
**MECANISME DE LA SUPPRESSION DU CANCER
PAR LE POLYETHYLENE GLYCOL :**

***IL ELIMINE LES CELLULES PRECANCEREUSES
MARQUEES AU DEXTRAN FLUORESCENT
DANS LE COLON DU RAT***

THESE

pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement en 2001
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Erik Dominique VAN BEEK

Né, le 1^{er} Juin 1976 à WAALWIJK (Pays-Bas)

Directeur de thèse : M. le Professeur CORPET

JURY

PRESIDENT :

M. Roland BUGAT

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

M. Denis CORPET

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Mme Nathalie BOURGES-ABELLA

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Liste récapitulative des enseignants

Liste récapitulative des enseignants

A Monsieur le Professeur Roland BUGAT,
Professeur des Universités
Praticien hospitalier
Oncologie médicale

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la Présidence de notre jury de thèse
Hommage respectueux

A Monsieur le Professeur Denis CORPET,
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Science de l'Aliment et Technologies dans les Industries Agro-alimentaires

Qui nous a proposé ce sujet, nous a soutenu et conseillé tout au long de ce travail
Qu'il trouve ici l'expression de notre profonde gratitude et de notre respect

A Madame le Docteur Nathalie BOURGES-ABELLA
Maître de conférences à l'Ecole Nationale vétérinaire de Toulouse
Histologie, Anatomie pathologique

Qui nous a fait l'honneur d'accepter de participer à notre jury de thèse
Qu'elle soit assurée de notre estime et de nos sincères remerciements

A mes parents

A mes frères

A pépère et mamie

A Adeline

A ceux que j'aime

**Merci aussi à Sylviane Taché pour sa gentillesse et sa disponibilité,
à Alain Pinton qui m'a permis d'utiliser le matériel du laboratoire de
cytogénétique de l'ENVT.**

TABLE DES MATIERES

| | |
|--|-----------|
| TABLE DES MATIERES..... | 9 |
| TABLE DES ILLUSTRATIONS..... | 15 |
| Introduction..... | 20 |
| Première partie : | |
| Etude bibliographique | 24 |
| <i>Premier chapitre :</i> | |
| <i>le cancer colorectal.....</i> | <i>26</i> |
| <i>.I Biologie du cancer.....</i> | <i>28</i> |
| <i>.A Définition.....</i> | <i>28</i> |
| <i>.B Déroulement de la cancérogenèse.....</i> | <i>28</i> |
| <i>.1 Définition.....</i> | <i>28</i> |
| <i>.2 Etapes de la cancérogenèse.....</i> | <i>30</i> |
| <i>III Le cancer colorectal.....</i> | <i>34</i> |
| <i>.A Définition.....</i> | <i>34</i> |
| <i>.B Données anatomo-pathologiques.....</i> | <i>34</i> |
| <i>.1 Histologie.....</i> | <i>34</i> |
| <i>.2 Les microadénomes : état préneoplasique.....</i> | <i>34</i> |
| <i>.C Epidémiologie.....</i> | <i>35</i> |
| <i>.1 Introduction.....</i> | <i>35</i> |
| <i>.2 Incidence du cancer colorectal.....</i> | <i>35</i> |
| <i>.3 Facteurs de risque.....</i> | <i>36</i> |
| <i>.D Approche médicale.....</i> | <i>40</i> |
| <i>.1 Clinique.....</i> | <i>40</i> |
| <i>.2 Diagnostic.....</i> | <i>40</i> |
| <i>.3 Traitement.....</i> | <i>41</i> |
| <i>.4 Pronostic.....</i> | <i>41</i> |
| <i>.5 Prévention et dépistage.....</i> | <i>41</i> |
| <i>Deuxième chapitre :</i> | |
| <i>les polyéthylènes-glycols.....</i> | <i>44</i> |

| | |
|--|-----------|
| <u>.I Propriétés des polyéthylènes-glycols.....</u> | <u>46</u> |
| <u>.A Propriétés physico-chimiques.....</u> | <u>46</u> |
| <u>.1 Structure.....</u> | <u>46</u> |
| <u>.2 Nomenclature et présentation.....</u> | <u>46</u> |
| <u>.3 Synthèse.....</u> | <u>46</u> |
| <u>.4 Propriétés physico-chimiques.....</u> | <u>46</u> |
| <u>.B Propriétés biologiques.....</u> | <u>47</u> |
| <u>.1 Absorption et métabolisation.....</u> | <u>47</u> |
| <u>.2 Toxicité et effets indésirables.....</u> | <u>47</u> |
| <u>.II Utilisations des polyéthylènes glycols.....</u> | <u>48</u> |
| <u>.A Utilisations médicales.....</u> | <u>48</u> |
| <u>.B Autres utilisations.....</u> | <u>48</u> |
| <u>.III Effet protecteur du PEG contre la cancérogenèse colorectale chez le rat.....</u> | <u>49</u> |
| <u>.A Historique.....</u> | <u>49</u> |
| <u>.1 Mise en évidence de l'effet protecteur.....</u> | <u>49</u> |
| <u>.2 Caractérisation de l'effet protecteur.....</u> | <u>49</u> |
| <u>.B Conclusion sur l'effet préventif du PEG.....</u> | <u>51</u> |
| <u>.IV Hypothèses sur le mécanisme de l'effet protecteur du PEG contre la cancérogenèse colorectale chez le rat.....</u> | <u>54</u> |
| <u>.A Effet du PEG sur le contenu intestinal.....</u> | <u>54</u> |
| <u>.1 Dilution des agents promoteurs.....</u> | <u>54</u> |
| <u>.2 Encapsulation des agents promoteurs.....</u> | <u>55</u> |
| <u>.B Effet du PEG sur la muqueuse ou la surface cellulaire.....</u> | <u>55</u> |
| <u>.1 Glissement et lubrification.....</u> | <u>55</u> |
| <u>.2 Film protecteur.....</u> | <u>56</u> |
| <u>.3 Effets sur l'épithélium.....</u> | <u>56</u> |
| <u>.4 Effets sur les membranes.....</u> | <u>57</u> |
| <u>.5 Pression osmotique et expulsion des cellules des FCA.....</u> | <u>58</u> |
| <u>.C Effets intracellulaire du PEG.....</u> | <u>60</u> |
| <u>.V Conclusions et perspectives.....</u> | <u>62</u> |

Deuxième partie :

| | |
|---|-----------|
| Etude expérimentale..... | 64 |
| <u>.Introduction : objectifs et intérêts de l'expérience.....</u> | <u>66</u> |
| <u>.II Etude #0 : cinétique du Dextran Fluorescent.....</u> | <u>70</u> |
| <u>.A But de l'étude.....</u> | <u>70</u> |

| | |
|---|-----------|
| .BMatériel et méthode..... | 70 |
| .1 Animaux et alimentation..... | 70 |
| .2 Protocole expérimental..... | 70 |
| .CRésultats..... | 72 |
| .DDiscussion..... | 73 |
| .IIIEtudes #1 et #2 : mécanisme d'action du PEG 8000..... | 74 |
| .ABut des études #1 et #2..... | 74 |
| .BMatériel et méthode..... | 74 |
| .1 Animaux et alimentation..... | 74 |
| .2 Protocoles expérimentaux..... | 76 |
| .3 Paramètres mesurés..... | 76 |
| .CRésultats..... | 78 |
| .1 Etude #1..... | 78 |
| .2 Etude #2..... | 78 |
| .3 Synthèse des résultats des études #1 et #2..... | 80 |
| .DDiscussion..... | 82 |
| Conclusion..... | 84 |
| ANNEXES..... | 88 |
| BIBLIOGRAPHIE..... | 94 |

TABLE DES ILLUSTRATIONS

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|--|----|
| Tableau n°1 : Etapes et mécanismes impliqués dans le processus de cancérogenèse..... | 29 |
| Tableau n°2 : Caractéristiques des rats utilisés dans les différentes études..... | 67 |
| Tableau n°3 : Protocole de préparation des côlons..... | 69 |
| Tableau n°4 : Résultats de l'étude #0..... | 71 |
| Tableau n°6 : Résultats de l'étude #1..... | 77 |
| Tableau n°8 : Résultats de l'étude #2..... | 77 |
| Tableau n°10 : Résultats des études #1 et #2 cumulées..... | 79 |
| Tableau n°5 : Statistiques de l'étude #0..... | 90 |
| Tableau n°7 : Statistiques de l'étude #1..... | 91 |
| Tableau n°9 : Statistiques de l'étude #2..... | 92 |
| Tableau n°11 : Statistiques des études #1 et #2 cumulées..... | 93 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|---|----|
| Figure n°1 : Mécanismes de cancérogenèse induite par les agents chimiques..... | 29 |
| Figure n°2 : Architecture du côlon..... | 33 |
| Figure n°3 : Schéma récapitulatif des hypothèses mécanistiques émises sur l'effet préventif du PEG..... | 53 |
| Figure n°4 : Protocole expérimental de l'étude #0..... | 69 |

| | |
|--|-----------|
| Figure n°5 : Cinétique du pourcentage de cellules fluorescentes par crypte..... | 71 |
| Figure n°6 : Protocoles expérimentaux des études #1 et #2..... | 75 |
| Figure n°7 : Effet d'un traitement par le PEG sur le pourcentage de cellules fluorescentes par crypte normale..... | 81 |
| Figure n°8 : Effet d'un traitement par le PEG sur le pourcentage de cellules fluorescentes par crypte aberrante. | 81 |

LISTE DES IMAGES

| | |
|--|-----------|
| Image n°1 : Observation d'un foyer de cryptes aberrantes..... | 33 |
| Image n°2 : Fluorescence dans quelques cryptes normales..... | 75 |
| Image n°3 : Fluorescence dans une crypte aberrante..... | 75 |

INTRODUCTION

250.000 nouveaux cas de cancer sont diagnostiqués chaque année en France. Plus de 13.000 personnes meurent chaque année d'un cancer. Les différentes formes de cette maladie représentent la première cause de mortalité devant depuis quelques années les maladies cardio-vasculaires. Chez l'homme, les décès par cancers sont dus d'abord aux cancers du poumon (23%), aux voies aérodigestives supérieures (12%), à la prostate (11%), aux cancers colorectaux (10%). Chez la femme, la première cause de décès par cancer provient des cancers du sein (19 %), des cancers colorectaux (13%), du poumon (6%), de l'ovaire (6%), de l'utérus (5%) [Ferlay, 01].

Dans le monde, le cancer progresse à raison de plus de dix millions de nouveaux cas et six millions de morts par an. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), qui prévoit un accroissement des cas de cancers dans la plupart des pays en raison du vieillissement des populations, ces chiffres devraient doubler d'ici l'an 2020.

Le cancer colorectal se situe au premier rang des cancers pour les deux sexes, représentant près de 15% des 250 000 nouveaux cas de cancer diagnostiqués en 2000. Avec près de 17 000 décès en 2000, le cancer colorectal est le plus grave après le cancer du poumon (24 000 décès). La gravité du cancer colorectal vient du fait qu'il est souvent diagnostiqué tardivement alors que la chirurgie doit être précoce. La radio et la chimiothérapie sont insuffisantes.

Ces dernières années, les études épidémiologiques associées à l'expérimentation animale et à l'analyse génétique des tumeurs [Vogelstein, 89] ont permis de réaliser des progrès considérables sur la connaissance des facteurs génétiques ou environnementaux impliqués dans la cancérogenèse colorectale et sur leurs mécanismes d'action. L'observation et la quantification de lésions précoces du cancer chez les modèles animaux exposés à différents facteurs environnementaux ont permis de mettre en évidence rapidement et méthodiquement de nombreux facteurs pro ou anti-cancer et de les classer par ordre de malignité ou d'efficacité. Les études épidémiologiques et les expérimentations sur des modèles animaux donnent des résultats souvent discordants ne permettant pas encore de faire des recommandations de prévention reposant sur des bases indiscutables. Les médias font souvent des recommandations sur l'hygiène alimentaire sans réel fondement scientifique. Le dépistage précoce reste aujourd'hui le meilleur moyen de prévention.

C'est ainsi que le polyéthylène glycol (PEG) s'est révélé être un des plus puissant agent de chimioprévention de la cancérogenèse colorectale connu chez le rat. Le PEG est un polymère non absorbé, non fermenté ni métabolisé, non toxique, couramment utilisé en

médecine comme laxatif. Il est aussi largement utilisé en industrie pour ses nombreuses propriétés intéressantes. L'efficacité du PEG a largement été démontrée et caractérisée chez les rongeurs. Son effet sur la taille et le nombre de foyers de cryptes aberrantes (FCA), marqueur précoce du cancer colorectal chez le rat, est significatif après seulement 3 jours de traitement mais réversible, dose et poids moléculaire dépendant mais indépendant du régime alimentaire. Le PEG agit non seulement sur les FCA établis mais aussi sur les adénomes et carcinomes. Sa faible toxicité en fait un candidat potentiel aux essais cliniques chez l'homme mais la preuve mécanistique de son efficacité, sujet de cette thèse, est le passage obligé avant ces essais cliniques chez l'homme.

PREMIÈRE PARTIE :
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Premier chapitre :
le cancer colorectal

.IBIOLOGIE DU CANCER

.ADÉFINITION

Le cancer est une appellation collective décrivant un groupe de maladies polyfactorielles qui ont pour caractéristique commune d'avoir pour résultat une croissance non contrôlée de cellules anormales.

Une tumeur cancéreuse se définit comme la prolifération d'une même cellule souche d'un tissu ou d'un organe. Cette prolifération est irréversible, génétiquement altérée, autonome, anarchique, indépendante des mécanismes normaux de contrôle de croissance et d'inhibition de contact. Une tumeur bénigne est une excroissance qui, bien qu'elle contienne des cellules anormales mais peu indifférenciées, ne menace pas de s'étendre dans tout le corps ou de toucher les tissus avoisinants. Dans une tumeur maligne, les cellules sont très indifférenciées et acquièrent la capacité de métastaser : elles peuvent se séparer de la tumeur, pénétrer les tissus avoisinants et les voies de circulation et envahir tout le corps. Le terme de cancer est généralement utilisé pour décrire ces tumeurs malignes et métastatiques.

D'un point de vue cellulaire, les cellules cancéreuses présentent des anomalies caractéristiques : les mitoses sont fréquentes, le rapport nucléoplasmique est augmenté et il existe des anomalies caryotypiques.

Pathogéniquement, une tumeur cancéreuse peut être mortelle par action mécanique sur les tissus ou organes vitaux avoisinants ou par sécrétion de substances toxiques pour l'organisme. Le plus fréquemment, ce sont les métastases dans les organes tels que le poumon, le foie, la moelle osseuse qui sont fatales.

.BDÉROULEMENT DE LA CANCÉROGENÈSE

.1DÉFINITION

Le terme de cancérogenèse recouvre l'ensemble des mécanismes responsables du développement des cancers, incluant toutes les formes de cancers [Riboli, 96].

Par commodité, la cancérogenèse est décrite comme un processus multiphasique [Riboli, 96]. En effet, le processus est probablement plus continu et plus complexe. Au moins 7 événements génétiques doivent se produire pour qu'un cancer colorectal se développe [Kinzler, 96]. Le développement tumoral commence lorsqu'une cellule d'une population normale subit une mutation génétique. Celle-ci et les cellules filles vont ensuite proliférer anormalement. Selon l'aspect des cellules qui constituent la lésion, on distingue les états hyperplasiques (les cellules ont un aspect normal), les états dysplasiques (les cellules ont un aspect anormal) qui évoluent vers le cancer in situ puis vers le cancer invasif malin [Weinberg, 96].

| ÉTAPES DE LA CANCÉROGÈNESE | MÉCANISMES IMPLIQUÉS |
|---|---|
| INITIATION = altérations génétiques stables et transmissibles → CELLULES INITIÉES • Etat irréversible | <ul style="list-style-type: none"> • Activation et détoxification des cancérogènes chimiques • Mutations spontanées, altérations primaires du génome : alkylation des bases, adduits à l'ADN, coupures, pontages intra et interbrins, aberrations chromosomiques • Mutations induites : en particulier sur les oncogènes et/ou les gènes suppresseurs de tumeurs • Réparation de l'ADN : fidèle par excision-resynthèse ou recombinaison ; fautive par le système SOS |
| PROMOTION = altérations épigénétiques = expansion clonale des cellules initiées → LÉSION PRÉ-CANCÉREUSE (HYPERPLASIE, DYSPLASIE) • Etat réversible | <ul style="list-style-type: none"> • Stimulation de la prolifération cellulaire • Perte de différenciation cellulaire • Perte de communication intercellulaire • Altération des mécanismes de signalisation cellulaire • Modulation de l'expression des gènes • Action pro-oxydante des radicaux libres |
| PROGRESSION = altérations génétiques stables et transmissibles → TUMEUR MALIGNÉ • Etat irréversible | <ul style="list-style-type: none"> • Instabilité génomique : translocation, recombinaison, amplification des gènes, remaniements chromosomiques • Mutation d'oncogènes et/ou de gènes suppresseurs de tumeurs |
| INVASION = dissémination des cellules tumorales → MÉTASTASES | <ul style="list-style-type: none"> • Perte d'adhésivité des cellules, capacité de migration |

Tableau n°1 : Etapes et mécanismes impliqués dans le processus de cancérogenèse
 [Riboli, 96]

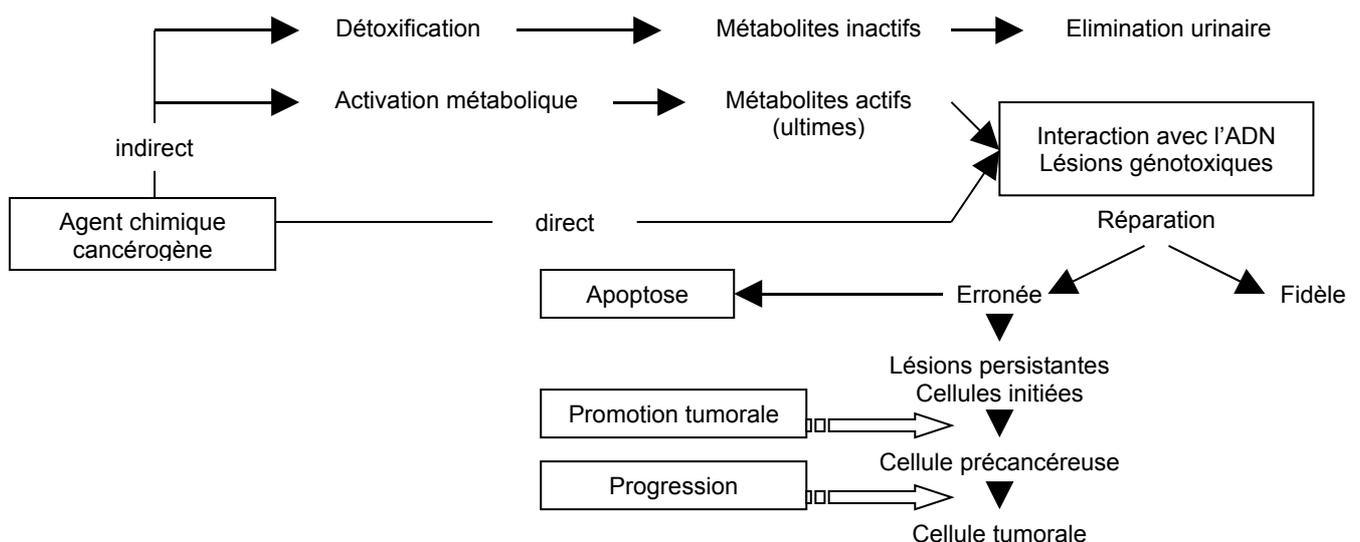


Figure n°1 : Mécanismes de cancérogenèse induite par les agents chimiques
 [Declôtre, 93]

Le développement de la maladie est un phénomène prolongé dans le temps pouvant comporter plusieurs étapes et implique des interactions complexes entre différents facteurs exogènes de types environnementaux et/ou endogènes de types génétique et épigénétique (Cf. tableau n°1).

.2 ETAPES DE LA CANCÉROGENÈSE

.1 Initiation

L'initiation correspond au tout premier phénomène de la transformation cancéreuse. On ne la connaît que grâce aux études expérimentales et aux études épidémiologiques, qui ont permis de faire un rapport entre les cancers et certains facteurs déclenchants.

L'initiation est un phénomène moléculaire et ponctuel aboutissant à la cellule initiée. Cette étape consiste en la formation de lésions stables et irréversibles de l'ADN de la cellule souche et transmissible aux cellules filles. Différents mécanismes sont susceptibles d'entraîner ces lésions :

➤ Les mutations spontanées sont de faible probabilité (10^{-8} à 10^{-5} selon les gènes). Ce sont les mutations géniques, les aberrations et remaniements chromosomiques ou les dommages primaires de l'ADN dues à certains mécanismes endogènes : la production de radicaux libres, l'instabilité et les erreurs de réplication de l'ADN, l'exposition aux agressions non spécifiques de l'environnement.

➤ Les mutations induites par de brèves expositions avec des agents cancérogènes sont conditionnées par les capacités de métabolisation des agents chimiques et l'efficacité des systèmes de réparation de l'ADN.

Les agents cancérogènes peuvent être de nature chimique (molécules organiques telles que la fumée de tabac), pharmaceutique, ions métalliques (tels que le Nickel, le Chrome, Cadmium), biologique (tel que des virus), physique (tels que les radiations X, UV). Ils sont dits directs s'ils sont capables d'induire l'initiation en l'état comme dans le cas d'agents physiques ; ils sont dits indirects ou pro-cancérogènes si une métabolisation est nécessaire à l'acquisition de la génotoxicité [Decloître, 93] (Cf. figure n°1). L'activation métabolique du pouvoir génotoxique des molécules absorbées est alors conditionnée par l'équilibre des systèmes enzymatiques impliqués. Les enzymes de bio-transformation de type I sont très représentées dans le foie et, dans une moindre mesure, les poumons, les reins, le côlon et la peau. Les cancérogènes peuvent aussi provoquer des dommages primaires de l'ADN de façon directe ou sous forme de métabolites oxygénés.

La plupart des mutations ont lieu dans les parties de l'ADN qui ne codent aucune protéine, mais qui sont spécifiques à chaque individu. Elles n'ont ainsi aucune répercussion biologique. Les gènes et protéines de contrôle du cycle cellulaire (p53, protéine du

rétinoblastome pRb...) interviennent avec les systèmes enzymatiques destinés à réparer les mutations produites pour provoquer une restitution ad integrum, ce qui explique la rareté des cancers si on les compare au nombre de divisions cellulaires [Decloître, 93]. Le mécanisme de réparation le plus représenté est le système de réparation fidèle dit d'excision-resynthèse. D'autres systèmes sont mis en œuvre plus spécifiquement tel que le système de réparation infidèle ou fautive dit SOS permettant la survie de la cellule tout en laissant persister des lésions mutagènes responsables de l'apparition de cellules initiées. Si la cellule n'a pas eu le temps de réparer avant la division, l'anomalie n'est pas obligatoirement transmise aux cellules filles, car la cellule possède un dernier mécanisme de défense de la régularité de la transmission génétique : le suicide ou apoptose. La majorité des cellules anormales arrêtent ainsi la transmission d'un matériel génétique muté. L'atteinte des gènes utiles pour la division cellulaire, en particulier les oncogènes et/ou gènes suppresseurs de tumeurs, est donc redoutable car la réparation cellulaire n'est plus possible et la prolifération est favorisée, [Weinberg, 96]. On retrouve une atteinte de ces gènes régulateurs dans la plupart des cancers humains.

Les cellules ainsi initiées sont éliminées ou restent quiescentes plus ou moins longtemps en fonction de l'occurrence des étapes suivantes. Ainsi, tout individu possède un certain nombre de cellules initiées, phénotypiquement indistincte des cellules normales, mais qui mémorise une altération génétique exprimée lors d'une stimulation ultérieure.

.bPromotion

L'étape de promotion se produit sous l'action continue ou répétée d'un agent promoteur en concentration suffisante sur les cellules initiées. Les mécanismes impliqués, de type épigénétiques, permettent l'expression des lésions génomiques. Les cellules initiées se multiplient alors de façon clonale réversible et s'engagent dans la voie de la dédifférenciation. Leur phénotype devient anormal. La promotion aboutit à la formation de lésions précancéreuses.

Les agents promoteurs chimiques présentés aux cellules initiées quiescentes participent à la régulation de la prolifération, de la différenciation cellulaire et à l'expression des gènes [Decloître, 93]. Ainsi, l'agent promoteur peut amplifier en particulier les signaux cellulaires de croissance et de prolifération [Weinstein, 88] ; inhiber les capacités de communication intercellulaire via les gap junctions aboutissant à l'isolement des clones de cellules initiées [Yamasaki, 91] ; entraîner la production de radicaux libres oxygénés par des mécanismes directs ou indirects via des processus inflammatoires [Cerutti, 85].

L'étape de promotion est réversible tout au moins au début.

.cProgression

Cette étape consiste en la transformation irréversible de cellules initiées précancéreuses et aboutit à l'émergence clinique de la tumeur. Les cellules initiées subissent de nouvelles altérations génétiques irréversibles et transmissibles : instabilité génomique, activation de proto-oncogènes et/ou inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs. Les cellules s'auto-stimulent, deviennent insensibles aux signaux inhibiteurs et résistantes aux mécanismes d'apoptose [Weinberg, 96]. L'activation du gène de la télomérase permet aux cellules cancéreuses de se multiplier indéfiniment en restituant la taille des télomères après chaque multiplication. La tumeur acquiert un caractère immortel [Weinberg, 96]. Cette étape est irréversible.

.dInvasion

Cette phase correspond à la perte d'adhésivité des cellules tumorales entre elles. Certaines cellules ou amas de cellules tumorales peuvent se disséminer localement ou par voie sanguine et lymphatique et coloniser secondairement d'autres organes. Ce sont des métastases.

Les étapes d'initiation, promotion, progression et invasion ne sont qu'une commodité pour décrire un phénomène probablement plus complexe et plus continu.

D'un point de vue prévention des tumeurs, une molécule de chimioprévention va pouvoir agir sur l'étape « d'initiation » par détoxification de l'agent initiateur ou protection organique ; ou sur l'étape « de promotion ». La promotion cancéreuse est l'étape ultime sur laquelle on peut agir afin de bloquer le déroulement de la cancérogenèse, au moyen de substances anti-promotrices ou en déterminant les promoteurs les plus répandus dans l'environnement et l'alimentation et en évitant de les consommer.

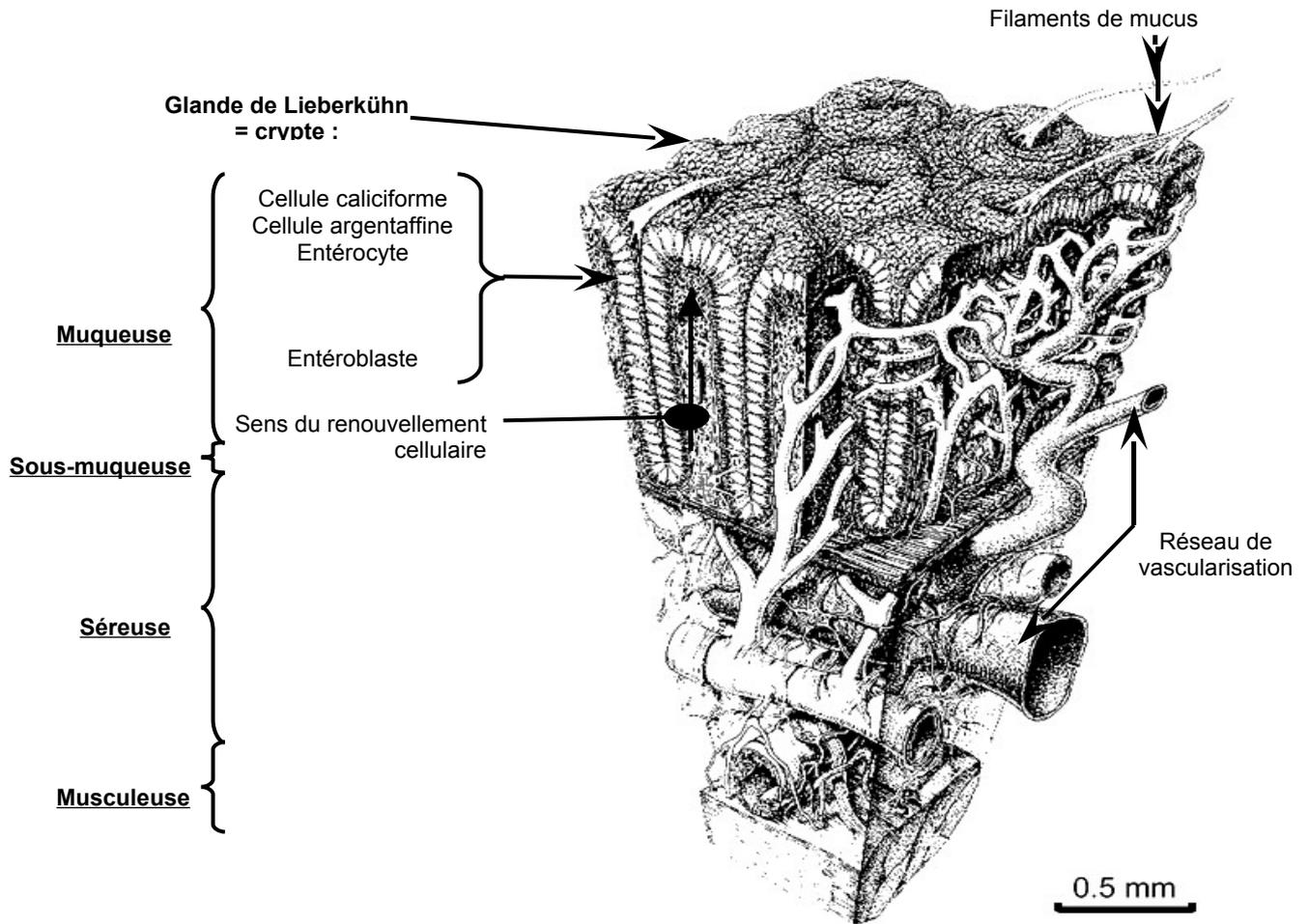


Figure n°2 : Architecture du côlon
[Krstić, 91]

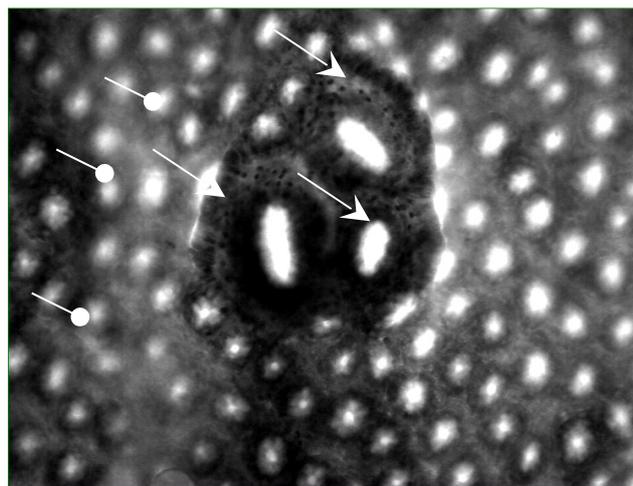


Image n°1 : Observation d'un foyer de cryptes aberrantes
au microscope optique (x100)

Le FCA est constitué de 3 cryptes aberrantes (→) de taille et d'affinité tinctoriale supérieures aux cryptes normales (●)

.III LE CANCER COLORECTAL

.A DÉFINITION

Le cancer colorectal est le nom donné à toutes tumeurs malignes se développant au niveau des parois du côlon et du rectum. Ce cancer est fréquent (sur 200 000 cancers diagnostiqués par an, 15% sont colorectaux), souvent diagnostiqué tardivement en raison de l'apparition tardive des manifestations cliniques, grave : le cancer colorectal répond faiblement à la chimiothérapie et la radiothérapie, l'intervention chirurgicale doit être précoce. Pour ces raisons, le taux de survie à 5 ans est inférieur à 45%. Les mesures de prévention sont donc nécessaires.

.B DONNÉES ANATOMO-PATHOLOGIQUES

.1 HISTOLOGIE

Le gros intestin est composé d'une muqueuse à épithélium glandulaire, d'une sous muqueuse et de deux couches musculaires longitudinale et circulaire. La muqueuse est creusée de nombreuses glandes de Lieberkühn constituées d'entérocytes, de cellules caliciformes à mucus, de cellules argentaffines endocrines et d'entéroblastes au fond de la crypte (**Cf. figure n° 2**). Des nœuds lymphatiques solitaires tapissent la muqueuse.

Les tumeurs colorectales sont des carcinomes glandulaires cylindriques ou atypiques, végétantes ou ulcéro-bourgeonnantes, à métastases hépatiques, pulmonaires, péritonéales voire osseuses. La prolifération cellulaire est plus importante dans un épithélium cancéreux que dans un épithélium normal alors que la différenciation cellulaire et l'apoptose y sont moins importants [Chang, 97 ; Weinberg, 96].

.2 LES MICROADÉNOMES : ÉTAT PRÉNÉOPLASIQUE

Chez les rongeurs, les adénocarcinomes du côlon sont observés un an après initiation par un cancérogène chimique. Mais de façon plus précoce, on observe des effets cellulaires (hyperprolifération, micronoyaux) ou moléculaires (adduits d'ADN, induction d'enzymes) ainsi que des anomalies tissulaires 15 jours après l'initiation : les microadénomes [Corpet, 96]. En 1987, Bird décrit une méthode qui consiste à colorer au bleu de méthylène le côlon fixé, non découpé, pour observer au microscope la surface de la muqueuse et les lésions pré-néoplasiques [Bird, 87]. Les microadénomes, ou foyer de cryptes aberrantes (FCA), présentent des atypies morphologiques et tinctoriales et semblent induits spécifiquement par les cancérogènes coliques [Bird, 87] (**Cf. image n°1**). Les cryptes aberrantes sont constamment présentes 10 jours après induction par l'azoxyméthane (AOM) [Wargovich, 92]. Leur nombre et taille peuvent être modulés par des moyens diététiques.

Pour ces raisons, la présence de microadénomes, ou foyer de cryptes aberrantes (FCA), semble révéler un état pré-néoplasique, précurseur d'adénomes et de cancer [Bird, 89]. L'induction de FCA et l'analyse de leur croissance au moyen de leur taille et leur structure histologique semble donc un marqueur valable dans l'identification d'initiateurs ou promoteurs potentiels de tumeurs [Bird, 89], si toutefois l'étude est confirmée en cancérogenèse classique [Corpet, 96]. La prise en compte de ces lésions précoces a permis d'accélérer fortement les recherches des relations entre aliments et cancer [Bird, 89]. Le système FCA permet une approche quantitative dans la caractérisation de l'évolution du cancer du côlon ou la classification d'agents promoteurs ou protecteurs [Bird, 00].

Les microadénomes sont une appellation restant néanmoins controversée. Elle ne sera pas utilisée.

Chez l'homme, de nombreuses études rapportent la présence de lésions ressemblant aux FCA observés chez les rongeurs de part leur atypie morphologique. Ces lésions sont corrélées à un risque élevé de développement d'un cancer du côlon [Bird, 95]. Il existe une corrélation entre le nombre de FCA, la présence de foyers de dysplasie et le nombre d'adénomes [Takayama, 98]. Les changements génétiques ayant lieu pendant la cancérogenèse colorectale se retrouvent dans cette population de FCA [Bird, 95]. Ces résultats supportent l'hypothèse que les FCA sont des lésions précoces du cancer du côlon.

.CEPIDÉMIOLOGIE

.1INTRODUCTION

Les cliniciens et les chercheurs portent depuis une vingtaine d'années un intérêt particulier au cancer du côlon. Ceci est lié au fait que c'est un cancer fréquent dont le pronostic reste sombre. Dans ce contexte, les données d'épidémiologie sont d'une grande importance. Elles apportent des renseignements sur la fréquence du cancer du côlon et sur l'évolution de cette fréquence avec le temps. Elles permettent également de connaître sa distribution géographique et de comparer son incidence à celle d'autres régions du monde. Les études épidémiologiques permettent d'identifier les groupes à risque élevé et les sujets à risque, et de connaître les facteurs prédisposants.

Ces données sont indispensables pour concevoir et analyser les enquêtes à visée étiologique ou pour envisager une politique de prévention ou de dépistage.

.2INCIDENCE DU CANCER COLORECTAL

Les chiffres utilisés ci-dessous sont fournis par l'OMS [Ferlay, 01].

.aFréquence

En France, le cancer colorectal se situe au premier rang des cancers pour les deux sexes, représentant près de 15% des 250 000 nouveaux cas de cancer diagnostiqués en 2000. On estime à près de 35 000 le nombre de nouveaux cas de cancers colorectaux dont 65% localisés au côlon, 35% au rectum. Depuis quelques années, le cancer est la première cause de décès avant les maladies cardio-vasculaires. Avec près de 17 000 décès en 2000, le cancer colorectal est le plus mortel après le cancer du poumon (24 000 décès).

.bDistribution géographique

Les données issues des différents départements permettent de comparer les distributions d'incidence du cancer colique en France. Les variations d'incidence étaient peu marquées, pour les deux sexes, entre les différents départements.

Ces données d'incidence peuvent également être comparées à celles issues d'autres régions du monde. 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 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.

.cEvolution de l'incidence des cancers du côlon

L'observation de l'évolution des taux d'incidence dans les autres régions du monde suggère que le cancer du côlon était en augmentation dans les pays à taux d'incidence élevé jusqu'au milieu des années 80, puis qu'il s'est stabilisé. Les données d'incidence les plus récentes, font état d'une augmentation de l'incidence du cancer colique en Europe et en Chine, ainsi qu'au Japon qui est maintenant un pays à risque élevé. Son incidence a diminué en Afrique.

.3FACTEURS DE RISQUE

.aSexe

Près d'un homme sur 2 et près d'une femme sur 3 a un cancer au cours de sa vie. Le cancer du côlon est caractérisé par une légère prédominance masculine, avec un sex-ratio voisin de 1,6.

Chez l'homme, sur 100 cancers, 86 sont localisés au poumon, à la bouche et au pharynx, 77 à la vessie et 54 au côlon et au rectum. L'incidence des cancers colorectaux est

de 38.8 / 100 000.

Chez la femme, la localisation la plus fréquente et responsable du plus grand nombre de décès est le sein. Vient ensuite le cancer colorectal avec une incidence légèrement inférieure à l'homme, soit 24.2 / 100 000.

.bAge

L'âge moyen d'apparition du cancer colorectal est de 70 ans. 6% des cancers colorectaux apparaissent avant 50 ans. 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. L'incidence est identique pour les deux sexes jusqu'à 65 ans, puis ce cancer devient prédominant chez les hommes. Le ratio d'incidence entre les deux sexes augmente régulièrement entre 55 ans et 75 ans, passant de 1,0 à 1,7, puis il diminue ensuite.

.cAlimentation

Les arguments en faveur du rôle de l'alimentation comme facteur de risque reposent pour la majeure partie sur les études épidémiologiques concernant d'une part l'analyse de la répartition géographique des cancers colorectaux et d'autre part l'étude des populations migrantes. Les résultats des études plaident contre une explication uniquement génétique des différences de risque, et en faveur du rôle de l'environnement, en particulier de l'alimentation.

➤ Facteurs associés à une augmentation du risque

Les effets néfastes de la viande rouge, largement répercuté par les médias, et dans une moindre mesure de la viande blanche et du poisson restent scientifiquement controversés. Il en va de même de la cuisson des viandes et des graisses qui seraient respectivement à l'origine d'amines hétérocycliques et de promoteur de la cancérogenèse [Boutron-Ruault, 98].

Il existe une association positive entre apport calorique élevé, obésité et risque de cancer colorectal dans la plupart des études. Cette relation serait expliquée par l'hyperinsulinisme et/ou la résistance à l'insuline. En effet, l'insuline stimule la croissance des cellules de la muqueuse colique et a été trouvée mutagène de cellules de carcinome colique *in vitro*. Les cellules de carcinome colique présentent des récepteurs IGF-1 (insulin and insulin-like growth factor-1) que l'insuline est capable d'activer [Boutron-Ruault, 98].

Une méta-analyse faisant la synthèse des études de corrélation entre cancer colorectal et consommation d'alcool fait apparaître un lien significatif mais faible [Boutron-Ruault, 98].

➤ **Facteurs associés à une diminution du risque**

Un faible poids fécal et un temps de transit lent sont considérés comme des facteurs de risque du cancer colorectal [Cummings, 92]. Une constipation peut multiplier par 4 le risque de cancer colorectal [Le Marchand, 98]. La consommation d'une alimentation riche en fibres protégerait contre ce cancer en augmentant l'excrétion fécale [Cummings, 92] et en impliquant une interaction entre fibres, bactéries intestinales et acides biliaires : l'acidification intestinale due à la dégradation des fibres par la flore bactérienne est peu favorable à la conversion des acides biliaires primaires en acides biliaires secondaires. Sous l'action des bactéries intestinales, les fibres sont dégradées en acides gras volatils, dont le butyrate. Celui-ci joue un rôle majeur comme agent de différenciation et d'apoptose. Il agit sur les mécanismes intracellulaires de régulation des oncogènes. Les fibres alimentaires jouent également un rôle dans le lest diminuant la concentration des cancérogènes au niveau du bol fécal [Boutron-Ruault, 98].

L'ensemble des données de la littérature est compatible avec un effet protecteur modéré du calcium et de la vitamine D sur le risque de cancer colorectal.

Les résultats concernant l'effet protecteur des vitamines anti-oxydantes (vitamines C et E, β -carotènes) sont discordants [Boutron-Ruault, 98].

L'effet protecteur des folates semble s'opérer à un stade précoce de la cancérogenèse, compatible avec l'hypothèse de leur rôle préventif sur la dysméthylation de l'ADN [Boutron-Ruault, 98].

L'effet protecteur des fruits et des légumes est un des résultats les plus constants des études à visée étiologique : ils sont riches en vitamines anti-oxydantes, en folates, en fibres alimentaires [Boutron-Ruault, 98].

.dInfections chroniques

Infections virales, bactériennes ou infestation parasitaires chroniques maintiennent localement une inflammation qui expose de façon prolongée les tissus à des agents cancérogènes. Les maladies inflammatoires de l'intestin sont liées à un risque accru de cancer [Mullin, 97]. La flore bactérienne anaérobie de l'intestin produit des fécapentaènes,

substances fortement génotoxiques d'autant plus abondantes dans l'intestin que le régime alimentaire est riche en graisse [Decloître, 93].

.ePrédispositions génétiques

Le cancer du côlon est caractérisé par une légère prédominance masculine, avec un sex-ratio voisin de 1,6.

Les sujets ayant un ou plusieurs parents du premier degré (pères, mères, frères, sœurs, enfants) atteints d'un cancer colorectal ont un risque d'être atteint de ce cancer plus élevé que ceux de la population générale.

La présence d'adénomes colorectaux est un facteur de risque de cancer colorectal pour la fratrie et/ou les parents de ces sujets. Les polypes adénomateux préexistent dans 60 à 80% des cas. La prédisposition génétique au cancer colorectal concerne l'augmentation de taille des adénomes.

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 élevé chez les sujets atteints d'un adénome avec structures villosités ou de plus d'un centimètre de diamètre ou si ces adénomes sont multiples. Par contre, chez 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.

Dans 2 à 5% des cas, le cancer colique survient dans un contexte d'agrégation familiale, évoquant le rôle d'un facteur génétique. Les maladies prédisposant au cancer colorectal sont des maladies héréditaires, dont la transmission est autosomique dominante, à forte pénétrance, et à expressivité variable. Actuellement, deux maladies associées aux gènes majeurs de susceptibilité du cancer colorectal ont été identifiées : la polypose adénomateuse familiale (FAP) et le syndrome de Lynch ou syndrome HNPCC, (hereditary non polyposis colorectal cancer).

➤ La polypose adénomateuse familiale (FAP)

Moins de 1 % des cancers colorectaux sont imputables à la FAP. Cette maladie est caractérisée par le développement, surtout après la puberté, de plusieurs centaines de polypes adénomateux bénins tapissant la muqueuse intestinale. La transformation maligne est inéluctable. Dans la FAP, il s'agit d'une mutation constitutionnelle d'un gène APC (adenomatous polyposis coli) situé sur le bras long du chromosome 5 qui affecte le taux de cellules initiées [Kinzler, 96].

➤ **Le syndrome HNPCC ou syndrome de Lynch**

1 à 5% des cancers colorectaux surviennent dans le cadre d'un syndrome HNPCC. Dans le syndrome HNPCC, les gènes mutés appartiennent à la famille des gènes impliqués dans le système de réparation des mésappariements de l'ADN et affectent la progression tumorale [Kinzler, 96].

.Interactions gènes-environnement

Des expositions potentiellement cancérogènes peuvent affecter les individus de diverses façons. Des différences de patrimoine génétique jouent un rôle dans ces variations. Les facteurs héréditaires semblent donc déterminer la susceptibilité de l'individu au cancer et aux adénomes coliques, tandis que l'exposition aux facteurs environnementaux déterminera quels individus prédisposés développeront des petits adénomes, des gros adénomes et finalement un cancer colorectal.

.DAPPROCHE MÉDICALE

.1CLINIQUE

Chez les patients atteints de cancer colorectal, les signes habituels, tardifs, comprennent des troubles du transit, des douleurs abdominales, des hémorragies intestinales, une anémie hypochrome, une altération de l'état général.

.2DIAGNOSTIC

Le diagnostic est fait à partir de symptômes dans près de 71% des cas, en urgence dans 15 à 18% des cas. Environ 7 % des cancers sont de découverte fortuite [X, 98].

.aLa coloscopie

La coloscopie reste l'examen complémentaire et l'outil de diagnostic de référence. Elle permet la visualisation de la tumeur et la confirmation histologique du cancer par les biopsies, le diagnostic des lésions associées (cancers synchrones dans 3 à 5% des cas, adénomes dans 20 à 30% des cas), le traitement par exérèse endoscopique des adénomes [X, 98].

.bLe lavement opaque

Lorsque la coloscopie est contre-indiquée (en cas de syndromes occlusifs aigus), de réalisation difficile ou incomplète (sujets âgés, patients avec pathologies multiples), le lavement opaque est un outil de diagnostic de choix.

.cBilan pré-thérapeutique

Il comprend la recherche de métastases à distance (hépatiques, pulmonaires, péritonéales et éventuellement osseuses) et d'antécédents familiaux. L'existence d'un gène prédisposant doit être systématiquement évoquée devant l'une au moins de ces trois situations : âge au diagnostic du cancer colorectal inférieur à 50 ans, antécédents tumoraux personnels, agrégation familiale de cancers colorectaux et d'autres sites. Il importe dans ces cas de reconstituer l'arbre généalogique du sujet pour déterminer s'il s'agit bien d'une forme familiale.

.3TRAITEMENT

La méthode de choix pour un traitement curatif est l'exérèse chirurgicale. Les traitements adjuvants sont la chimiothérapie systémique et la radiothérapie loco-régionale, à moduler selon le grade de la tumeur et le bilan d'extension. Ces traitements permettent une réduction importante du taux de récurrence et de mortalité.

Le traitement palliatif consiste à éviter l'occlusion de façon chirurgicale.

La surveillance consiste à dépister précocement une récurrence locale, une métastase ou une deuxième tumeur par des examens cliniques, des échographies hépatiques, des radiographies pulmonaires et des coloscopies totales régulières.

.4PRONOSTIC

L'étude anatomo-pathologique de la pièce d'exérèse est capitale pour l'évaluation du pronostic et la décision thérapeutique. Le taux de survie à 5 ans est de 45 à 50% des cas. Celui-ci varie selon la topographie de la tumeur et le bilan d'extension. Sont de mauvais pronostic les localisations basses et les bilans d'extension positifs.

.5PRÉVENTION ET DÉPISTAGE

D'après l'OMS, la prévention primaire vise à limiter les cas de maladie, généralement en empêchant l'exposition aux facteurs de risque connus. Elle vise donc à contrôler l'alimentation, le parasitisme, les inflammations chroniques.

La prévention secondaire consiste à limiter les conséquences néfastes de la maladie grâce à une intervention avant l'apparition des symptômes ou rapidement après. La prévention secondaire englobe donc la détection précoce de la maladie par le dépistage et des mesures curatives.

L'Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé (ANES) propose différentes recommandations selon la population concernée [X, 98].

.aPopulation à risque moyen

L'endoscopie, technique utilisée pour le diagnostic des maladies intestinales, ne répond pas aux critères d'acceptabilité et d'innocuité d'un test de dépistage [X, 98]. L'objectif d'un dépistage de masse est de détecter parmi 10 000 personnes en bonne santé de plus de 50 ans, les 50 personnes atteintes d'un cancer encore asymptomatique.

La recherche d'un saignement occulte dans les selles tous les deux ans est la seule méthode adéquate et la mieux évaluée. C'est une méthode simple, bien acceptée, sans danger, d'un coût faible et d'une certaine efficacité. Le test Hemocult II® a une sensibilité et une spécificité acceptables dans le cadre de campagnes de dépistage de masse soumises à des conditions strictes de réalisation. Il permet de découvrir environ la moitié des cancers asymptomatiques, habituellement à un stade où l'exérèse chirurgicale permet la guérison. L'autre moitié sera découverte à l'occasion de symptômes, dans les 2 ans suivant le test de dépistage. Dans une population de plus de 50 ans, le taux de positivité du test est de 1,5 à 2%.

En cas de test positif, il faut faire une coloscopie pour identifier la cause du saignement. Après un test Hemocult II® positif, la coloscopie découvre un cancer dans 10% des cas, un gros adénome (à haut risque de transformation maligne) dans 20% des cas.

.bPopulation à risque élevé

Le niveau de risque élevé est défini comme le risque des patients ayant des antécédents personnels d'adénome ou de cancer colorectal ou celui des sujets ayant un ou plusieurs parents du premier degré atteints d'un cancer colorectal ou d'un adénome de plus de 1 cm.

Il est conseillé une coloscopie de dépistage chez tout apparenté au premier degré d'un malade atteint de cancer colorectal avant 60 ans, ou si deux parents au premier degré sont atteints d'un cancer colorectal quel que soit l'âge du diagnostic. La coloscopie est faite à partir de 45 ans, ou 5 ans avant l'âge du diagnostic du cas index. Après une coloscopie normale, une surveillance tous les 5 ans est suffisante.

.cPopulation à risque très élevé

Le niveau de risque très élevé est caractérisé par le risque des sujets appartenant à une famille atteinte de cancers à transmission héréditaire autosomale dominante à forte pénétrance et expressivité variable.

Dans la polypose familiale (FAP) et le syndrome de cancer colique familial sans polypose (HNPCC), l'analyse moléculaire de la mutation constitutionnelle délétère (gène APC sur le bras du chromosome 5) peut être recherchée chez le sujet index avec son consentement ; de même chez les apparentés informés d'un résultat positif par le sujet

index. Les sujets ayant bénéficié d'un test génétique et non porteurs de la mutation familiale doivent être suivis comme la population générale. Dans la PAF, la détection se fait par rectosigmoïdoscopie souple annuelle à partir de la puberté jusqu'à l'âge de 40 ans. Une exérèse totale du côlon avec anastomose iléo-anale est proposée au début de l'âge adulte chez les sujets atteints, en raison d'un risque de cancer colorectal proche de 100%. Dans le HNPCC, les recommandations internationales actuelles de surveillance proposent une coloscopie totale tous les 2 ans, dès l'âge de 25 ans, ou 5 ans avant l'âge au moment du diagnostic du cas le plus précoce dans la famille ; un examen gynécologique annuel après l'âge de 30 ans avec échographie endo-vaginale complétée d'un frottis aspiratif.

Des progrès considérables 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, notamment grâce aux études épidémiologiques et à l'utilisation de modèles animaux. Les données parfois discordantes ne permettent pas encore de faire des recommandations de prévention reposant sur des bases indiscutables.

A court terme, un programme de prévention secondaire par la recherche d'un saignement occulte dans les selles chez les sujets à risque moyen, par coloscopie chez les sujets à risque élevé et très élevé, devrait permettre de réduire la mortalité par cancer colorectal. Le dépistage de masse du cancer colorectal devrait bientôt être une réalité en France.

A long terme, une synthèse entre les apports de l'épidémiologie nutritionnelle, de la physiologie intestinale et de la biologie moléculaire devrait aboutir à une prévention primaire sûre et efficace de ce cancer.

Deuxième chapitre :
les polyéthylènes-glycols

Les propriétés physico-chimiques et biologiques des polyéthylènes-glycols (PEGs) sont exploitées dans de nombreux secteurs de l'industrie.

.IPROPRIÉTÉS DES POLYÉTHYLÈNES-GLYCOLS

.APROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES

.1STRUCTURE

Les polyéthylènes glycols (PEGs) sont des molécules linéaires formés par la répétition d'un motif d'oxyde d'éthylène : $H(O-CH_2-CH_2)_n-OH$ ou n varie de 1 à 500 suivant le poids moléculaire du PEG.

Les pluronics dérivent des PEGs. Ils sont formés d'un bloc d'oxyde de propylène entre deux blocs de PEG de longueur variable.

.2NOMENCLATURE ET PRÉSENTATION

Le PEG est suivi d'un nombre représentant son poids moléculaire moyen (de 200 à 58 000 Daltons) dont dépend sa forme physique. Le PEG peut être liquide (faibles poids moléculaires de 200 à 600 Da), pâteux (poids moléculaires intermédiaires) ou solide (hauts poids moléculaires de 800 à 58 000 Da). Les PEGs solides sont présentés sous forme d'écaillés ou de poudre.

.3SYNTHÈSE

L'oxyde d'éthylène, molécule très réactive à l'origine de la synthèse des PEGs, est obtenue par réaction entre l'éthylène et l'oxygène. La polymérisation catalysée par le sodium aboutit à la formation de chaînes de PEG plus ou moins longues selon la durée de la réaction. La relative simplicité de la réaction mise en jeu fait du PEG une molécule peu onéreuse.

.4PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES

Les PEGs et leurs dérivés sont des composés non ioniques. Les PEGs sont des polymères hydrophiles, les pluronics sont des polymères à la fois hydrophiles et hydrophobes. A température ambiante, les PEGs sont complètement solubles dans les solutions aqueuses et le chloroforme. Ils forment des complexes avec les ions métalliques. Le caractère hygroscopique des PEGs leur confère une activité osmotique importante en solution.

Les PEGs de faible poids moléculaire ont une conformation en zigzag, alors que les PEGs de hauts poids moléculaires forment des replis aléatoires. Ils peuvent encapsuler des composés hydrophobes par orientation des éléments $-CH_2-CH_2-$ et $-O-$ vers les molécules

respectivement lipophiles et hydrophiles.

.BPROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES

.1ABSORPTION ET MÉTABOLISATION

Les PEG de haut poids moléculaire ne sont ni absorbés, ni métabolisés, ni fermentés par les bactéries au niveau du TD [Hammer, 89 ; Bernier, 97 ; Schiller, 99]. Ainsi, chez le rat, l'absorption du PEG 4000 est de 0.6% au niveau du jéjunum et iléum, de 0.2% au niveau du côlon [Winne, 82].

Le PEG 400 a été utilisé pour la première fois comme marqueurs de perméabilité passive de l'intestin grêle par Chadwick [Chadwick, 77]. D'autres auteurs ont testé la perméabilité des PEGs de poids moléculaires supérieurs [Parlesak, 94 ; Schiller, 97]. Quand la fonction de barrière intestinale est compromise, l'intestin présente une perméabilité anormalement accrue [Chadwick, 77 ; Schiller, 97].

.2TOXICITÉ ET EFFETS INDÉSIRABLES

La toxicité des PEGs est très faible et diminue d'autant plus que le poids moléculaire est élevé. Les PEGs de hauts poids moléculaires ont une DL₅₀ supérieure à 50g/kg chez le rat. Chez l'homme, il y a peu de rapports sur des effets secondaires à la consommation de PEG. Un cas de réaction anaphylactique possible a été reporté [Schuman, 91] ainsi qu'un cas de réaction d'urticaire [Brullet, 92].

Les effets indésirables sont une augmentation de la fréquence et du poids moyen des déjections, une diminution de la consistance par augmentation de la teneur en eau de dilution [Bernier, 97]. Aucun changement sur l'excrétion d'électrolytes n'a été observé [Hudziak, 96].

.III UTILISATIONS DES POLYÉTHYLÈNES GLYCOLS

.AU UTILISATIONS MÉDICALES

Les PEGs sont utilisés dans l'industrie pharmaceutique comme liants pour les cachets, adoucissant des épithéliums dans des solutions de lavage des lentilles de contact, adjuvants dans les pommades et suppositoires ou en tant que vecteur de molécules diverses, notamment les médicaments anticancéreux. Par exemple, les PEGs forment des liaisons covalentes avec la daunorubicine et augmentent son temps de demi-vie dans le sang en diminuant son excrétion, et favorisent la pénétration sélective des molécules dans les cellules cancéreuses. Les PEGs augmentent la stabilité des liposomes.

Ils sont utilisés en physiologie comme marqueur dans les explorations physiologiques de l'intestin grêle [Chadwick, 77 ; Parlesak, 94 ; Schiller, 97], en médecine comme laxatifs osmotiques en préparation aux explorations endoscopiques, radiologiques ou aux interventions chirurgicales [Schiller, 99]. Aujourd'hui, ils sont utilisés en traitement de la constipation ou des intoxications. Ils sont utilisés pour le traitement des surfaces exposées à du matériel biologique pour les rendre plus inertes.

.BAUTRES UTILISATIONS

Les PEGs de faible poids moléculaire sont essentiellement utilisés comme lubrifiant dans l'industrie des métaux. Ils sont aussi représentés dans de nombreux secteurs industriels pour leurs propriétés humidifiantes ou diluantes : l'industrie pharmaceutique, les cosmétiques, les détergents et savons, l'industrie textile, l'industrie céramique, l'industrie du caoutchouc, les adhésifs, les peintures, l'industrie du papier, l'industrie agroalimentaire, la restauration et la conservation du bois.

Les PEGs sont utilisés dans les études biophysiques de macromolécules (ADN, lipides, protéines). Ils établissent une pression osmotique telle que les molécules sont contraintes à une plus grande proximité. Le PEG est aussi utilisé pour initier la fusion cellule-cellule dans la production de cellules somatiques hybrides, et la fusion cellule de culture-érythrocyte ou liposome véhiculant des macromolécules [Lentz, 92 ; 94]. Dans les bioréacteurs sous agitation, les PEGs et surtout les pluronics ont la capacité de protéger les cellules animales cultivées des dommages causés par les chocs mécaniques [Michaels, 91 ; McDowell, 98].

.III EFFET PROTECTEUR DU PEG CONTRE LA CANCÉROGÈNE COLORECTALE CHEZ LE RAT

Un faible poids fécal et un temps de transit lent sont considérés comme des facteurs de risque du cancer colorectal [Cummings, 92]. Une constipation peut multiplier par 4 le risque de cancer colorectal [Le Marchand, 98]. La consommation d'une alimentation riche en fibres protégerait contre ce cancer en augmentant l'excrétion fécale [Cummings, 92] et l'humidité des fèces. La dilution du bol fécal diminuerait à la fois la concentration des produits cancérigènes in situ, le temps de transit et le temps de contact des produits cancérigènes avec la muqueuse colique. C'est cette hypothèse qui a été émise pour expliquer l'effet paradoxalement protecteur du bacon dont la consommation s'accompagne d'une augmentation de la quantité d'eau bue [Parnaud, 98, 00]. Pour vérifier cette hypothèse, le pouvoir protecteur de différents laxatifs contre la cancérogenèse colorectale, dont le PEG, a été testé.

.A HISTORIQUE

.1 MISE EN ÉVIDENCE DE L'EFFET PROTECTEUR

Les études qui ont mené à la mise en évidence de l'effet protecteur du PEG contre la cancérogenèse colorectale ont utilisé le rat comme modèle et, dans un premier temps, les FCA comme marqueurs précoces de la cancérogenèse colorectale. Dans un deuxième temps, des études de cancérogenèse accélérée et classique ont été entreprises pour confirmer les résultats des premières sur le long terme.

Le PEG diminue fortement le nombre total de foyers de cryptes aberrantes (FCA), supprime quasi totalement les FCA de taille supérieure à 1 crypte et diminue la taille moyenne des FCA par rat [Parnaud, 99 (2)] : on constate 20 fois moins de FCA et 100 fois moins de gros FCA chez les rats induits à l'azoxyméthane (AOM) que chez les rats témoins [Corpet, 99]. Dans ce modèle, le PEG se révèle 10 fois plus puissant que les autres agents de chimioprévention déjà connus [Corpet, 99].

Le PEG réduit fortement l'incidence et le nombre de tumeurs colorectales par rat et supprime totalement l'apparition de cancers invasifs dans un modèle de cancérogenèse accélérée [Parnaud, 99 (2)] et classique [Corpet, 00]. Le PEG semble n'avoir aucune action protectrice contre les tumeurs de l'intestin grêle [Parnaud, 99 (1)]. Ces études confirment le fait que les FCA ou les gros FCA sont des marqueurs intermédiaires valables des cancers colorectaux chez le rat.

.2 CARACTÉRISATION DE L'EFFET PROTECTEUR

L'effet préventif du PEG a été testé dans différentes conditions expérimentales et a conduit aux résultats suivants :

➤ **Au niveau des FCA (nombre et taille) :**

- L'effet préventif est bien dû au PEG lui-même : quel que soit le fournisseur l'effet préventif a été retrouvé [Parnaud, 99 (1)].

- L'effet préventif semble d'autant plus important que le poids moléculaire est élevé, jusqu'à un poids moléculaire de 15000 Da avec un maximum d'effet pour un poids moléculaire de 8000 Da. Les PEGs de petits poids moléculaires seraient absorbés par diffusion passive et facilitée le long du TD d'où une diminution de la concentration de PEG dans le côlon [Parnaud, 99 (1)]. Ceci expliquerait l'effet moindre des PEGs de faibles poids moléculaires.

- L'effet préventif est visible quel que soit le régime alimentaire mais semble moins important avec un régime riche en fibres. Un régime riche en fibres augmente l'excrétion fécale, l'humidité des fèces d'où une dilution du PEG [Parnaud, 99 (1)].

- L'effet préventif est retrouvé quel que soit le sexe des rats induits [Parnaud, 99 (2)].

- Le PEG prévient aussi bien la croissance des FCA initiés par un cancérogène indirect (amine hétérocyclique : 2-amino-3,4-diméthylimidazo [4,5-f] quinoline) que direct (nitrosamine : N-méthyl-N-nitrosurée). Il n'y a aucune inhibition de la cancérogenèse quand le PEG est donné seulement avant ou pendant l'injection du cancérogène. Le PEG n'agit donc pas sur la phase d'initiation, donc pas par détoxification ou métabolisation du cancérogène [Corpet, 00].

- L'effet protecteur du PEG sur les FCA est dose-dépendant et est d'autant plus grand que sa concentration est élevée [Parnaud, 99 (2)].

- L'inhibition de la croissance des FCA par le PEG est temps-dépendante et apparaît déjà de façon significative après 3 jours de traitement [Parnaud, 99 (1) ; Corpet, 00].

- L'effet est réversible : en l'absence de traitement, les FCA qui n'étaient qu'inhibés

ou ralentis par le PEG peuvent reprendre leur croissance [Parnaud, 99 (1) ; Corpet, 00].

- L'effet du PEG dépend de la localisation des FCA : le PEG divise le nombre de FCA par 11 dans les 5 premiers centimètres du côlon distal (partie du côlon la plus sujette aux cancers chez l'homme) et d'un facteur 3.2 dans la partie proximale du côlon [Parnaud, 99 (1)]. Ceci peut s'expliquer par la dilution croissante du PEG du côlon proximal au côlon distal par absorption d'eau.

➤ **Au niveau cellulaire :**

- La morphologie des cellules en culture (condensation de la chromatine, cellules plus petites, présence de corps apoptotiques) après traitement par le PEG sont en faveur d'une stimulation de l'apoptose par le PEG. Ces observations ont été confirmées *in vivo* par la méthode TUNEL [Parnaud, 99 (1)]. Le PEG induit l'apoptose des cellules HT-29 [Roy, 01].

- Le PEG diminue significativement la hauteur des cryptes (le nombre de cellules par cryptes) [Parnaud, 99 (1)].

De façon paradoxale, le PEG a deux effets considérés comme susceptibles de favoriser la cancérogenèse :

- Le PEG stimule la prolifération cellulaire *in vivo* (marquage au BrdU, nombre de mitoses par crypte, observation de la zone de prolifération) [Parnaud, 99 (1)].

- Le PEG n'augmente pas la différenciation cellulaire *in vivo* et semblerait même la diminuer [Parnaud, 99 (1)].

.B CONCLUSION SUR L'EFFET PRÉVENTIF DU PEG

L'effet préventif du PEG observé chez le rat n'est pas significatif chez des souris *min* dont le gène APC est muté et qui présentent spontanément des adénomes dans l'intestin [Naigamwalla, 01]. Son caractère réversible diminue l'intérêt et l'importance du PEG comme agent chimiopréventif mais c'est la première fois qu'un effet inhibiteur si rapide et si efficace est observé. Le PEG n'exerce qu'une action d'inhibition de la croissance des FCA et n'empêche pas la formation de cellules initiées par les cancérogènes chimiques [Parnaud, 99 (2)]. Son effet préventif n'a lieu que durant la phase de post-initiation ou de promotion.

Ainsi le PEG peut être considéré comme un agent supprimeur d'après Wattenberg [Wattenberg, 92]. Le pluronic F68, dérivé du PEG, est efficace chez le rat et la souris, est capable d'éliminer totalement les FCA induits par l'AOM et semble être un agent de chimioprévention 5 fois plus puissant que le PEG [Parnaud, 01 (2)]. Les PEGs et leurs

dérivés semblent être aujourd'hui les plus puissants agents de prévention connus [Corpet, 99].

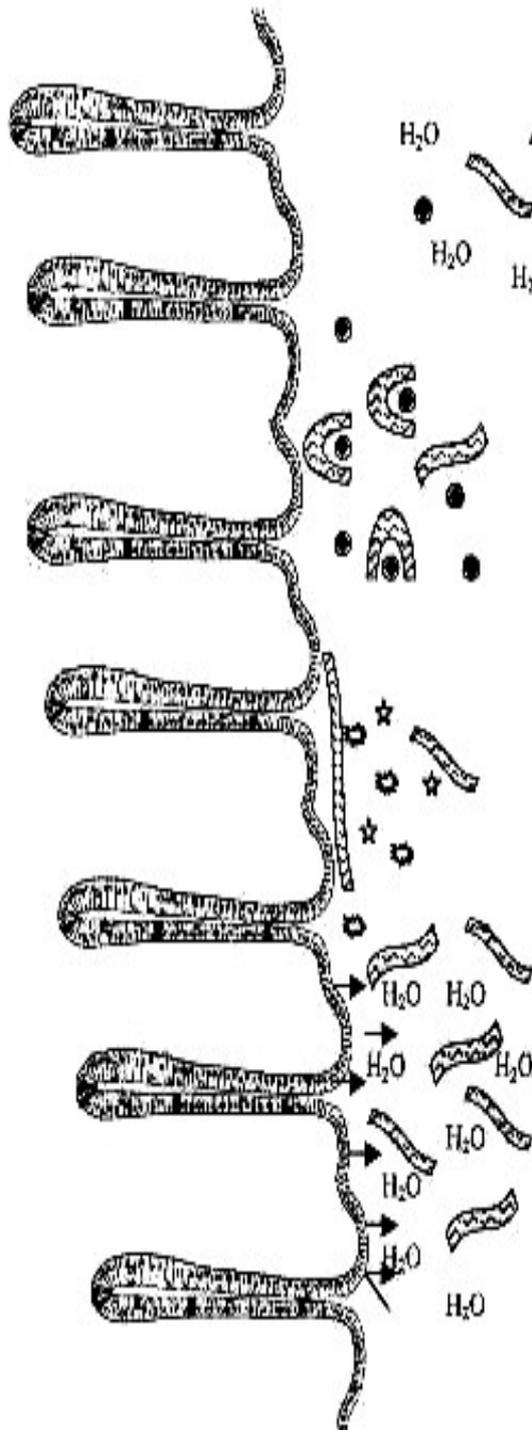
L'important effet protecteur du PEG contre la cancérogenèse colorectale chez le rat a largement été démontré et caractérisé. La protection par le PEG contre la cancérogenèse colorectale chez le rat semble s'opérer par régression des FCA (en taille et en nombre) dans le côlon de rats induits par un cancérigène. L'incidence, le nombre de tumeurs colorectales et de cancers invasifs sont nettement diminués par le PEG dans des modèles de cancérogenèse accélérée et classique.

L'effet du PEG est d'autant plus important que son poids moléculaire et sa concentration sont élevées. Il est précoce et réversible. Il ne dépend pas du sexe, du cancérigène, du régime alimentaire, de la localisation des FCA.

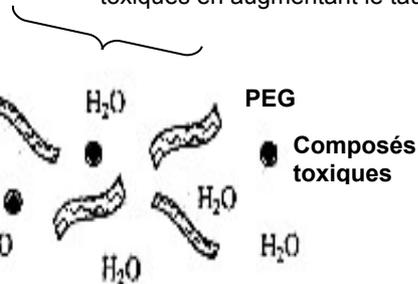
Sa faible toxicité en fait un candidat potentiel aux essais cliniques chez l'homme. La recherche son mécanisme d'action est l'étape nécessaire avant ces essais cliniques.

Muqueuse/séreuse

Contenu colique = fèces



A.1. Le PEG dilue les acides biliaires et les composés toxiques en augmentant le taux d'humidité des fèces.



A.2. Le PEG encapsulerait les acides biliaires, les empêchant ainsi d'endommager les membranes cellulaires

B.1. Glissement et lubrification

B.2. Le PEG formerait un film à la surface de la muqueuse colique, prévenant ainsi l'érosion par des particules abrasives

B.3 Le PEG restituerait les jonctions serrées réduisant l'inflammation, les mutations et la prolifération cancéreuse ; restaurerait les communications intercellulaires à l'origine de l'apoptose des cellules cancéreuses et d'une prolifération compensatoire.

B.4. Le PEG favoriserait la réparation membranaire imperméabilisant les cellules et réduisant la prolifération.

B.5. Le PEG exerce une pression osmotique qui contraint les cellules à utiliser leur système de régulation du volume intercellulaire :

Ainsi les cellules dépenseraient toute leur énergie pour réguler leur volume entraînant une diminution des divisions cellulaires.

La régulation du volume étant plus difficile chez les cellules cancéreuses, celles-ci vont se contracter et entraîner un manque de cohésion dans le FCA, d'où l'élimination progressive des cellules initiées.

La prolifération cellulaire serait compensatoire.

Figure n°3 : Schéma récapitulatif des hypothèses mécanistiques émises sur l'effet préventif du PEG [D'après Parnaud, 99 (1)]

.IV HYPOTHÈSES SUR LE MÉCANISME DE L'EFFET PROTECTEUR DU PEG CONTRE LA CANCÉROGÈNE COLORECTALE CHEZ LE RAT

Les agents protecteurs peuvent agir de différentes façons et à différents niveaux sur la cancérogenèse [Kelloff, 94] :

- **Blocage** : Leur activité bloque le cancérogène par inhibition de son activation s'il s'agit d'un pro-cancérogène, par sa désactivation ou sa détoxification. Ce mécanisme intervient avant la phase d'initiation.

- **Anti-oxydation ou anti-inflammation** : Leur activité anti-oxydante ou anti-inflammatoire permet de piéger des radicaux oxygénés, des réactifs électrophiles ou d'inhiber le métabolisme de l'acide arachidonique générateur de radicaux libres. Ce mécanisme intervient pendant la phase d'initiation, de promotion et de progression.

- **Suppression** : Leur activité bloque la prolifération et la progression par modulation du signal de transduction, inhibition de l'activité des oncogènes, inhibition de la prolifération cellulaire, induction de l'apoptose, de la différenciation cellulaire. Ce mécanisme intervient après la phase d'initiation.

Le PEG peut potentiellement agir sur ces trois niveaux mais l'essentiel de l'effet protecteur du PEG a lieu en phase de post-initiation [Parnaud, 99 (2)]. De plus, le PEG ne présente pas d'activité anti-oxydante et anti-inflammatoire sur les cellules normales *in vivo* [Parnaud, 99 (1)]. Ces remarques restreignent le mécanisme d'action du PEG au dernier niveau.

Nous envisagerons maintenant les hypothèses qui peuvent expliquer l'effet protecteur du PEG en s'appuyant sur les propriétés physico-chimiques et biologiques des PEGs. La **figure n°3** résume les hypothèses exposées ci-dessous.

.A EFFET DU PEG SUR LE CONTENU INTESTINAL

.1 DILUTION DES AGENTS PROMOTEURS

Le PEG pourrait réduire l'action des agents promoteurs sur les cellules coliques en les diluant dans la phase aqueuse des fèces et en accélérant le transit intestinal, diminuant ainsi le temps de contact des agents promoteurs avec la muqueuse colique.

➤ **En faveur de l'hypothèse « dilution »**

Le PEG retient l'eau par des liaisons hydrogènes augmentant la quantité de fèces, le poids fécal et cæcal et la quantité d'eau de dilution dans les fèces [Corpet, 99 ; Parnaud, 99 (2) ; Hammer, 89 ; Bernier, 97]. Le PEG dilue les acides biliaires et réduit de 3 fois la toxicité de l'eau fécale [Corpet, 99].

➤ **En défaveur de l'hypothèse « dilution »**

L'effet protecteur n'est pas corrélé avec le poids cæcal et fécal ou la teneur des fèces en eau si on teste d'autres molécules à fort pouvoir hygroscopique (Poly-Vinyl-Ppyrrolidone, Carboxy-Méthyl-Cellulose, gomme de karaya...) [Parnaud, 99 (1)]. Certaines fibres alimentaires comme le psyllium diluent les fèces autant que le PEG mais montrent une protection controversée, [Boutron-Ruault, 98]. Le carborundum mime les effets des fibres mais ne diminue pas la cancérogenèse colorectale [Corpet, 97]. La consommation de laxatifs de lest (gomme de karaya, psyllium, kaolin) favorise parfois le développement des FCA [Parnaud, 99 (1)]. L'action rapide et très efficace du PEG sur les FCA ainsi que son effet essentiel en phase de post initiation sont en défaveur de cette hypothèse.

.2ENCAPSULATION DES AGENTS PROMOTEURS

Le PEG a la capacité de séquestrer des molécules hydrophobes, potentiellement promotrices, en formant des vésicules.

➤ **En faveur de l'hypothèse « encapsulation »**

La structure chimique et les propriétés tensioactives et de surfactant des PEGs sont en faveur de cette hypothèse.

➤ **En défaveur de l'hypothèse « encapsulation »**

Le polyoxyéthylène 100 stéarate et 100 stéaryl éther, de structures voisines des PEGs, ne protègent pas autant que les PEGs [Parnaud, 99 (1)]. L'action rapide et très efficace du PEG sur les FCA ainsi que son effet essentiel en phase de post-initiation sont en défaveur de cette hypothèse.

.BEFFET DU PEG SUR LA MUQUEUSE OU LA SURFACE CELLULAIRE

.1GLISSEMENT ET LUBRIFICATION

Le PEG protégerait la muqueuse colique des abrasions dues au bol fécal en facilitant le glissement et la lubrification des fèces.

➤ **En faveur de l'hypothèse « lubrification »**

Un faible poids fécal et un temps de transit lent sont considérés comme des facteurs de risque du cancer colorectal [Cummings, 92]. Une constipation peut multiplier par 4 le risque de cancer colorectal [Le Marchand, 98]. Le PEG ramollit les selles en augmentant leur teneur en humidité, accélère le transit intestinal et facilite la défécation [Bernier, 97]. Le PEG a des propriétés lubrifiantes.

➤ **En défaveur de l'hypothèse « lubrification »**

Comme indiqué ci-dessus, il n'existe pas de corrélation entre la teneur des fèces en eau et l'effet protecteur si on teste d'autres laxatifs [Parnaud, 99 (1)]. L'huile de paraffine, laxatif lubrifiant, ne présente aucun effet protecteur contre les FCA chez le rat [Parnaud, 99 (1)]. Le PEG agit pendant la phase de post-initiation.

.2FILM PROTECTEUR

Les détergents étudiés par Lugea (Brij 35 contenant 5% de polyoxyéthylène 23 lauryl éther) diminuent l'hydrophobicité à la surface de l'épithélium colorectal et augmentent la perméabilité des cellules [Lugea, 00]. Les surfactants exogènes testés (tripalmitine additionné de dipalmitoyl-phosphatidylcholine) agissent inversement. Je n'ai pas réussi à savoir si le PEG est un détergent ou un surfactant. Le PEG détergent entraînerait une augmentation de l'influx de radicaux libres, de nitrosations, des stimulations par les autres cellules conduisant à l'apoptose des cellules anormales. Le PEG surfactant protégerait les cellules épithéliales. Mc Neil propose l'hypothèse suivante : les cellules en surface de la muqueuse sont agressées par les composants de la lumière colique et expulsées [McNeil, 89]. La prolifération accrue des cellules souches mutées répondrait à l'élimination des cellules de surface. Le PEG, en réparant ou protégeant les cellules de surface « calmerait » la prolifération de cellules souches mutées [Bruce, 01].

.3EFFETS SUR L'ÉPITHÉLIUM

.aRestitution de l'épithélium

La réparation des discontinuités de l'épithélium induites chimiquement est normalement rapidement réalisée en 30 à 60 minutes par la migration des cellules survivantes [McNeil, 89]. La migration cellulaire est reconnue comme un composant important dans la réparation des effractions pour de nombreux tissus [McNeil, 89].

Les jonctions serrées assurent la cohésion de l'épithélium. Il existe une relation entre l'altération de la fonctionnalité des jonctions serrées et le développement de tumeurs épithéliales [Mullin, 97]. Une perméabilité paracellulaire anormale permet le passage de ligands, notamment les facteurs de croissance, depuis la lumière colique à la face baso-

latérale de l'épithélium et à l'espace interstitiel. L'augmentation de la surface épithéliale exposée serait à l'origine d'une inflammation locale favorisant les mutations et la prolifération cancéreuse [Mullin, 97].

Le PEG pourrait rétablir la cohésion de l'épithélium [Lentz, 94]. Le PEG pourrait suppléer les jonctions serrées et restaurer l'imperméabilité de l'interstitium vis à vis de la lumière colique, réduisant l'inflammation, les mutations et la prolifération cancéreuse [Bruce, 01].

.bEffet sur les communications intercellulaires

Laboisse a pu restaurer les caractéristiques de la différenciation d'une lignée de cellules coliques cancéreuses par un traitement au PEG [Laboisse, 88].

D'après Parnaud, le PEG favorise la prolifération cellulaire, l'apoptose et la diminution de la hauteur des cryptes [Parnaud, 99 (1)]. Le PEG pourrait favoriser la communication intercellulaire et, de là, induire l'apoptose des cellules cancéreuses et favoriser une prolifération et une différenciation cellulaire compensatoire.

.4EFFETS SUR LES MEMBRANES

.aRéparation membranaire

Les cellules épithéliales vivent entre 3 et 6 jours. Elles sont soumises à des agressions chimiques et mécaniques due à la motricité intestinale qui plaque les aliments sur la muqueuse, au-delà de la couche de mucus. Le côlon est le siège d'un grand nombre de réparations membranaires [McNeil, 89].

Le PEG réduit fortement la mortalité cellulaire et améliore la croissance des cellules dans les cultures cellulaires [Michaels, 91 ; McDowell, 98]. On ne sait pas si ces effets sont dus à une augmentation de l'hydrophilie des membranes cellulaires [Schmolka, 91] ou à une diminution des facteurs de dégradation membranaire. Des études plus récentes suggèrent que cet effet protecteur est lié au fait que les PEGs peuvent réparer les membranes cellulaires endommagées par des facteurs mécaniques, chimiques, thermiques ou électriques [Togo, 99]. Le repliement dans l'espace du PEG peut faire apparaître des plages hydrophobes riches en $\text{CH}_2\text{-CH}_2$. En présence de Pluronic, dérivé du PEG, le polyoxypropylène hydrophobe adhère préférentiellement aux membranes cellulaires endommagées et transforme leur surface hydrophobe et adhésive en une surface hydrophile non adhésive [Schmolka, 91]. Togo a décrit les mécanismes moléculaires et d'exocytose impliqués dans la réparation facilitée des membranes et a montré que le pluronic restaure la réparation des cellules même lorsque l'exocytose est bloquée. Il suggère

que cet effet est le résultat de la réduction de la tension superficielle de la cellule en présence de pluronic.

La réparation membranaire après effraction peut être un mécanisme s'opposant à la pénétration cellulaire de molécules hydrosolubles, celles-ci pouvant affecter la biologie de la cellule [McNeil, 89]. McNeil propose l'hypothèse suivante : le cancer gastrique ou du côlon pourrait être lié à la pénétration de cancérigènes dans les cellules épithéliales endommagées. La réparation membranaire des cellules épithéliales endommagées pourrait « imperméabiliser » les cellules épithéliales vis à vis des molécules toxiques ou des facteurs de croissance des cellules voisines. Bruce suggère que la protection de ces cellules ralentit la prolifération cellulaire, bien que ce ne soit pas observé *in vivo* chez des rats recevant du PEG [Bruce, 01].

En simplifiant, selon cette hypothèse, le PEG agirait contre le cancer en protégeant les cellules, ce qui réduirait la prolifération et/ou la cancérogenèse.

.bFusion cellulaire

Le PEG pourrait promouvoir la fusion cellulaire [Lentz, 94]. Le PEG initie la fusion cellule-cellule, cellule-érythrocyte, cellule-liposome [Ross, 99] par des mécanismes sujets à discussion : une modification du potentiel de surface et une diminution de la tension superficielle [Ross, 99 ; Lentz, 94] ou une déshydratation de la membrane causant l'agrégation des cellules puis la fusion membranaire [Lentz, 94]. D'après Schmolka, les membranes cellulaires ont tendance à s'hydrater en présence de pluronic, dérivé du PEG [Schmolka, 91].

Un traitement par le PEG d'une lignée de cellules coliques cancéreuses restaure les caractéristiques de la différenciation [Laboisse, 88]. Les interactions cellulaires dues à la fusion induite par le PEG pourraient initier la différenciation cellulaire [Steinberg, 82]. Gogichadze propose d'utiliser la capacité du PEG à induire la fusion cellulaire en polycaryocytes non viables pour traiter le cancer [Gogichadze, 00].

.5PRESSION OSMOTIQUE ET EXPULSION DES CELLULES DES FCA

In vivo, le PEG stimule légèrement la prolifération et l'apoptose des cellules normales de la crypte. In vitro, le PEG présente un effet anti-proliférateur dose-dépendant sur les cellules cancéreuses. Cet effet serait dû à l'augmentation de la pression osmotique du milieu par le PEG. Un choc hyperosmotique entraînerait la déshydratation des cellules. Celles-ci doivent alors métaboliser beaucoup plus de glucose pour produire l'énergie cellulaire nécessaire à la régulation de leur volume intracellulaire, ce qui limite leur prolifération. Les

cellules cancéreuses auraient plus de difficultés à maintenir un volume intracellulaire constant, elles vont se contracter, entraînant des répercussions sur la capacité des cellules à adhérer entre elles pour former la tumeur [Parnaud, 99 (1)].

En simplifiant, selon cette hypothèse, le PEG agirait contre le cancer en détruisant les cellules des FCA.

➤ **En faveur de l'hypothèse « pression osmotique »**

Ce mécanisme expliquerait [Parnaud, 99 (1)] :

- Les modifications morphologiques des cellules cancéreuses en culture, compatibles avec un différentiel de pression osmotique [Parnaud, 01 (1)].

- La multiplication par 20 et de façon dose-dépendante de la concentration fécale de phosphatase alcaline, un biomarqueur de la lyse épithéliale [Lapré, 91 ; 93] (résultats obtenus par notre laboratoire mais non publiés).

- La régression chronologique des FCA : l'hyperosmolarité créée par le PEG permettrait une élimination successive de la couche de cellules cancéreuses présente à la surface des FCA jusqu'à une élimination quasi totale de la partie supérieure du FCA.

- L'action rapide et très efficace du PEG sur les FCA dont le nombre est divisé par deux par un traitement de 3 jours par le PEG [Parnaud, 99 (1)].

- La prévention de la croissance des tumeurs : un traitement continu par le PEG va permettre un gommage constant de la surface des cryptes empêchant les tumeurs de s'établir et de grossir.

- L'inhibition quasi-totale de la croissance des FCA dans le côlon distal : les fèces sont stockées et déshydratées dans la partie distale du côlon. Ainsi, à ce niveau, le PEG serait plus concentré et pourrait agir plus longtemps sur les cellules épithéliales rectales.

- L'augmentation de la prolifération cellulaire, pourtant considérée comme marqueur de cancérogenèse [Chang, 97], et la diminution de la hauteur des cryptes chez les rats consommant le PEG : le PEG exerçant une sorte de gommage à la surface des cryptes, les cellules se multiplient pour compenser cet effet.

- La reprise de la croissance des FCA après l'arrêt du traitement au PEG : les cellules mutées au niveau des cellules souches (fond de la crypte) ne sont pas éliminées et vont pouvoir, à nouveau, proliférer après migration le long de la crypte (**Cf. figure n°2, p.32**).

➤ **En défaveur de l'hypothèse « pression osmotique »**

D'autres laxatifs osmotiques tels que le polyvinylpyrrolidone ne présentent pas d'effet protecteur [Parnaud, 99 (1)]. Le PEG 400 n'augmente pas la concentration fécale de phosphatase alcaline (résultats obtenus par notre laboratoire mais non publiés).

.CEFFETS INTRACELLULAIRE DU PEG

Les PEGs de hauts poids moléculaires sont les plus efficaces contre la cancérogenèse colorectale mais ne peuvent pénétrer les cellules normales. Les cellules dont la membrane est modifiée autoriseraient le passage de molécules de taille plus importante. Dans l'étude de McNeil, le dextran fluorescent 5000 (FDx 5000 Daltons), molécule normalement non absorbée, pénètre dans les cellules gastro-intestinales dont les membranes ont été abîmées mécaniquement [McNeil, 89]. On peut supposer qu'une altération de la membrane fait partie des nombreuses modifications des cellules cancéreuses. Ainsi, les molécules de haut poids moléculaire tel que les PEGs pourraient anormalement pénétrer ces cellules et exercer une action intracellulaire.

➤ **En faveur de l'hypothèse « effets intracellulaires »**

Le PEG et ses dérivés réduisent fortement la mortalité cellulaire et améliorent la croissance des cellules dans les cultures cellulaires [Michaels, 91 ; McDowell, 98]. Le groupement polyoxyéthylène, groupement spécifique commun aux PEGs et aux pluronics pourrait être responsable des mêmes effets qu'un messenger chimique : régulation de l'apoptose, de l'adhésion, de la croissance ou de la différenciation cellulaire. Aucune preuve de cette fonction n'existe cependant.

➤ **En défaveur de l'hypothèse « effets intracellulaires »**

Une étude non publiée montre que l'injection de PEG à dose assez faible ne réduit pas le nombre des FCA. Cependant, les abrasions membranaires susceptibles de permettre la pénétration du PEG sont certainement plus importantes sur la face muqueuse en raison du contact permanent avec les particules abrasives du contenu colique.

Le PEG 400, le polyoxyéthylène 100 stéarate et le polyoxyéthylène 100 stéaryl éther sont peu actifs contre les FCA mais ont pourtant tous le groupement polyoxyéthylène [Parnaud, 99 (1)]. Le PEG ne présente pas d'activité anti-oxydante et anti-inflammatoire sur

les cellules normales *in vivo*.

.V CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

*Les hypothèses mécanistiques que l'on peut faire pour expliquer l'effet du PEG contre la cancérogenèse colorectale sont nombreuses. Elles sont résumées sur la **figure n°3 (p.52)**.*

Le PEG augmente l'excrétion fécale et favorise la dilution des composés toxiques dans le contenu colique. Son pouvoir lubrifiant protège la muqueuse colique contre l'abrasion et l'irritation des aliments. Ces mécanismes expliqueraient un effet protecteur du PEG contre le processus de cancérogenèse et feraient de cette molécule un agent de chimioprévention, par inhibition de la phase d'initiation.

Cependant, le PEG agit sur la phase de post-initiation et c'est là l'essentiel de son effet. Le PEG est donc essentiellement un agent supprimeur du cancer. Il ne présente pas d'activité anti-oxydante ou anti-inflammatoire. Un effet réparateur membranaire est peu probable si on considère que les cellules cancéreuses sont altérées génétiquement. Son effet anti-proliférateur sur les cellules cancéreuses HT29 serait conséquence de son pouvoir osmotique et de la sensibilité particulière de ces cellules.

L'agent de prévention du cancer idéal est celui qui est capable de retarder la croissance de toute lésion pré-néoplasique quel que soit son stade d'évolution [Bird, 96]. Le PEG en fait partie. En plus d'inhiber la croissance des lésions, il entraîne leur régression. Le PEG est un puissant agent de chimioprévention agissant sur la phase de post-initiation : il inhibe fortement la croissance des lésions précancéreuses et des tumeurs au niveau du côlon des rats. C'est aussi un puissant agent supprimeur : il provoque rapidement la régression des tumeurs établies (résultats non publiés).

Le PEG peut être administré par voie orale : le PEG est un polymère non ionique, une poudre soluble dans l'eau, sans odeur, sans goût. La réaction de synthèse du PEG étant simple, il a un faible coût de production. Il présente peu ou pas d'effets secondaires indésirables : le PEG est déjà très utilisé et bien connu en médecine comme laxatifs. Le PEG n'est ni absorbé, ni fermenté, ni métabolisé.

La recherche de la preuve mécanistique de son efficacité est l'ultime étape avant la réalisation d'essais cliniques chez l'homme. Parmi les hypothèses sur le mécanisme d'action, on distingue deux courants : le PEG réparateur (Cf. IV.B.4.a.) ou le PEG destructeur (Cf. IV.B.5.). Notre étude expérimentale s'est attachée à ajouter un peu d'eau à l'un de ces courants...

DEUXIÈME PARTIE :

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE

Les études épidémiologiques visant à mettre en relation l'alimentation et la cancérogenèse donnent des résultats souvent discordants. L'expérimentation est donc nécessaire. Les études sur l'homme sont longues, coûteuses, difficilement contrôlables et se heurtent à des problèmes éthiques. Pour ces raisons, elles doivent être précédées d'expérimentations animales, ne serait-ce que pour déterminer les mécanismes biologiques de l'effet promoteur ou protecteur de l'aliment étudié.

L'avantage du modèle animal réside dans la possibilité de faire des études moins coûteuses, plus courtes, à grande échelle et d'une bonne répétabilité, la plupart des facteurs pouvant être contrôlés. Dans les études de cancérogenèse, on peut notamment induire simultanément le cancer désiré sur un groupe d'animaux, réduisant ainsi le nombre de sujets d'expérience. Des abattages et des prélèvements séquentiels peuvent aussi être réalisés afin de mesurer simultanément différents marqueurs et d'explorer les mécanismes du développement des cancers et l'effet des aliments.

Les modèles animaux de cancérogenèse sont très variés. Les plus employés sont les rongeurs dont les cancers sont initiés par des agents chimiques cancérogènes. L'aliment étudié est donné avant et pendant, ou 1 à 4 semaines après l'initiation suivant que l'on veut tester respectivement l'effet anti ou pro-initiateur ou l'effet anti ou promoteur [Corpet, 96].

Pratiquement, la valeur prédictive des expérimentations animales sur les cancérogènes chimiques est confirmée par les études épidémiologiques chez l'homme [Corpet, 96]. Cependant, la physiologie, la génétique et les régimes entre les modèles animaux et l'homme sont trop différents pour extrapoler directement [Corpet, 96].

.II INTRODUCTION : OBJECTIFS ET INTÉRÊTS DE L'EXPÉRIENCE

L'important effet suppresseur du PEG contre la cancérogenèse colorectale chez le rat a largement été démontré et caractérisé. La preuve mécanistique doit maintenant être apportée avant d'envisager une étude chez l'homme. L'objectif principal de l'expérience consiste en la détermination du ou des mécanismes de l'effet suppresseur du PEG. Les nombreuses hypothèses sur le mécanisme d'action du PEG peuvent en effet être regroupées en deux groupes : un premier groupe dans lequel les mécanismes tendent à protéger et réparer les cellules cancéreuses, un autre dans lequel les mécanismes tendent à les éliminer. Les expériences menées tentent de différencier ces deux groupes de mécanisme.

Le principe de l'expérience repose en partie sur l'étude de McNeil en 1989 [McNeil, 89]. Il étudie les phénomènes de réparation membranaire des cellules gastro-intestinales après lésion mécanique de ces dernières. Il utilise un marqueur cellulaire fluorescent (le dextran fluorescent 5000 Da, FDx 5000) de taille trop importante pour traverser les membranes des cellules normales. Après abrasion mécanique des membranes cellulaires, le FDx peut pénétrer dans les cellules. L'emprisonnement de la fluorescence dans les cellules marque la réparation membranaire. Nous allons tester in vivo si le PEG favorise la destruction des cellules dont la membrane est lésée ou s'il favorise au contraire leur réparation comme le propose Togo [Togo, 99]. Le PEG8000 diminue de façon précoce le nombre total de FCA par côlon (effet dès 1 jour, significatif dès 3 jours de traitement [Parnaud, 99 (1)]). On suppose que le PEG agit dès son contact avec la muqueuse colique et que l'observation des effets cellulaires est précoce. Cette hypothèse permet d'éviter toute interférence avec le taux de renouvellement physiologique des cellules gastro-intestinales (entre 2 et 6 jours [McNeil, 89]) qui pourrait mimer un mécanisme destructeur.

Dans une première étude (étude #1), des rats dont la cancérogenèse colorectale a été induite plusieurs semaines auparavant par l'azoxyméthane (AOM) sont gavés par une solution de FDx (4400 Da). Un traitement de quelques heures au PEG 8000 à 5% est ensuite distribué dans l'eau de boisson (**Cf. figure n°6, p.74**). Après ce traitement, les rats sont abattus et leurs côlons sont observés au microscope à fluorescence. Au niveau des cryptes normales et aberrantes, le nombre de cellules marquées par le FDx et la proportion de cellules marquées par rapport aux cellules non marquées sont quantifiés.

L'étude a été renouvelée dans une seconde expérience (étude #2) différée par rapport à l'étude #1. Cette étude #2 vise à confirmer les résultats de l'étude #1 et à intégrer un nouveau groupe de rats non induits à l'AOM mais recevant un traitement au PEG.

| Etude #0 | | | |
|--------------------------|-------|-------|-------|
| FDx12 | FDx18 | FDx24 | FDx36 |
| 243g | 229g | 228g | 234g |
| F344 mâles abattus à 35j | | | |

| Etude #1 | | | | | | |
|--------------------------|-------|---|----------|----------|----------|----------|
| FDx24=Tem 1 | Tem 2 | AOMTem 1 | AOMTem 2 | AOMPEG 1 | AOMPEG 2 | AOMPEG 3 |
| 228g | 265g | 355g | 349g | 340g | 357g | 295g |
| F344 mâles abattus à 60j | | F344 mâles abattus à 170j après 130j de cancérogenèse | | | | |

| Etude #2 | | | | | | | |
|---|----------|----------|----------|---------------------------|----------|----------|-------|
| Tem 3 | Tem 4 | Tem 5 | Tem 6 | PEG 1 | PEG 2 | PEG 3 | PEG 4 |
| 300g | 287g | 297g | 292g | 295g | 304g | 294g | 310g |
| F344 mâles abattus à 100j | | | | F344 mâles abattus à 100j | | | |
| AOMTem 3 | AOMTem 4 | AOMTem 5 | AOMTem 6 | AOMPEG 4 | AOMPEG 5 | AOMPEG 6 | |
| 415g | 336g | 366g | 317g | 341g | 388g | 362g | |
| F344 mâles abattus à 140j après 105j de cancérogenèse | | | | | | | |

Tableau n°2 : Caractéristiques des rats utilisés dans les différentes études

Ces études ont été précédées d'une expérience (étude #0) visant à évaluer la cinétique du FDx, de l'ingestion à l'excrétion fécale (**Cf. figure n°4, p.68**). Cette étude préliminaire était nécessaire au choix des intervalles entre gavage, traitement par le PEG et euthanasie des rats.

4,7 et 15 rats ont été utilisés dans les protocoles des études #0, #1 et #2 respectivement. Leurs caractéristiques sont regroupées dans le **tableau n°2**

Le but de ces expériences est de répondre aux hypothèses suivantes :

Les premières concernent les cryptes des côlons de rats non traités par le PEG :

H1.1 : L'AOM ne change pas les cryptes normales. Les cryptes normales des rats induits à l'AOM ont autant de cellules fluorescentes que les cryptes normales des rats témoins, en nombre ou en proportion.

H1.2 : Les cryptes aberrantes captent plus le dextran fluorescent que les cryptes normales. Les cryptes aberrantes des rats induits à l'AOM ont plus de cellules marquées que les cryptes normales, en nombre ou en proportion.

D'autres hypothèses concernent directement le mécanisme d'action du PEG au niveau cellulaire :

H2.1 : Le PEG n'a aucun effet au niveau des cellules dont la membrane est endommagée : le nombre et la proportion de cellules fluorescentes sont inchangés par le PEG.

Ou bien H2.2 : Le mécanisme est de type réparateur de membrane : le PEG piège la fluorescence dans les cellules des cryptes aberrantes et/ou les cellules des cryptes normales. Le nombre et la proportion de cellules fluorescentes sont augmentés par le PEG.

Ou bien H2.3 : Le mécanisme est de type destructeur cellulaire : le nombre et la proportion de cellules fluorescentes sont diminués par le PEG.

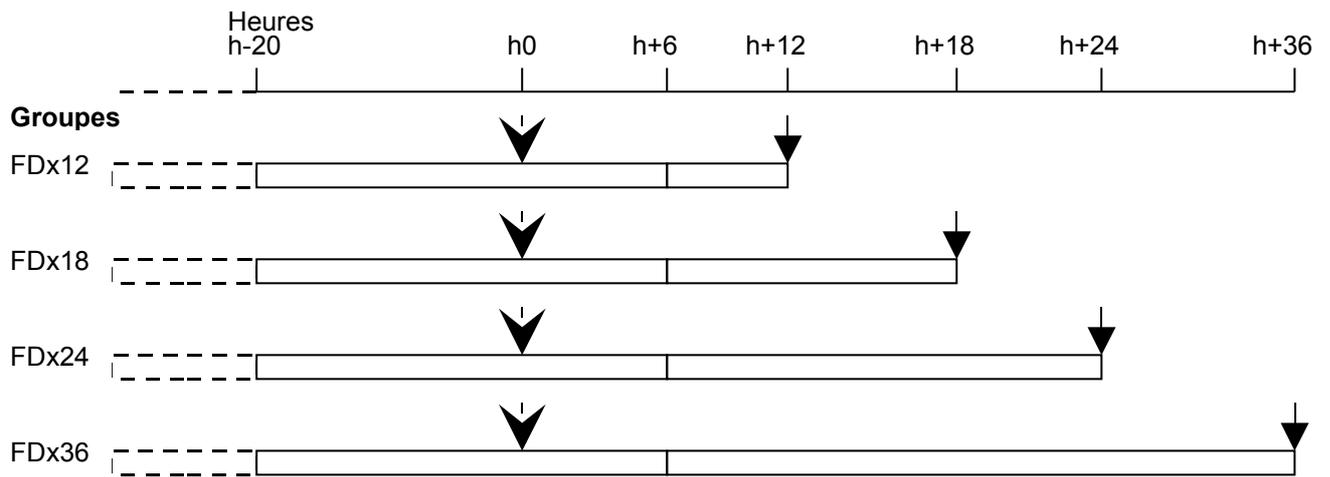


Figure n°4 : Protocole expérimental de l'étude #0

▼, gavage FDx, 250mg/ml, 1ml ; ▼, abattage, chloroforme ;
 , AIN76, eau, à volonté ; , diète ;

| <u>OBSERVATION VISUELLE DES TD</u> |
|---|
| Couleur, aspect |
| <u>PRÉLÈVEMENT DES COLONS</u> |
| Vidange du contenu par rinçage au Krebs Ringer Ouverture sur toute la longueur Rinçage au Krebs Ringer |
| <u>FIXATION</u> |
| Rapidement Colon agrafé entre 2 feuilles de papier filtre Formol pendant 18h minimum |
| <u>PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS</u> |
| Elimination de la partie striée attenante au cæcum Réalisation de carrés de 1cm ² dans la portion médiane du côlon |
| <u>COLORATION</u> |
| Bleu de méthylène 0.05% dans du Krebs Ringer (250ul d'une solution à 2% dans 10ml de Krebs Ringer), 3mn Rinçage au Krebs Ringer (blocage de la coloration par le Bleu) |
| <u>FLUORIMÉTRIE CYTOGÉNÉTIQUE</u> |
| x40 lumière normale x100 et x400 : fluorescence |

Tableau n°3 : Protocole de préparation des côlons

.II ETUDE #0 : CINÉTIQUE DU DEXTRAN FLUORESCENT

.ABUT DE L'ÉTUDE

L'étude #0 est une étude préliminaire à la réalisation des études #1 et #2. Elle a pour but d'établir l'intervalle de temps optimal entre le gavage par le dextran fluorescent (FDx) et l'abattage des rats. Cet intervalle de temps doit permettre un marquage maximal des cellules (en pourcentage) et une fluorescence non spécifique minimale. Il doit être inférieure au taux de renouvellement physiologique des cellules gastro-intestinales (entre 2 et 6 jours [McNeil, 89]). Cette étude permet de réaliser une cinétique du marquage des cellules coliques par le FDx.

.B MATÉRIEL ET MÉTHODE

.1 ANIMAUX ET ALIMENTATION

4 rats mâles F344, âgés de 5 semaines et fournis par Iffa Credo (Lyon) ont été utilisés pour cette étude préliminaire. Leurs caractéristiques sont regroupées dans le **tableau n°2 (p.66)**. Les rats ont été placés dans des cages individuelles avec libre accès à l'aliment (bouchons AIN76) et à l'eau de boisson. Leur acclimatation aux conditions du laboratoire a duré 4 jours.

.2 PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

Le déroulement de l'étude #0 est représenté sur la **figure n°4**. Elle débute 4 jours après réception des rats. Les rats sont pesés puis privés d'aliment et d'eau pendant 20 heures, nuit complète comprise. A la suite de cette diète, 1ml de solution contenant 250mg de FDx (PM 4400) est distribué aux rats par gavage. Le gavage consiste en l'introduction d'une sonde par voie oesophagienne jusqu'à l'estomac. La solution est administrée par l'intermédiaire d'une seringue.

Les fèces sont récupérés toutes les 2 heures, depuis la fin du gavage jusqu'à l'euthanasie de l'animal. 6 heures après le gavage, la nourriture et l'eau sont remises en libre accès. 12, 18, 24 et 36 heures après le gavage, les rats FDx12, FDx18, FDx24 et FDx36 sont abattus, les côlons fixés au minimum 18 heures. Pour chaque rat, le côlon est découpé en 6 morceaux d'environ 1 cm². La partie striée attenante au cæcum est éliminée. La lecture y est difficile en raison du relief et le nombre de FCA est généralement peu important [Bird, 95]. Les échantillons sont colorés et observés selon le protocole décrit dans le **tableau n°3**. Le protocole de coloration a été obtenu par des essais sur les premiers échantillons observés. Ce protocole permet de compter les noyaux dans les cryptes et de ne pas masquer la fluorescence.

| | Nb de données (cryptes) | Nb de noyaux /crypte (a) | | Nb de cellules marquées /crypte (b) | | Pourcentage (%) | |
|---------------|-------------------------|--------------------------|-----|-------------------------------------|------|-----------------|-----|
| | | M | SEM | M | SEM | M | SEM |
| FDx12 | 80 | 13,2 | 0,4 | 0,25 | 0,05 | 2.2 | 0,6 |
| FDx18 | 120 | 14,0 | 0,3 | 0,29 | 0,06 | 2.2 | 0,4 |
| FDx24 | 100 | 14,0 | 0,4 | 0,72 | 0,09 | 5.2 | 0,6 |
| FDx36 | 120 | 15,9 | 0,3 | 0,62 | 0,08 | 3.9 | 0,5 |
| P ANOVA Tukey | | *** | | *** | | *** | |

Tableau n°4 : Résultats de l'étude #0

La colonne « Pourcentage » indique la moyenne des pourcentages de cellules marquées par crypte (ANOVA Tukey) : *** : extrêmement significatif (p<0.001)

(Les résultats de l'analyse statistique sont regroupés en annexe dans le **tableau n°5, p.89**)

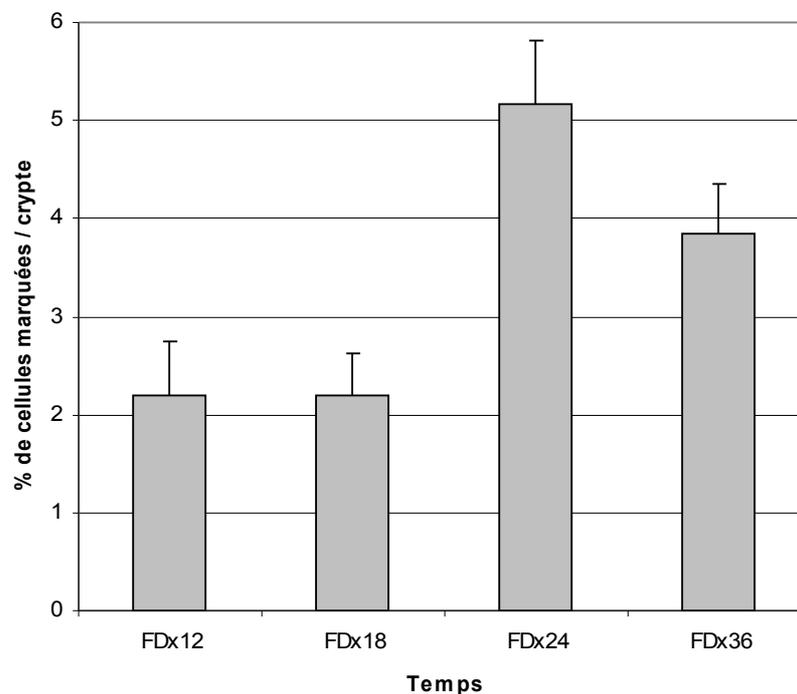


Figure n°5 : Cinétique du pourcentage de cellules fluorescentes par crypte

Les fèces correspondants à chaque tranche de 2 heures sont placés dans des flacons contenant 2ml d'eau. L'eau fécale ainsi obtenue se colore en jaune intense en présence de FDx. Cette dilution des fèces permet d'apprécier la durée nécessaire entre le gavage et le début d'excrétion fécale du FDx.

Les dépôts non spécifiques gênant la lecture des lames sont appréciés de façon comparative selon les différentes heures d'abattage. Un comptage de la proportion de cellules marquées par rapport aux cellules non marquées est effectué sur 20 cryptes par morceau de côlon. Le microscope optique permet d'observer les cellules en surface de la muqueuse et non celles au fond des cryptes (**Cf. figure n°2, p.32**). Les comptages ne concernent donc que les parties supérieures des cryptes.

.CRÉSULTATS

Le marqueur fluorescent se retrouve dans les fèces émises 12 heures après le gavage et jusqu'à 36 heures.

D'un point de vue confort visuel au microscope, le marqueur fluorescent est présent en grande quantité entre les cryptes des côlons des rats FDx12 et FDx18 rendant difficiles la mise au point au grossissement 400 du microscope et le comptage des cellules fluorescentes. La distinction entre dépôts non spécifiques de FDx et cellules effectivement marquées est difficile. A partir de 24 heures post-gavage, le confort visuel est plus net avec moins de dépôts non spécifiques de FDx. A 36 heures, on retrouve une fluorescence marquée entre les cryptes.

Les résultats du comptage sont présentés dans le **tableau n°4**, ceux de l'analyse statistique dans le **tableau n°5 en annexe (p.89)**.

Certains échantillons n'ont pu être observés correctement pour des raisons de dépôts non spécifiques de fluorescence ou de coloration par excès ou par défaut.

Le nombre de cellules marquées par crypte dans le côlon de FDx24 et FDx36 est plus du double du nombre de cellules marquées dans les côlons FDx12 et FDx18 ($p < 0.001$). La proportion de cellules fluorescentes par crypte dans le côlon de FDx24 est plus du double de la proportion de fluorescence dans les côlons FDx12 et FDx18 ($p < 0.001$). La proportion de cellules fluorescentes de FDx36 est significativement supérieure à celle de FDx12 ($p < 0.001$) (**Cf. figure n°5**). On peut noter que le côlon du rat FDx36 présente plus de cellules par crypte que les autres côlons ($p < 0.001$).

.DDISCUSSION

Le bolus de FDx arrive dans le côlon 12 heures après le gavage. La concentration de FDx dans le côlon est alors maximale. Un rinçage intense du côlon avant fixation est donc nécessaire pour éviter les dépôts non spécifiques. La muqueuse colique est constituée d'une multitude de cryptes surélevées. Le marqueur peut se déposer de façon non spécifique dans la lumière des cryptes ou dans les sillons séparant les cryptes rendant difficile le rinçage des côlons avant fixation. 24 heures après le gavage, les bols alimentaires successifs ont nettoyé le côlon du FDx en excès. Les dépôts non spécifiques sont moins nombreux et la lecture microscopique devient plus aisée. Le fait de retrouver une fluorescence importante entre les cryptes à 36 heures après le gavage peut s'expliquer par la coprophagie (les rats ont pu recycler le dextran fluorescent) ou par le renouvellement physiologique des cellules qui ont accumulé le marqueur. Les cellules épithéliales sont produites de façon constante en partie profonde et moyenne de la crypte. Celles-ci remontent le long de la crypte en se différenciant puis migrent en dehors de la crypte au niveau de l'épithélium de surface où elles sont expulsées [Chang, 84]. Les cellules dans lesquelles la fluorescence a pénétré ont une membrane lésée. Ce sont en majorité les cellules les plus anciennes présentes à la surface des cryptes, en contact direct avec les aliments et dont le renouvellement est prochain.

Le protocole de coloration est primordial pour l'observation correcte des noyaux des cellules des cryptes d'une part et pour l'observation de la fluorescence d'autre part. Les bains de colorant doivent être changés régulièrement.

Le nombre et la proportion de cellules fluorescentes diminuant à 36 heures par rapport à 24 heures tendent à confirmer que le renouvellement des cellules marquées est en cours 36 heures après le gavage.

Le nombre moyen de noyaux comptés par crypte est plus important 36 heures après le gavage qu'à des temps plus courts. La mise à jeun des rats avant le gavage a pu diminuer le taux de renouvellement des cellules coliques moins sollicitées et la reprise de nourriture a pu stimuler la prolifération.

Il apparaît qu'au moins 12 heures sont nécessaires depuis le gavage jusqu'à l'arrivée du marqueur fluorescent dans le côlon ; qu'au moins 12 heures de contact entre le marqueur fluorescent et la muqueuse colique sont nécessaires au marquage d'une proportion maximale de cellule par crypte et au rinçage physiologique du marqueur en excès par les bols successifs. Pour les études #1 et #2, nous devons donc fixer un délai de 24 heures entre le gavage par le FDx et l'abattage des rats.

.III ETUDES #1 ET #2 : MÉCANISME D'ACTION DU PEG 8000

.ABUT DES ÉTUDES #1 ET #2

Nous avons écrit précédemment que les nombreuses hypothèses sur le mécanisme de l'effet protecteur du PEG contre la cancérogenèse colorectale chez le rat peuvent être regroupées en deux groupes : un premier groupe dans lequel les mécanismes tendent à protéger et réparer les cellules cancéreuses, un autre dans lequel les mécanismes tendent à les éliminer. Les expériences menées tentent de différencier ces deux groupes de mécanisme : un traitement par le PEG entraîne une élimination ou une protection des cellules préalablement marquées par le FDx ou bien n'a pas d'effet à ce niveau

Nous rappelons donc ici que le but de nos expériences est de répondre aux hypothèses suivantes :

➤ Concernant les cryptes des côlons de rats non traités par le PEG (H1) :

H1.1 : L'AOM ne change pas les cryptes normales. Les cryptes normales des rats induits à l'AOM ont autant de cellules fluorescentes que les cryptes normales des rats témoins, en nombre ou en proportion.

H1.2 : Les cryptes aberrantes captent plus le dextran fluorescent que les cryptes normales. Les cryptes aberrantes des rats induits à l'AOM ont plus de cellules marquées que les cryptes normales, en nombre ou en proportion.

➤ Concernant le mécanisme d'action du PEG au niveau cellulaire (H2):

H2.1 : Le PEG n'a aucun effet au niveau des cellules dont la membrane est endommagée : le nombre et la proportion de cellules fluorescentes sont inchangés par le PEG.

Ou bien H2.2 : Le mécanisme est de type réparateur de membrane : le PEG piège la fluorescence dans les cellules des cryptes aberrantes et/ou les cellules des cryptes normales. Le nombre et la proportion de cellules fluorescentes sont augmentés par le PEG.

Ou bien H2.3 : Le mécanisme est de type destructeur cellulaire : le nombre et la proportion de cellules fluorescentes sont diminués par le PEG.

.B MATÉRIEL ET MÉTHODE

.1 ANIMAUX ET ALIMENTATION

22 rats mâles F344 fournis par Iffa Credo (Lyon) ont été utilisés pour cette étude. Les rats ont été placés dans des cages par 2 ou 3 jusqu'au début du protocole expérimental. Ils avaient libre accès à l'aliment (bouchons AIN76) et à l'eau de boisson.

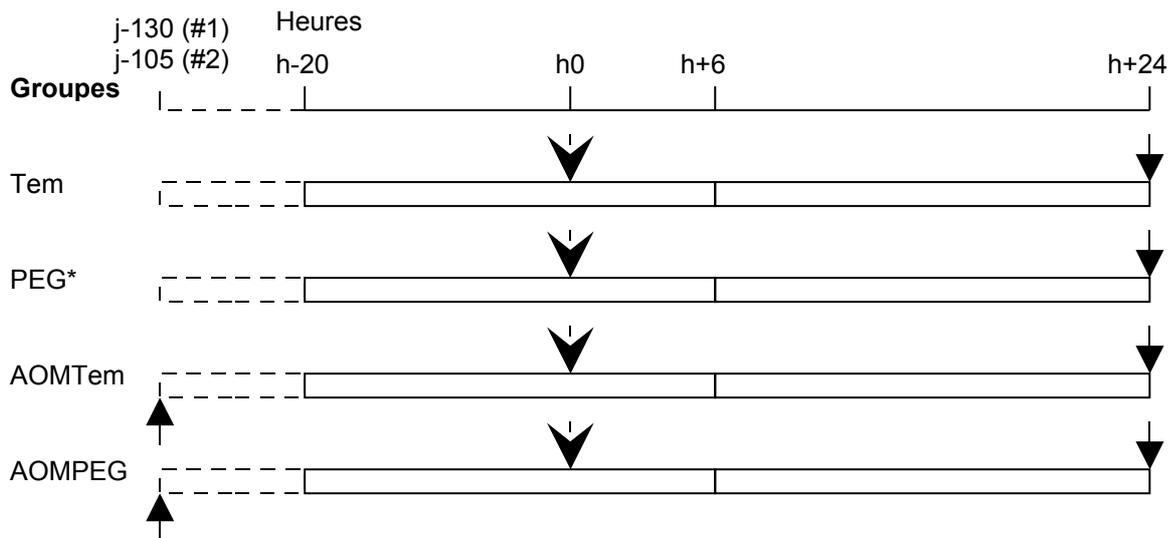


Figure n°6 : Protocoles expérimentaux des études #1 et #2

▲, AOM, 20mg/kg de poids vif, injection i.p. ; ▼, gavage FDx, 250mg/ml, 1ml ; ▾, abattage, chloroforme ;
 □, AIN76, eau, à volonté ; ◻, diète ; ◼, AIN76, eau + PEG8000 5%, à volonté

* Uniquement pour l'étude #2

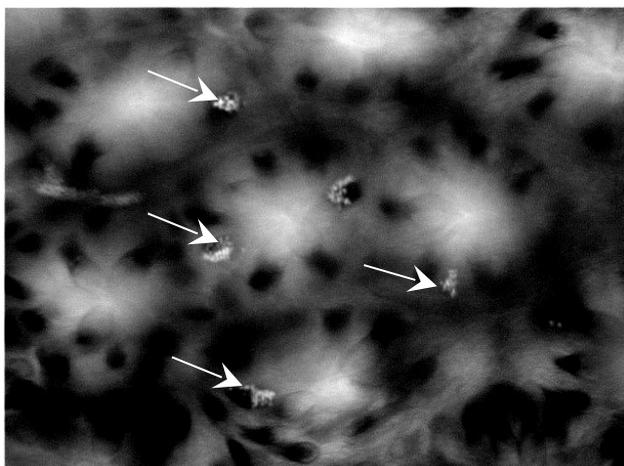


Image n°2 : Fluorescence dans quelques cryptes normales

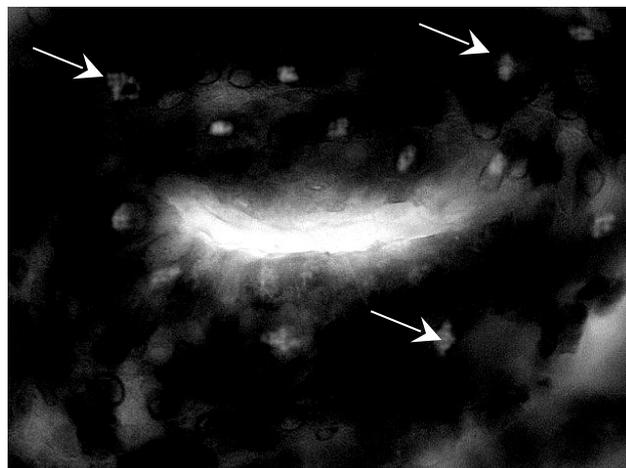


Image n°3 : Fluorescence dans une crypte aberrante

Observation au microscope à fluorescence (x400)
 Exemple de cellules marquées par le dextran fluorescent (↘)

7 rats dont le rat FDx24 de l'étude #0 sont entrés dans le protocole de l'étude #1. Les 15 autres rats sont entrés dans le protocole de l'étude #2. Leurs caractéristiques sont regroupées dans le **tableau n°2 (p.66)**.

.2PROTOCOLES EXPÉRIMENTAUX

Le déroulement des études #1 et #2 est représenté sur la **figure n°6**.

La cancérogenèse a été induite par injection intra-péritonéale d'azoxyméthane (AOM, 20mg/kg), agent inducteur du cancer colorectal couramment utilisé en expérimentation animale [Corpet, 96]. Pour des raisons de calendrier, la durée de cancérogenèse n'a pu être homogène entre les deux études (25 jours d'écart) mais reste suffisamment longue pour observer les mêmes effets cellulaires.

Après 105 à 130 jours de cancérogenèse, les colonocytes sont marqués en gavant les rats avec une solution de FDx (PM 4400). Après marquage, les rats sont traités *per os* par une solution à 5% de PEG 8000 pendant 18 heures, puis sacrifiés.

Après abattage, les côlons sont préparés selon le protocole décrit dans le **tableau n°3 (p)**. La partie striée attenante au cæcum est éliminée.

.3PARAMÈTRES MESURÉS

Les comptages se sont fait en aveugle : les échantillons ont été identifiés et repérés par des codes, puis mélangés, puis observés.

Le nombre de cellules observées par crypte et le nombre de cellules marquées ont été comptés sur 20 cryptes normales par échantillon de côlon et sur les cryptes aberrantes. La proportion de cellules marquées par crypte a été calculée.

Les FCA sont facilement reconnaissables : la taille des cryptes, de la zone péricryptale et de la lumière des cryptes est augmentée, la coloration au bleu de méthylène est plus soutenue que la coloration des cryptes normales [Bird, 96] (**Cf. image n°1, p.32**). Le comptage est réalisé au grossissement 400 du microscope à fluorescence. Les **images n°2 et n°3** illustrent respectivement la fluorescence observée dans les cryptes normales et dans une crypte aberrante au microscope à fluorescence. Le nombre de cellules quantifiées ne sont que la partie supérieure des cryptes (**Cf. figure n°2, p.32**).

Les résultats sont analysés statistiquement par des tests de Bonferroni. Les statistiques sont basées sur le nombre de cryptes.

| CRYPTES NORMALES (CN) | Nb de données (cryptes) | Nb de noyaux /crypte (a) | | Nb de cellules marquées /crypte (b) | | | Pourcentage (%) | | |
|-----------------------|-------------------------|--------------------------|-----|-------------------------------------|------|----|-----------------|-----|----|
| | | M | SEM | M | SEM | p | M | SEM | p |
| Tem | 200 | 14,5 | 0,2 | 0,73 | 0,06 | - | 5,1 | 0,4 | - |
| AOMTem | 200 | 14,9 | 0,2 | 0,77 | 0,06 | ns | 5,1 | 0,4 | ns |
| AOMPEG | 360 | 14,8 | 0,1 | 0,58 | 0,05 | ns | 3,7 | 0,3 | * |
| P ANOVA Bonferroni | | ns | | * | | | ** | | |

| CRYPTES ABERRANTES (CA) | Nb de données (cryptes) | Nb de noyaux /crypte (a) | | | Nb de cellules marquées /crypte (b) | | | Pourcentage (a/b)% | | |
|-------------------------|-------------------------|--------------------------|-----|-----|-------------------------------------|-----|-----|--------------------|-----|-----|
| | | M | SEM | p | M | SEM | p | M | SEM | p |
| AOMTem | 150 | 39,0 | 1,0 | *** | 4,0 | 0,2 | *** | 9,9 | 0,5 | *** |
| AOMPEG | 255 | 34,8 | 0,6 | | 2,6 | 0,2 | | 5,9 | 0,4 | |
| P ANOVA Bonferroni | | *** | | | *** | | | *** | | |

Tableau n°6 : Résultats de l'étude #1

La colonne « Pourcentage » indique la moyenne des pourcentages de cellules marquées par crypte (ANOVA Bonferroni) : ns : non significatif ($p > 0.05$) ; * : significatif ($0.01 < p < 0.05$) ; ** : très significatif ($0.001 < p < 0.01$) ; *** : extrêmement significatif ($p < 0.001$)

(Les résultats de l'analyse statistique sont regroupés dans le **tableau n°7, en annexe, p.90**)

| CRYPTES NORMALES (CN) | Nb de données (cryptes) | Nb de noyaux /crypte (a) | | Nb de cellules marquées /crypte (b) | | | Pourcentage (%) | | |
|-----------------------|-------------------------|--------------------------|-----|-------------------------------------|------|-----|-----------------|-----|-----|
| | | M | SEM | M | SEM | p | M | SEM | p |
| Tem | 420 | 15,0 | 0,1 | 0,89 | 0,05 | * | 5,5 | 0,3 | ** |
| PEG | 460 | 15,2 | 0,1 | 0,67 | 0,04 | | 4,0 | 0,3 | |
| AOMTem | 400 | 14,8 | 0,1 | 1,15 | 0,06 | *** | 7,3 | 0,4 | *** |
| AOMPEG | 320 | 14,9 | 0,2 | 0,74 | 0,06 | | 4,6 | 0,3 | |
| P ANOVA Bonferroni | | ns | | *** | | | *** | | |

| CRYPTES ABERRANTES (CA) | Nb de données (cryptes) | Nb de noyaux /crypte (a) | | | Nb de cellules marquées /crypte (b) | | | Pourcentage (%) | | |
|-------------------------|-------------------------|--------------------------|-----|-----|-------------------------------------|-----|-----|-----------------|-----|-----|
| | | M | SEM | p | M | SEM | p | M | SEM | p |
| AOMTem | 200 | 44,9 | 0,9 | *** | 6,9 | 0,3 | *** | 14,5 | 0,6 | *** |
| AOMPEG | 150 | 42,6 | 1,0 | | 4,0 | 0,3 | | 8,7 | 0,6 | |
| P ANOVA Bonferroni | | *** | | | *** | | | *** | | |

Tableau n°8 : Résultats de l'étude #2

La colonne « Pourcentage » indique la moyenne des pourcentages de cellules marquées par crypte (ANOVA Bonferroni) : ns : non significatif ($p > 0.05$) ; * : significatif ($0.01 < p < 0.05$) ; ** : très significatif ($0.001 < p < 0.01$) ; *** : extrêmement significatif ($p < 0.001$)

(Les résultats de l'analyse statistique sont regroupés dans le **tableau n°9, en annexe, p.91**)

.CRÉSULTATS

.1ETUDE #1

Les résultats de l'étude #1 sont regroupés dans le **tableau n°6**. L'analyse statistique est résumée dans le **tableau n°7, en annexe (p.90)**.

.2ETUDE #2

Les résultats de l'étude #1 sont regroupés dans le **tableau n°8**. L'analyse statistique est résumée dans le **tableau n°9, en annexe (p.91)**.

Pour ces études, nous avons étudié 22 rats, examiné 2360 cryptes normales et 755 cryptes aberrantes.

| CRYPTES NORMALES (CN) | Nb de données (cryptes) | Nb de noyaux /crypte (a) | | Nb de cellules marquées /crypte (b) | | | Pourcentage (%) | | |
|-----------------------|-------------------------|--------------------------|-----|-------------------------------------|------|-----|-----------------|-----|-----|
| | | M | SEM | M | SEM | p | M | SEM | p |
| Tem | 620 | 14,8 | 0,1 | 0,84 | 0,05 | ns | 5,4 | 0,2 | ** |
| PEG | 460 | 15,2 | 0,1 | 0,67 | 0,04 | | 4,0 | 0,3 | |
| AOMTem | 600 | 14,9 | 0,1 | 1,02 | 0,04 | *** | 6,6 | 0,3 | *** |
| AOMPEG | 680 | 14,8 | 0,1 | 0,66 | 0,04 | | 4,1 | 0,2 | |
| P ANOVA Bonferroni | | ns | | *** | | | *** | | |

| CRYPTES ABERRANTES (CA) | Nb de données (cryptes) | Nb de noyaux /crypte (a) | | | Nb de cellules marquées /crypte (b) | | | Pourcentage (%) | | |
|-------------------------|-------------------------|--------------------------|-----|-----|-------------------------------------|-----|-----|-----------------|-----|-----|
| | | M | SEM | p | M | SEM | p | M | SEM | p |
| AOMTem | 350 | 42,4 | 0,7 | *** | 5,6 | 0,2 | *** | 12,5 | 0,4 | *** |
| AOMPEG | 405 | 38,1 | 0,6 | | 2,9 | 0,2 | | 7,0 | 0,4 | |
| P ANOVA Bonferroni | | *** | | | *** | | | *** | | |

Tableau n°10 : Résultats des études #1 et #2 cumulées

La colonne « Pourcentage » indique la moyenne des pourcentages de cellules marquées par crypte (ANOVA Bonferroni) : ns : non significatif ($p > 0.05$) ;

** : très significatif ($0.001 < p < 0.01$) ; *** : extrêmement significatif ($p < 0.001$)

(Les résultats de l'analyse statistique sont regroupés dans le **tableau n°11, en annexe, p.92**)

.3 SYNTHÈSE DES RÉSULTATS DES ÉTUDES #1 ET #2

Les résultats des deux études indépendantes sont similaires. Les **tableaux n°10 (ci-contre) et n°11 (en annexe, p.92)** représentent la synthèse des deux études (résultats et analyse statistique respectivement). Les résultats de la synthèse sont similaires aux résultats des études #1 et #2.

Le comptage des cellules fluorescentes est difficile : certains amas de fluorescence font penser à des dépôts non spécifiques. Apparemment, aucune différence de marquage fluorescent n'était décelable. Ce n'est qu'après analyse statistique que les résultats sont apparus intéressants. Nous les présentons ici selon les hypothèses testées, pour en faciliter la compréhension.

➤ Concernant les cryptes des côlons de rats non traités par le PEG (H1) :

H1.1 : L'hypothèse est vérifiée : l'AOM ne change pas les cryptes normales.

Le test de Bonferroni indiquerait que la proportion de cellules fluorescentes est légèrement supérieure dans les cryptes normales des rats induits à l'AOM. Chez les rats témoins et induits à l'AOM, les pourcentages de fluorescence calculés dans 620 et 600 cryptes normales sont de 5.4 ± 0.2 et 6.6 ± 0.3 respectivement, $p < 0.01$. Mais un test de Dunnett, plus adapté, permet de conclure que cette différence de 22% est non significative ($p > 0.05$).

On trouve chez les rats témoins et induits à l'AOM, un nombre de cellules par crypte de 14.8 ± 0.1 et 14.9 ± 0.1 respectivement, $p = 0.054$, comptés dans 620 et 600 cryptes normales.

H1.2 : L'hypothèse est vérifiée : les cryptes aberrantes captent plus le dextran fluorescent que les cryptes normales..

Les cryptes aberrantes ont 3 fois plus de cellules, et un pourcentage de cellules fluorescentes plus important, que les cryptes normales. La proportion de cellules fluorescentes par crypte aberrante est le double de celle des cryptes normales. Ainsi chez les rats témoins induits à l'AOM, les pourcentages de fluorescence calculés dans 600 cryptes normales et 350 cryptes aberrantes sont de 6.6 ± 0.3 et $12,5 \pm 0.4$ respectivement, $p < 0.001$.

➤ Concernant le mécanisme d'action du PEG (H2) :

L'hypothèse **H2.3** est vérifiée : le mécanisme est de type destructeur cellulaire : le nombre et la proportion de cellules fluorescentes sont diminués par le PEG.

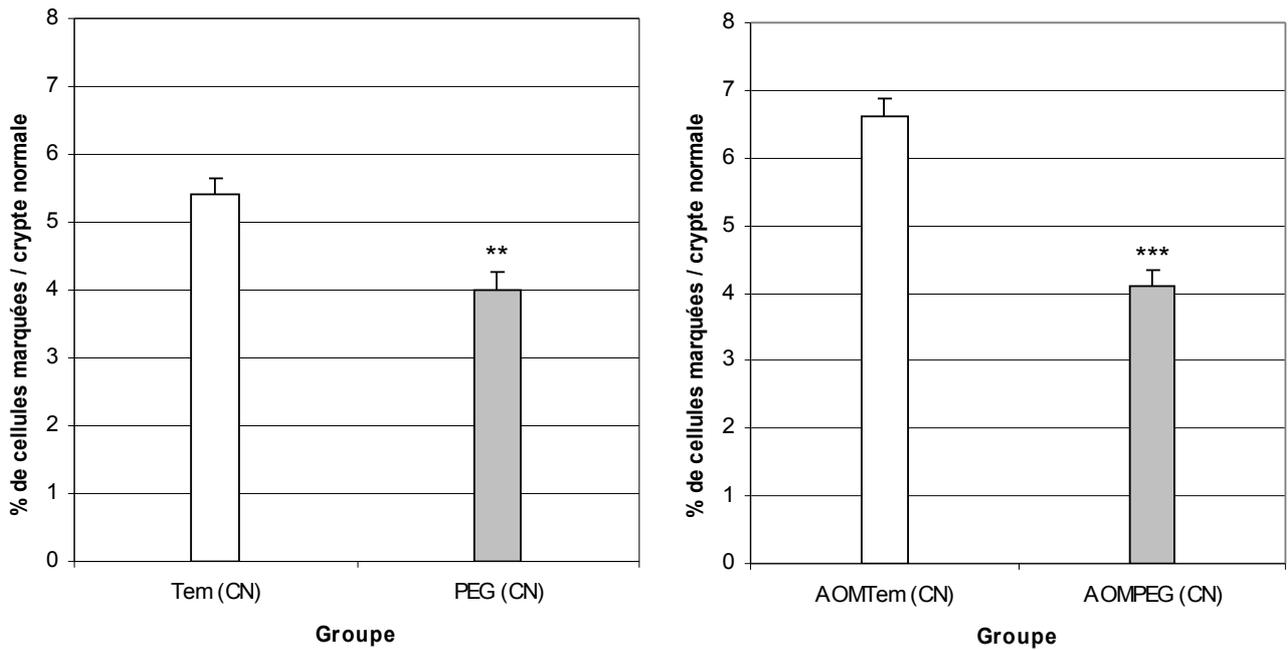


Figure n°7 : Effet d'un traitement par le PEG sur le pourcentage de cellules fluorescentes par crypte normale

ANOVA Bonferroni : ** : très significatif ($0.001 < p < 0.01$) ; *** : extrêmement significatif ($p < 0.001$)

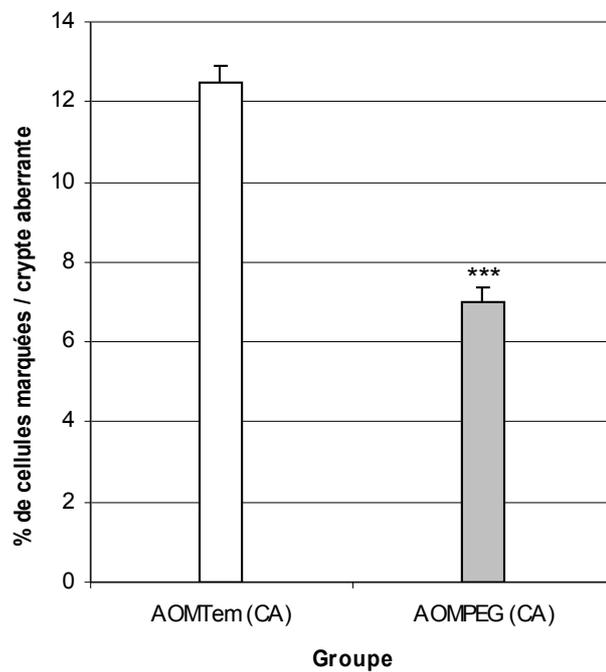


Figure n°8 : Effet d'un traitement par le PEG sur le pourcentage de cellules fluorescentes par crypte aberrante.

ANOVA Bonferroni : *** : extrêmement significatif ($p < 0.001$)

Le PEG diminue le nombre et la proportion de cellules fluorescentes par crypte normale (**Cf. figure n°7**). Ainsi chez les rats Tem et les rats PEG, les proportions calculées dans 620 et 460 cryptes normales sont de 5.4 ± 0.2 et 4.0 ± 0.3 respectivement, $p < 0.01$; chez les rats AOMTem et les rats AOMPEG, les proportions calculées dans 600 et 680 cryptes normales sont de 6.6 ± 0.3 et 4.1 ± 0.2 respectivement, $p < 0.0001$.

Le PEG diminue fortement et normalise donc la fluorescence piégée dans les FCA :

- Un traitement de 18h de PEG 5% dans l'eau diminue la proportion de cellules fluorescentes dans les FCA induits par l'AOM. Ainsi chez les rats témoins et traités, les pourcentages de fluorescence calculés dans 350 et 405 cryptes aberrantes sont de 12.5 ± 0.4 et 7.0 ± 0.4 respectivement, $p < 0.001$ (**Cf. figure n°8**).

- Le PEG normalise la proportion de cellules fluorescentes dans les cryptes aberrantes. Ainsi dans les 620 cryptes normales des rats Tem et les 405 cryptes aberrantes des rats AOMPEG, les proportions de cellules fluorescentes calculées sont de 5.4 ± 0.2 et 7 ± 0.4 respectivement, $p > 0.05$ d'après un test de Dunnett).

La diminution de la proportion de cellules fluorescentes après un traitement au PEG est plus importante dans les cryptes aberrantes que dans les cryptes normales.

.DISCUSSION

➤ Concernant les cryptes des côlons de rats non traités par le PEG (H1) :

Les hypothèses sont vérifiées : l'étude montre que les cryptes normales des rats induits à l'AOM ont autant de cellules fluorescentes que les cryptes normales des rats témoins, en nombre ou en proportion (**H1.1**). Les cryptes aberrantes des rats induits à l'AOM ont plus de cellules marquées que les cryptes normales, en nombre ou en proportion (**H1.2**).

Après plus de 100 jours après injection, l'AOM n'a pas d'effet sur le nombre de cellules endommagées à la surface des cryptes normales. Toutefois la proportion des cellules endommagées dans les cryptes aberrantes est plus du double de celle dans les cryptes normales. Les cellules des FCA fixent-elles mieux la fluorescence ? Ont-elles des membranes plus fréquemment endommagées que les cellules normales ? Ceci peut s'expliquer par le fait que les FCA sont constitués de cellules précancéreuses, donc moins bien différenciées ou plus fragiles.

➤ Concernant le mécanisme d'action du PEG (H2) :

Le mécanisme est de type destructeur cellulaire : le nombre et la proportion de cellules fluorescentes sont diminués par le PEG (**H2.3**).

Le PEG est plus actif sur les FCA que sur les cryptes normales. Le PEG semble « normaliser » les cryptes du point de vue du piégeage du marqueur fluorescent. L'action du PEG est d'autant plus intéressante que le traitement testé est court (18 heures) et qu'il diminue en même temps le nombre de cellules par crypte aberrante.

Le PEG semble donc agir comme une molécule de chimiothérapie : il semble détruire les cellules cancéreuses mais son action est rapide, douce et sans effet secondaire car elle est limitée à la lumière intestinale. Ce mode d'action est cohérent avec l'augmentation de l'ALP dans l'eau fécale, la stimulation de la prolifération cellulaire compensatoire, l'augmentation de la pression osmotique des fèces, la diminution de la hauteur des FCA.

CONCLUSION

L'efficacité du polyéthylène glycol contre la cancérogenèse colorectale chez le rat a largement été démontrée et caractérisée. Les hypothèses de son mécanisme sont néanmoins nombreuses et contradictoires.

Notre étude permet de privilégier un mécanisme par lequel les cellules précancéreuses seraient éliminées en présence de PEG. Le PEG élimine les cellules précancéreuses à la surface de l'épithélium colique, au niveau des foyers de cryptes aberrantes. Il conduit aussi à l'élimination des cellules dont la membrane est endommagée au niveau des cryptes normales, ces cellules étant peut-être elle-mêmes précancéreuses.

Les hypothèses compatibles avec ces résultats sont l'induction par le PEG de la mort cellulaire par choc osmotique, par apoptose après rétablissement des communications intercellulaires, ou par des effets intracellulaires.

D'autre part, cette étude permet de confirmer que l'action du PEG est précoce et intense sur les foyers de cryptes aberrantes, considérés comme un marqueur précoce du cancer colorectal chez le rat.

Le PEG semble donc être une molécule destinée à la chimiothérapie mais sa faible toxicité et son effet local permettraient de l'utiliser également dans un but chimiopréventif, du moins chez les individus à risques. Son avenir est prometteur en médecine humaine mais la preuve mécanistique de son efficacité reste à être approfondie avant de passer aux études cliniques chez l'homme.

Finalement, notre étude a permis de réaliser un petit pas pour l'Homme mais un grand pas pour les Muridés, ce qui finalement replace cette thèse vétérinaire dans son contexte et ne manquera pas d'intéresser la profession...

ANNEXES

ANNEXE N°1

| (a) p<0.0001*** | FDx12 | FDx18 | FDx24 | FDx36 |
|-----------------|-------|-------|-------|-------|
| FDx12 | - | ns | ns | *** |
| FDx18 | ns | - | ns | *** |
| FDx24 | ns | ns | - | *** |
| FDx36 | *** | *** | *** | - |

Tableau n°5.1 :
Statistiques concernant
le nombre de noyaux par crypte

| (b) p<0.0001*** | FDx12 | FDx18 | FDx24 | FDx36 |
|-----------------|-------|-------|-------|-------|
| FDx12 | - | ns | *** | ** |
| FDx18 | ns | - | *** | ** |
| FDx24 | *** | *** | - | ns |
| FDx36 | ** | ** | ns | - |

Tableau n°5.2 :
Statistiques concernant
le nombre de cellules fluorescentes par crypte

| (%) p<0.0001*** | FDx12 | FDx18 | FDx24 | FDx36 |
|-----------------|-------|-------|-------|-------|
| FDx12 | - | ns | ** | *** |
| FDx18 | ns | - | *** | ns |
| FDx24 | ** | *** | - | ns |
| FDx36 | *** | ns | ns | - |

Tableau n°5.3 :
Statistiques concernant
le pourcentage de cellules fluorescentes par crypte

Tableau n°5 : Statistiques de l'étude #0

(ANOVA Tukey) : ns : non significatif ($p > 0.05$) ;

** : très significatif ($0.001 < p < 0.01$) ; *** : extrêmement significatif ($p < 0.001$)

ANNEXE N°2

CN (a) p=0.3089 ns **Tableau n°7.1.1 :** Statistiques concernant le nombre de noyaux par crypte normale

| CN (b) p=0.0368* | Tem | AOMTem | AOMPEG |
|------------------|-----|--------|--------|
| Tem | - | ns | ns |
| AOMTem | ns | - | ns |
| AOMPEG | ns | ns | - |

Tableau n°7.1.2 :
Statistiques concernant le nombre de cellules fluorescentes par crypte normale

| CN (%) p=0.0068** | Tem | AOMTem | AOMPEG |
|-------------------|-----|--------|--------|
| Tem | - | ns | * |
| AOMTem | ns | - | * |
| AOMPEG | * | * | - |

Tableau n°7.1.3 :
Statistiques concernant le pourcentage de cellules fluorescente par crypte normale

| CA (a) p<0.0001*** | Tem | AOMTem | AOMPEG |
|--------------------|-----|--------|--------|
| Tem | - | *** | *** |
| AOMTem | *** | - | *** |
| AOMPEG | *** | *** | - |

Tableau n°7.2.1 :
Statistiques concernant le nombre de noyaux par crypte aberrante

| CA (b) p<0.0001*** | Tem | AOMTem | AOMPEG |
|--------------------|-----|--------|--------|
| Tem | - | *** | *** |
| AOMTem | *** | - | *** |
| AOMPEG | *** | *** | - |

Tableau n°7.2.2 :
Statistiques concernant le nombre de cellules fluorescentes par crypte aberrante

| CA (%) p<0.0001*** | Tem | AOMTem | AOMPEG |
|--------------------|-----|--------|--------|
| Tem | - | *** | ns |
| AOMTem | *** | - | *** |
| AOMPEG | ns | *** | - |

Tableau n°7.1.3 :
Statistiques concernant le pourcentage de cellules fluorescentes par crypte aberrante

Tableau n°7 : Statistiques de l'étude #1

(ANOVA Bonferroni) : ns : non significatif (p>0.05) ;

* : significatif (0.01<p<0.05) ; ** : très significatif (0.001<p<0.01) ; *** : extrêmement significatif (p<0.001)

ANNEXE N°3

CN (a) p=0.1781 ns **Tableau n°9.1.1** : Statistiques concernant le nombre de noyaux par crypte normale

| CN (b) p<0.0001*** | Tem | PEG | AOMTem | AOMPEG |
|--------------------|-----|-----|--------|--------|
| Tem | - | * | ** | ns |
| PEG | * | - | *** | ns |
| AOMTem | ** | *** | - | *** |
| AOMPEG | ns | ns | *** | - |

Tableau n°9.1.2 : Statistiques concernant le nombre de cellules fluorescentes par crypte normale

| CN (%) p<0.0001*** | Tem | PEG | AOMTem | AOMPEG |
|--------------------|-----|-----|--------|--------|
| Tem | - | ** | ** | ns |
| PEG | ** | - | *** | ns |
| AOMTem | ** | *** | - | *** |
| AOMPEG | ns | ns | *** | - |

Tableau n°9.1.3 : Statistiques concernant le pourcentage de cellules fluorescentes par crypte normale

| CA (a) p<0.0001*** | Tem | PEG | AOMTem | AOMPEG |
|--------------------|-----|-----|--------|--------|
| Tem | - | ns | *** | *** |
| PEG | ns | - | *** | *** |
| AOMTem | *** | *** | - | * |
| AOMPEG | *** | *** | * | - |

Tableau n°9.2.1 : Statistiques concernant le nombre de noyaux par crypte aberrante

| CA (b) p<0.0001*** | Tem | PEG | AOMTem | AOMPEG |
|--------------------|-----|-----|--------|--------|
| Tem | - | ns | *** | *** |
| PEG | ns | - | *** | *** |
| AOMTem | *** | *** | - | *** |
| AOMPEG | *** | *** | *** | - |

Tableau n°9.2.2 : Statistiques concernant le nombre de cellules fluorescentes par crypte aberrante

| CA (%) p<0.0001*** | Tem | PEG | AOMTem | AOMPEG |
|--------------------|-----|-----|--------|--------|
| Tem | - | ** | *** | *** |
| PEG | ** | - | *** | *** |
| AOMTem | *** | *** | - | *** |
| AOMPEG | *** | *** | *** | - |

Tableau n°9.1.3 : Statistiques concernant le pourcentage de cellules fluorescentes par crypte aberrante

Tableau n°9 : Statistiques de l'étude #2

(ANOVA Bonferroni) : ns : non significatif (p>0.05) ;

* : significatif (0.01<p<0.05) ; ** : très significatif (0.001<p<0.01) ; *** : extrêmement significatif (p<0.001)

ANNEXE N°4

CN (a) p=0.0542 **Tableau n°11.1.1 :** Statistiques concernant le nombre de noyaux /crypte normale

| CN (b) p<0.0001 | Tem | PEG | AOMTem | AOMPEG |
|-----------------|-----|-----|--------|--------|
| Tem | - | ns | * | * |
| PEG | ns | - | *** | ns |
| AOMTem | * | *** | - | *** |
| AOMPEG | * | ns | *** | - |

Tableau n°11.1.2 :
Statistiques concernant le nombre de cellules fluorescentes par crypte normale

| CN (%) p<0.0001 | Tem | PEG | AOMTem | AOMPEG |
|-----------------|-----|-----|--------|--------|
| Tem | - | ** | ** | ** |
| PEG | ** | - | *** | ns |
| AOMTem | ** | *** | - | *** |
| AOMPEG | ** | ns | *** | - |

Tableau n°11.1.3 :
Statistiques concernant le pourcentage de cellules fluorescentes par crypte normale

| CA (a) p<0.0001 | Tem | PEG | AOMTem | AOMPEG |
|-----------------|-----|-----|--------|--------|
| Tem | - | ns | *** | *** |
| PEG | ns | - | *** | *** |
| AOMTem | *** | *** | - | *** |
| AOMPEG | *** | *** | *** | - |

Tableau n°11.2.1 :
Statistiques concernant le nombre de noyaux par crypte aberrante

| CA (b) p<0.0001 | Tem | PEG | AOMTem | AOMPEG |
|-----------------|-----|-----|--------|--------|
| Tem | - | ns | *** | *** |
| PEG | ns | - | *** | *** |
| AOMTem | *** | *** | - | *** |
| AOMPEG | *** | *** | *** | - |

Tableau n°11.2.2 :
Statistiques concernant le nombre de cellules fluorescentes par crypte aberrante

| CA (%) p<0.0001 | Tem | TemPEG | AOMTem | AOMPEG |
|-----------------|-----|--------|--------|--------|
| Tem | - | ** | *** | *** |
| TemPEG | ** | - | *** | *** |
| AOMTem | *** | *** | - | *** |
| AOMPEG | *** | *** | *** | - |

Tableau n°11.1.3 :
Statistiques concernant le pourcentage de cellules fluorescentes par crypte aberrante

Tableau n°11 : Statistiques des études #1 et #2 cumulées

(ANOVA Bonferroni) : ns : non significatif (p>0.05) ;

* : significatif (0.01<p<0.05) ; ** : très significatif (0.001<p<0.01) ; *** : extrêmement significatif (p<0.001)

BIBLIOGRAPHIE

[Bernier, 97] :

1. **BERNIER J.J., DONAZZOLO Y.** Effet du polyéthylène glycol 4000 à petites doses sur la consistance et l'eau de dilution des selles chez le sujet sain. *Gastroenterologie Clinique et Biologique*, 1997 ; **21** : 7-11.

[Bird, 87] :

2. **BIRD R.P.** Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen : preliminary findings. *Cancer Letter*, 1987 ; **37** : 147-151.

[Bird, 89] :

3. **BIRD R.P., MCLELLAN E.A., BRUCE, W.R.** Aberrant crypts, putative precancerous lesions, in the study of the role of diet in the aetiology of colon cancer. *Cancer Surveys*, 1989 ; **8** : 189-200.

[Bird, 95] :

4. **BIRD R.P.** Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Cancer Letter*, 1995 ; **93** : 55-71.

[Bird, 96] :

5. **BIRD R.P.** Aberrant crypt foci system to study cancer preventive agents in the colon. *Methods in molecular Medicine*, 1996 ; **14** : 465-474.

[Bird, 00] :

6. **BIRD R.P., GOOD C.K.** The significance of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Toxicology Letters*, 2000 ; **112-113** : 395-402.

[Boutron-Ruault, 98] :

7. **BOUSTRON-RUAULT. M.-C.** Alimentation et cancérogenèse colorectale : éléments pour une prévention primaire. *Gastroenterologie Clinique et Biologique*, 1998 ; **22** : 12-20.

[Bruce, 01]

8. **BRUCE W.R., GIACCA A., MEDLINE A.** Possible mechanism relating diet to colorectal cancer risk. *European Conference on Nutrition and Cancer*, 2001. Lyon, IARC.

[Brullet, 92]

9. **BRULLET E., MORON A., CALVET X., FRIAS C., SOLA J.** Urtical reaction to oral polyethylene glycol electrolyte lavage solution. *Gastrointestinal Endoscopy*, 1992 ; **38** : 400-401.

[Cerutti, 94] :

10. **CERUTTI P., GHOSH R., OYA Y., AMSTAD P.** The role of the cellular antioxidant defense in oxidant carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives*, 1994 ; **102** : 123-130.

[Chadwick, 77] :

11. **CHADWICK V.S., PHILIPS S.F., HOFMANN A.F.** Measurements of intestinal permeability using low molecular weight polyethylene glycols (PEG 400). I. Chemical analysis and biological properties of PEG 400. *Gastroenterology*, 1977 ; **73** : 241-246.

[Chadwick, 77] :

12. **CHADWICK V.S., PHILLIPS, S.F., HOFMANN, A.F.** Measurements of intestinal permeability using low molecular weight polyethylene glycols (PEG 400). II. Application to normal and abnormal permeability states in man and animals. *Gastroenterology*, 1977 ; **73** : 247-251.

[Chang, 84] :

13. **CHANG W.W.L.** Histogenesis of colon cancer in experimental animals. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 1984 ; **19** : 27-43.

[Chang, 97]

14. **CHANG W.C.L., CHAPKIN R.S., LUPTON J.R.** Predictive value of proliferation, differentiation and apoptosis as intermediate markers for colon tumorigenesis. *Carcinogenesis*, 1997 ; **18** : 721-730.

[Corpet, 96]

15. **CORPET D.E.** Expérimentation animale en nutrition et cancérogène. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 1996 ; **147** : 175-180.

[Corpet, 97] :

- 16. CORPET D.E., TACHE S., PEIFFER G.** Carborundum, a bulk similar to dietary fibers but chemically inert, does not decrease colon carcinogenesis. *Cancer Letters*, 1997 ; **114** : 35-38.

[Corpet, 99] :

- 17. CORPET D.E., PARNAUD G.** Polyethylene-glycol, a potent suppressor of azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats. *Carcinogenesis*, 1999 ; **20** : 915-918.

[Corpet, 00] :

- 18. CORPET D.E., PARNAUD G., DELVERDIER M., PEIFFER G., TACHE S.** Consistent and fast inhibition of colon carcinogenesis by polyethylene glycol in mice and rats given various carcinogens. *Cancer Research*, 2000 ; **60** : 3160-3164.

[Cummings, 92]

- 19. CUMMINGS J.H., BINGHAM S.A., HEATON K.W., EASTWOOD M.A.** Fecal weight, colon cancer risk, and dietary intake of nonstarch polysaccharides (dietary fiber). *Gastroenterology*, 1992 ; **103** : 1783-1789.

[Decloître, 93] :

- 20. DECLOITRE F.** Impact des facteurs alimentaires sur les mécanismes de la cancérogénèse : bases d'une prévention des cancers par l'alimentation. *Cahier Nutrition Diet*, 1993 ; **28** : 85-95.

[Ferlay, 01] :

- 21. FERLAY J., BRAY F., P. PISANI P., PARKIN D.M.** Globocan 2000 : Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. (Page consultée le 4 mars 2001). *Globocan (International Agency for research on cancer World Health organisation)*, [en ligne]. Adresse URL : <http://www-dep.iarc.fr/dataava/dataicon.htm>.

[Gogichadze, 00] :

- 22. GOGICHADZE G.K., GEDENIDZE A.V.** A paradoxical idea of cancer's resolution. *Medical Hypotheses*, 2000 ; **55** : 300-301.

[Hammer, 89] :

23. HAMMER H.F., SANTA ANA C.A., SCHILLER L.R., FORDTRAN J.S. Studies of osmotic diarrhea induced in normal subjects by ingestion of polyethylene glycol and lactulose. *Journal of Clinical Investigation*, 1989 ; **84** : 1056-1062.

[Hudziak, 96] :

24. HUDZIAK H., BRONOWICKI J.P., FRANCK P., DUBOS-BEROGIN C., BIGARD M.A. Low-dose PEG 4000 : digestive effects. Randomized double-blind study in healthy subjects. *Gastroenterologie Clinique et Biologique*, 1996 ; **20** : 418-423.

[Kelloff, 94] :

25. KELLOFF G.J., BOONE C.W., STEELE V.E., FAY J.R., LUBET R.A., CROWELL J.A., SIGMAN C.C. Mechanistic considerations in chemopreventive drug development. *Journal of cellular biochemistry*, 1994 ; **20** : 1-24.

[Kinzler, 96] :

26. KINZLER K.W., VOGELSTEIN B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, 1996 ; **87** : 159-170.

[Krstić, 91]

27. KRSTIĆ R. Human Microscopic Anatomy. Berlin : Springer-Verlag, 1991. 222p

[Laboisse, 88] :

28. LABOISSE C.L., MAORET J.-J., TRIADOU N., AUGERON C. Restoration by polyethylene glycol of characteristics of intestinal differentiation in subpopulations of the human adenocarcinoma cell line HT29. *Cancer Research*, 1988 ; **48** : 2498-2504.

[Lapré, 91] :

29. LAPRE J.A., KLEIBEUKER J.H., VAN DER MEER R. Intestinal alkaline phosphatase activity in fecal water reflects epitheliolysis and is decreased by dietary calcium. *Gastroenterology*, 1991 ; **100** : A378.

[Lapré, 93] :

30. LAPRE J.A., DE VRIES H.T., TERMONT D.S.M.L., KLEIBEUKER J.H., DE VRIES E.G.E., VAN DER MEER R. Mechanism of protective effect of supplemental dietary calcium on cytolytic activity of fecal water. *Cancer research*, 1993 ; **53** : 248-253.

[Le Marchand, 98] :

31. LE MARCHAND L. Constipation and colon cancer. *Epidemiology*, 1998 ; **9** : 371-372

[Lentz, 92] :

32. LENTZ B.R., MCINTYRE G.F., PARKS D.J., Yates J.C., MASSENBURG D. Bilayer curvature and certain amphipaths promote poly(ethylene glycol)-induced fusion of dipalmitoylphosphatidylcholine unilamellar vesies. *Biochemistry*, 1992 ; **31** : 2643-2653.

[Lentz, 94] :

33. LENTZ B.R. Polymer-induced membrane fusion : potential mechanism and relation to cell fusion events. *Chemistry and physics of lipids*, 1994 ; **73** : 91-106.

[Lugea, 00] :

34. LUGEA A., SALAS A., CASALOT J., GUARNER F., MALAGELADA J.-R. Surface hydrophobicity of the rat colonic mucosa is a defensive barrier against macromolecules and toxins. *Gut*, 2000 ; **46** : 515-521.

[McDowell, 98] :

35. MCDOWELL C.L., CARVER R.T., PAPOUTSAKIS E.T. Effects of methocel A15LV, polyethylene glycol, and polyvinyl alcohol on CD13 and CD33 receptor surface content and metabolism of HL60 cells in stirred tank bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 1998 ; **60** : 251-258.

[McNeil, 89] :

36. MCNEIL P.L., ITO S. Gastrointestinal cell plasma membrane wounding and resealing in vivo. *Gastroenterology*, 1989 ; **96** : 1238-1248.

[Michaels, 91] :

37. MICHAELS J.D., PAPOUTSAKIS E.T. Polyvinyl alcohol and polyethylene glycol as protectants against fluid-mechanical injury of freely-suspended animal cells (CRL 8018). *Journal of Biotechnology*, 1991 ; **19** : 241-257.

[Mullin, 97] :

38. MULLIN J.M. Potential interplay between luminal growth factors and increased tight junction permeability in epithelial carcinogenesis. *The Journal of Experimental Zoology*, 1997 ; **279** : 484-489.

[Naigamwalla, 01] :

- 39. NAIGAMWALLA D., CHIA M.C., TRAN T.T., MEDLINE A., HAY K., GALLINGER S., BRUCE W.R.** Polyethylene glycol 8000 and colon carcinogenesis : inhibition in the F344 rat, promotion in the Min mouse. *Cancer Research*, 2000 ; **60** : 6856-6858.

[Parlesak ,94] :

- 40. PARLESAK A., BODE J.C., BODE C.** Parallel determination of gut permeability in man with Mr 400, Mr 1500, Mr 4000 and Mr 10000 polyethylene glycol. *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, 1994 ; **32** : 813-820.

[Parnaud, 98] :

- 41. PARNAUD G., PEIFFER G., TACHÉ S., CORPET D.E.** Effect of meat (beef, chicken, and bacon) on rat colon carcinogenesis. *Nutrition and Cancer*, 1998 ; **32** : 165-173.

[Parnaud, 99 (1)] :

- 42. PARNAUD G.** *Prévention de la cancérogenèse colorectale par l'alimentation : effet des viandes et des polyéthylène-glycols chez le rat.* Thèse de Doctorat : Alimentation et Cancer : Toulouse : 1999. 153 p.

[Parnaud, 99 (2)] :

- 43. PARNAUD G., TACHÉ S., PEIFFER G., CORPET D.E.** Polyethylene-glycol suppresses colon cancer and causes dose-dependent regression of AOM-induced ACF in rats. *Cancer Research*, 1999 ; **59** : 5143-5147.

[Parnaud, 00] :

- 44. PARNAUD G., PIGNATELLI B., PEIFFER G., TACHÉ S., CORPET D.E.** Endogenous N-Nitroso compounds, and their precursors, present in bacon, do not initiate or promote aberrant crypt foci in the colon of rats. *Nutrition and Cancer*, 2000 ; **38** : 74-80.

[Parnaud,001 (1)] :

- 45. PARNAUD G., CORPET D.E., GAMET-PAYRASTRE L.** Cytostatic effect of polyethylene glycol on human colonic adenocarcinoma cells. *International Journal of Cancer*, 2001 ; **92** : 69-69

[Parnaud, 01 (2)] :

- 46. PARNAUD G., TACHÉ S., PEIFFER G., CORPET D.E.** Pluronic F68 block polymer, a very potent suppressor of carcinogenesis in the colon of rats and mice. *British Journal of Cancer*, 2001 ; **84** : 90-93.

[Riboli, 96]

- 47. RIBOLI E., DECLOITRE F., COLLET-RIBBING C.** *Alimentation et Cancer : Evaluation des Données Scientifiques*. Paris : Lavoisier TEC&DOC, 1996. 533 p.

[Ross, 99]

- 48. ROSS P.C., HUI S.W.** Polyethylene-glycol enhances lipoplex-cell association and lipofection. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1999 ; **1421** : 273-283.

[Roy, 01]

- 49. ROY H.K., DI BAISE J.K., BLACK J., KAROLSKI W.J., RATASHAK A., ANSARI S.** Polyethylene glycol induces apoptosis in HT-29 cells : potential mechanism for chemoprevention of colon cancer. *FEBS Letter*, 2001 ; **496** : 143-146.

[Schiller, 97] :

- 50. SCHILLER L.R., SANTA ANA C.A., PORTER J., FORDTRAN J.S.** Validation of polyethylene glycol 3350 as a poorly absorbable marker of intestinal perfusion studies *Digestive Diseases and Sciences*, 1997 ; **42** : 1-5.

[Schiller, 99] :

- 51. SCHILLER L.R.** Clinical pharmacology and use of laxatives and lavage solutions. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 1999 ; **28** : 11-18.

[Scmolka, 91] :

- 52. SCHMOLKA I.R.** Physical basis for poloxamer interactions *Annual NY Academic Science*, 1991 ; 92-97.

[Schumann, 91]

- 53. SCHUMAN E., BALSAM P.E.** Probable anaphylactic reaction to polyethylene glycol electrolyte lavage solution. *Gastrointestinal Endoscopy*, 1991 ; **2** : 19-33.

[Steinberg, 1982]

54. STEINBERG M.L., DEFENDI V. Fusion-induced differentiation of SV-40 infected human keratinocytes. *Experimental Cell Research*, 1982 ; **139** : 369-375.

[Takayama, 98] :

55. TAKAYAMA T., ET AL. Aberrant crypt foci of the colon as precursors of adenoma and cancer. *The New England Journal of Medicine*, 1998 ; **339** : 1277-1284.

[Togo, 99] :

56. TOGO T., ALDERTON J.M., BI G.-Q, STEINHARDT R.A. The mechanism of facilitated cell membrane resealing. *Journal of Cell Science*, 1999 ; **112** : 719-731.

[Vogelstein, 89]

57. VOGELSTEIN B., FEARON R., KERN S., HAMILTON S., PREISINGER A., NAKAMURA Y., WHITE R. Allelotype of Colorectal Carcinomas. *Science*, 1989 ; **244** : 207-211

[Wargovich, 92] :

58. WARGOVICH M.J., HARRIS C., CHEN, C.-D, PALMER C., STEELE V.E., KELLOFF G.J. Growth and chemoprevention of aberrant crypts in the rat colon. *Journal of Cellular Biochemistry*, 1992 ; **16** : 51-54.

[Wattenberg, 96] :

59. WATTENBERG L. Inhibition of Carcinogenesis by Minor Dietary Constituents. *Cancer Research*, 1992 ; **52** : 2085s-2091s.

[Weinberg, 96] :

60. WEINBERG R. L'apparition des cancers. *Pour la Science*, 1996 ; **229** : 34-42.

[Weinstein, 88] :

61. WEINSTEIN I.B. The origins of human cancer: molecular mechanisms of carcinogenesis and their implications for cancer prevention and treatment. *Cancer Research*, 1988 ; **48** : 4135-4143.

[Winne, 82] :

- 62. WINNE D., GORIG H.** Appearance of ¹⁴C-polyethylene glycol 4000 in intestinal venous blood : influence of osmolarity and laxatives, effect on net water flux determination. *Naunyn Schmiedebergs Archive of Pharmacology*, 1982 ; **321** : 149-156.

[Yamasaki, 91] :

- 63. YAMASAKI H.** Aberrant expression and function of gap junctions during carcinogenesis. *Environnemental Health Perspectives*, 1991 ; **93** : 191-197.

[X, 98] :

- 64.** Prévention, dépistage et prise en charge des cancers du côlon. Conférence de consensus. Paris, France, Janvier 1998. *Gastroenterologie Clinique et Biologique*, 1998 ; **22** : 205-226.

Agrément

Titre : Mécanisme de la suppression du cancer par le polyéthylène-glycol :
Il élimine les cellules précancéreuses marquées au dextran fluorescent dans le côlon du rat.

Résumé :

Le polyéthylène glycol est un puissant agent de chimioprévention contre la cancérogenèse colorectale chez le rat. Mais le mécanisme est inconnu. Nous nous demandons si le PEG protège ou détruit les cellules des lésions préneoplasiques dans la muqueuse colique.

Pour tester ces hypothèses, cette étude a été réalisée sur des rats Fisher 344. La cancérogenèse a été initiée par injection d'un cancérigène colique, l'azoxyméthane (20mg/kg de poids vif). Les colonocytes ont été marqués en gavant les rats avec du dextran fluorescent (PM 4400) : il marque les cellules dont la membrane est endommagée. 6 heures après ce gavage, les rats ont reçu un traitement à 5% de PEG8000 dans l'eau de boisson, pendant 18h, puis sacrifiés. Sur les côlons fixés, les cellules marquées ont été comptées dans les cryptes normales et les cryptes aberrantes, considérées comme pré-néoplasiques. Nous avons étudié 22 rats, examiné 2360 cryptes normales et 755 cryptes aberrantes.

Les résultats sont extrêmement significatifs :

- La proportion de cellules fluorescentes dans les cryptes aberrantes est plus du double de celle dans les cryptes normales. Nous pensons que les cryptes aberrantes sont constituées de cellules précancéreuses qui sont incomplètement différenciées. Leur membrane serait plus fragiles et plus perméable au dextran de haut PM.
- Le traitement par le PEG normalise la proportion de cellules fluorescentes dans les cryptes aberrantes. Il semble que le PEG élimine les cellules préneoplasiques marquées.

Les résultats suggèrent que la protection permise par le PEG contre la cancérogenèse colorectale vient de l'élimination des cellules précancéreuses de la surface de la muqueuse colique. Le PEG agit donc un peu comme une molécule de chimiothérapie. Sa faible toxicité en fait un candidat potentiel aux essais cliniques chez l'homme.

Mots-clés : **polyéthylène-glycol – néoplasme – côlon – rat – prévention – lutte**

English title : **PEG Suppression of Cancer in the Colon of Rats:
*A Novel Mechanism Involving Elimination of Precancerous Cells***

Abstract :

Polyethylene-glycol (PEG) is a strikingly potent chemopreventive agent against colorectal cancer in rats. However, the mechanism is unknown. We speculated that PEG could either protect, or destroy, cells in preneoplastic lesions in the colon mucosa.

To test these hypotheses, the present study was done in Fisher 344 rats. Carcinogenesis was initiated by injection of a colon carcinogen, azoxymethane (20mg/kg BW). The colon cells were marked by gavaging the rats with fluorescein dextran (MW 4400) : it tags cells with wounded membrane. 6 hours after this gavage, rats were given drinking water containing 5% PEG8000, for 18h, then sacrificed. On the fixed colons, labeled cells were counted in both normal and aberrant crypts, assumed to be preneoplastic lesions. We studied 22 rats, and scored 2360 normal crypts and 755 aberrant crypts.

The results were extremely significant :

- The proportion of fluorescent cells in aberrant crypts was more than twice the proportion in normal crypts. We think aberrant crypts contain precancerous cells, which are not fully differentiated. Their membrane may be leaky and let the high MW dextran enter the cell.
- PEG treatment normalized the proportion of fluorescent cells in aberrant crypts: PEG-treated rats had aberrant crypts that looked like normal crypts. It seems that PEG eliminated the marked preneoplastic cells.

The results suggest that the protection afforded by PEG against colorectal carcinogenesis comes from the elimination of precancerous cells from the surface of colon mucosa. PEG works a bit like a chemotherapeutic agent. Because PEG is not toxic at all, its cancer chemopreventive potential should be tested in a human clinical trial.

Key words : **polyethylene-glycol – neoplasm – colon – rat – prevention – fight**