
**CARRAGHENANES ET CANCER DU COLON :
ETUDE EXPERIMENTALE
CHEZ DES RATS A FLORE HUMAINE
MECANISMES D’ACTION**

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
Eric, Jean, Gilbert VERHAEGHE
Né, le 18 novembre 1973 à TOULON (Var)

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. Patrick VERWAERDE

Professeur à l’Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Maître de Conférences à l’Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

SOMMAIRE

Introduction.....	5
--------------------------	----------

Première partie : le cancer.....	6
---	----------

1. Généralités sur le cancer.....	6
a) Cancérogénèse.....	6
b) Le cancer du côlon.....	8
c) Cancer et alimentation	10
2. Modèle expérimental de Bird : les microadénomes.....	11
a) Cryptes aberrantes et foyers de cryptes aberrantes (FCA).....	11
b) FCA : des lésions préneoplasiques ?	13
c) FCA et muqueuse colique chez l'homme	15
3. Rats axéniques associés à une flore humaine	16
a) Obtention des rats axéniques.....	17
b) Maintien des animaux axéniques	18
c) Rats à flore fécale humaine.....	19
d) Intérêts du modèle animal	20

Deuxième partie : les carraghénanes.....	21
---	-----------

1. Généralités sur les carraghénanes	21
a) Historique	21
b) Fabrication.....	22
b.1) Matières premières	22
b.2) Extraction.....	22
b.3) Séparation des carraghénanes du reste	23
b.4) Obtention de produits commerciaux	24
c) Structure	24

2. Propriétés des carraghénanes	26
a) Solubilité	26
b) Comportement rhéologique : épaissement, gélification.....	26
c) Effets des électrolytes	27
d) Réactions avec les protéines.....	28
e) Synergie.....	28
3. Réglementation et applications	28
a) Dispositions générales.....	28
b) Critères de pureté.....	28
c) Etiquetage.....	28
d) Applications.....	29
4. Carraghénanes et cancer colique.....	29
a) Etudes de cocancérogénèse	29
b) Etudes de cancérogénèse.....	32

Troisième partie : étude expérimentale..... 35

Initiation et promotion de microadénomes par les carraghénanes chez des rats axéniques associés à une microflore humaine

1. Matériels et méthodes.....	35
a) Animaux	35
b) Matériels.....	36
c) Alimentation.....	36
d) Traitements.....	37
d.1) Transfert de flore.....	37
d.2) Cancérogène utilisé : azoxyméthane.....	37
2. Calendrier	37
3. Déroulement de l'expérience	38
a) Initiation	38
b) Promotion	39

4. Mesures et résultats.....	41
a) Mesures	41
a.1) Lecture des lésions	41
a.2) Quantité de carraghénanes ingéré	41
a.3) Poids moléculaire des carraghénanes	42
a.4) Test du sang fécal occulte.....	43
b) Résultats	43
b.1) Initiation	43
b.2) Promotion	44
Quatrième partie : discussion sur les mécanismes	46
1. Adsorption de carcinogène	46
2. Dégradation des carraghénanes	47
3. Activité sur les acides biliaires	47
4. Carraghénanes et métabolisme du H ₂ S	50
Conclusions.....	54
Annexes :	
Annexe 1 : Résumé des recommandations InVS - DGS – NACRe.....	56
Annexe 2 : Critères de pureté	57
Annexe 3 : Tableau des principales applications des carraghénanes.....	58

INTRODUCTION

En France les cancers sont la première cause de mortalité depuis 1996, et sont responsables d'un tiers des décès. Le mode de vie semble avoir une grande influence sur l'origine et le développement des cancers, mais aucune théorie ne permet, à elle seule, d'expliquer l'étiologie des cancers. De nombreux arguments suggèrent que l'alimentation influe sur le développement des cancers, et qu'à cette influence s'ajoute d'autres causes bien démontrées comme : la fumée du tabac (poumon, larynx), les rayons ultra-violetts (peau), et des produits chimiques tels que le chlorure de vinyle (foie), les amines aromatiques (vessie), et le diéthylstilbestrol (col de l'utérus). S'il est démontré que certaines tumeurs se produisent plus souvent chez des sujets prédisposés génétiquement, et que si chez certains l'environnement n'influence probablement pas le développement du cancer (tumeur de l'enfant), il est probable aussi, que pour une majorité de personnes le cancer est la conséquence d'une interaction entre génétique et environnement. (Corpet, 1996)

Pour établir le lien entre environnement et cancer, et notamment entre alimentation et cancer, l'épidémiologie ne suffit pas, aussi l'expérimentation animale est-elle nécessaire pour préciser ce lien.

Des expérimentations sur le rat ont montré que les carraghénanes, un additif alimentaire, pourrait avoir un effet sur la cancérogenèse colique (Watanabe et al., 1978 ; Arakawa et al., 1986 ; Préclaire, 1996). Cependant cet effet pourrait être influencé par la flore intestinale spécifique du rat, modèle utilisé dans ces différentes expériences. En effet si l'ingestion continue de carraghénanes entraîne une colite ulcérate chez les rongeurs, ce n'est pas le cas chez les singes ou les humains (Corpet, 1984). De même l'ingestion de carraghénanes n'entraîne pas de colite ulcérate chez des cobayes axéniques ou ayant reçus un traitement antibiotique particulier (Onderdonk et al., 1979). C'est pourquoi nous avons étudié l'effet initiateur et promoteur des carraghénanes sur des rats axéniques auxquels nous avons associé une flore humaine. Nous avons ainsi essayé d'observer l'action des carraghénanes dans un modèle animal dont l'écologie intestinale est proche du côlon humain. Ces effets ont été observés dans notre étude à partir de lésions pré-néoplasiques : les microadénomes (Bird, 1987). Nous avons également essayé de déterminer quels pourraient être les mécanismes d'action des carraghénanes sur la cancérogenèse colique.

PREMIERE PARTIE : LE CANCER

1. GENERALITES SUR LE CANCER

a) Cancérogenèse

On attribue aux cancers « une origine clonale », à partir d'une seule cellule somatique, dont les mécanismes de régulateur de la croissance, de la différenciation, et de la prolifération ont été gravement perturbés. De plus les caractères nouveaux acquis sont transmis à la descendance cellulaire. Alors, les cellules tumorales n'obéissent plus aux mécanismes de contrôle d'une croissance normale chez l'hôte (Prescott et al., 1982). Elles prolifèrent de façon anarchique, incontrôlée et incessante pour devenir une tumeur macroscopique qui peut alors devenir invasive et former des métastases, pour finalement détruire l'organe dans lequel elle se trouvait initialement. Les métastases se disséminent dans l'organisme par voie sanguine et lymphatique, atteignant ainsi d'autres organes qu'elles peuvent détruire ainsi.

Le cancer peut être mortel soit par action directe et mécanique de la tumeur, détruisant l'organe dans lequel elle se trouve ou dans lequel elle s'est disséminée (poumon, foie, rate, moelle osseuse); soit par sécrétion de substances toxiques pour l'organisme lié aux dysfonctionnements des organes atteints.

Aujourd'hui on définit la cancérogenèse comme la succession des mécanismes responsable du développement des cancers. Ces mécanismes peuvent être divisés en plusieurs phases que sont les phases d'initiation, de promotion et d'invasion

La phase d'initiation : elle résulte d'une interaction brève et irréversible entre un agent cancérogène et le matériel génétique du tissu cible. La réaction engendre une lésion moléculaire, ou mutation, qui transforme certaines cellules en cellules quiescentes, phénotypiquement indistinctes des autres cellules, mais qui mémorisent une altération génétique qui sera exprimée lors d'une stimulation ultérieure. Cette mutation est due à une absence de réparation ou une réparation incomplète ou non conforme de l'ADN. Les proto-oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs ont un rôle fondamental dans l'apparition du

cancer, puisqu'ils coordonnent le développement et la division cellulaire. Par mutation, ils deviennent des oncogènes en favorisant la prolifération cellulaire (Weinberg, 1996). Ces cellules sont donc anormales sans qu'aucune tumeur ne soit encore cliniquement observable, tant que d'autres agents, appelés promoteurs, n'interviennent pas.

La phase de promotion : c'est une prolifération des cellules transformées après l'initiation, qui forment alors des tumeurs, sous l'action d'un agent promoteur qui n'est en lui-même ni mutagène ni cancérigène. En outre, il n'a d'effet biologique que s'il est appliqué en permanence ; quand l'action du stimulus promoteur est supprimée, ses effets disparaissent (Cohen 1988).

La phase de progression et d'invasion : elle concrétise l'acquisition de la malignité tumorale. Mettant en jeu des mécanismes mal connus, elle signe l'irréversibilité tumorale. Elle implique des remaniements génomiques, des translocations, des recombinaisons, des mutations d'oncogènes et/ou de gènes suppresseurs de tumeurs. Enfin, la dissémination des cellules tumorales dans l'organisme par effraction de l'organe originel va entraîner des métastases, celles-ci se disséminent dans l'organisme par voie sanguine et lymphatique, atteignant alors d'autres organes. (Riboli et al., 1996)

Ce modèle initiation-promotion-progression et invasion ne rend certes pas compte de toute la complexité des mécanismes conduisant à la formation d'une tumeur maligne, mais il représente à l'heure actuelle un schéma généralement admis, conciliant les données issues de la cancérogénèse expérimentale et celles de la cancérologie humaine.

L'identification claire des facteurs d'initiation est rare et difficile chez l'homme, on ne connaît que peu d'agents spécifiques de certains cancers, tel que l'amiante responsable du mésothéliome du poumon ou le virus d'Epstein Barr associé au lymphome de Burkitt. Des mutagènes retrouvés dans les selles seraient des initiateurs du cancer du côlon comme les amines hétérocycliques produites lors de la cuisson des viandes (Corpet, 1989). Cependant l'élimination des agents initiateurs n'est pas un moyen praticable de prévention des cancers communs, mieux vaut agir sur les agents promoteurs de ces cancers en les éliminant ou en diminuant l'exposition à ces produits. En agissant ainsi les lésions créées restent souvent à l'état latent ou se développent en tumeurs plus lentement. Parmi ces promoteurs on trouve beaucoup de produits alimentaires.

b) Le cancer du côlon

Les cancers du côlon sont une cause majeure de mortalité dans les pays occidentaux, ils représentent la première cause de cancer chez les non-fumeurs. Ils tuent environ 15000 personnes par an en France, autant en Angleterre et quatre fois plus aux USA. Au cours des dernières années, et ceci en dépit de progrès importants dans la compréhension de mécanismes responsables de la transformation maligne, on n'a pu enregistrer que peu de progrès thérapeutiques. L'acte chirurgical, lorsqu'il est effectué dans des conditions favorables, fait preuve d'une certaine efficacité : la survie à 5 ans varie de 96% pour les tumeurs intraépithéliales à 48%-76% pour les tumeurs plus ou moins étendues localement pour chuter à 6% pour les tumeurs au stade métastatique (Riboli, 1996).

Les différences géographiques au niveau de l'incidence du cancer du côlon ont dirigé les recherches vers l'étude des facteurs génétiques et environnementaux.

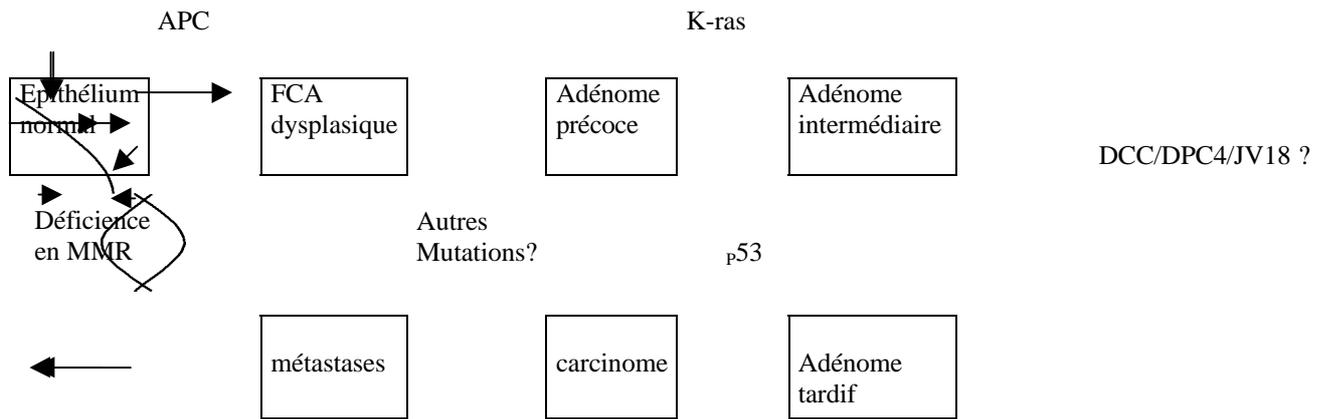
Il existe des dispositions familiales engendrant une extrême susceptibilité au cancer du côlon chez l'homme (5 à 15% des cas de cancer colique) ; on retrouve deux syndromes dominants, la FAP (polypose adénomateuse familiale) et le HNPCC (cancer colorectal héréditaire non polypeux ou syndrome de Lynch) qui sont transmis selon un mode autosomal dominant (Burt, 1996). La FAP provient d'une mutation du gène APC et le HNPCC serait dû à des mutations des gènes de réparation de l'ADN (Potter et al., 1993).

L'exploration des familles FAP et HNPCC a permis d'élaborer un modèle moléculaire de cancérogenèse, adapté au côlon, décrivant des mutations successives (5 à 7), et dont l'ordre des mutations joue un rôle, qui font qu'une cellule normale du côlon devient une métastase (Kinzler et al., 1996).

Une mutation du gène APC permet d'initier le processus néoplasique, la progression des tumeurs résulte elle des autres mutations. Une déficience en MMR (gène de réparation de l'ADN) semble accélérer le processus.

K-ras est un oncogène qui nécessite une mutation pour être activé.

DCC, DPC4, et JV18 sont au contraire des gènes suppresseurs de tumeurs portés par le chromosome 18. Une mutation sur chaque allèle est nécessaire pour leur inactivation.



Mutations génétiques associées à la cancérogenèse colorectale (Kinzler et al., 1996).

L'acquisition de la malignité peut se faire selon deux modalités différentes liées à l'instabilité génomique. Soit une instabilité chromosomique (CIN ou chromosomal instability) dans la majorité des cas, soit une instabilité des microsatellites (MIN ou microsatellite instability). Les familles FAP et HNPCC représentent de bons modèles pour les altérations respectivement liées à (CIN) et à (MIN) (Lindblom, 2001). La plupart des tumeurs sporadiques (CIN) se développent dans le côlon distal, alors que les tumeurs sporadiques (MIN) se développent surtout dans le côlon proximal.

Les études épidémiologiques montrent que l'incidence de ces cancers varie de 1 à 50 suivant les pays, affectant essentiellement les populations des pays développés, où les aliments sont transformés et contiennent des molécules ajoutées tels que les additifs alimentaires naturels ou chimiques. Cette variation serait avant tout liée aux facteurs de l'environnement (surtout alimentaire), plus qu'aux facteurs génétiques, comme nous le montre une étude comparative assez ancienne effectuée sur les populations migrantes entre les USA et le Japon. Dans ces deux pays, la mortalité par le cancer est proche mais le siège et la fréquence des divers cancers sont très différents. Aux USA les cancers du sein, du côlon et de la prostate dominant, alors qu'au Japon c'est le cancer de l'estomac qui est le plus fréquent. On pourrait penser que ces écarts proviendraient d'une différence génétique entre ces deux populations, mais les fréquences de cancers du sein chez les Japonais qui ont émigré à Hawaï et en Californie sont voisines de celles des populations blanches qui y habitent, et nettement supérieures à celles des Japonais résidant au Japon (Haenszel et al., 1968).

Ces études sur les émigrants montrent bien que les variations géographiques des fréquences des cancers spécifiques d'un organe résultent plus des facteurs environnementaux, essentiellement alimentaires, que des facteurs génétiques (Cohen, 1988).

c) Cancer et alimentation

Comme mentionné précédemment, il semble que l'alimentation soit surtout impliquée dans la promotion des tumeurs et c'est donc après l'initiation qu'un ensemble de facteurs alimentaires va déterminer si la cellule préalablement transformée va devenir une tumeur invasive. Les acides biliaires et certains acides gras libres, dont la concentration fécale augmente lors de l'ingestion de lipides, induiraient une prolifération cellulaire dans la muqueuse colique, et seraient des promoteurs de tumeurs chez des animaux ayant reçu un initiateur (Corpet, 1989). L'épidémiologie montre que des facteurs de l'alimentation tels que la quantité de lipides, de viande et d'alcool, ainsi que l'ingestion d'un excès de calories sont associés à un risque augmenté de cancer colique. D'autres facteurs comme les légumes, les fruits, le calcium, les fibres alimentaires contenant des pentosanes, et certains glucides, sont associés à un risque diminué. On a noté, par exemple, dans certaines études, que la mortalité par cancer du côlon est inversement proportionnelle à la consommation de blé et de céréales (Riboli, 1996).

Les études expérimentales concordent en général avec les observations épidémiologiques, notamment les études sur les graisses, qui montrent que des régimes à haute teneur en graisse et en acide linoléique sont des promoteurs chez le rat, alors que des régimes similaires mais contenant de l'acide oléique et de l'acide eicosapentaénoïque n'agissent pas comme tels (Cohen, 1988 ; Corpet, 1989). Ces expériences aident à mieux comprendre certaines observations épidémiologiques, telles que la faible incidence du cancer du sein et du côlon chez les esquimaux du Groenland : ces populations ont une alimentation riche en graisses mais celles-ci proviennent essentiellement de poissons et de mammifères marins.

Enfin, quels que soient les résultats des études expérimentales ou biologiques, il n'existe pas de preuve directe que l'on doive manger moins de graisse, consommer plus de vitamines, de fibres ou de légumes. Il semble quand même sage de conseiller une alimentation moins grasse, contenant plus d'acides gras de la série n-3, avec plus de céréales complètes, de

fruits et de légumes, moins de viandes grillées, et enfin plus de produits laitiers écrémés pour le calcium, ainsi que la pratique d'exercices physiques réguliers pour les sujets à risques (voir recommandations générales officielles, annexe 1).

2. MODELE EXPERIMENTAL DE BIRD : LES MICROADENOMES

En raison de leur complexité, de leur coût, et de problèmes éthiques, les essais chez l'homme doivent être précédés d'études expérimentales sur des animaux. Bien que les expérimentations chez l'animal soient beaucoup moins longues que les études sur l'homme, le développement d'un adénocarcinome du côlon chez un rongeur nécessite tout de même entre 6 et 12 mois au minimum après initiation (Corpet, 1996).

Il est donc long et coûteux de détecter directement l'effet d'un promoteur lors d'administration chronique à des animaux initiés, les expériences durant plus d'un an. Ainsi, on a désiré mettre en évidence des changements morphologiques et biochimiques se produisant à un stade précoce de la cancérogenèse colique.

C'est Bird, en 1987, qui a découvert une lésion de la muqueuse colique, le microadénome ou FCA (Foyer de Cryptes Aberrantes). Les FCA sont considérés comme des lésions préneoplasiques et permettent l'étude des interactions alimentation-cancer du côlon.

a) Cryptes aberrantes et Foyers de Cryptes Aberrantes (FCA)

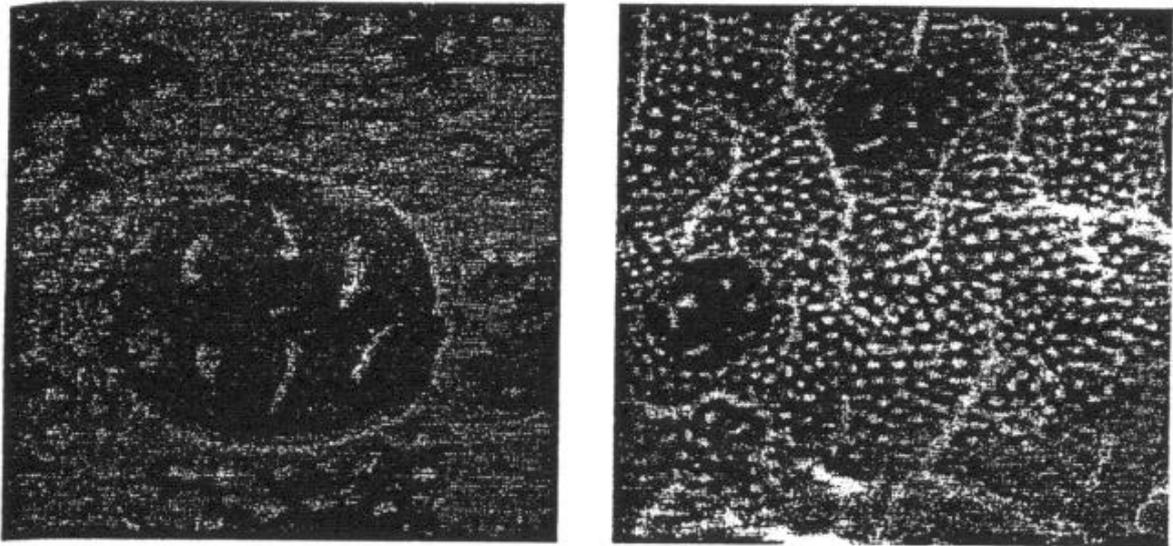
Quelques jours à quelques semaines après un traitement par un cancérogène connu, la muqueuse colique du rat présente à sa surface des cryptes anormales, dites aberrantes, que l'on peut facilement identifier au microscope optique (grossissement x40 et x100) après fixation des côlons dans le formol et coloration au bleu de méthylène. On distingue également des microadénomes, ou foyers de cryptes aberrantes (FCA), ils sont composés de plusieurs cryptes aberrantes (Bird, 1987).

- Description et caractéristiques des cryptes aberrantes et FCA (Bird et al., 1989)

Par rapport aux cryptes normales, les cryptes aberrantes apparaissent sous le microscope:

- plus grosses
- surélevées
- à "lumière" en forme de fente (ronde pour les normales)

- colorées plus intensément au bleu de méthylène
- à zone péri-cryptale augmentée



Photographies de microadénomes du colon

Les microadénomes ou FCA sont des foyers de cryptes aberrantes (ils sont constitués de plusieurs cryptes aberrantes, leur nombre pouvant aller jusqu'à jusqu'à 20). Les FCA ont été observés chez la souris et le rat, préférentiellement dans les portions distales du côlon des rongeurs, et également chez l'homme. Très rares chez les sujets sains, les FCA sont recensés en plus grand nombre chez les sujets cancéreux.

- Induction et promotion des cryptes aberrantes

En 1987, Bird fait l'hypothèse que ces FCA soient des lésions pré-néoplasiques. Elles sont spécifiquement induites de façon dose dépendante, par des cancérigènes coliques du type diméthylhydrazine (DMH) ou azoxyméthane (AOM) chez les rongeurs. Il semble bien que le nombre de FCA dépende de la dose de cancérigène administrée. Par contre, le nombre de cryptes par microadénome, c'est à dire la taille des microadénomes, semble refléter la vitesse de croissance et de duplication des cryptes aberrantes (McLellan et al., 1988).

Les FCA sont visibles 15 jours après initiation (injection unique) et sont ensuite inhibés ou promus par les mêmes facteurs alimentaires que les tumeurs du côlon (Bird, 1995).

b) FCA : des lésions pré néoplasiques ?

Les FCA sont nombreux et la lecture de côlons entiers de rats permet de les recenser en peu de temps. Plusieurs arguments étayent l'hypothèse que les FCA sont des précurseurs des cancers coliques (Bruce et al, 1993) :

- les FCA sont induits spécifiquement par des cancérogènes coliques chez la souris et chez le rat.

- les FCA sont promus ou inhibés par les mêmes composés qui induisent ou réduisent la promotion du cancer colique.

- des initiateurs et promoteurs méconnus auparavant ont pu être identifiés par l'induction et la promotion des FCA : caséine cuite, prolifération de la muqueuse par l'effet toxique des acides gras dans la lumière colique, 5-hydroxy-méthyl-2-furaldéhyde du caramel, effet prolifératif et promoteur du saccharose et non de l'amidon (Caderni et al., 1991).

- les mutations sur les gènes K-ras et la sur-expression du gène c-fos ont été observées à la fois dans les tumeurs du côlon du rat et les FCA.

- les FCA coliques identifiés *in vivo* grossissent et conduisent plus tard à un cancer du côlon. Les animaux à gros microadénomes développent également plus d'adénocarcinomes, donc de cancers.

- certains FCA et adénocarcinomes partagent une histologie dysplasique.

Le nombre et la taille des FCA augmentent, après initiation, sous l'effet de promoteurs du cancer du côlon comme par exemple un régime riche en lipides ou pauvre en fibres (Tang et al., 1996), et diminue sous l'effet d'inhibiteurs de la cancérogenèse colique (Wargovich et al., 1992).

Néanmoins, le nombre de FCA n'est pas totalement représentatif de l'effet promoteur d'un produit : en effet, certains composés reconnus promoteurs de la cancérogenèse colique (acide cholique, caséine cuite) réduisent le nombre des FCA tout en augmentant leur taille (Magnuson et al., 1993 ; Corpet et al., 1995). Ainsi, nous conviendrons que si le nombre des FCA par animal reflète bien l'effet initiateur du cancer du côlon, la mesure d'un effet promoteur doit tenir compte du nombre de cryptes par foyer (taille des FCA) (Zhang et al., 1992 ; Magnuson et al., 1993 ; Corpet et al., 1995).

Tous ces arguments semblent confirmer le rôle précurseur des FCA dans la cancérogenèse du côlon, mais il reste encore à connaître la validité de ce modèle chez

l'homme.

Néanmoins de nouveaux travaux remettent en cause les FCA en tant que lésions préneoplasiques. En 2000, Paulsen et al. ont observé les colons de souris min. Ces souris sont hétérozygotes pour la mutation du gène APC (polypose adénomateuse du côlon), et présentent de façon spontanée de multiples néoplasmes intestinaux (min), similaire à ceux rencontrés lors de polypose adénomateuse familiale chez l'homme (FAP) (Paulsen et al., 2000).

Ils n'ont pas observé de FCA « classiques » sur ces souris, mais un autre type de lésions, qu'ils ont appelé FCA (min). Ces FCA (min) ne sont :

- pas surélevés
- visibles qu'en utilisant un marquage au bleu de méthylène et à l'observation par transillumination
- pas identifiables au microscope électronique à balayage

En injectant 5mg/kg d'AOM à des souris min à l'âge de 1 et 2 semaines, puis en les sacrifiant pour étudier leur côlon (Paulsen et al., 2001), ils ont constaté l'induction de deux types de lésions : des FCA et des FCA (min). L'analyse histopathologique des FCA (min) monocryptotique et des adénomes a montré dans les deux cas les mêmes signes : dysplasie et surexpression cytoplasmique de la bêta-caténine (ce qui n'est pas le cas pour les FCA « classiques ») ; de plus la diminution des FCA (min) entre la 7^{ème} et la 11^{ème} semaine de vie est corrélée à une augmentation du nombre de microadénomes (le nombre d'FCA « classiques » est quant à lui resté constant, seule une légère augmentation de la multiplicité des cryptes a été constatée).

Il existe donc une relation quantitative et qualitative entre FCA (min) et adénome chez la souris.

Les expériences menées par Yamada (Yamada et al., 2000 et 2001) tendent à confirmer cette hypothèse. Ils ont étudié les mutations activatrices du gène codant pour la bêta-caténine et l'expression de celle-ci sur des côlons de rats ayant été traité à l'AOM. Ils ont remarqué que les mutations du gène étaient présentes dans 67 % des cryptes histologiquement altérées avec une apparence macroscopique normale (HACNs), qui semblent correspondre aux FCA(min), et seulement 20 % des FCA « classiques » (ou cryptes histologiquement altérées avec l'apparence d'ACF ou HACAs). De plus dans 86 % des HACNs ils ont retrouvé une accumulation de bêta-caténine, ce qui n'a pas été le cas dans les FCA « classiques » (ceci

10 semaines après l'injection d'AOM). Les cryptes accumulant la bêta-caténine présentent en plus des anomalies histologiques accrues au cours du temps contrairement aux FCA « classiques ».

Les HACNs, accumulant la bêta-caténine, qui sont des lésions indépendantes des FCA « classiques » semblent donc être les véritables lésions préneoplasiques du cancer du côlon.

c) FCA et muqueuse colique chez l'homme

Comme chez les rongeurs, des FCA ont été identifiés sur la muqueuse de côlons humains. Leur nombre et leur morphologie sont nettement associés au risque de cancer colique (Roncucci et al., 1991). On recense en effet beaucoup plus de FCAI/m² de muqueuse chez les patients atteints de cancer du côlon que chez les patients sains.

Il existe de nombreuses similitudes entre l'histologie, la biochimie (enzymes, protéines, mucines) et la génétique (mutations) des tumeurs induites chimiquement chez les rongeurs et celles des humains (Corpet et al., 1996).

Plusieurs études indiquent que les FCA évoluent en adénocarcinomes, via les polypes adénomateux et ce, à la fois chez les rongeurs et l'homme (Goldin, 1988). Bruce propose un schéma pathogénique qui montre l'évolution des cryptes normales vers le cancer colique.

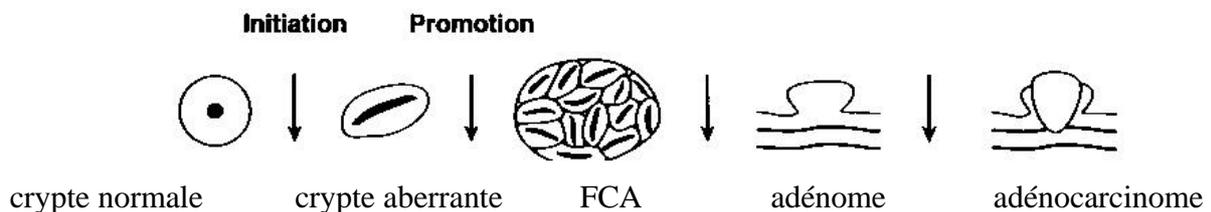


Schéma montrant l'évolution d'une crypte normale vers une tumeur (Bruce, 1993)

D'autre part le cancer du côlon est associé à de nombreuses mutations notamment sur les gènes K-ras, APC, DCC, MCC et p53. Or, le génome des cellules des FCA présente aussi certaines de ces mutations (Bruce et al., 1993) (Vivona et al., 1993). Inversement, les cryptes normales de mêmes patients ne présentent pas ces mutations (Pretlow et al., 1993).

Cependant leur étude doit être confirmée par des essais de cancérogenèse à long terme chez l'homme, puisqu'il persiste de nombreux doutes quant à la pathogénicité de certains composés sur la muqueuse colique. Stamp démontre en effet que des bolus de saccharose et de fructose augmentent la prolifération cellulaire colique sans causer de dégâts sur l'épithélium. Un mécanisme hormonal avait été alors envisagé (Stamp et al., 1993). Ces contradictions soulignent la difficulté d'étudier chez l'homme l'impact précis de régimes alimentaires complexes sur la cancérogenèse colique. La prudence est recommandée dans toute extrapolation à l'homme qui risquerait d'être abusive si l'on ne tient pas compte des multiples paramètres métaboliques, physiologiques et génétiques qui entrent en jeu.

Mais avant que ne soient validés des tests futurs de promotion *in vitro* plus précoces, capables de tester des aliments ou des régimes (micronoyaux, induction d'enzymes), le modèle à court terme des FCA reste encore le plus adapté au cancer du côlon (Bruce et al., 1993) et le plus rapide. Alors qu'il faut attendre des dizaines d'années afin de détecter des tumeurs chez l'homme, 40 à 100 jours suffisent chez le rat pour découvrir un cancer après initiation chimique. A l'aide des lésions pré-néoplasiques de Bird, on peut tester les initiateurs du cancer du côlon en 4 semaines (Corpet, 1993); et en 3 mois les promoteurs (Corpet et al., 1990).

3. RATS AXENIQUES ASSOCIES A UNE FLORE HUMAINE

Il est à noter que la plupart des rats utilisés dans des expérimentations sont des rats dit conventionnels, c'est à dire qu'ils ont leur propre microflore intestinale. Or de par sa spécificité et son importance, cette flore pourrait influencer sur le métabolisme des contenus intestinaux et par la même sur l'évolution des microadénomes de l'intestin que développent ces rats. En effet, il a par exemple été noté que l'ingestion continue de carraghénanes entraîne une colite ulcéraire chez les rongeurs mais pas chez les singes ou l'humain (Corpet, 1984). C'est pourquoi, pour permettre une meilleure interprétation de l'effet cancérogène de certaines molécules sur le cancer du côlon chez l'homme, il semble plus adapté d'utiliser pour l'expérimentation, des rats développant une microflore intestinale proche de celle que nous retrouverions chez l'homme. Ce sont des rats associés à une flore humaine (ou rats HFA, *Human Flora Associated*).

La première étape à l'obtention de tels animaux est d'avoir des animaux axéniques, c'est à dire des animaux qui n'hébergent aucun microorganisme, c'est le *germ free* des anglo-saxon. L'animal axénique est l'outil indispensable grâce auquel on peut dissocier animal hôte/flore microbienne, contrairement à l'animal holoxénique, aussi appelé animal conventionnel.

a) Obtention de rats axéniques

Pour obtenir de tels rats il faut une première souche parentale axénique. C'est seulement pendant la vie *in utéro* que les mammifères sont totalement dépourvus de bactéries, à l'exception de quelques cas pathologiques où des bactéries réussissent à franchir la barrière placentaire (ex/ *Brucella*). La méthode la plus utilisée pour l'obtention de rats axéniques est l'hystérectomie. L'utérus prélevé de façon stérile est décontaminé superficiellement par un passage dans un bain bactéricide, puis introduit dans une enceinte stérile où la délivrance des jeunes à lieu. Ces rats se reproduisent ensuite dans des conditions de stérilité parfaite, leur reproduction est rigoureusement normale. Leur progéniture est allaitée par une nourrice axénique, toujours dans des conditions parfaites de stérilité, et élevée en isolateur jusqu'à l'âge adulte (Ducluzeau et al, 1978).

b) Maintien des animaux axéniques

On utilise de nos jours uniquement des isolateurs en matière plastique souple, qui peuvent être de formes et de dimensions variées.

Les parois et l'intérieur de ces enceintes sont stérilisés par voie chimique, soit par le formol, soit le plus souvent par l'acide peracétique. Cet acide vaporisé en aérosol libère très facilement de l'oxygène, qui tue en moins de 20 minutes les spores les plus résistantes, et laisse comme résidu l'acide acétique, non toxique pour les animaux. Cette opération peut se faire à l'aide d'un appareil automatique (sterivap GL automatique).

La stérilisation des grands volumes d'air, nécessaire à la ventilation des isolateurs, se fait par passage sur des filtres de laine de verre ou de papier.

La plupart des techniques de stérilisation connues en maintien de stérilisation sont employées pour introduire dans l'isolateur les divers types d'objet et matériaux nécessaires : chaleur sèche (four Pasteur : 180°C pendant 1h30) pour la verrerie et le matériel métallique ; chaleur humide (120°C pendant 20 minutes avec balayage de vapeur) pour les aliments, le

linge ; irradiation (rayon gamma, 4Mrad) pour les aliments, les appareils fragiles ; oxyde d'éthylène pour les litières et les cages ; membranes filtrantes (porosité 0,22 à 0,45 microns) pour les solutions fragiles.

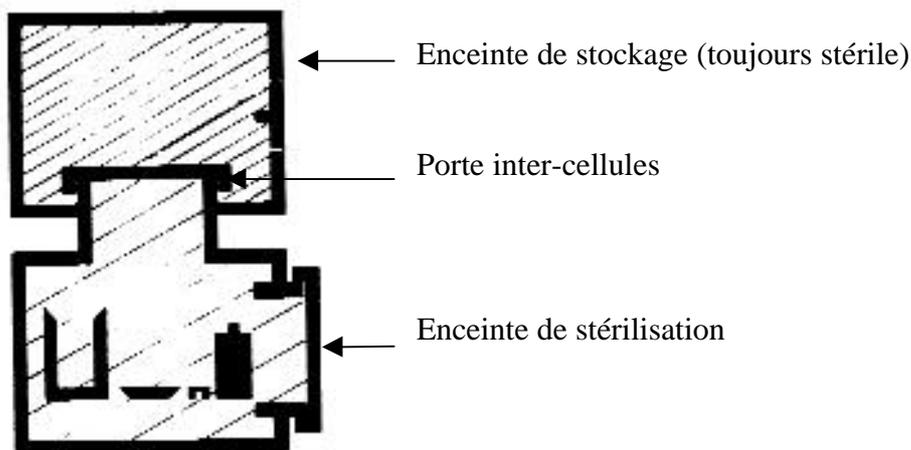
Le transfert des matériaux, ainsi stérilisés, dans l'isolateur, se fait essentiellement à l'aide du système de connections à double porte pour transfert étanche (système DPTE de la firme CELSTER-ISOTECHNIE), et d'une installation auxiliaire dénommée la « banque stérile ».

- La banque stérile

Elle se compose de deux isolateurs ventilés, superposés, et reliés entre eux par un passage cylindrique qu'obture une porte inter-cellules.

- Le premier isolateur sert d'enceinte de stérilisation. On y introduit tout le matériel nécessaire dans les isolateurs d'élevage ou d'expérience, les aliments dans des boites métalliques stériles ou emballés en sachets plastiques après stérilisation par irradiation, ainsi que les conteneurs de transfert, portes ouvertes, pour que leur volume intérieur soit également stérile.

- Le deuxième isolateur sert d'enceinte de stockage, il est maintenu en permanence sous atmosphère stérile.



Une fois la stérilisation automatique effectuée dans le premier isolateur, les conteneurs de transfert sont refermés par leur porte. La porte inter-cellules est ouverte, les deux

atmosphères étant stériles, les matériels et aliments sont alors transférés dans l'isolateur de stockage. Celui-ci sera réapprovisionné de façon discontinue et disponible à tout moment. La porte inter-cellules est refermée, et on peut ainsi échanger les conteneurs de transfert, précédemment fermés par des portes étanches, de l'isolateur de stockage vers les différents isolateurs contenant les animaux axéniques, par le système DTPE, sans contamination de leur environnement.

- Le système DPTE

Les isolateurs possèdent sur le côté une porte étanche où peuvent venir se connecter les conteneurs avec un système DPTE par lesquels seront transférés les matériels nécessaires. Lors de la connection du conteneur à l'isolateur, on verrouille les deux portes l'une à l'autre de façon étanche par une simple rotation de 60°. Ce verrouillage des deux portes permet de constituer une double porte, dont les deux faces restant visibles sont stériles (les deux faces externes de chaque porte étant isolées du reste par ce verrouillage). Cette double porte peut être ouverte instantanément par l'opérateur depuis l'intérieur de l'isolateur. Cette opération est effectuée pour remplir ou vider les conteneurs de leur matériel dans les isolateurs, ainsi que pour récupérer le matériel souillé de ces isolateurs, et permet d'apporter tout ce qui est nécessaire aux animaux pour vivre, sans contaminer le milieu dans lequel ils sont maintenus.

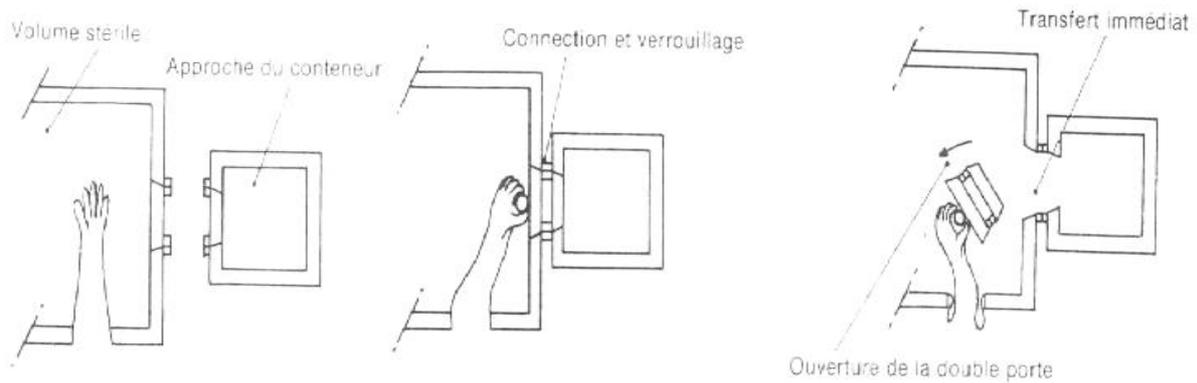


Schéma B. Saint-Martin, Compagnie CELSTER.

c) Rats à flore fécale humaine

Pour obtenir des rats à flore fécale humaine (rats HFA) il suffit de faire ingérer par gavage à des rats axéniques une bouillie obtenue à partir de selles humaines. La composition et l'activité enzymatique des souris axéniques, auxquelles on inocule une suspension de flore fécale humaine, sont similaire à la flore humaine d'origine (Ducluzeau et al., 1978).

Une expérience sur des souris axéniques contaminées par une suspension de fécès humain (ici 4 sujets), dont on a analysé les fécès pendant 5 semaines, ne montre pas de différence significative entre la flore digestive de l'individu au départ, et la flore que développe les souris (selon un test de Fischer), pour ce qui concerne la flore anaérobie. La flore aérobie étant faible, moins de 1% n'a pas été comparée (Hazenberget al., 1981). Aussi les rats HFA sont souvent utilisés comme un modèle *in vivo*, pour étudier l'écologie et le métabolisme de la flore intestinale humaine dont elle est très proche. Ils représentent un très bon modèle du tube digestif de l'homme.

d) Intérêts du modèle animal

La seule façon de prouver qu'un aliment agit sur la genèse d'un cancer, c'est de comparer des groupes absolument identiques, sauf en ce qui concerne l'ingestion de l'aliment ou de la molécule étudiée. Il est possible de pratiquer de telles expérimentations sur des groupes d'individus volontaires, mais cela est très coûteux, très long, et il est difficile d'avoir des groupes très proches dont on ne modifie que quelques éléments dans leur alimentation. De plus, de telles expérimentations ne seraient éthiques que si l'on testait un aliment supposé protecteur. Mais en aucun cas on ne peut tester un facteur de risque, ce serait immoral. D'où la nécessité de tester un facteur de risque sur des animaux.

D'autre part, comme on l'a vu chez le rat on peut détecter un cancer mammaire ou colique en 40 à 100 jours après initiation, alors qu'il faut des dizaines d'années chez l'homme.

On peut aussi réaliser chez ces animaux des prélèvements multiples ou des abattages séquentiels permettant de mesurer simultanément de nombreux marqueurs.

Enfin, on peut modifier profondément leur alimentation, puisqu'ils n'ont d'autre possibilité que de consommer ce qu'on leur délivre, et donc on peut étudier l'effet d'un aliment en particulier.

C'est pourquoi les rats HFA qui ont un milieu intestinal proche de celui de l'homme, semblent être un bon modèle pour étudier l'effet des substances métabolisées par la flore sur la cancérogenèse colique.

DEUXIEME PARTIE : LES CARRAGHENANES

1. GENERALITES

a) Historique

Dans un comté du sud de l'Irlande, appelé Carrageen, les habitants avaient pour habitude d'utiliser une *mousse d'Irlande*, algue qu'ils trouvaient sur les rochers des côtes, pour faire des pommades et des flancs. Vers 1700, au cours de la colonisation de l'Amérique du Nord, les Irlandais constatèrent que leur *mousse d'Irlande* poussait également sur les côtes du Massachusetts. Ils se sont par la suite rendus compte que cette algue appartenait à la famille des Rhodophycées (ou algues rouges), et était appelée *Chondrus crispus*.

On rencontre cette algue rouge sur toutes les côtes de l'Atlantique Nord surtout dans les provinces maritimes du Canada, le Maine, la Bretagne et la péninsule Ibérique. En Bretagne, le *Chondrus crispus* était appelé " pioka ", sa cueillette se pratique encore les jours de grandes marées.

L'intérêt économique et l'abondance de l'algue a éveillé l'intérêt des industriels. Ainsi en 1871, le polysaccharide pur, à l'origine des vertus de la " mousse d'Irlande ", est extrait aux Etats-Unis. Il est logiquement appelé carraghénane en référence à son comté d'origine. Après la Seconde Guerre Mondiale, l'expansion de l'industrie alimentaire a engendré une utilisation accrue des carraghénanes en tant que stabilisateurs, épaississants et gélifiants. L'importance de la demande a amené la création de fermes aquacoles destinées à la culture du *Chondrus crispus*. Celles-ci apportent de nombreux avantages : absence de fluctuations climatiques, facilité de récolte, matières premières plus pures, et la possibilité de sélectionner les algues les plus productives en carraghénanes (<http://carraghenanes.chez.tiscali.fr/>).

b) Fabrication

La plupart des données suivantes sur les carraghénanes sont extraites de l'ouvrage sciences des aliments (Martin, 1984).

b.1) Matières premières

Les carraghénanes peuvent être extraits des familles suivantes :

- Furcellariacées : *Furcellaria*
- Gigartinacées : *Chondrus, Gigartina, Iridaea*
- Hypnéacées : *Hypnéa*
- Phylloporacées : *Phyllophora, Gymnogongrus, Ahnfeltia*
- Solériacées : *Eucheuma, Anatheca, Meristotheca*.

Les espèces les plus utilisées industriellement appartiennent aux familles des Solériacées et des Gigartinacées.

Dans les Solériacées, deux espèces sont particulièrement employées :

- Eucheuma cottonii* contenant majoritairement du Kappa carraghénane, avec très peu de Iota carraghénanes et de précurseurs
- Eucheuma spinosum* contenant majoritairement de l'Iota carraghénanes, avec très peu de Kappa carraghénanes et de précurseurs.

Dans les Gigartinacées, de nombreux genres sont utilisés, et la répartition des différentes fractions est extrêmement variable.

b.2) Extraction

En 1871, le polysaccharide pur est extrait pour la première fois. Le processus d'extraction se déroule en plusieurs étapes :

La récolte s'effectue à la main, sur les côtes, les jours de grandes marées ou par bateaux à l'aide de râtaux. Les algues sont ensuite séchées afin d'obtenir un taux d'humidité inférieur à 20%, afin de préserver la qualité de l'algue et de faciliter son transport jusqu'à l'usine.

Ensuite les algues sont dispersées dans de l'eau contenant une base alcaline ou alcalinoterreuse. L'ensemble subit alors un chauffage et un broyage suffisamment fin pour extraire le maximum de collœ des.

En dehors de la sélection du type d'algues le mieux adapté, on procède en général de la façon suivante :

-**Pour les épaississants** : cuisson à température modérée en présence d'une assez faible quantité de base

-**Pour les gélifiants** : cuisson à température plus élevée en présence d'une plus grande quantité de base de façon à favoriser la transformation des précurseurs Mu et Nu en fractions gélifiantes Kappa et Iota.

b.3) Séparation des carraghénanes du reste

Lors de l'extraction alcaline, tous les constituants cellulosiques, les hémicelluloses et la majeure partie des protéines restent à l'état d'insolubles et sont éliminés. Industriellement, cette purification est le plus souvent réalisée par filtration.

Par contre il reste encore avec les carraghénanes, tous les sels minéraux solubles et quelques constituants organiques mineurs, comme certains pigments. Aussi faut-il procéder à une séparation des carraghénanes de l'extrait aqueux. Pour ce faire il existe trois méthodes :

- *Le séchage sur tambour* qui donne le carraghénane le moins pur, elle n'est pas utilisée en Europe.

- *La récupération par congélation* réservée aux espèces d'algues riches en fraction gélifiante du type Kappa.

- *La précipitation par alcool*, les polysaccharides utilisés dans l'alimentation sont extraits par une précipitation sélective avec l'isopropanol. Le produit obtenu est alors plus pur et plus concentré. Dans certains cas, la précipitation à l'alcool ne permet pas d'obtenir des fibres facilement essorables, et il est nécessaire alors de recourir à l'addition de sels minéraux, généralement du chlorure de potassium (KCl) pour des raisons économiques, afin d'améliorer la déshydratation des fibres.

b.4) Obtention de produits commerciaux

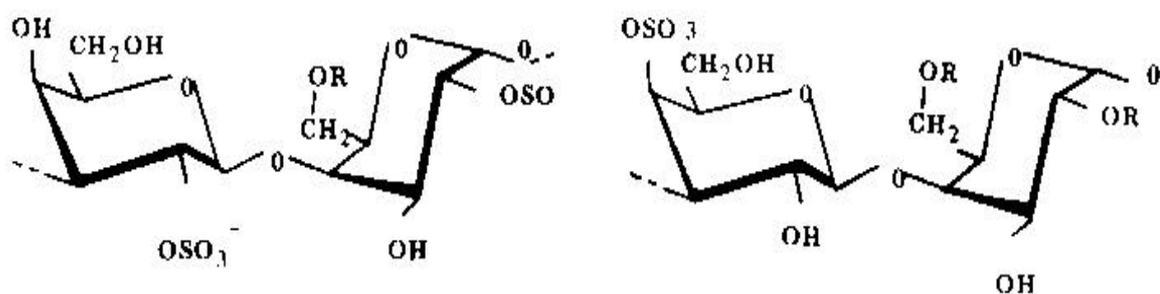
Le carraghénane une fois séparé est séché jusqu'à ce que l'extrait sec obtenu représente une fraction supérieure à 90%, puis il est broyé à la finesse désirée, en général inférieure à 200 ou 300 microns de diamètre. Mais il est nécessaire que les produits commerciaux aient des caractéristiques constantes, de façon à ce que l'utilisateur obtienne toujours le même effet texturant avec la même quantité de produit. Aussi procède-t-on à des mélanges, de sorte à respecter un certain nombre de spécifications selon le domaine d'application : eau ou lait. Les tests les plus courants portent sur la viscosité, la force de gel, la température de gélification, la synérèse, la stabilité en fonction du pH, etc...

c) Structure

Les carraghénanes sont des polysaccharides linéaires constitués de polygalactanes sulfatés alternativement liés en α 1-3 et β 1-4.

Il existe différents types de carraghénanes idéaux désignés par les lettres grecques Lambda, Ksi, Kappa, Iota, Mu, et Nu.

Mu et Nu sont les précurseurs biologiques respectifs des fractions Kappa et Iota.

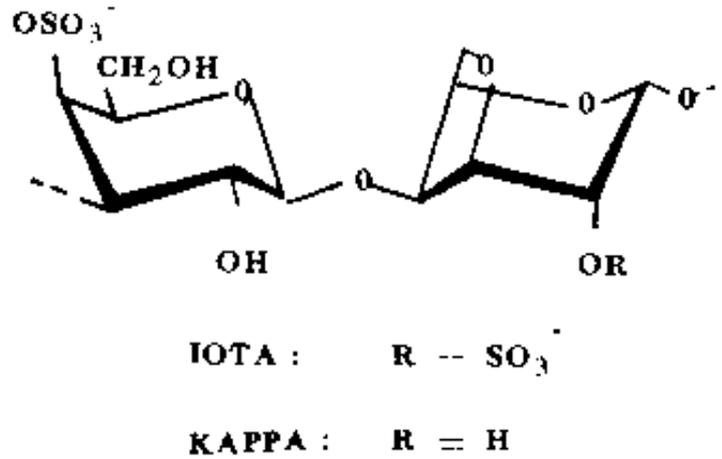


LAMBDA : R = SO₃⁻

KSI : R = H

FRACTION NU : R = SO₃⁻

FRACTION MU : R = H



Il n'existe pas en réalité de polymères répondant à ces formules idéales étant donné qu'il y a toujours dans une macromolécule d'un type certains dimères d'un autre type. Aussi est-il à la fois plus simple et plus réaliste de définir les carraghénanes comme des copolymères constitués de motifs galactose, plus ou moins sulfatés en différentes positions, et de motifs 3,6 anhydrogalactose eux-mêmes sulfatés ou non, alternativement liés en α 1-3 et β 1-4. Les esters sulfates sont salifiés par divers cations alcalins ou alcalino-terreux, qui sont principalement le sodium, le potassium, le calcium, et le magnésium (Martin, 1984).

L'identification de la structure chimique des carraghénanes est réalisée suivant des méthodes classiques : oxydation périodique, méthylation, hydrolyse partielle ou totale.

La structure conformationnelle est déterminée par différentes méthodes : la diffraction des rayons X, la RMN, la spectrométrie de masse, et la spectrophotométrie infrarouge.

Il est maintenant possible de séparer les différentes formes structurales par électrophorèse (Stanley et al., 1974) ou perméation sur gel (Ekström et al., 1983).

Dernièrement la microscopie électronique fut utilisée pour étudier les polysaccharides non cristallisés en solution. Les images fournies représentent une alternative intéressante aux méthodes physiques déjà employées. Cette technique a pour intérêt de fournir des renseignements sur la conformation des molécules, et sur les états transitionnels de la gélification (Stokke et al., 1994).

En ce qui concerne la terminologie, il convient de faire une distinction entre les carraghénanes à usage alimentaire, utilisés comme agents de texture, et les carraghénanes dégradés, employés exclusivement en pharmacie comme principe actif. Ces derniers sont

intentionnellement dépolymérisés, pour leur faire perdre tout caractère texturant, qui serait une gêne à leur administration orale. Aussi ne sont-ils jamais utilisés dans le domaine alimentaire du fait même de leur absence de tout intérêt technologique.

2. PROPRIETES DES CARRAGHÉNANES

a) Solubilité

Les carraghénanes sont solubles dans l'eau, mais la température de solubilisation dépend du type de copolymère et des cations associés à l'ester sulfate. Plus il y a de groupements sulfate, plus la molécule est soluble. Donc la présence du pont 3,6 anhydrogalactose résultant de la désulfation du carbone 6 du copolymère diminue la solubilité.

- Le **Lambda carraghénane** est le plus hydrophile car il ne possède pas de pont 3,6 anhydrogalactose, et sa solubilisation se fera à température ambiante quel que soit le cation associé aux sulfates.
- Le **Kappa carraghénane** est moins hydrophile, sa solubilisation totale ne pourra être assurée que par élévation de la température. Cette température de solubilisation dépendra en outre du cation associé, la forme sodique étant plus facilement soluble que la forme potassique.
- Le **Iota carraghénane** a un comportement intermédiaire.

Cependant, tous les carraghénanes sont insolubles dans les solvants organiques apolaires et dans la plupart des solvants organiques polaires.

b) Comportement rhéologique : épaissement, gélification

La linéarité des macromolécules de carraghénane leur confère un important pouvoir viscosifiant, du fait de leur grand rayon de giration, comparativement à celui d'une autre macromolécule du même poids moléculaire qui serait ramifiée. Les carraghénanes ont donc tous des propriétés épaissement, dès lors que les macromolécules ont acquis une certaine indépendance les unes vis-à-vis des autres, c'est à dire au-delà de la température nécessaire à

leur solubilisation : à froid pour la fraction Lambda et à chaud pour les fractions Kappa et Iota.

Par refroidissement à la température ambiante de leur solution chaude, les diverses fractions de carraghénanes évoluent différemment selon que les chaînes de polysaccharides auront, ou non, tendance à s'associer entre elles :

- Dans le Lambda carraghénane très hydrophile, dont les chaînes peuvent s'écarter facilement les unes des autres dès la température ambiante, les macromolécules n'auront évidemment aucune tendance à se réassocier pour donner des gels : il a seulement un rôle épaississant.
- Pour les fractions Kappa et Iota, qui nécessitent un chauffage pour leur complète solubilisation, les macromolécules auront au contraire tendance à spontanément se rapprocher lors du refroidissement, en créant des zones de jonction plus ou moins intenses caractérisant l'état gélifié.

Selon REEVES et WELSH (1977), ces zones de jonctions caractérisant l'état gélifié sont dues à l'arrangement en double hélice des macromolécules de carraghénanes, lorsque la structure conformationnelle des cycles pyranosiques est alternativement C1-1C, selon la terminologie de Reeves. C'est le cas pour les fractions Kappa et Iota, alors qu'au contraire les fractions Lambda, Mu et Nu en conformation répétitive C1-C1 ne pourront pas former de telles zones de jonction.

En résumé les fractions Lambda, Mu et Nu sont solubles à froid, épaississantes et stabilisantes, alors que les fractions Kappa et Iota sont solubles à chaud et gélifiantes.

c) Effets des électrolytes

Le pouvoir gélifiant des carraghénanes est grandement influencé par la présence d'électrolytes, qui sont nécessaire pour permettre cette gélification. Les sels de potassium (K^+) sont les plus réactifs et de ce fait les plus utilisés. La densité du gel de Kappa carraghénanes augmente en fonction des concentrations de K^+ . Ainsi, plus la concentration en K^+ est élevée plus le gel est dense. Les ions K^+ augmentent également les températures de fusion et de formation du gel. Les ions calcium (Ca^{++}) ont également une influence sur le

pouvoir gélifiant des carraghénanes, mais leur effet est plus marqué pour la fraction Iota avec laquelle ils forment un gel très élastique et cohérent.

d) Réactions avec les protéines

Les carraghénanes, au caractère anionique très prononcé du fait de la présence des groupements esters sulfates, réagissent avec les polyélectrolytes cationiques, et les flocculent. De la même façon, ils précipitent les protéines lorsque le pH est inférieur à leur point isoélectrique. A des pH supérieurs à leur point isoélectrique, les protéines sont compatibles avec les carraghénanes et des réactions peuvent être obtenues. A cet égard, la propriété la plus remarquable des carraghénanes, est leur aptitude à stabiliser les micelles de caséine désignée sous le nom de caséine Kappa (Snoeren, 1976). Mais il s'y superpose également l'action des ions, en particulier Ca^{++} et K^+ du liquide intermicellaire, dont la présence est indispensable à la gélification.

Les gels à l'eau comme les gels au lait sont tous thermoréversibles.

e) Synergie

Certains hydrocollôïdes, notamment les galactomannanes constitués de chaînes linéaires de mannose, sur lesquels sont branchés irrégulièrement des motifs galactose, comme la gomme de caroube, ont la particularité d'augmenter la cohésion des gels de carraghénanes. Les parties linéaires du galactomannane, dépourvues de ramifications, peuvent se rapprocher des doubles hélices et former un réseau qui évite la formation ultérieure d'agrégats. Le gel qui en résulte est moins cassant, plus élastique, approchant ainsi la texture de la gélatine et présente surtout moins de synérèse que celui du Kappa carraghénane seul.

3. REGLEMENTATION ET APPLICATIONS

a) Dispositions générales

Les carraghénanes sont considérés, dans le domaine alimentaire, comme des additifs. Les additifs alimentaires sont des substances ou des mélanges de substances possédant des propriétés particulières, que l'on ajoute aux aliments à des stades différents de leur

élaboration afin d'en améliorer la qualité, la protection, la présentation (couleur), et la conservation. C'est à ce titre qu'ils sont soumis aux prescriptions concernant l'emploi des produits d'addition et énoncées dans le décret du 12 février 1973, modifiant le décret du 15 avril 1912. Ils sont donc soumis au principe des listes positives, c'est à dire que tout produit qui n'est pas expressément autorisé est interdit.

Les carraghénanes n'ont vraiment acquis le statut d'additifs qu'en 1974, lors de la notification de la directive communautaire établissant la liste des agents émulsifiants, épaississants, stabilisants, et gélifiants pouvant être employés dans les denrées alimentaires. Les carraghénanes ont alors été affectés du numéro d'identification conventionnelle E 407.

De nombreuses autorisations ont été délivrées pour l'emploi de cet additif, soit par voie de décrets ou d'arrêtés, soit par des textes administratifs.

Les carraghénanes peuvent être additionnés de sels retardateurs de gélification (tartrates, citrates, phosphates) conformément à l'arrêté du 15 septembre 1964 (Journal Officiel du 3 octobre 1964) et à la circulaire du 6 mai 1965, complétée par les circulaires du 3 août 1965 et du 21 janvier 1966.

b) Critères de pureté

Les normes de pureté ainsi que les spécifications des carraghénanes sont fixées par un arrêté du 25 janvier 1982 (Journal Officiel du 23 février 1982). Conformément à cet arrêté, les carraghénanes doivent répondre à des normes spécifiques (annexe 2).

c) Etiquetage

L'arrêté du 25 janvier 1982 prévoit des mentions d'étiquetage obligatoires pour les emballages renfermant des carraghénanes présentés seuls ou en mélange avec des supports ou d'autres additifs.

Par ailleurs, leur présence dans les aliments préemballés doit être signalée dans la composition, par le nom de la catégorie à laquelle ils appartiennent - gélifiant ou épaississant -

suivi, soit de leur numéro conventionnel prescrit par la CEE - E 407 -, soit de leur dénomination - carraghénanes -.

d) Applications

Les applications des carraghénanes sont extrêmement nombreuses. Dans le domaine alimentaire, ils sont toujours utilisés dans un but technologique à l'exclusion de tout but nutritionnel, du fait qu'ils ne sont pas absorbés par le tractus gastro-intestinal de l'homme. Le but technologique visé est uniquement celui de modifier le comportement rhéologique des denrées alimentaires dans lesquelles ils sont incorporés. Ce rôle modificateur de texture peut aller de l'épaississement à la gélification, en passant par tous les stades intermédiaires de texture semi-gélifiée et de gels thixotropes (cf. annexe 3).

Les carraghénanes peuvent être utilisés autrement qu'en tant qu'additifs alimentaires, ils ne sont alors pas utilisés pour leurs propriétés rhéologiques :

- En brasserie, ils sont employés comme flocculants pour faciliter l'élimination du trouble protéotannique du goût, ce sont alors des auxiliaires technologiques
- En pharmacie, leurs propriétés anti-peptiques sont mises à profit pour le traitement des ulcères gastro-duodénaux, on les considère alors comme principe actif d'une préparation médicamenteuse.

4. CARRAGHENANES ET CANCER COLIQUE

Différentes études sur la potentialité cancérigène des carraghénanes ont été menées.

a) Etudes de cocancérogénèse

Les premières, Watanabe et al (1978), ont étudié l'effet cocancérogène de carraghénanes natifs (Viscarin 402) sur des rats. Pour cela ils utilisèrent des rats femelles F344 âgés de 5 semaines, divisés en 6 groupes. Tous les groupes reçurent une alimentation à volonté contenant 0 ou 15 % de poudre sèche de carraghénanes. Tous les groupes à l'exception des deux groupes témoins reçurent, à partir de l'âge de 7 semaines, soit une injection par semaine d'azoxyméthane (AOM) de 8mg/kg en sous-cutanée pendant 10

semaines, soit une injection intra rectale de 2mg/rat de méthylnitrosourée (MNU) deux fois par semaine pendant 10 semaines. Les animaux recevant du MNU furent abattus à l'âge de 30 semaines quant aux animaux recevant de l'AOM ils furent abattus à l'âge de 40 semaines.

Les résultats furent les suivants :

Régime	Nombre de rats	Incidence des tumeurs sur le colon		Tumeurs/rats
		nombre de rats	Pourcentage	
Standard	15	0	0	0
CARR	15	1	7	1
Standard+AOM	30	17	57	1,5
CARR+AOM	26	26	100	11,3
Standard+MNU	29	20	69	1,5
CARR+MNU	29	29	100	4,4

Ces résultats nous montrent que pour des rats dont les tumeurs ont été initiées à l'AOM ou au MNU, l'incidence de ces tumeurs, ainsi que leur nombre par rats, sont très nettement augmentés ($p < 0.01$) pour les rats dont le régime alimentaire a été supplémenté en carraghénanes. De plus la taille des tumeurs du côlon est dans 84 % des cas inférieure à 4 mm pour les rats ayant reçus un régime standard et de l'AOM alors qu'elle est supérieure à 4 mm pour 52 % des rats ayant reçus de l'AOM et un régime alimentaire à 15 % de carraghénanes.

L'association de l'injection pendant plusieurs semaines d'un cancérogène associée à l'administration de carraghénanes par voie orale à très forte dose (1.4g/j/rat) favorise donc le développement de tumeurs coliques.

Arakawa et al. (1986) se sont également intéressés aux effets cocancérogène des carraghénanes, l'expérience de Watanabe et al. montrent en effet que les carraghénanes auraient un effet promoteur, mais le régime alimentaire contenait 20 % de matière grasse. Or un régime riche en matière grasse favoriserait également le développement de tumeurs du côlon (Reddy et al., 1976). C'est pourquoi Arakawa utilise un régime alimentaire à 6 % de matières grasses. Pour cela il utilise des rats mâles F344 âgés de 7 semaines divisés en 4 groupes. Chaque groupe est alimenté à volonté par une alimentation bien définie à 6 % de matières grasses. Le lot témoin ne reçoit que cette alimentation, un deuxième lot reçoit en plus des carraghénanes (de type Kappa, 6%) dans son alimentation. Les deux autres lots reçoivent des injections sous cutanée de 1,2-diméthylhydrazine (DMH) à 20 mg/kg de poids vif pendant 16 semaines, l'un recevant la même alimentation que le lot témoin, l'autre l'alimentation

complémenté en carraghénanes. Tous les lots sont nourris pendant 24 semaines. On estime que les rats dont l'alimentation a été complétement en carraghénanes ont consommé chacun 0,8g de carraghénanes par jour.

Il en résulte que le nombre de tumeurs est augmenté chez les rats ayant reçu du DMH et supplémentés en carraghénanes, par rapport aux rats ayant uniquement reçu du DMH.

Aucun lot ne présente d'ulcération visible.

	Nombre de rats	% de rats présentant des tumeurs	Nombre de tumeurs par rats
Témoin	15	0	0
Carraghénanes	15	0	0
DMH	20	40 (8 rats)	0,55±0,18
DMH+carraghénanes	20	75 (15 rats)	1±0,16

Les carraghénanes semblent bien être des cocancérogènes coliques.

b) Etudes de cancérogenèse

Rustia et al (1980) ont étudié l'effet de carraghénanes natifs, essentiellement Kappa, d'un PM d'environ 800 000 Da chez des rats et des hamsters dorés. Des groupes de rats et de hamsters âgés de 7 semaines, ont reçu durant leur vie des carraghénanes natifs à 0,5 ; 2,5 ou 5 % dans la ration. Bien qu'un léiomyome soit apparu sur le côlon d'un des rats recevant des carraghénanes à 2,5 %, aucune différence significative de l'incidence des tumeurs n'a été notée entre les animaux témoins et ceux ayant reçus des carraghénanes sur ces deux espèces.

Macha Préclaire (thèse vétérinaire, 1996) étudie à la fois l'effet initiateur et l'effet promoteur des carraghénanes sur des rats conventionnels.

Tous les groupes reçoivent ad libitum une alimentation de pellets pour rongeurs faible en matières grasses (5%).

Pour la phase d'initiation 24 rats femelles F344 âgés de 3 semaines sont utilisés.

- 9 d'entre eux ne reçoivent que de l'eau (témoin négatif : TEM)
- 9 reçoivent un gel contenant 10% de carraghénanes (type I sigma, carraghénanes kappa majoritaire, non dégradés)(groupe CAR) de J4 à J8 et de J11 à J15 en remplacement de l'eau.

- 6 derniers rats reçoivent une injection intra-péritonéale d'AOM de 5mg/kg (témoin positif : AOM) à J7, et de l'eau.

Tous les rats sont sacrifiés à J47.

Pour le groupe AOM le nombre moyen de microadénomes est de 6,4 par rats pour une taille moyenne de 2,43 cryptes par microadénomes. Par contre aucun microadénome n'est trouvé sur le groupe TEM, ni sur le groupe CAR.

Les carraghénanes ne semblent donc pas être des initiateurs du cancer du côlon.

Pour la phase de promotion se sont 30 rats femelles F344 âgés de 5 à 6 semaines qui sont utilisés. Tous ces animaux reçoivent au bout d'une semaine une injection intra-péritonéale d'AOM (20 mg/kg) pour initier l'expérience de promotion. Ils sont séparés en 3 groupes de 10 rats qui reçoivent chacun pendant 100 jours un abreuvement différent :

- Un groupe témoin ne reçoit que de l'eau (TEM)
- Un groupe reçoit de l'eau contenant 0,25% de carraghénanes par des biberons (LIQ)
- Un groupe reçoit de l'eau contenant 2,5% de carraghénanes sous forme de cubes gélifiés (CAR). Afin d'éviter une perte de poids trop importante (les rats ayant plus de difficultés à s'abreuver correctement du fait que l'eau leur soit apportée uniquement sous forme d'un gel solide), ce dernier groupe reçoit des biberons d'eau avec 0,25% de carraghénanes les week-end, à la place des cubes à 2,5% de carraghénanes.

Ils sont tous sacrifiés à l'issue des 100 jours d'expérimentation.

Les résultats sont les suivants :

Groupe	Nombre de rats	Moyenne du nombre de microadénomes/rats	Moyenne de la taille des microadénomes/rats
TEM	10	80 ± 29,2	2,98 ± 0,29
LIQ	10	60,8 ± 23,2	3,00 ± 0,38
CAR	10	54,5 ± 17,6	3,44 ± 0,48

Si on trouve une diminution significative du nombre de microadénomes pour les côlons des rats des lots CAR et LIQ par rapport à ceux du lot TEM (test de Dunnet $p < 0.01$), d'un autre côté on a aussi une augmentation significative de la taille des microadénomes sur les côlons des rats du lot CAR par rapport à ceux du lot TEM (test de Dunnet $p < 0.05$).

Samuel Cohen, qui ne prend en compte que le nombre de microadénomes considère que cette expérience montrerait plutôt un effet protecteur des carraghénanes (Cohen, 2002, manuscrit soumis pour publication).

Cependant comme nous l'avons vu précédemment l'effet promoteur doit prendre en compte la taille des microadénomes et non leur nombre (Bird, 1993 ; Caderni et al, 1995). Il apparaît donc, qu'à forte dose, c'est à dire dans cette expérience 2,9g/kg/jour (0,65g/jour/rat, lot CAR) qui reste une dose plus faible que pour celles de Watanabe ou d'Arakawa, les carraghénanes seraient promoteur du cancer du côlon chez les rats, du fait de l'augmentation constatée de la taille des microadénomes. Cependant ils ne semblent pas l'être à une dose plus faible de 0,22g/kg/jour (0,04g/jour/rat, lot LIQ).

TROISIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE

Initiation et promotion de microadénomes par les carraghénanes chez des rats axéniques associés à une microflore humaine.

Comme nous l'avons vu les carraghénanes pourraient être promoteur du cancer du côlon (Watanabe et al., 1978 ; Arakawa et al., 1986 ; Préclaire, 1996). Nous avons également vu que suivant l'espèce animale sur laquelle ils sont étudiés, les effets des carraghénanes sur le tube digestif sont différents. En effet si l'ingestion continue de carraghénanes entraîne une colite ulcéreuse chez les rongeurs, ce n'est pas le cas chez les singes ou les humains (Corpet, 1984). De même l'ingestion de carraghénanes n'entraîne pas de colite ulcéreuse chez des cobayes axéniques ou ayant reçus un traitement antibiotique particulier (Onderdonk, 1979).

Aussi et afin d'avoir un modèle le plus proche possible des caractéristiques du tube digestif humain, nous avons étudié l'effet des carraghénanes sur l'initiation et la promotion du cancer du côlon sur des rats axéniques auxquels nous avons implanté une flore humaine. Ces rats maintenant la flore intestinale dans les mêmes proportions que chez les donneurs (Corpet, 1993).

1. MATERIELS ET METHODES

a) Animaux

Pour l'expérience nous avons utilisé des rats axéniques Fischer 344 fournis par le CSAL (CNRS d'Orléans) transportés par camion dans des isolateurs stériles à l'animalerie du laboratoire des xénobiotiques, INRA, de Saint Martin du Touch. Là, ils ont été repartis aléatoirement dans des cages en inox, elles-mêmes reparties dans 4 isolateurs, un réservé à l'expérience d'initiation, et les 3 autres à l'expérience de promotion.

La stérilité des rats a été contrôlée à leur réception. Un repos de 24 heures a été respecté afin de permettre aux animaux de s'adapter à leur nouvel environnement.

b) Matériels

Les cages contenant les rats sont en polycarbonate, elles possèdent un couvercle en acier inox.

La litière est en sciure de bois dépoussiérée irradiée.

Les cages sont placées dans des isolateurs de plastique souple, munis d'une porte rapide DPTE (Double Porte pour le Transfert Etanche). Ce « haut de banque » est stérilisé par pulvérisation d'acide peracétique, avant introduction des animaux.

L'animalerie est éclairée 12 heures par jour, sa température et son hygrométrie sont contrôlées.

c) Alimentation

L'alimentation est constituée de pellets rats (RO3 UAR, Villemoisson sac de 1,6 kg) stérilisés par irradiation à 4 Mrad avant d'être donnés ad libitum.

L'eau est conditionnée en flacon de 2 litres.

Les carraghénanes à 0,25% ont été préparés en mélangeant 5 grammes de carraghénanes type I Kappa majoritaire (Sigma C1013) non dégradés dans 2 litres d'eau. Ils ont été conditionnés en flacons de 2 litres, un flacon permettant d'abreuver les rats pendant 12 jours.

Les carraghénanes à 2,5% ont été obtenus en mélangeant 62,5 grammes de carraghénanes dans 2,5 litres d'eau. Cette dose est répartie en 5 pots en propylène de 500 ml, un pot permettant d'abreuver les rats pendant 2 jours.

Les carraghénanes à 10% sont quant à eux obtenu en mélangeant 250 grammes de carraghénanes dans 2,5 litres d'eau, également répartie en 5 pots de 500 ml.

L'eau et les différents mélanges de carraghénanes sont stérilisés par autoclave à 120 °C pendant 25 minutes.

d) Traitements

d.1) Transfert de flore

On inocule d'abord par gavage, à l'aide d'une canule en acier stérile, que l'on introduit dans la bouche de l'animal jusqu'à l'estomac, 1ml d'une souche de *Bacteroides sp* d'origine humaine aux rats axéniques, pour réduire la concentration en oxygène dans le milieu intestinal (Corpet, 1993).

Trois jours plus tard, afin de permettre à la souche inoculée de s'installer dans le tube digestif, les rats reçoivent, également par gavage, 1ml d'une dilution au 1/100 d'un pool de selle de trois donneurs dans les 2 heures suivant leur émission. La dilution est réalisée en anaérobiose, en milieu de Shaedler semi-gélosé pré-réduit (Biomerieux, Marcy). Les donneurs sont des enfants de 10 ans environ, dont la flore a été adaptée aux carraghénanes. En effet, ils ont reçu un flan contenant des carraghénanes tous les 2 jours pendant 3 semaines.

Dans les jours qui ont suivi, les selles des animaux, après dilution au 1/100, ont été examinées au microscope afin de s'assurer que la flore introduite se développait bien dans leur tube digestif.

d.2) Cancérogène utilisé : l'azoxyméthane

L'azoxyméthane (AOM) est préparé à partir de 100 grammes d'azoxyméthane Sigma A-9517 dissous dans 25 ml de solution de NaCl à 9% stérilisée. La solution ainsi obtenue contenait 4mg d'AOM/ml, elle a été utilisée pour l'expérience de promotion, puis diluée au quart afin d'obtenir une concentration d'1mg d'AOM/ml, qui a été utilisée dans l'expérience d'initiation. L'AOM étant un cancérogène très puissant, toutes les précautions doivent être prises par le manipulateur lors de sa préparation et de son injection (blouse, masque, gants...).

2. CALENDRIER

-J -90 : adaptation de la flore des donneurs aux carraghénanes (du 25/08/96 au 12/09/96)

-J 0 : réception des rats et contrôle de leur stérilité (12/09/96)

-J 1 : inoculation par gavage de la souche *Bactéroïdes sp* (13/09/96)

-J 4 : inoculation par gavage de la flore humaine des donneurs (16/09/96)

-J 11 : préparation et administration de l'AOM ; préparation et début d'administration des carraghénanes pour l'expérience d'initiation (23/09/96)

-J 17 : préparation et début d'administration des carraghénanes pour l'expérience de promotion (30/09/96)

-J 39 : abattage et prélèvements des côlons des animaux de l'expérience d'initiation (21/10/96)

-J 111 : abattage et prélèvements des côlons des animaux de l'expérience de promotion (07/01/97)

3. DEROULEMENT DE L'EXPERIENCE

a) Initiation

Les 20 rats mâles ont été répartis par lots de 4 animaux dans 5 cages différentes en inox, de manière aléatoire, et placés dans un isolateur plastique comme nous le montre le schéma suivant :

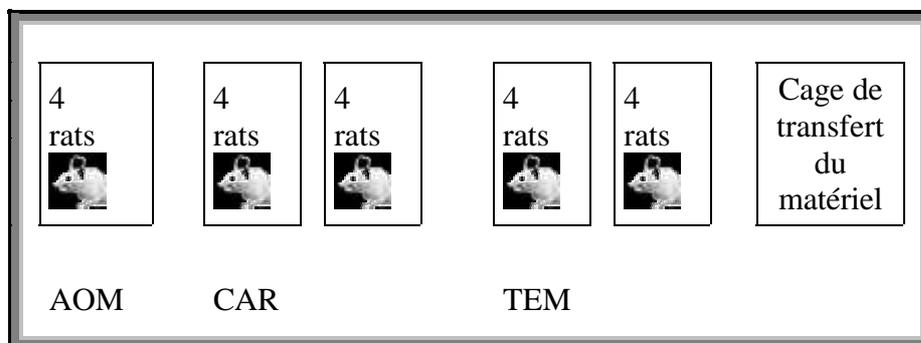


Schéma de répartition des rats dans l'isolateur réservé à l'expérience d'initiation

- Le lot témoin négatif (TEM) est constitué de 8 rats (soit 2 cages). En plus de l'alimentation de base, constituée de pellets pour rats, ils reçoivent uniquement de l'eau stérilisée par autoclave à 120°C pendant 25 minutes.
- Le lot témoin positif (AOM) est constitué de 4 rats (soit une cage). Ils reçoivent une injection en intrapéritonéale d'AOM de 5 mg/kg dilué dans du NaCl à 9 g/l une

semaine après le transfert de flore. Ces rats sont alimentés et abreuvés de la même façon que ceux du lot témoin négatif.

- Le lot test (CAR) est constitué de 8 rats (soit 2 cages). Ces rats reçoivent, en plus de l'alimentation de base, des carraghénanes à 10 % (type 1 : Kappa majoritaire, non dégradés Sigma C-1013) autoclavés à 120°C pendant 25 minutes. Ces carraghénanes sont la seule source d'hydratation apportée aux rats, ils sont administrés selon le protocole suivant :
 - 4 jours de carraghénanes à 10% sous forme de cubes gélifiés placés sur les grilles des cages
 - 3 jours de carraghénanes à 0,25% sous forme liquide, pour éviter une déshydratation et une perte de poids trop importante
 - 4 jours de carraghénanes à 10% sous forme de cubes gélifiés placés sur les grilles des cages

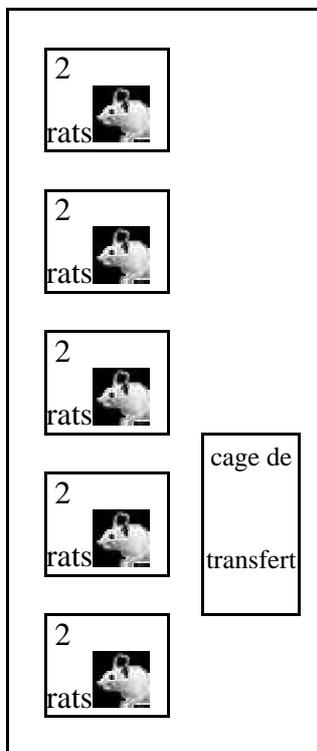
Les rats sont abattus 28 jours après l'injection d'AOM. Ils sont euthanasiés en quelques minutes par une méthode d'endormissement à l'éther dans une cloche à euthanasie. Après sacrifice des animaux, les côlons sont prélevés immédiatement par dissection par la ligne blanche, ouvert sur toute la longueur, et coupé en morceaux de 6 cm environ (longueur d'une lame), soit 2 à 3 morceaux de côlon pour chaque rat. Ils sont lavés par passage de tampon de Krebs, puis ils sont fixés à plat au formol tamponné à 10% entre 2 papiers filtres codés. Le codage est constitué pour chaque côlon de rat de 2 lettres aléatoires qui permettront la lecture en aveugle, le lecteur ignorant à quel groupe appartient le côlon lu.

b) Promotion

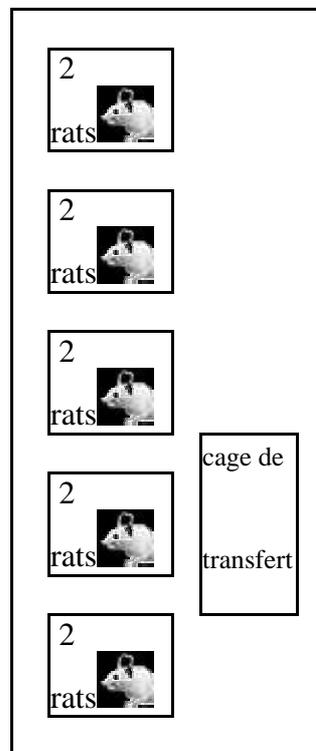
Une semaine après le transfert de flore, tous les rats reçoivent une injection intra péritonéale d'AOM à 20mg/kg. Puis, les 33 rats femelles sont répartis de manière aléatoire, par lot de 2 rats dans 16 cages en inox (une d'entre elle en contient 3), ces cages sont elles même réparties dans 3 isolateurs en plastique différents.

- Un lot de 13 rats servant de lot témoin (TEM) reçoit uniquement, en plus de la nourriture, de l'eau stérilisée par autoclave (120°C/25 min).

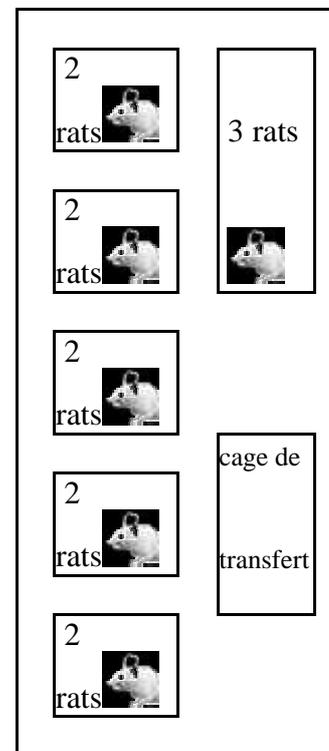
- Un lot de 10 rats reçoit, en remplacement de la boisson, des carraghénanes (type 1 : Kappa majoritaire, non dégradés sigma c-1013) sous forme liquide (LIQ). Ce sont des carraghénanes à 0.25% autoclavés (120°C/25 min) administrés avec des biberons sous forme liquide
- Un lot de 10 rats reçoit, en remplacement de la boisson, des carraghénanes à 2.5% (CAR) autoclavés (120°C/25 min) sous forme de cubes gélifiés placés sur les grilles des cages pendant 5 jours de la semaine, et des biberons contenant des carraghénanes à 0.25% sous forme liquide le week-end, soit 2 jours de la semaine, afin d'éviter une déshydratation trop importante.



Isolateur n°1 : Lot CAR
10 rats



Isolateur n°2 : Lot LIQ
10 rats



Isolateur n°3 : Lot TEM
13 rats

Les rats sont abattus, et leurs côlons prélevés au bout de 100 jours de cette alimentation, dans les même conditions que pour l'initiation.

Tout ceci c'est déroulé à l'animalerie du laboratoire des xénobiotiques, INRA, Saint Martin du Touch.

4. MESURES ET RESULTATS

a) Mesures

a.1) Lecture des lésions

Avant d'être observés au microscope les côlons sont colorés au bleu de méthylène à 0,05% pendant 10 minutes. Cette opération s'effectue au fur et à mesure de la lecture car les côlons se dessèchent vite. De plus le bleu de méthylène qui s'accumule dans les cellules et qui donne la surcoloration des cryptes aberrantes s'atténue après 30 minutes. Ils sont ensuite placés sur la lame, et lus en aveugle au microscope (x40) par deux personnes (dont moi-même), indépendamment, afin d'éviter qu'elles ne s'influencent l'une l'autre (lecture en « double aveugle »). La lame de lecture est divisée en 20 segments, d'un demi-millimètre chacun, et numérotés, ce qui permet une lecture plus facile et un repérage plus aisé. Ont été noté indépendamment pour chaque côlon le nombre de microadénomes, ainsi que le nombre de cryptes par microadénomes observés segment par segment.

Les lésions que nous avons observées sont caractérisées par :

- des cryptes plus larges
- une surélévation des cellules épithéliales
- leur lumière est plus souvent oblongue que ronde
- une augmentation de la zone péricryptale qui séparent les cryptes aberrantes des normales.

Nous avons pratiqué ces lectures à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, au laboratoire de sécurité des aliments d'HIDAOA du professeur D. Corpet.

a.2) Quantité de carraghénanes ingéré

Une quantité importante de carraghénanes est gaspillée par les rats les consommant sous forme de cubes gélifiés, et se mêle à la litière sous forme de très petites particules. Or il

est cependant nécessaire de connaître la quantité de carraghénanes réellement ingérée par les rats, en évaluant la quantité de carraghénanes non ingérée. Pour ce faire on ajoute de l'eau au mélange carraghénanes-sciure, après avoir retiré les fécès, on porte à ébullition quelques minutes, puis après refroidissement le gel de surface de carraghénanes obtenu est retiré, l'opération est répétée 3 fois. Les gels sont alors mis à l'étuve à 120°C pendant 24 heures pour connaître le poids sec de carraghénanes non ingérés. En soustrayant alors la quantité de carraghénanes retrouvée dans la litière à celle que nous avons administrée aux animaux nous pouvons estimer la quantité de carraghénanes qu'ils ont ingérée.

Pour les rats du lot test (CAR) de l'expérience d'initiation nous avons estimé par cette mesure la consommation moyenne à 1.78g de carraghénanes/j/rat (nous avons estimé les rats à 100 grammes), soit 17.8 g/kg/jour.

Pour les rats de l'expérience de promotion on a estimé la consommation moyenne à 0.31 g/kg/jour pour le lot LIQ (carraghénanes à 0.25%) et à 2.5 g/kg/jour pour le lot CAR (carraghénanes à 2.5%).

a.3) Poids moléculaire des carraghénanes

Les carraghénanes dégradés, c'est à dire de faible poids moléculaire (PM<100kDa), étant très toxique pour l'intestin (Marcus et al., 1969 ; Grasso et al., 1973) nous avons donc mesuré le PM des carraghénanes au cours de notre expérience. Ceci a été fait au laboratoire SKW BIOSYSTEMS par le professeur G. Brigand, 50500 Baupte.

Le PM des carraghénanes utilisés dans l'eau ou le gel donné aux rats durant notre expérimentation a été mesuré par chromatographie d'exclusion sur gel. Cette mesure est effectuée sur des carraghénanes ayant subi un traitement par autoclave à 120°C pendant 25 minutes, correspondant à la stérilisation de ceux-ci au cours de notre expérience, et est de 310-320 kda.

Afin de déterminer si les carraghénanes ont été dégradés dans le tube digestif des rats, leur PM dans les fécès des rats en ayant consommés au cours de l'expérience a également été mesuré. Etant donné que dans les selles, de nombreuses substances interfèrent avec le système de mesure, celui-ci a été estimé à partir du temps d'élution en utilisant une courbe de calibrage. Il a ainsi été estimé à 307 ± 37 kda.

Il n'y a donc, à priori, pas de dégradation importante des carraghénanes au cours de leur transit digestif pour notre expérience.

a.4) Test du sang fécal occulte

Il a été montré que des polysaccharides sulfatés, tels que le sulfate d'amilopectine (APS) ou le dextran sulfate de sodium (DSS), entraînent des lésions ulcérate du côlon (Ishioka et al., 1987). Aussi afin de déterminer si des lésions ulcérateives étaient apparues au cours de notre étude nous avons réalisé un test du sang fécal occulte sur les fécès des animaux de l'expérience de promotion, le 58^{ème} et le dernier jour de celle-ci. Nous avons utilisé pour cela un test Hémocult II (SKD, Gagny). Dans les 2 cas il a été négatif, quel que soit le lot considéré.

b) Résultats

b.1) Initiation

Pour l'expérience concernant l'initiation, après lecture au microscope des côlons prélevés sur les rats, aucun des rats du lot TEM, ainsi qu'aucun des rats du lot CAR ne présente de FCA. Seuls les rats ayant reçu de l'AOM, c'est à dire les rats du lot témoin positif, développent quelques FCA sur la muqueuse de leur côlon (des FCA sont observés de façon sûre sur 3 rats parmi les 4 du lot, par les 2 lecteurs).

Lot AOM	Nombre de FCA	Taille
Rat 1	3	2.3
Rat 2	0	
Rat 3	11	1.6
Rat 4	4	2.5

Lecteur 1

Lot AOM	Nombre de FCA	Taille
Rat 1	3	2.3
Rat 2	1	2
Rat 3	12	1.9
Rat 4	5	4.4

Lecteur 2

Nous pouvons donc conclure que les carraghénanes ne sont pas initiateurs de FCA, et par conséquent du cancer, sur le côlon de rats à flore humaine. Ils ne seraient donc pas non plus initiateurs de cancer du côlon chez l'homme. Ceci vient confirmer les résultats précédemment obtenus chez des rats conventionnels sur l'absence d'effet initiateur des carraghénanes.

b.2) Promotion

Pour l'expérience de promotion nous avons noté, et pris en compte : le nombre de cryptes aberrantes, le nombre de microadénomes ainsi que leur taille, c'est à dire le nombre de cryptes aberrantes par microadénome, lus sur chacun des côlons prélevés. La moyenne et l'écart type de ces résultats sont résumés dans les tableaux suivant pour chaque lecteur :

Lot	Nombre moyen de cryptes/rat	Nombre moyen de FCA/rat	Taille moyenne des FCA/rat
TEM (13 rats)	150 ± 61	54 ± 22	2,78 ± 0,22
LIQ (10 rats)	129 ± 59	45 ± 20	2,93 ± 0,30
CAR (10 rats)	122 ± 39	46 ± 17	2,72 ± 0,19

Lecteur 1

Lot	Nombre moyen de cryptes/rat	Nombre moyen de FCA/rat	Taille moyenne des FCA/rat
TEM (13 rats)	155 ± 38	56 ± 14	2,81 ± 0,18
LIQ (10 rats)	126 ± 51	45 ± 20	2,88 ± 0,24
CAR (10 rats)	141 ± 49	52 ± 22	2,78 ± 0,38

Lecteur 2

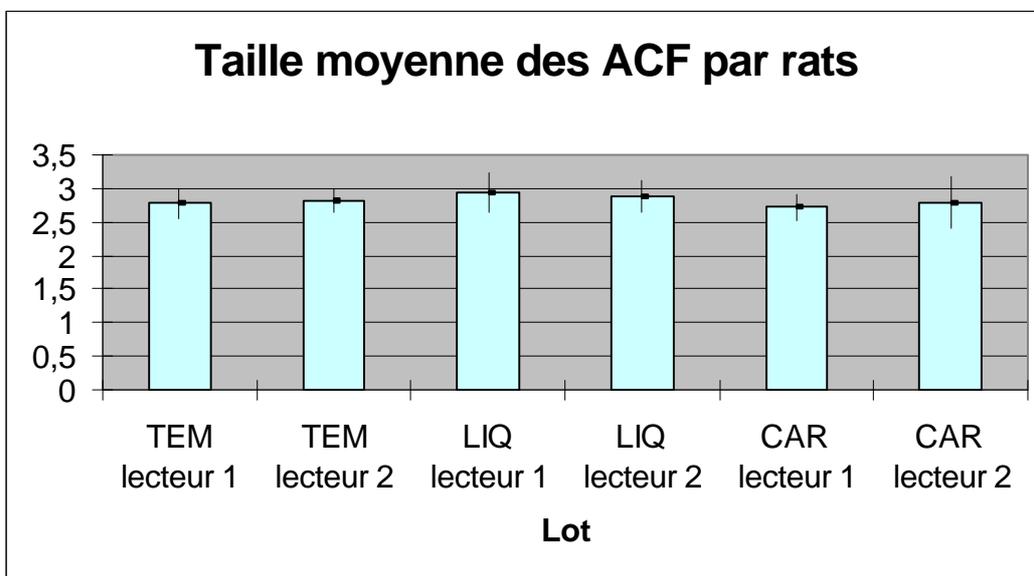
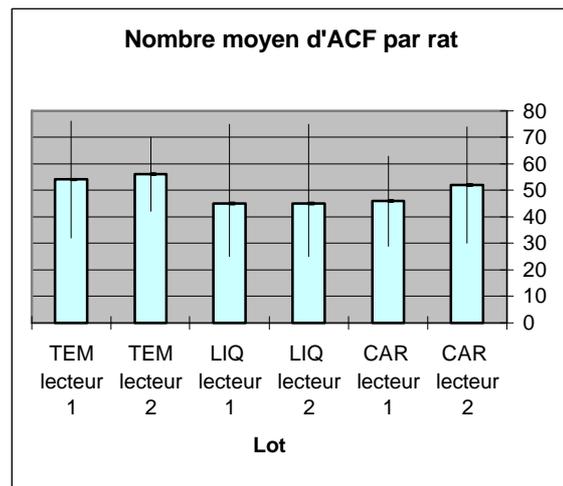
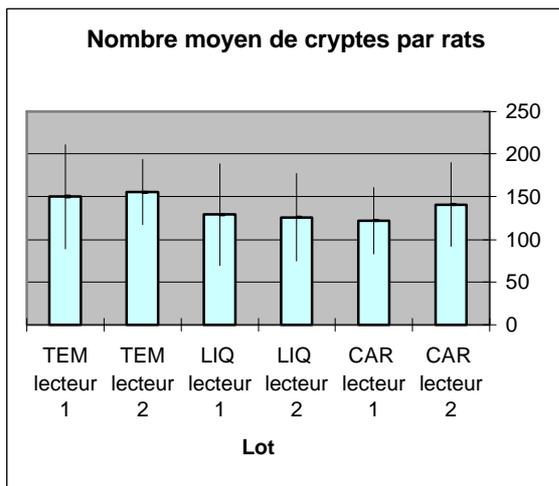
Pour l'expérience concernant la promotion, le nombre de microadénomes est assez semblable dans les trois groupes pour les deux lecteurs ($p=0,38$ et $p=0,50$). Les rats du groupe LIQ semblent avoir un peu moins de microadénomes que les autres animaux (45 ± 20 contre 56 ± 14 pour le groupe CAR et 52 ± 22 pour le groupe TEM). Cependant l'analyse statistique ne montre aucune différence significative entre les trois groupes d'animaux.

De plus, en ce qui concerne la taille des microadénomes, c'est à dire le nombre de cryptes aberrantes par microadénome, il n'y a également aucune différence significative entre les 3 groupes d'animaux :

Pour le groupe CAR : $2,78 \pm 0,38$ et $2,72 \pm 0,19$ selon le lecteur

Pour le groupe TEM : $2,81 \pm 0,18$ et $2,78 \pm 0,22$

Pour le groupe LIQ : $2,88 \pm 0,24$ et $2,93 \pm 0,30$



Contrairement à l'expérience pratiquée sur des rats conventionnels (Préclaire, 1996), dans notre étude l'ingestion de carraghénanes chez des rats axéniques à flore humaine n'influence ni le nombre de FCA ni leur taille par rapport au lot témoin, et ce quelle que soit la dose.

Les carraghénanes ne semblent donc pas avoir d'effet promoteur sur le cancer colorectal, tout du moins chez des rats axéniques à flore humaine, modèle utilisé dans notre étude et qui semble être le plus proche du côlon humain.

QUATRIEME PARTIE : DISCUSSION SUR LES MECANISMES

Si dans notre expérimentation nous n'avons pas montré d'effets cancérrogènes des carraghénanes sur des rats HFA, par contre, comme nous l'avons vu, différentes expériences tendent à prouver qu'il existerait bien un effet cocancérrogène ou cancérrogène des carraghénanes sur le côlon de rats conventionnels. Cette différence semble confirmer l'idée que la microflore intestinale des rongeurs soit impliquée dans l'effet toxique des carraghénanes sur le côlon. Aussi nous allons voir quelles sont les différentes hypothèses qui pourraient expliquer cette possible toxicité colique des carraghénanes.

1. ADSORPTION DE CARCINOGENE

Plusieurs expérimentations animales ont étudié la relation existant entre les polysaccharides indigestibles et l'induction chimique des tumeurs du côlon (Bauer et al., 1979 ; Freeman et al., 1980). Les fibres associées à un régime alimentaire sont supposées diminuer l'incidence du cancer colo-rectal par dilution du contenu intestinal et la diminution de la durée du transit digestif (Barbolt et al, 1978).

En réalité, dans la majorité des études les fibres insolubles, comme le son de blé ou la cellulose, diminuent l'incidence tumorale chez les rats qui en consomment. Ceci de par leur adsorption de carcinogènes dans le tractus digestif les rendant protectrices vis à vis du cancer du côlon (Harris et al., 1993). Au contraire les fibres solubles augmente cette incidence tumorale. Ces fibres solubles, dont le kappa carraghénanes fait partie, maintiendrait un carcinogène en solution aqueuse et diminuerait son adsorption par les fibres insolubles (alpha cellulose), comme par exemple le 1-8 dinitropyrene, ou DNP (Harris et al., 1993). Cette action des fibres solubles pourrait être expliquée par leur capacité émulsifiante et stabilisante.

Cette diminution de l'adsorption des carcinogènes par les fibres solubles, notamment le kappa carraghénanes, pourrait surtout expliquer les effets cocancérrogène des carraghénanes : l'effet néfaste ne se produirait que pendant l'administration du cancérigène (Watanabe et al, 1978 ; Arakawa et al, 1986).

2. DEGRADATION DES CARRAGHENANES

Une des causes de toxicité des carraghénanes pourrait être leur dégradation dans le milieu intestinal. En effet les carraghénanes dégradés (PM<100 kDa) introduits dans le régime alimentaire ou l'eau de boisson, même à des doses peu élevées (1%), peuvent entraîner à court ou à moyen terme des effets ulcérogènes au niveau du côlon. Le cobaye et le lapin y sont particulièrement sensibles (Marcus et al., 1969 ; Grasso et al, 1973).

Chez des rats, des cobayes et des singes rhésus ayant reçu des carraghénanes pendant de longues périodes (10 semaines à 11 mois), à des doses de 1 à 5% du régime, les carraghénanes retrouvés dans les fécès ont un PM nettement plus faible que les produits ingérés (Pittman et al, 1976). Pour cela, les animaux doivent avoir reçu préalablement des carraghénanes pendant 2 à 3 semaines avant d'observer cette possible dégradation (peut-être pour une adaptation de la flore intestinale).

Cependant que ce soit dans notre expérience ou dans l'expérience de Préclaire (1996), le PM des carraghénanes dans les fécès était en effet légèrement inférieur au PM des carraghénanes ingérés mais cette baisse n'était en aucun cas significative (Taché et al., 2000), et le PM restait élevé, autour de 300 kDa. De plus dans ces 2 expériences le test Hemocult montre l'absence de sang dans les selles, donc certainement l'absence d'ulcérations qu'entraînent les carraghénanes de faible PM.

Il semble donc peu probable que ce soit la dégradation des carraghénanes par la microflore, en favorisant l'irritation de la paroi colique, qui soit à l'origine d'un effet promoteur de ceux-ci. Cependant il reste possible qu'une petite fraction de carraghénanes de faible PM puisse suffire pour agir.

3. ACTIVITE SUR LES ACIDES BILIAIRES

Ce sont des données épidémiologiques qui ont attiré l'attention sur le rôle possible des stéroïdes biliaires et de l'alimentation dans la genèse des cancers du côlon. En effet il existe une inégalité de répartition de ce cancer, celui-ci augmentant en fréquence dans les pays occidentaux, dont l'alimentation est riche en graisse animale, le facteur génétique étant peu probable (Haenszel et al, 1968). Les régimes riches en graisse animale augmentant le taux d'acides biliaires fécaux (Reddy et al., 1983).

Ceci a amené l'hypothèse selon laquelle les stéroïdes biliaires pourraient être transformés par la flore bactérienne colique en un produit carcinogène ou cocarcinogène. Plusieurs arguments viennent étayer cette hypothèse (Le Quintrec, 1984) :

- Il existe une analogie de structure chimique entre les stéroïdes biliaires neutres (cholestérol) ou acides (acide cholique et déoxycholique), leurs dérivés et certains hydrocarbures polycycliques, comme le méthyl-3-cholanthrène, qui sont des carcinogènes connus. De plus il a été montré que le déoxycholate pouvait être transformé en 20-méthyl cholanthrène.
- Des études montrent que l'association d'acides biliaires, en particulier lithocolique, à des carcinogènes (DMH, AOM) augmente le nombre de tumeurs provoquées chez le rat. Une simple dérivation chirurgicale du cholédoque, favorisant l'afflux de bile vers le colon, suffit à doubler le nombre de tumeurs coliques observées chez le rat.
- Des études épidémiologiques ont montré que l'élimination fécale de stéroïdes biliaires était généralement, mais pas toujours, plus importante dans les populations à haut risque par rapport aux populations à bas risque. De même on trouve une élimination accrue d'acides biliaires chez les sujets porteurs de polypes du côlon dont on connaît le rôle essentiel dans la genèse du cancer. (Nagengast et al., 1995).

Dans une étude sur l'incidence des acides biliaires sur le cancer du côlon un important renouvellement cellulaire a été constaté suite à des dommages de la muqueuse. On a donc supposé que l'action des acides biliaires sur cette prolifération cellulaire serait le mécanisme à l'origine de la carcinogenèse du côlon (Rafter et al., 1986). D'autres expériences ont fait ressortir le concept que ce serait la concentration d'acides biliaires solubles qui serait à l'origine des effets cytotoxiques de ces molécules, et non la concentration totale d'acides biliaires fécaux (Nagengast., 1988).

Les acides biliaires peuvent porter atteinte à l'intégrité des membranes cellulaires de la muqueuse du côlon et donc entraîner leur renouvellement en présence des agents cytotoxiques que sont les acides biliaires, d'où le risque d'augmenter l'incidence des tumeurs coliques. Il a en effet été démontré qu'une muqueuse colique hyperproliférative est plus sensible aux substances cancérigènes qu'un épithélium normal (Deschner et al., 1984)

De plus le test de Ames montre des effets co-mutagènes des acides biliaires (Wilpart et al., 1986).

Or Arakawa et al. (1988), dans leur expérience sur les effets promoteur des carraghénanes à partir d'un régime alimentaire pauvre en matières grasses (6%), chez des rats recevant des injections de DMH, ont également mesuré le taux d'acides biliaires retrouvé dans les fécès. La concentration fécale en acides biliaires totaux et en acide déoxycholique est diminuée chez les rats recevant des carraghénanes. Cependant comme le régime à base de carraghénanes s'accompagne d'une augmentation de la masse fécale, l'excrétion journalière de composés biliaires chez les sujets recevant des carraghénanes et chez les rats qui n'en reçoivent pas est équivalente. De plus une augmentation de la concentration relative et de l'excrétion journalière de l'acide lithocolique (acide biliaire le plus promoteur), est notée chez les rats recevant des carraghénanes. Ainsi le rôle promoteur des carraghénanes dans le cancer du côlon pourrait être lié à cette augmentation d'acides biliaires, créant ainsi un milieu toxique favorable au développement de cancers coliques.

Il est notable que les résultats obtenus sur les animaux peuvent être différents de ceux obtenus sur les humains, car leur flore intestinale est différente, et donc le métabolisme de cette flore est différent. Par exemple les rats possèdent une flore intestinale permettant une 6-bêta-hydroxylation des acides biliaires (Matheson et al., 1994). Cette métabolisation permet l'obtention d'acides biliaires secondaires peu hydrophobes. Les hommes ont des acides biliaires plus hydrophobes que les rats car ils ne possèdent pas de 6-beta-hydroxylase. Or le degrés d'hydrophobicité des acides biliaires joue un rôle majeur dans le cycle de synthèse hépatique. Lorsque la concentration en acides déoxycholique et lithocolique est forte, la synthèse d'acides cholique à partir des graisses alimentaires et du cholestérol est inhibée (Naito et al., 1996). D'autre part, ce « feedback » n'altère pas la production d'acide chénodéoxycholique, qui augmente donc relativement par rapport à la quantité d'acides cholique. La modification de ce rapport entraîne une augmentation du ratio acides lithocolique / acides déoxycholique dans le cycle entérohépatique suivant. Les rats ayant un pool d'acides biliaires moins hydrophobes le phénomène de feedback est donc moins important, le ratio acides lithocolique / acides déoxycholique est donc plus faible chez le rat par rapport à l'homme. C'est pourquoi beaucoup de résultats valables sur les rats conventionnels ne peuvent pas être extrapolés à l'homme, et montre l'importance que peut jouer la flore intestinale.

4. CARRAGHENANES ET METABOLISME DU H₂S

Le gros intestin héberge une flore spéciale de gram négative anaérobie connu pour être des bactéries sulfates réductrices (SRB). Comme leur nom l'indique ces bactéries réduisent les sulfates et sulfites, cette réduction produit du sulfure (H₂S), ces bactéries sont diverses et n'ont pas de relations les unes avec les autres sauf cette capacité de réduction. Le principal genre est *Desulfovibrio* représentant 64 à 81% des bactéries SRB de côlons humains, de plus ces bactéries SRB ont une croissance préférentielle dans le côlon distal (Gibson et al., 1993). Ces souches bactériennes utilisent l'hydrogène (H₂) comme électron donneur dans la réduction des sulfates, et sont les consommateurs de l'hydrogène provenant des fermentations importantes se produisant dans le côlon. Elles fournissent également les acides gras à courte chaîne comme les acides butyrique, propionique et acétique, essentiel au métabolisme énergétique des cellules épithéliales du côlon. Ces acides gras à courte chaîne (notamment le butyrate) fournissent environ 70% de l'énergie des cellules épithéliales du côlon, alors que les cellules épithéliales de l'intestin grêle utilisent préférentiellement le glucose (Pitcher et al., 1996). Nous verrons par la suite que c'est l'action sur ce métabolisme énergétique qui pourrait être à l'origine de la colite ulcéraire, une pathologie affectant uniquement le gros intestin. De plus le taux de sulfide est maximal dans la région terminale du côlon ce qui pourrait expliquer la répartition préférentielle des ulcérations coliques au niveau du côlon distal (Gibson et al., 1992).

Le H₂S serait, d'après différentes expériences, toxique pour l'épithélium du côlon:

- In vitro pour des colonocytes de rats ou d'humains, le sulfide à 2 mmol/l inhibe l'oxydation du butyrate. Cette « lésion » biochimique est caractéristique de ce qui se produit lors de colite ulcéraire, la déficience énergétique intracellulaire provoquée par l'interruption du métabolisme fragilise la cellule. La déficience métabolique est due à la formation de persulfide, celui-ci bloque la Butyryl CoA déshydrogénase, enzyme lié au FAD. Ce blocage peut être levé par l'ajout de crotonate au cours de l'incubation. (Roediger et al, 1993).
- In vivo si on injecte dans des côlons de rats du sulfide à 0.22 mmol/l on produit une ulcération de la muqueuse colique, une perte de l'intégrité cellulaire, des apoptoses et

une déformation de l'architecture des cryptes (Aslam et al., 1992). Les sulfides entraînent alors une perméabilité importante de la muqueuse digestive. Le mécanisme est encore mal connu mais pourrait être la destruction de la structure de la muqueuse par rupture des ponts disulfure (Tonzetich et al., 1984).

Christl et al. ont montré que du sulfide à 1 mmol/l sur des tissus de colons humains augmente de manière significative le taux de prolifération cellulaire et autres modifications habituellement rencontré dans la colite ulcéraire (Christl et al., 1996).

L'activité des bactéries SRB est largement liée à la présence de composés sulfurés pouvant être réduit, notamment le SO_4^- et le SO_3^- qui sont habituellement présent dans la nourriture utilisant des conservateurs (on en trouve notamment dans les carraghénanes). Bien que la plupart des flores intestinales humaines comportent des bactéries SRB, moins de la moitié d'entre elles ont une activité sulfo-réductrice, ce qui pourrait expliquer l'effet toxique de repas riche en soufre favorisant cette activité (Pitcher et al., 1995 ; 1996).

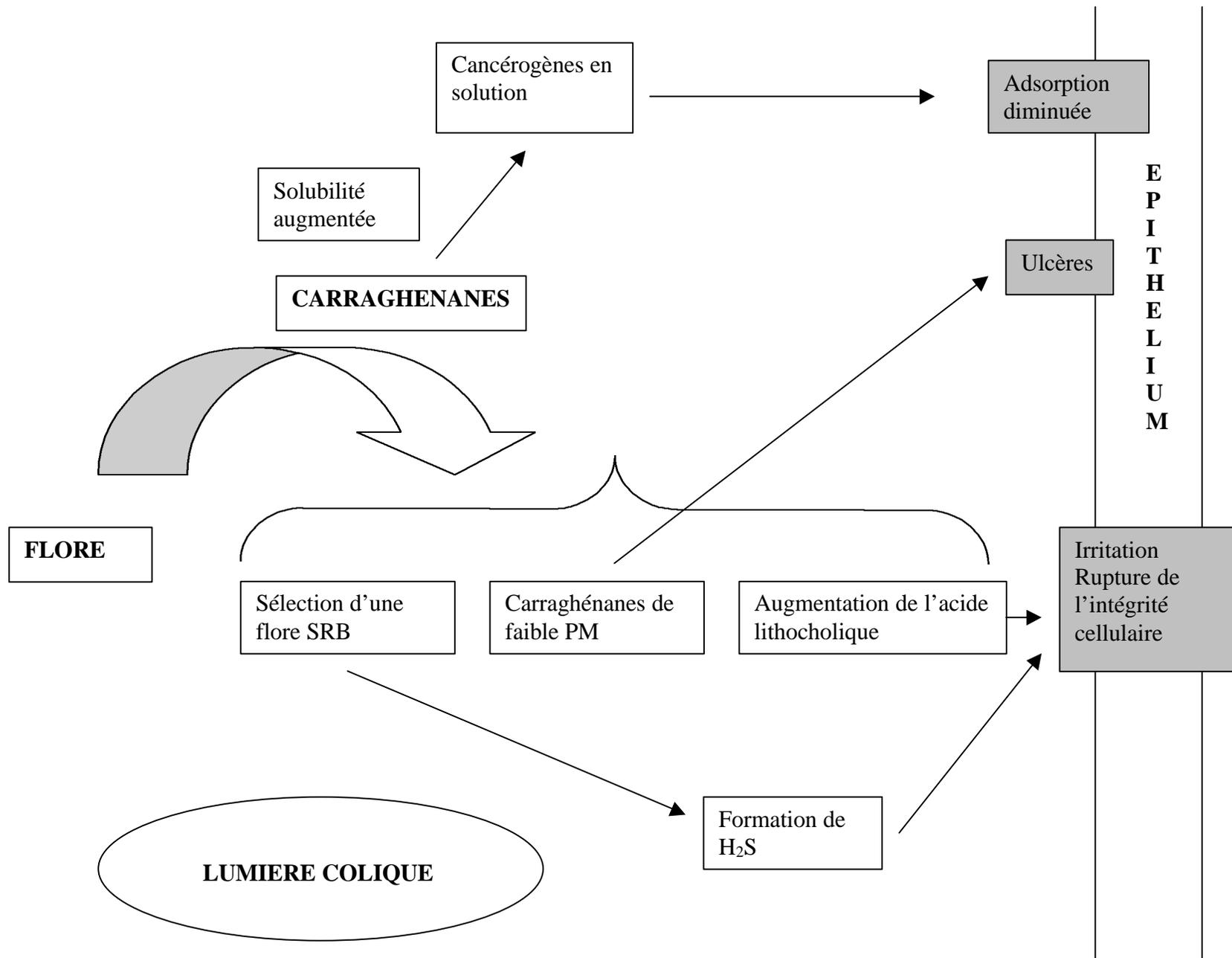
Des expériences in vitro et in vivo ont montré que la croissance des bactéries SRB peut être stimulée, et la production de H_2S augmentée, par l'apport de composés soufrés qui apportent l'électron terminal nécessaire à la réduction (Gibson et al., 1988 ; 1992). Le soufre contenu dans certains acides aminés des protéines est déjà connu pour contribuer à la production de H_2S dans le gros intestin. Il a été montré que la production de H_2S est divisée par 6 chez des animaux mis à la diète alors qu'elle est multipliée par 5 chez des animaux recevant des carraghénanes (Suarez et al., 1998).

Ainsi on constate qu'un repas riche en soufre (notamment à base de carraghénanes) peut stimuler la croissance d'un groupe spécifique de bactéries intestinales qui peut avoir un effet très néfaste sur l'intégrité cellulaire de l'épithélium digestif et par là même favoriser le développement d'un cancer. Or il est possible que dans notre expérience cette flore spécifique soit absente, ou qu'elle se soit très peu développée, bien que les 3 donneurs à l'origine de la flore intestinale humaine implantée aient été accoutumés aux carraghénanes pendant plusieurs semaines.

D'un autre côté une expérience menée récemment par Furne remet ne cause cette toxicité du H_2S (Furne et al., 2000). Il utilise pour cela deux groupes de rats dont la nourriture

est additionnée pour les deux groupes de sulfate de dextran, un polymère riche en soufre. Un des groupes reçoit en plus du subsalicylate de bismuth, un composé qui précipite le H₂S. Après autopsie il s'est avéré que pour chaque groupe de rats une colite ulcérate s'est développée, bien que le taux de H₂S fécal du groupe de rats recevant en plus du subsalicylate de bismuth soit nettement diminué. Ceci tendrait à prouver que la production excessive de H₂S dans le côlon ne jouerait probablement pas de rôle dans la colite ulcérate du rat.

Comme nous venons de le voir il semblerait que la flore intestinale joue un rôle important dans les différents mécanismes d'action qui pourraient intervenir dans la cancérogenèse colique, et qui sont favorisés par l'ingestion de carraghénanes . La différence entre la flore intestinale des rats conventionnels et celle des rats HFA pourrait expliquer les résultats contradictoires entre notre expérience et les expériences précédentes, bien qu'aucun mécanisme ne puisse vraiment expliquer ce possible effet promoteur.



Shéma récapitulatif : interactions carraghénanes-flore intestinale, effets toxiques

CONCLUSIONS

Les carraghénanes, ou E 407, un additif alimentaire, semblent selon diverses études avoir un effet promoteur sur le cancer du côlon de rats conventionnels (Préclaire, 1996). Aussi et afin d'avoir un modèle plus proche de l'homme nous avons étudié l'effet initiateur et promoteur des carraghénanes sur le cancer du côlon chez des rats axéniques à flore humaine (rats HFA).

Nous n'avons pas mis en évidence de réel effet cancérigène des carraghénanes sur le côlon de ces rats HFA malgré une ingestion massive (17.8g/kg/jour de carraghénanes ingérés pour les rats utilisés dans l'étude sur l'initiation, et 2.5 g/kg/jour pour ceux utilisés dans l'étude sur la promotion.). En effet la consommation moyenne de carraghénanes dans les pays industrialisés est de l'ordre de 0.8 mg/kg/jour (des consommations maximales de 40mg/kg/jour ont aussi été rapportées.) (Cherbut., 2000), c'est à dire bien inférieure à celles utilisées dans les différentes études menées. Aussi, à la vue de notre étude expérimentale, et étant donnée la faible dose de carraghénanes ingérée par l'homme, nous ne pensons pas que les carraghénanes présentent un réel risque cancérigène pour le côlon dans notre alimentation quotidienne.

Toutefois il pourrait exister deux biais dans notre étude. D'une part le milieu expérimental stérile dans lequel ont été conservé les rats HFA pourrait intervenir dans la différence de résultats par rapport aux études précédentes (Taché et al., 2000). Aussi il pourrait être intéressant d'effectuer une nouvelle étude sur des rats HFA auxquels on implanterait une flore de rats conventionnels, et qu'on nourrirait avec des carraghénanes, dans les mêmes conditions de stérilité que pour notre expérience. D'autre part la remise en cause des FCA en tant que lésions préneoplasiques (Paulsen et al., 2000 ; 2001 ; Yamada et al., 2000, 2001.), qui étaient les lésions que nous avons utilisé pour obtenir nos résultats. Aussi faudrait-il envisager de mener la même étude mais en utilisant la recherche de ces nouvelles lésions supposées actuellement être les véritables lésions précancéreuses.

Cependant étant donné le coût important de ces animaux pour mener ces études il serait intéressant de faire avant une étude épidémiologique fine de l'incidence des adénomes chez les consommateurs qui ingèrent beaucoup de carraghénanes. Ceci nous indiquerait peut être si de nouvelles études aussi coûteuses, dans des modèles animaux sophistiqués, sont justifiées.

Annexe 1 : Résumé des recommandations InVS - DGS - NACRe

**Institut Veille Sanitaire- Direction Générale de la Santé
Réseau National Alimentation Cancer Recherche
Brochure destinée à l'ensemble des médecins et professionnels de santé français,
distribuée début 2003.
(février 2002)**

Un certain nombre de facteurs semblent être associés à un moindre risque de cancer :

- 1. un bon équilibre de la ration alimentaire** caractérisée par une **alimentation variée et quantitativement adaptée aux besoins** nutritionnels, préférentiellement basée sur des aliments d'origine végétale
- 2. un poids stable sans surcharge pondérale** (indice de masse corporel (Poids/taille²) maintenu entre 18,5 et 25) en limitant le gain de poids à moins de 5 kg durant la vie adulte..
- 3. un mode de vie actif** correspondant à un niveau d'activité physique de 1.75 (exprimé sous forme de multiple du métabolisme basal). Faire au moins une demi-heure de marche, ou une activité similaire, par jour et une activité physique vigoureuse d'au moins une heure, par semaine.
- 4. la consommation d'au moins cinq fruits et légumes variés** (soit entre 400 et 800 grammes par jour). La consommation d'aliments riches en fibres (fruits légumes, pain riz et pâtes complets) doit être privilégiée par rapport à celle d'aliments raffinés (pain et riz blancs).
- 5. la consommation d'alcool est déconseillée.** Chez les consommateurs, celle-ci doit être limitée à moins de deux verres par jour chez l'homme, et à moins d'un verre par jour chez la femme.
- 6. la consommation de charcuterie doit être limitée.** Le poisson, la volaille doivent être privilégiés. L'utilisation de méthodes de cuisson utilisant des températures très élevées doivent être limitées (barbecue, grillades et fritures mal contrôlées) Eviter de manger les parties carbonisées des aliments.
- 7. la consommation d'aliments salés, sel de cuisson et sel de table doit être limitée.**
- 8. aucune supplémentation nutritionnelle sous forme médicamenteuse n'est pour l'instant recommandée.**

Annexer 2 : Critères de pureté

E 407 carraghénanes

Description chimique : Le carraghénane est obtenu à partir d'algues marines des familles des Gigantacées, des Solériacées, des Hypnéacées et des Furcellariacées, familles de la classe des Rhodophycées (algues rouges), par extraction aqueuse éventuellement suivie d'une précipitation effectuée uniquement au moyen de méthanol, éthanol, isopropanol. Il se compose essentiellement des sels de potassium, de sodium, de calcium et de magnésium des esters sulfatés de polysaccharides qui, à l'hydrolyse, donnent du galactose et du 3,6 anhydrogalactose. Le carraghénane ne doit pas être hydrolysé ni avoir subi aucune autre dégradation chimique.

Description physique : Poudre grossière à fine, dont la couleur varie du jaunâtre à l'incolore, pratiquement inodore, avec un goût de mucilage.

Matières volatiles : Pas plus de 12%, après dessiccation à 105°C, pendant 4 heures.

Sulfates : Pas moins de 15% et pas plus de 40% de la matière sèche, exprimés en SO₄.

Cendres insolubles dans l'acide sulfurique à 1 % : Pas plus de 2% de la matière sèche.

Cendres : Pas moins de 15% et pas plus de 40% de la matière sèche, déterminées à 550°C.

Teneur en méthanol, éthanol, isopropanol : Pas plus de 1%, séparément ou ensemble.

Viscosité d'une solution à 1,5% à 75°C : Pas moins de 5cPo.

Annexe 3 : Tableau des principales applications des carraghénanes (Martin, 1984).

Utilisation	Application	Fonctions principales	Doses habituelles d'emploi
Milieux laitiers	Lait concentré	Stabilisation des matières grasses et des protéines	0.01 à 0.02 %
	Lait cacaoté	Empêche la sédimentation du cacao	0.02 à 0.03 %
	Flan préparé à chaud	Structure gélifiée	0.2 à 0.03 %
	Flan préparé à froid	Structure semi-gélifiée	≈ 0.5 % + 0.5 % de pyrophosphate tétrasodique
	Crèmes desserts	Epaississant	0.2 à 0.3 %
	Lait gélifié	Structure gélifiée	0.2 à 0.3 %
	Liégeois	Gel thixotrope	0.3 à 0.4 %
	Glaces	Evite la séparation du petit lait et contrôle du Melt down	0.01 à 0.05 % + autres stabilisateurs
	Boissons lactées en poudre	Donne du corps	0.1 à 0.4 %
	Toppings	Stabilisation de la mousse	0.05 à 0.5 %
Milieux aqueux	Desserts à l'eau (Jellies)	Structure gélifiée	0.8 à 1.2 %
	Confitures basses calories	Structure gélifiée (en substitution de la pectine HM qui ne gélifie pas en milieux peu sucrés)	0.5 à 1 %
	Poudre pour jus de fruits et sirop	Suspension et consistance	0.1 à 0.5 %
	Gels à l'eau	Structure gélifiée	0.8 à 1.2 %
	Sauces	Consistance et suspension	0.4 à 0.6 %

Bibliographie

ARAKAWA, S., OKUMURA, M., YAMADA, S., et al., -Enhancing effect of carrageenan on the induction of rat colonic tumors by 1-2 dimethylhydrazine and its relation to β -glucuronidase activities in feces and other tissues.-, *J. Nutr. Sci. Vitaminol*, 1986, **32**, 481-485.

ARAKAWA, S., ITO, M. Et TEJIMA, S. -Promoter function of carrageenan on development of colonic tumor induced by 1,2-dimethylhydrazine in rats.- *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 1988, **34**, 577-585.

ASLAM, M., BATTEN, J.J., FLORIN, T.H.J, et al., -Hydrogen sulphide induced damage to the colonic mucosal barrier in the rat.-, *Gut*, 1992, **33**, F274.

BARBOLT, T.A., ABRAHAM, R., -The effect of bran on dimethylhydrazine-induced coloncarcinogenesis in the rat.-, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1978, **157**, 656-659.

BAUER, H.G., ASP, N.G., OSTE, R., et al., -Effect of dietary fiber on the induction of colorectal tumors and fecal beta-glucuronidase activity in the rat.-, *Cancer Res.*, 1979, **39**, 3752-3756.

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

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

BIRD, R.P., -Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of coloncancer.-, *Cancer Letters*, 1995, **93**, 55-71.

BRUCE, W.R., MICHAEL, C.A., CORPET, D.E., et al., -Diet, aberrant crypt foci and colorectal cancer.-, *Mutation Research*, 1993, **290**, 111-118.

BURT, R.W., -Cohorts with familial disposition for colon cancers in chemoprevention trials.-, *J Cell. Biochem. Suppl.*, 1996, **25**, 231-135.

CADERNI, G., BIANCHINI, A., MANCINI, M.T. et al., -Effect of dietary carbohydrates on the growth of dysplastic crypt foci in the colon of rats treated with 1,2-dimethylhydrazine.-, *Cancer Res.*, 1991, **51**, 3721-3725.

CADERNI, G., GIANNINI, A., LANCIONI, L., et al., -Characterisation of aberrant crypt foci in carcinogen-treated rats : association with intestinal carcinogenesis.-, *British Journal of Cancer*, 1995, **71**, 763-769.

CHERBUT, C., -Risque inflammatoire intestinal lié à la consommation de carraghénanes.-, 2000, communications personnelles au professeur Corpet D..

CHRISTL, S.U, EISNER, H.D, SCHEPPACH, W et al., -Effect of sodium hydrogen sulfide on cell proliferation of colonic mucosa.-, *Gastroenterology*, 1996, **106**, A664.

- COHEN, S.M., -L'alimentation et le cancer.-, *Pour la science*, 1988, janvier, 20-27.
- COHEN, S.M., NOBUYUKI, I., -A critical review of the toxicological effects of carrageenan and processed eucheuma seaweed on the gastrointestinal tract.-, 2002, 1-70, manuscrit soumis pour publication.
- CORPET, D.E., -Evaluation toxicologique des carraghénanes. Chapitre 5-Interactions entre les carraghénanes et la microflore digestive.- *Sciences et aliments.*, 1984, **4**, 367-374
- CORPET, D.E., -Alimentation et étiologie du cancer du côlon.-, *Cah. Nutr. Diet.*, 1989, **24**, 375-380.
- CORPET, D.E., STAMP, D., MEDLINE, A. et al., -Promotion of colonic microadenoma growth in mice and rats fed cooked sugar or cooked casein and fat.-, *Cancer Res.*, 1990, **50**, 6955-6958.
- CORPET, D.E., -An evaluation of methods to assess the effect of antimicrobial residues on the human gut flora.-, *Vet. Microbiol.*, 1993, **35**, 199-212.
- CORPET, D.E., CASSAND, P., -Lack of aberrant crypt promotion and mutagenicity in extracts of cooked casein, a coloncancer-promoting food.-, *Nutrition and Cancer*, 1995, **24**, 249-256.
- .CORPET, D.E., -Introduction aux modèles utilisés en expérimentation animale.-, *Alimentation et cancer, Paris TEC DOC*, 1996, **14**, 243-254.
- DESHNER, E.E., LONG, F.C., HAKISSIAN, M., et al., -Differential susceptibility of inbred mouse strains forecast by acute colonic proliferative response to methylazoxymethanol.-, *J. Natl. Cancer Inst.*, 1984, **72**, 195-198.
- DUCLUZEAU, R., RAIBAUD, P., CORPET, D., -Acquisitions récentes sur le rôle de la microflore digestive des monogastriques.-, *Dossiers de l'élevage*, 1978, vol 2, **4**, 1-31.
- EKSTROM, L.G, KUIVINEN, J., JOHANSSON G., -Molecular weight distribution and hydrolysis behaviour of carrageens.- *Carbohydrate research*, 1983, **116**, 89-94.
- FREEMAN, H.G, SPILLER, G.A, KIM, Y.S, -A double-blind study on the effects of differing purified cellulose and pectin fiber diets on 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colonic neoplasia.-, *Cancer Res.*, 1980, **40**, 2661-2665.
- FURNE, J.K, SUAREZ, F.L, EWING, S.L., et al., -Binding of hydrogen sulfide by bismuth does not prevent dextran sulfate-induced colitis in rats.-, *Digestive Diseases and Sciences*, 2000, **45**, **7**, 1439-1443.
- GIBSON, G.R., CUMMINGS, J.H., MACFARLANE, G.T., -Use of three-stage continuous culture system to study the effect of mucin on dissimilatory sulfate reduction and methanogenesis by mixed populations of human gut bacteria.-, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1988, **54**, 2750-2755.

- GIBSON, G.R., CHRISTL, S.U, CUMMINGS, J.H., -Role of dietary sulphate in the regulation of methanogenesis in the human large intestine.-, *Gut*, 1992, **33**, 1234-1238.
- GIBSON, G.R., MACFARLANE, S., MACFARLANE, G.T., -Metabolic interactions involving sulphate-reducing and methanogenic bacteria in the human large intestine.-, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 1993, **12**, 117-125.
- GOLDIN, B.R., -Chemicals induction of colon tumors in animals: an overview.-, *Prog. Clin. Biol. Res.*, 1988, **279**, 319-333.
- GRASSO, P., SHARRAT, M., CARPANI, F.M.B, et al., -Studies on carrageen and large-bowel ulceration in mammals.-, *Fd. Cosmet. Toxicol.*, 1973, **11**, 555-564.
- HAENSZEL, W., KURIHARA, M., -Studies of Japanese migrants. Mortality from cancer and other diseases among Japanese in the United states.-, *J. Natl. Cancer Inst.*, 1968, **35**, 291-297.
- HARRIS, P.J., FERGUSON, L.R., -Dietary fiber. Its composition and role in the protection against colorectal cancer.-, *Mutation Research.*, 1993, **290**, 97-110.
- HAZENBERG, M.P., BAKKER, M., VERSHOOR-BUGGRAAF, A., -Effect of the human intestinal flora on germ-free mice, *Journal of applied Bacteriol.*, 1981, **50**, 95-106.
- ISHIOKA, T., KUWABARA, N., OOHASHI, Y. et al., -Induction of colorectal tumors in rats by sulfated polysaccharides.-, *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, 1987, **17**, 215-244.
- KINZLER, K.W., VOGELSTEIN, B., -Lessons from hereditary colorectal cancer.-, *Cell.*, 1996, **87**, 159-170.
- LE-QUINTREC, Y., -Nutrition, acides biliaires et cancer du côlon.-, *Cah. Nutr. Diet.*, 1984, **19**, 151-154.
- LINDBLOM, A., -Different mechanisms in the tumorigenesis of proximal and distal colon cancers.-, *Current Opinion in Oncology*, 2001, **13**, 63-69.
- MARCUS, R., WATT, J., -Seaweeds and ulcerative colitis in laboratory animals.-, *The Lancet.*, 1969, **2**, 7618, 489-490.
- MAGNUSSON, B.A., CARR, I., BIRD, R.P., -Ability of aberrant crypt foci characteristics to predict colonic tumor incidence in rats fed cholic acid.-, *Cancer Research*, 1993, **53**, 449-454.
- MARTIN, G., -Evaluation toxicologique des carraghénanes. Définition, structure, fabrication, propriétés et applications. – *Science des aliments*, 1984, **4**, 335-346.
- MATHESON, H.B, STORY, J.A., -Dietary psyllium hydrocolloid and pectin increase bile acid composition in rats.-, *J. Nutr.*, 1994, **124**(8), 1161-1165.
- MCLELLAN, E.A., BIRD, R.P., -Aberrant crypts : potential preneoplastic lesions in the murine colon.-, *Cancer Res.*, 1988, **48**, 6187-6192.

- NAGENGAST, F.M., -Bile acids and colonic carcinogenesis. *Scand. J. Gastroenterol.*, 1988, **23**, 76-81.
- NAGENGAST, F.M, GRUBBEN, M.J; VAN-MUNSTER, I.P., -Role of bile acids in colorectal carcinogenesis., *European Journal of Cancer*, 1995, **31A**, 1067-1070.
- NAITO, T., KURIKI, S., CHIJIWA, K., et al., -Bile acid synthesis and biliary hydrophobicity during obstructive jaundice in rats.-, *J. Surgical Res.*, 1996, **65**, 70-76.
- ONDERDONK, AB, BARTLETT, JG. -Bacteriological studies of ulcerative colitis.- *Amer J Clin. Nutr.*, 1979, **32**, 258-265.
- PAULSEN, J.E., NAMORK, E., STEFFENSEN, I.L., et al., -Identification and quantification of aberrant crypt foci in the colon of min mice a murine model of familial adenomatous polyposis.-, *Scand J. Gastro.*, 2000, **35**, 534-539.
- PAULSEN, J.E., NAMORK, E., STEFFENSEN, I.L., et al., -Qualitative and quantitative relationship between dysplastic aberrant crypt foci and tumorigenesis in the Min/+ mouse colon.-, *Cancer Res.*, 2001, Jul. 1, **61**, 5010-5015.
- PITCHER, M.C.L., BEATY, E.R, GIBSON, G.R., et al., -Incidence and activities of sulphate-reducing bacteria in patients with ulcerative colitis.-, *Gut*, 1995, **36**, A63.
- PITCHER, M.C.L., CUMMINGS, J.H., -Hydrogen sulfide: a bacterial toxin in ulcerative colitis?-, *Gut*, 1996, **39**, 1-4.
- PITTMAN, K.A., GOLBERG, L., COULSTON, F., -Carrageen : the effect of molecular weight and polymer type on its uptake, excretion and degradation in animals.-, *Fd Cosmet. Toxicol.*, 1976, **14**, 85-93.
- POTTER, J.D., SLATTERY, M.L., BOSTICK, R.M., et al., -Colon cancer: a review of the epidemiology.-, *Epidemiologic Reviews*, 1993, **15**(2), 499-545.
- PRECLAIRE, M., -Initiation et promotion des microadénomes du côlon du rat par un additif géifiant alimentaire : le carraghénane K.-, *Thèse Doct. Vétérinaire, Toulouse, Université Paul Sabatier*, 1996, 4077.
- PRESCOTT, D.H., FLEXER, A.S., -In cancer : The misguided cell.- *Sinauer Association Inc., Publisher. Massachusetts.*, 1982, 27-48.
- PRETLOW, T.P., BRASITUS, T.A., FULTON, N.C., et al., -K-ras mutations in putative preneoplastic lesions in human colon.-, *Journal of the National Cancer Institute*, 1993, **85**, 2004-2007.
- RAFTER, J.J., ENG, V.W., MEDLINE, A., et al., -Effects of calcium and pH on the mucosal damage produced by deoxycholic acid in the rat colon.-, *Gut*, 1986, **27**, 1320-1329.
- REDDY, B.S., NARISAWA, T., VURKUSICH, D., WEISBURGER, J.H. et WYNDER, E.L., -Effect of quality and quantity of dietary fat and dimethylhydrazine in coloncarcinogenesis in rats.- *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1976, **151**, 237-239.

REDDY, B.S., EKELUND, G., BOHE, M., -Metabolic epidemiology of coloncancer : dietary pattern and fecal sterol concentrations of three populations.-, *Nutr. Cancer*, 1983, **5**, 34-40.

RIBOLI, E., DECLOITRE, F., -Introduction à l'étude des relations entre alimentation et cancer.-, *Alimentation et cancer.*, Paris TEC DOC, 1996, **1**, 3-18.

RIBOLI, E., -Cancer du colon et du rectum.-, *Alimentation et cancer.*, Paris TEC DOC, 1996, **7**, 127-138.

ROEDIGER, W.E.W, DUNCAN, A., KAPANIRIS, O. et al., -Reducing sulfur compounds of the colonimpair colonocyte nutrition : implication for ulcerative colitis.-, *Gastroenterology*, 1993, **104**, 802-809.

ROEDIGER, W.E.W, DUNCAN, A., KAPANIRIS, O. et al., -Sulphide impairment of substrate oxidation in rat colonocytes : a biochemical basis for ulcerative colitis?-, *Clin. Sci.*, 1993, **85**, 623-627.

RONCUCCI, L., STAMP, D., MEDLINE, A., et al., -Identification and quantification of aberrant crypt foci and microadenomas in the Human Colon.-, *Human pathology*, 1991, **22**, 287-294.

RUSTIA, M., SHUBIK, P., PATIL, K., -Lifespan carcinogenicity tests with native carrageenan in rats and hamsters.-, *Cancer letter.*, 1980, **11**, 1-10.

SNOEREN, T.H.M., -Kappa carageenan. A study on its physico-chemical properties. Sol gel transition with milk proteins. *Nizo Verslagen*, 1976, 174.

STAMP, D., BRUCE, W.R., ARCHER, M.C., -Sucrose enhancement of the early steps of coloncarcinogenesis in mice.-, *Carcinogenesis*, 1993, **14**, 777-779.

STANLEY, N.F., RENN D.W., -Estimation of molecular weight distribution of carrageenans by electrophoresis in rehydrated Agarose gel.- *Proceeding of the 8th International Seaweed Symposium*, bangor, Wales, 1974.

STOKKE, B. T., ELGAESTER, A., -Conformation, order-disorder conformational transitions and gelation of non-crystalline polysaccharides studied using electron microscopy.- *Micron*, 1994, **25**, 469-491.

SUAREZ, F., FURNE, J., SPRINGFIELD, J., et al., -Production and elimination of sulfur-containing gases in the rat colon.-, *Am. J. Physiol.*, 1998, **274** (37), G727-G733.

TACHE, S., PEIFFER, G, CORPET, D.E., et al. -Carrageenan gel and aberrant crypt foci in the colon of conventional and humen-flora-associated rats.-, *Nutrition and cancer*, 2000, **37**(2), 75-80.

TANG, Z.C., SHIVAPURKAR, N., FROST, A. et al., -The effect of dietary fat on the promotion of mammary and coloncancer in a dual-organ rat carcinogenesis model.-, *Nutrition and cancer*, 1996, **25**, 151-159.

TONZETICH, J., NG, W., -Effect of hydrogen sulphide and methyl mercaptan on permeability of oral mucosa.-, *J. Dental. Res.*, 1984, **63**, 994-997.

VIVONA, A.A., SHPITZ, B., MEDLINE, A., et al., -K-ras mutations in aberrant crypt foci, adenomas and adenocarcinomas during azoxymethane-induced colon carcinogenesis.-, *Carcinogenesis*, 1993, **14**, 1777-1781.

WARGOVICH, M.J., HARRIS, C., CHEN, C.D, et al., -Growth kinetics and chemoprevention of aberrant crypt in the rat colon.-, *Journal of Cellular Biochemistry*, 1992, **Suppl 16G**, 51-54.

WATANABE, K., REDDY; B.S., WONG, C.Q. et WEISBURGER, J.H., -Effect of dietary undegraded carrageenan on colon carcinogenesis in F344 rats treated with azoxymethane or methyl nitrosourea.-, *Cancer Res*, 1978, **38**, 4427-4430.

WEINBERG, R., -L'apparition des cancers.-, *Pour la science, n° spécial*, 1996, **229**, 34-42.

WILPART, M., ROBERFROID, M., -Effect of secondary bile acids on the mutagenicity of MNNG, 2AAF, and 2nitrofluorene towards *Salmonella typhimurium* strains.-, *Carcinogenesis*, 1986, **7**, 703-706.

YAMADA, Y., YOSHIMI, N., HIROSE, et al., -Sequential analysis of morphological and biological properties of beta-catenin-accumulated crypts, provable premalignant lesions independent of aberrant crypt foci in rat colon carcinogenesis.-, *Cancer Res.*, 2001, **61**, 1874-1878.

YAMADA, Y., YOSHIMI, N., HIROSE, Y., et al., -Frequent beta-catenin gene mutations and accumulations of the protein in the putative preneoplastic lesions lacking macroscopic aberrant crypt foci appearance, in rat colon carcinogenesis.-, *Cancer Res.*, 2000, **60**, 3323-3327.

ZHANG, X.M., STAMP, D., MINKIN, S., et al., -Promotion of aberrant crypt foci and cancer in rat colon by thermolyzed protein.-, *Journal of the National Cancer Institute*, 1992, **84**, 1026-1030.

Toulouse, 2002

NOM : VERHAEGHE

PRENOM : ERIC

TITRE : Carraghénanes et cancer du côlon : étude expérimentale chez des rats à flore humaine. Mécanismes d'action.

RESUME :

Nous avons étudié l'effet cancérigène des carraghénanes (ou E407), un additif alimentaire, chez des rats F344 axéniques associés à une microflore intestinale humaine. Pour cela nous avons dénombré au microscope le nombre de foyers de cryptes aberrantes sur les côlons des rats. Les rats utilisés dans l'expérience d'initiation ont été abattus au bout de 28 jours après avoir reçu pendant 8 jours des carraghénanes à 10%. Ceux de l'expérience de promotion ont été sacrifiés au bout de 100 jours après initiation à l'AOM, et ont reçu des carraghénanes à 0%, 0,25% ou 2,5% dans l'eau de boisson durant ces 100 jours. Nous n'avons pas mis en évidence d'effet initiateur ou promoteur des carraghénanes sur la cancérogenèse colique de rats à flore humaine.

Toutefois des effets promoteurs ont été précédemment observés chez des rats conventionnels. L'action de la flore intestinale spécifique semble donc impliquée, et son effet sur le métabolisme de différents composés est discuté dans la thèse.

MOTS-CLES : Carraghénanes, cancérogenèse, côlon, flore intestinale, rats, microadénome.

ENGLISH TITLE : Carrageenans and colon cancer : experimental study in human-flora-associated rats. Mechanisms.

ABSTRACT :

We studied the putative carcinogenic effect of carrageenan (or E 407) in germfree F344 rats associated with human flora (HFA rats). We counted using the microscope, we scored the aberrant crypt foci number in rats colon. The rats used in the initiation study were sacrificed 28 days, after receiving 10% carrageenan gel for 8 days. The rats used in the promotion experiment were sacrificed 100 days after initiation with AOM. They received 0%, 0,25% or 2,5% carrageenan in drinking water for 100 days. We didn't find any initiating nor promoting effect of carrageenan in HFA rats colon carcinogenesis.

However, promoting effects have already been shown in conventional rats. The specific fecal flora seems to be involved, and its effect on several compounds' metabolism is discussed in the thesis.

KEY WORDS : Carrageenans, carcinogenesis, colon, gut flora, rats, microadenoma.