

INFLUENCE DES CONSTITUANTS DU COGNAC SUR LA CANCEROGENESE COLIQUE CHIMIQUEMENT INDUITE CHEZ LE RAT

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement en 2002
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Benoît HADENGUE

Né, le 5 janvier 1974 à AGEN (Lot-et-Garonne)

Directeur de thèse : M. le Professeur Denis CORPET

JURY

PRESIDENT :
M. Roland BUGAT

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :
M. Denis CORPET
M. Guy BODIN

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Table des matières

Introduction	13
Données bibliographiques	15
1- Le cancer	15
1-1 Epidémiologie du cancer.....	15
1-2 Biologie du cancer.....	18
1-2-1 La cancérogenèse.....	18
1-2-2 La cancérogenèse colo-rectale.....	21
2- Alimentation et cancer du côlon	25
2-1 Données épidémiologiques.....	25
2-2 Mécanismes d'interaction.....	26
2-3 Alcool et Cancer colo-rectal.....	32
2-3-1 Données épidémiologiques.....	32
2-3-2 Données expérimentales.....	33
2-3-3 Mécanismes d'action.....	33
2-4 Polyphénols et Cancer colo-rectal.....	34
2-4-1 Apports et biodisponibilité.....	34
2-4-2 Données épidémiologiques.....	36
2-4-3 Données expérimentales.....	36
2-4-4 Mécanismes d'action.....	38
Etude in vivo de l'influence des constituants du cognac sur la cancérogenèse colique chimiquement induite	43
1- Définition du sujet	43
2- Matériels et méthodes	44
2-1 Protocole.....	44
2-2 Composition et consommation des régimes.....	45
2-2-1 Régime standard et mode d'administration.....	45
2-2-2 Elaboration et composition des régimes.....	45
2-2-3 Consommations et apports.....	47
2-3 Induction chimique de la cancérogenèse colique.....	51
2-4 Evaluation des paramètres de la cancérogenèse colique.....	53
2-4-1 Test 3D : DNA Damage Detection.....	53
2-4-2 Dénombrement des foyers de cryptes aberrantes.....	54
3- Résultats	56
3-1 Quantification des lésions néoplasiques coliques.....	56
3-2 Quantification des lésions à l'ADN.....	58
4- Discussion	60
Conclusion Générale	65
Références bibliographiques	69
Annexe	77

Table des illustrations

Liste des figures :

	page	
figure 1 :	Répartition de l'incidence des cancers dans le monde en 1998	16
figure 2 :	Schéma du processus de cancérogenèse	20
figure 3 :	Histologie de la muqueuse colique normale.	22
figure.4 :	Foyer de cryptes aberrantes	22
figure 5 :	Etapes et gènes impliqués dans le processus de cancérogenèse colo-rectale	24
figure 6 :	Structure chimique des principaux polyphénols du cognac	38
figure 7 :	Mécanisme hypothétique de l'interaction de polyphénols avec le système de réponse au choc septique	39
figure 8 :	Différents niveaux d'actions des polyphénols dans la prévention de la cancérogenèse	41
figure 9 :	Schéma chronologique du protocole	44
figure 10 :	Consommations d'aliment et boissons	47
figure 11 :	Apports caloriques moyens des différents régimes	48
figure 12 :	Courbe de poids	49
figure 13 :	Apports en polyphénols	49
figure 14 :	Métabolisme de la DMH	52
figure 15 :	Principe du test 3D	53
figure 16 :	Evolution des cryptes au cours de la cancérogenèse	54
figure 17 :	Photographie de FCA colique	55
figure 18 :	Nombre total de FCA en fonction des régimes	56
figure 19 :	Nombre de foyers contenant 4 cryptes aberrantes et plus	56
figure 20 :	Lésions à l'ADN extrait des prélèvements de côlon	58

Liste des tableaux :

tableau I :	Facteurs responsables des cancers en France	18
tableau II :	Facteurs modulant l'apparition de cancer colo-rectal	26
tableau III :	Alimentation et cancérogenèse colo-rectale : différents niveaux d'interactions possibles	31
tableau IV :	Apports en polyphénols consécutifs à la consommation de vins et spiritueux	35
tableau V :	Données relatives à la biodisponibilité des polyphénols	35
tableau VI :	Composition de l'aliment standard	45
tableau VII :	Composition en polyphénols du Cognac enrichi	46
tableau VIII :	Teneur des régimes en éthanol et polyphénols	47
tableau IX :	Apports en polyphénols totaux, acide ellagique et éthanol pour chaque régime	50
tableau X :	Dénombrement des FCA en fonction des régimes	57
tableau XI :	Comparatif de la présente étude et des études de Caderni (et al, 1999 et 2000)	62

INTRODUCTION

L'Organisation Mondiale de la Santé estime à environ sept millions le nombre de personnes qui décèdent chaque année des suites d'un cancer dans le monde, ce qui fait de cette maladie un problème majeur de santé publique, particulièrement dans la plupart des pays industrialisés où elle est en tête des causes de mortalité.

Or, même si des progrès indéniables ont été obtenus dans le dépistage, la précision et la précocité des diagnostics ainsi que la prise en charge des patients, les avancées thérapeutiques s'avèrent somme toutes décevantes. Conjointement, de nombreuses études épidémiologiques suggèrent que l'apparition des cancers est en grande partie liée à des facteurs environnementaux, et en particulier que plus d'un tiers des cancers mortels, parmi lesquels le cancer colo-rectal, serait dû à l'alimentation. Ces observations mettent en évidence le rôle essentiel de la prévention dans la lutte contre cette maladie.

Dans le cadre de cette prévention, on a recherché les effets protecteurs de certains régimes vis-à-vis de la mortalité par cancer au cours de différentes études épidémiologiques, complétées par des études analytiques et expérimentales de ces régimes. Ainsi, les composés de la famille des polyphénols, rencontrés dans des aliments largement consommés tels que les fruits et légumes, le thé, des boissons alcoolisées parmi lesquelles le vin et certains spiritueux, ont fait l'objet de nombreuses recherches concernant leurs effets bénéfiques pour la santé, en particulier par l'étude de leurs propriétés antioxydantes.

C'est dans ce contexte que se situe l'étude présentée ci-après et lors de laquelle nous avons tenté d'évaluer l'influence des constituants du cognac, un spiritueux contenant des polyphénols issus du vieillissement en fût de chêne, au cours d'une expérience de cancérogenèse colique chimiquement induite chez le rat.

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

1- Le cancer

1-1 Epidémiologie du cancer

Le cancer est une affection polymorphe vraisemblablement connue depuis toujours (elle est décrite depuis l'Antiquité), qui a vu au cours du 20^{ème} siècle son incidence croître considérablement pour constituer de nos jours l'un des fléaux majeurs menaçant la santé publique. Le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) dénombrait ainsi en 1996 près de 10 millions de cas et sept millions de décès imputables à cette maladie dans le monde. Parallèlement, les recherches médicales et scientifiques consacrées aux traitements et à la prévention du cancer n'ont cessé de croître et de se perfectionner, quoique les résultats thérapeutiques demeurent décevants en regard des espoirs immenses nourris il y a une trentaine d'années.

Le cancer est d'autre part une maladie pluri-factorielle, frappant inégalement les populations (figure 1), en fonction de facteurs de risque génétiques mais aussi de facteurs divers, difficiles à apprécier isolément, et qui peuvent être aussi bien géographiques, sociologiques que psychologiques : stress, exposition excessive au soleil ou à des substances cancérigènes (leucémies et benzène, cancers de la plèvre et amiante). D'emblée, l'alimentation se pose comme un facteur complexe dans la mesure où elle peut être source de substances protectrices (fibres, vitamines) comme de composés cancérigènes, des corrélations ayant été montrées par exemple entre l'exposition alimentaire à l'ochratoxine A (une mycotoxine) et les cancers du tractus urinaire dans les Balkans, ou entre les amines hétérocycliques issues de la cuisson des protéines et le cancer colo-rectal dans les pays industrialisés (Pfohl-Leszkowicz et al, 2002 ; Sugimura et Wakabayashi, 1990)

L'épidémiologie descriptive, en étudiant les fortes différences géographiques dans l'incidence du cancer, peut concourir à déterminer les causes probables de sa survenue. Certains pays ou zones géographiques vont ainsi présenter une incidence particulièrement élevée pour un type de cancer (le cancer de l'estomac au Japon par

exemple), qui peut être lié à un mode de vie autochtone (la consommation de poissons conservés par salaison et fumaison). De même, l'étude des flux migratoires a permis de mettre en évidence l'influence des conditions de vie : au bout d'un certain temps, une personne immigrée présentera les mêmes risques de cancers que la population du pays d'accueil, si tant est qu'elle en adopte également le mode de vie, en particulier le régime alimentaire (CIRC, 1998), ce qui est particulièrement vrai dans le cas du cancer du côlon.

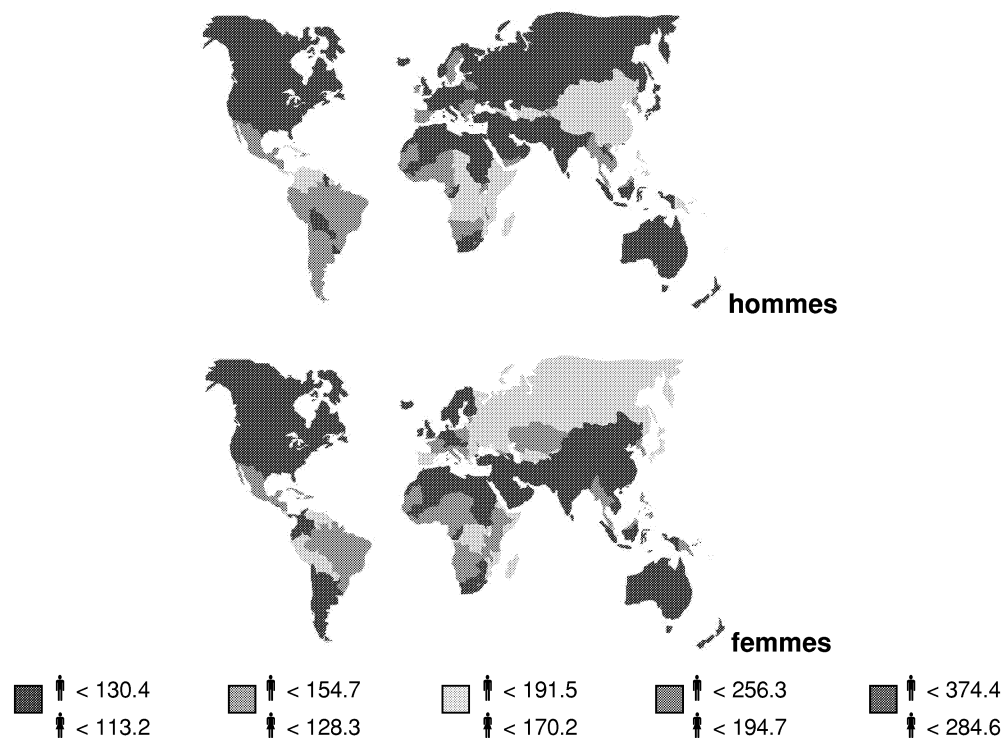


fig.1 : Répartition de l'incidence des cancers dans le monde en 1998
(données exprimées en taux standardisés par âge sur la population standard mondiale/100 000)

En France, le cancer constitue la première cause de mortalité depuis 1989, devant les maladies cardio-vasculaires, avec plus de 200 000 nouveaux cas diagnostiqués par an, tous âges et sexes confondus (Hill et Doyon, 1997). Les tumeurs cancéreuses représentent ainsi un tiers des causes de décès chaque année en France (INSEE, 1997), qui se situe au quatrième rang européen pour la fréquence d'apparition de nouveaux cas de cancers au cours de l'année 1996.

En ce qui concerne la répartition des cancers en fonction des organes ou tissus, femmes et hommes confondus, le cancer du sein est le plus fréquent, suivi des cancers du côlon/rectum et du poumon. La mortalité la plus forte est observée chez les personnes atteintes de cancer du poumon (24 338 décès en 1996 en France), puis chez les individus atteints par une tumeur colique ou rectale (16 050 décès en 1996 en France).

L'incidence des cancers colo-rectaux suit sensiblement la même disparité géographique que l'ensemble des cancers, et le CIRC a estimé à 945 000 le nombre de personnes touchées par ces cancers au cours de l'année 2000 dans le monde. Le taux de survie à 5 ans est de 50 à 60%, et 493.000 personnes en auraient succombé en 2000, soit 7.9% des décès par cancer (CIRC, 2000). A l'échelle mondiale, c'est le quatrième type de cancer le plus fréquent chez l'homme (après ceux du poumon, de l'estomac et de la prostate) et le troisième le plus fréquent chez la femme (après ceux du sein et de l'utérus). Si l'incidence semble être la même quel que soit le sexe dans le cas du cancer du côlon, les hommes ont entre 20 et 50% de risques supplémentaires d'être atteints de cancer du rectum.

Les pays industrialisés regroupent 65% des cas recensés dans le monde, avec des zones à haut risque identifiées en Amérique du Nord, Europe et Australie/Nouvelle-Zélande.

Au fil des études épidémiologiques descriptives et analytiques se dégagent six facteurs principaux influençant la cancérogenèse chez l'Homme : le régime alimentaire, le tabagisme, les mécanismes liés à la reproduction, les infections bactériennes et virales, l'environnement chimique et physique et les facteurs héréditaires (Trichopoulos et al, 1996). Ces derniers, cependant, représenteraient moins de 5% des cancers mortels, tandis que l'alimentation, l'alcool (qui est un ingrédient alimentaire) et le tabac seraient les principaux responsables des cancers (tableau I).

Tableau I : Facteurs responsables des cancers en France

(d'après Hill et Doyon, 1997)

Facteurs	Proportion de décès par cancer (%)
Alimentation	35 (10 - 70, Doll et Peto, 1981)
Alcool	12
Tabac	22
Infections	10
Vie reproductive	8
Expositions professionnelles	4 (sous-estimation possible)
Additifs alimentaires	1
Pollutions	3
Géophysiques (soleil, radioactivité naturelle...)	3
Facteurs iatrogènes (radiologie...)	1
Facteurs héréditaires	< 5

1-2 Biologie du cancer

1-2-1 La cancérogenèse

(figure 2)

Sous le terme de cancer se retrouvent en réalité une multitude d'affections protéiformes touchant pratiquement tous les tissus de l'organisme, mais qui ont en commun une croissance cellulaire non contrôlée menant à l'invasion des tissus environnants, potentiellement suivie d'une migration vers d'autres tissus (métastases). La mortalité peut survenir dès lors que ces cellules cancéreuses viennent à bloquer ou perturber gravement le fonctionnement d'organes vitaux.

Les recherches expérimentales menées depuis plusieurs dizaines d'années ont permis de mettre en évidence les mécanismes fondamentaux qui régissent le développement du cancer. Toutes les cellules d'une tumeur sont issues d'une unique cellule dont la division est devenue anormale sous la pression de facteurs multiples. La transformation maligne de la cellule responsable de la tumeur, qui survient à la suite de l'accumulation de mutations dans certains de ses gènes, est un phénomène lent (jusqu'à plusieurs dizaines d'années chez l'Homme) traditionnellement décrit en

trois étapes : la phase d'initiation, la phase de promotion et la phase de progression-invasion (Vogelstein et Kinzler, 1993).

La **phase d'initiation** comprend une altération du matériel génétique de la cellule, stable et transmissible aux cellules-filles, conférant ainsi un caractère irréversible à ce premier stade du processus cancérogène. Un certain taux de lésions de l'ADN a lieu spontanément à la suite de mécanismes endogènes, mais celles-ci peuvent également être produites à la suite d'exposition à des agents cancérogènes. Dans un premier temps les agents cancérogènes sont principalement métabolisés par un système enzymatique dépendant du cytochrome P450 (enzymes de phase I), visant à accroître leur hydrosolubilité en vue d'en faciliter l'élimination. Les métabolites intermédiaires sont ensuite pris en charge par un deuxième ensemble d'enzymes (enzymes de phase II) qui se charge de les éliminer via les voies urinaires ou biliaires après conjugaison à des composés hydrophiles. Or, ce système de métabolisation complexe conduisant normalement à une détoxification des xénobiotiques, peut donner naissance à des métabolites électrophiles mutagènes qui vont passer la membrane nucléaire et réagir avec la molécule d'ADN. Certains de ces composés électrophiles (molécules dérivées par exemple du benzo(a)pyrène, de l'aflatoxine ou d'amines aromatiques hétérocycliques) peuvent ainsi se lier de manière covalente à une base de l'ADN et former ce qu'on appelle un adduit de l'ADN. D'autres agents (le bromure d'éthidium par exemple) sont capables de s'intercaler entre deux bases d'un même brin ou entre les deux brins d'ADN. On peut également observer des pontages entre l'ADN et des protéines (par le rayonnement UV par exemple), ou des pontages inter-brins. Des cassures simple ou double brins de l'ADN peuvent aussi survenir (provoquées par les rayons X par exemple, ou conséquence des autres lésions).

Lorsque l'ADN est endommagé, les mécanismes cellulaires de réparation entrent en jeu. La grande majorité des lésions de l'ADN est ainsi éliminée par un mécanisme fidèle d'excision-resynthèse. Cependant, dans certains cas, un système de réparation infidèle (système SOS) peut avoir lieu, ce qui permet la survie de la cellule mais induit des mutations responsables de l'apparition de cellules initiées.

Deux classes de gènes, les proto-oncogènes qui stimulent la croissance cellulaire et les gènes suppresseurs de tumeurs (tels que le gène codant pour la protéine P53 capable d'induire l'apoptose) qui l'inhibent, ont un rôle fondamental dans l'apparition du cancer. Des mutations de ces deux classes de gènes seront

responsables de la prolifération cellulaire incontrôlée (Stanley, 1995). Des précisions sur la survenue de ce processus nous sont apportées par Hahn (et al, 1993) qui est parvenu à faire évoluer des cellules épithéliales humaines normales (HEK) et des fibroblastes (BJ) en cellules cancéreuses in vitro. Cette cancérisation a été rendue possible par l'introduction de deux gènes modifiés dans le génome de la cellule (l'un inhibant les protéines RB et p53, l'autre activant la protéine Ras, protéines contrôlant le cycle cellulaire), et du gène hTERT induisant la production de télomérase nécessaire à la prolifération cellulaire (chez l'Homme, les télomères raccourcissent au cours des divisions cellulaires successives jusqu'à induire l'entrée en apoptose de la cellule).

La **phase de promotion** est constituée par le passage de la cellule initiée d'un état phénotypiquement normal, qui peut durer des années, à un état prolifératif. Cette étape, qui est réversible, est induite par différents facteurs (chimiques, physiques) en quantité suffisamment importante pour provoquer l'expression de la mutation. Les substances promotrices présentent de manière générale une absence de pouvoir génotoxique. Ce sont principalement des mécanismes épigénétiques impliquant les voies de signalisation cellulaire et de communications intercellulaires qui interviennent au cours de cette étape (Decloître et Puiseux-Dao, 1993).

L'acquisition définitive de la malignité s'effectue au cours d'une **phase de progression** qui aboutit à la tumeur proprement dite. Cette étape est elle irréversible et se caractérise par une grande instabilité génomique. La dernière phase qui peut survenir est celle de l'**invasion** se manifestant par la dissémination des cellules tumorales migrant de leur organe d'origine vers d'autres tissus (invasion métastatique).

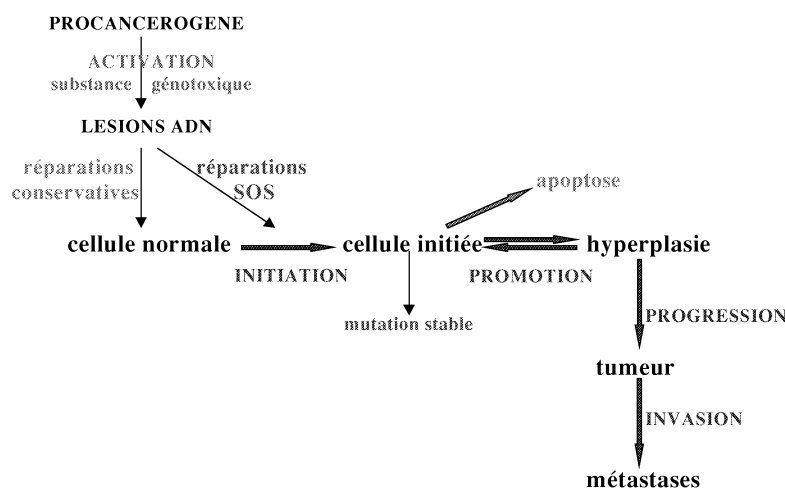


fig.2 : Schéma du processus de cancérogenèse

1-2-2 La cancérogenèse colo-rectale

La plupart des cancers colorectaux sont sporadiques (80% des cas), mais il existe également deux formes issues de susceptibilités génétiques héréditaires : la polypose adénomateuse familiale (FAP : Familial Adenomatous Polyposis) et le syndrome HNPCC (Hereditary Non Polyposis Colon Cancer).

Eléments d'anatomo-physiologie :

Le côlon humain, situé dans la partie distale du tube digestif, est un organe long de plus d'un mètre. Il contribue à trois fonctions essentielles de la digestion :

- 1) la régulation du volume des matières fécales par absorption d'eau et d'électrolytes
- 2) l'entreposage et l'évacuation maîtrisée des selles
- 3) la digestion et l'absorption des aliments non encore digérés.

Le côlon se divise en cinq parties depuis son extrémité proximale : le cæcum, le côlon ascendant, le côlon transverse, le côlon descendant et le côlon sigmoïde, et se termine par le rectum et l'anus.

La muqueuse colique est constituée d'une lamina propria, ou chorion, où sont enchâssés des leucocytes et des cellules musculaires lisses. Elle est bordée par une rangée de cellules épithéliales. Dans le côlon, la muqueuse est lisse, contrairement à celle de l'intestin grêle, et est invaginée en tubules droits, les glandes de Lieberkühn, à la base desquelles se trouvent les cryptes (figure 3).

L'épithélium colique est formé de cellules cylindriques absorbantes, et de cellules caliciformes sécrétant des mucines qui protègent la muqueuse d'une invasion par les bactéries présentes dans la lumière. Cet épithélium est en constant renouvellement : le fond de la crypte est constitué de cellules souches non différenciées qui prolifèrent, puis migrent vers le haut du tubule tout en subissant un processus de différenciation, avant d'être éliminées dans la lumière colique.

Chez l'Homme, l'épithélium colique est complètement remplacé en quatre à huit jours. La muqueuse colique, vascularisée et innervée, est également reliée au réseau lymphatique qui peut devenir une voie de dissémination de cellules tumorales.

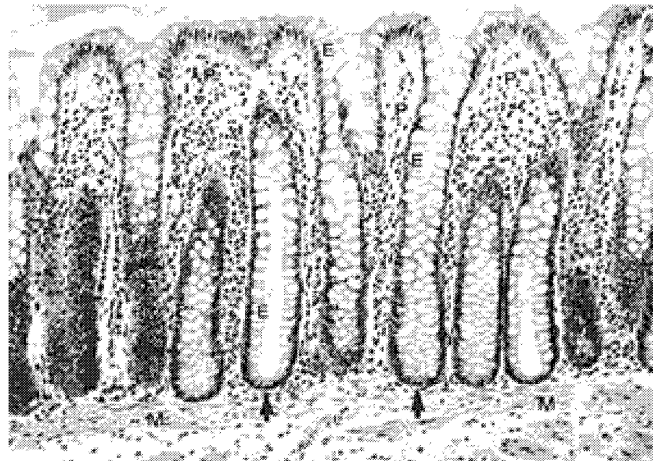


fig.3 : Histologie de la muqueuse colique normale.

E : cellules épithéliales, P : lamina propria, M : lamina muscularis mucosa
Les fonds des cryptes, qui contiennent les cellules souches, sont signalées par une flèche
 (source : site Internet Gastromed-Suisse)

Aspects histo-pathologiques

L'évolution du cancer colo-rectal est une des mieux connues, d'une part du fait de sa durée (10 ans en moyenne) et de son déroulement qui s'effectue en général par étapes bien définies, d'autre part parce que le côlon est facilement accessible par endoscopie, ce qui a facilité la reconnaissance de ces étapes.

La phase la plus précoce de la perturbation de l'équilibre cellulaire est celle des foyers de cryptes aberrantes (FCA) (figure 4). Une production accrue et anarchique des cellules cryptiques conduit à une dilatation, élongation ou fission des cryptes.

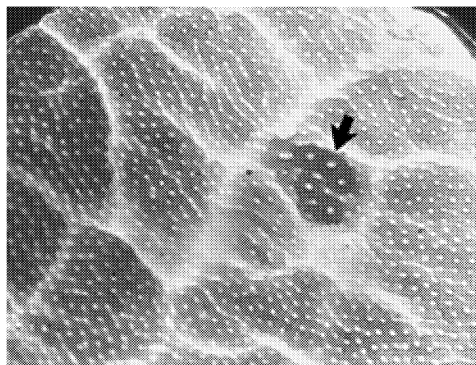


fig.4 : Foyer de cryptes aberrantes
stéréomicroscopie après coloration au bleu de méthylène
 (source : Internet Gastromed-Suisse)

Le modèle adénome-carcinome (Hill et al, 1978) est l'hypothèse admise aujourd'hui dans le processus de cancérogenèse colo-rectale. Celui-ci propose que la lésion initiale se développe en polype adénomateux avant d'évoluer en tumeur (d'autres lésions polypoïdes non-néoplasiques pouvant survenir dans le côlon, de nature inflammatoire notamment).

Les adénomes sont habituellement classés selon leur architecture tubulaire, la majorité des carcinomes se développant dans des polypes villosités. La taille de la lésion est également un paramètre de gravité à considérer : les adénomes dépassant un centimètre contiennent un petit foyer de carcinome dans 10% des cas seulement alors que dans les adénomes de plus de 3 cm, on le retrouve dans 50% des cas. Enfin le degré de dysplasie, laquelle résulte des altérations de la prolifération et de la différenciation cellulaires, est le critère le plus significatif. On apprécie ce degré au niveau des modifications architecturales (irrégularité des glandes, stratification des cellules épithéliales) et au niveau de la morphologie des cellules : irrégularité des noyaux, activité mitotique élevée, augmentation du rapport noyau/cytoplasme et perte de différenciation (moins de cellules caliciformes) (Hermanek, 1989).

La distribution des adénomes dans le côlon est assez typique. 75% des lésions se trouvent dans le rectosigmoïde. Dans la majorité des cas, les adénomes sont solitaires, mais la multiplicité des adénomes est un facteur de risque supplémentaire pour le développement de nouveaux adénomes et/ou carcinomes.

Modèle moléculaire (figure 5)

Dans le cadre d'une recherche intensive survenue pendant les deux dernières décennies, qui a entre autre abouti à la découverte de la pathogénie des syndromes familiaux, l'équipe de Vogelstein a proposé un modèle moléculaire du déroulement de la carcinogenèse colo-rectale (Fearon et Vogelstein, 1990).

Bien que le processus de cancérogenèse colo-rectale humaine soit probablement le résultat de l'accumulation plutôt que de la succession séquentielle de modifications génétiques et épigénétiques, il semble qu'un ordre dans les événements moléculaires soit observé dans les modèles expérimentaux chez l'animal. Les mutations les plus précoces concerneraient les gènes K-ras et APC. Les mutations activantes du gène K-ras mènent probablement à une stimulation de

la croissance cellulaire, tandis que les mutations désactivantes du gène suppresseur de tumeur APC, qui code une protéine cytoplasmique liée au fonctionnement de la cadhérine impliquée dans l'adhésion intercellulaire, participent au développement de la dysplasie. La désactivation du gène p16 se fait principalement par hyperméthylation du promoteur de ce gène. L'activation de la télomérase contribue à l'immortalité des cellules tumorales dans l'évolution vers des adénomes de haut degré de dysplasie. La désactivation du gène suppresseur de tumeurs p53, intervenant normalement dans l'apoptose, permet la progression des lésions vers un carcinome, tandis que la désactivation des gènes DCC et Smad4, codant pour le facteur TGF α qui inhibe la croissance cellulaire, contribue finalement au développement du phénotype métastatique. Dans toutes ces étapes, des mutations des gènes 'mismatch repair' peuvent mener à une instabilité génomique facilitant le développement - par acquisition de mutations supplémentaires - de la prochaine étape (Toft et Arends, 1998).

Ce modèle, réducteur par rapport à la réalité de la cancérogenèse moléculaire impliquant sans doute de nombreux autres gènes, représente néanmoins une étape vers une connaissance plus approfondie des phénomènes génétiques, déjà utilisée dans le cadre du dépistage (recherche dans les selles des cellules desquamées présentant des mutations sur le gène p53) et peut-être prochainement dans le développement de nouvelles approches thérapeutiques.

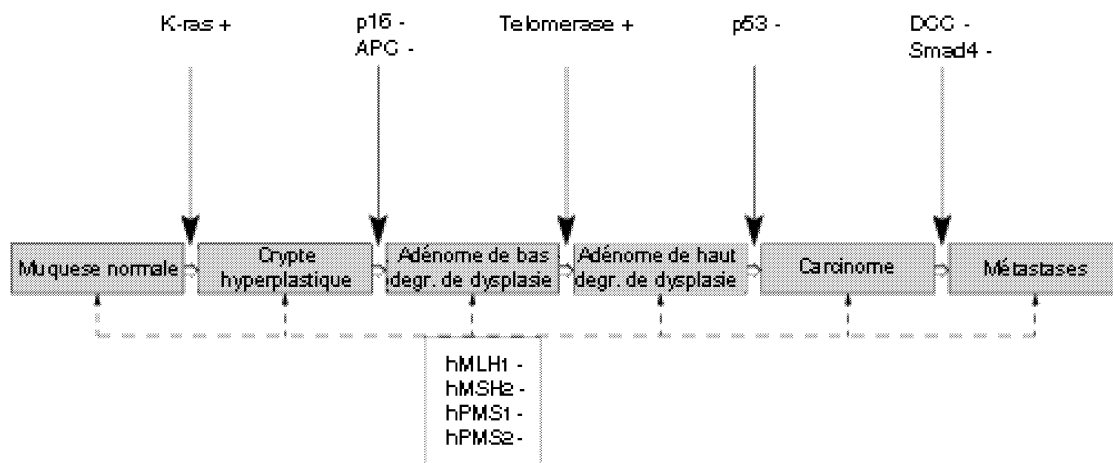


fig.5
Etapes et gènes impliqués dans le processus de cancérogenèse colo-rectale

2- Alimentation et cancer du côlon

2-1 Données épidémiologiques

En étudiant les bilans alimentaires à travers le monde, on constate de grandes différences de consommation suivant les régions géographiques considérées. En Afrique et en Asie (excepté le Japon), les céréales, les fruits et légumes à forte proportion d'amidon constituent au moins la moitié de l'apport énergétique. Au contraire, ce type d'aliment ne dépasse pas un quart de l'apport énergétique en Amérique du Nord et en Europe. Si dans les pays développés plus de 15% de l'énergie consommée provient de produits carnés, cette proportion est nettement inférieure dans les pays en voie de développement.

Au cours de ces dernières années, les tendances montrent que la consommation de céréales tend à diminuer, alors que celle de viande augmente. Les produits laitiers et les matières grasses ajoutées sont en très forte augmentation dans le bilan énergétique, les fruits et légumes varient peu. La consommation d'alcool augmente globalement, sauf en Afrique où elle reste stable (WCRF, 1997).

Une multitude d'études épidémiologiques a relié les taux de mortalité par cancer colo-rectal aux valeurs des consommations alimentaires moyennes dans plusieurs pays du monde. Globalement, ces études suggèrent l'existence d'une corrélation positive avec des apports en matière grasse, en viande, en sucre, et une corrélation négative avec des apports en fibres, en amidon, et surtout en fruits et légumes (Potter, 1996 ; Riboli, 1996). Les recherches épidémiologiques ont également cherché à cerner le rôle possible de différents nutriments ou composés alimentaires, mais aussi les aspects diététiques plus généraux comme la consommation énergétique totale, les habitudes culinaires, les caractéristiques anthropométriques ou l'activité physique (tableau II).

Tableau II : Facteurs modulant l'apparition de cancer colo-rectal
(WCRF, 1997 ; Corpet et Taché, 2002).

<i>Degré de certitude</i>	Diminution du risque	Pas de relation	Augmentation du risque
<i>Convaincant</i>	Activité physique Fruits et Légumes		
<i>Probable</i>			Viande rouge Alcool
<i>Possible</i>	Sélénium Calcium Fibres , Amidon Caroténoïdes	Poissons	Obésité Grande taille Repas fréquents Sucre Graisse totale Graisse animale saturée Œufs Viande très cuite
<i>Insuffisant</i>	Amidon résistant Vitamines C, D, E Folates Méthionine Céréales Café		Fer

2-2 Mécanismes d'interaction

Au vu des données épidémiologiques, il apparaît ainsi que l'alimentation peut être source d'éléments promoteurs mais aussi protecteurs vis-à-vis du cancer colo-rectal. Différents mécanismes d'interaction entre l'alimentation et le processus de cancérogenèse colique sont donc possibles, et de nombreuses études expérimentales chez l'Homme, l'animal ou in vitro ont permis de préciser les niveaux d'intervention des facteurs alimentaires, en concordance avec les observations épidémiologiques.

Le rôle de l'alimentation dans la survenue ou la prévention de cancers du côlon et du rectum peut en effet être appréhendé selon des niveaux d'intégration multiples et complexes. La cellule cible du processus de tumorigenèse étant la cellule épithéliale colique, les molécules apportées par l'alimentation peuvent moduler des événements extra-cellulaires et/ou intra-cellulaires, soit directement depuis la lumière colique, soit indirectement, après absorption intestinale et métabolisation hépatique, depuis la circulation sanguine et lymphatique. Les événements modulés peuvent être d'ordre physiologique, biochimique, cellulaire et moléculaire, les uns pouvant être la

conséquence des autres. Ces événements peuvent être liés à différents niveaux du processus de cancérogenèse colique, initiation, promotion ou progression tumorale. Enfin, les effets de l'alimentation peuvent être ceux d'un mélange alimentaire complexe ayant subi des traitements technologiques, d'un aliment entier seul, ou de certains constituants isolés d'un aliment.

Les mécanismes d'action de l'alimentation vis-à-vis de la cancérogenèse colique peuvent donc être multiples. D'après Potter (1996) et Lipkin (et al, 1999), l'alimentation peut modifier de nombreux paramètres biologiques.

Elle affecte tout d'abord les **paramètres physiologiques et biochimiques de la digestion**. En premier lieu, le régime va directement moduler la biodisponibilité des éléments cancérogènes ou anticancérogènes qu'il contient, en modifiant l'absorption intestinale, via le temps de transit, ou des phénomènes de piégeage. Les fibres végétales, en augmentant la vitesse du transit, peuvent ainsi diminuer le temps de contact d'un cancérogène avec la muqueuse intestinale. D'autre part, des bactéries lactiques auraient la capacité de se lier avec certains composés cancérogènes tels que les amines aromatiques hétérocycliques (issues de la cuisson des protéines) et de les inactiver subséquentement dans la lumière intestinale (Orrhage et al, 1994).

Dans un deuxième temps, des composés alimentaires ou des facteurs comme la quantité d'aliments ingérés vont avoir des actions sur le milieu colique. Ces actions peuvent être la modification de la population bactérienne, de sa fermentation et de ses activités enzymatiques, du pH, du renouvellement cellulaire ou des paramètres immunologiques. Ces différentes modifications peuvent avoir lieu simultanément indépendamment les unes des autres, mais elles sont aussi capables d'interagir. Par exemple, une activité enzymatique bactérienne varie en fonction du pH colique, ou bien la modification de la population bactérienne entraîne une réponse immunologique.

Une étude réalisée par Hambly (et al, 1997) a ainsi comparé l'action sur différents paramètres de l'administration d'un régime riche en graisses et pauvre en fibres et calcium (high-risk HR) et d'un régime supposé protecteur riche en fibres et pauvres en protéines et graisses (low risk LR), chez des rats présentant une flore intestinale « humanisée » (HFA : Human Flora Associated). Il en ressort que d'une part le régime HR a augmenté le nombre de lésions préneoplasiques coliques et de lésions oxydatives de l'ADN, que d'autre part un

fort taux d'ammonium fécal a été mis en relation avec des productions bactériennes toxiques; ce taux est significativement plus élevé chez les rats nourris au HR, et la conversion de l'IQ (une amine aromatique hétérocyclique alimentaire) en son métabolite actif le 7OHIQ est 2.5 fois plus importante chez ces mêmes rats. Parallèlement, l'activité de la β -glucuronidase est elle-même augmentée d'un facteur 2.5 entre les régimes HR et LR.

La modulation de la flore et de ses paramètres par l'alimentation pourrait donc passer par la consommation de probiotiques, bactéries vivantes considérées comme « bénéfiques » telles que les bifidobactéries, voire de prébiotiques, constituants alimentaires indigestibles (oligosaccharides tels que l'inuline contenue dans la chicorée) qui affecteraient positivement l'équilibre de la flore intestinale et son métabolisme.

Un troisième aspect de ces paramètres physiologiques et biochimiques est la régulation de la production des acides biliaires par les facteurs alimentaires. On suppose que des produits cancérigènes sont libérés en plus ou moins grande quantité au cours de la dégradation par les bactéries du cholestérol et des acides biliaires dans l'intestin, en fonction, en particulier, de la composition de la flore intestinale. Les fibres alimentaires influent, semblerait-il, sur cette flore en inhibant la formation de substances à potentiel cancérigène. Toute alimentation pauvre en fibres entraîne un ralentissement du transit intestinal et une dégradation accrue des acides biliaires au niveau des intestins. D'où un contact prolongé – et indésirable – des substances cancérigènes ainsi libérées avec la paroi intestinale. Des études récentes tendraient à montrer que la teneur de l'alimentation en calcium a aussi son rôle: il se pourrait que le calcium fixe les acides gras et les acides biliaires à potentiel cancérigène, atténuant ainsi le risque de cancer du gros intestin.

L'alimentation influe également sur certains **paramètres sanguins et hormonaux**. Des associations positives ont ainsi été trouvées entre des glycémies et triglycéridémies élevées et le risque de survenue de cancers colo-rectaux (Bostick et al, 1994). Cependant, si l'effet de l'excès de lipides et glucides est essentiellement lié à l'apport calorique, le type de graisses semble important, en particulier le cholestérol et les graisses saturées (présentes dans les charcuteries, oeufs, abats, crème...) qui joueraient un rôle néfaste propre. Inversement, certaines huiles végétales telles que les huiles d'olive et de colza, riche en acides gras poly-insaturés, seraient associées à un effet protecteur.

D'autre part, une méta-analyse de 13 études cas-témoin (Howe et al, 1997) fait apparaître une relation dose effet entre consommation calorique et risque de cancer colo-rectal, aussi bien chez l'homme que chez la femme. En outre, la sédentarité augmente le risque de cancer colo-rectal indépendamment de l'apport calorique. L'obésité, surtout de type androïde, caractérisée par un rapport tour de taille sur tour de hanches élevé augmente essentiellement le risque d'une étape intermédiaire, le gros adénome, mais moins nettement celui de cancer. Ces trois facteurs, excès calorique, sédentarité et excès de poids, interviendraient sur la promotion de la cancérogenèse (croissance et transformation maligne des adénomes) par un mécanisme commun, l'hyperinsulinisme et/ou la résistance à l'insuline, qui se traduit par l'augmentation de la production d'IGF-1 (Insuline Growth Factor), facteur de croissance des cellules de la muqueuse colique et capable de bloquer l'apoptose (Giovannucci, 2001). D'autre part, certains régimes hypercaloriques présentant de plus un déséquilibre phospho-calcique pourraient rendre la muqueuse colique plus perméable aux facteurs de croissances et composés carcinogènes présents dans la lumière intestinale (Bruce, 2001).

L'alimentation peut enfin modifier les **paramètres cellulaires et moléculaires** de la cancérogenèse colique.

De nombreux composés rencontrés dans l'alimentation peuvent ainsi influencer sur une partie des mécanismes qui interviennent dans le déroulement du processus tumoral, tout d'abord par la modification du métabolisme endogène, au niveau hépatique ou colique, via la modulation des activités enzymatiques de phase I et II impliquées dans l'équilibre toxification/détoxification des xénobiotiques. Par exemple, une étude a pu montrer que la consommation de chou de Bruxelles augmente la production d'activités enzymatiques de détoxification (NAD-quinone réductase et UDP-glucuronosyl transférase) (Humblot et al, 2001), une autre que les catéchines du vin non métabolisées diminuent chez le rat le cytochrome P450 total et plus particulièrement la forme 2^{E1}, impliquée dans l'activation de pro-cancérogènes et induite par la consommation d'éthanol (Nugon-Baudon et al, 2001).

Plus directement, les composés alimentaires peuvent avoir une action sur la formation de lésions génotoxiques : les métabolites actifs de certains éléments peuvent induire des lésions de l'ADN, tels que les composés nitrosés ou les amines aromatiques hétérocycliques issues de la conservation et de la cuisson des viandes

En outre, le fer non absorbé (environ 90% du fer ingéré) résultant d'une alimentation riche en viande (surtout en viande rouge), pourrait favoriser la production de radicaux libres.

D'autres composés au contraire peuvent protéger les sites nucléophiles de l'ADN ou éliminer des espèces chimiques réactives telles que les radicaux libres oxygénés. Une alimentation riche en folates (présents dans certains fruits et légumes) et méthionine (apportée par certaines céréales et noix) diminuerait l'incidence des adénomes colo-rectaux en prévenant l'hypométhylation de l'ADN (Giovannucci et al, 1993).

L'alimentation est également susceptible de jouer un rôle dans l'expression de certains gènes et de moduler les facteurs de croissance cellulaire, liés à la prolifération, la différenciation et l'apoptose. Deux études cas-contrôle menées respectivement aux Pays-Bas et en Espagne mettent en évidence un lien entre une alimentation riche en fruits et légumes et un faible taux de mutations du gène APC (Diergaarde et al, 2001) et du gène K-ras, impliqués dans la cancérogenèse colo-rectale (Moreno, 2001). Ce même type de régime, en favorisant la synthèse luminale de certains acides gras, régulerait positivement la transcription de la cyclooxygénase-2 préventive de la cancérogenèse (Glinghammar et al, 2001).

Les différentes implications de l'alimentation dans la cancérogenèse colo-rectale sont répertoriées dans le tableau III.

TABLEAU III
Alimentation et cancérogenèse colo-rectale :
différents niveaux d'interactions possibles

SITE D'INTERACTIONS	TYPE DE MODULATION	MECANISMES D'INTERACTIONS
DIGESTIF	BIODISPONIBILITE DES SUBSTANCES XENOBIOTIQUES	<ul style="list-style-type: none"> • modulation du transit • piégeage • modulation de l'absorption intestinale • modifications de la flore intestinale • modifications des conditions physico-chimiques • action sur les sécrétions biliaires
CELLULAIRE	ACTIVITE DES SUBSTANCES GENOTOXIQUES	<ul style="list-style-type: none"> • modulation des activités de métabolisation de type I et II • activité anti-radicalaire
	MUTAGENICITE	apports alimentaires de substances mutagènes ou protectrices de l'ADN
	CANCERISATION	modulation de l'expression de gènes et de facteurs impliqués dans la croissance et la division cellulaires

Enfin, les individus présentent des différences de susceptibilité face au cancer du côlon, pour une même alimentation, du fait des polymorphismes génétiques, notamment ceux qui touchent les gènes impliqués dans la métabolisation hormonale, les réponses inflammatoires (cyclo-oxygénases), la réparation de l'ADN, la métabolisation des cancérogènes (cytochrome P450 et acétyltransférases par exemple).

Tous ces paramètres soulignent la complexité de la relation alimentation/cancer.

2-3 Alcool et Cancer colo-rectal

2-3-1 Données épidémiologiques

Contrairement à d'autres types de cancer (de l'oesophage par exemple) et du fait de nombreuses études épidémiologiques discordantes, il est difficile d'apporter une réponse catégorique concernant une augmentation de risque du cancer colo-rectal liée à la prise d'alcool. En effet, seule la moitié des études cas-témoins a montré une augmentation de risque (Hirayama et al, 1989; Meyer et White, 1993; Giovannucci et al, 1995...), tandis que d'autres la mettaient en évidence seulement pour certaines boissons alcoolisées telles que la bière (dont le processus de fabrication, par le passé, a pu générer des nitrosamines) plutôt qu'avec la consommation totale d'alcool (Riboli et al, 91). Une méta-analyse synthétique de ces études fait apparaître un lien statistiquement significatif mais faible entre cancer colo-rectal et consommation d'alcool (Longnecker et al, 1990) ; cette relation existe quelle que soit la localisation colique ou rectale du cancer et quel que soit le type d'alcool, bien que l'association avec la bière soit un peu plus forte qu'avec le vin ou les spiritueux. Le faible niveau de risque (1,1 pour les études cas témoin, 1,3 pour les études de cohorte avec deux boissons alcoolisées soit 24 g d'alcool par jour) peut susciter des doutes quant à une relation de causalité

De plus, il est toujours délicat d'isoler chez les sujets étudiés l'effet de l'alcool d'autres influences, notamment le tabac dont la cancérogénicité peut-être favorisée par la prise concomitante d'alcool (Honjo et al, 1992). Néanmoins, une étude cas-contrôle réalisée en Côte-d'Or (Boutron et al, 1995) met en évidence une liaison spécifique et indépendante de l'effet du tabagisme entre des consommations d'alcool de 20 à 60 grammes par jour et le risque d'adénome de taille supérieure à 1cm. L'alcool interviendrait alors sur une étape précoce de promotion du cancer, la croissance de l'adénome, mais non sur la phase de cancérisation elle-même.

2-3-2 Données expérimentales

Une alcoolisation chronique sur 32 semaines (36% des calories apportées par l'éthanol) a potentialisé la cancérogenèse induite par la DMH chez le rat, en augmentant le nombre de tumeurs rectales (Seitz et al, 1984). L'alcool pourrait aussi favoriser la cancérogenèse gastro-duodénale induite par l'azoxyméthane (AOM), métabolite de la DMH (Hakkak, 1996).

A l'inverse, un effet inhibiteur de l'alcool a pu être mis en évidence sur la cancérogenèse induite chimiquement (Cerar et al, 96) ou par irradiation (Watanabe, 1992).

Enfin, une étude à long terme (2 ans) sans induction chimique sur des rats Sprague-Dawley ne montre pas d'augmentation de la fréquence de tumeurs (tous organes) chez le mâle (voire une diminution pour certaines tumeurs) (Holmberg et al, 95).

2-3-3 Mécanismes d'action

Il est difficile de dénier à l'alcool ses propriétés inflammatoires vis-à-vis des muqueuses, même si cette action se manifeste de manière plus évidente dans les affections du tractus aéro-digestif supérieur.

Dans le côlon, l'éthanol est oxydé par la flore bactérienne en acétaldéhyde, qui pourrait favoriser la cancérogenèse (Seitz et al, 1990), peut-être en stimulant à l'excès la régénération de la muqueuse (Simanowski et al, 1995) ou encore en favorisant la dégradation des folates dans la lumière colique (Homann et al, 2000).

Dans une étude réalisée en France sur des patients souffrant de cirrhose ou de pathologies coliques, l'alcoolisme chronique et la cirrhose s'avèrent deux facteurs de risque indépendants d'adénomes colorectaux (Naveau et al, 1992).

L'éthanol est par ailleurs capable d'induire les enzymes de son propre métabolisme telles que le cytochrome P450 2E1, susceptibles de convertir les cancérogènes présents dans le côlon en métabolites actifs vis-à-vis des cellules coliques.

On a pu aussi montrer un effet suppresseur de l'éthanol sur les cellules Natural Killer (NK), impliquées dans la lutte contre les cellules cancéreuses (Yirmiya et al, 1992).

2-4 Polyphénols et Cancer colo-rectal

2-4-1 Apports et biodisponibilité

Les polyphénols sont des composés très répandus dans le règne végétal, comportant une ou plusieurs fonctions phénols. Parmi eux, les flavonoïdes forment une famille très vaste regroupant de nombreuses substances polyphénoliques impliquées notamment dans la coloration des plantes mais dont les rôles ne sont pas encore tous connus. Dans le vin rouge sont notamment présents des catéchines et des anthocyanes (responsables de la coloration), ces derniers étant constitués d'un oligosaccharide et d'un aglycone appelé anthocyanidine. Les tanins se définissent comme des polymères de flavonoïdes capables de se fixer aux protéines, propriété qui confère aux denrées en contenant un caractère amer ou astringent. Les tanins condensés sont des précurseurs des anthocyanes (ils proviennent du raisin dans le cas du vin), tandis que les tanins hydrolysables sont des esters d'acide gallique (gallotanins) ou ellagique (ellagitanins), qui proviennent essentiellement du bois de chêne dans le cas des spiritueux et vins vieillissés en fût. D'autres acides phénoliques sont naturellement présent dans le raisin. Au cours du vieillissement, la plupart de ces acides donne naissance à des aldéhydes aromatiques et à des phénols volatils odorants (responsables du « bouquet » des vins et spiritueux).

Il existe aussi plusieurs groupes de non-flavonoïdes comme les dérivés de l'acide benzoïque, les acides hydroxycinnamiques abondant dans la pulpe du raisin ainsi que les dérivés du stilbène tels que le resvératrol.

Apports alimentaires

L'apport moyen de polyphénols par l'alimentation serait de l'ordre de quelques dizaines de mg/jour, procuré par de nombreux aliments d'origine végétale : les fruits, les épices, le thé vert et noir mais aussi le vin, la bière ou les spiritueux vieillissés en fûts de bois (Cognac, Armagnac, Whisky...). Cependant il semble évident que les polyphénols du bois apportent une contribution mineure par rapport à la quantité totale de polyphénols ingérés par jour à partir de fruits, de légumes et même de vin. (tableau IV).

Tableau IV
Apports en polyphénols consécutifs à la consommation de vins et spiritueux
 (données : Société Française des Antioxydants)

	Consommation de vins et spiritueux	Apports en polyphénols			
		mg par jour et par personne			
	litre par an et par personne	ellagitanins	ac.lignique	lignine	ac.phénolique
Cognac	0,15	0,017	0,013	0,05	0,23
Whisky	1,5	0,13	0,13	0,5	2,5
Vin	60	<13	<3,9	<21	364

Biodisponibilité

En-dehors de démonstrations indirectes, telles que l'augmentation de la capacité anti-oxydante plasmatique après ingestion de polyphénols, il existe assez peu d'études et de certitudes concernant la biodisponibilité des substances polyphénoliques chez l'Homme. Le tableau suivant regroupe quelques dosages réalisées dans les urines et le plasma après ingestion d'aliments riches en polyphénols.

Tableau V
Données relatives à la biodisponibilité des polyphénols
 (d'après Scalbert et Williamson, 2000)

polyphénol	source	Quantité ingérée (mg)	Concentration plasmatique maximale (μ M)	Taux d'excrétion urinaire (%)	référence
acide caféique	<i>non précisée</i>	1000	-	27	Jacobson et al, 1983
quercetine	oignon	68	0,74	1,39	Hollman et al, 1997
epigallocatechine gallate	Thé vert	525	4,4	-	Nakagawa et al, 1997
anthocyanes	Vin rouge	218	-	1,0-6,7	Lapidot et al, 1998

Les faibles taux d'excrétion urinaire peuvent signifier que les substances n'ont pas été absorbées, ont été éliminées dans la bile ou métabolisées par la flore intestinale ou au niveau tissulaire. On peut ainsi supposer que même en l'absence

d'absorption, une action localisée puisse survenir au niveau du côlon. Malgré l'élimination systémique rapide de ces substances par conjugaison de leur groupe aglycone, il se pourrait que la demi-vie des polyphénols et de leurs métabolites issus de la flore soient allongée par leur liaison avec les protéines. Ainsi, une étude utilisant des segments d'intestin grêle de rats a montré que l'acide tannique et la catéchine (respectivement de fort et faible poids moléculaire) interagissaient tous deux avec la paroi intestinale mais que seule la catéchine était effectivement absorbée, l'acide tannique ayant plutôt tendance à diminuer la perméabilité intestinale par complexation avec les protéines de la paroi muqueuse (Carbonaro et al, 2001).

2-4-2 Données épidémiologiques

Ces dernières années, une moindre mortalité par maladies cardio-vasculaires a été observée en France, par-rapport aux autres pays industrialisés et malgré un régime riche en graisses, constatation à l'origine de la théorie dite du « french paradox » (Renaud et de Lorgeril, 1992). Ce phénomène a notamment été associé à une consommation de vin modérée et régulière. Des études de cohortes réalisées en France (Renaud et Gueguen, 1998) et au Danemark (Gronbaek et al, 2000) ont également montré une réduction de la mortalité par cancer chez les buveurs modérés de vin. Le même type de relation a été établi au Japon avec la consommation de thé vert (Imai, 1997 ; Nakachi et al, 2000).

Cependant, il reste difficile d'isoler les effets de ces polyphénols dans les enquêtes épidémiologiques et d'évaluer l'influence relative des fibres et vitamines lorsqu'ils sont apportés par les fruits, ou de l'éthanol et d'autres composés lorsqu'il sont apportés par le vin ou les spiritueux. C'est pourquoi des études expérimentales sont réalisées à partir des fractions polyphénoliques de ces aliments.

2-4-3 Données expérimentales

De nombreuses études s'accordent à démontrer les propriétés antioxydantes des aliments riches en polyphénols. Elles sont innombrables en ce qui concerne les constituants du thé et du vin. La fraction non alcoolique du cognac a également

présenté un effet antioxydant vis-à-vis de l'oxydation des lipoprotéines de basse densité (Goldberg et al, 1999; Rayssiguier et al, 1999).

D'autres études ont montré in vitro un effet antimutagène des composés présents dans la bière, le vin et le cognac (Arimoto-Kobayashi et al, 1999). De même, certains polyphénols extraits du vin, ont montré un effet antiproliférateur vis-à-vis de cellules tumorales hépatiques en culture (De Ledinghen et al, 2001).

Dans une revue publiée en 1993, Yang et Wang recensent plusieurs expérimentations conduites à partir d'extraits de thé vert et noir, mettant en évidence des effets inhibiteurs de ces extraits sur la tumorigenèse induite dans différents organes, dont le côlon. Des polyphénols issus du thé noir ont également diminué les dommages à l'ADN causés par la DMH dans la muqueuse colique de rats Fisher (Lodovici et al, 2000).

Deux études récentes de Caderni (et al 1999, 2000) menées sur des extraits de polyphénols du vin rouge et de thés, n'ont pas donné les mêmes résultats sur différents paramètres de la cancérogenèse colique induite par l'AOM, la DMH ou l'IQ. La première n'a montré aucun effet de l'administration de polyphénols extraits du vin (57 mg/kg/jour, 13 semaines) sur ces paramètres, tandis que la plus récente mettait en évidence un nombre plus faible de rats présentant des adénomes après induction à l'AOM dans le groupe ayant reçu les polyphénols du vin (50 mg/kg/jour, 16 semaines) ainsi qu'un indice d'apoptose supérieur. La même équipe avait auparavant montré un effet protecteur de ces extraits sur les dommages oxydatifs causés à l'ADN de rats traités au 2-Nitropropane, mais pas sur ceux traités à la DMH (Casalini et al, 1999), puis une diminution des lésions oxydatives basales en utilisant le test des comètes modifié (Giovanelli et al, 2000).

L'acide ellagique, un des polyphénols retrouvé en particulier dans le cognac car extrait du bois de chêne, est l'objet d'une abondante et contradictoire littérature concernant ses propriétés anti-oxydantes et anti-tumorales. Néanmoins, assez peu d'études expérimentales sont consacrées à son action éventuelle sur la cancérogenèse colique. Notons qu'administré à 8000 ppm il diminue l'incidence des tumeurs de l'intestin grêle induites par l'AOM, mais est sans effet sur celles du côlon (Rao et al, 1991). Deux autres études de cancérogenèse induite à l'AOM ne montrent aucun effet de l'acide ellagique sur les tumeurs coliques (Liu et al, 1995) ou le nombre de cryptes aberrantes (Pereira et al, 1991).

2-4-4 Mécanismes d'action

(figure 8)

Les mécanismes d'action anti-cancéreuse des substances polyphénoliques reposent en premier lieu sur leurs propriétés antioxydantes et antiradicalaires, qui les rendraient actives sur les pathologies cardiovasculaires, le vieillissement cérébral et le processus tumoral. Ces propriétés découlent directement de leur structure chimique (Bors et al, 1990) (figure 6). Cette activité directe a été largement mesurée dans le plasma y compris chez l'Homme (Serafini et al, 1998).

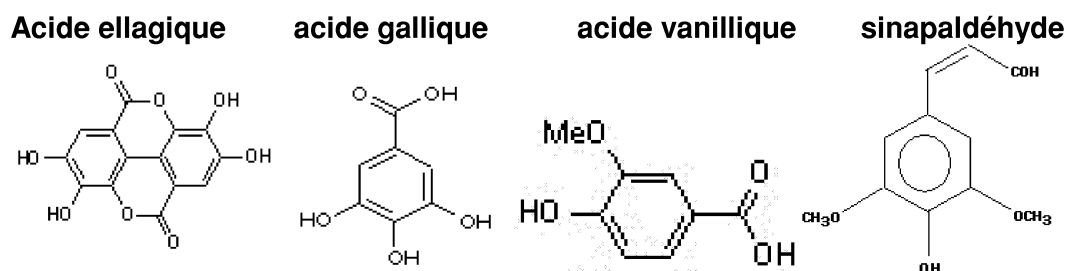


fig.6

Structure chimique des principaux polyphénols du cognac

(sources internet : signet-uk.com, bio-davidson.edu)

Leur participation à la lutte contre l'oxydation repose aussi sur la stimulation de systèmes enzymatiques d'antioxydants, propriété montrée notamment par des extraits de thé vert (Katiyar et al, 1993). Néanmoins, cette puissante action antioxydante n'a pas montré d'effet au niveau de l'ADN de cellules coliques humaines (Pool-Zobel et al, 1999). D'autre part une action inhibitrice sur des enzymes telles que les cyclo- et lipo-oxygénases a pu être établie (Laughton et al, 1991).

Par leur faculté à se lier avec les protéines au niveau du groupement aminé, propriété par laquelle on définit les substances tanniques, les polyphénols joueraient également un rôle dans la détoxification de l'organisme. Ce peut être par adsorption et élimination dans le tube digestif de composés génotoxiques (Ferguson et al, 1998), mais aussi par stimulation des enzymes de phase 2 (Nagata et al, 1999). L'acide gallique et d'autres polyphénols neutraliseraient ainsi des composés nitrosés très réactifs (Gichner et al, 1987) ou bloqueraient leur formation à partir de nitrites (Kuenzig et al, 1984).

Des études de cancérogenèse chimiquement induite ont aussi montré les propriétés d'inhibition de l'acide ellagique et d'autres polyphénols sur les enzymes dépendantes du cytochrome P450, responsables de l'activation des substances cancérogènes dans le foie (Stoner et Morse, 1997), notamment les amines hétérocycliques (Lee et al, 1994).

Des études font aussi état de leur action sur la phase de promotion de la cancérogenèse : ainsi la fraction polyphénolique de grains de raisins appliquée avant induction a inhibé des enzymes marqueurs de promotion de tumorigenèse cutanée chez la souris (Bomser et al, 1999). Le même type de polyphénols administré (voie orale) à des rats induits à l'AOM a également inhibé la formation de cryptes aberrantes, conjointement à une diminution de l'activité de l'ornithine décarboxylase dans le tiers distal du côlon. Ces extraits sont restés en revanche sans effets sur les enzymes du cytochrome P450 hépatique, la GST et la tumorigenèse mammaire (Singletary et al, 2001).

Plus précisément, ces substances seraient à même d'agir sur la régulation transcriptionnelle des enzymes impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques et la réaction au stress de type oxydant (Yu et al, 1997; Hayes et al, 1999) (figure 7). Ainsi, des ellagitanins de synthèse ont stimulé la sécrétion de facteurs anti-tumoraux (TNF- α) par des monocytes humains (Feldman et al, 1999)

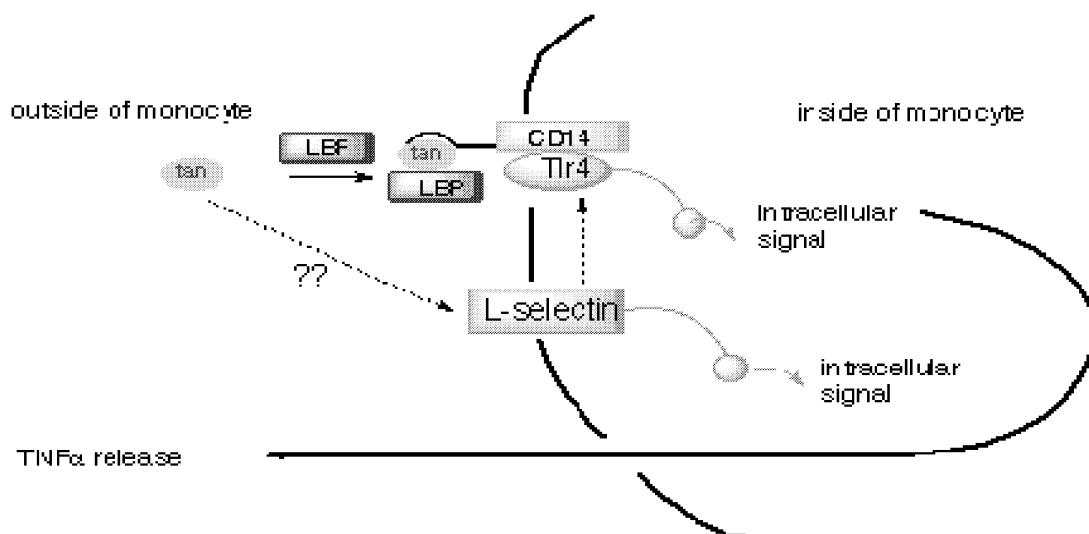


fig.7
mécanisme hypothétique de l'interaction de polyphénols (« tan »)
avec le système de réponse au choc septique
 (d'après Hayes et al, 1999)

Un autre mécanisme de prévention serait l'induction de l'apoptose des cellules tumorales, évaluée avec succès sur des polyphénols du vin et du thé noir en cancérogenèse intestinale induite (Caderni et al, 2000), et sur l'acide gallique vis-à-vis de certains types cellulaires seulement (Sakaguchi et al, 1998). En particulier, l'acide ellagique pourrait protéger le gène de la protéine P 53 (Narayanan et al, 1999) et induire l'apoptose de cellules coliques tumorales humaines en culture en bloquant le cycle cellulaire par régulation négative du facteur IGF-2 (id., 2001).

Au niveau du génome, certaines substances polyphénoliques ont également montré des actions préventives. On a pu ainsi mettre en évidence une inhibition par l'acide ellagique des adduits sur l'ADN (Smith et al, 1988). Ce même acide ellagique s'est révélé in vitro, par son action inhibitrice sur les topoisomérases, un agent préventif contre certains génotoxiques (Constantinou et al, 1995). Une action promotrice des systèmes de réparation a pu être montrée également par la vanilline (Ohta et al, 1988 ; Takahashi et al, 1990).

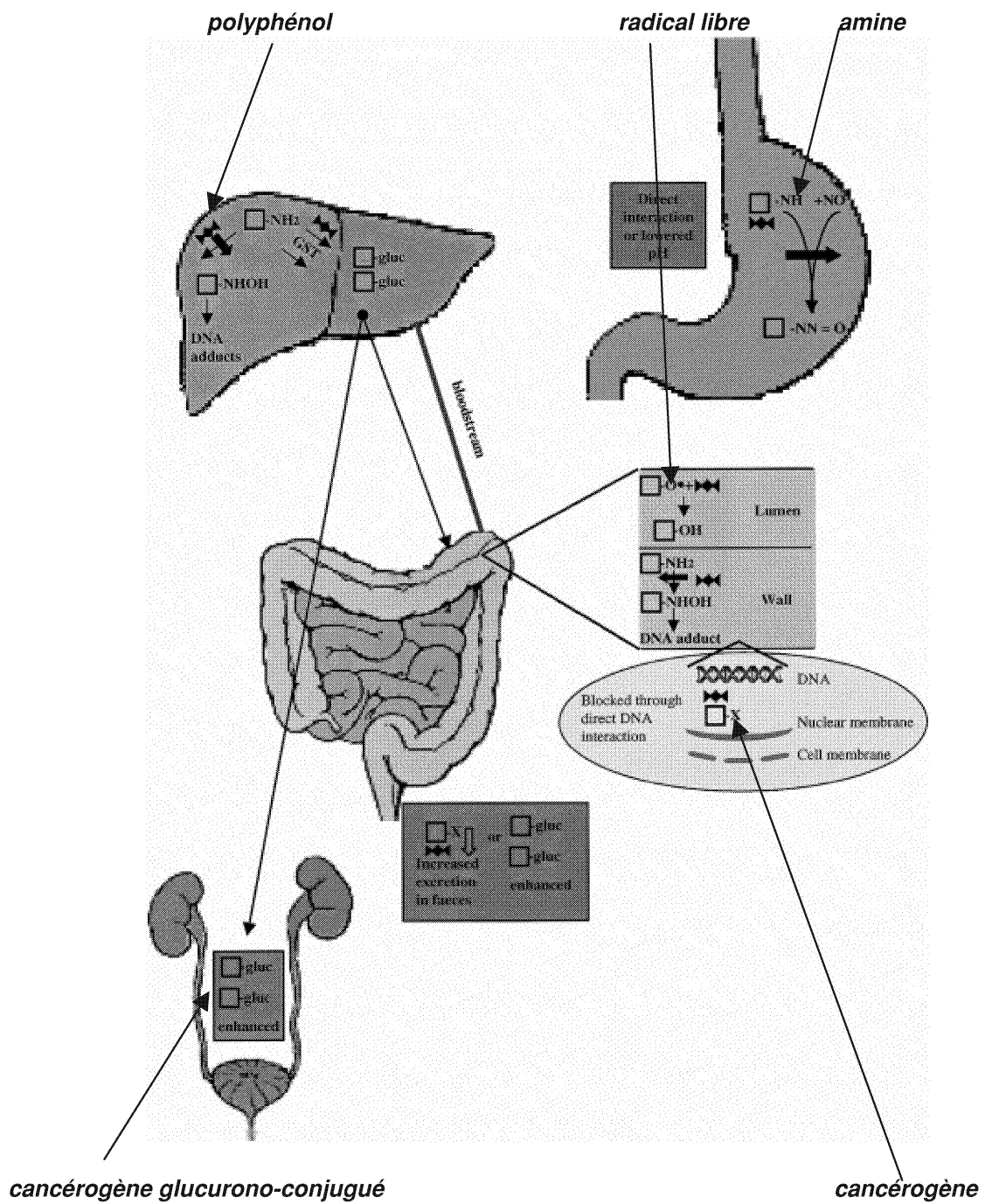


fig.8
Différents niveaux d'actions des polyphénols dans la prévention de la cancérogénèse
 (d'après Ferguson, 2001)

ETUDE IN VIVO DE L'INFLUENCE DES CONSTITUANTS DU COGNAC SUR LA CANCEROGENESE COLIQUE CHIMIQUEMENT INDUITE

1- Définition du sujet

Les données bibliographiques nous ont permis d'apprécier les limites et les contradictions des études épidémiologiques concernant l'effet sur le cancer colorectal des boissons alcoolisées telles que le vin et la difficulté de dissocier les contributions de l'alcool, des composants polyphénoliques, voire d'autres constituants, sur les conséquences observées sur la santé. D'autre part, si le vin, le thé et leurs polyphénols ont été testés in vitro et in vivo, les spiritueux riches en composés issus et spécifiques du bois tels que le cognac n'ont jamais fait l'objet d'expériences in vivo, alors même que l'acide ellagique, l'un de ces composés, est fréquemment cité pour ses propriétés antimutagènes et anticancérogènes.

Il semble donc intéressant d'évaluer l'influence des différents constituants du cognac au cours d'un protocole de cancérogenèse colique induite, au cours duquel on cherchera à établir les effets distincts de l'éthanol, des polyphénols apportés par le fût de chêne, et en particulier de l'acide ellagique qui sera administré séparément. Un lot recevra également du vin rouge pour évaluer l'apport de polyphénols de composition différente.

Les dommages à l'ADN seront mesurés à différentes étapes du protocole en tant que marqueurs précoces, tandis que les foyers de cryptes aberrantes (FCA) seront dénombrés comme marqueurs finaux intermédiaires de la cancérogenèse colique.

2- Matériels et méthodes

2-1 Protocole

(figure 9)

Les animaux employés sont des rats Sprague-Dawley mâles (souche sensible à la diméthylhydrazine et modèle pour les études de cancérogenèse).

6 lots de 13 rats ont été répartis selon les régimes suivants:

- un lot témoin recevant de l'eau (T)
- un lot recevant de l'eau et de l'acide ellagique incorporé à l'aliment (E)
- un lot recevant les polyphénols extraits du cognac reconstitué (P)
- un lot recevant le cognac reconstitué (C)
- un lot recevant de l'eau-de-vie jeune de cognac (A)
- un lot recevant du vin (V)

Les boissons sont ajustées à 6% d'alcool et/ou à 1g/l de polyphénols.

Tous les animaux subissent l'induction à la DMH 3 semaines après le début du protocole.

3 sacrifices ont été réalisés au cours du protocole afin de déterminer les dommages à l'ADN :

- sacrifice avant l'induction à la DMH (3 animaux/lot)
- sacrifice 6 heures après l'induction à la DMH (4 animaux/lot)
- sacrifice en fin d'expérimentation (6 animaux/lot)

Le dernier sacrifice a permis également de quantifier les foyers de cryptes aberrantes qui constituent les lésions néoplasiques coliques.

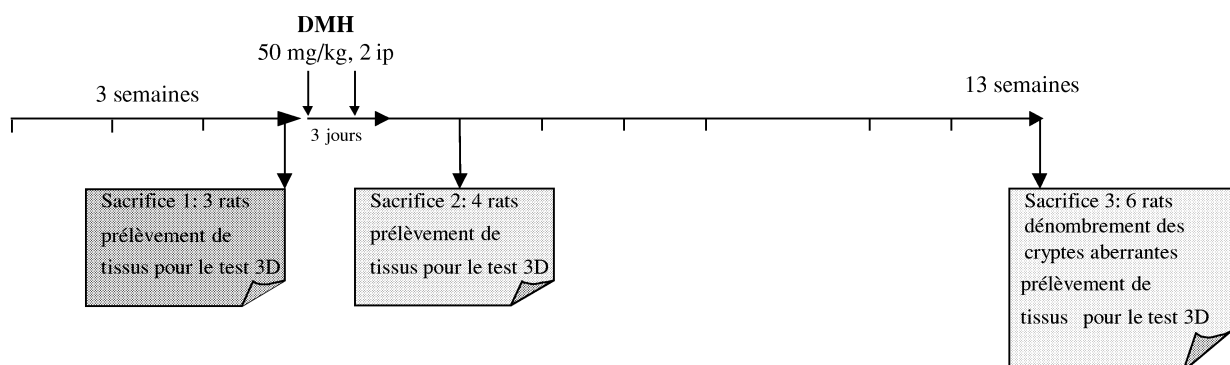


figure 9 : schéma chronologique du protocole

2-2 Composition et consommation des régimes

2-2-1 Régime standard et mode d'administration

Tous les lots reçoivent ad libitum de l'aliment UAR A 04 (tableau VI) en bâtonnets, sauf le lot E qui le reçoit en poudre en vue d'y incorporer l'acide ellagique (insoluble dans l'eau) de manière homogène.

Tableau VI
Composition de l'aliment standard

Nutriment	Apport (%)
Protéines	16
Lipides	3
Glucides E.N.A.	60
Fibres	4
Minéraux	5
dont calcium	8000 mg/kg
Vitamine A	6600 mg/kg
Vitamine E	30 mg/kg

Les consommations d'aliment et de boissons sont mesurées tous les jours ou tous les deux jours. Chaque lot reçoit un seul type de boisson, *ad libitum*, dans des biberons en plastique. Les boissons sont préparées extemporanément (vin dilué à 6% d'alcool) ou conservées au frais et renouvelées régulièrement (cognac et eau-de-vie à 6%, polyphénols en solution aqueuse) pour éviter les phénomènes d'oxydation des polyphénols et de dénaturation (susceptibles d'altérer les propriétés et l'appétence).

2-2-2 Elaboration et composition des régimes

Les régimes sont préparés à partir des échantillons suivants fournis par la station viticole de Cognac :

- cognac enrichi en polyphénols extraits de fûts de chêne, titré à 40% vol. d'alcool et 7g/l de polyphénols (tableau VII)
 - extrait concentré de cognac en poudre à 48.8% de polyphénols, obtenu par lyophilisation du cognac enrichi (même composition en polyphénols)
 - eau-de-vie de cognac « blanche » (non-vieillie en fût) titrée à 40% vol. d'alcool
 - Vin « Merlot du pays charentais », 12°, non-passé sur fût, 2.2 g/l e polyphénols
- Acide ellagique acquis séprément (FLUKA).

Tableau VII
Composition en polyphénols du Cognac enrichi
(analyse avant lyophilisation, méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu)

Composés	Teneur dans l'extrait concentré (mg/l)
Acide gallique	33,4
Acide ellagique	234,5
5-hydroxy-méthylfurfural	32
furfural	95,3
Acide vanillique	3,9
5-méthylfurfural	8,8
Acide syringique	13,5
vanilline	7,0
syringaldéhyde	28,0
scopoletine	0,4
coniferaldéhyde	32,7
sinapaldéhyde	114,0
Indice polyphénol exprimé en ac.gallique	6728,0

La différence entre la somme des teneurs des composés identifiés et l'indice polyphénol total correspond à la présence de composés issus du bois, complexes et de haut poids moléculaires, essentiellement des lignines et des ellagitanins.

Composition des régimes : (tableau VIII)

Pour harmoniser les concentrations en éthanol et polyphénols de chaque régime à respectivement 6% et 1 g/litre, les échantillons sont dilués aux 3/20èmes dans de l'eau. Les concentrations ainsi obtenues ont été choisies par cohérence avec l'étude de Rayssiguier (1999) sur les effets anti-oxydants de ces polyphénols.

Tableau VIII
Teneur des des régimes en éthanol et polyphénols

REGIME	CONCENTRATION	Ethanol (% vol.)	Polyphénols (g/l)
Cognac (C)		6	1,05
Polyphénols (P)		0	1
Eau-de-vie blanche (A)		6	0
Vin (V)		6	1,1
Acide ellagique (E)		0	0,5-0,7 g/kg d'aliment

Remarque : la teneur en acide ellagique a été ajustée en cours de protocole pour tenir compte de la croissance des animaux.

2-2-3 Consommations et apports

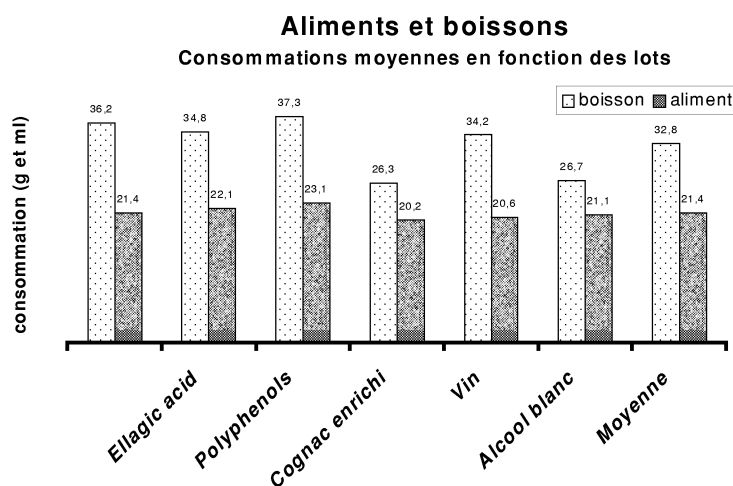


fig.10
Consommations d'aliment et boissons
(moyennes sur 53 mesures)

L'aliment a été consommé de manière homogène par les différents lots. Les boissons à base d'alcool distillé (cognac et eau-de-vie) sont sensiblement moins appréciées des animaux (80% de la consommation moyenne). C'est la boisson à base de polyphénols en solution aqueuse qui a été la plus consommée par les rats (115% de la moyenne).

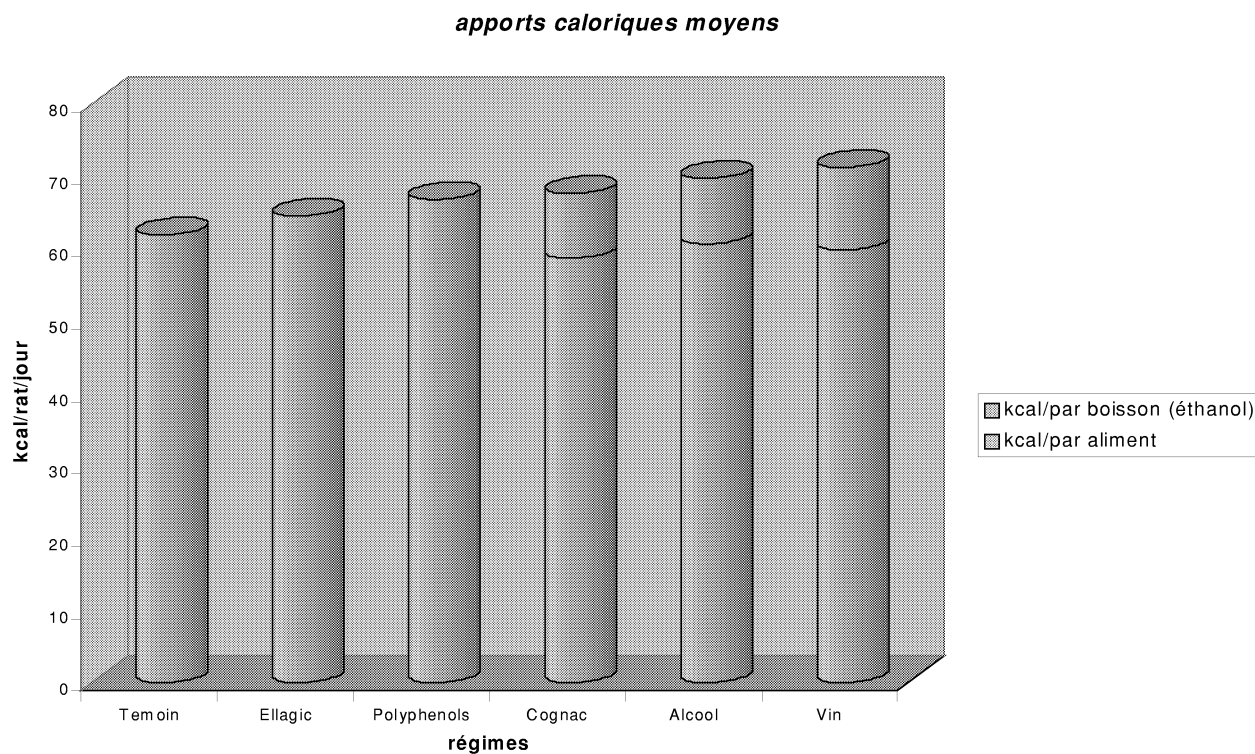


fig.11
Apports caloriques moyens des différents régimes

La part de calories apportées par l'éthanol se situe autour de 15%, ce qui représente un apport modéré eu égard à d'autres modèles expérimentaux (Lieber et de Carli, 1994). Compte tenu de la durée du protocole, cet apport n'est à priori pas susceptible d'induire des modifications pathologiques majeures (foie, système nerveux).

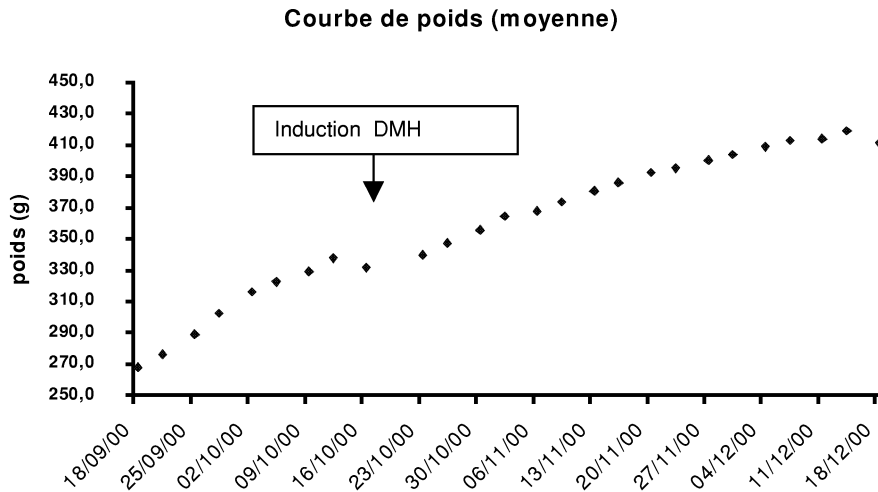


fig.12
Courbe de poids

Hormis le stress dû à l'administration de l'inducteur cancérogène, on ne relève pas d'anomalies au cours de la croissance des animaux, y compris dans les lots soumis à alcoolisation.

apports moyens en polyphénols

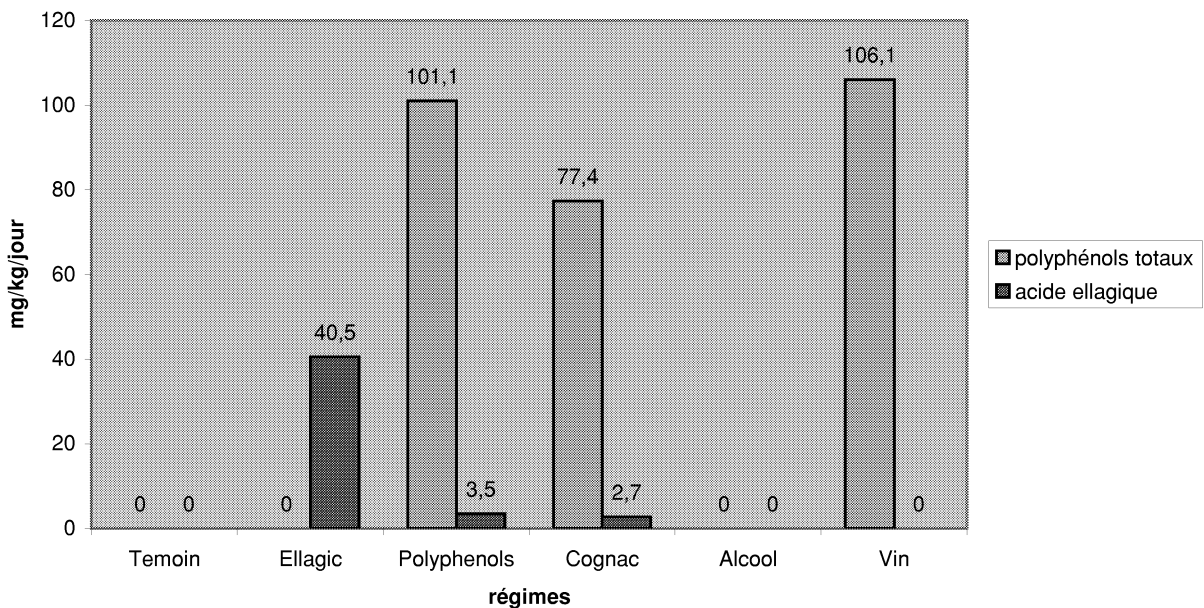


fig.13
Apports en polyphénols

Tableau IX
Apports en polyphénols totaux, acide ellagique et éthanol pour chaque régime

Régime	Apports éthanol (g/kg/jour)	polyphénols (mg/kg/jour)	acide ellagique (mg/kg/jour)
Ac.ellagique	0	0	40,5
Polyphenols	0	101,1	3,5
Cognac	3,5	77,4	2,7
Alcool blanc	3,5	0	0
Vin	4,6	106,1	0*

A concentration égale en polyphénols, le cognac apporte moins de polyphénols que le vin ou la boisson à base de lyophilisat du fait de sa moindre consommation.

D'autre part, si les régimes Vin et Polyphénols apportent sensiblement la même quantité de polyphénols, il est important de rappeler qu'ils n'ont pas la même composition, les polyphénols du vin étant issus du raisin tandis que ceux de la solution à base de lyophilisat sont issus exclusivement des fûts de chêne, riche en ellagitanins hydrolysables.

Enfin, il est difficile d'évaluer la part de ces ellagitanins qui va effectivement libérer de l'acide ellagique par hydrolyse, et donc la conséquence de cette libération sur la biodisponibilité des polyphénols du cognac et sur leur action au niveau des mécanismes de la cancérogenèse.

* inférieur à la limite de détection par HPLC (0,20 mg/l)

2-3 Induction chimique de la cancérogenèse colique

La cancérogenèse chimique colique est induite par la diméthylhydrazine (DMH) : c'est un cancérigène spécifique du côlon isolé des noix de Cycas (*Cycas spp.*). La farine de Cycas est utilisée dans l'alimentation de certaines tribus Aborigènes d'Australie, qui traitent la plante selon divers procédés empiriques de détoxification, tels que la cuisson ou le trempage (Rouers, 1996). On retrouve d'autres types d'hydrazines dans certains champignons comestibles, tels que les morilles (*Gyromitra esculenta*) et les champignons de Paris (*Agaricus bisporus*).

La DMH est métabolisée par les enzymes dépendantes des cytochromes P450 du foie et conjuguée par des glucurono-transférases.

Au niveau du côlon, la déconjugaison par des enzymes bactériennes fécales, les β -glucuronidases, provoque le relargage du méthylazoxyméthanol (MAM), métabolite alors transformé dans les cellules coliques en dérivé extrêmement réactif et cancérigène, le méthyldiazonium (figure 14).

Ce composé est à l'origine de la méthylation de macromolécules telles que l'ADN.

L'induction est réalisée par 2 injections intra-péritonéale de 25 mg/kg chacune à 3 jours d'intervalle.

2-4 Evaluation des paramètres de la cancérogenèse colique

2-4-1 Test 3D : DNA Damage Detection

On réalise l'extraction de l'ADN (voir protocole en annexe) à partir des tissus de foies et muqueuses coliques prélevés lors des différents sacrifices. La quantité et la pureté de l'ADN extrait sont contrôlés par la mesure de la densité optique et l'électrophorèse de plusieurs échantillons. Enfin, le test 3D (Salles et al, 1995) est effectué par le laboratoire de la société SFRI* qui l'a développé.

L'ADN est incubé avec des enzymes de réplication et de réparation, qui permettront l'incorporation d'une base préalablement marquée à la biotine chaque fois qu'une réparation par excision de base a eu lieu, réparation due à une lésion préalable. Deux anticorps sont ensuite employés, un anticorps à la biotine portant une peroxydase puis un anticorps à la peroxydase portant une molécule lumineuse. L'intensité lumineuse est proportionnelle au taux de réparation et donc au taux de dommages.

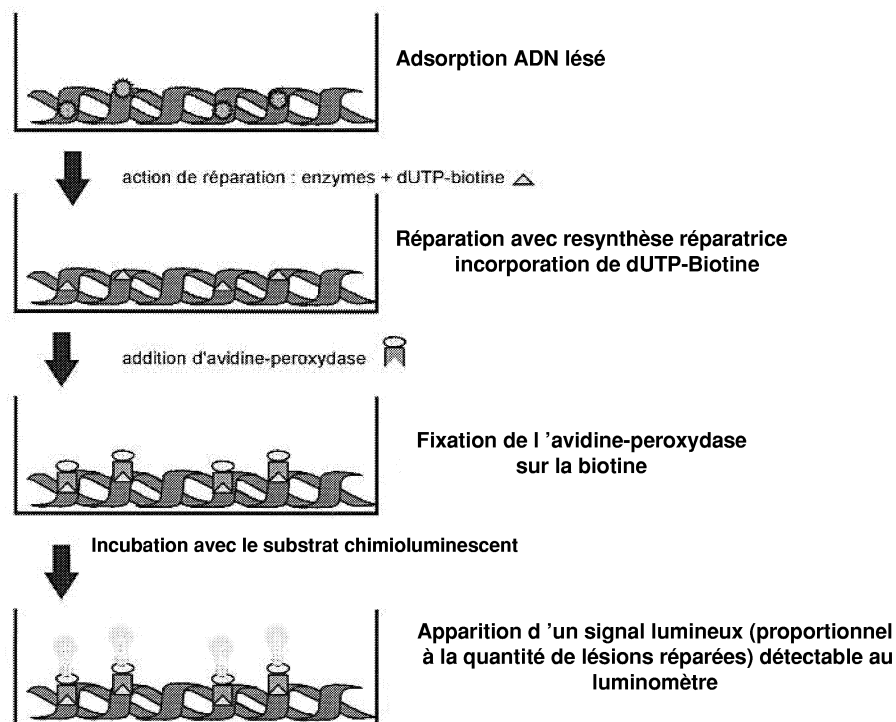


fig.15 : Principe du test 3D

*33127 SAINT JEAN D'ILLAC

2-4-2 Dénombrement des foyers de cryptes aberrantes

Les cryptes aberrantes (CA), qui ont été reconnues comme des lésions préneoplasiques coliques, ont été mises en évidence et étudiées dans des études de cancérogenèse colique induite chez l'animal (Chang, 1984 ; Bird, 1987 ; McLellan et al, 1991 ; Pretlow et al, 1992) et dans la muqueuse colique de patients atteints du cancer du côlon (Takayama et al, 1998). Elles reflètent à la fois les étapes d'initiation et de promotion de la cancérogenèse colique.

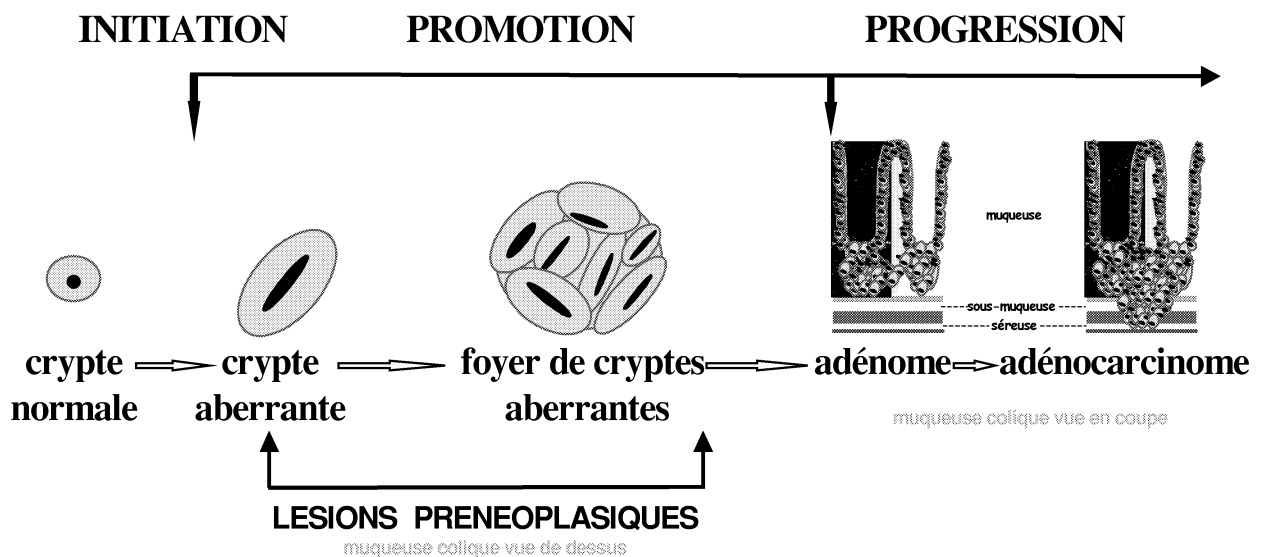


fig. 16
Evolution des cryptes au cours de la cancérogenèse
(d'après Bruce et al, 1993)

Les cellules épithéliales qui composent les CA ont un caractère hyperplasique, et des activités biochimiques perturbées (diminution de l'activité hexosaminidase, perturbation dans la sécrétion des mucines) (Pretlow et Pretlow, 1988 ; McLellan et al, 1991; Caderni et al, 1995). De plus, les cellules appartenant aux CA expriment des mutations dans les gènes *Ki-ras* et *c-fos* impliqués dans le processus de tumorigenèse colique (Kinzler et Vogelstein, 1996). Enfin, au cours d'une étape de promotion, les CA peuvent se multiplier par un mécanisme de fission et donner naissance à des foyers de plusieurs cryptes aberrantes (FCA) (Fujimitsu, 1996). Ces FCA se développent au cours du temps et certains d'entre eux peuvent donner naissance à des adénomes puis des adénocarcinomes (Bird, 1995).

Ces modifications des cellules épithéliales vont permettre de localiser des cryptes coliques de morphologie caractéristique : par rapport aux cryptes normales, les FCA se présentent sous forme d'agrégats plus intensément colorés que les cryptes normales environnantes, avec une zone péricryptale plus importante, une légère surélévation par rapport au niveau de la muqueuse et une ouverture luminale allongée par rapport à l'ouverture ronde des cryptes normales.

Ainsi, les CA reflètent bien le mécanisme de cancérogenèse chez l'Homme, et permettent de mener des études expérimentales plus courtes et moins coûteuses que des études d'intervention humaines, tout en contrôlant au maximum les paramètres influençant la cancérogenèse (Corpet, 1996).

Méthode de dénombrement des FCA :

Lors du dernier sacrifice, le côlon est prélevé, ouvert longitudinalement puis sectionné transversalement. Les segments sont maintenus ouverts dans un papier filtre replié imbibé de tampon formalin et stocké au froid positif en attendant la lecture. Chaque papier porte un code de manière à effectuer le dénombrement en aveugle.

Préalablement à l'examen microscopique, les segments coliques doivent subir une coloration au bleu de méthylène destinée à faciliter la reconnaissance des cryptes (fig.17).

Chaque segment fait l'objet d'un double examen.

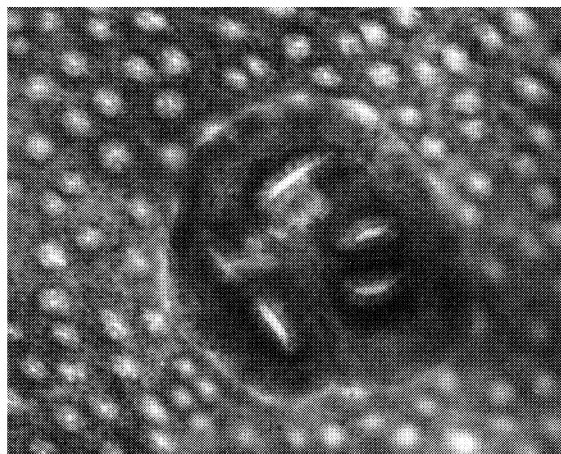


fig.17
Photographie de FCA colique (G : ×40)
Ici un foyer à 4 cryptes

3- Résultats

3-1 Quantification des lésions néoplasiques coliques

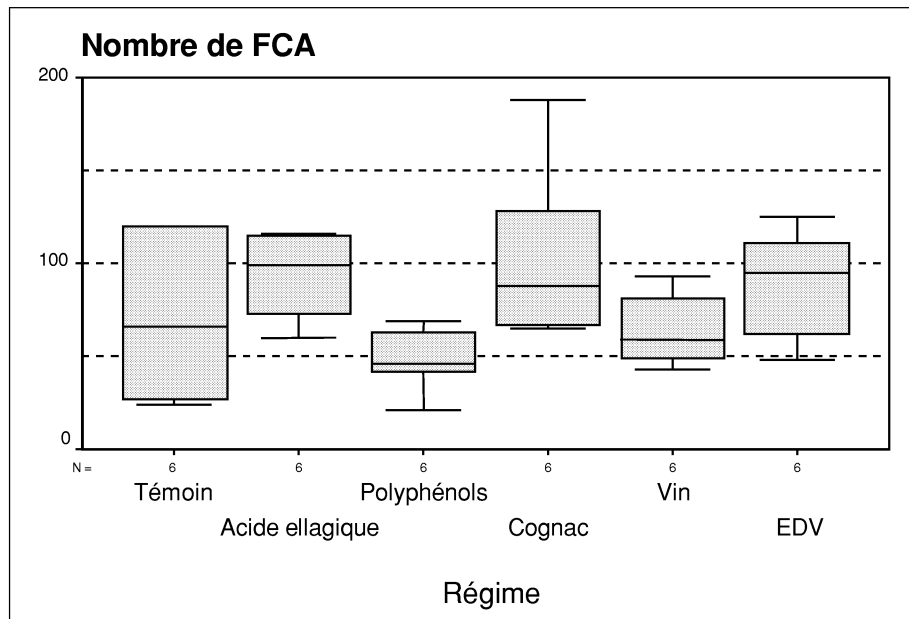


fig.18
Nombre total de FCA en fonction des régimes

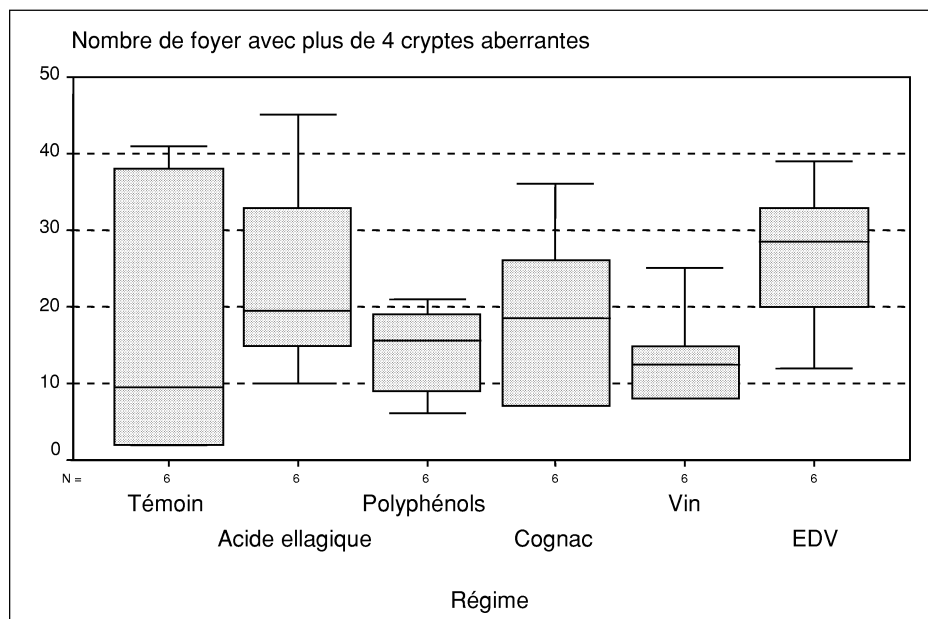


fig.19
Nombre de foyers contenant 4 cryptes aberrantes et plus, par régime

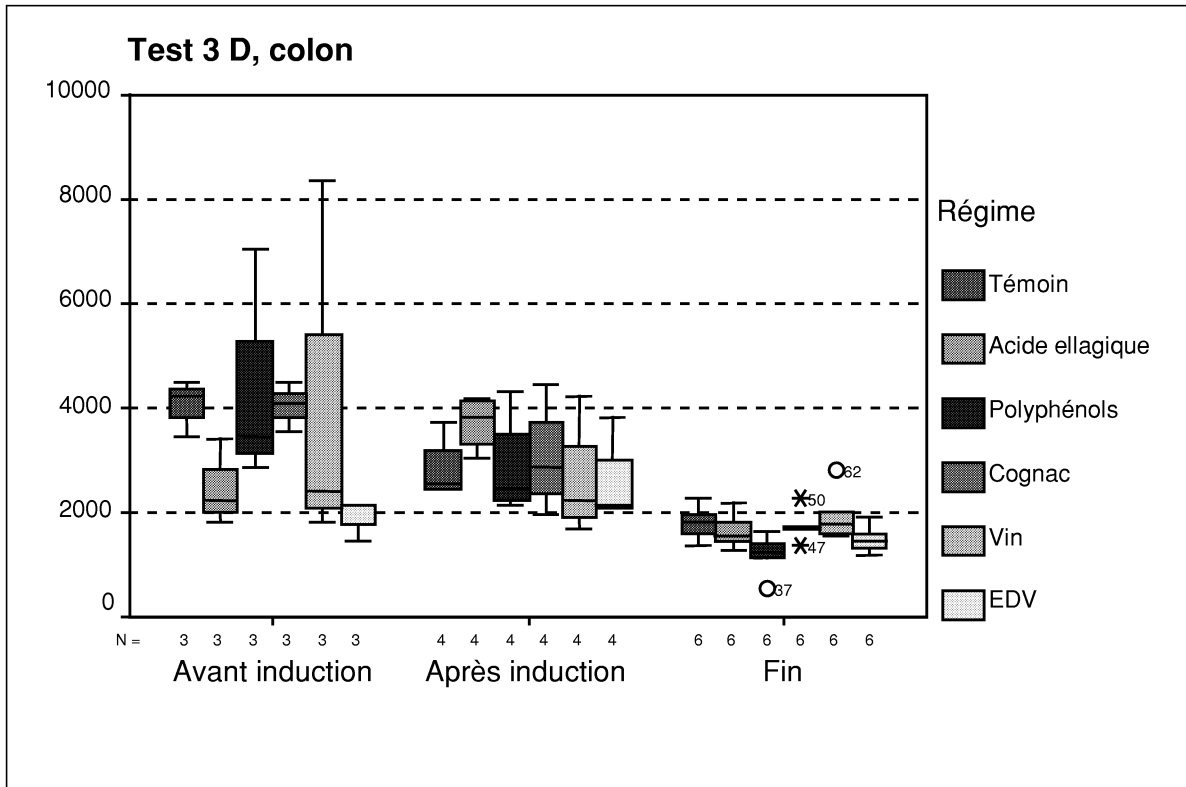
Tableau X
Dénombrement des FCA en fonction des régimes

	FCA		CA		CA/FCA		F ≥ 4 CA	
	moy	+/-	moy	+/-	moy	+/-	moy	+/-
témoin	70,5	47,3	185,2	143,2	2,6	0,3	17,0	18,0
ac.ellagique	93,5	22,9	252,0	81,8	2,7	0,4	23,7	13,1
polyphénols	47,8	17,0	134,2	48,8	2,8	0,3	14,3	5,8
cognac	104,0	47,0	260,2	126,2	2,5	0,2	18,8	11,5
vin	64,0	19,4	159,5	55,1	2,5	0,2	13,5	6,3
eau-de-vie	89,2	30,2	255,7	76,8	2,9	0,2	26,8	9,6

En ce qui concerne le nombre total de FCA (fig.19), l'analyse statistique montre que les résultats entre les lots sont différents à la limite de la signification (ANOVA, $p=0,059$), sans mettre en évidence les effets d'un régime en particulier.

Comme il a été exposé précédemment, plus un foyer contient de cryptes, plus il est susceptible d'évoluer en adénocarcinome. C'est pourquoi le dénombrement des foyers comportant 4 cryptes et plus peut être un élément supplémentaire d'appréciation de la gravité des lésions et permettre de préciser l'action préventive d'une substance. Dans le cas présent, l'analyse statistique du dénombrement effectué ne permet pas de déterminer l'effet différentiel des régimes ($p=0,307$), on peut toutefois remarquer les valeurs basses et homogènes des lots Vin et Polyphénols. La dispersion des valeurs du lot Témoin est également frappante.

3-2 Quantification des lésions à l'ADN



	Témoins			Acide ellagique			Polyphénols		
	A	P	F	A	P	F	A	P	F
moyenne	4053	2814	1798	2485	3716	1646	4452	2845	1191
écart type	542	609	323	830	511	327	2276	1010	372
	Cognac			Vin			Eau-de-Vie		
	A	P	F	A	P	F	A	P	F
moyenne	4029	3040	1737	3491	5728	2906	1908	2542	1480
écart-type	488	1044	293	545	4083	326	383	865	241

fig.20
Lésions à l'ADN extrait des prélèvements de côlon
en fonction des régimes et de l'induction cancérogène (A : avant, P : après, F : final)

Avant induction à la DMH, les lésions basales de l'ADN extrait de la muqueuse colique présentent une forte dispersion des résultats, ce qui n'a rien d'anormal : tout individu peut présenter jusqu'à 10^4 lésions par cellule et par jour sous l'effet d'un stress physique ou alimentaire. En outre, seuls 3 animaux ont fait l'objet de prélèvements à ce stade.

Aucune différence significative n'est enregistrée après induction à la DMH. Les lésions étant mesurées 6 heures après la dernière injection de DMH, celle-ci est alors métabolisée et le métabolite actif capable de provoquer les lésions à l'ADN. On constate que le nombre de lésions est relativement semblable pour tous les animaux : ni la DMH, ni les différents régimes ne semblent encore avoir eu une action.

En revanche, on note une différence significative (ANOVA, $p=0,015$) entre les lots pour ce qui est des lésions de l'ADN mesurées sur les échantillons de muqueuse colique prélevés lors du dernier sacrifice. Pour autant, les résultats ne permettent pas de mettre en valeur d'effet protecteur ou néfaste de l'un ou l'autre des régimes, malgré les valeurs homogènes et peu élevées du lot Polyphénols.

Aucune différence entre les lots n'a pu être montrée après réalisation du test 3D sur les prélèvements de foie.

4- Discussion

En l'absence de résultat significatif, il n'est pas possible d'affirmer que les polyphénols du cognac administrés à 100 mg/kg/jour aient montré un quelconque rôle protecteur vis-à-vis de la cancérogenèse colique chimiquement induite, ni de corrélérer nos résultats aux études épidémiologiques et expérimentales ayant montré des propriétés bénéfiques de cette famille de substances. On peut seulement observer que dans l'évaluation des deux marqueurs choisis, les valeurs relevées chez les rats du lot Polyphénols semblent peu dispersées et situées dans les valeurs les plus basses.

Aucune tendance ne se dégage des valeurs du lot Cognac, ce que l'on peut expliquer par la moindre quantité de polyphénols finalement ingérée (77 mg/kg/jour) ou par un éventuel effet adverse de l'éthanol. Cependant, les valeurs du lot Eau-de-Vie ne mettent pas en évidence d'effet néfaste de l'éthanol, rejoignant en cela les études déjà citées et qui peinent à s'accorder sur une relation entre éthanol et cancer colo-rectal.

Aucun effet favorable n'est non plus observé dans le lot acide ellagique. Celui-ci, administré à une dose 10 fois supérieure à celle procurée par le régime Cognac ou Polyphénols, a pu entraîner un effet pro-oxydant.

Les résultats du lot Vin, homogènes et plutôt bas pour le nombre de FCA, ne confirment pas cette tendance au test 3D. Rappelons que les polyphénols apportés par ce régime diffèrent de ceux apportés par les polyphénols du cognac lyophilisé, puisqu'il s'agit uniquement de substances polyphénoliques apportées par le raisin. Ainsi une étude récente portant sur l'activité antiradicalaire de fraction polyphénoliques du vin rouge, montre qu'une part non-négligeable (11%) de cette activité est apportée par les tanins du bois dans le cas d'un vin élevé en barriques neuves (Saint-Cricq de Gaulejac et al, 1998). Cependant, le vin constitue un médiocre extracteur des ellagitanins du fût de vieillissement en regard de l'extraction hydro-alcoolique réalisée par des spiritueux tels que le cognac, dont l'eau-de-vie titre à plus de 70% d'alcool lors de la mise en barrique (Snakkers et Cantagrel, 1999).

Certains procédés de vinification peuvent également faire chuter la teneur du vin en tanins, tel que le « collage » aux protéines (traditionnellement le blanc d'oeuf) utilisé pour précipiter les tanins et éviter ainsi la formation de dépôts disgracieux.

D'autre part, il peut être intéressant de rapprocher ces résultats de ceux obtenus par deux études de Caderni (et al, 1999 et 2000) portant sur l'effet des polyphénols du vin rouge sur différents marqueurs de la cancérogenèse colique (tableau XI).

Les deux études de Caderni utilisant le même type d'extrait polyphénolique, les protocoles expérimentaux diffèrent surtout par la réalisation dans l'étude de 2000 d'une induction carcinogénique répétée (1 injection hebdomadaire d'AOM pendant 10 semaines), ainsi que par la durée des régimes (3 semaines de plus en 2000). On constate que les seuls résultats obtenus intéressent les phases secondaires de la cancérogenèse, puisque le résultat discret de 1999 comme celui plus probant de 2000 sont tous deux obtenus lors de protocoles où l'induction précède la mise en place des régimes. Rappelons que dans la présente étude, nous avons choisi d'explorer l'action des polyphénols du cognac sur les différentes phases de la cancérogenèse, par la mise en place initiale des régimes et la réalisation de 3 sacrifices au cours du protocole.

Tableau XI
Comparatif de la présente étude et des études de Caderni (et al, 1999 et 2000)

Réf.	Paramètres / résultats significatifs	Protocole
Caderni et al, 1999	Acides biliaires et acides gras longue chaîne fécaux	Rats F344 AOM puis 90 jours WCPT
	Prolifération de la muqueuse colique <i>diminution du nombre de cellules par cryptes (57mg/kg)</i>	AOM 2fois15mg/kg à une sem intervalle puis après 1 semaine 90 jours HF ou HF+WCPT 14 ou 57 mg/kg
	Apoptose FCA Initiation	10 jours HF ou HF+WCPT 57 mg/kg puis AOM 1 fois 20 mg/kg. Sacrifice après 30 jours)
	promotion	1 sem HF puis AOM 2fois15mg/kg à une sem intervalle puis après 1 semaine : 90 jours HF ou HF+WCPT 14 ou 57 mg/kg
	Aberrations nucléaires dans les cellules cryptiques	Gavage neutre ou WCPT 10 jours puis IQ ou DMH 24h avant sacrifice
Caderni et al, 2000	Examen histopathologique des tumeurs (tous organes) <i>↓nombre de tumeurs (colon rectum) et de rats atteints d'adénomes intestinaux : BT, WE</i> Apoptose des cellules de la muqueuse colique <i>↑index apoptose : BT++, WE</i>	Rats F344 Régime HF, AOM 7 mg/kg 10 fois à 1 sem d'intervalle puis ajout WE, BT ou GT 50 mg/kg pendant 16 sem
Etude Cognac	3D (lésions à l'ADN) FCA	Rats Sprague-Dawley Régimes (dont polyphénols 100 mg/kg) 3 sem puis DMH 50mg/kg à 3 jours interv. Sacrifices avant, après induction et à 13 semaines.

Abréviations :

AOM : azoxyméthane (métabolite actif de la DMH)

WCPT (Wine Complex Polyphenols and Tanins): extrait polyphénolique de vin rouge

HF (High-Fat diet) : régime hyperlipidique analogue d'un régime humain en pays industrialisé

IQ : amine aromatique hétérocyclique d'origine alimentaire nécessitant une activation métabolique

BT, GT (Black Tea, Green Tea) : extrait polyphénolique de thé noir ou vert

Eu égard à la timidité et même l'absence de tendance observée, on peut légitimement s'interroger sur la biodisponibilité des substances polyphénoliques apportées par ces régimes aux différentes étapes de la cancérogenèse. Ainsi, de Vries (et al, 2001) a montré que de semblables polyphénols étaient moins bien distribués chez l'Homme après ingestion de vin qu'après ingestion de thé ou de certains légumes. La question de la biodisponibilité et du métabolisme au niveau du côlon et de la flore commensale demeure également à explorer plus avant.

Enfin, la très forte dispersion des valeurs témoins dans le dénombrement des foyers de cryptes aberrantes a constitué un obstacle à l'interprétation des résultats, et plaide pour une forte variabilité individuelle des animaux. Il conviendrait de modifier en ce sens le protocole, en employant un plus grand nombre d'animaux témoins et en choisissant un type de rats plus homogènes sur le plan génétique (F344). La faible dispersion des résultats du lot Polyphénols n'en est toutefois que plus notable.

CONCLUSION GENERALE

Impulsée par les résultats prometteurs obtenus sur les effets antioxydants des polyphénols du cognac (Rayssiguier et al, 1999), cette étude échoue à mettre en évidence un effet fort et distinct de ces mêmes polyphénols vis-à-vis de la cancérogenèse colique chimiquement induite, et à attribuer une action préventive précise tant à un composé polyphénolique spécifique (ici l'acide ellagique), qu'à un extrait polyphénolique total ou à un aliment réputé pour contenir des polyphénols (ici une spiritueux vieilli en fût de chêne: le cognac). En cela elle ne vient pas confirmer non plus l'hypothèse d'un effet synergique des polyphénols in toto par-rapport à l'effet d'un composé isolé, phénomène qui avait pu être montré pour l'activité anti-radicalaire des polyphénols du vin rouge sur l'ADN en utilisant le test 3D (Saint-Cricq de Gaulejac et al, 1999).

Il serait toutefois intéressant de réaliser une étude supplémentaire avec un plus grand nombre d'animaux en se concentrant sur les polyphénols du cognac, et éventuellement de prendre en considération les facteurs de variation très nombreux influant sur leur composition (Snakkers et Cantagrel, 1999) : la nature du bois employé (espèce de chêne, origine forestière), les pratiques de tonnellerie (chauffe, échaudage) et bien sûr le vieillissement, au cours duquel l'extraction des polyphénols du bois et les réactions chimiques (hydrolyse, condensations) modifient la composition des polyphénols et de là leur biodisponibilité et leurs propriétés bioactives. En outre, induire la cancérogenèse par l'utilisation répétée de cancérogènes alimentaires typiques de l'alimentation des pays industrialisés (des amines aromatiques hétérocycliques par exemple) permettrait de se rapprocher des conditions d'exposition naturelles.

Néanmoins cette étude isolée peut être considérée comme une contribution à un projet d'investigation plus vaste qui s'inscrit dans le cadre du programme européen Flair-Flow, étudiant les propriétés d'un type de polyphénols appelé CPT (Complex Phenols and Tanins) qui n'est pas naturellement présent dans les végétaux mais qui se retrouve dans des denrées ayant subi des procédés de

conservation (fermentation, maturation...) tels que le thé noir, le vin et les spiritueux vieilliss en fûts de bois.

Plus généralement, elle participe d'un mouvement en pleine expansion qui voit s'associer chercheurs, épidémiologistes, médecins et producteurs de denrées alimentaires, et qui vise à identifier les facteurs de risque et de prévention des cancers, dans le but de concevoir et promouvoir des stratégies alimentaires préventives dépassant le simple cadre d'une alimentation équilibrée.

Ce noble objectif ne doit cependant pas faire perdre de vue que la multiplication des études sur les propriétés bénéfiques de tel ou tel composé alimentaire obéit avant tout à des motivations commerciales. Dans un contexte concurrentiel féroce qui n'épargne pas le domaine de la santé publique, on peut imaginer que dans un proche avenir chaque aliment soit doté d'une « indication » (anti-cholestérol, anti-oxydant...) plus ou moins avalisée par des arguments scientifiques, et plutôt plus que moins vantée par des allégations figurant en bonne place sur l'étiquette[♦].

C'est un fait, le rôle de l'alimentation dans la santé est fondamental, aussi bien dans le cadre de la prévention des maladies que pour sa participation au bien-être physique et psychologique. En cela, le cognac par ses qualités organoleptiques mondialement appréciées trouve sa place pourvu qu'il soit consommé avec modération.

Gardons cependant à l'esprit qu'il peut paraître prématuré, futile voire indécent, d'étudier avec trop d'insistance les micronutriments palliatifs d'une hygiène de vie défectueuse dans les pays industrialisés, quand dans les pays les plus pauvres les maladies infectieuses déciment encore les populations et quand tout simplement plus de 800 millions d'êtres humains n'ont pas accès à l'eau et la nourriture nécessaires à leur seule subsistance.

[♦] pour l'instant la directive CEE 79/112 sur l'étiquetage des denrées alimentaires n'autorise pas la mention de propriétés préventives, mais elle devrait bientôt être assouplie sous la pression de l'industrie agroalimentaire.

Références bibliographiques

- Arimoto-Kobayashi S, Sugiyama C, Harada N, Takeuchi M, Takemura M, Hayatsu H. **Inhibitory effects of beer and other alcoholic beverages on mutagenesis and DNA adduct formation induced by several carcinogens.** *J Agric Food Chem* 1999 Jan;47(1):221-30
- Bird R.P. **Observation and quantification of aberrant crypts in murine colon treated with a colon carcinogen : preliminary findings.** *Cancer Letters* 1987, 37. 147-151
- Bird R.P. **Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer.** *Cancer Letters*.1995, 93. 55-71
- Bomser JA, Singletary KW, Wallig MA, Smith MA. **Inhibition of TPA-induced tumor promotion in CD-1 mouse epidermis by a polyphenolic fraction from grape seeds.** *Cancer Lett* 1999 Jan 29;135(2):151-7
- Bors W., Heller W., Michel C.and Saran M. **Flavonoids as antioxidants: determination of radical scavenging efficiencies.** *Methods Enzymol.* 186 (1990), pp. 343-355
- Bostick RM, Potter JD, Kushi LH et al. **Sugar, meat, and fat intake, and non-dietary risk factors for colon cancer incidence in Iowa women (United States).** *Cancer Causes Control* 5 (1994): 38-52
- Boutron MC, Faivre J, Dop MC, Quipourt V, Senesse P. **Tobacco, alcohol and colo-rectal tumors : a multistep process.** *Am J Epidemiol* 1995;141:1038-46
- Bruce, W.R., Archer, M.C., Corpet, D.E., Medline, A., Minkin, S., Stamp, D., Yin, Y. et Zhang, X.M. **Diet, aberrant crypt foci and colo-rectal cancer.** *Mutation Research.* (1993) 290. 111-118
- Bruce R. **diet, growth factors and colo-rectal cancer.** *Conférence européenne nutrition et cancer, Lyon 2001*
- Caderni G., Giannini, A., Lancioni, L., Luceri, C., Biggeri, A. et Dolara, P. **Characterisation of aberrant crypt foci in carcinogen-treated rats : association with intestinal carcinogenesis.** *British Journal of Cancer.*1995, 71. 763-769
- Caderni G, Remy S, Cheynier V, Morozzi G, Dolara P. **Effect of complex polyphenols on colon carcinogenesis.** *Eur J Nutr* 1999 Jun;38(3):126-32
- Caderni G, De Filippo C, Luceri C, Salvadori M, Giannini A, Biggeri A, Remy S, Cheynier V, Dolara P **Effects of black tea, green tea and wine extracts on intestinal carcinogenesis induced by azoxymethane in F344 rats.** *Carcinogenesis* 2000 Nov;21(11):1965-9
- Carbonaro M, Grant G, Pusztai A. **Evaluation of polyphenol bioavailability in rat small intestine.** *Eur J Nutr* 2001 Apr;40(2):84-90
- Casalini C, Lodovici M, Briani C, Paganelli G, Remy S, Cheynier V, Dolara P. **Effect of complex polyphenols and tannins from red wine (WCPT) on chemically induced oxidative DNA damage in the rat.** *Eur J Nutr* 1999 Aug;38(4):190-5
- Cerar A, Pokorn D. **Inhibition of MNNG-induced gastroduodenal carcinoma in rats by synchronous application of wine or 11% ethanol.** *Nutr Cancer* 1996;26(3):347-52
- Chang W.W.L. **Histogenesis of colon cancer in experimental animals.** *Scandinavian Journal of Gastroenterology.*1984, 19. 27-43.
- CIRC-Centre International de Recherche sur le Cancer. **Bases de données WHO Cancer Mortality.** *Databank* (1998) et *Globocan* (2000)

- Constantinou A., G.D. Stoner, R. Mehta, K. Rao, C. Runyan and R. Moon. **The dietary anticancer agent ellagic acid is a potent inhibitor of DNA topoisomerases in vitro.** *Nutr. Cancer* 23 (1995), pp. 121-130
- Corpet D.E. **Introduction aux modèles utilisés en expérimentation animale.** In *Alimentation et Cancer, évaluation des données scientifiques, 1996, chap. 14. Eds Lavoisier Tec et Doc, Paris, pp 243-254*
- Corpet D.E. et Taché S. **Most effective colon cancer chemopreventive agents in rats: A review of aberrant crypt foci and tumor data, ranked by potency.** *Nutrition and cancer* 2002 43 (1)
- Decloître F. et Puiseux-Dao, S. **Mécanismes épigénétiques de la cancérogenèse.** In **Cancérogenèse, Aspects génétiques et épigénétiques, Mécanismes et méthodes d'évaluation.** Eds, F. Decloître et Y. Moulé, Association Toxicologie-CNAM, Paris, 1993, pp 53-93.
- De Ledinghen V, Monvoisin A, Neaud V, Krisa S, Payrastra B, Bedin C, Desmouliere A, Bioulac-Sage P, Rosenbaum J. **Trans-resveratrol, a grapevine-derived polyphenol, blocks hepatocyte growth factor-induced invasion of hepatocellular carcinoma cells.** *Int J Oncol* 2001 Jul;19(1):83-8
- Diergaarde B., Geelof W., Muijen G., Kampman E. **Diet and APC mutations in colon tumours.** *Conférence européenne nutrition et cancer, Lyon 2001*
- Doll R. et Peto R. **The causes of cancer : quantitative estimates of the avoidable risks of cancer in the United States today.** *Journal of the National Cancer Institute.* 66. 1191-1308
- Fearon ER, Vogelstein B. **A genetic model for colo-rectal tumorigenesis.** *Cell* 61 (1990): 759-767
- Feldman KS, Sahasrabudhe K, Smith RS, Scheuchenzuber WJ. **Immunostimulation by plant polyphenols: a relationship between tumor necrosis factor-alpha production and tannin structure.** *Bioorg Med Chem Lett* 1999 Apr 5;9(7):985-90
- Ferguson L.R. and P.J. Harris. **Suberized plant cell walls suppress formation of heterocyclic amine-induced aberrant crypts in a rat model.** *Chem.-Biol. Interactions* 114 (1998), pp. 191-209
- Ferguson L.R. **Role of plant polyphenols in genomic stability.** *Mutat. research,* 475 (2001) 89-111
- Fiala ES. **Investigations into the metabolism and mode of action of the colon carcinogens 1,2-dimethylhydrazine and azoxymethane.** *Cancer* 1977 Nov;40(5 Suppl):2436-45
- Fujimitsu, Y., Nakanishi, H., Inada, K., Yamachika, T., Ichinose, M., Fukami, H. et Tatematsu, M. **Development of aberrant crypt foci involves a fission mechanism as revealed by isolation of aberrant crypts.** *Japanese Journal of Cancer Research.* 1996, 87. 1199-1203
- Gichner T., F. Pospisil, J. Veleminsky, V. Volkeova and J. Volke. **Two types of antimutagenic effects of gallic and tannic acids towards N-nitroso-compounds-induced mutagenicity in the Ames Salmonella assay.** *Folia Microbiol.* 32 (1987), pp. 55-62
- Giovannelli L, Testa G, De Filippo C, Cheynier V, Clifford MN, Dolara P. **Effect of complex polyphenols and tannins from red wine on DNA oxidative damage of rat colon mucosa in vivo.** *Eur J Nutr* 2000 Oct;39(5):207-12
- Giovannucci E, Stampfer MJ, Colditz GA et al. **Folate, methionine and alcohol intake and risk of colo-rectal adenoma.** *J Natl Cancer Inst* 85 (1993): 875-884
- Giovannucci E, Rimm EB, Ascherio A, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC. **Alcohol, low-methionine--low-folate diets, and risk of colon cancer in men.** *J Natl Cancer Inst* 1995 Feb 15;87(4):265-73 Comment in: *J Natl Cancer Inst.* 1995 Feb 15;87(4):239-40
- Giovannucci E. **Insulin, insulin-like growth factors and colon cancer: a review of the evidence.** *J Nutr* 2001 Nov;131(11 Suppl):3109S-20S

- Glinghammar B., Rafter J. **Colonic linal contents (fecal water) induces cox-2.** *Conférence européenne nutrition et cancer, Lyon 2001*
- Goldberg DM, Hoffman B, Yang J, Soleas GJ. **Phenolic constituents, furans, and total antioxidant status of distilled spirits.** *J Agric Food Chem 1999 Oct;47(10):3978-85*
- Gronbaek M, Becker U, Johansen D, Gottschau A, Schnohr P, Hein HO, Jensen G, Sorensen TI. **Type of alcohol consumed and mortality from all causes, coronary heart disease, and cancer.** *Ann Intern Med 2000 Sep 19;133(6):411-9*
- Hahn, W.C., Counter, C.M., Lundberg, A.S., Beijersbergen, R.L., Brooks, M.W. et Weinberg, R.A. **Creation of human tumour cells with defined genetic elements.** *Nature. 1993, 400. 464-467*
- Hakkak R, Korourian S, Ronis MJ, Badger TM. **Effects of diet and ethanol treatment on azoxymethane-induced liver and gastrointestinal neoplasia of male rats.** *Cancer Lett 1996 Oct 22;107(2):257-64*
- Hambly RJ, Rumney CJ, Cunninghame M, Fletcher JM, Rijken PJ, Rowland IR. **Influence of diets containing high and low risk factors for colon cancer on early stages of carcinogenesis in human flora-associated (HFA) rats.** *Carcinogenesis 1997 Aug;18(8):1535-9*
- Hayes J.D., E.M. Ellis, G.E. Neal, D.J. Harrison and M.M. Manson. **Cellular responses to cancer chemopreventive agents: contribution of the antioxidant response element to oxidative and chemical stress.** *Biochem. Soc., Symp. 64 (1999), pp. 141-168*
- Hermanek P. **Colo-rectal carcinoma: histopathological diagnosis and staging.** *Baill Clin Gastroenterol (1989). 3: 511-529*
- Hill, M.J., Morson, B.C. et Bussey, H.J.R. **Aetiology of adenoma-carcinoma sequence in large bowel.** *Lancet. 1978, 1. 245-247*
- Hill, C. et Doyon, F. **Epidemiology of cancer.** *Bulletin du Cancer. 1997, 84. 917-918*
- Hirayama T. **Association between alcohol consumption and cancer of the sigmoid colon: observations from a Japanese cohort study.** *Lancet 1989 Sep 23;2(8665):725-7 Comment in: Lancet. 1989 Nov 25;2(8674):1270*
- Hollman P.C.H., van Trijp J.M.P., Buysman M.N.C.P., van der Gaag M. S., Mengelers M.J.B., de Vries J.H.M., Katan M. B. **Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man.** *FEBS Lett 1997;418:152-156*
- Holmberg B, Ekstrom T. **The effects of long-term oral administration of ethanol on Sprague-Dawley rats : a condensed report.** *1995 Toxicology Feb 6;96(2):133-45*
- Homann N, Tillonen J, Salaspuro M. **Microbially produced acetaldehyde from ethanol may increase the risk of colon cancer via folate deficiency.** *Int J Cancer 2000 Apr 15;86(2):169-73*
- Honjo S, Kono S, Shinchu K, Imanishi K, Hirohata T. **Cigarette smoking, alcohol use and adenomatous polyps of the sigmoid colon.** *Jpn J Cancer Res 1992 Aug;83(8):806-11*
- Howe G, Aronson KJ, Benito E et al. **The relationship between dietary fat intake and risk of colo-rectal cancer: evidence from the combined analysis of 13 case-control studies.** *Cancer Causes Control (1997) 8: 215-228*
- Humblot C, Kassie F, Nugon-Baudon L, Knäsmüller S, Lhoste EF. **Flore colique, alimentation et modulation de la génotoxicité d'une amine hétérocyclique.** *Bulletin du Cancer. Vol. 88, Numéro 5, Mai 2001 : 496-501*
- Imai K., K. Suga and K. Nakachi. **Cancer-preventive effects of drinking green tea among a Japanese population.** *Prev. Med. 26 (1997), pp. 769-775*

- Jacobson E. A., Newmark H., Baptista J., Bruce W. R. **A preliminary investigation of the metabolism of dietary phenolics in humans.** *Nutr. Rep. Int.* 1983;28:1409-1417
- Katiyar SK, Agarwal R, Zaim MT, Mukhtar H. **Protection against N-nitrosodiethylamine and benzo[a]pyrene-induced forestomach and lung tumorigenesis in A/J mice by green tea.** *Carcinogenesis* 1993 May;14(5):849-55
- Kinzler, K.W. et Vogelstein, B. **Lessons for hereditary colo-rectal cancer.** *Cell.* 1996, 87. 159-170.
- Kuenzig W., J. Chau, E. Norkus, H. Holowaschenko, H. Newmark, W. Mergens and A.H. Conney. **Caffeic and ferulic acid as blockers of nitrosamine formation.** *Carcinogenesis* 5 (1984), pp. 309-313
- Lapidot T., Harel S., Granit R., Kanner J. **Bioavailability of red wine anthocyanins as detected in human urine.** *J. Agric. Food Chem.* 1998;46:4297-4302
- Laughton M.J., P.J. Evans, M.A. Moroney, J.R. Hoult and B. Halliwell. **Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. Relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability.** *Biochem. Pharmacol.* 42 (1991), pp. 1673-1681
- Lee H., H.-W. Wang, H.-Y. Su and N.J. Hao. **The structure-activity relationships of flavonoids as inhibitors of cytochrome P-450 enzymes in rat liver microsomes and the mutagenicity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline.** *Mutagenesis* 9 (1994), pp. 101-106
- Lieber CS, De Carli LM. **Animal models of chronic ethanol toxicity.** *Methods Enzymol* 1994;233:585-94
- Lipkin M, Reddy B, Newmark H et Lamprecht SA. **Dietary factors in human colo-rectal cancer.** *Annual Review of Nutrition* 1999. 19. 545-586.
- Liu T, Mokuolu AO, Rao CV, Reddy BS, Holt PR. **Regional chemoprevention of carcinogen-induced tumors in rat colon.** *Gastroenterology* 1995 Oct;109(4):1167-72
- Lodovici M, Casalini C, De Filippo C, Copeland E, Xu X, Clifford M, Dolara P. **Inhibition of 1,2-dimethylhydrazine-induced oxidative DNA damage in rat colon mucosa by black tea complex polyphenols.** *Food Chem Toxicol* 2000 Dec;38(12):1085-8
- Longnecker NW, Orza MJ, Adams ME, Vioque J, Chalmers TC. **A meta-analysis of alcoholic beverage consumption in relation to risk of colo-rectal cancer.** *Cancer Causes Control* 1990;1:59-68
- McLellan, E.A., Medline, A. et Bird, R.P. **Sequential analyses of the growth and morphological characteristics of aberrant crypt foci-putative preneoplastic lesions,** *Cancer Research.* 1991, 51. 5270-5274
- Meyer F, White E (1993). **Alcohol and nutrients in relation to colon cancer in middle-aged adults.** *Am J Epidemiol* 1993 Aug 15;138(4):225-36
- Moreno V. **Diet and K-ras mutations in colo-rectal cancer.** *Conférence européenne nutrition et cancer, Lyon 2001*
- Nagata H., S. Takekoshi, T. Takagi, T. Honma and K. Watanabe. **Antioxidative action of flavonoids, quercetin and catechin, mediated by the activation of glutathione peroxidase.** *Tokai J. Exp. Clin. Med.* 24 (1999), pp. 1-11
- Nakachi K, Matsuyama S, Miyake S, Suganuma M, Imai K. **Preventive effects of drinking green tea on cancer and cardiovascular disease: epidemiological evidence for multiple targeting prevention.** *Biofactors* 2000;13(1-4):49-54

Nakagawa K., Okuda S., Miyazawa T. **Dose-dependent incorporation of tea catechins, (-)-epigallocatechin-3-gallate and (-)-epigallocatechin, into human plasma.** *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1997;61:1981-1985

Narayanan B. A., Geoffroy O., Willingham M. C., Re G. G., Nixon D. W. **p53/p21 (waf1/cip1) expression and its possible role in G1 arrest and apoptosis in ellagic acid treated cancer cells.** *Cancer Letters* 1999, 136, 215-221.

Narayanan BA, Re GG. **IGF-II down regulation associated cell cycle arrest in colon cancer cells exposed to phenolic antioxidant ellagic acid.** *Anticancer Res* 2001 Jan-Feb;21(1A):359-64

Naveau S, Chaput JC, Bedossa P et al. **Cirrhosis as an indépendant risk factor for colonic adenomas.** *Gut* 1992;33:535-40

Nugon-Baudon L, Lhoste EF, Ouriet V, Lory S, Brezillon C, Chèze C, Rabot S. **La consommation de catéchines du vin module les enzymes du métabolisme des xénobiotiques en fonction de la présence de flore colique humaine chez le rat.** *Bulletin du Cancer.* Vol. 88, Numéro 5, Mai 2001 : 496-501)

Ohta T., M. Watanabe, Y. Shirasu and T. Inoue. **Post-replication repair and recombination in uvrA umuC strains of Escherichia coli are enhanced by vanillin, an antimutagenic compound.** *Mutat. Res.* 201 (1988), pp. 107-112

Orrhage K., Sillerstrom E., Gustafsson J-A., Nord C.E. et Rafter J. **Binding of mutagenic heterocyclic amines by intestinal and lactic acid bacteria.** *Mutation Research* (1994) 311. 239-248

Pereira MA, Khoury MD. **Prevention by chemopreventive agents of azoxymethane-induced foci of aberrant crypts in rat colon.** *Cancer Lett* 1991 Dec 9;61(1):27-33

Pfohl-Leszkowicz A, Petkova-Bocharova T, Chernozemsky IN, Castegnaro M. **Balkan endemic nephropathy and associated urinary tract tumours: a review on aetiological causes and the potential role of mycotoxins.** *Food Addit Contam* 2002 Mar;19(3):282-302

Pool-Zobel B.L., A. Bub, N. Schroder and G. Rechkemmer, **Anthocyanins are potent antioxidants in model systems, but do not reduce endogenous oxidative DNA damage in human colon cells.** *Eur. J. Nutr.* 38 (1999), pp. 227-234

Potter, J.D. **Nutrition and colo-rectal cancer.** *Cancer Causes and Control* 1996 7. 127-146

Pretlow, T.P., Pretlow T.G. **Putative preneoplastic changes identified by enzyme histochemical and immunohistochemical techniques.** *Journal of Histochemistry and Cytochemistry.* 1988, 46. 577-583

Pretlow, T.P., Oriordan, M.A., Somich, G.A., Amini, S.B. et Pretlow, T.G. **Aberrant crypts correlate with tumor incidence in F344 rats treated with azoxymethane and phytate,** *Carcinogenesis.* 1992, 13. 1509-1512.

Rao CV, Tokumo K, Rigotty J, Zang E, Kelloff G, Reddy BS. **Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary administration of piroxicam, alpha-difluoromethylornithine, 16 alpha-fluoro-5-androsten-17-one, and ellagic acid individually and in combination.** *Cancer Res* 1991 Sep 1;51(17):4528-34

Rayssiguier Y., Mazur A., Gueux E., Rock E. **In vitro and in vivo antioxidant effect of cognac. Moderate alcohol consumption and cardiovascular disease,** *International satellite symposium, Venice oct 30-31 1999*

Renaud S, de Lorgeril M. **Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease.** *Lancet* 1992 Jun 20;339(8808):1523-6

- Renaud S, Gueguen R. **The French paradox and wine drinking.** *Novartis Found Symp* 1998;216:208-17; discussion 217-22, 152-8
- Riboli E, Cornee J, Macquart-Moulin G, Kaaks R, Casagrande C, Guyader M. **Cancer and polyps of the colorectum and lifetime consumption of beer and other alcoholic beverages.** *Am J Epidemiol* 1991 Jul 15;134(2):157-66
- Riboli, E. **Cancer du côlon et du rectum.** In *Alimentation et Cancer, évaluation des données scientifiques.* 1996 Eds, Lavoisier Tec et Doc, Paris, pp 126-138.
- Rouers B. **L'eau, agent de détoxification alimentaire. Étude de deux techniques de détoxification des plantes alimentaires utilisées par les Aborigènes Australiens.** *Altérités vol.1 n°1, 1996*
- Sakaguchi N., M. Inoue and Y. Ogihara. **Reactive oxygen species and intracellular Ca²⁺, common signals for apoptosis induced by gallic acid.** *Biochem. Pharmacol.* 55 (1998), pp. 1973-1981
- Salles, B., Provot, C., Calsou, P., Hennebelle, I., Gosset, I., et Fournié, G.J. **A chemiluminescent microplate assay to Detect DNA Damage induced by genotoxic treatments,** *Analytical Biochemistry.* 1995, 231.
- Scalbert A., Williamson G. **Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols,** *Journal of Nutrition.* 2000;130:2073S-2085S
- Saint-Cricq de Gaulejac N., Glories Y. et Vivas N. **Recherche des composés responsables de l'effet antiradicalaire dans les vins. Influence de l'élevage en barriques.** *J.Sci.Tech.Tonnellerie* 1998, 4, 147-161
- Saint-Cricq de Gaulejac N., Vivas N., Chaugier C., Buganet D., Bentzon J. et Skovenborg E. **Influence of ethanol on free radical scavenging activity of phenolic compounds issuing from red wines.** *Polyphenols, Vin et Santé, Bordeaux, 1999*
- Seitz HK, Czygan P, Waldherr R, Veith S, Raedsch R, Kassmodel H, Kommerell B. **Enhancement of 1,2-dimethylhydrazine-induced rectal carcinogenesis following chronic ethanol consumption in the rat.** *Gastroenterology* 1984 May;86(5 Pt 1):886-91
- Seitz HK, Simanowski UA, Garzon FT, Rideout JM, Peters TJ, Koch A, Berger MR, Einecke H, Maiwald M. **Possible role of acetaldehyde in ethanol-related rectal cocarcinogenesis in the rat.** *Gastroenterology* 1990 Feb;98(2):406-13
- Serafini M, Maiani G, Ferro-Luzzi A. **Alcohol-free red wine enhances plasma antioxidant capacity in humans.** *J Nutr* 1998 Jun;128(6):1003-7
- Simanowski UA, Stickel F, Maier H, Gartner U, Seitz HK. **Effect of alcohol on gastrointestinal cell regeneration as a possible mechanism in alcohol-associated carcinogenesis.** *Alcohol* 1995 Mar-Apr;12(2):111-5
- Singletary KW, Meline B. **Effect of grape seed proanthocyanidins on colon aberrant crypts and breast tumors in a rat dual-organ tumor model.** *Nutr Cancer* 2001;39(2):252-8
- Smith W.A., J.M. Arif, R.C. Gupta. **Effect of cancer chemopreventive agents on microsome-mediated DNA adduction of the breast carcinogen dibenzo[a,l]pyrene.** *Mutat. Res.* 412 (1988), pp. 307-314
- G. Snackers R. Cantagrel. **Teneurs en ellagitannins et acide ellagique des bois de chêne et des Cognacs, facteurs de variations.** 1999, rapport du Bureau National Interprofessionnel du Cognac
- Stanley, L. **Molecular aspects of chemical carcinogenesis : the roles of oncogenes and tumor suppressor genes.** *Toxicology.* 1995, 96. 173-194

Stoner GD, Morse MA. **Isothiocyanates and plant polyphenols as inhibitors of lung and esophageal cancer.** *Cancer Lett* 1997 Mar 19;114(1-2):113-9

Sugimura, T. et Wakabayashi, K. **Mutagens and carcinogens in the diet.** (1990) Eds, M.W. Pariza, J.S. Felton, H.U. Aeschbacher and S. Sato, Wiley-Liss, New-York, pp 1-18

Takahashi K., M. Sekiguchi and Y. Kawazoe, **Effects of vanillin and o-vanillin on induction of DNA-repair networks: modulation of mutagenesis in Escherichia coli.** *Mutat. Res.* 230 (1990), pp. 127-134

Takayama, T., Katsuki, S., Takahashi, Y., Ohi, M., Nojiri, S., Sakamaki, S., Kato, J., Kogawa, K., Miyake, H. et Niitsu, Y. **Aberrant crypt foci of the colon as precursors of adenoma and cancer,** *New England Journal of Medicine.* 1998, 339. 1277-1284

Toft NJ, Arends MJ. **DNA mismatch repair and colo-rectal cancer.** *J Pathol* 1(998). 185: 123-129

Trichopoulos, D., Li, F., et Hunter, D.J. **What causes cancer ?** *Scientific American.* 1996, 275. 50-57

Vogelstein, B. et Kinzler, K.W. **The multistep nature of cancer.** *Trends in Genetics.* 1993, 4. 138-141

de Vries JH, Hollman PC, van Amersfoort I, Olthof MR, Katan MB. **Red wine is a poor source of bioavailable flavonols in men.** *J Nutr* 2001 Mar;131(3):745-8

Watanabe H, Okamoto T, Takahashi T, Ogundigie PO, Ito A. **The effects of sodium chloride, miso or ethanol on development of intestinal metaplasia after X-irradiation of the rat glandular stomach.** *Jpn J Cancer Res* 1992 Dec;83(12):1267-72

WCRF (World Cancer Research Fund). **Food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective.** In *American Institute for Cancer Research. Ed, G. Cannon, Washington, pp 13-17, 23-26, 216-251.*

Yang CS, Wang ZY. **Tea and cancer.** *J Natl Cancer Inst* 1993 Jul 7;85(13):1038-49

Yirmiya R, Ben-Eliyahu S, Gale RP, Shavit Y, Liebeskind JC, Taylor AN. **Ethanol increases tumor progression in rats: possible involvement of natural killer cells.** *Brain Behav Immun* 1992 Mar;6(1):74-86

Yu R., J.J. Jiao, J.L. Duh, K. Gudehithlu, T.H. Tan and A.N. Kong, **Activation of mitogen-activated protein kinases by green tea polyphenols: potential signaling pathways in the regulation of antioxidant-responsive element-mediated phase II enzyme gene expression.** *Carcinogenesis* 18 (1997), pp. 451-456.

Annexe

Protocole d'extraction d'ADN à partir de tissu avec le kit QIAGEN Midi 100

Ce protocole a été établi à partir du guide fourni par Quiagen et des observations faites à la suite des extractions déjà réalisées dans le laboratoire.

Préparation des échantillons

Après sacrifice :

Le pré-traitement des échantillons peut se faire sur tissu fraîchement prélevé ou sur tissu congelé dans l'azote liquide et conservé à -80°C .

Le tissu prélevé est pesé, dilué dans 9 fois son volume de tampon de lyse G2 (fourni dans le kit), homogénéisé à l'Ultraturax (côlon et foie).

(Si on souhaite différer l'extraction, on peut stocker à ce stade les échantillons à -80°C /

Avant extraction :

dégeler les échantillons à température ambiante puis homogénéiser (vortex).

préparer un tube par échantillon avec :

5 ml de tampon de lyse G2+19 μl de RNase A à 100 mg/ml

+100 mg de côlon OU 80 mg de foie (plus riche en ADN)

vortex

incuber pendant 1h à 50°C

200 μl de protéase à 20 mg/ml (dans de l'eau mq stérile)

agiter et incuber 2h à 50°C (avec agitation manuelle régulière)

vortex puis centrifugation (5000 rpm, 10')

Extraction

disposer les colonnes extractrices sur un récipient d'évacuation

équilibrer avec 4 ml de tampon QBT

juste après centrifugation, déposer le surnageant sur la colonne

15 ml de tampon de lavage QC en 2 fois 7.5 ml

disposer des récipients de récolte

5 ml de tampon d'élution QF (température ambiante)

refroidissement des échantillons (glace, 10')

Purification

verser doucement 3,5 ml d'isopropanol à température ambiante

retourner plusieurs fois le tube pour isoler la pelote d'ADN

centrifuger (id.)

éliminer le surnageant, reprendre le culot dans 5 ml d'éthanol (70 vol. à -20°C) agiter

modérément

refaire les 2 étapes précédentes

centrifuger

éliminer le surnageant, faire sécher le culot (10', air libre, tube retourné)

reprendre dans 260 μl de tampon TE, agiter modérément

incuber 1h à 50°C (agitation régulière)

répartir 100 μl et 3x50 μl dans des cônes EppendorfND

stocker à -80°C en attendant la réalisation du test 3D.

