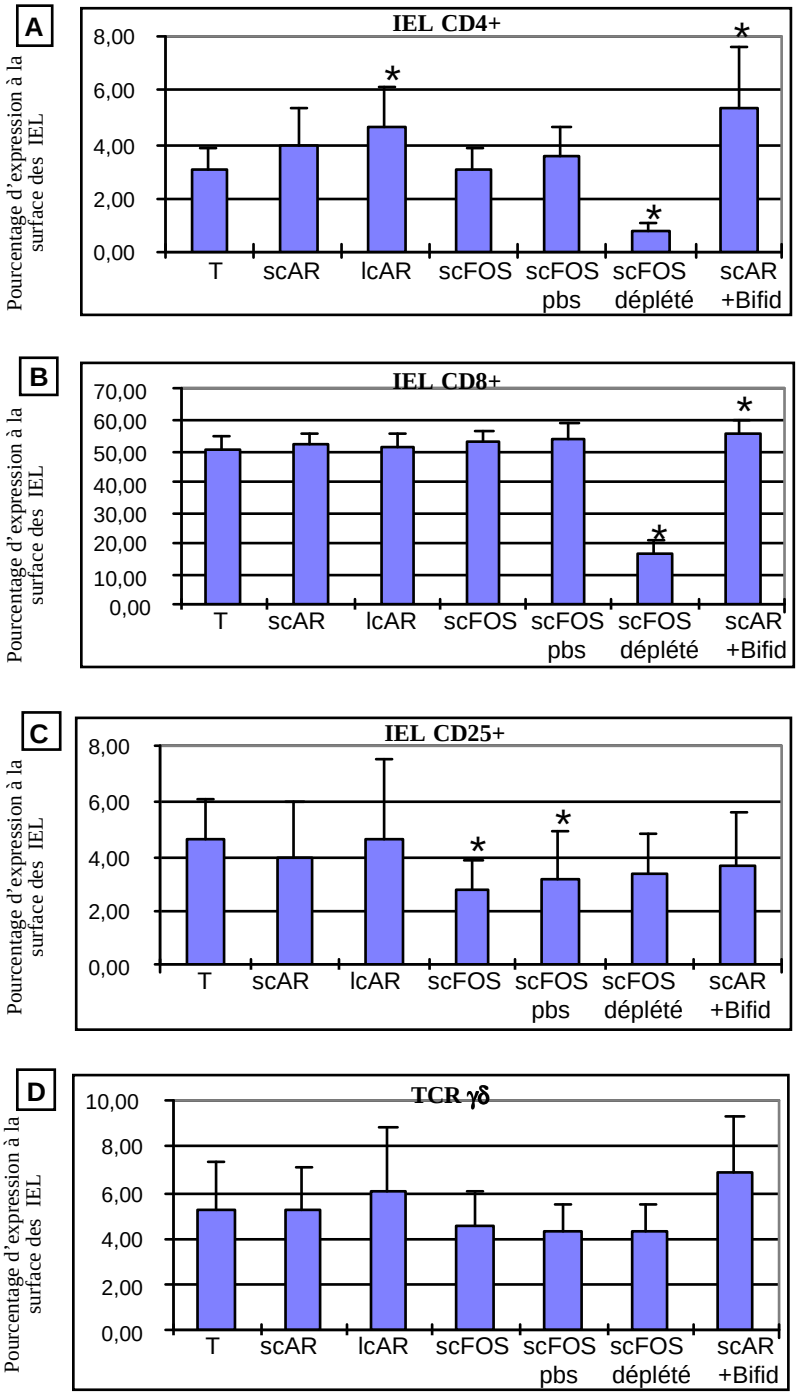


Figure 15: Effet d'une supplémentation en glucides indigestibles fermentables sur le phénotype des lymphocytes intra-épithéliaux (IEL) coliques chez la souris *Min* .A: IEL CD4+; B: IEL CD8+; C: IEL CD25+; D: IEL à TCR gd. *: résultat significatif par rapport au régime Témoin (T) (P<0,05)

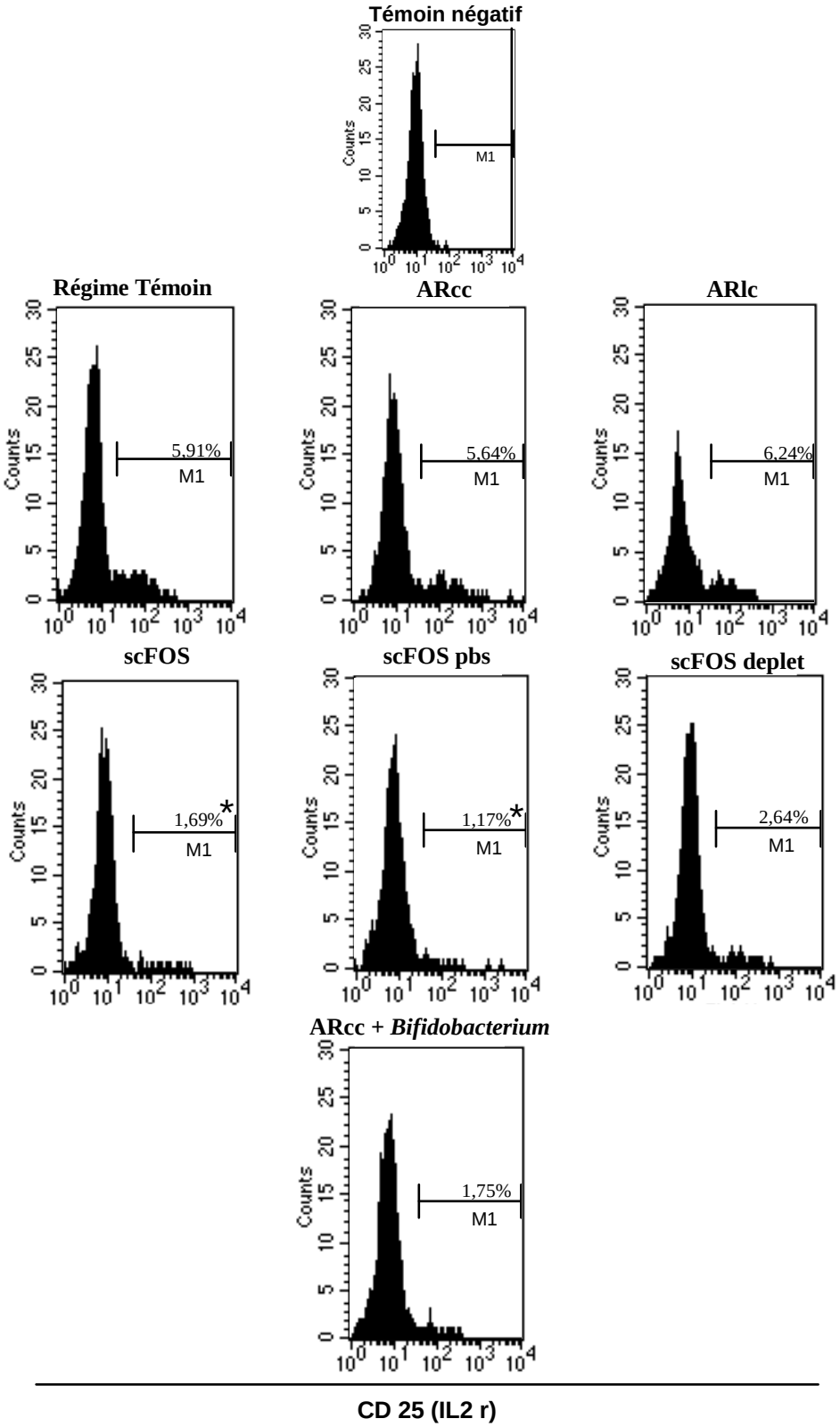


Figure 16: Effet des régimes sur l'expression du récepteur à l'interleukine 2 à la surface des lymphocytes intra-épithéliaux chez la souris *Min*. Simple marquage des IELCD25 (7D4) en cytométrie de flux.

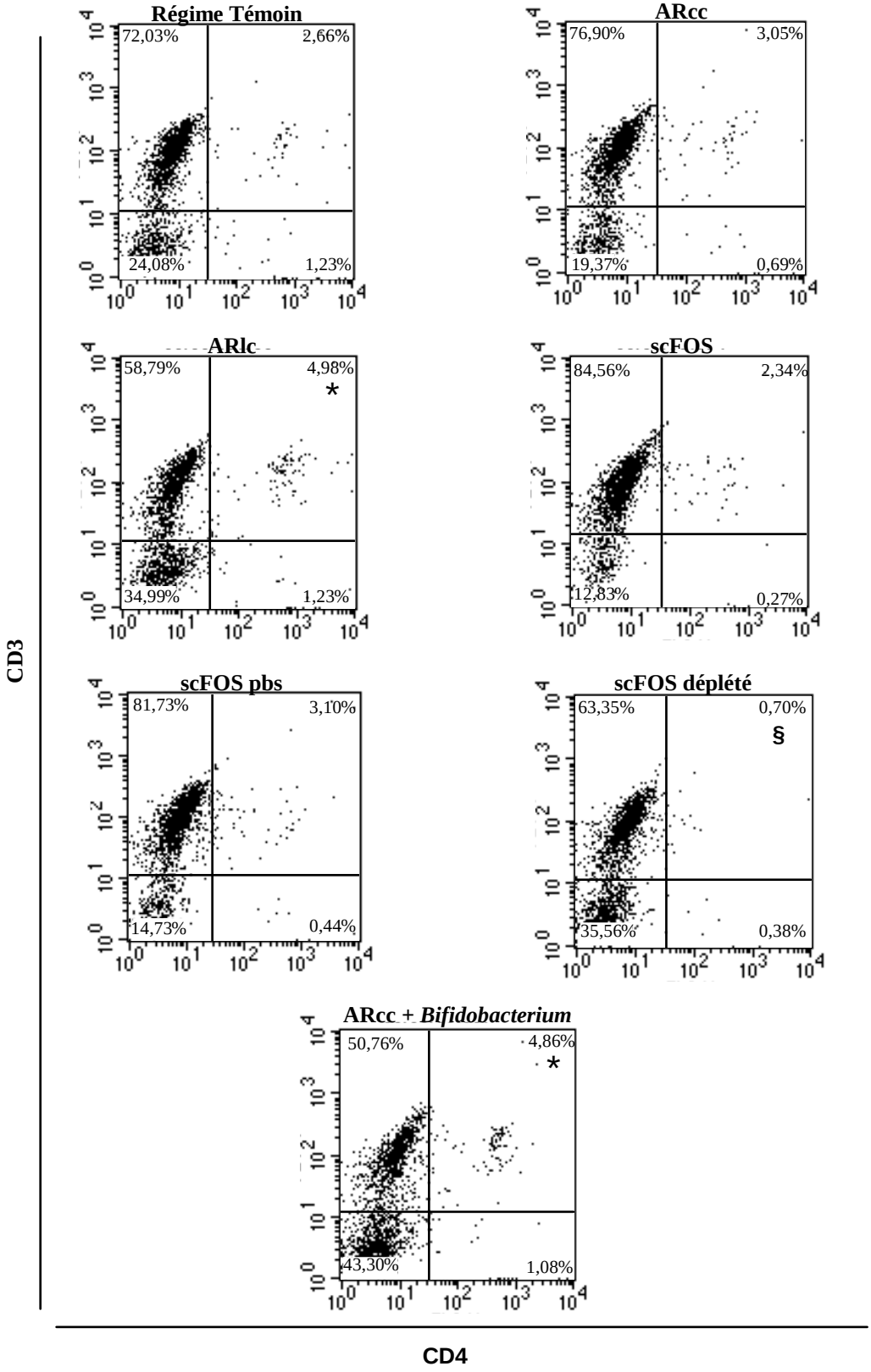


Figure 17: Phénotypage par cytométrie de flux des lymphocytes CD3/CD4+ intra-épithéliaux en fonction des régimes alimentaires chez la souris *Min*. Double marquage des lymphocytes CD3+ (145-2C11) CD4+ (H129.19). * résultat statistiquement significatif en comparaison au régime témoin (P<0,05); § résultat statistiquement significatif en comparaison au régime sc-FOS (P<0,05).

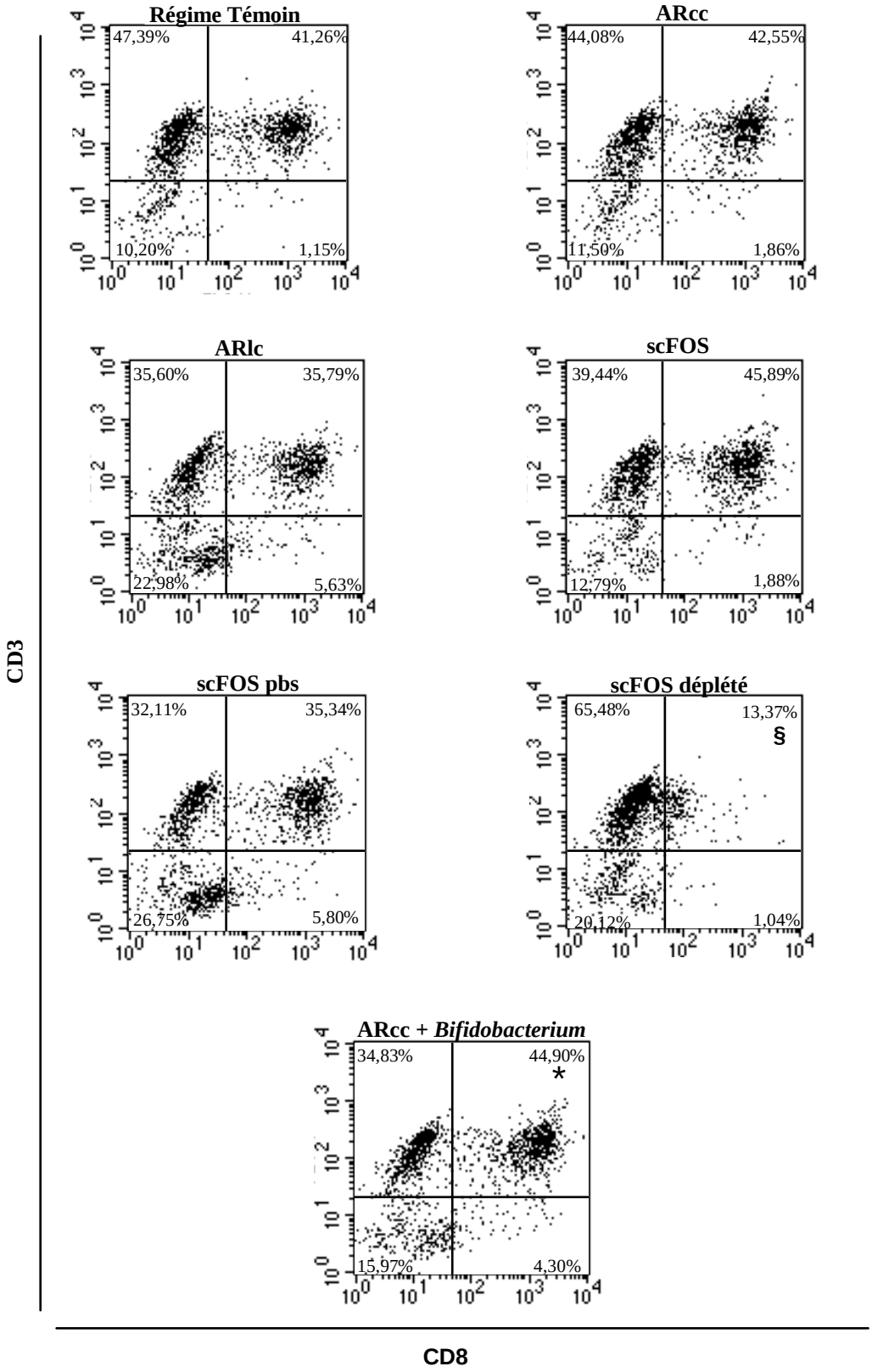


Figure 18: Phénotypage par cytométrie de flux des lymphocytes CD3/CD8+ intra-épithéliaux en fonction des régimes alimentaires chez la souris *Min*. Double marquage des lymphocytes CD3+ (145-2C11) CD8+ (53-6.7). * résultat statistiquement significatif en comparaison au régime témoin (P<0,05); § résultat statistiquement significatif en comparaison au régime sc-FOS (P<0,05).

Cette baisse significative du récepteur à l'Il2 (qui est également observée chez les souris C57BL6 sauvages cf Fig 17) peut être interprétée à la lumière de travaux récents concernant le recepteur IL2Rα au niveau du système immunitaire périphérique.

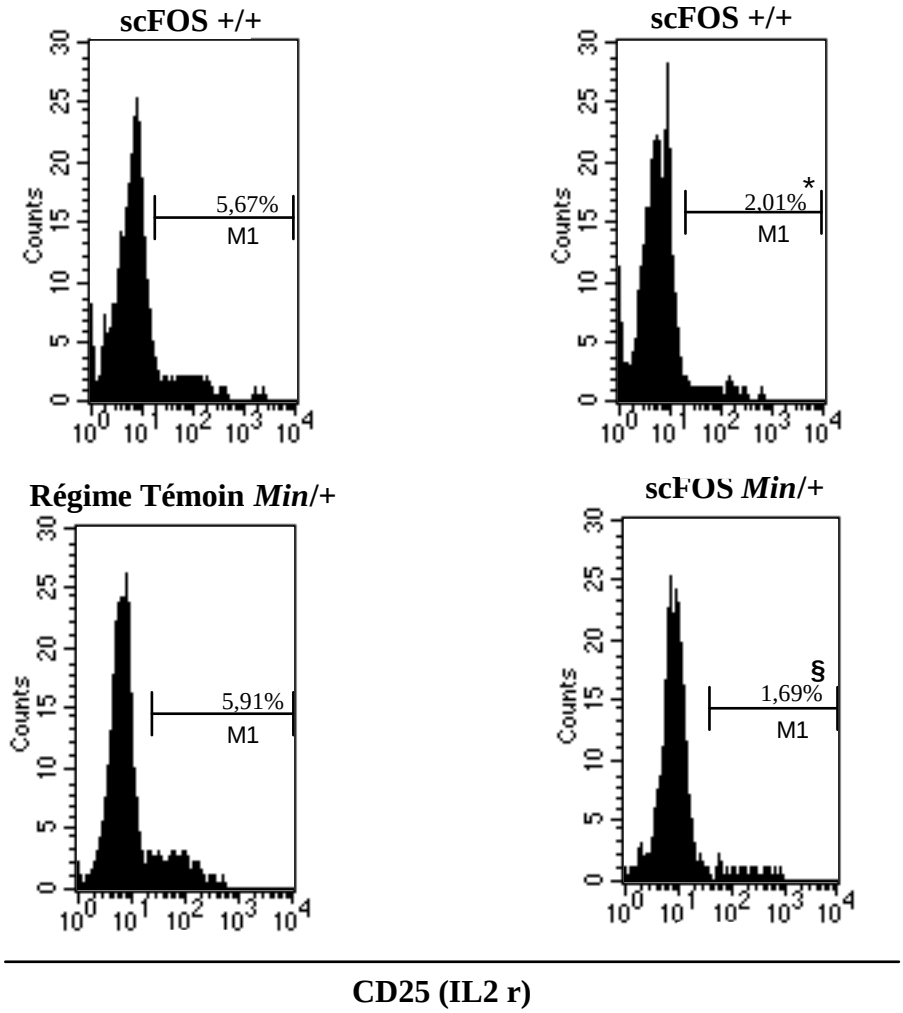


Figure 19: Effet d'une supplémentation en fructo-oligosaccharides à chaînes courtes sur le phénotype des lymphocytes intra-épithéliaux chez les souris C57BL6 (+/+) et *Min* (*Min*/+): analyse par cytométrie de flux. A: Double marquage des IEL CD3 (145-2C11) CD4+ (H129.19). B: Simple marquage des IEL CD25+ (7D4). * Résultat statistiquement significatif en comparaison à Régime Témoin +/+; §Résultat statistiquement significatif en comparaison de Régime Témoin *Min*/+

Très récemment, Onizuka et coll (1999) ont obtenu la régression de plusieurs types de tumeurs (leucémie, myelome et sarcome) par injection d'un anticorps monoclonal anti IL2Rα. L'administration de l'anticorps est associée à une réduction de la population CD4+ CD25+.

Le rôle du récepteur à l'Il-2 est clarifié par l'étude des souris knock-out pour ce gène (Willerford et coll 1995). CD25 n'est pas indispensable au développement normal des lymphocytes T et des lymphocytes B et n'est pas impliqué dans la génération de lymphocytes matures. Le nombre ainsi que la proportion des différentes populations lymphocytaires est normal chez les souris IL2Rα -/-, à l'exception de l'amplification des organes lymphoïdes périphériques (rate et ganglions) sans que, là encore, les proportions des différentes populations soient modifiées. Cette amplification ne serait pas liée à une augmentation de la

prolifération mais plutôt à une baisse de l'entrée en apoptose après activation. Le récepteur à l'IL2 serait un régulateur des populations lymphocytaires en exerçant un contrôle sur la balance expansion clonale/apoptose.
Une étude préliminaire montre une augmentation du nombre d'LIE chez les souris C57BL/6 supplémentées en scFOS (eau de boisson et régime: cf tableau 9), qui pourrait donc être due à une diminution d'entrée en apoptose liée à la baisse de l'expression de CD25, ouvrant une piste pour l'interprétation de nos résultats.

Tableau 9: Incidence d'une supplémentation en scFOS sur le nombre d'IEL:

Expériences	**T** (n/souris)	**FOS*** (n/souris)
FOS-Eau	320 087	499 899
FOS-Eau	448 500	732 336
FOS-Eau	285 171	404 040
FOS-régime	170 000	374 000
FOS-régime	250 000	670 000
FOS-régime	390 000	1 100 000
FOS-régime	532 000	660 000

FOS-Eau: supplémentation de l'eau de boisson (3g/jours) sur le régime T. FOS-régime: supplémentation du régime alimentaire en sc-FOS (5,7%) chez la souris C57BL/6. *: nombre d'IEL significativement supérieur par rapport au régime T(Test de student bilatéral: P=0,01)

Des résultats partiels obtenus dans le laboratoire (Euphémie Bassonga, Diplôme EPHE) montrent une augmentation de l'ARN messager de l'IL15 dans la muqueuse colique de souris alimentées avec sc-FOS. Cette interleukine est un activateur de la prolifération et de la cytotoxicité des LIE (Ebert et coll 1998). D'autre part, la baisse du récepteur à l'IL-2 pourrait stimuler l'activité cytotoxique des LIE (les cLIE de souris IL2 -/- acquièrent la capacité de lyser des cellules cibles (Simpson et coll en 1995)). Les sc-FOS augmenteraient à la fois le nombre et la cytotoxicité des LIE par l'action synergique d'une augmentation de la production d'IL15 et de la baisse de l'expression du récepteur à l'IL-2 à leur surface.

3) Deux amidons résistants diminuent l'incidence des petites tumeurs sans baisse du récepteur à l'IL2 à la surface des LIE

Deux régimes enrichis en amidon résistant (ccAR et lcAR) protègent contre les petites tumeurs mais ne modifient pas les marqueurs du système immunitaire local que nous avons examinés et donc l'expression du récepteur à l'IL2 sur les LIE. Un de ces deux amidons (lcAR (figure 15) est cependant associé à une augmentation de la population CD4+). La diminution du récepteur à l'Il 2 est donc associée à un effet spécifique sur la croissance des tumeurs. Le mécanisme de protection exercé par les amidons résistants serait moins dépendant de la

réaction du système immunitaire local. Dans un modèle qui concerne les toutes premières étapes de la cancérogenèse colique (la formation de cryptes aberrantes par injection d'azoxy méthane à des rats), la production intra-colique de butyrate par fermentation d'un amidon résistant est associée à la réduction de ces lésions (potentiellement pré-cancéreuses) peut-être en modulant l'immunogénicité des cellules épithéliales (Perrin et coll 1999). Un tel mécanisme pourrait rendre compte de l'effet observé avec ces deux amidons résistants. Malheureusement, l'amidon résistant butyrogène qui est protecteur dans le modèle rat est celui qui ne l'est pas dans le modèle *Min* (Pierre et coll 1997). L'étude des profils fermentaires de ces trois amidons résistants chez la souris devrait permettre de clarifier l'implication du butyrate. D'autres facteurs
liés à leurs propriétés physico-chimiques ou encore à leurs propriétés prébiotiques (Silvi et coll 1999) peuvent aussi rendre compte de l'hétérogénéité des résultats obtenus avec les amidons résistants.

4) Perspectives *in vivo* et *ex vivo*:

Toutefois, ces résultats restent préliminaires et les corrélations sont peut-être étrangères au mécanisme mis en jeu. Le rôle joué par CD25 au cours du développement de la carcinogenèse colique spontanée de la souris *Min* pourra être vérifié par injection d'anticorps anti CD25 suivant le protocole effectué par Onizuka et coll. La déplétion effective en cellules immunocompétentes CD4 et CD8 du sytème immunitaire local par injection d'anticorps monoclonaux par la voie intrapéritonéale (Pierre et coll 1999) laisse envisager que la déplétion des cellules CD25+ est possible par cette même voie. Si l'implication de CD25 est réelle, cette déplétion sur le régime témoin (non protecteur) se traduira par une baisse de l'incidence tumorale qui se rapprochera de la supplémentation en scFOS.
Ensuite il sera intéressant de connaître précisément la population de LIE affectée par cette baisse de l'expression du CD25. Pour celà, des doubles marquages en cytométrie de flux des LIE permettront d'identifier cette population. Il apparaît important de déterminer si cette population $CD25^{faible}$, appartient à la population des thymodépendants (TCR $\alpha\beta$ CD4+ et CD8 $\alpha\beta$) ou thymoindépendants (TCR $\gamma\delta$ et TCR $\alpha\beta$ CD8 $\alpha\alpha$). Une baisse de l'expression de CD 25 sur les lymphocytes thymodépendants favoriserait l'augmentation de cette population entraînant une réponse antigène-spécifique. L'implication de la population affectée par la baisse du CD25 pourra être confirmée par une déplétion.
Une voie alternative pour mesurer l'implication des LIE est le transfert adoptif, suivant la technique développée par Davidson et coll (1996) et Buzoni-Gatel et coll (1997). L'injection de LIE par *iv* est en effet suivie par un homing substantiel de ces cellules dans la muqueuse intestinale avec maintien des propriétés acquises chez le donneur.
De plus, il sera utile d'étudier l'orientation de la réponse immunitaire dans le cadre du régime protecteur (Th1 versus Th2) par l'étude de la production des cytokines spécifiques de ces deux

voies: IFN γ et IL-2 pour la voie Th1 et IL4,5 et 6 pour la voie Th2. Ceci nous permettra de vérifier si la réponse immunitaire impliquée dans la protection est plus orientée vers une réponse cytotoxique (Th1) ou humorale (Th2).
Enfin les travaux de Simpson et coll (1995) ayant mis en évidence une activité cytotoxique plus forte des cLIE des souris IL2-/-, la comparaison de l'activité cytotoxique des cIEL isolés de souris nourries au régime témoin ou scFOS, nous permettra de vérifier et quantifier la relation CD25 - activité cytotoxique des cLIE.
Enfin, il faudra documenter l'impact de ces glucides indigestibles sur les partenaires des LIE dans la muqueuse que sont les cellules épithéliales, en particulier l'expression de CD1d molécule de présentation antigénique exprimée par ces cellules, et qui est sans doute impliquée dans l'activation des LIE (Porcelli et coll 1998; Colgan et coll 1996).

Cette première étude sur l'immunité locale n'ouvre pas de piste particulière pour interpréter la protection exercée par certains amidons résistants sur les petites tumeurs.
Deux hypothèses sont à examiner :
- Le mécanisme est indépendant de la stimulation de l'immunité locale (butyrate)
- Les paramètres de l'immunité locale qui interviennent sont différents de ceux que nous avons examinés, ce qui reste possible puisque ces amidons ont un impact sur l'immunité systémique qui est très vraisemblablement le reflet d'une action locale. Ce pourrait être alors la conséquence d'effets prébiotiques différenciés des différents types de glucides indigestibles (Silvi et coll 1999).
Toutefois, pour aborder l'étude des mécanismes mis en jeu lors de ces interactions lympho-épithéliales au cours de la carcinogenèse spontanée de la souris *Min*, il est indispensable de mettre en place un sytème de modélisation *in vitro* de ces interactions.

III- MISE EN PLACE D'UN MODELE D'ETUDE *IN-VITRO*:

1) Etablissement de lignées de cellules épithéliales coliques

Il existe, pour les études *in-vitro* des propriétés des cellules coliques, plusieurs possibilités. La plus répandue est l'utilisation de lignées établies à partir d'adénocarcinomes du côlon ou du rectum. De nombreuses lignées de ce type sont disponibles chez l'Homme, mais elles sont très rares chez la souris. Ces lignées sont de plus mal adaptées à l'étude des phases précoces de la cancérogenèse et à celle de la fonctionnalité des cellules saines.
L'établissement de primo-cultures est une approche alternative qui permet de contourner cette difficulté. Malheureusement et comme c'est souvent le cas pour les cellules épithéliales, ces cellules se maintiennent très mal en culture quel que soit le mode de récupération (par digestion enzymatique (Gibson et coll 1989) ou grâce à des agents chélateurs de calcium

(Whitehead et coll 1987)) et le support de culture utilisé. Quelques cas de culture à long terme à partir de cellules d'intestin grêle normal sélectionnées par cylindre de clonage ont été rapporté chez les rongeurs mais on peut suspecter qu'il s'agit de cas d'immortalisation spontanée qui se produit avec une fréquence de 10^{-5} à 10^{-6} (Deveney et coll 1996). En outre, ces cellules présentent peu de marqueurs de différenciation associés à l'épithélium intestinal.
Le maintien de réelles cellules normales en culture étant très difficile, plusieurs procédés d'immortalisation de cellules intestinales ont été mis au point. L'immortalisation consiste au transfert par transfection d'un gène immortalisant, principalement l' antigène T du virus 40 de singe (AgT SV40) dans des cellules normales (Emami et coll 1989). Mais cette technique présente beaucoup de contraintes techniques qui restreignent son utilisation. En premier lieu, il faut un grand nombre de cellules pour que quelques-unes intègrent le gène de façon stable et dans une situation favorable pour son expression. En second lieu, un même type cellulaire peut présenter *in-vitro* des caractéristiques différentes suivant le site d'intégration. En tout état de cause, l'introduction d'un gène immortalisant va perturber la physiologie normale de la cellule du fait d'une multiplication cellulaire en continu. Ces difficultés peuvent être surmontées par le transfert d'un gène conditionnellement immortalisant, par exemple une version thermolabile de l'antigène T du virus 40 de singe (Quaroni et coll 1997), ce qui permet d'obtenir des cellules immortalisées à la température permissive, mais capable de différenciation lorsque l'antigène T est inactivé. Mais cette solution n'élimine pas les problèmes liés au transfert et au site d'intégration du gène. Par contre, l'établissement de souris transgéniques pour un variant thermosensible de l'antigène T réalisé par le groupe de Whithehead R.H allie les avantages de la souris transgénique (site d'intégration unique) à ceux de la conditionnalité de l'immortalisation (Withehead et coll 1993). Pour obtenir cette souris, ils ont intégré tsA 58 sous le contrôle du promoteur du CMH I H-$2K^b$ (interféron γ inductible) dans un ovocyte de souris CBA/Ca x C57 BL/10. La lignée de souris transgéniques ainsi obtenue à été nommée H-$2K^b$-tsA58 et est désormais commercialisées sous la dénomination d'"Immortomouse". L'immortalisation des cellules isolées à partir de cette lignée de souris est donc à la fois sous contrôle de la température et de l'interféron γ. Ils établissent à partir de cette souris une lignée épithéliale colique conditionnellement immortalisée qui réexprime les marqueurs de différenciation (enzymes de la bordure en brosse) une fois l'antigène T inactivé. D'autres lignées de cellules épithéliales issues de l'intestin et du thymus ainsi qu'une lignée de fibroblastes isolés de la peau sont également établies. Enfin, en croisant cette lignée de souris avec les souris *Min*, Whitehead a de la même manière obtenu une lignée de cellules épithéliales coliques mutées pour *Apc* (Whitehead et coll 1994).

Nous avons choisi d'appliquer cette technique pour obtenir notre modèle cellulaire, puisqu'elle permet d'établir des lignées de cellules épithéliales mutées ou non pour *Apc* capables de différenciation *in vitro*. Ceci nous rapprochera, à la température non permissive et sans interféron γ, de la situation *in vivo*.
Toutefois, nous avons choisi d'apporter quelques modifications à cette technique.

Pour isoler les cellules épithéliales Whitehead et coll (1993 et 1994) utilisent un chélateur de calcium (EDTA). Nous avons choisi la dissociation par un cocktail enzymatique (collagénase + dispase) qui favorise considérablement l'attachement et la croissance des cellules *in vitro* (Evans et coll 1992).
Pour
l'é0ff00ff0000fffd0003ff0000fffd0000fffd0000ffcc0036cf0021ff0000ff0000ffff0000ff0000ff0000ff00ff0000ff00ff0000ff0000ff0000fffffc0003ff0000fffe0000fffd0000ffcb0039f800faffdf0012ff0000ff00ff0000ff00ff0000ff0000ff0000feff0100fffe00feff0400ff0000fffd0006ff0000ff0000fffb0000ffcc003cf70003ff0000ffdd0010ff0000ff00ff0000ff00ff0000ff0000fffd0002ff00fffc0005ff00ff0000fffd0005ff0000ff00fffd0003ff0000ffcc003df60002ff00ffdc0001fffffe0004ffff0000fffe0001fffffe0004ffff0000fffe0001fffffe0001fffffe0006ff0000ffff0000fdff03de trois mois, nous pourrons isoler à partir d'adénocarcinomes des cellules épithéliales tumorales. Ce qui nous permettra d'avoir à notre disposition un modèle cellulaire complet : cellule saine, cellule mutée pour *Apc* et cellule tumorale au fond génétique identique. Le caractère épithélial des lignées est établi par un marquage dirigé contre la cytokératine 18 et l'expression des enzymes de la bordure en brosse sera vérifiée (Phosphatase alcaline et Dipeptidyl peptidase IV). De plus, pour favoriser la différenciation des cellules dans les conditions non permissives, ces cellules seront cultivées sur filtre collagène, technique qui favorise la polarisation cellulaire.

2) Matériels et méthodes :

Souris :
Souris C57BL/6 et souris *Min* sont fournies par Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, US).
Immortomouse fournie par Charles River (St-Aubin-les-Elbeuf, France).

Etablissement des primo-cultures de cellules épithéliales coliques:
La technique utilisée s'inspire des travaux de Evans et coll (1992) pour purifier des cellules épithéliales d'intestin de rat nouveau-né. Les cryptes et cellules sont isolées à partir de côlon de souris F1 de trois semaines. Le côlon est ouvert longitudinalement et lavé trois fois dans du PBS + 1% P/S par agitation forte dans des tubes de 15 ml. Il est ensuite coupé en segments de 2 à 3 cm de long, ces morceaux sont à nouveau lavés trois fois dans du PBS + 1% P/S. Le tissu est ensuite transféré dans une boîte de Pétri pour y être découpé à l'aide d'une lame de scalpel en morceaux inférieurs à 1 mm^3. Le côlon ainsi dilacéré est transféré dans 5ml de RPMI (Gibco, Grand Island, NY) contenant 0,1 mg/ml de dispase type I (Boehringer Mannheim, Meylan) et 300 U/ml de collagénase type XI (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO) et incubé 30 mn à 37°C sous agitation forte. La dissociation enzymatique est terminée par une dissociation mécanique: environ 100 pipettages avec une pipette de 5 ml. Le produit de la dissociation est laissé sédimenter 1 mn pour éliminer les débris. Les étapes de la dissociation

mécanique et de la sédimentation sont répétées deux fois sur les débris récupérés. Les surnageants obtenus après les trois sédimentations sont poolés et centrifugés à basse vitesse pendant 2 mn. Le surnageant est éliminé et le culot est repris dans 10 ml de RPMI + 2,5 % de SVF. La centrifugation est répétée 5 à 6 fois jusqu'à l'obtention d'un culot bien défini.
Les cryptes et cellules ainsi isolées sont ensemencées en puits (plaque 24 puits) "coatés" au collagène de type I de queue de rat (Institut Jacques Boy S.A., Reims) dans 300 µl de RPMI + 2,5% SVF + 1% P/S + 1% glutamine supplémenté de 10 unités/ml d'interféron γ (Boehringer Mannheim, Meylan) et de 10 ng/ ml de facteur de croissance épidermique (EGF) (Boehringer Mannheim, Meylan). La moitié du milieu est renouvelée tous les trois jours jusqu'au départ de la croissance.
Une fois à confluence, les cellules sont repiquées au tiers à l'aide de trypsine-EDTA (Gibco, Grand Island, NY).

Vérification du caractère épithélial des primocultures:
Le caractère épithélial des lignées est mis en évidence par un marquage immunocytofluorimétrique anti-cytokératine 18. Les cellules sont maintenues en culture jusqu'à confluence. Elles sont ensuite décollées à la trypsine et fixées au foramldéhyde 4% pendant une heure à 4°C. Une fois perméabilisées à la saponine en plaque 96 puits, elles sont marquées avec l'anticorps monoclonal anti-cytokératine18: clone Ks 18.04 (Progen Biotechnik GMBH, D). Un deuxième anticorps dirigé contre IgG de souris couplé à la FITC (Anti-Mouse IgG FITC Conjugate / Sigma, St Louis MO) permet la mise en évidence du marquage sous microscope à fluorescence ou par cytométrie en flux (FACScan Becton Dickinson, San Jose, CA) avec le logiciel d'analyse CELLQuest (Becton Dickinson, San Jose, CA).
Le contrôle positif du marquage a été réalisé sur des cellules CMT-93 qui sont des cellules épithéliales de carcinome de rectum de souris C57Bl/1CRF (EACACC n° 89111413).

Vérification de l'immortalisation conditionnelle:
Pour mettre en évidence le caractère conditionnel de l'immortalisation, les lignées établies sont tout d'abord cultivées en condition permissive pour permettre l'attachement. Ensuite, deux lots de cellules sont maintenus soit en condition permissive (33°C + interferon γ) soit en condition non permissive (37°C - inetrféron γ) pendant 7 jours pour suivre les différences de croissance.

Mise en évidence des activités enzymatiques associées à la bordure en brosse :
Les mesures d'activité des enzymes de la bordure en brosse, PAL (Phophatase alcaline) et DPPIV (DiPeptidyl Peptidase IV) sont effectuées par dosage colorimétrique au spectrophotomètre à 405 nm du para nitro phénol ou de la para nitro aniline libérés par

hydrolyse du para nitro phenyl phosphate ou de Gly-Pro para-nitroanilide en milieu basique. Les cellules cultivées à 33°C sont lysées avant le dosage.

Test PCR pour l'antigène T et la mutation *Apc*:

Pour chaque lignée, deux tests PCR sont effectués pour détecter la présence de l'Ag T et mettre en évidence la mutation *Min*. Les oligonucléotides utilisés pour tester la présence de l'Ag T thermolabile (SV+ 5'-CCTGGAATAGTCACCATG-3'; SV- 5'-CAATGCCTGTTTCATGCC-3') permettent l'amplification d'un fragment de 424 pb en présence du gène. Pour le test *Min*, les amorces utilisées (Apc+ 5'-GCCATCCCTTCACGTTAG-3'; Apc MT spécifique de la mutation 5'-TTCTGAGAAAGACAGAAGTT**A**-3'; Apc- 5'-TTCCACTTTGGCATAAGGC-3' pour mettre en évidence la mutation non-sens permettent l'amplification d'un fragment de 313 pb en cas de mutation et grâce à un témoin interne l'amplification d'un fragment de 619 pb que l'ADN soit muté ou non.

3) Résultats :

Obtention et caractérisation des lignées cellulaires :

Actuellement, nous avons établi trois lignées de cellules épithéliales saines à partir des souris F1 issues des croisements C57BL/6 x H-2K^b-tsA58 et une lignée de cellules épithéliales mutées à partir d'un croisement *Min* x H-2K^b-tsA58 (cf figure 20). L'établissement de lignées tumorales est en cours.

Figure 20:**A**, Monocouche de cellules épithéliales immortalisées +/+ après 3 mois de culture.
B, Monocouche de cellules épithéliales *Min*/+ après 2 mois de culture.
(grossissement x 40)

Avec la technique de dissociation enzymatique, plusieurs types cellulaires contaminent les cellules épithéliales. Les cellules contaminantes représentent environ 10% de la totalité et sont principalement des fibroblastes. L'avantage de croissance des fibroblaste exige leur élimination rapide. Plusieurs solutions ont été testées pour éliminer les fibroblastes. La plus simple est la plus efficace, il s'agit d'un simple grattage sous microscope, préservant les îlots de cellules épithéliales, effectué très tôt et suivi d'un lavage doux.

Quatre lignées sont marquées avec l'anticorps anti-cytokératine 18, marquage cytoplasmique filamenteux caractéristique du réseau des cytokératines (cf figure 21), mettant bien en évidence leur caractère épithélial. Whitehead et coll avaient obtenu un marquage de 10% des

cellules non mutées (1993), nous avons un marquage positif allant de 30% des cellules jusqu'à 90% pour la lignée mutée, ce qui traduit sans doute un statut de différenciation supérieur pour cette dernière.

A

B

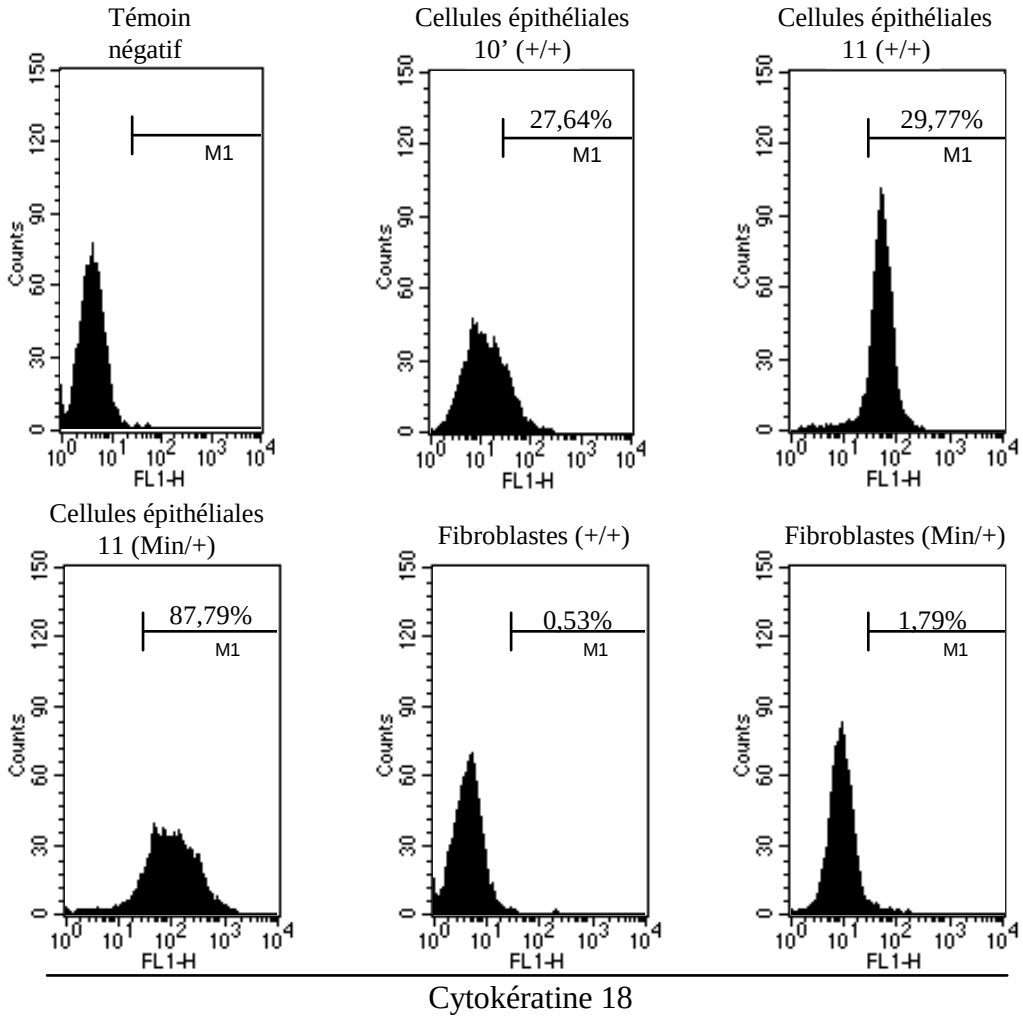


Figure 21: Marquage des cellules épithéliales immortalisées +/+ avec l'anticorps monoclonal anti-cytokératine 18 (clone Ks 18.04) **A**: analyse en microscopie à fluorescence avec un marquage des fibres de cytokératine dans le cytoplasme (grossissement x40). **B** Analyse par cytométrie en flux.

Les trois enzymes associées à la bordure en brosse ont été détectées dans les trois lignées saines. Toutefois, les tests d'activité pour la DPP IV et phosphatase alkaline ont mis en évidence des différences entre ces trois lignées (cf tableau 10). Deux de ces lignées (n°10 et 10') présentent une forte expression de PAL associée à une faible expression de DPP IV alors que la troisième (n°11) va présenter à l'inverse une activité PAL plus faible et DPP IV plus forte (cf tableau 10). Ceci rapproche les lignées n° 10 et 10' d'un phénotype entérocytaire et la lignée 11 d'un phénotype plus colique. Ce résultat est sensiblement différent de celui obtenu

par Whitehead et coll (1994) qui n'avaient obtenu que des lignées phénotypiquement immatures.

	Type cellulaire	PAL (10^{-4} mmol/mn/mg)	DPPIV (10^{-5} mmol/mn/mg)
	Fibroblastes	4,49	-
"Phénotypes entérocytaire"	Primo 10	257	2,6
	Primo 10'	220	2,2
"Phénotype colique"	Primo 11	46,9	3,04

Tableau 10: Mesure des activités enzymatiques associées à la bordure en brosse phosphatase alkaline (PAL), dipeptidyle peptidase IV (DPPIV) dans les primocultures épithéliales et une lignée de fibroblastes immortalisés.

Le caractère conditionnel de l'immortalisation a été vérifié par une croissance en condition non permissive qui aboutit en dix jours au détachement puis à la mort de la quasi totalité des cellules (cf figure 22), ce qui confirme que ces cellules ont gardé un phénotype de cellule normale. En parallèle ces cellules cultivées en condition permissive croissent jusqu'à confluence pouvant subir de très nombreux passages (elles ont été ainsi maintenues plus de trois mois).

Figure 22: Cellules épithéliales immortalisées après 10 jours de culture à 37°C. Seules peu de cellules de la monocouche confluente initiale ont survécu.

Pour toutes les lignées obtenues, épithéliales et fibroblastiques, la PCR a permis de mettre en évidence le gène codant pour l'Ag T thermolabile, confirmant l'immortalisation conditionnelle de ces cellules. De la même manière, la présence de l'allèle muté de *Apc* a été vérifiée par PCR pour la primo-culture issue des souris F1 *Min* x H-2K^{b}-tsA58 dont sont issues une lignée épithéliale et une lignée fibroblastique. Cette PCR a permis aussi la confirmation du caractère sauvage des lignées 10, 10' et 11 pour *Apc*. (cf figure 23)

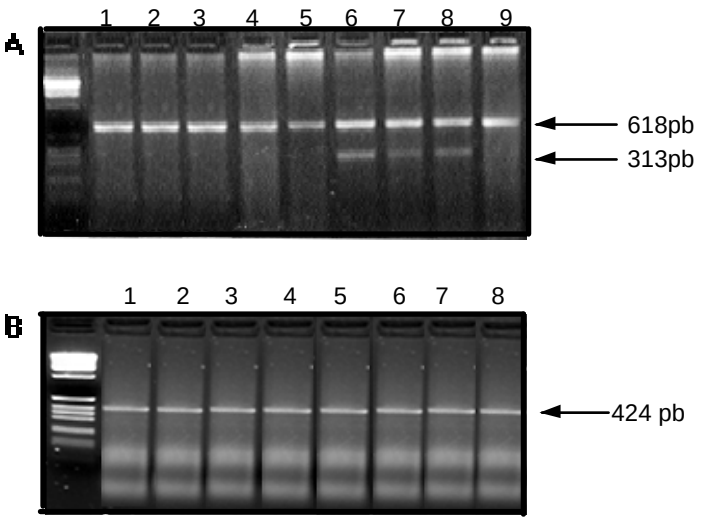


Figure 23: Produits de PCR des primocultures dérivées des souris F1 Immortomouse / C57Bl6 et Immortomouse / *Min* . **A**, La mutation *Min* est mise en évidence par amplification de deux fragments de 618 pb et 313 pb alors que la forme sauvage de *Apc* engendre l'amplification du seul fragment de 618 pb. Lignes 1, 2 et 3: produits de PCR des primocultures épithéliales immortalisées +/+. Lignes 4 et 5: produits de PCR obtenus à partir des lignées de fibroblastes +/+. Ligne 6: amplification à partir des lignées de cellules épithéliales *Min*/+. Ligne 7: amplification à partir des lignées de fibroblastes *Min*/+. Lignes 8 et 9: témoin positif *Min*/+ et +/+. **B**, L'antigène T de SV40 est mis en évidence par amplification d'un fragment de 424 pb. Lignes 1 à 4: produits de PCR obtenus à partir des primocultures épithéliales. Lignes 5 à 7 : amplification à partir des fibroblastes immortalisés. Ligne 8: témoin positif obtenu à partir de l'ADN extrait de côlon de souris Immortomouse.

Enfin, la technique d'isolation par cocktail enzymatique ne permettant pas d'obtenir des cellules épithéliales exemptes de cellules mésenchymateuses, nous avons établi simultanément des lignées de fibroblastes colique issus des souris mutées ou non pour *Apc*. Ces fibroblastes pourront être utilisés ultérieurement pour des co-cultures avec les cellules épithéliales.

4) Perspectives *in vitro*

Le système de co-culture, que j'ai commencé à mettre en place a été adapté de la technique developpée par Kerneis et coll (1997) pour modéliser les plaques de Peyer. Des cellules épithéliales (Caco-2) sont déposées sur la surface inférieure d'un filtre (4 µm de pore) sur lequel elles adhèrent, croissent et se différencient. Au bout de 14 jours, celui-ci est retourné et les lymphocytes isolés de plaques de Peyer sont déposés sur la surface supérieure. Ce système permet d'obtenir deux compartiments: un compartiment inférieur qui mime la lumière intestinale et un compartiment supérieur qui représente la plaque de Peyer. Nous avons décidé d'adapter ce système pour étudier les interactions cellules épithéliales-lymphocytes intra-épithéliaux (cf Fig 24). La culture sur filtre favorise la différenciation des cellules épithéliales intestinales issues de primo-cultures, qui par définition peu différenciées puisqu'elles dérivent des cellules souches des cryptes (Whitehead et coll 1993). Ce système devrait aussi favoriser la migration de lymphocytes et leur insertion entre les cellules épithéliales.

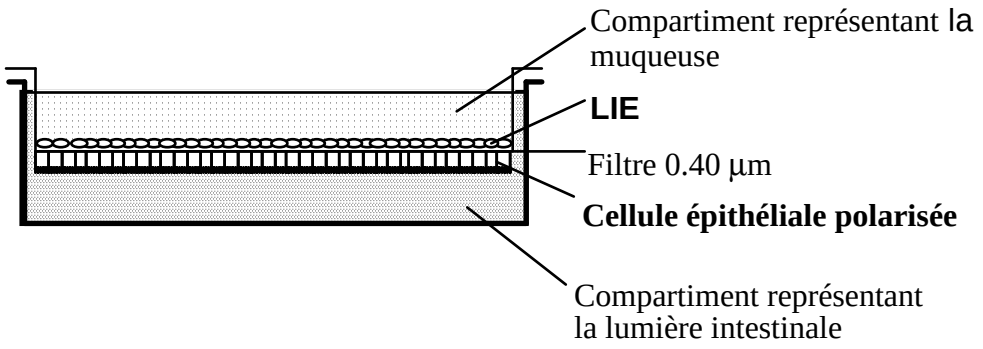


Figure 24: Représentation schématique du système de co-culture sur filtre

L'établissement des lignées épithéliales coliques normales et mutées ainsi que la modélisation *in vitro* des interactions lympho-épithéliales, devraient permettre d'apporter des réponses aux questions soulevées par nos expérimentations réalisées *in vivo* et *ex vivo*.
Ce modèle nous permettra de documenter les conséquences de la mutation *Apc* sur les interactions lympho-épithéliales, puis l'impact des glucides indigestibles et de leurs dérivés sur ces interactions.

Influence des modifications du phénotype LIE par les glucides indigestibles *in vivo* sur leurs intéractions *in vitro* avec les cellules épithéliales dans le contexte Apc

Quatre types de combinaisons sont d'ores et dejà réalisables: cellules épithéliales mutées ou non sur *Apc* avec des LIE provenant de souris alimentées avec un régime pauvre ou enrichi en fibres.
L' analyse de la production de facteurs solubles d'intérêt est possible dans chacun des deux compartiments. Dans le compartiment lymphocytaire, on pense à la discrimination réponse Th1 versus Th2, à l'interleukine 4 capable d'inhiber l'expression du récepteur à l'IL2 et à l'interféron gamma deux cytokines constitutionnellement exprimées par les LIE. Dans le compartiment épithélial, pourraient être suivies la production d'IL-15, stimulateur des LIE et de TGF β immunosuppresseur.
L'étude des molécules de surface impliquées dans les interactions cellulaires hétérotypiques est aisée pour les LIE (analyse par cytométrie de flux) mais plus problématique pour les cellules épithéliales (western blot ou ARN messagers). Dans ce contexte, les molécules d'adhésion de type intégrines (CD 103 et CD11a), le récepteur à l'IL2, la voie d'activation alternative CD2/CD58, et la présentation antigènique par CD1d sont des molécules dont l'expression est à explorer.
Enfin la cytotoxicité réciproque des deux types cellulaires est à explorer, en particulier l'apoptose par la voie FAS- FAS Ligand.

Action du butyrate et/ou d'extraits bactériens *in vitro* sur les interactions lympho-épithéliales dans le contexte Apc.

- Conséquences de la mutation du gène *Apc* sur la sensibilité au butyrate des cellules épithéliales coliques.

Le butyrate est un agent de régulation des processus de prolifération, différenciation, apoptose. La mutation *Apc* a des conséquences sur la prolifération qui pourraient être compensées par le butyrate capable de favoriser l'expression de p21 qui bloque le cycle cellulaire (en agissant sur l'acetylation des histones) (Archer et coll 1999).

La protéine c-Myc qui stimule la prolifération cellulaire est une cible de l'inactivation d'*Apc* et son expression est très fréquemment perturbée dès les stades précoces de la cancérogenèse colique (Sundaressan et coll 1987). Là encore le butyrate pourrait être un agent compensateur puisqu'il inhibe l'expression de c-Myc (Tichonicky et coll 1990; Bassonet coll 1998; Cuisset et coll 1997).

- Butyrate ef interactions lympho-épithéliales dans le contexte Apc

La dérégulation de c-Myc (modulable par le butyrate) s'accompagne aussi d'une sensibilisation à l'apoptose par la voie FAS (CD95) (Hueber et coll 1997) alors que la voie FAS/FAS-L intervient dans la cytotoxicité des LIE (Morimoto 1999).

- Bactéries lactiques et immunité anticancéreuse

Certains glucides indigestibles, en particulier les FOS , stimulent la croissance de bactéries productrices d'acide lactique dans le côlon (Bifidobactéries et lactobacilles en particulier). Ces bactéries sont de puissants agents stimulateurs de l'immunité locale. Les conséquences de cette stimulation sur l'immunité anti tumorale sont assez mal documentées, mais certaines pistes ont été ouvertes (Goldin et coll 1980; Perdigon et coll 1998). S'il n'est pas envisageable d'introduire des bactéries anaérobies vivantes dans les co-cultures, il est par contre possible d'utiliser des extraits bactériens.

CONCLUSIONS GENERALES

CONCLUSIONS

L’ensemble des données épidémiologiques disponibles laisse entrevoir la possibilité de la mise en place d’une stratégie de prévention primaire du cancer colique par modification du régime alimentaire, ou l'utilisation d'agents anti-inflammatoires non stéroïdiens. A l’heure actuelle, les seules recommandations officielles concernent une augmentation de la consommation de fruits et légumes et une diminution de la consommation de viande et graisses animales, régime déjà clairement associé à une baisse de l'incidence des maladies cardio vasculaires.

Les fibres alimentaires ou glucides indigestibles restent une piste mais la nature chimique et le mécanisme d'action des agents protecteurs que pourraient contenir les fruits et légumes ne sont pas identifiés.

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à des glucides indigestibles fermentés par la flore bactérienne dans le côlon , dont nous avons testé l'efficacité dans un modèle génétique de cancérogénèse intestinale chez la souris.

Dans ce modèle, c'est une mutation sur l'analogue murin du gène *APC* qui entraîne l'apparition de tumeurs dans l'intestin. Ce gène est très fréquemment et très précocément muté dans les formes héréditaires de cancers coliques chez l'Homme (c'est la cause du syndrome de polypose adénomateuse familiale) mais aussi dans les cancers sporadiques.

Plutôt que d'utiliser des aliments très hétérogènes, nous avons testé des produits chimiquement définis en collaboration avec des centres de recherche de l'industrie agro-alimentaire et nos partenaires INRA du Centre de Recherche en Nutrition Humaine de Nantes, spécialistes des glucides alimentaires.

Trois aliments très fermentescibles réduisent l'incidence des tumeurs dans le côlon, les fructo-oligosaccharides à chaîne courte qui diminuent le nombre de tumeurs quelle qu'en soit la taille et deux amidons résistants qui réduisent le nombre de petites tumeurs seulement.

Le caractère fermentescible des aliments protecteurs et le fait que la protection soit limitée au côlon semblent impliquer le processus de fermentation et/ou la flore.

La réduction du nombre total de tumeurs par l'aliment FOS est associée à une stimulation non spécifique du système immunitaire local, suggérant une implication de ce dernier dans le mécanisme. La cause de cette amplification n'a pas été identifiée, mais ce pourrait être la croissance de bactéries lactiques (effet probiotique), agents stimulateurs naturels de l'immunité locale.

Une déplétion des lymphocytes T CD4+ et CD8+ de souris *Min* alimentées en FOS entraîne le doublement du nombre de tumeurs par rapport aux souris immunocompétentes apportant un argument majeur pour l'intervention du système immunitaire dans le mécanisme de protection.

L'addition de bifidobactéries à l'un des deux amidons résistants protecteurs diminue le nombre de petites tumeurs, mais augmente celui des grosses et semble stimuler leur vascularisation.
L'ensemble de ces résultats montre que la manipulation de l'écosystème colique par une supplémentation du régime alimentaire en glucides indigestibles, interfère avec la cancérogénèse colique et que le système immunitaire est impliqué au moins parfois dans cette interférence.
Puisque les lymphocytes intra-épithéliaux sont au contact direct des cellules épithéliales et participent à l'homéostasie cellulaire dans ce compartiment tissulaire, nous avons exploré in vivo l'impact de telles supplémentations sur leur phénotype dans le contexte Apc muté de la souris *Min*. La supplémentation en FOS se traduit par une baisse statistiquement significative de l'expression du récepteur à l'interleukine 2 (sous-unité α : CD25) qui pourrait être impliqué dans le contrôle de la population lymphocytaire (balance prolifération/apoptose).
Pour étudier les conséquences de telles modulations phénotypiques sur les interactions lympho-épithéliales dans le contexte Apc muté de la pré-cancérogénèse colique, j'ai développé une modélisation *in vitro*. J'ai établi des lignées cellulaires épithéliales conditionnellement immortalisables porteuses ou non de la mutation *Apc* et testé la faisabilité d'un système de co-culture sur filtre avec compartimentation pour l'étude de leurs interactions avec différents phénotypes de lymphocytes intra-épithéliaux.
La piste des fructo-oligosaccharides à chaîne courte et de certains amidons résistants en prévention primaire est ouverte et suggère des études d'intervention chez l'Homme. Pour ces études, la prise en compte d'un monitoring immunologique semble s'imposer, compte-tenu de l'impact de ces aliments sur l'immunité locale, de l'importance du système immunitaire intestinal dans l'immunité en général, et des conséquences sur la réponse à la cancérogenèse.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A.

Abreu-Martin MT and Targan SR. Regulation of immune responses of the intestinal mucosa. Crit Rev Immunol. 1996; 16: 277-309.

Alberts DS, Ritenbaugh C, Story JA, Aickin M, Rees-McGee S, Buller MK, et al. Randornized, double-blinded, placebo-controlled study of effect of wheat bran fiber and calcium on fecal bile acids in patients with resected adenomatous colon polyps. J Natl Cancer Inst 1996; 88: 81-92.

Alles MS, Hartemink R, Meyboom S, Harryvan JK, Van Laere KMJ, Nagengast FM and Hautvast JG.Effect of transgalactooligosaccharides on the composition of the human intestinal microflora and on putative risk markers for colon cancer. Am J Cli Nut. 1999; 69: 980-991.

Archer MC, Bruce WR, Chan CC, Corpet DE, Medline A, Roncucci L, Stamp D, Zhang XM. Aberrant crypt foci and microadenoma as markers for colon cancer. Environ Health Perspect 1992; 98: 195-197.

Archer SY, Hodin RA. Histone acetylation and cancer. Curr Opin Genet Dev 1999; 9: 171-174.

Atkin W, Cuzick J, Nor-tover JMA, Whynes D. Prevention of colorectal cancer by once only sigmoidoscopy. Lancet 1993; 341: 736-740.

Atkin WS, Morson BC, Cuzick J. Long-term risk of colorectal cancer after excision of rectosigmoid adenomas. N Engl J Med 1992; 326: 658-662.

B.

Baba S, Otha A, Ohtsuki M, Takizawa T, Adachi T, Hara H. Fructooligosacharides stimulate the absortption of magnesium from the hingut in rats. Nut Res. 1996; 16: 657-666.

Baeg GH, Matsumine A, Kuroda T, Bhattacharjee RN, Miyashiro I, Toyoshima K, Akiyama T. The tumor suppressor gene product APC blocks cell cycle progression from G0/G1 to S phase. EMBO J. 1995; 14: 5618-5625.

Baricault L, Denariaz G, Houri JJ, Bouley C, Sapin C and Trugnan G. Use of HT-29 cultured human colon cancer cell line, to study the effect of fermented milks on colon cancer growth and differentiation. Carcinogenesis. 1995; 16: 245-252.

Barnes CJ, Lee M. Chemoprevention of spontaneous intestinal adenomas in the adenomatous polyposis coli *Min* mouse model with aspirin. Gastroenterology 1998; 114: 873-877.

Barnes CJ, Lee M. Determination of an optimal dosing regimen for aspirin chemoprevention of 1,2-dimethylhydrazine-induced colon tumours in rats. Br J Cancer 1999; 79: 1646-1650.

Basson MD, Emenaker NJ, Hong F. Differential modulation of human (Caco-2) colon cancer cell line phenotype by short chain fatty acids. Proc Soc Exp Biol Med 1998 ; 217: 476-483.

Beagley KW, Fujihashi K, Lagoo AS, Lagoo-Deenadaylan S, Black CA, Murray AM, Sharmanov AT, Yamamoto M, McGhee JR, Elson CO, Kiyono H. Differences in intraepithelial lymphocyte T cell subsets isolated from murine small versus large intestine. J Immunol 1995; 154: 5611-5619.

Beagley KW, Husband AJ. Intraepithelial lymphocytes: origins, distribution, and function. Crit Rev Immunol 1998; 18: 237-254.

Bedenne L, Faivre J, Boutron MC, Piard F, Cauvin JM, Hillon P. Adenoma-carcinoma sequence or "de novo" carcinogenesis. Cancer 1992; 69: 883-888.

Bonneton C, Larue L, Thiery JP. The *APC* gene product and colorectal carcinogenesis. C R Acad Sci III 1996; 319: 861-869.

Boolbol SK, Dannenberg AJ, Chadburn A, Martucci C, Guo XJ, Ramonetti JT, Abreu-Goris M, Newmark HL, Lipkin ML, DeCosse JJ, Bertagnolli MM. Cyclooxygenase-2 overexpression and tumor formation are blocked by sulindac in a murine model of familial adenomatous polyposis. Cancer Res 1996; 56: 2556-2560.

Bouhnik Y, Flourie B, Riottot M, Bisetti N, Gailing MF, Guibert A, Bornet F, Rambaud JC. Effects of fructo-oligosaccharides ingestion on fecal bifidobacteria and selected metabolic indexes of colon carcinogenesis in healthy humans. Nutr Cancer 1996; 26: 21-29.

Bostick RM, Potter JD, Sellers TA, McKenzie DR, Kushi LH, Folsom AR. Relation of calcium, vitamin D, and dairy food intake to incidence of colon cancer among older women. The Iowa Women's Health Study. Am J Epidemiol 1993a; 137: 1302-1317.

Bostick RM, Potter JD, Mckenzie DR, et al. Reduced risk of colon cancer with high intake of vitamin E : The Iowa women's health study. Cancer Res 1993b; 53: 4230-4237.

Bostick RM, Potter JD, Kushi LH, et al. Sugar, meat, and fat intake, and non-dietary risk factors for colon cancer incidence in Iowa women (United States). Cancer Causes Control 1994; 5: 38-52.

Boutron MC, Faivre J, Dop MC, Quipourt V, Senesse P. Tobacco, alcohol and colorectal tumors : a multistep process. Am J Epidemiol 1995; 141: 1038-1046.

Boutron MC, Faivre J, Marteau P, Couillault C, Senesse P, Quipourt V. Calcium, phosphorus, vitamin D, dairy products and colorectal carcinogenesis : a French casecontrol study. Br J Cancer 1996; 74: 145-151.

Boyle P, Kevi R, Lucchuni F, La Vecchia C. Trends in diet-related cancers in Japan : a conundrum ? Lancet 1993; 342: 752.

Breuer-Katschinski B, Nemes K, Rump B, et al. NSAIDs intake and the risk of colorectal adenoma. Gastroenterology 1996; 110:A 1171.

Bunyan DJ, Shea-Simonds J, Reck AC, Finnis D, Eccles DM. Genotype-phenotype correlations of new causative *APC* gene mutations in patients with familial adenomatous polyposis. J Med Genet 1995 Sep; 32(9): 728-731.

Buyse M, Zeleniuch Jacquotte A, Chalmers TC. Adjuvant therapy of colorectal cancer. Why we still don't know. JAMA 1988; 259: 3571-3578.

Buzoni-Gatel D, Lepage AC, Dimier-Poisson IH, Bout DT, Kasper LH. Adoptive transfer of gut intraepithelial lymphocytes protects against murine infection with Toxoplasma gondii. J Immunol 1997; 158: 5883-5889.

C.

Cahill RJ, O'Sullivan KR, Mathias PM, Beattie S, Hamilton H, O'Morain C. Effects of vitamin anti-oxidant supplementation on cell kinetics of patients vàth adenomatous polyps. Gut 1993; 34: 963-967.

Camerini V, Panwala C, Kronenberg M. Regional specialization of the mucosal immune system. Intraepithelial lymphocytes of the large intestine have a different phenotype and function than those of the small intestine. J Immunol 1993; 151: 1765-1776.

Campbell JM, Fahey GCJ and Wolf BW. Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats. J Nut. 1997; 127: 130-136.

Carol M, Lambrechts A, Van Gossum A, Libin M, Goldman M, Mascart-Lemone F. Spontaneous secretion of interferon gamma and interleukin 4 by human intraepithelial and lamina propria gut lymphocytes. Gut 1998; 42: 643-649.

Carstensen B, Sol]-Johanning H, Villadsen E, Sondergaard JO, Lynge E. Familial aggregation of colorectal cancer in the general population. Int J Cancer 1996; 68: 428-435.

Cerf-Bensussan N, Jarry A, Brousse N, Lisowska-Grospierre B, Guy-Grand D, Griscelli C. A monoclonal antibody (HML-1) defining a novel membrane molecule present on human intestinal lymphocytes. Eur J Immunol 1987; 17: 1279-1285.

Cerf-Bensussan N, Cerf M, Guy-Grand D. Gut intraepithelial lymphocytes and gastrointestinal diseases. Current Opinion in Gastro. 1993; 9: 953-961.

Chadeneau C, LeCabellec M, LeMoullac B, Meflah K , Denis MG. Over-expression of a novel member of the immunoglobulin superfamily in *Min* mouse intestinal adenomas. Int. J. Cancer 1996; 68: 817-821.

Chiu CH, McEntee MF, Whelan J. Sulindac causes rapid regression of preexisting tumors in *Min*/+ mice independent of prostaglandin biosynthesis. Cancer Res 1997; 57: 4267-4273.

Colgan SP, Morales VM, Madara JL, Polischuk JE, Balk SP, Blumberg RS. IFN-gamma modulates CD1d surface expression on intestinal epithelia. Am J Physiol 1996; 271: C276-C283.

Conway PL. Selection criteria of probiotic microorganisms. Asia Pacific J Clin Nutr. 1996; 5: 10-14.

Crabbé PA, Nash DR, Bazin H, Eyssen H, Heremans JF. Immunohistochemical observations on lymphoid tissue from conventional and germ-free mice. Lab. Invest. 1970; 22: 448-457.

Cuisset L, Tichonicky L, Jaffray P, Delpech M. The effects of sodium butyrate on transcription are mediated through activation of a protein phosphatase. J Biol Chem 1997; 272: 24148-24153.

D.

Davidson MH, Maki KC, Synecki C, Torri SA and Drennan KB. Evaluatino of the influence of dietary inulin on serum lipids in adults with hypercholesterolemia. Nut Res. 1998; 18: 503-517.

Davidson NJ, Leach MW, Fort MM, Thompson-Snipes L, Kuhn R, Muller W, Berg DJ, Rennick DM. T helper cell 1-type CD4+ T cells, but not B cells, mediate colitis in interleukin 10-deficient mice. J Exp Med 1996; 184: 241-251.

Debinski HS, Trojan J, Nugent KP, Spigelman AD, Phillips RK. Effect of sulindac on small polyps in familial adenomatous polyposes. Lancet 1995; 345: 855-856.

Delzenne NM, Kok N, Fiordaliso MF, Deboyser DM, Goethals FM and Roberfroid MB. Dietary fructooligosaccharides modify lipid metabolism. Am J Cli Nut. 1993; 57 (S5): S820.
Deveney CW, Rand-Luby L, Rutten MJ, Luttropp CA, Fowler WM, Land J, Meichsner CL, Farahmand M, Sheppard BC, Crass RA, Deveney KE. Establishment of human colonic epithelial cells in long-term culture. J Surg Res 1996; 64: 161-169.

Devesa S, Blot W, Stone B, Miller B, Tarone R, Fraumeni J. Recent cancer trends in the United States. J Natl Cancer Inst 1995; 87: 175-182.

Dietrich WF, Lander ES, Smith JS, Moser AR, Gould KA, Luongo C, Borenstein N, Dove W. Genetic identification of *Mom-1*, a major modifier locus affecting *Min*-induced intestinal neoplasia in the mouse. Cell 1993; 75: 631-639.

Djouzi Z and Andrieux C. Compared effect of three oligosaccharies on metabolism of intestinal microflora in rats inoculated in rats with a human faecal flora. Br J Nut. 1997; 78: 313-324.

Dobbie Z, Müller H, Scott RJ. Secretory phospholipase A_2 does not appear to be associated with phenotypic variation in familial adenomatous polyposis. Hum Genet 1996; 98: 386-390.

Doherty PC, Knowles BB, Wettstein PJ. Immunological surveillance of tumors in the context of major histocompatibility complex restriction of T cell function. Adv Cancer Res 1984; 42: 1-65.

Dove WF, Clipson L, Gould KA, Luongo C, Marshall DJ, Moser AR, Newton MA, Jacoby RF. Intestinal neoplasia in *Apc Min* Mouse: independence from the microbial and Natural killer (beige locus) status. Cancer Res 1997; 57: 812-814.

Dudley ME, Sundberg JP, Roopenian DC. Frequency and histological appearance of adenomas in multiple intestinal neoplasia mice are unaffected by severe combined immunodeficiency (scid) mutation. Int. J. Cancer 1996; 65: 249-253.

E.

Ebert EC. Inhibitory effects of transforming growth factor-beta (TGF-beta) on certain functions of intraepithelial lymphocytes. Clin Exp Immunol 1999; 115: 415-420.

Ebert EC. Interleukin 15 is a potent stimulant of intraepithelial lymphocytes. Gastroenterology. 1998; 115:1 439-445.

Ekbom A, Helmick C, Zack M, Adami HO. Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. N Engl J Med 1990; 1228-1233.

Elder DJ. Halton DE. Hague A. Paraskeva C. Induction of apoptotic cell death in human colorectal carcinoma cell lines by a cyclooxygenase-2 (COX-2)-selective nonsteroidal anti-inflammatory drug: independence from COX-2 protein expression. Clinical Cancer Research. 1997; 3: 1679-1683.

Emami S, Mir L, Gespach C, Rosselin G. Transfection of fetal rat intestinal epithelial cells by viral oncogenes: establishment and characterization of the E1A-immortalized SLC-11 cell line. Proc Natl Acad Sci U S A 1989; 86: 3194-3198.

Emoto M, Emoto Y, Kaufmann SH. Development of CD8 alpha/beta + TCR alpha beta intestinal intraepithelial lymphocytes in athymic nu/nu mice and participation in regional immune responses. Immunology 1996; 88: 531-536.

Englyst HN, Trowell H, Southgate DA, Cummings JH. Dietary fiber and resistant starch. Am J Clin Nutr 1987; 46: 873-874.

Evans D, McMahon AD, McGilchrist MM. Non-steroidai anti-inflammatory drugs, aspirin and colorectal cancer: a record linkage case control study in Tayside, Scotland. Gastroenterology 1995; 114: A 608.

Evans GS, Flint N, Somers AS, Eyden B, Potten CS. The development of a method for the preparation of rat intestinal epithelial cell primary cultures. J Cell Sci 1992; 101: 219-231.

F.

Faivre J, Boutron MC, Senesse P, Couillault C, Belghiti C, Meny B. Environmental and familial risk factors in relation to the adenoma-carcinoma sequence : results of a casecontrol study in Burgundy (France). Eur J Cancer Prev 1997; 6: 127-131.

Fazeli A, Steen G, Dickinson SL, Bautista D, Dietrich WF, Bronson RT, Weinberg RA. Effects of p53 mutations on apoptosis in mouse intestinal and human colonic adenomas. PNAS USA. 1997; 16: 10199-10204.

Fiordaliso M, Kok N, Goethals F, Deoyser D, Roberfroid M and Delzenne N. Dietary oligofructose lowers triglycerides, phospholipids and cholesterol in serum and very low density lipoproteins of rats. Lipids. 1995; 30: 163-167.

Fodde R, Edelmann W, Yang K, van Leeuwen C, Carlson C, Renault B, Breukel C, Alt E, Lipkin M, Khan PM. A targeted chain-termination mutation in the mouse *Apc* gene results in multiple intestinal tumors. Proc Natl Acad Sci U S A 1994; 91: 8969-8973.

Framson PE, Cho DH, Lee LY, Herhberg RM. Polarized expression and function of the costimulatory molecule CD58 on human intestinal epithelial cells. Gastroenterology 1999; 116: 1054-1062.

Freudenheim JL, Graham S, Marshall JR, Haughey BP, Cholewinski S, Wilkinson G. Folate intake and carcinogenesis of the colon and rectum. Int J Epidemiol 1991; 20: 368-373.

Fuchs C S, Giovannucci E L, Colditz G A et al. Dietary fiber and the risk of colorectal cancer and adenoma in women. New Engl J Med 1999; 340: 169-177.

G.

Gann PH, Manson JE, Glynn RJ, Buring JE, Hennekens CH. Low-dose aspirin use and incidence of colorectal tumors in a randomized trial. J Natl Cancer Instit 1993; 85: 1120.

Garland C. Shekelle RB. Barrett-Connor E. Criqui MH. Rossof AH. Paul O. Dietary vitamin D and calcium and risk of colorectal cancer: a 19-year prospective study in men. Lancet 1985; 1: 307-309.

Gerhardsson de Verdier M, Hagman U, Peters RK et al. Meat, cooking methods and colorectal cancer: a case-referent study in Stockholm. Int J Cancer 1991; 49: 520-5.

Ghoshal K and Jacob ST. Specifiq inhibition of pre-ribosomal RNA processing in extracts from the lymphosarcoma cells treated with 5-fluorouracil. Cancer Res. 1994; 54: 632-636.

Giardiello FM, Hamilton SR, Krush AJ, Piantadosi S, Hylind LM, Celano P, Booker SV, Robinson CR, Offerhaus GJ. Treatment of colonic and rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis. N Engl J Med 1993; 328: 1313-1316.

Gibson PR, van de Pol E, Maxwell LE, Gabriel A, Doe WF. Isolation of colonic crypts that maintain structural and metabolic viability invitro. Gastroenterology 1989; 96: 283-291.

Gilbertsen VA. Proctosigmoidoscopy and polypectomy in reducing the incidence of rectal cancer. Cancer 1974; 64: 936-939.

Giovannucci E, Stampfer MJ, Colditz GA, et al. Folate, méthionine and alcohol intake and risk of colorectal adenoma. J Natl Cancer Inst 1993; 85: 875-884.

Giovannucci E. Insulin and colon cancer. Cancer Causes Control 1995a; 6: 164-179.

Giovannucci E, Ascherio A, Rimm EB, et al. Physical activity, obesity, and risk for colon cancer and adenoma in men. Ann Intern Med 1995b; 122: 327-334.

Giovanucci E, Egan KM, Hunter DJ, et al. Aspirin and the risk of colorectal cancer in women. N Engl J Med 1995c; 333: 609-614.

Giovannuci E. Meta-analyisi of coffee consumption and risk of colorectal cancer. Am J Epidemiol 1998; 147: 1043-1052.

Goldbohm RA, Van den Brandt PA, Van 't Veer P, Dorant E, Sturmans F, Hermus RJ. Prospective study on alcohol consumption and the risk of cancer of the colon and rectum in the Netherlands. Cancer Causes Control 1994 5: 95-104.

Goldin BR, Gorbach SL. Effect of Lactobacillus acidophilus dietary supplements on 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride-induced intestinal cancer in rats. J Natl Cancer Inst 1980; 64: 263-265.

Gorczynski RM, Chen Z, Cohen Z, Plapler H, Wojcik D. Phenotypic and functional assessment of intraepithelial lymphocytes (IEL) isolated from rat colon and small bowel. Immunol Lett 1996; 50: 131-137.

Gould KA, Dietrich WF, Borenstein N, Lander ES, Dove WF. *Mom1* is a semi-dominant modifier of intestinal adenoma size and multiplicity in *Min/* + mice. Genetics 1996a; 144: 1769-1776.

Gould KA, Dove WF. Action of *Min* and *Mom1* on neoplasia in ectopic instestinal grafts. Cell growth & differenciation 1996b; 7: 1361-1368.

Gould KA, Luongo C, Moser AR, McNeley MK, Borenstein N, Shedlovsky A, Dove WF, Hong K, Dietrich WF, Lander ES. Genetic evaluation of candidate genes for *Mom1* modifier of intestinal neoplasia in mice. Genetics 1996c; 144: 1777-1785.

Gould KA, Dove WF. Localized gene action controlling intestinal neoplasia in mice. PNAS USA 1997; 94: 5848-5853.

Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. Cancer Res 1994; 54: 4855-4878.

Grepithe M. Etude multicentrique prospective sur la détection des polypes et des cancers rectocoliques dans une population d'hospitalisés et de consultants. Gastroenterol Clin Biol 1981; 5: 58-66.

Gridley G, McLaughlin JK, Ekbom A, et al. Incidence of cancer among patients with rheumatoid arthritis. J Natl Cancer Instit 1993; 85: 307-310.

H.

Hague A, Butt AJ, Paraskeva C. The role of butyrate in human colonic epithelial cells: an energy source or inducer of differentiation and apoptosis? Proc Nutr Soc 1996; 55: 937-943.
Hardcastle JD, Chamberlain JO, Robinson ME, et al. Randomised controlled trial of faecal-occult-blood screening for colorectal cancer. Lancet 1996; 348: 1472-1477.

Harwig SS, Tan L, Qu XD, Cho Y, Eisehauer PB, Lehrer RI. Bactericidal properties of murine intestinal phospholipase A2. J Clin Invest 1995; 95: 603-610.

Hata Y, Hara T, Oikawa T, Yamamoto M, Hirose N, Nagashima T, Torhima N, Nakajima K, Watanabe A and Yamashita M. Geriatric Med. 1983; 21: 156-167.

Havenaar R. Probiotics: a general view. Wood ed The lactic acid bacteria in health and disease. London. Elsevier Applied Science. 1992: 209-224.

Hawks A, Swann PF, Magee PN. Probable methylation of nucleic acids of mouse colon by 1.2-dimethylhydrazine in vivo. Biochem Pharmacol 1971; 21: 432-435.

He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, Da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Identification of c-Myc as a target of a APC pathway. Science 1998; 281: 1509-1512.

Hidaka H, Eida T, Takizawa T, Tokunaga T and Tashiro Y. Effects of fructooligosaccharides on intestinal flora and human health. Bifid and Microflora. 1986; 5: 37-50.

Hioki K, Shivapurkar N, Oshima H, Alabaster O, Oshima M, Taketo MM. Suppression of intestinal polyp development by low-fat and high-fiber diet in *Apc*$^{\Delta 716}$ knockout mice.Carcinogenesis 1997; 188: 1863-1865.

Hirota C, Lida M, Matsumoto T, Fujishima M. Effect of inomethacin suppositories on rectal polyposis in patients with familial adenomatous polyposis. cancer. 1996; 78: 1660-1665.

Holt P R, Atillasoy E O, Gilaman J et al. Modulation of abnormal colonic epithelial cell proliferation and diffrenciation by low-fat daairy foods. JAMA 1998; 28: 1074-1079.

Hoover HC Jr, Brandhorst JS, Peters LC, Surdyke MG, Takeshita Y, Madariaga J et al. Adjuvant active specific immunotherapy for human colorectal cancer: 6.5-year median followup of a phase III prospectively randomized trial. J Clin Oncol 1993; 11: 390-399.

Howe G, Benito E, Castellato R, et al. Dietary intake of fiber and decreased risk of cancers of the colon and rectum: evidence from the combined analysis of 13 case-control studies. J Natl Cancer Inst 1992; 84: 1887-1896.

Hueber AO, Zornig M, Lyon D, Suda T, Nagata S, Evan GI. Requirement for the CD95 receptor-ligand pathway in c-Myc-induced apoptosis. Science 1997; 278: 1305-1309.

Hull MA, Booth JK, Tisbury A, Scott N, Bonifer C, Markham AF, Coletta PL. Cyclooxygenase 2 is up-regulated and localized to macrophages in the intestine of *Min* mice. Br J Cancer 1999; 79: 1399-1405.

I.

Ibraghimov AR, Lynch RG. Heterogeneity and biased T cell receptor alpha/beta repertoire of mucosal CD8+ cells from murine large intestine: implications for functional state. J Exp Med 1994; 180: 433-444.

Ishikawa H, Akedo I, Suzuki T, Narahara H, Otani T. Adverse effects of sulindac used for prevention of colorectal cancer. J Natl Cancer Inst 1997; 89: 1381.

Ito M, Kimura M, Deguchi Y, Miyamori-Watabe A, Yajima T and Kan T. Effects of transgalactosylated disaccharides on the human intestinal microflora and their metabolism. J Nut Sc Vitaminology. 1993; 39: 279-288.

J.

Jacoby RF, Marshall DJ, Newton MA, Novakovic K, Tutsch K, Cole CE, Lubet RA, Kelloff GJ, Verma A, Moser AR, Dove WF. Chemoprevention of spontaneous intestinal adenomas in the *Apc*^{Min} mouse model by nonsteroidal anti-inflammatory drug piroxicam. Cancer Research 1996; 56: 710-714.

K.

Kahlenberg MS. Stoler DL. Petrelli NJ. Rodriguez-Bigas M.Weber TK. Anderson GR. Absence of frequent involvement of modifier of *Min*(APC) in sporadic colorectal cancer. Annals of Surgical Oncology. 1998; 5: 181-185.

Kargman SL. O'Neill GP. Vickers PJ. Evans JF. Mancini JA. Jothy S. Expression of prostaglandin G/H synthase-1 and -2 protein in human colon cancer. Cancer Res. 1995; 55: 2556-2559.

Kauppi M, Pukkala E, Isomaki H. Low incidence of colorectal cancer in patients with rheumatoid arthritis. Clin Exp Rheumatol 1996; 14: 551-553.

Kennedy AR, Beazer-Barclay Y, Kinzler KW, Newberne PM. Suppression of carcinogenesis in the intestines of *Min* mice by the soybean-derived bowman-birk inhibitor. Cancer Research 1996; 56: 679-682.

Kerneis S, Bogdanova A, Kraehenbuhl JP, Pringault E. Conversion by Peyer's patch lymphocytes of human enterocytes into M cells that transport bacteria. Science 1997 ; 277: 949-952.

Kim SH, Roth KA, Moser AR, Gordon JI. Transgenic mouse models that explore the multistep hypothesis of intestinal neoplasia. The Journal of cell biology 1993; 123: 877-893.

Kleibeuker JH. van der Meer R. de Vries EG. Calcium and vitamin D: possible protective agents against colorectal cancer?. European Journal of Cancer. 1995; 31A: 1081-1084.

Kohwi Y. Imai K. Tamura Z. Hashimoto Y. Antitumor effect of Bifidobacterium infantis in mice. Gann. 1978; 69: 613-618.

Koo M and Rao AO. Long term effect of Bifidobacteria and neosugar on precursor lesions of colonic cancer in CF1 mice. Nutrition Cancer. 1991; 16: 249-257.

Kronborg 0, Fenger C, Olsen J, Jorgensen OD, Sondergaard O. Randomised study of screening for colorectal cancer with faecal-occult-blood test. Lancet 1996; 348: 1467-1671.

Kulkarni N. Reddy BS. Inhibitory effect of Bifidobacterium longum cultures on the azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation and fecal bacterial beta-glucuronidase. Proceedings of the Society for Experimental Biology & Medicine. 1994; 207: 278-283.

Kundig TM, Schorle H, Bachmann MF, Hengartner H, Zinkernagel RM, Horak I. Immune responses in interleukin-2-deficient mice. Science 1993; 262: 1059-1061.

L.

Labianca R, Marsoni S, Pancera G, Torri V, Zaniboni A, Seitz JF, Pignon JP. Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in colon cancer. International Multicentre Pooled Analysis of Colon Cancer Trials (IMPACT) investigators. Lancet 1995; 345: 939-944.

La Vecchia C, Negri E, Franceschi S. Aspirin and colorectal cancer. Br J Cancer 1997; 76: 675-677.

Labayle D, Fischer D, Vielh P, et a]. Sulindac causes regression of rectal polyps in familial adenomatous polyposis. Gastroenterology 1991; 101: 635-639.

Lacour J, Laplanche A, Malafosse M, Gallot D, Julien M, Rotman N et al. Polyadenylicpolyuridylic acid as an adjuvant in resectable colorectal carcinoma: a 6 1/2 year follow-up analysis of a multicentric double blind randomized trial. Eur J Surg Oncol 1992; 18: 599-604.

Laird PW, Jackson-Grusby L, Fazeli A, Dickinson SL, Jung WE, Li E, Weinberg RA, Jeanisch R. Suppression of intestinal neoplasia by DNA hypomethylation. Cell 1995; 81: 197-205.

LaMont JT, O'Gorman TA. Experimental colon cancer. Gastroenterology 1978; 75: 1157-1169.

Laurent-Puig P. Comment se coordonnent les altérations génétiques ? Le cancer colique. Hepatogastro 1997; 4(suppl 2): 76-84.

Lee J, Ametani A, Enomoto A, Kaminogawa S. Screening for immnunopotentiating of food microorganisms and enhancement of the immune response by Bifidobacterium adolescentis M101-4. Biosci Biotech Biochem. 1993; 57: 2127-2132.

Lefebvre AM, Chen I, Desreumaux P, Najib J, Fruchart JC, Geboes K, Briggs M, Heyman R, Auwerx J. Activation of the peroxisome proliferator-activated receptor γ promotes the development of colon tumors in C57BL/6J-APC^{Min}/+mice. Nature Medecine 1998; 4: 1053-1057.

Lemort C and Roberfroid M. Effect of chicory fructooligosaccharides on Ca balance. NDO: Healthy Food for the Colon. Symposium LUW, 4-5 December 1997, p.163. Wageningen: Wageningen University.

Levy DB, Smith KJ, Beazer-Barclay Y, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW. Inactivation of both *APC* alleles in human et mouse tumors. Cancer Research 1994; 54: 5953-5958.

Ling WH, Korpela R, Mykkanen H, Saminen S, Hanninen O. Lactobacillus strain GG supplementation decreases colonic hydrolitic and reductive enzyme activities in healthy female adults. J Nutr. 1994; 124: 18-23.

Little J, Logan RFA, Hawtin PG, et al. Colorectal adenomas and energy intake, body size and physical activity : a case-control study of subjects participating in the Nottingham faecal occult blood screening programme. Br J Cancer 1993a; 67: 172-176.

Little J, Logan RFA, Hawtin PG, Hardcastle JD, Turner ID. Colorectal adenomas and diet : a case-control study of subjects participating in the Nottingham faecal occult blood screeriing programme. Br J Cancer 1993b; 67: 177-184.

Lothe RA, Peltomäki P, Melfing GI, Aaltonen LA, Nyström-Lahti M, Pylkkänen L and al. Genomic instability in colorectal cancer : relationship to clinicopathological variables and family history. Can Res 1993; 53: 5849-5852.

Lu C, Rak JW, Kerbel RS. Interleukin 6 in progression of human solid tumors: transitional changes in the regulation of cell growth, apoptosis and angiogenesis. The Cancer J. 1997; 10: 256-260.

Luongo C, Moser AR, Geldhill S, Dove WF. Loss of Apc^{+} in intestinal adenomas from *Min* mice. Cancer Research 1994; 54: 5947-5952.

Luongo C, Dove WF. Somatic genetic events linked to the Apc locus in intestinal adenomas of the Min mouse. Genes Chromo. Cancer. 1996; 17: 194-198.

Lynch HT, Thorson AG, Smyrk T. Rectal cancer after prolongea sulindac chemoprevention. A case report. Cancer 1995; 75: 936-938.

M.

Macfarlane GH, Cummings JH. Probiotis and prebiotics: can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health? Br Med J. 1999; 318: 999-1003.

MacLennan B, Macrae F, Bain C, Battistutta D, Chapuis P, Gratten H, Lambert J, et al. Randomized trial of intake of fat, liber, and beta carotene to prevent colorectal adenomas. JNCI 1995; 87: 1760-1766.

MacPhee M, Chepenik KP, Liddell RA, Nelson KK, Siracusa LD, Buchberg AM.The secretory phospholipase A2 gene is a candidate for the *Mom1* locus, a major modifier of Apc^{Min}-induced intestinal neoplasia. Cell 1995; 81: 957-966.

Macquart-Moulin G, Riboli E, Cornee J, Charnay B, Berthézene P, Day N. Case-control study on colorectal cancer and diet in Marseille.Int J Cancer 1986; 38: 183-191.

Macquart-Moulin G, Riboli E, Comée J, Kaaks R, Berthezene P. Colorectal polyps and diet : a case-control study in Marseille. Int J Cancer 1987; 40: 179-188.

Mahmoud NN, Boolbol SK, Bilinski RT, Martucci C, Chadburn A, Bertagnolli MM. Apc gene mutation is associated with a dominant-negative effect upon intestinal cell migration. Cancer Res 1997; 57: 5045-5050.

Mahmoud NN, Boolbol SK, Dannenberg AJ, Mestre JR, Bilinski RT, Martucci C, Newmark HL, Chadburn A, Bertagnolli MM. The sulfide metabolite of sulindac prevents tumors and restores enterocyte apoptosis in a murine model of familial adenomatous polyposis. Carcinogenesis 1998; 19: 87-91.

Mahmoud NN, Bilinski RT, Churchill MR, Edelmann W, Kucherlapati R, Bertagnolli MM. Genotype-phenotype correlation in murine *Apc* mutation: differences in enterocyte migration and response to sulindac. Cancer Res 1999 Jan 15; 59: 353-359.

Martinez OM, Gibbons RS, Garovoy MR, Aronson FR. IL-4 inhibits IL-2 receptor expression and IL-2-dependent proliferation of human T cells. J Immunol 1990; 144: 2211-2215.

Matsumine A, Ogai A, Sendo T, Okumara N, Satoh K, Baeg GH, Akiyama T. Binding of APC to the human homolog of the drosophila discs large tumor supressor protein. Science 1996; 272: 1020-1023.

Matsuzaki T, Hashimoto S and Yokokura T. Effects on antitumor activity and cytokine production in the thoracic cavity by intrapleural administration of lactobacillus casei in tumor-bearing mice. 1996; 185: 157-161.

McKeown-Eyssen G, Holloway C, Jazmaji V, Bright-See E, Dion P, Bruce WR A randomized trial of vitamins C and E in the prévention of recurrence of colorectal polyps. Cancer Res 1988; 48: 4701-4747.

McKeown-Eyssen G. Epidemiology of colorectal cancer revised : are serum triglycérides and/or plasma glucose associated with risk ? Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1994; 3: 687-695.

McKeown-Eyssen G, Bright-See E, Bruce WR, Jazmaji V, and the Toronto Polyp Prevention Group. A Randomized trial of a low fat high fibre diet in the recurrence of colorectal polyps. J Clin Epidemiol 1994; 47: 525-536.

Menegoz F, Black RJ, Arveux P, Magne V, Ferlay J, Buemi A et al. Cancer incidence and mortality in France in 1975-1995. Eur J Can Prev 1997; 6: 442-466.

Merrit AJ, Gould KA, Dove WF. Polyclonal structure of intestinal adenomas in Apc^{Min} /+ mice with concomitant loss of Apc^{+} from all tumor lineages.PNAS USA 1997; 94: 13927-13931.

Miettinen M,Vuopo-Varkila J, Varkila K. Production of human tumor necrosis factor alpha, interleukin-6 and interleukin-10 is induced by lactic acid bacteria. Infect Immunity. 1996; 64: 5403-5405.

Mitzutani T and Mitsuoka T. Effect of intestinal bacteria on incidence of liver tumors in grotobiotic C3H/He male mice. J natl Cancer Inst. 1979; 63: 1365-1370.

Miyaki M, Ijima T, Kimura J, Yasumo M, Mori T, Hayashi Y, Koike M, Kuroki T. Frequent mutation of beta-catenin and APC genes in primary colorectal tumors from patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Cancer Res. 1999; 59: 4506-4509.

Moertel CG, Flenùng TR, Macdonald JS, Haller DG, Laurie JA, Tangen, CM et al. Fluorouracil plus Levamisole as effective adjuvant therapy after resection of stage II colon carcinoma : a final report. Ann Intem Med 1995; 122: 321-326.

Moore WEC and Moore LH. Intestinal flora of populations that have a high risk of colon cancer. Appl. Environment Microbiol. 1995; 61: 3202-3207.

Morimoto Y, Hizuta A, Ding EX, Ishii T, Hongo T, Fujiwara T, Iwagaki H, Tanaka N. Functional expression of Fas and Fas ligand on human intestinal intraepithelial lymphocytes. Clin Exp Immunol 1999; 116: 84-89.

Morishita Y, Yoshimi N, Kawabata K, Matsunaga K, Sugie S, Tanaka T, Mori H. Regressive effects of various chemopreventive agents on azoxymethane-induced aberrant crypt foci in the rat colon. Jpn J Cancer Res 1997; 88: 815-820.

Morson BC, Dawson IMP, Day DW, Jass JR, Price AB, William GT. Gastrointestinal pathology. Third edition. Oxford. Blackwell, 1990.

Moser AR, Pitot HC, Dove WF. A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. Science 1990; 247: 322-324.

Moser AR, Dove WF, Roth KA, Gordon JI. The *Min*(Multiple intestinal neoplasia) mutation: its effects on gut epithelial cell differenciation and interaction with a modifier system. The journal of Cell Biology 1992; 116: 1517-1526.

Moser AR, Mattes EM, Dove WF, Lindstrom MJ, Haag JD, Gould MN. Apc^{Min}, a mutation in the murine *Apc* gene, predisposes to mammary carcinomas and focal alveolar hyperplasias. PNAS USA 1993; 90: 8977-8981.

Muller O, Nimmrich I, Finke U, Friedl W, Hoffmann I. A beta-catenin mutation in a sporadic colorectal tumor of the RER phenotype and absence of beta-catenin germline mutations in FAP patients. Genes Chromosomes Cancer 1998; 22: 37-41.

Muto T, Bussey HRJ, Morson BC. The evolution of cancer of the colon and rectum. Cancer 1975; 36: 2251-2270.

N.

Nabel GJ. A transformed view of cyclosporine. Nature 1999 ;397 :471-472

Nakatsugi S, Fukutake M, Takahashi M, Fukuda K, Isoi T, Taniguchi Y, Sugimura T, Wakabayashi K. Suppression of intestinal polyp development by nimesulide, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, in *Min* mice. Jpn J Cancer Res 1997; 88: 1117-1120.

Nakatsuru Y, Aoki K, Ishikawa T. Age and strain dependence of O6-methylguanine DNA methyltransferase activity in mice. Mutat Res 1989; 219: 51-56.

Narisawa T, Sato T, Hayakawa M, Sakuma A, Nakano H. Carcinoma of the colon and rectum of rats by rectal infusion of N-methyl-N-nitro-N nitrosoguanidine. Gann 1971; 62: 231-234.

Näthke I, Adams C, polakis P, Sellin J, Nelson WJ. The adenomatous polyposis coli tumor supressor protein localizes to plasma membrane sites involved in active cell migration. J Cell Biol 1996; 134: 165-179.

Neugut AI, Terry MB, Hocking G, Mosca L, Garbowski G-C, Forde KA, et al. Leisure and occupational physical activity and risk of colorectal adenomatous polyps. Int J Cancer 1996; 68: 744-748.

NIH consensus conference. Adjuvant therapy for patients with colon and rectal cancer. JAMA 1990; 264: 1444-1450.

Niv Y, Fraser GM. Adenocarcinoma in the rectal segment in familial polyposes coli is not prevented by sulindac therapy. Gastroenterology 1994; 107: 854-857.

Nugent KP, Farmer KCR, Spigelman AD, Williams CB, Phillips RKS. Randomised controlled trial of sulindac on intestinal polyposes in FAP. Gut 1992; 33: S33.

Nunemitsu S, Albert I, Souza B, Rubinfeld B, Polakis P. Regulation of intracellular b catenin levels by adenomatous polyposis coli (APC) tumor supressor protein. Pro. Natl. Acad. Sci. USA. 1995; 92: 3046-3050.

O.

Ohtsuka K, Hasegawa K, Ymagiwa S, Abo T. Intraepithelial lymphocytes in colon have similar properties to intraepithelial lymphocytes in small intestine and hepatic intermediate TCR cells. Dig Dis Sci. 1996; 41: 902-911.

Olschwang S, Thomas G. Cancer colorectal : peut-on identifier les sujets à risque ? Hepatogastro 1997; 4 (S2): 39-43.

Onizuka S, Tawara I, Shimizu J, Sakaguchi S, Fujita T, Nakayama E. Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. Cancer Res 1999; 59: 3128-3133.

Oshima M, Oshima H, Kitagawa K, Kobayashi M, Itakura C, Taketo M. Loss of *Apc* heterozygosity and abnormal tissue building in nascent intestinal polyps in mice carrying a truncated *Apc* gene. PNAS 1995a; 92: 4482-4486.

Oshima M, Takahashi M, Oshima H, Tsutsumi M, Yazawa K, Sugimura T, Nishimura S, Wakabayashi K, Taketo MM. Effects of docosahexaenoic acid (DHA) on intestinal polyp development in Apc delta 716 knockout mice. Carcinogenesis 1995b; 16: 2605-2607.

Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, Oshima H, Hancock B, Kwong E, Trzaskos JM, Evans JF, Taketo MM. Suppression of intestinal polyposis in *Apc*$^{\Delta 716}$ knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). Cell 1996a; 87: 803-809.

Oshima M, Oshima H, Tsutsumi M, Nishimura S, Sugimura T, Nagao M, Taketo MM. Effects of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine on intestinal polyp development in Apc delta 716 knockout mice. Mol Carcinog 1996b; 15: 11-17.

P.

Papkoff J, Rubinfeld B, Schryver B, Polakis P. Wnt-1 regulate free pools of catenins and stabilizes APC-catenin complexes. Mol Cell Biol 1996; 16: 2128-2134.

Parker WB and Gheng YC. Metabolism and mechanism of action of 5-fluorouracil. Pharmacol. Ther.1990; 48: 381-395.

Parkin DM, Muir CS, Whelan SL, Gao YT, Ferlay J, Powell. Cancer Incidence in Five Continents. vol 6 IARC Scientific publications n°120, Lyon, 1992.

Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Raymond L, Young J. Cancer Incidence in Five Continents. Vol VII, IARC Scientific Publication n°143, Lyon, 1997.

Perdigon G, Valdez JC, Rachid M. Antitumour activity of yogurt: study of possible immune mechanisms. J Dairy Res 1998; 65: 129-138.

Pereyra BS and Lemonnier D. Induction of human cytokines by bacteria used in dairy foods. Nutr Res. 1993; 13: 1127-1140.

Perrin P, Cassagnau E, Burg C, Patry Y, Vavasseur F, Harb J, Le Pendu J, Douillard JY, Galmiche JP, Bornet F, Meflah K. An interleukin 2/sodium butyrate combination as immunotherapy for rat colon cancer peritoneal carcinomatosis. Gastroenterology 1994; 107: 1697-1708.

Perrin P, Pierre F, Patry Y, Champ M, Berreur M, Pradal G, Bornet F, Meflah K, Menanteua J. Only fibers promoting a stable butyrate-producing colonic ecosystemdecrease the rate of aberrant crypt foci in rats. Soumis à Gut; 1999.

Piazza GA, Rahm ALK, Krutszsch M, Sperl G, Paranka N, Ahnen DJ. Antineoplastic drugs sulindac sulfide and sulfone inhibit cell growth by inducing apoptosis. Cancer Res. 1995; 55: 3110-3116.

Piazza GA, Alberts DS, Hixson LJ, Paranka NS, Li H, Finn T, Bogert C, Guillen JM, Brendel K, Gross PH, Sperl G, Ritchie J, Burt RW, Ellsworth L, Ahnen DJ, Pamukcu R. Sulindac sulfone inhibits azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats without reducing prostaglandin levels. Cancer Res 1997; 57: 2909-2915

Pierre F, Perrin P, Champ M., Bornet F., Meflah K., Menanteau J. Short Chain Fructooligosaccharides Reduce the Occurrence of Colon Tumors and Develop Gut - Associated Lymphoid Tissue in *Min* mice. Cancer Res 1997; 57: 225-228.

Pierre F, Perrin P, Bassonga E, Bornet F., Meflah K., Menanteau J. Two different kind of resistant starches reduce the number of small colon tumors in Min mice. 1999a, soumis à Carcinogenesis

Pierre F, Perrin P, Bassonga E, Bornet F., Meflah K., Menanteau J. T cell status influences colon tumor occurence in *Min* mice fed short chain fructo-oligosaccharides as a diet supplement. Carcinogenesis 1999b; 20: 1953-1956.

Pinedo HH and Peters GFJ. Fluorouracil: biochemistry and pharmocology. J. Clin. Oncol. 1988; 6: 1653-1662.

Polakis P. The adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor. Biochim Biophys Acta 1997; 1332: F127-F147.

Ponz de Leon M, Sassatelli R, Benatti P, Roncucci L. Identification of hereditary non-polyposis colorectal cancer in the general population. Cancer 1993; 71: 3493-3501.

Porcelli SA, Segelke BW, Sugita M, Wilson IA, Brenner MB. The CD1 family of lipid antigen-presenting molecules. Immunol Today 1998; 19: 362-368.

Pories SE, Ramchurren N, Summerhayes I, Steele G. Animal models for colon carcinogenesis. Arch Surg 1993; 128: 647-653

Potter JD. Colon cancer-Do the nutritional epidemiology, the gut physiology and the :molecular biology tell the same story. J Nutr 1992; 123: 418-423.

Potter JD, Slattery MI, Bostick RM, Gapstur SM. Colon cancer, a review of the epidemiology. Epidemiol Rev 1993; 15: 499-545.

Potter JD. Reconciling the epidemiology, physiology and molecular biology of colon cancer. JAMA 1993; 268: 23-30.

Q.

Quaroni A, Beaulieu JF. Cell dynamics and differentiation of conditionally immortalized human intestinal epithelial cells. Gastroenterology 1997; 113: 1198-1213.

R.

Rao CV, Chou D, Simi B and Reddy BS. Prevention of colonic aberrant crypt foci and modulation of large bowel microbial activity by dietary coffee fiber, inulin and pectin. 1998 19(10): 1815-1819.

Rao CV, Sanders ME, Indranie C, Simi B and Reddy BS. Prevention of colonic preneoplastic lesions by the probiotic Lactobacillus acidophilus NCFMTM in F344 rats. Int J Oncology. 1999 14 (5): 939-944.

Reddy BS, Engle A, Simi B, Goldman M. Effect of dietary fiber on colonic bacterial enzymes and bile acids in relation to colon cancer. Gastroenterology 1992; 102: 1475-1482.

Reddy BS and Riverson A. inhibition effect of Bifidobacterium longum on colon mammary and liver carcinogenesis induced by 2-Amino-3methylimidazo (4,5-f) quinoline, a food mutagen. Cancer Res. 1993; 53: 3914-3918.

Reddy BS. Possible mechanisms by which pro- and prebiotics influence colon carcinogenesis and tumor growth. Journal of Nutrition.1999; 129(7 Suppl): 1478S-1482S.

Riethmuller G, Schneider Gadicke E, Schlimok G, Schmiegel W, Raab R, Hoffken K et al. Randomised trial of monoclonal antibody for adjuvant therapy of resected Dukes' C colorectal carcinome. German Cancer Aid 17-1A Study Group. Lancet 1994; 343: 1177-1183.

Ritland SR, Leighton JA, Hirsch RE, Morrow JD, Weaver AL, Gendler SJ. Evaluation of 5-aminosalicylic acid (5-ASA) for cancer chemoprevention : lack of efficacity against nascent adenomatous polyps in the Apc^{Min} mouse. Clinical Cancer Research 1999; 5: 855-863.

Roberfroid MB and Van Loo J and Gibson GR. The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. J Nut. 1998; 128: 11-19.

Roberts I, O'connel SM, Ebert EC. intestinal intraepithelial lymphocytes bind to colon cancer cells by HML-1 and CD11a. Cancer Res. 1993a; 53: 1608-1611.

Roberts I, O'connel SM, Biancone L, Brolin RE, Ebert EC. Spontaneaous cytotoxixity of intestinal intraepithelial lymphocytes: clues to the mechanism. Clin Exp immunol 1993b; 94: 527-532.

Rosenberg L, Palmer JR, Zauber AG, Warshauer ME, Stolley PD, Schapiro S. A hypothesis: non-steroidal anti-inflammatory drugs reduce the incidence of large bowel cancer. J Natl Cancer Instit 1991; 83: 355-358.

Rosenberg L, Werler MM, Palmer JR, et al. The risks of cancers of the colon and rectum in relation to coffee consomption. Am J Epidemiol 1989; 130: 895-903.

Rougier P, Sahmoud T, Nitti D, Curran D, Doci R, De Waele B et al. Adjuvant portal vein infusion of 5-FU and Heparine in colorectal cancer: a randomised trial . Lancet 1998; 351: 1677-1681.

Rowland IR, Rummey CJ, Coutts JT and Lievense LC. Effect of Bifidobacterium longum and inulin on gut bacterial metabolism and carcinogen-induced aberrant crypt foci in rats. Carcinogenesis. 1998; 19: 281-285.

Rubinfeld B, Albert I, Porifi E, Fiol C, Munemitsu S, polakis P. Binding of GSK-3b to the APC-bcatenin complex and regulation of complex assembly. Science 1996; 272: 1023-1026.

Rumney CJ, Rowland IR, Coutts TM, Randerath K, Reddy R, Shah AB, Ellul A, O'Neill IK. Effects of risk-associated human dietary macrocomponents on processes related to carcinogenesis in human-flora-associated (HFA) rats. Carcinogenesis 1993; 14: 79-84.

S.

Salmi M, Jalkanen S. Molecules controlling lymphocyte migration to the gut. Gut 1999 ; 45: 148-153.

Sandler R, Galanko J, Murray S, Helm J, Woosley J. Aspirin and non-steroidal antiinflammatory agents prevent colorectal adenomas. Gastroenterology 1997; 112: A 789.

Sano H, Kawahito Y, Wilder RL, Hashiramoto A, Mukai S, Asai K, Kimura S, Kato H, Kondo M. Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer. Cancer Res 1995; 55: 3785-3789.

Santi DV, Mc Henry CS, Sommer H. Mechanism of interaction of thymidylate synthase with 5-fluorouridylate. Biochem. 1974; 51: 471-481.

Scheithauer W, Marczell A, Depisch D, et al. Combined intravenous (IV) and intraperitoneal (IP) chemotherapy with 5-Fluorouracil (5-FU) + Leucovorin (LV) versus 5-FU + Levamisole for adjuvant therapy of resected colon carcinoma. [Abstract] Proc Am Soc Clin Oncol 1996; 15: 216.

Scholz-Arhens K, Van Loo J and Schrezenmeir J. The increase in bone mineralization in the ovariectomitized rat by oligofructose also depends on Ca supplementation. Zeitschrift für Ernährungswissenschaft. 1998; 37: 123-124.

Seed B. PPARγ and colorectal carninoma : conflicts in a nuclear family. Nature Medecine 1998; 4: 1004-1005.

Seitz HK, Simanowski UA, Homann N, Waldherr R. Cell proliferation and its evaluation in the colorectal mucosa: effect of ethanol. Z Gastroenterol 1998; 36: 645-655.

Sekine K, Ohta J, Onishi M, Tatsuki T, Hashimoto Y. Ananlysis of antitumor properties of effector cells stimulated with a cell wall preparation (WPG) of bifidobacterium infantis. Biol Pharm Bull. 1995; 18: 148-153.

Senda T, Miyashiro I, Matsumine A, Baeg GH, Monden T, Kobayashil S, Monden M, Toyoshima K, Akiyama T. The tumor suppressor protein APC colocalizes with beta-catenin in the colon epithelial cells. Biochem Biophys Res Commun 1996; 223: 329-334.

Shakelford LA, Rao DR, Chawan CB and Pulusain SR. Effect of feeding fermented milk on the incidence of chemically induced colon tumors in rats. Nutrition Cancer 1983; 5: 159-163.

Sheng H, Shao J, Williams CS, Pereira MA, Taketo MM, Oshima M, Reynolds AB, Washington MK, DuBois RN, Beauchamp RD. Nuclear translocation of beta-catenin in hereditary and carcinogen-induced intestinal adenomas. Carcinogenesis 1998; 19: 543-549.

Shing B, Halestrap AP, Paraskeva. Butyrate can act as a stimulator growth or inducer of apoptosis in human cell lines depending on the presence of alternative energy sources. Carcino. 1997; 18: 1265-1270.

Shinge AR. Cancer Epidemio Biomark Prev 1992; 1: 405-411.

Shoemaker AR, Moser AR, Dove WF.*N*-Ethyl-*N*-nitrosourea treatment of multiple intestinal neoplasia (*Min*) mice: age-related effects on the formation of intestinal adenomas, cystic crypts, and epidermoid cysts. Cancer Research 1995; 55: 4479-4485.

Shoemaker AR, Gould KA, Luongo C, Moser AR, Dove WF. Studies of neoplasia in the Min mouse. Biochim. Biophysic. Acta 1997a; 1332: F25-F28.

Shoemaker AR, Luongo C, Moser AR, Marton LJ, Dove WF. Somatic mutational mechanisms involved in intestinal tumor formation in *Min* mice. Cancer Research 1997b; 57: 1999-2006.

Silvi S, Rumney CJ, Cresci A, Rowland IR. Resistant starch modifies gut microflora and microbial metabolism in human flora-associated rats inoculated with faeces from Italian and UK donors. J Appl Microbiol 1999; 86: 521-530.

Simpson SJ, Mizoguchi E, Allen D, Bhan AK, Terhorst C. Evidence that CD4+, but not CD8+ T cells are responsible for murine interleukin-2-deficient colitis. Eur J Immunol 1995; 25: 2618-2625.

Sitrin MD. Halline AG. Abrahams C. Brasitus TA. Dietary calcium and vitamin D modulate 1,2-dimethylhydrazine-induced colonic carcinogenesis in the rat. Cancer Res 1991; 51: 4305-4309.

Smits R, Kartheuser A, Jagmohan-Changur S, Leblanc V, Breukel C, Fodde R. Loss of Apc and the entire chromosome 18 but absence of mutations at the Ras and Tp53 genes in intestinal tumors from Apc1638N, a mouse model for Apc-driven carcinogenesis. Carcinogenesis 1997; 18: 321-327.

St John DJB, McDermott FT, Hopper JL, Debney EA, Johnson WR, Hughes ESR. Cancer in relatives of patients with common colorectal cancer. Ann Intem Med 1993; 118: 785-790.

Steffensen IL, Paulsen JE, Eide TJ, Alexander J. 2-amino-1methyl-6-phenylimidazol(4,5-*b*)pyridine increases the numbers of tumors, cystic crypts and aberrant crypt foci in multiple intestinal neoplasia mice. Carcinogenesis 1997; 18: 1049-1054.

Steinmetz Ka, Potter JD. Food-group consomption and colon cancer in the Adelaide casecontrol study. 1- Vegetables and fruit. Int J Cancer 1993; 53: 711-719.

Stewart T, Henderson R, Grayson H, Opelz G. Reduced incidence of rectal cancer, compared to gastric and colonic cancer, in a population of 73,076 men and women chronically immunosuppressed. Clin Cancer Res 1997; 3: 51-55.

Stryker SI, Wolf BG, Culpe CE, Libbe SD, Ilstrup DM, MacCarthy RI. Natural history of untreated colonic polyps. Gastroenterology 1987; 93: 1009-1013.

Su L-K , Kinzler KW, Vogelstein B, Preisinger AC, Moser AR, Luongo C, Gould KA, Dove WF. Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the APC gene. Science 1992; 256: 668-670.

Su LK, Burrell M, Hill DE, Gyuris J, Brent R, Wiltshire R, Trent J, Vogelstein B, Kinzler KW. APC binds to the novel protein EB1. Cancer Res 1995; 55: 2972-2977.

Su LK, et al. Association between wild type and mutant APC gene products. Cancer Res. 1993; 53: 2728-2731.

Sugimura T, Nagao M, Wakabayashi K. Heterocyclic amines in cooked foods: candidates for causation of common cancers. J Natl Cancer Inst 1994; 86: 2-4.

Summers KM. Relationship between genotype and phenotype in monogenic diseases: relevance to polygenic diseases. Human mutation 1996; 7: 283-293.

Sundaresan V, Forgacs IC, Wight DG, Wilson B, Evan GI, Watson JV. Abnormal distribution of c-myc oncogene product in familial adenomatous polyposis. J Clin Pathol 1987; 40: 1274-1281.

Suzuki H, Duncan GS, Takimoto H, Mak TW. Abnormal development of intestinal intraepithelial lymphocytes and peripheral natural killer cells in mice lacking the IL-2 receptor beta chain. J Exp Med 1997; 185: 499-505.

T.

Takaku K, Oshima M, Miyoshi H, Matsui M, Seldin MF, Taketo MM. Intestinal tumorigenesis in compound mutant mice of both DPC4 (SMAD4) and Apc genes. Cell 1998; 92: 645-656.

Takano T, Arai K, Murota I, Hayakawa K, Mitzutani T, and Mitsuoka T. Effects of feeding sour milk on longevity and tumorigenesis in mice and rats. Bifidobacteria Microflora. 1985; 4: 31-37.

Taper HS,Delzienne NM, Roberfroid MB. Growth inhibition of transplantable mouse tumors by non digestible carbohydrates. Int J Cancer 1997; 71: 1109-1112.

Taunk J, Roberts AI, Ebert EC.Spontaneous cytotoxicity of human intraepithelial lymphocytes against epithelial cell tumors. Gastroenterology. 1992; 102: 69-75.

Thompson LH, Tucker JD, Stewart SA, Christensen ML, Salazar EP, Carrano AV, Felton JS. Genotoxicity of compounds from cooked beef in repair-deficient CHO cells versus Salmonella mutagenicity. Mutagenesis 1987; 2: 483-487.

Thorson AG, Lynch HT, Smyrk TC. Rectal cancer in FAP patient after sulindac. Lancet 1994; 343: 180.

Thune I, Lund E. Physical activity and risk of colon cancer in men and women. Br J Cancer 1996; 73: 1134-1140.

Thurnherr N, Deschner EE, Stonehill EH, Lipkin M. Induction of adenocarcinomas of the colon in mice by weekly injectionsof 1,2-dimethylhydrazine. Cancer Res 1973; 33: 940-945.

Tichonicky L, Kruh J, Defer N. Sodium butyrate inhibits c-myc and stimulates c-fos expression in all the steps of the cell-cycle in hepatoma tissue cultured cells. Biol Cell 1990; 69: 65-67

Tomlinson IP, Neale K, Talbot IC, Spigelman AD, Williams CB, Phillips RK, Bodmer WF. A modifying locus for familial adenomatous polyposis may be present on chromosome 1p35-p36. J Med Genet 1996; 33: 268-273.

Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibriblasts by PPAR g2, a lipid-activated transcription factor. Cell 1994; 79: 1147-1156.

Trock B, Lanza E, Greenwald P. Dietary fiber, vegetables, and colon cancer, critical review and meta-analyses of the epidemiologic evidence. J Natl Cancer Inst 1990; 82: 650-661.

Tsujii M and Bubois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. Cell. 1995: 83: 493-501.

Tuyns AJ, Kaaks R, Haelterman M. Colorectal cancer and the consomption of foods : a case-control study in Belgium. Nutr Cancer 1988; 11: 189-204.

V.

Van de Heuvel EGH, Muys Th van Dokkun W and Schaafsma G. Oligofructose stimulates calcium absorption in adolescents. Am J Cli Nut. 1999; 69: 544-548.

Van Kranen HJ, van Iersel PWC, Rijnkels JM, Beems DB, Alink GM, van Kreijl CF. Effects of dietary fat and a vegetable-fruit mixture on the development of intestinal neoplasia in the Apc^{Min} mouse. Carcinogenesis 1998; 19: 1597-1601.
Vargas PA, Alberts DS. Primary prévention of colorectal cancer through dietary modification. Cancer 1992; 70: 1229-1235.

Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. Trends genet. 1993; 9: 138-141.

W.

Waddell WR, Ganser GF, Cerise EJ, Loughry RW. Sulindac for polyposes of the colon. Am J Surg 1989; 157: 175-179.

Walsh J H. Fiber and colorectal cancer: poor relation? Gastro 1999; 116: 785.

Wargovich MJ, Chen CD, Harris C, Yang E, Velasco M. Inhibition of aberrant crypt growth by non-steroidal anti-inflammatory agents and differentiation agents in the rat colon. Int J Cancer 1995; 60: 515-519.
Wasan HS, Novelli M, Bee j, Bodmer WF. Dietary fat influences on polyp phenotype in multiple intestinal neoplasia mice. PNAS USA 1997; 94: 3308-3013.

Weedon DD, Shorter RG, Ilstrup DM, Huizenga KA, Taylor WF. Crohn's disease and cancer. N Engl J Med 1973; 289: 1099-1103.

Whitehead RH, Brown A, Bhathal PS. A method for the isolation and culture of human colonic crypts in collagen gels. In Vitro Cell Dev Biol 1987; 23: 436-434.

Whitehead RH, VanEeden PE, Noble MD, Ataliotis P, Jat PS. Establishment of conditionally immortalized epithelial cell lines from both colon and small intestine of adult H-2Kb-tsA58 transgenic mice. Pro Natl Acad Sci USA 1993; 90: 587-591.

Whitehead RH, Joseph JL. Derivation of conditionally immortalized cell lines containing the *Min* mutation from the normal colonic mucosa and immortomouse/*Min* hybrid. Epith Cell Biol 1994; 3: 119-125.

Wiesenfeld M, O'Connell MJ, Wieand HS, Gonchoroff NJ, Donohue JH, Fitzgibbons RJ Jr et al. Controlled clinical trial of interferon-gamma as postoperative surgical adjuvant therapy for colon cancer. J Clin Oncol 1995; 13: 2324-2329.

Wijnands MVW. Appel MJ. Hollanders VMH. Woutersen RA. A comparison of the effects of dietary cellulose and fermentable galacto-oligosaccharide, in a rat model of colorectal carcinogenesis: fermentable fibre confers greater protection than non-fermentable fibre in high and low fat backgrounds. Carcinogenesis. 1999; 20: 651-656.

Willerford DM, Chen J, Ferry JA, Davidson L, Ma A, Alt FW. Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. Immunity 1995; 3: 521-530.

Willett WC, Stantfer MJ, Colditz GA. Relation of meat, fat and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study amofig women. N Engl J Med 1990; 323: 1664-1672.

William CS, Luongo C, Radhika A, Zhang T, Lamps LW, Nanney LB, Beauchamp RD. Elevated cyclooxygenase-2 levels in *Min* mouse adenomas. Gastroenterology 1996; 111: 1134-1140.

Williamson SL, Kartheuser A, Coaker J, Kooshkghazi MD, Fodde R, Burn J, Mathers JC. Intestinal tumorigenesis in the Apc1638N mouse treated with aspirin and resistant starch for up to 5 months. Carcinogenesis 1999; 20: 805-810.

Winaver SJ, Zauber AG, Ho MN. Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. N Engl J Med 1993; 329: 1977-1981.

Winawer SJ, Zauber AG, Gerdes H, O'Brien MJ, Gottlieb LS, Sternberg SS et al. Risk of colorecta cancer in the families of patients with adenomatous polyps. N Eng J Med 1996; 11: 82-87.

Winde G, Schmid KW, Brandt B, Muller 0, Osswald H. Clinical and genomic influence of sulindac on rectal mucosa in familial adenomatous polyposes. Dis Colon Rectum 1997; 40: 1156-1168.

Wolmark N, Fisher B, Rockette H, Redmond C, Wickerham DL, Fisher ER et al. Postoperative adjuvant chemotherapy or BCG for colon cancer: results from NSABP protocol C-01. J Natl Cancer Inst 1988; 80: 30-36.

Wolmark N, Rockette H, Mamounas EP, et al. The relative efficacy of 5-FU + Leucovorin (FU-LV), 5-FU + Levamisole (FU-LEV), and 5-FU + Leucovorin + Levam-isole (FU-LVLEV) in patients with Dukes'B and C carcinoma of the colon: first report of NSABP C-04. Proc Am Soc Clin Oncol 1996; 15: 205.

Y.

Yamashita K, Kawai K and Itakura M. Effects of fructo-oligosaccharides on blood glucose and serum lipids in diabetic subjects. Nut Res. 1984; 4: 961-966.

Yun JW. Fructooligosaccharides-Occurence, preparation and application. Enz. Microb. Tech. 1996; 19: 107-117.

Z.

Zhang T, Nanney LB, Luongo C, Lamps L, Heppner KJ, DuBois RN, Beauchamp RD. Concurrent overexpression of cyclin D1 and cyclin-dependent kinase 4 (Cdk4) in intestinal adenomas from multiple intestinal neoplasia (*Min*) mice and human familial adenomatous polyposis patients. Cancer Research 1997; 57: 1638-1643.

IMMUNOPROPHYLAXY of COLORECTAL CANCER by FERMENTABLE INDIGESTIBLE CARBOHYDRATES: STUDIES in *MIN* MICE.

ABSTRACT

Dietary fiber may prevent colorectal cancer, but this hypothesis is still controversial. One proposed mechanism is the production of butyrate by fermentation. We tested two different butyrogenic fibers (short-chain fructooligosaccharides and type III resistant starch) in opposition to a weak butyrate-producing fiber (wheat bran starch free) in the *Min* mouse, a genetic model of spontaneous intestinal carcinogenesis. Only the sc-FOS diet protected against colon cancer. It suggests the action of another protecting factor besides butyrate: the chemical nature of the fiber and/or the prebiotic properties of sc-FOS (via lactic bacteria which can act on the immune process). In accordance with this hypothesis, we have observed an amplification of the intestinal immune system. Secondly, two resistant starchs with different chemical properties did not reduce the total number of tumours but reduced the number of small tumours. The addition of lyophilised bifidobacteria to the starch-resistant diet reduced the number of small tumours but increased the number of large tumours showing the concept of the dual immunofacilitation/immunoprotection process. A depletion of T lymphocytes of mice fed with sc-FOS doubled the number of colon tumours in comparison with immunocompetent mice, arguing for the participation of the immune system in the protection. By phenotyping of intra-epithelial lymphocyte, a significant decrease of interleukin 2 receptor was found only in sc-FOS diet. This is a possible indication of a temporary anergy of the local immune system or of the involvement of another activation pathway of the colon IELs. In order to classify the mechanisms, we isolated cell lines conditionally immortalized healthy (Apc +/+) and mutated (Apc *Min*/+) from of breeding *Min* mice with immortomouse. This cell culture model using a filter co-culture system allows us to study the influence of indigestible carbohydrates and their fermentation products on lympho-epithelial interactions during carcinogenesis.

RESUME

Certaines fibres alimentaires réduiraient l'apparition des cancers colorectaux mais l'hypothèse reste contreversée. Un des mécanismes fait intervenir la production par fermentation de butyrate. Nous avons testé deux fibres butyrogènes chimiquement différentes (fructo-oligosaccharides à chaîne courte scFOS, et amidon résistant) versus une fibre faiblement productrice de butyrate (son de blé désamidonné) chez la souris *Min*, un modèle de carcinogenèse intestinale spontanée. Seul le régime scFOS réduisait le nombre de tumeurs coliques et stimulait l'immunité locale. La nature chimique de la fibre ou bien les propriétés prébiotiques des scFOS (ils favorisent la croissance de bactéries lactiques qui agiraient sur la réaction immunitaire) sont donc impliquées. Deux autres types d'amidons résistants réduisaient le nombre de petites tumeurs. L'addition de bifidobactéries à l'un de ces deux régimes réduisait le nombre de petites tumeurs, mais augmentait celui de grosses tumeurs illustrant le concept de modulation par l'immunogénicité de la dualité immunofacilitation/surveillance. La déplétion en lymphocytes T associée au régime scFOS doublait le nombre de tumeurs par rapport aux souris immunocompétentes. Le régime scFOS diminuait l'expression du récepteur à l'IL2 à la surface des lymphocytes intra-épithéliaux (LIE) suggérant la mise en anergie temporaire du système immunitaire, mais pouvant aussi signifier l'implication d'une autre voie d'activation des LIE. Enfin, pour mettre en place une modélisation des intéractions lympho-épithéliales, nous avons croisé des souris C57BL6 et *Min* avec la souris transgénique Immortomouse et isolé à partir de primo-cultures de muqueuses des lignées cellulaires conditionnellement immortalisées saines et mutées sur Apc. Ce modèle permettra d'étudier en co-culture sur filtre, l'influence des glucides indigestibles et de leurs produits de fermentation sur les interactions lympho-épithéliales au cours de la carcinogenèse.

Mots clefs: Cancer colique, Prévention, Nutrition, Glucides indigestibles, Souris *Min*, Système immunitaire local, Récepteur à l'interleukine 2.

INSERM U419, Institut de Biologie, 9 quai Moncousu 44035 Nantes Cedex 01