

2m11.2894.11

Université de Montréal

**Modulation du renouvellement et de la différenciation des cellules
cancéreuses du côlon par des composants du lait**

Par

Monica Lannes

Département de Nutrition

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures en vue de l'
obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en nutrition

Novembre, 2000

©Monica Lannes, 2000



Q11

145

158

2001

N.005

Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Modulation du renouvellement et de la différenciation des cellules
cancéreuses du côlon par des composants du lait**

Présenté par :

Monica Lannes

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Michèle Houde-Nadeau

Dr Ernest G. Seidman

Dr Marc Prentki

Sommaire

Dans les dernières années, des études épidémiologiques ont suggéré un rôle bénéfique du lait et des produits laitiers dans la prévention du cancer du côlon. La découverte récente que certains composants présents dans les lipides du lait pourraient avoir un effet anticancéreux a contribué à attirer l'attention de plusieurs chercheurs sur ces nutriments, plus spécifiquement l'acide linoléique conjugué, le butyrate, la sphingomyéline et la carnitine.

L'hypothèse que ces composants laitiers, seuls ou en combinaison, puissent affecter le renouvellement et la différenciation des cellules cancéreuses du côlon humain a été testée. De plus, nous avons aussi examiné les mécanismes moléculaires qui pouvaient potentiellement être associés aux effets qu'ont ces composants sur les cellules épithéliales intestinales.

Pour évaluer la contribution de ces nutriments dans la modulation de la carcinogenèse colorectale, un modèle *in vivo* avec les souris C57BL/6J et deux modèles *in vitro* : une lignée bien établie de cellules cancéreuses du côlon humain – Caco-2, et une lignée de cellules non transformées de la crypte intestinale humaine – HIEC, ont été choisis. *In vitro*, l'effet de ces facteurs sur la prolifération cellulaire a été mesuré à travers l'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN. La différenciation cellulaire a été déterminée par le test d'activité spécifique de la sucrase. L'apoptose cellulaire a été détectée par le critère morphologique et a été quantifiée via cytométrie en flux. Pour examiner les mécanismes moléculaires, le test de transfert par Western Blot a été utilisé pour dépister les protéines cyclooxygénase-2 et poly (ADP-ribose) polymérase exprimées par les cellules traitées ou non avec les composants laitiers. Chez les souris, l'effet de la supplémentation de la diète en carnitine sur sa concentration dans la muqueuse colique et aussi sur l'activité de l'enzyme carnitine

acetyltransférase, a été déterminé. Les résultats ont été analysés statistiquement par ANOVA, suivi d' un test de t pour des comparaisons entre 2 groupes.

Nous avons démontré que l' acide linoléique conjugué, le butyrate, la sphingomyéline et la carnitine, en concentrations physiologiques, présents dans le lait, sont capables d' inhiber significativement la croissance des cellules Caco-2. Un effet additif a été observé avec la combinaison butyrate + carnitine. En revanche, ces nutriments n' ont pas empêché la prolifération des cellules non transformées HIEC. Ils ont même stimulé leur croissance. Nous avons aussi démontré que le butyrate et la sphingomyéline sont capables d' induire la différenciation des cellules Caco-2. L' effet inducteur de l' apoptose par le butyrate, la carnitine, et les deux en combinaison a été constaté chez les Caco-2. La dégradation de la protéine poly(ADP-ribose)polymérase en réponse au traitement des cellules Caco-2 avec le butyrate a indiqué l' activation de la voie de signalisation des caspases impliquées dans la mort cellulaire programmée. Au niveau moléculaire, l' expression de la protéine cyclooxygénase-2 par les cellules Caco-2 a été diminuée significativement en présence de butyrate et d' acide linoléique conjugué, ce qui peut expliquer, en partie, leur effet anticancéreux. *In vivo*, après la supplémentation en carnitine, les concentrations de cette dernière dans la muqueuse colique avaient augmentées, et aussi l' activité de l' enzyme carnitine acetyltransférase était préservée. Ces observations appuient l' hypothèse selon laquelle la carnitine puisse favoriser l' effet anti-carcinogénique du butyrate, via la formation de butyrylcarnitine.

En résumé, cette étude démontre que les composants lipidiques du lait peuvent affecter le renouvellement et la différenciation des cellules cancéreuses et soutiennent le rôle protecteur de ces nutriments contre la carcinogenèse colorectale.

Table de matières

Identification du jury	i
Sommaire	ii
Table de matières	iv
Liste des tableaux	vi
Liste des figures	vii
Liste des abréviations	x
Annexes	xii
Remerciements	xiii
Dédicace	xiv
I- Introduction	1
1.0 - Épidémiologie du cancer du côlon	1
2.0 - L' alimentation et le cancer du côlon	2
2.1 - Facteurs nutritionnels associés à une augmentation de tumeurs colorectales	2
2.1.1 - Rôle des graisses	2
2.1.2 - Rôle des viandes et des protéines	3
2.1.3 - Rôle des calories et de l' obésité	4
2.1.4 - Rôle de l' alcool	5
2.1.5 - Rôle du sucre et des hydrates de carbone	5
2.1.6 - Rôle du fer	6
2.2 - Facteurs nutritionnels associés à une diminution du risque de tumeur colorectale	6
2.2.1 - Effet protecteur des fibres alimentaires	6
2.2.2 - Rôle protecteur du calcium et de la vitamine D	8
2.2.3 - Effet protecteur des vitamines et des antioxydants	9
2.2.4 - Rôle protecteur des folates	10
2.2.5 - Effet protecteur du café	10
3.0 - Potentiel anticancéreux du lait et des produits laitiers	10

4.0	- Biologie cellulaire : l' entérocyte et le cancer	11
	4.1 - Prolifération et différenciation des cellules de la muqueuse épithéliale intestinale	11
	4.2 - Aspects de la biologie moléculaire du cancer	13
	4.2.1 - Régulation du cycle cellulaire	14
	4.2.2 - L' apoptose, un moyen de prévenir la malignité	17
5.0	- Composants lipidiques du lait comme facteurs antinéoplasiques	20
	5.1 - Le butyrate	20
	5.2 - L' acide linoléique conjugué (CLA)	22
	5.3 - La sphingomyéline	29
	5.4 - La carnitine	32
6.0	- Stratégie pour la prévention primaire : bénéfiques des nutriments pour combattre le cancer colorectal	33
7.0	- Description du projet de recherche	34
	7.1 - Les objectifs	34
	7.2 - Le modèle <i>in vitro</i>	34
	7.3 - Les méthodes	35
II-	Présentation des articles	38
	Modulation of Caco-2 cell turnover and differentiation by milk fat components	39
	Carnitine enhances the antitumoral effects of butyrate on human colon cancer cells	74
III-	Discussion et conclusion générales	102
IV-	Bibliographie	110

Liste des tableaux

Tableau 1. Concentrations représentatives de CLA dans divers aliments.	24
--	----

Tableaux utilisés dans l' article intitulé : « Carnitine enhances the antitumoral effects of butyrate on human colon cancer cells»

Tableau 1. Effect of feeding milk fat with and without carnitine on carnitine levels in colonic tissue.	93
---	----

Tableau 2. Carnitine acetyltransferase (CAT) activity in colons of mice fed with different diets for 49 weeks.	93
--	----

Liste des figures

Figure 1 - Modèle d'organisation de l'épithélium intestinal.	12
Figure 2 - Interactions entre cyclines et CDK's durant le cycle cellulaire	16
Figure 3 - Représentation schématique des événements apoptotiques.	19
Figure 4 - Biosynthèse des prostaglandines par des cyclooxygénases.	27
Figure 5 - Métabolisme des sphingolipides.	30
Figure 6 - Effets possibles des sphingolipides sur la carcinogenèse colorectale.	31
Figure 7 - Modèle pour la prévention du cancer du côlon par les composants lipidiques du lait.	108

Figures utilisées dans l' article intitulé : « Modulation of Caco-2 cell turnover and differentiation by milk fat components »

Figure 1. Effect of conjugated linoleic acid on human colorectal carcinoma Caco-2 cell proliferation	64
Figure 2. Effect of conjugated linoleic acid, butyrate and sphingomyelin on nontransformed human intestinal epithelial HIEC cell proliferation	65
Figure 3. Effect of conjugated linoleic acid and butyrate on human colorectal carcinoma Caco-2 cell proliferation	66
Figure 4. Effect of sphingomyelin on human colorectal carcinoma Caco-2 cell proliferation	67
Figure 5. Effect of conjugated linoleic acid, butyrate and sphingomyelin on human colorectal carcinoma Caco-2 cell differentiation	68 69
Figure 6. Effect of butyrate on human colorectal carcinoma Caco-2 cell death.	70
Figure 7. Morphological signs of apoptosis : Hoechst nuclear stain in Caco-2 cells.	71
Figure 8. Cyclooxygenase-2 expression on conjugated linoleic acid and butyrate treated caco-2 cells.	72
Figure 9. Poly-(ADP-ribose) polymerase degradation induced by butyrate treated Caco-2 cells.	73

Figures utilisées dans l' article intitulé : « Carnitine enhances
the antitumoral effects of butyrate on human colon
cancer cells»

Figure 1. Effect of butyrate and carnitine, alone	94
and in combination, on Caco-2 cell proliferation	95
Figure 2. Effect of butyrate and carnitine, alone	96
and in combination, on Caco-2 cell apoptosis and	97
cell death.	98
Figure 3. Morphological assessment of the effect	99
of the combination of butyrate and carnitine on	
caco-2 cell apoptosis.	
Figure 4. Effect of caspase inhibition on the	100
induction of Caco-2 cell apoptosis by butyrate and	101
carnitine, alone or in combination.	

Liste des abréviations

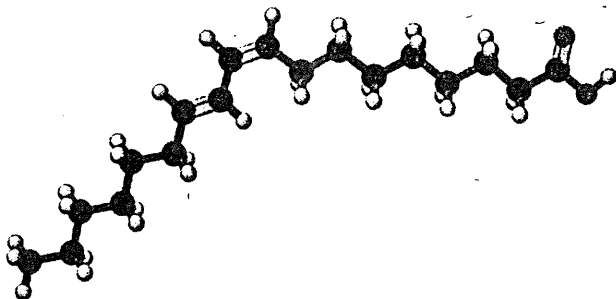
AA	- acide arachidonique
AGCC	- acides gras à chaîne courte
AIF	- facteur inducteur de l'apoptose
AOM	- azoxyméthane
Caco-2	- lignée des cellules épithéliales humaines, dérivées d'un cancer du côlon
CAT	- carnitine acétyltransférase
Cdk	- protéine kinase cycline dépendant
CLA	- acide linoléique conjugué
Cox	- cyclooxygénase
DNA-PK	- ADN protéine kinase
DMBA	- diméthylbenzo(α)anthracène
Fas L	- ligand du récepteur Fas
HIEC	- lignée des cellules épithéliales humaines non transformées, dérivées de la crypte du petit intestin
IFN- γ	- interféron γ
IGF-1	- facteur insulino-mimétique 1
IL-1 β	- interleukine 1 β
LA	- acide linoléique
MAPK	- protéine kinase activatrice de la mitose
MEM	- milieu minimal essentiel de Eagle
MPF	- facteurs promoteurs de la mitose
NSAIDS	- médicaments anti-inflammatoires non stéroïdes
NuMa	- nuclear mitotic apparatus protein
PARP	- poly (ADP-ribose) polymérase
PGs	- prostaglandines
PI	- iodure de propidium
PKC	- protéine kinase C
PPAR	- peroxisome proliferator activated receptor
Rb	- produit du gène rétinoblastoma
SM	- sphingomyéline

Sp	- sphingosine
SREBPs	- sterol regulatory element binding proteins
SVF	- sérum de veau fœtal
TBST	- tampon salin de Tris et Tween 20
TNF α	- facteur de nécrose tumorale α
TPA	- 12-0-tetradecanoy-phorbol-13-acetate
TXA	- thromboxane A
$\Delta\Psi_m$	- perméabilité transmembranaire mitochondriale

Annexes

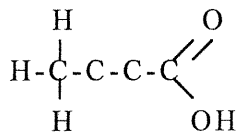
Structures moléculaires

Acide linoléique conjugué

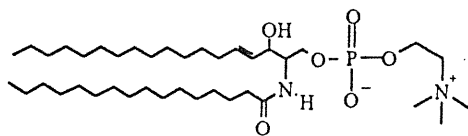


9-cis, 11-trans CLA

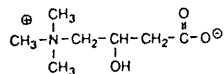
Butyrate



Sphingomyéline



Carnitine



Remerciements

Mes sincères remerciements à mon directeur de recherche, le Dr Ernest G. Seidman, pour la confiance et la motivation exprimées dès le début de ma maîtrise. Je le remercie aussi pour les nombreuses connaissances qu'il m'a transmises ainsi que pour son exemple de compétence, persévérance et détermination. J'ai eu la chance de faire partie de son équipe de recherche, où l'on jouit d'une ambiance de travail optimiste et enrichissante, importante pour ma formation autant professionnelle que personnelle.

Je voudrais souligner ma grande reconnaissance à Denise Levesque pour son appui constant, que ce soit lié à l'enseignement de techniques de laboratoire ou au soutien moral, indispensable pour ma réussite.

Je remercie beaucoup mes collègues Serge Dionne, George Marx et Sandra Bernotti pour toute l'aide et la collaboration dont ils ont fait preuve.

Je remercie également Anne Duhaime, Carole Garofalo, Sylvain Brunet et Stéphane Pinsonneault pour toute leur assistance.

À mes amis, Flavia Oliveira et Paulo Ferreira, qui m'ont toujours soutenu. Un grand merci.

Un remerciement affectueux à Mauricio De Maria, pour son amour et sa compréhension.

Je désire enfin remercier chaleureusement ma famille : mon frère Antonio Jr et mes parents, Magali et Antonio Lannes, pour leur amour et leurs encouragements tout au long de ma vie académique.

*« Voici le commencement de la sagesse :
Acquiers la sagesse,
et avec tout ce que tu possèdes
Acquiers l' intelligence. »*

Pr. 4, 7.

Introduction

1) *Épidémiologie du cancer du côlon*

Le cancer du côlon est un facteur important de morbidité et de mortalité dans les sociétés occidentales. Aux États Unis, il représente la deuxième cause de mortalité due au cancer (1) et il est le troisième type de néoplasme le plus commun tant chez les femmes que chez les hommes (2). Pour l'année 2000, approximativement 130000 nouveau cas auront été diagnostiqués, et plus de 56000 décès auront été causés par cette maladie (1).

Les statistiques canadiennes ne sont pas différentes : le cancer colorectal constitue le deuxième cancer en importance et on estime à près de 16600 le nombre de nouveaux cas en 1999, et 6300 décès dus aux tumeurs du côlon (3).

Une interaction entre des facteurs environnementaux et génétiques semble être impliquée dans l'étiologie de cette maladie.

Une incidence élevée a lieu en Amérique du Nord, Grande-Bretagne et certaines régions de l'Europe, une basse incidence est rencontrée en Amérique du Sud, Asie et Afrique (4,5). Les études de migration ont démontré qu'il y a une augmentation du risque du cancer de côlon chez les populations qui ont migré des régions de basse incidence (Japon, Chine) vers des régions de haute incidence (États-Unis) (6,7), ce qui suggère une forte influence des facteurs environnementaux.

Plusieurs études épidémiologiques ont démontré que des facteurs diététiques sont associés à un risque augmenté du cancer du côlon. Des facteurs diététiques et nutritionnels jouent un rôle très important spécialement dans les cancers du poumon, prostate, sein

et côlon. La diète est estimée être associée au développement de 35 à 65% de tous les cancers aux États-Unis (8).

2) *L' alimentation et le cancer du côlon*

Un grand nombre d' études cas-témoins ou de cohorte ont tenté de démontrer la relation entre l' alimentation et le cancer colorectal depuis les années soixante. Le rôle protecteur des fibres alimentaires, des légumes verts, des fruits, du calcium, des vitamines A, C, D et E, de la beta-carotène, du café, et des folates est très souvent mis en évidence. Tandis que les graisses, les viandes, un apport calorique élevé, l' alcool et le tabac semblent favoriser le développement du cancer du côlon.

2.1) *Facteurs nutritionnels associés à une augmentation des tumeurs colorectales*

2.1.1) Rôle des graisses

Plusieurs revues de la littérature scientifique ont fait le point sur les relations entre les lipides et le cancer colorectal. Dans la revue de Potter et al (9), sur 23 études, 11 ont démontré une association positive entre la consommation de lipides et le risque de cancer, tandis que les autres ne mettent en évidence aucune association significative. En ce qui concerne les études de cohorte, deux sur huit mettent en évidence une association positive et significative entre consommation de graisses et risque de cancer. La majorité ne mettent en évidence aucun lien significatif tandis qu'un effet inverse est observé dans une étude (10).

Les lipides saturés sont le plus souvent concernés. Dans des études cas- témoins c'est essentiellement la consommation de matières grasses animales ajoutées à l' alimentation qui était associée au risque de cancer colorectal (11,12). Une consommation élevée d' acide gras polyinsaturés de type linoléique (oméga 6) semble augmenter le risque de cancer du sein, du colon et peut-être de la prostate (13) tandis que celle d' acide gras polyinsaturés de type omega-3 et aussi d' acide gras monoinsaturés comme l' acide oléique (omega-9) semble être protectrice (13,14). Cet effet différentiel des types de graisses a été trouvé dans les modèles animaux et dans les études cliniques chez l' humain. Des études épidémiologiques et cliniques montrent une association inverse entre risque de cancer colorectal et consommation de poisson et d' huile de poisson (n-3), suggérant un effet protecteur remarquable de ces aliments sur la cancérogenèse (15).

En ce qui concerne les adénomes, cinq études sur sept constatent un risque élevé chez les consommateurs de graisses. Il s' agissait dans la plupart des cas des graisses saturées (10).

2.1.2) Rôle des viandes et des protéines

La relation positive entre consommation de viande et risque de cancer colorectal a été observée dans plusieurs études. Le type de viande et le type de cuisson semblent jouer un grand rôle. Une étude prospective menée par des infirmières américaines suggère qu'une forte consommation de viande rouge soit un facteur de risque et, qu'à l' inverse, les forts consommateurs de poisson et de poulet sont à bas risque (16). Il est cependant important de souligner que cet effet possible néfaste de la viande rouge ne surviendrait que pour des consommations quotidiennes supérieures à 133g.

En ce qui concerne les adénomes, les études démontrent une relation positive avec la consommation de viande de bœuf, de porc et de mouton. Ces études ont aussi démontré un effet protecteur avec les crustacés et le poisson. Plusieurs études soulignent le rôle potentiellement néfaste des charcuteries. Il a été suggéré que les agents de conservations de type nitrite puissent augmenter le risque de cancer colorectal par le biais de la formation intracolique de composés nitrés. Il a également été suggéré que la cuisson des aliments en particulier celle des graisses et des viandes entraîne la production de composés carcinogènes ou co-carcinogènes (17). Une étude suédoise a observé un risque relatif de cancer du côlon de 2,7 pour les consommateurs réguliers de viande longtemps cuite dans la graisse, et un risque relatif de cancer du rectum encore plus élevé à 6,0 (18).

2.1.3) Rôle des calories et de l'obésité

La plupart des études ont mis en évidence une association positive entre apport calorique élevé et risque de cancer colorectal (19,20). Une telle association a également été observée pour les adénomes.

Des études de corrélation avaient observé un risque élevé de cancer colorectal chez les sujets obèses (surtout avec une obésité du type abdominale). Ceci a été confirmé par de nombreuses études cas-témoins (20). La sédentarité joue également un rôle favorisant vis-à-vis des tumeurs colorectales. Selon des hypothèses récentes, ces facteurs pourraient agir en tant que facteurs promoteurs de la cancérogenèse par le biais de l'hyperinsulinémisme et/ou de la résistance à l'insuline. L'insuline est en effet un facteur de croissance des cellules épithéliales de la muqueuse, et a été trouvé mutagène de cellules de carcinome du côlon *in vitro*. Les cellules cancéreuses du côlon ont des récepteurs de type IGF-1 (facteur

insulinomimétique – 1). Dans le cas de hyperinsulinémie, l'insuline serait capable de se lier aux récepteurs IGF-1 et de les activer.

2.1.4) Rôle de l'alcool

Une méta-analyse récente a démontré un lien statistiquement significatif mais faible entre le cancer colorectal et la consommation d'alcool, quel que soit le type d'alcool, bien que l'association avec la bière soit un peu plus forte qu'avec le vin ou les spiritueux (21). Il semble que l'alcool interviendrait à une étape de promotion du cancer. Il a été suggéré que l'éthanol a une action directe sur la flore intestinale, avec production de divers métabolites, en particulier des concentrations élevées d'acétaldéhyde.

2.1.5) Rôle du sucre et des hydrates de carbone

Dans une étude récente, Bostick et al.(22) ont souligné que sur 14 études consacrées à l'effet du sucre sur le risque de tumeurs intestinales, 12 ont mis en évidence une association positive, statistiquement significative pour sept d'entre elles. La plupart des études cas-temoin réalisées ont également observé une association positive entre la consommation des produits céréaliers raffinés et le risque de cancer colorectal. La consommation de pâtes ou de riz, de pain ou de polenta, de pâtisseries ou de féculents en général a été associée à un risque accru de cancer colorectal. Les mécanismes invoqués pour expliquer ces associations comportent en particulier l'hyperinsulinémisme.

2.1.6) Rôle du fer

Il a été suggéré que la formation des radicaux libres joue un rôle dans la cancérogenèse, et que le fer non absorbé, résultant d'une alimentation riche en viandes, pourrait favoriser la production des radicaux libres. Des études récentes portant sur un nombre élevé de sujets confirme une association modeste entre ferritinémie élevée et/ou consommation élevée de fer, et le risque d' adénome colorectal (23,24).

2.2) *Facteurs nutritionnels associés à une diminution du risque de tumeurs colorectales*

2.2.1) Effet protecteur des fibres alimentaires

Un grand nombre d' études épidémiologiques ont démontré qu'une diète riche en fibres réduit l' incidence du cancer du côlon. La plus forte évidence appuyant cette hypothèse a été établie par le remarquable effet protecteur des fibres alimentaires dans les études de corrélation et de cas-témoin, menées auprès de diverses populations avec différents types de diètes, et le cancer colorectal. Trois analyses combinées ou méta-analyses des études cas-témoins étaient aussi en faveur d' un effet protecteur des fibres contre la carcinogenèse du côlon (25,26,27). Ces études suggèrent une réduction moyenne de 50% du risque de développer un cancer colorectal pour le groupe ayant un apport en fibres plus élevé comparativement à celui ayant une consommation plus faible.

Des études prospectives menées auprès de populations spécifiques aux États-Unis sont venues controverser cette hypothèse. Elles n'ont pas confirmé le rôle protecteur des fibres sur le développement du

cancer du côlon (28). La contradiction des résultats peut être expliquée par le grand nombre de variable, comme la source des fibres (végétaux, produits céréaliers de grains entiers, fruits, légumes, etc.), et aussi l'effet des autres composants anti-carcinogéniques comme les vitamines antioxydantes et les folates.

Trois études randomisées et contrôlées chez l'humain ont démontré un effet protecteur significatif d'un supplément de fibres (la majorité avec le son de blé) (29,30,31). Cependant deux autres études n'ont trouvé aucun lien entre la consommation de fibres et l'incidence de cancer colorectal (32,33). Dans la plus grande intervention publiée jusqu'ici (Australian Polyp Prevention Project, n = 424), une diète faible en lipides et riche en fibres a prévenu la récurrence d'adénomes (31). Cinq autres études randomisées et contrôlées à double insu sont en train de se faire aux États-Unis et en Europe pour éclairer l'effet des fibres dans le développement du cancer colorectal (28).

Plusieurs mécanismes d'action des fibres sur la carcinogénèse intestinale ont été suggérés, parmi eux :

- Augmentation du bol fécal : dilution des carcinogènes potentiels ; diminution du temps de transit alimentaire (moins de temps de contact avec la substance carcinogène).
- Liaison avec des substances cancéreuses.
- Liaison avec des acides biliaries : diminution de la concentration fécale des acides biliaries ; prévention de la conversion des acides biliaries primaires en acides biliaries secondaires.
- Diminution du pH : réduction de la solubilité des acides biliaries libres ; inhibition de l'enzyme responsable de la

conversion des acides biliaires primaires en secondaires ; l'acidification intestinale augmente aussi la disponibilité du calcium pour interagir avec des acides biliaires et des acides gras libres, en réduisant leurs effets sur la muqueuse colorectale.

- Altération de la flore bactérienne : inhibition des enzymes microbiennes liées à l'activation des carcinogènes ; changements des espèces de bactéries ; stimulation de la croissance bactérienne, ce qui augmente le bol fécal.

- Fermentation par la flore bactérienne et production des acides gras à chaîne courte (AGCCs) : inhibition de la prolifération des cellules malignes, induction de la différenciation, induction de l'apoptose, modulation de l'expression génique.

- Prévention de la résistance à l'insuline et hyperinsulinémie.

2.2.2) Rôle protecteur du calcium et de la vitamine D

L'effet bénéfique du calcium dans la prévention du cancer colorectal a été vérifié dans un grand nombre d'études *in vivo*. Chez les modèles animaux, le calcium en supplément réduit l'hyperprolifération de l'épithélium du côlon et réduit la formation de tumeurs en réponse à des carcinogènes (34). D'après quelques études, menées chez des humains ayant une prise élevée de calcium via diète ou supplément, on a remarqué une diminution de la prolifération des colonocytes, des changements dans la composition de la bile ou une diminution de la cytotoxicité de l'excrétion fécale (35-39). La plupart des études cas-témoins et des études prospectives chez les humains démontre une association inverse entre les diètes riches en calcium ou le calcium en supplément et le risque de cancer du côlon ou d'adénomes, toutefois cette association est statistiquement significative seulement dans très peu d'études

(34,40,41). Dans une étude récente, 930 patients ayant une histoire d' adénome ont été randomisés pour recevoir un supplément quotidien de calcium (1200mg) ou placebo. Des colonoscopies faites un et quatre ans après le début de l' étude ont démontré une diminution modérée et significative de la formation de nouveaux adénomes chez le groupe recevant le calcium en supplément (42).

Il a été suggéré que le calcium provenant des sources alimentaires se lie aux acides gras et aux acides biliaires dans la lumière intestinale, favorisant leur conversion en complexes insolubles, incapables de stimuler la prolifération épithéliale. Le calcium provoque une augmentation de l' excrétion du phosphate et des acides biliaires et aussi modifie la quantité des acides biliaires dans la bile. En plus, le calcium présent dans les produits laitiers est capable de précipiter des substances cytotoxiques présentes dans le lumen, en inhibant leurs effets sur la muqueuse du côlon.

Des études épidémiologiques et cliniques suggèrent que la prise de vitamine D puisse aussi protéger contre le cancer du côlon. Une étude cas- témoin (43) et trois études prospectives (44-46) appuient cette hypothèse.

2.2.3) Effet protecteur des vitamines antioxydants

Il a été suggéré par des études expérimentales chez l' animal et par quelques études cas-témoin chez l' homme que les vitamines A, C, E, que la bêta carotène et que les minéraux (sélénium) ont un effet antioxydant qui pourrait diminuer le risque de tumeurs colorectales (10). Ces vitamines pourraient réduire la mutagenèse fécale, mais les résultats disponibles sont discordants.

2.2.4) Rôle protecteur des folates

Des études épidémiologiques suggèrent une réduction d' approximativement 40% du risque de néoplasmes colorectales chez les individus dont la prise d' acide folique est élevée par rapport aux individus dont la prise est basse (47,48). Les études *in vivo* appuient aussi un rapport de cause à effet entre déficience en folate et carcinogenèse colorectale (49,50). Il a été suggéré que les folates agissent sur la dysméthylation de l' ADN à un stade précoce de la cancérogenèse.

2.2.5) Effet protecteur du café

Trois études ont mis en évidence une relation inverse entre consommation de café et risque de cancer ou d' adénomes colorectaux (10). Le mécanisme impliqué pourrait être dû à une réduction de l' excrétion fécale du cholestérol.

3.0) *Potentiel anticancéreux du lait et des produits laitiers*

La consommation du lait et des produits laitiers est associée à une diminution de l' incidence de cancer du côlon dans la plupart des études épidémiologiques (51). Puisque ces aliments sont riches en calcium, la majorité des recherches s' est concentrée sur ce micronutriment.

En 1984, Newmark et al ont suggéré un mécanisme protecteur basé sur la capacité du calcium à se lier aux acides gras de chaîne longue et aux acides biliaires, en les rendant biologiquement inactifs (52). Ils ont suggéré que la présence de ces substances puisse irriter les colonocytes, en déclenchant une prolifération cellulaire excessive.

Cette théorie a généré un grand nombre d' études animales et humaines, en utilisant une diversité des suppléments de calcium.

Van Der Meer et al, dans un étude clé, a démontré que la précipitation des acides biliaires implique non seulement le calcium mais aussi un complexe de calcium et phosphate (53). Cette découverte a favorisé la consommation du lait et des produits laitiers puisque ces aliments contiennent des quantités équivalentes de calcium et de phosphate.

De plus, Rafter et al ont observé que le changement d' une diète riche à une diète exempte de produits laitiers chez les individus sains augmentait significativement la cytotoxicité de l' excrétion de l' eau fécale, un marqueur de risque acceptable pour le cancer du côlon (54).

L' indication que d' autres composants présents dans les lipides du lait et des produits laitiers pouvaient avoir un rôle anticarcinogénique, a été suggérée récemment (55). Les composants comme l' acide linoléique conjugué, le butyrate, la sphingomyéline et la carnitine ont reçu une attention considérable ces dernières années, face à l' hypothèse de leur effet inhibiteur sur la carcinogenèse.

4.0) Biologie cellulaire : l' entérocyte et le cancer

4.1) Prolifération et différenciation des cellules de la muqueuse épithéliale intestinale

La muqueuse intestinale des rongeurs et des autres mammifères est renouvelée à chaque 2-3 jours. Le maintien de l' architecture de la muqueuse, en particulier de la crypte, est une conséquence d' un

équilibre entre plusieurs facteurs. La prolifération des cellules souches intestinales a lieu dans la base de la crypte. Pendant qu'elles migrent au sommet de la crypte, elles cessent leur division et se différencient en 4 lignes principales (cellules de Paneth, gobelet, cellules entéroendocrines ou des entérocytes absorbatives). Dans le processus de différenciation, les cellules épithéliales de l'intestin deviennent matures et fonctionnelles en terme d'absorption et de sécrétion de mucus. Elles expriment des produits provenant de gènes spécifiques comme les enzymes de la bordure en brosse : la sucrase et la phosphatase alcaline. Voir figure 1.

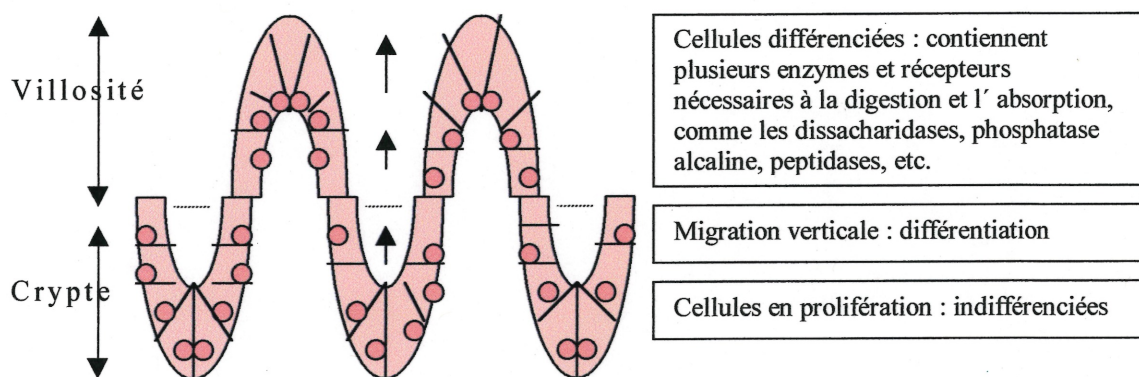


Fig.1 – Modèle d'organisation de l'épithélium intestinal.

L'apoptose - la mort cellulaire autonome génétiquement programmée - est associée avec l'enlèvement des cellules endommagées et est considérée comme un événement protecteur.

La relation entre la carcinogenèse colorectale et une prolifération cellulaire anormale a été démontrée par des études faites à l'aide de biopsies de la muqueuse intestinale chez des patients ayant un risque élevé de cancer, et chez des animaux exposés à des substances cancéreuses pour le côlon. Deux changements dans la

prolifération ont été décrits : une augmentation du nombre totale de cellule en prolifération, ou hyperprolifération, et un déplacement progressif de ces cellules vers la surface de la crypte.

Une autre caractéristique des tumeurs est la présence d' un faible nombre des cellules différenciées. L' inhibition de l' apoptose est aussi associé à une augmentation de l' agressivité de la tumeur. L' inhibition de l' apoptose confère une survie avantageuse aux cellules porteuses d' altérations génétiques et qui peuvent par conséquent, acquérir d' autres mutations, ce qui favorise la progression du cancer et qui contribue aussi au développement de la résistance au traitement chimiothérapeutique.

Puisque le maintien de l' épithélium intestinal consiste dans l' équilibre entre la naissance et la mort cellulaire, et que tous les changements dans ces processus peuvent promouvoir le développement tumoral, les mesures de la prolifération aussi bien que de l' apoptose deviennent très importantes pour l' évaluation de l' effet de la diète/nutriment dans la physiologie du côlon.

4.2) Aspects de la biologie moléculaire du cancer

Le cancer en tant que déséquilibre profond du comportement cellulaire, peut être dû à l' expression d' un ou de plusieurs gènes appelés oncogènes. La plupart dérivent de gènes impliqués dans la régulation de la prolifération, gènes qui codent 5 types de protéines : facteurs mitotiques, récepteurs, transducteurs intracellulaires de signaux, facteurs de transcription nucléaires et protéines régissant le cycle mitotique. La division cellulaire est enclenchée par l' interaction d' un facteur de croissance avec son récepteur cellulaire et est maintenue par l' arrivée d' un ou de plusieurs signaux. Cet événement entraîne, entre autres, la modification du profil de transcription de gènes. Le processus entier

est coordonné et surveillé par des protéines comme RB et p53. Ces protéines réglant le cycle mitotique jouent un rôle suppresseur de tumeur; l' inactivation de leur gène accroît la susceptibilité cellulaire à l' effet des oncogènes et prédispose aux mutations.

La perte de gènes suppresseurs de tumeur prédispose au cancer. On identifie ainsi comme porteur d' une mutation cancérogène : RB dans la tumeur de Wilm, APC dans le cancer du côlon, p53 dans la moitié des tumeurs.

4.2.1) Régulation du cycle cellulaire

La cellule en prolifération franchit la suite d' étapes du cycle cellulaire : G1 (croissance cellulaire), S (période de synthèse d' ADN), G2 (préparation pour la division cellulaire) et M (mitose et la génération des 2 cellules filles).

La plupart des mécanismes moléculaires qui commandent l' avancement dans le cycle cellulaire régissent l' amorçage de la phase S ou celui de la mitose. Ces deux transitions sont ajustées par des protéines kinases hétérodimères, composées d' un protomère catalytique et d' un protomère régulateur. Les protomères régulateurs sont les cyclines, parce que le taux de la plupart d' entre elles fluctue en concordance avec le cycle cellulaire. L' activité de protéine kinase des protomères catalytiques dépend de leur association avec une cycline, d' où leur nom de kinase dépendant d' une cycline, ou cdk. À l' état activé, ces hétérodimères cdk-cycline déclenchent la phosphorylation de tout un éventail de protéines, pour en activer certaines, en inhiber d' autres, de sorte qu'elles gouvernent les divers événements moléculaires en jeu dans la répllication d' ADN et la mitose.

En l'absence des signaux pour engager les cellules dans le cycle, elles sortent de ce dernier et entrent en G₀, une phase non proliférative où la différenciation et l'apoptose ont lieu. Par contre, en présence des stimuli, une induction d'un groupe de gènes appelés de réponse précoce a lieu. Parmi les protéines codées par ces gènes, se trouvent plusieurs facteurs de transcription qui induisent l'expression d'une seconde série de gènes, les gènes de réponse tardive. Les cyclines G₁ (D et E) et les cdk font partie des protéines codées par ces gènes. L'induction des gènes codant les cyclines G₁ (D et E) et les cdk (2, 4, 5, 6) détermine l'entrée en phase S, processus appelé franchissement du point de restriction. Les complexes cdk-cycline G₁ activent des facteurs de transcription d'un grand nombre de gènes codant les enzymes requis pour la synthèse d'ADN et de désoxyribonucléotides, et aussi des facteurs d'amorçage de la réplication d'ADN.

L'activation du facteur de transcription E2F est aussi nécessaire pour que la cellule s'engage en phase S. L'inhibition de l'activité de E2F par la protéine RB bloque l'engagement en phase S.

Dès que la cellule est engagée dans la phase S, cdk-2 s'associe à la cycline A. Après la réplication complète de son ADN, la cellule entre en phase G₂. Le passage de G₂ à la mitose dépend de l'activation de facteurs promoteurs de la mitose (MPF). Le protomère catalytique des MPF, aussi une protéine kinase dépendant d'une cycline, est communément désigné cdc2 (cdk1). Le protomère régulateur des MPF est la cycline B. Les MPF catalysent la phosphorylation des lamines nucléaires et de l'histone 1, et sont impliqués dans la régulation d'événements qui précèdent la division cellulaire comme la condensation des chromosomes et la dispersion de l'enveloppe nucléaire. L'enclenchement de l'anaphase résulte de la dégradation des cyclines mitotiques et l'inactivation des MPF. La ségrégation des chromatines sœurs, l'entraînement de chacun des chromosomes à un pôle du fuseau, la décondensation des

chromosomes, la reformulation de l' enveloppe nucléaire, le remaniement du réticulum endoplasmique et de l' appareil de Golgi et la cytotdièrèse, permettent la génération des 2 nouvelles cellules en G1.

Les complexes cdk-cyclines sont eux-mêmes soumis à une stricte régulation. P15,16,21,27 sont des protéines inhibitrices du cycle cellulaire en G1. Voir figure 2.

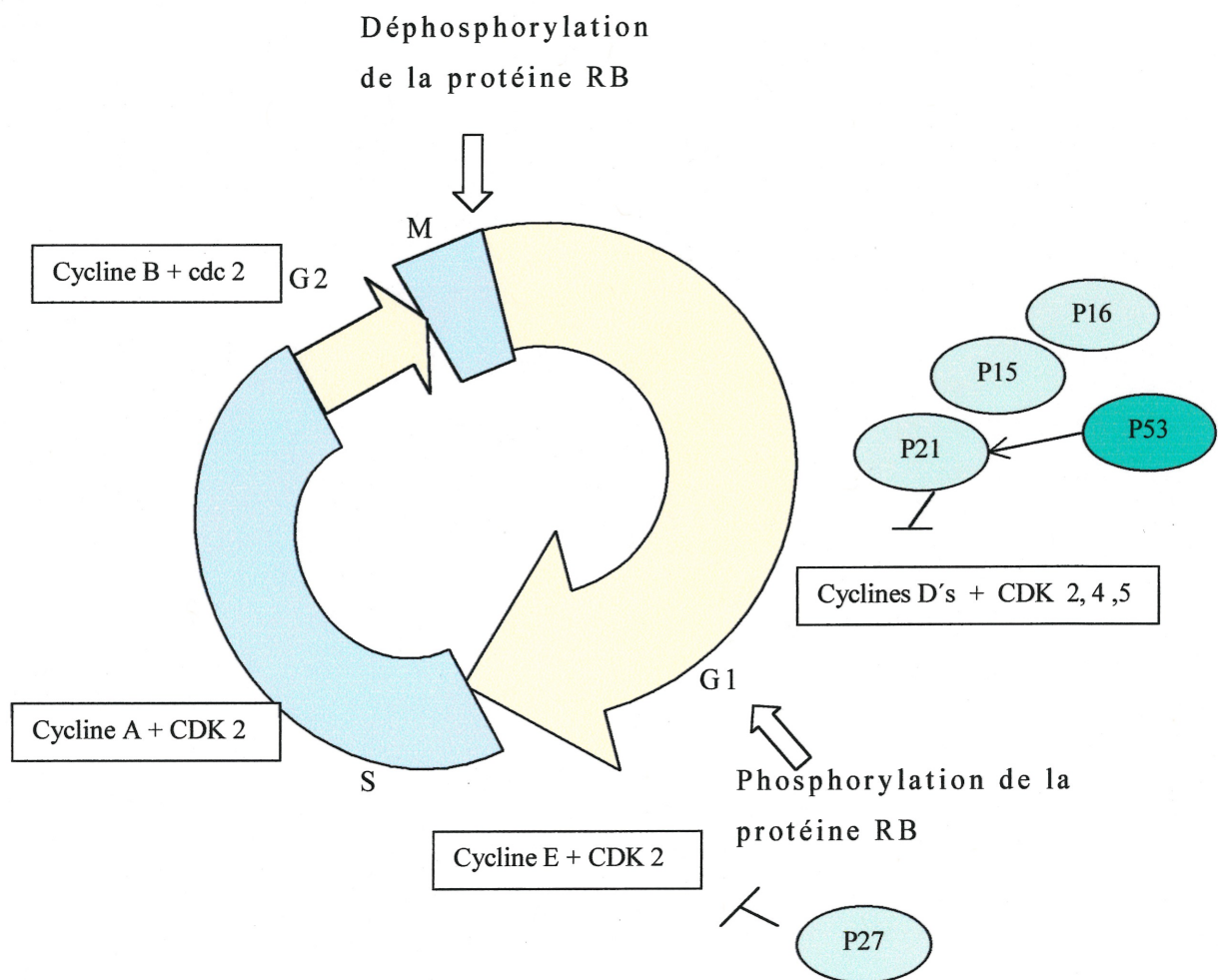


Fig.2 - Interactions entre cyclines et CDK' s durant le cycle cellulaire et les principaux composants impliqués dans le cancer via mutation ou surexpression (ex. -p53 et cycline D) ou via leur absence dans les tumeurs ou cellules transformées (ex. p16 et p21).

4.2.2) *L'apoptose, un moyen de prévenir la malignité*

La mort cellulaire programmée, ou aussi désignée apoptose, constitue un moyen de protéger l'organisme contre des cellules qui sont devenues inutiles, vieilles, qui ont un comportement anarchique où qui contient de l'ADN endommagé. L'abondance des protéines pro-apoptotiques (comme Bad, Bax, Bid, Bik et Bim) et anti-apoptotiques (famille Bcl-2) déterminent la susceptibilité de la cellule à l'apoptose. La présence des protéines pro-apoptotiques à la surface de la membrane mitochondriale diminue le potentiel transmembranaire et provoque la libération du cytochrome c dans le cytosol. Dans la présence d'ATP, le cytochrome c se lie et active l'APAF-1, qui va, par conséquent, se lier à des protéines qualifiées caspases (cysteine-requiring aspartate protease), en déclenchant toute une cascade qui résulte dans l'apoptose.

Les caspases 2, 3, 6, 7, 8, 9 et 10 sont inducteurs de l'apoptose, pendant que les caspases 1, 4, 5, 11, 12 et 13 ont un rôle plus important dans l'inflammation.

Les caspases sont normalement présentes dans la cellule sur une forme inactive : pro-caspases. L'hydrolyse et l'enlèvement des résidus d'aspartate génèrent des subunités qui s'associent en hétérodimères. La forme active des caspases est due au groupement comme tétramères. Les caspases activées continuent à activer d'autres caspases, où hydrolysent d'autres protéines clés comme PARP (Poly ADP-Ribose Polymerase), DNA-PK (DNA-dependent Protein Kinase), Nuclear Mitotic Apparatus Protein (NuMA), Sterol Regulatory Element Binding Proteins (SREBPs), lamines.

Les cellules en apoptose meurent spontanément après l'initiation du processus par une voie chimique ou biologique, pendant que les cellules en nécrose meurent à la suite d'un endommagement toxique ou d'une blessure. Les cellules en apoptose souffrent des

changements spécifiques physiques et biologiques comme la translocation de la phosphatidylsérine de la couche interne de la membrane vers l'extérieur de la membrane cytoplasmique, la libération du cytochrome c et de l'AIF (facteur inducteur de l'apoptose) dans le cytosol ; l'agrégation de la chromatine au long de la membrane ; la fragmentation de l'ADN nucléaire en parties caractéristiques, en créant un escalier d'ADN, la dégradation de la cellule en corps apoptotiques, qui sont phagocytés par des cellules voisines ou macrophages.

L'apoptose est initiée par des signaux internes de la cellule où par la liaison de récepteurs activateurs de la mort cellulaire à la surface de la membrane. Des activateurs comme le TNF et le Fas L peuvent déclencher l'apoptose en se liant à leurs récepteurs cellulaires respectifs : récepteur du TNF et Fas. Voir figure 3.

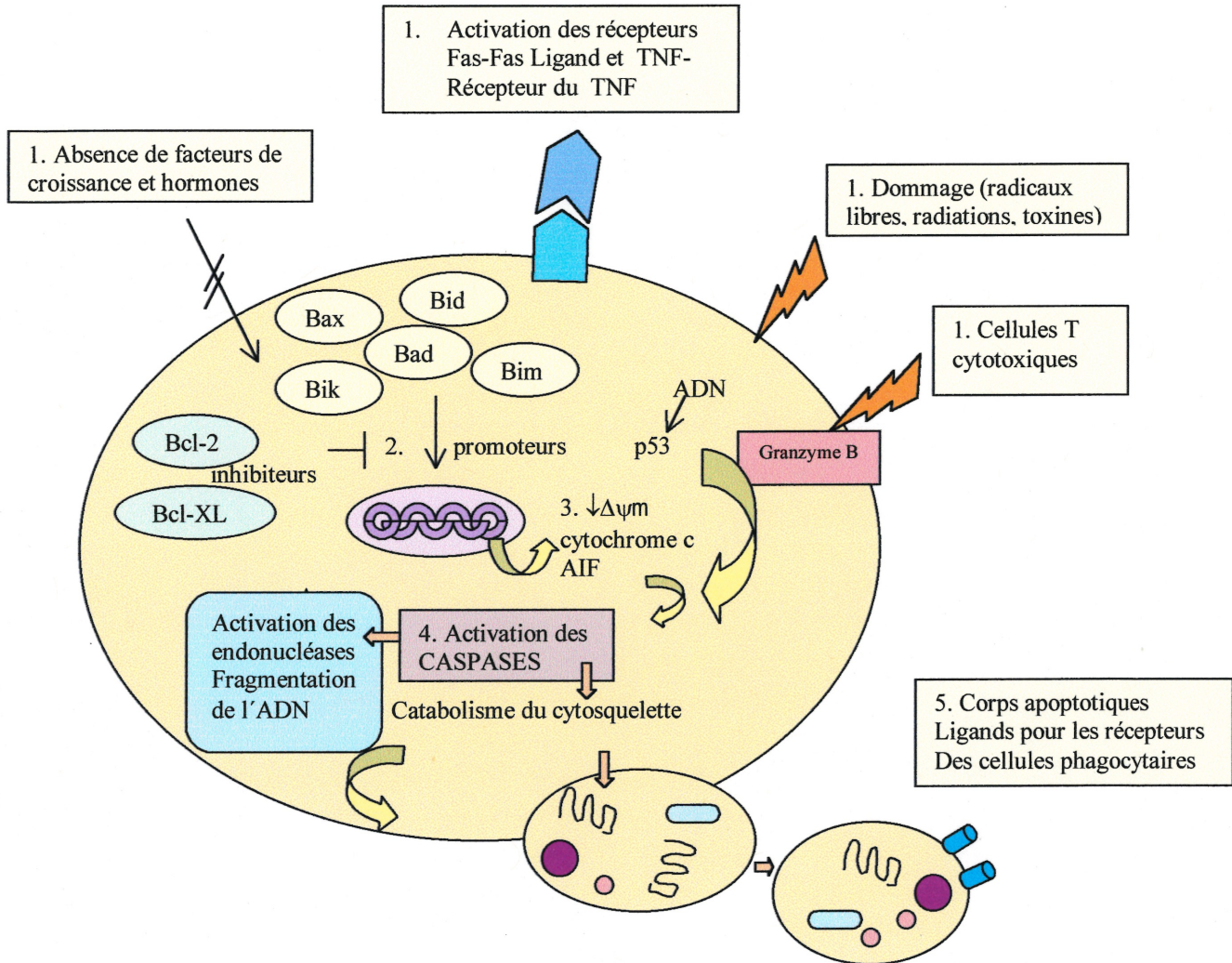


Fig.3 – Représentation schématisée des événements apoptotiques; 1. Divers stimulus déclencheurs de l'apoptose; 2. Contrôle et régulation de l'apoptose par des membres de la famille de protéines Bcl-2; 3. Changements dans la perméabilité transmembranaire mitochondriale ($\Delta \psi m$) et libération du cytochrome c et du facteur d'induction de l'apoptose (AIF) dans le cytosol; 4. Activation des caspases et subséquente activation des endonucléases et protéases dont résultera la dégradation intracellulaire; 5. Formation des corps apoptotiques qui seront enlevés par des cellules phagocytaires.

5.0) Composants lipidiques du lait comme facteurs antinéoplasiques

5.1) Le butyrate

Les acides gras à chaîne courte (AGCC) constituent l'essentiel des anions organiques présents dans le côlon et regroupent des acides monocarboxyliques de C1 à C6. Les principaux AGCC impliqués dans la physiologie des mammifères sont les acides acétique (C2), propionique (C3) et butyrique (C4).

Les bactéries anaérobies de l'écosystème du côlon produisent, par la fermentation des polysaccharides non amylacés, des amidons résistants et certains oligosaccharides indigestibles, les acides gras à chaîne courte. Les proportions d'AGCC produites varient en fonction de la nature de la flore bactérienne, du temps du transit intestinal et des substrats disponibles. Le profil fermentaire dépend largement du type de régime alimentaire et de la quantité d'amidon et de polysaccharides non amylacés qui arrivent dans le côlon. Dans les conditions normales, la concentration en AGCC dans le contenu colorectal est relativement constante (respectivement 60, 20, 20 mmol/L pour les acides acétique, propionique, butyrique) et comprise entre 100 et 150 mmol/L, soit 300 à 400 mmol par jour.

Chez l'homme, les AGCC sont rapidement absorbés par la muqueuse du côlon. Plus de 70% de l'énergie utilisée par les colonocytes est fournie par l'oxydation du butyrate. Dans des conditions physiologiques normales, 95 à 99% des 300 à 400 mmol d'AGCC produits par jour sont rapidement absorbés, alors qu'une faible proportion est excrétée dans les selles. Le butyrate est toujours utilisé préférentiellement aux autres acides gras à chaîne courte ou longue par les colonocytes, même à faible concentration.

Effets trophiques :

Les AGCC, et principalement le butyrate, exercent un effet trophique sur l' épithélium intestinal, qui se traduit par une augmentation du nombre de cellules, de la hauteur et de la surface des villosités, de la profondeur des cryptes et de la quantité d'ADN et d' ARN dans les cellules épithéliales. Velazquez et al (56) ont émis l' hypothèse que le butyrate stimule non seulement la prolifération des colonocytes via un effet direct (apport énergétique), mais aussi via un effet indirect, véhiculé par le mévalonate (produit généré par la métabolisation du butyrate dans les colonocytes). Ce métabolite peut se lier à des protéines G situées à l' interface de la membrane cellulaire en déclenchant la transduction des signaux (par l' activation de la cascade de MAP Kinases), capables de stimuler la prolifération cellulaire.

De plus, selon Siavoshian et al, les effets trophiques du butyrate puissent en partie s'expliquer par une augmentation de l'expression des cyclines (71). Le butyrate est également un puissant inducteur de la différenciation de cellules normales du côlon (72).

L' intérêt des AGCC dans les néoplasies colorectales est apparu depuis que des travaux ont montré que le butyrate est capable d' inhiber la prolifération des cellules cancéreuses et d' agir comme agent de différenciation (57-59). Les effets sont en partie associés à une hyperacétylation des histones ainsi qu' à une hyperméthylation de l' ADN (60). Ces changements pourraient être à l' origine d' une altération de la chromatine, entraînant une diminution de l' expression des gènes, et ayant un effet antiprolifératif. Il a été également démontré que le butyrate induit dans des lignées humaines de cellules d' adénocarcinome colorectal, l' expression cellulaire d' inhibiteurs des cyclines (p21 et p27) ce qui pouvait expliquer son effet antiprolifératif (la réplication des cellules cancéreuses du côlon a été bloquée en phase G1 dans le cycle

cellulaire) (61,62). Un blocage en phase G2/M due a une diminution de l' activité de la protéine p34cdc2 a aussi été noté après traitement des cellules avec le butyrate (63).

Le butyrate est aussi impliqué dans l' induction de l'apoptose des cellules cancéreuses *in vitro* (64,73). L' apoptose induite par le butyrate est précédée d' une augmentation de l' expression des protéines Bak (65) et d' une diminution de l' expression des protéines Bcl-2 et Bcl-XL (61). De plus, le butyrate est un activateur de la cascade des caspases, ce qui entraîne la dégradation des enzymes et des protéines essentielles pour la cellule comme PARP (65).

Le butyrate a été aussi capable d' activer le récepteur nucléaire PPAR- γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor - gamma), dont le rôle dans le contrôle de l' expression des gènes impliqués dans la régulation de la croissance et la différenciation cellulaire a été fortement mis en évidence (66).

Dans les modèles *in vivo*, le butyrate a supprimé le développement du cancer colorectal (67-69) ou n' a pas eu d' effet sur ce dernier (70).

Le butyrate semble donc moduler, de façon dose-dépendante, la prolifération, la différenciation et l' apoptose. Il module le déroulement du cycle cellulaire et de la mort des cellules épithéliales intestinales tumorales et non tumorales.

5.2) L' acide linoléique conjugué (CLA)

L' acide linoléique conjugué est le nom générique utilisé pour la mixture d' isomères structuraux et géométriques dérivés de l' acide linoléique (LA : C18:2; un acide gras polyinsaturé essentiel),

caractérisé par la présence d' un système de double liaison conjuguée dans les positions 9 et 11 ou 10 et 12, à la configuration cis ou trans, dont l' isomère le plus fréquent est le 9 cis 11 trans.

Le CLA est présent naturellement dans le lait et les produits laitiers comme le fromage et le yogourt, et aussi dans certains types de viande et d'huiles végétales. Voir tableau 1.

En addition aux sources alimentaires, la formation endogène d' isomère 9 cis 11 trans 18 :2 a été observée chez les souris à la suite de la conversion de l' acide linoléique en CLA par des bactéries de la flore intestinale (74). Il a été suggéré que ce même processus puisse avoir lieu chez l' homme, mais une étude où la diète a été supplémentée en huile de carthame n' a pas fait augmenter la concentration plasmique de CLA (75).

<i>Aliment (mg/g lipide)</i>	<i>CLA totale</i>
<i>Viandes *</i>	
<i>Bœuf</i>	4,3
<i>Veau</i>	2,7
<i>Mouton</i>	5,6
<i>Porc</i>	0,6
<i>Poulet</i>	0,9
<i>Dinde</i>	2,5
<i>Fromages</i>	
<i>Romano</i>	2,9
<i>Parmesan</i>	3,0
<i>Cheddar</i>	3,6
<i>Mozzarella</i>	4,9
<i>Cottage</i>	4,5
<i>Ricotta</i>	5,6
<i>Fruits de mer*</i>	
<i>Saumon</i>	0,3
<i>Truite</i>	0,5
<i>Crevette</i>	0,6
<i>Produits laitiers</i>	
<i>Lait homogénéisé</i>	5,5
<i>Crème sure</i>	4,6
<i>Yogourt</i>	4,8
<i>Huiles végétales</i>	
<i>Maïs</i>	0,2
<i>Arachide</i>	0,2
<i>Olive</i>	0,2
<i>Carthame</i>	0,7
<i>Tournesol</i>	0,4

Tableau 1. Concentrations représentatives de CLA dans divers aliments;

* échantillons disponibles sur le marché commercial, portions comestibles non cuites. Adapté de Chin et al. (J.Food Composition 1992; 5 : 185-197).

Le CLA a reçu une attention considérable à cause de son effet bénéfique sur la santé. En 1987, Pariza et Ha ont identifié un nouveau anticarcinogène présent dans la viande de bœuf frit, désigné comme CLA. Ils ont vérifié que les souris traitées avec le CLA dérivé du bœuf présentaient moins de papillomes épidermiques et ont eu une incidence plus basse de ces tumeurs induites par le 7,12-diméthylbenz(a)anthracene (DMBA) par rapport au souris

contrôles (76). Le mécanisme justifiant l' inhibition de l' initiation des tumeurs épidermiques est inconnu, mais c'est attribué en partie à une action directe sur l' inhibition de l' activité de l' enzyme p450.

Il a été démontré dans les années suivantes, que chez les souris, le CLA inhibe partiellement (50%) l' initiation de la carcinogenèse dans l' estomac induite par benzo(a)pyrène (77), et inhibe aussi le développement des tumeurs malignes dans les seins induites par DMBA (78). L'étude chez les rongeurs a révélé que la prise de CLA (0,05 - 0,5%) réduit significativement, de façon dose-dépendante, le nombre et l' incidence de tumeurs du sein induites par DMBA (79). Ces observations ont indiqué un rôle antioxydant du CLA, dont on pourrait se servir comme mécanisme de défense, en protégeant la membrane cellulaire contre l' attaque des radicaux libres. Les peroxydes lipidiques et les radicaux libres sont connus pour endommager la membrane plasmique et interférer dans la division cellulaire. Ils perturbent la synthèse des protéines autant que de l' ARN et l' ADN.

Liew et Pariza ont démontré que le CLA protégeait aussi contre le cancer du côlon causé par des amines hétérocycliques de la diète in vivo, en jouant un rôle d' inhibiteur de l' activation des carcinogènes (80).

Une série d' expériences in vitro a démontré que des concentrations physiologiques de CLA sont cytostatiques et cytotoxiques pour les cellules cancérigènes du côlon (HT-29, SW480), du sein (MCF-7) et de la peau (M21-HPB) (Shultz et al, O'Shea et al) et aussi pour les cellules d' adénocarcinome du poumon (A-427) (Krokan et al). L' incubation des cellules cancérigènes avec le CLA (10 - 70uM; 2 a 12 jours) a réduit significativement la prolifération (18-100%) en comparaison avec le contrôle (81,82,83). Ces résultats ont suggéré que l'habileté qu' a le CLA d' inhiber la croissance cellulaire puisse

être due à l' inhibition de la synthèse de nucléotides. Krokan et al et O'Shea et al ont constaté que l'activité anticancérogène du CLA est aussi due à sa conversion en produits cytotoxiques, dérivés de la peroxydation lipidique.

Durgam et Fernandes (1997) ont démontré que l' effet inhibiteur de la prolifération des cellules humaines cancérogènes du sein MCF-7 traitées avec le CLA est du au blocage du cycle cellulaire dans la phase G0/G1 (84) .

Puisque le CLA peut être incorporé aux phospholipides de la membrane plasmique et remplacer l' acide arachidonique, il a été proposé que le CLA puisse exercer son effet à travers la réduction de synthèse de prostaglandines. L' acide arachidonique est le précurseur de la PGE₂, et l' augmentation de CLA incorporé à la membrane peut diminuer la production des prostaglandines. Belury et al (1999) ont constaté que chez les souris traitées avec le promoteur tumorigène 12-O-tétradécanoyphorbol-13 acetate (TPA), le CLA de la diète (1,5%) réduit la synthèse de prostaglandines (PGE₂) de façon significative (85). Ces résultats ont appuyé l' hypothèse que le CLA puisse changer le profil lipidique de la membrane plasmique et, par conséquent, interférer dans la disponibilité des substrats pour la synthèse de eicosanoides pendant la promotion des tumeurs. Le CLA pourrait aussi réduire la synthèse de PGE₂, via compétition avec l' AA pour les enzymes prostanoides. Voir figure 4.

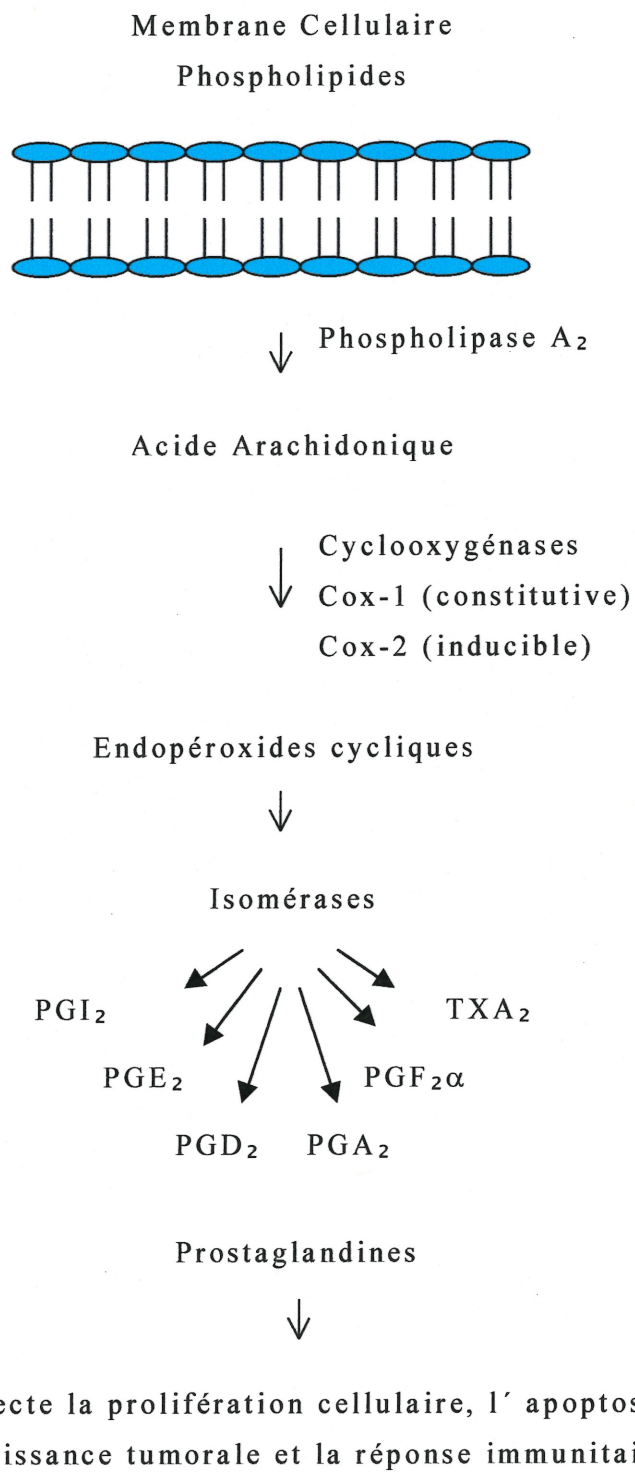


Fig.4- Biosynthèse des prostaglandines par des cyclooxygénases.

Plusieurs rapports, qui incluent des études épidémiologiques et des recherches en laboratoires (expériences *in vivo* et *in vitro*), ont indiqué que les médicaments anti-inflammatoires non stéroïdes (NSAIDs) avaient un effet anti-carcinogène (86,87). Des études en populations ont démontré une diminution de 40-50% du risque relatif du cancer du côlon chez les individus qui prenaient quotidiennement ces médicaments (88,89). Le mécanisme responsable de cette inhibition n' a pas été établi mais il semble être dû à la modulation de l'activité des 2 enzymes clés indispensables à la synthèse de prostaglandines : cyclooxygénase (Cox)-1 et Cox-2.

Les cyclooxygénases catalysent la conversion de l' acide arachidonique en prostaglandines. Deux isoformes de Cox ont été caractérisés : Cox 1 et Cox 2. Cox 1 est exprimé constitutivement dans plusieurs types cellulaires et il semble être nécessaire à la régulation de la production des PGs en quantités adéquates aux besoins physiologiques, en assurant l' homéostasie. Cox 1 est présent dans l' épithélium intestinal normal et sa concentration reste inaltérée en présence de tumeurs. Par contre, Cox 2 est inexprimable dans l'intestin normal et ce niveau est augmenté jusqu'à 90 % dans les adénocarcinomes colorectaux (90, 91). L' expression de Cox 2 est induite par divers facteurs, comme des cytokines, facteurs de croissance et promoteurs de tumeurs. Cox 2 est exprimé en grande quantité dans les tumeurs intestinales chez les humains et les rongeurs. Tsujji et Dubois ont démontré que les cellules cancérigènes du côlon que surexprime le gène Cox-2 ont une adhésion augmentée à la matrice extracellulaire et ont aussi développé une résistance à l' apoptose (92).

L' hypothèse que Cox 2 peut avoir un rôle crucial dans la croissance et la progression du cancer du côlon a été fortement suggérée. Récemment, l' administration des inhibiteurs sélectifs pour le Cox 2 (celecoxib) a inhibé de façon significative, le développement du

cancer du côlon dans un modèle animal (souris F344 dont le cancer du côlon a été induit par azoxyméthane -AOM)(93).

En plus, Belury et al (1999) ont constaté que le CLA est un ligand et aussi un activateur de PPAR α (peroxisome proliferator activated receptor alpha), qui est un récepteur nucléaire capable de moduler divers facteurs de transcription, par conséquent, affecter le métabolisme lipidique (94). Cette hypothèse peut aussi expliquer les effets hypocholestérolémiques et hypolipidémiques dus au CLA.

5.3) *La sphingomyéline*

La sphingomyéline (N-acylsphingosine-1-phosphocholine) (SM) est un composé habituel des membranes plasmiques, dont la base est la sphingosine (un alcool aminé à longue chaîne aliphatique insaturée) lié à un groupe phosphocholine et a une chaîne d'acide gras. La SM est située dans le feuillet extracytoplasmique de la membrane cellulaire des mammifères et était historiquement considérée comme un constituant inerte qui influence la fluidité de la membrane. Les effets biologiques remarquables dus à l'hydrolyse de la SM ont été identifiés quand un effet inhibiteur de la sphingosine sur la protéine kinase C (PKC) et un effet stimulateur de 1,2 diacylglycérol sur hydrolyse de la SM ont été rapportés (95) . PKC fait partie de la machinerie de signalisation de la cellule pour la régulation de la prolifération, et 1,2diacylglycérol est un activateur physiologique de la PKC. Plusieurs études sur l'hydrolyse de la SM ont été faites pendant la dernière décennie, et une nouvelle voie de transduction des signaux déclenchés par l'hydrolyse de la SM a été établie. Cette voie génère des messagers lipidiques multiples, incluant céramide, céramide-phosphate, sphingosine, sphingosine-1-phosphate et lysosphingomyéline. Ils ont divers effets régulateurs sur la prolifération, différenciation et apoptose cellulaires. La SM est aussi un composant de la diète, dont la digestion et l'absorption

peuvent causer des implications cliniques. On lui accorde une attention spéciale due à son impact sur les cancers gastro-intestinaux.

L'hydrolyse de la SM est catalysée par SMase, que coupe la phosphocholine, ce qui permet la formation de la céramide. La chaîne d'acide gras est aussi libérée par la céramidase, due à la conversion de céramide en sphingosine. La sphingosine peut être reacylée par la céramide synthase en formant la céramide, ou peut être phosphorylée par la sphingosine kinase pour générer la sphingosine-1-phosphate. Voir figure 5.

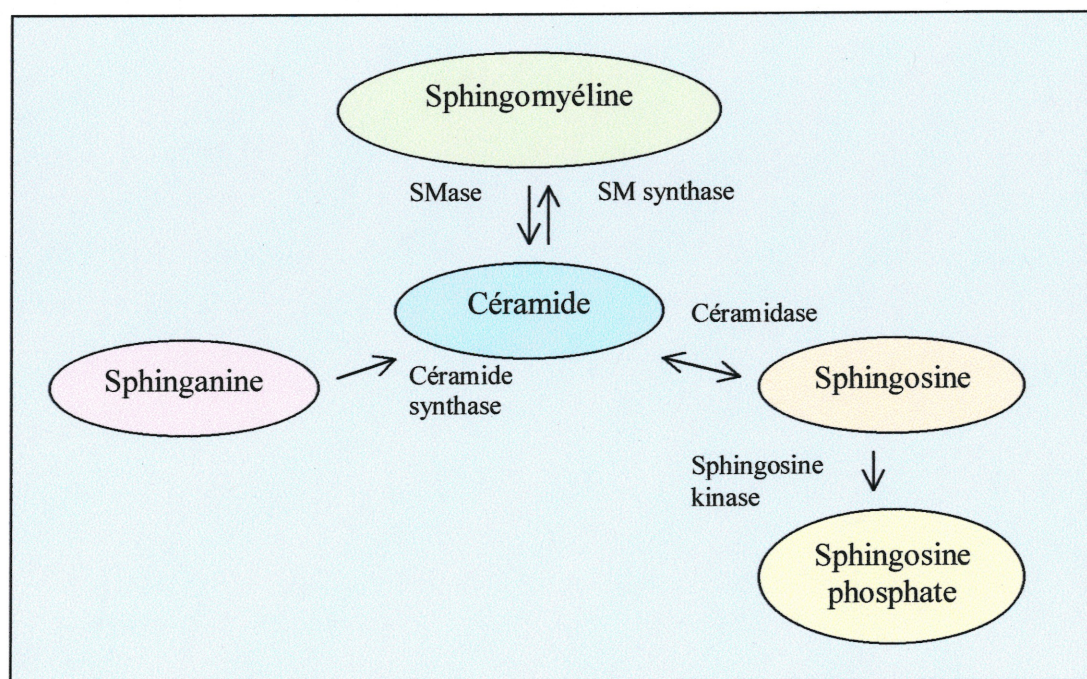


Fig.5 - Métabolisme des sphingolipides.

L'hydrolyse de la SM peut être stimulée par un grand nombre d'agonistes et aussi par des cytokines ($\text{TNF}\alpha$, l' $\text{IFN}\gamma$, $\text{IL-1}\beta$), la $1\alpha,25$ -dihydroxy-vitamine D3, le stress environnemental, les radiations ionisées et causées par les rayons ultraviolets, etc.

L'hydrolyse de la SM produit des messagers biologiques, dont les plus importants sont la céramide, la sphingosine, et la sphingosine-1-phosphate.

La céramide est un important régulateur de croissance et de différenciation cellulaire. L'incubation avec un analogue de la céramide (C2-céramide) stimule la différenciation, inhibe la prolifération et induit l'arrêt du cycle cellulaire dans plusieurs types des cellules (96). Un autre effet de la céramide est dû à l'induction de l'apoptose (97). Le mécanisme suggéré d'action de la céramide est véhiculé par la phosphorylation et déphosphorylation des protéines, en transférant des signaux au noyau et en influençant l'activité de plusieurs facteurs de transcription. Comme conséquence, les processus de prolifération, différenciation et apoptose sont affectés. Voir figure 6.

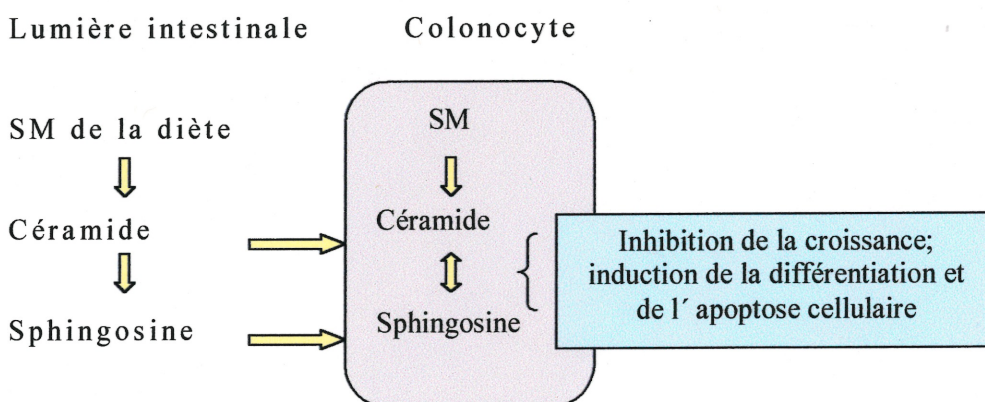


Fig.6 – Effets possibles des sphingolipides sur la carcinogène colorectale.

Dans le tract intestinal, les deux SM endogène et exogène sont présentes. La SM exogène est dérivée de la diète. La SM est le principal phospholipide dans le lait. La digestion et l'absorption de

la SM a lieu dans tout le tractus intestinal, de l'intestin grêle jusqu'au côlon.

Dillehay et al, et Schmelz et al ont constaté une réduction de 70% du nombre de cryptes aberrantes du côlon chez les souris dont la diète a été supplémentée en SM purifiée du lait de vache (98). Des résultats similaires ont été obtenus avec l'administration de la SM synthétisée chimiquement (99). Il semble que la SM de la diète peut avoir un effet inhibiteur sur la transformation maligne.

Dans une étude chez les patients atteints de polypose rectocolique familiale, l'activité de la SMase était réduite de 90% dans les adénomes en comparaison avec les patients contrôles (100). Une diminution de l'activité de la SMase peut être un événement précoce dans la transformation néoplasique. L'hypothèse que la diminution de l'activité de la SMase par conséquent, la diminution de la production de céramide sont responsables pour l'inhibition de l'apoptose dans le cancer du côlon, nécessite d'être clarifiée.

5.4) *La carnitine*

La carnitine (3-hydroxy-4-méthylammoniobutanoate) régularise le flux de substrat et l'équilibre d'énergie à travers les membranes cellulaires par la modulation du transport des acides gras de chaîne longue vers la mitochondrie et leur conséquente β -oxydation (101). Les aliments d'origine animale (viande de bœuf, volaille, poisson et produits laitiers) contient des quantités substantielles de carnitine, mais l'organisme peut aussi la synthétiser en utilisant les aminoacides lysine et méthionine. La carnitine est principalement emmagasinée dans le muscle squelettique et est présente sous deux formes : libre ou comme esters avec des groupements acyle en diverses substances biologiques.

La diète occidentale fournit approximativement 2-12 μ mol de carnitine par kg par jour. Le lait entier contient 20 μ mol de carnitine par 100ml, même après la pasteurisation.

La carnitine a aussi une fonction antioxydante et anticarcinogénique, dans la mesure où elle inhibe le dommage oxydatif induit par plusieurs carcinogènes (102). De plus, selon des expériences *in vivo*, il a été suggéré que l'effet antinéoplasique de la carnitine puisse être aussi expliqué par l'augmentation de la demi-vie du butyrate.

6.0) Stratégie pour la prévention primaire : bénéfiques des nutriments pour combattre le cancer colorectal.

Malgré des progrès significatifs faits sur le traitement du cancer durant les dernières trente années, (amélioration de la chimiothérapie, radiothérapie entre autres), le pronostic des patients atteints de tumeurs invasives reste sombre. Une survie moyenne de 5 ans chez les patients ayant un cancer colorectal est dans l'ordre de 50-55%, les décès sont dus principalement à la propagation du cancer (métastases) (103).

Dans ces circonstances, la prévention du cancer colorectal apparaît comme une stratégie d'approche très lumineuse, et le développement des mesures diététiques préventives offre de meilleures possibilités de réduire la mortalité causée par cette maladie.

Dans les objectifs diététiques visant à diminuer le risque de cancer colorectal, le lait et les produits laitiers en supplément dans la diète pourront avoir des effets bénéfiques incluant la prévention de l'incidence du cancer et l'interférence dans le comportement des

tissus néoplasiques. On obtiendrait ainsi un grand impact sur la santé publique.

7.0) Description du projet de recherche

7.1) Les objectifs

L' hypothèse que les composants laitiers : butyrate, acide linoléique conjugué, sphingomyéline et carnitine ; seuls ou en combinaison, sont capables de prévenir le cancer colorectal a été testée dans la présente étude.

En utilisant le modèle *in vitro*, la modulation du renouvellement et de la différenciation des cellules cancéreuses du côlon par ces composants du lait a été déterminée. De plus, les événements moléculaires associés aux effets bénéfiques de ces facteurs sur le développement du cancer colorectal ont été examinés.

7.2) Le modèle *in vitro*

Pour évaluer la contribution des composants laitiers dans la modulation de la carcinogenèse colorectale, la lignée des cellules cancéreuses du côlon humain - Caco-2 - et la lignée des cellules non transformée de la crypte intestinale humaine - HIEC - ont été choisies.

La lignée des cellules Caco-2 est bien établie et est largement utilisée par plusieurs investigateurs comme modèle de l' épithélium intestinal (104). En culture, les cellules Caco-2 ont, comme propriété, la capacité de se différencier spontanément en cellules matures. Elles peuvent exister à 3 stades différents : homogène indifférencié (en sous - confluence), hétérogène polarisé et

différentié (entre 0 et 20 jours post- confluence), et homogène polarisé et différencié (après 30 jours post- confluence). Les cellules indifférenciées expriment de faibles niveaux de protéine caractéristique des colonocytes ou entérocytes. Immédiatement après confluence, elles expriment de protéines caractéristiques des ces deux types cellulaires. Des cellules différenciées (absorptives) expriment les enzymes de la bordure en brosse (comme la sucrase et la phosphatase alcaline).

7.3) Les méthodes

Les cellules Caco-2 ont été cultivées dans des flasques de polystyrène de 75 cm², à 37°C avec 5% de CO₂, dans un milieu minimal essentiel de Eagle (MEM) supplémenté en 10% (v/v) de sérum de veau fœtal (SVF) inactivé à la chaleur, 1% de pénicilline streptomycine et 1% d'acides aminés non essentiels.

Test d'activité de croissance par incorporation de thymidine - méthyle- ³H - radioactive dans des cellules en culture : les cellules Caco-2 et HIEC ont été cultivées dans les plaques de 24 puits à une densité de 50.000 et 300.000 cellules/ml respectivement, avec un milieu MEM complet plus 5% SVF. Après 24 heures de stabilisation dans un milieu dépourvu de sérum de veau, les cellules ont été cultivées en absence (contrôle) ou en présence d'acide linoléique conjugué (CLA 5-100µM), de butyrate (1-100mM), de sphingomyéline (0,5-1,5mg/ml) et de carnitine (1-100mM), seules ou en combinaisons, pendant des périodes allant de 24 à 96h. A la fin des différents temps d'incubation avec les facteurs ci- haut mentionnés, la thymidine tritiée a été ajoutée (2µCi) et son incorporation dans l'ADN cellulaire a été déterminée après 2h.

Détermination de la différenciation cellulaire par le test d'activité spécifique de la sucrase : les cellules Caco-2 ont été cultivées dans les plaques de 6 puits avec membrane à une densité de 10⁵

cellules/ml avec un milieu MEM complet plus 5% de SVF. Après 72h d'incubation avec différents facteurs, les cellules (le 15e et 21e jours de culture) ont été récoltées et homogénéisées dans un tampon maléate (pH 6,0) et le dosage de la sucrase a été fait selon Loyd et Whelan. L'activité de l'enzyme a été calculée en unité internationale par gramme de protéine cellulaire. Le contenu protéique a été quantifié selon la méthode de Bradford.

Détermination de l'apoptose : a) Quantification et analyse via cytométrie en flux: le test Annexin V / Iodure de Propidium : les cellules Caco-2 ont été cultivées dans les plaques de 24 puits à une densité de 50.000 cellules/ml de MEM complet plus 5% de sérum, en stade sous confluent. Les cellules ont été stimulées avec différents facteurs pendant 24 et 48h. Après la récolte des cellules (incluant les surnageantes), celles en apoptose ont été identifiées en utilisant le kit commercial Apo-Alert Annexin V, selon les instructions du fabricant. Le mécanisme, basé sur la détection de la phosphatidylsérine dans la couche externe de la membrane plasmique, permet la reconnaissance précoce de la mort cellulaire programmée. Les cellules dont la perméabilité était augmentée ont été aussi identifiées par la coloration de l'ADN nucléaire avec le colorant iodure de propidium (PI), ce qui caractérise la nécrose ou la phase tardive de l'apoptose. La quantification des cellules a été faite par la mesure de la fluorescence des molécules (Annexin V et PI) au moyen de la cytométrie en flux. b) Détection par le critère morphologique : les cellules Caco-2 cultivées en plaques de 6 puits à densité de $1,0 \times 10^5$ cellules/ml de MEM avec 5% de sérum ont été en absence ou présence des différents facteurs pendant 48h. Le marquage spécifique de l'ADN cellulaire a été fait via le colorant HOECHST 33342 à une concentration de $1\mu\text{g/ml}$. La morphologie cellulaire a été vérifiée en utilisant un microscope à fluorescence. Les cellules avec la fragmentation nucléaire typique et fortement brillantes avec le colorant ont été considérées apoptotiques.

Études sur les mécanismes moléculaires : analyses par l'immunotransfert : le test de transfert par Western Blot a été choisi pour dépister les protéines Cox-2 et PARP exprimées par les cellules traitées par les différents facteurs. Les Caco-2 ont été cultivées dans des flasques de 25 cm² à une densité de 1,0 x 10⁵ cellules/ml de MEM avec 5% de sérum. Après 24h de stabilisation dans un milieu sans sérum, les cellules ont été incubées avec les facteurs pendant 72h et ont été récoltées dans un tampon de lyse (50mM Tris, 150mM NaCl, 10mM EDTA, 1% Triton et une mixture d'inhibiteurs de protéases). Après l'homogénéisation et le dosage des concentrations protéiques (méthode Bradford), des volumes équivalents à 30µg de protéine de chaque lysat ont été utilisés pour faire l'électrophorèse avec un gel de polyacrylamide-SDS à 10%, puis les protéines séparées ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose. Après blocage de 30 minutes avec du lait à 5% (dans le tampon salin de Tris et Tween 20 - TBST), la membrane a été mise en contact avec l'anticorps spécifique de la protéine recherchée (Anti-Cox-2 : 1/700; Anti-PARP : 1/1000; Anti-B-actine 1/750) pendant toute la nuit à 4°C. Ensuite, après la série de lavage avec le TBST, on a incubé la membrane avec un deuxième anticorps couplé à la phosphatase alcaline (Anti-chèvre-IgG 1 :3000 et Anti-lapin-IgG 1 :3000 et Anti-chèvre-IgG 1 :3000, respectivement) pendant 2 heures. Après les lavages avec le TBST, le signal des bandes immunoréactives a été révélé en utilisant le kit DURA.

Analyses statistiques : les expériences ont été exécutées au moins en duplicatas et ont été répétées au moins trois fois. Les résultats ont été analysés avec le BMDP statistical software, par des analyses de variances (ANOVA) suivies d'un test de t pour des comparaisons entre 2 groupes. Les différences avec des valeurs de $p < 0,05$ ont été considérées significatives.

Présentation des articles

**Modulation of Caco-2 cell turnover and
differentiation by milk fat components**

Monica Lannes, George Marx, Serge Dionne, Denise Levesque,

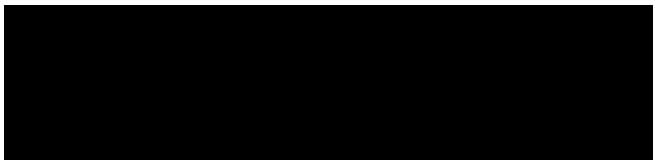
Jean François Beaulieu*, Emile Levy, Ernest G. Seidman

*Intestinal Immunology Laboratory, Ste. Justine Hospital, Departments
of Pediatrics and Nutrition, Faculty of Medicine, University of
Montreal,*

** Department of Anatomy and Cellular Biology, Faculty of Medicine,
University of Sherbrooke*

Address for correspondence and reprint requests :

Ernest G. Seidman, Chief, Division of Gastroenterology - Nutrition, Ste.
Justine Hospital, 3175
Cote Ste. Catherine Rd., Montreal Quebec, H3T 1C5, Canada.



Abstract

Epidemiological studies have suggested a beneficial effect of the consumption of dairy products on colon cancer. The role of milk fat components in modulating colon cancer epithelial cell turnover and differentiation was examined. Butyrate, conjugated linoleic acid (CLA) and sphingomyelin (SM), at low concentrations, significantly decreased human colorectal cancer Caco-2 cell proliferation. However, CLA, butyrate and SM supplementations stimulated nontransformed human intestinal epithelial HIEC cell growth. Both butyrate and SM were able to induce differentiation of Caco-2 cells. Caco-2 cell apoptosis was induced in the presence of butyrate, but not with CLA or SM. In keeping with these findings, only butyrate activated the caspase pathway of apoptosis, resulting in cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP). At the molecular level, diminished Caco-2 cell cyclooxygenase-2 (Cox-2) protein expression was demonstrated in response to both butyrate and CLA. These findings provide evidence that downregulation of Cox-2 and interference with the eicosanoid pathway may, in part, be involved in mediating the anti-tumor effects of these milk fat components.

Introduction

In view of the persistent resistance of colorectal cancers to chemotherapeutic agents, recent effort have focussed on their prevention. It has been suggested that nutritional interventions may become powerful tools for controlling malignant disease. An increasing body of research has supported the role for a number of anticarcinogenic factors in the human diet (1). There is increasing evidence that milk fat components have strong anti-tumor activity (2). Several epidemiological studies have suggested that the intake of milk and other dairy products is associated with a decreased incidence of colon cancer (1-6). Milk fat components including including butyrate, conjugated linoleic acid and sphingomyelin have been proposed as nutrients potentially capable of preventing the development of colon carcinogenesis (2).

Conjugated linoleic acid (CLA), which is primarily derived from dairy products, has been shown to inhibit carcinogenesis both *in vitro* and *in vivo*. CLA refers to a class of positional and geometric conjugated dieonic isomers of linoleic acid. Since its discovery by Pariza et al (7), investigations on its potential health benefits have expanded rapidly (8). CLA was show to be an effective inhibitor of benzo{a}pyrene-initiated mouse epidermal neoplasia (7), as well as mouse forestomach tumorigenesis (9). Dietary CLA at concentrations as low as 0.05 to 0.5% was found to produce a dose-dependant inhibition in mouse mammary tumors induced by dimethylbenz{a}anthracene (10). Continuous feeding of CLA(1%) reduced the total number of mammary carcinomas by 70% in rats treated with dimethylbenz{a}anthracene (11). Moreover, CLA exerted an inhibitory effect on the growth of different human cancer cell lines in culture : lung carcinoma cell lines (A-427, SK-LU-1, A549) (12), malignant melanoma (M21-HPB), colorectal (HT-29) and breast cancer cells (MCF-7)(13). The mechanisms by which

CLA affects carcinogenesis remain undetermined. It seems possible that its action involve, at least in part, a modification of intracellular signaling by eicosanoids and other lipid mediators (14-16). Research from a number of laboratories indicates that CLA affects the synthesis of prostaglandins, in particular PGE₂ (15,17). CLA has been shown to inhibit phorbol ester-induced prostaglandin E₂ production and hyperplasia in mouse epidermis (16).

Butyrate, the principal short chain fatty acid produced by fermentation of dietary fiber and resistant starch by colonic bacteria, is also abundant in bovine milk fat (7.5-13.0 mol/100 mol) (2). Although butyrate serves as the primary energy source for normal colonic epithelial cells (18), it inhibits growth and induces differentiation and apoptosis in colonic tumor cell lines (19,20,21). At the molecular level, butyrate has been shown to inhibit histone deacetylase, resulting in hyperacetylation of histones and increased accessibility of DNA to factors controlling gene expression (22). It also induces the cell-cycle inhibitors p21 and p27 and blocks cell proliferation in the G1 phase (23,24). Butyrate is known to inhibit p34cdc2 activity, the major G2/M regulatory protein (25). We have shown that it upregulates Bak, a pro-apoptotic protein, and activates the cascade of cysteine proteases, which in turn cleaves several substrates such as the DNA-repair enzyme poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)(26). It upregulates Fas and its ligand (27) and downregulates the apoptosis inhibitors Bcl-2 and Bcl-XL (23), resulting in apoptosis. Butyrate is able to activate peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-gamma, a nuclear lipid-activable receptor controlling expression of genes involved in the regulation of cell growth and differentiation (28). Recently, a role has been suggested for cyclooxygenase-2 (Cox-2), which catalyzes the synthesis of prostaglandins, and for 15-lipoxygenase (15-LO), in modulating butyrate-induced apoptosis and cell differentiation (29). A cyclooxygenase-2 selective non steroidal anti-inflammatory drug

(NS-398) enhanced the growth inhibitory effect of butyrate in HT29 cells, a colorectal carcinoma cell line expressing Cox-2 protein (30).

Sphingomyelin (N-acylsphingosine-1-phosphocholine) (SM) is another milk fat component that has drawn attention from cancer researchers. Hydrolysis of SM yields biologic messengers, of which the most important ones are ceramide, sphingosine and sphingosine-1-phosphate. Ceramide and sphingosine inhibit growth and /or induce apoptosis (31,32,33), whereas sphingosine-1-phosphate is a potent mitogen and an inhibitor of apoptosis (34). The anticarcinogenic effect of dietary sphingomyelin has been noted in mice treated with 1,2 dimethylhydrazine. SM supplementation at 0.1% of the diet reduced the number of aberrant colonic crypt foci by 70% and the number of aberrant crypts per focus by 30% (35). Longer feeding reduced the number of adenocarcinomas. In a larger follow-up investigation, sphingomyelin (0.025-0.5% of the diet) caused a comparable reduction in aberrant colonic crypt foci, the number of crypts per focus, and increased the proportion of adenomas versus adenocarcinomas (36). This raises the possibility that release of ceramide and sphingosine during digestion of dietary SM may alter the behavior of transformed cells, especially in the intestine.

To further investigate the beneficial effects of these milk fat components on colon cancer, as well as to elucidate the potential mechanisms by which they may prevent colonic neoplasia, we examined the effects of butyrate, conjugated linoleic acid and sphingomyelin, alone and in combination, on growth, differentiation and apoptosis of Caco-2 cells. This human colon cancer cell line represents a well-establish model system for studying the mechanisms involved in the regulation of cell turnover and differentiation of the intestinal epithelial cells (37).

Material and Methods

Cell culture and materials: Caco-2 cells from American Type Culture Collection (Rockville, MD) were maintained in minimal essential medium (MEM, Gibco BRL, Grand Island, NY) supplemented with 10% fetal bovine serum (FCS, Gibco), 1% MEM nonessential amino acids (Gibco) and 1% penicillin/streptomycin in a humidified incubator with 5% CO₂ at 37°C. In all experiments, subconfluent Caco-2 cells (passages 30-45) were plated in MEM with 5% FCS. After 24 hours without serum, Caco-2 cells were treated with either Na-butyrate (Sigma, St.Louis. MO), conjugated linoleic acid (CLA, Sigma) using a stock solution prepared in ethanol at a concentration of 250mM and diluted to the final concentrations with the MEM medium, Na-butyrate and CLA, sphingomyelin (Biomol, PA) dissolved in acetic acid followed by pH correction with NaOH or vehicle (control). HIEC, a human small intestinal crypt cells of fetal origin were employed as nontransformed control cells as previously described (37). The Annexin V kits were purchased from Clontech Laboratories Inc (Palo Alto, CA) and the Hoechst 33342-DNA stain from Boehringer (Mannheim, Germany). Additional reagents used for Western blots were : anti-cox-2 antibody and anti-PARP antibody and anti-β-actin antibody from Santa Cruz Biotechnology Inc (Santa Cruz, CA), and anti-goat and anti-rabbit horseradish peroxidase from BioSource International (Camarillo, CA).

Proliferation assay: Cells were seeded in 24-well plates (5×10^4 Caco-2 cells/ml, 3×10^5 HIEC cells/ml) and allowed to grow for one day. After a 24h period in FCS-free medium, Caco-2 cells were exposed to CLA (5-40μM), butyrate (1mM), CLA (20μM) and butyrate (1mM), sphingomyelin (0.5-1.5mg/ml) or vehicle. HIEC cells were exposed to CLA (40 and 100μM), butyrate (1mM),

sphingomyelin (1.5mg/ml) or vehicle, for up to 72h. During the final 2h of culture, ^3H thymidine was added ($2\mu\text{Ci/ml}$) and proliferation assessed by its incorporation into DNA. Results were expressed as percentage relative compared with control wells (medium alone).

Sucrase activity : Caco-2 cells were plated (10^5 cells/ml) on 24.5 mm polycarbonate Transwell filter inserts (Costar, Cambridge, MA). The inserts fit into six-well culture plates, and the medium was changed every 2 days. At the desire time intervals (days 15 and 21), the cells were subject to 24h in a FCS-free medium, after which the milk factors were added for 72h. The Caco-2 cells were then scraped in maleate buffer (pH 6,0) and sonicated. Protein content of Caco-2 homogenates were determined by Bradford micromethod (39). To assess cellular differentiation, sucrase activity was measured according to the method of Messer and Dahlqvist (40), as modified by Loyd and Whelan (41).

Apoptosis assays : Caco-2 cells were cultured in 24 well plates (5×10^4 cells/ml) to subconfluency and stimulated with factors for up to 48h. Cells were stained with propidium iodide (PI). Cell death was quantified by flow cytometry (FACScan, Becton Dickinson, Mississauga, Ont, Canada). In parallel, the typical morphological criteria of apoptosis were confirmed by Hoechst 33342 nuclear staining ($1\mu\text{g/ml}$) using an inverted fluorescent microscope (Axioscop, Carl Zeiss, Jena, Germany).

Western blot analysis : Changes in the expression of cyclooxygenase-2 (Cox-2) were monitored by Western blotting. In addition, degradation of poly-(ADP-ribose)polymerase (PARP) were determined by immunoblotting. CLA ($100\mu\text{M}$), butyrate (10mM) or sphingomyelin (1.5mg/ml) - treated and control Caco-2 cell lysates were prepared using an ice-cold lysis buffer (50mM Tris, 150mM

NaCl, 10mM EDTA, 1% Triton) containing a mixture of protease inhibitors (Boehringer). After determination of protein concentrations (Bradford method), equivalent samples (30 μ g) were resolved by 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad). Membranes were blocked in 5% nonfat milk for at least 30 minutes and then incubated with cox-2 (1/700) or PARP (1/1000) primary antibody overnight. After washing with Tris-buffered saline/Tween-20 (TBST), membranes were incubated with the corresponding alkaline phosphatase-conjugated secondary antibody (anti-goat-IgG 1/3000; anti-rabbit-IgG 1/3000) for 2 hours and then developed according to the enhanced chemiluminescence system (Super Signal West DURA Extended Duration Substrate, Pierce, Rockford, IL, USA).

Statistical analysis : All experiments were performed in duplicate and were repeated at least four times. Data were expressed as mean \pm standard deviations and were analyzed by ANOVA, followed by t test for comparison of pairs of groups. A p value $<.05$ was considered significant.

Results

Cell Proliferation

CLA significantly inhibited Caco-2 cell proliferation in a dose-dependent manner (Figure 1). Maximum inhibition was 58% of control after 96 hours of incubation with 40 μ M CLA. In contrast, CLA increased the growth of the nontransformed HIEC cells, reaching 150% of control at 72h incubation with 40 or 100 μ M CLA (Figure 2).

Butyrate at concentrations as low as 1mM significantly inhibited Caco-2 cell proliferation (41% versus control at 72h, $p < 0.01$). As illustrated in Figure 3, the combination of butyrate (1mM) with CLA (20 μ M) had no additive effect. Paradoxically, butyrate strongly stimulated HIEC cell proliferation at the same concentration (173% versus control at 72 h, $p < 0.05$) (Figure 2).

Sphingomyelin significantly decreased Caco-2 cell proliferation after 48 hours incubation at concentrations of 1.0 and 1.5mg/ml (66% and 57% versus control, respectively, $p < 0.01$). Similar results were seen at 72 hours (Figure 4). In HIEC cells, sphingomyelin had an inverse effect, increasing the growth of these normal cells in 164% of control (at 72h incubation with 1.5mg/ml, $p < 0.05$) (Figure 2).

Cell Differentiation

In order to examine the effect of milk nutrient factors on intestinal cellular differentiation, we assessed the induction of sucrase activity. As expected, butyrate (10mM) strongly stimulated Caco-2 sucrase activity (212% versus control, $p < 0.01$) after 72h incubation

at day 15 of culture (Figure 5a). Almost the same effect (192% versus control, $p < 0.01$) was seen after 72h of exposure to butyrate at day 21 of culture, even though at this time, spontaneous differentiation of this cell line, leading to expression of brush border enzymes, had already taken place (Figure 5b). Moreover, sphingomyelin concentrations of 1.5mg/ml also increased sucrase activity to 150% of control cells after 72h incubation at day 15 of culture ($p < 0.05$; Figure 5a). CLA treatment did not alter enzyme activity (Figures 5a and 5b), and thus does not appear to promote differentiation of Caco-2 cells, unlike butyrate and sphingomyelin.

Colon Cancer Cell Apoptosis

Experiments were designed to determine whether butyrate could induce the death of Caco-2 cells, at physiologically relevant concentrations. Within 48 hours after treatment with butyrate (10mM), the majority of Caco-2 cells died. This was observed microscopically by the detachment of adherent cells from the plates and their subsequent floating in the media, as quantified by flow cytometry (Figure 6). This death appeared to be primarily apoptotic, as it was accompanied by nuclear condensation and fragmentation, as well as by the formation of apoptotic bodies (Figure 7).

Despite the evidence for induction of cell death with butyrate, neither CLA or sphingomyelin induced Caco-2 apoptosis, under all experimental conditions tested (Figure 7).

Cox-2 Expression

To investigate the mechanisms by which butyrate and CLA inhibit proliferation of Caco-2 cells, we examined its effect on Cox-2 protein levels. Caco-2 overexpression of Cox-2 (69kDa) was detected, as shown in Figure 8. Butyrate (10mM) and CLA (100 μ M) after 72 hours of treatment, were both able to down-regulate the expression of Cox-2 (Figure 8). Immunoblot analysis of β -actin was used to control for loading and transfer.

Degradation of PARP

Caspase-3 is a key specific protease involved in apoptosis, and its activation triggers the degradation of poly-(ADP-ribose) polymerase (PARP), a DNA-repair enzyme. Immunoblotting revealed that PARP (113kDa) was cleaved into a 89kDa fragment in response to 72 hours of butyrate treatment (10mM) but not with CLA (100 μ M) or sphingomyelin (1.5mg/ml) stimulation (Figure 9). The lack of an apoptotic response to CLA and sphingomyelin was consistent with these observations.

Discussion

Consumption of milk and other dairy products is associated with a decreased incidence of colon cancer in most epidemiological studies (1-6). In the present study, we focused on specific milk fat components and their capacity to modulate cell turnover and differentiation of a colonic cancer cell line. Because maintenance of the colonic epithelium is a balance between cell renewal and death, changes in either of these processes may contribute to tumor development. Thus, we assessed the effect of conjugated linoleic acid (CLA), butyrate and sphingomyelin (SM) on Caco-2 cells, which provide a readily accessible model to study intestinal epithelial cells *in vitro*.

It is well documented that butyrate inhibits the proliferation of several colorectal cancer cell lines and stimulates their differentiation (20,23). Our results demonstrate that CLA and SM, like butyrate, can significantly inhibit growth of the Caco-2 cell line, in a dose-dependent manner. However, both CLA and butyrate were not found to have a synergistic or an additive effect on the potent inhibition of proliferation observed with butyrate alone.

The data presented herein furthermore show that the growth inhibitory effect of CLA, butyrate and sphingomyelin supplementation are specific for cancerous cells. All these milk fat factors clearly enhanced the proliferation of HIEC, a cell model of nontransformed human enterocytes, at the same concentrations. These results suggested that normal and tumor intestinal epithelial cells respond differently to CLA and sphingomyelin, as previously observed with butyrate (18).

Furthermore, our findings show that SM, as well as butyrate, can induce cell differentiation. CLA did not modulate colonic cell differentiation. SM hydrolysis yields ceramide, which has

important effects on cell differentiation (31). It is unknown whether ceramide mediated the induction of differentiation by SM.

It is well established that butyrate induces apoptosis in various human colorectal carcinoma cells *in vitro*, including Caco-2 cells (23,26). Our data confirm that treatment with butyrate resulted an increase in Caco-2 cell death, demonstrating the induction of apoptosis with two markers. However, this effect was not observed after treatment with CLA or SM. Upon the induction of apoptosis by butyrate, the activation of the classical caspase cascade lead to degradation of several key substrates including poly-(ADP-ribose) polymerase (PARP)(26). Our data demonstrate that PARP was cleaved in the presence of butyrate, but not with CLA or SM stimulation. These results suggest that CLA and SM do not mediate an apoptotic response in Caco-2 cells, despite their capacity to reduce cell renewal.

With regard to the mechanism of action of these milk fat components against colon carcinogenesis, previous reports indicate that their effects may be due to their ability to regulate Cox-2 activity. This is the key enzyme in the conversion of arachidonic acid (AA) to prostaglandins (PG) and other eicosanoids (42). Cox-2 expression is undetectable in normal intestinal cells, whereas its levels are elevated in up to 85% of human colorectal cancers (43). Increased PGE₂ synthesis has also been associated with colorectal neoplasia (44). Furthermore, various PG, including PGE₂, have been found to be growth-stimulatory to colon tumor cells *in vitro* (45). Because Cox-2 is suggested to play a key role in driving intestinal tumorigenesis, we examined its expression in response to milk nutrient factors. Caco-2 cells constitutively express Cox-2 protein. We observed that both CLA and butyrate diminished Caco-2 cell Cox-2 activity.

Our results are in keeping with a previous reports showing that butyrate down-regulates expression of Cox-2 protein in Caco-2 cells (29). In contrast, butyrate up-regulates Cox-2 protein levels in HT-29 cells, another human colorectal carcinoma cell line which also constitutively expresses Cox-2 protein (30). Our data indicate that biological effects of butyrate may be in part mediated through the eicosanoid pathway.

Several mechanisms of growth inhibition by CLA have been proposed, including the modulation of eicosanoids. Previous reports suggested that CLA may act by competing with linoleic acid (LA) in the biosynthesis of AA and eicosanoids. In one study, the investigators showed that there was a significant drop in tissue levels of AA after CLA feeding (46). AA is the precursor for PGE₂ and thus, any alteration in that substrate may modify eicosanoids and, ultimately, tumor growth. Therefore, a possible anticarcinogenic mechanism of CLA in this study may be related to effects on Cox-2 activity and consequently, alteration of eicosanoid synthesis.

In summary, our findings support the hypothesis that milk fat contains potent anticarcinogenic components. The data demonstrate that physiologic concentrations of CLA, butyrate and SM can modulate growth, differentiation and apoptosis of Caco-2 cells. CLA, butyrate and sphingomyelin do not inhibit the growth of normal, non-transformed HIEC. On the molecular level, the regulation of Cox-2 activity by both CLA and butyrate appears to be involved in their anticarcinogenesis.

Acknowledgments

This study was supported by a research grant from Dairy Farmers of Canada (EGS), by a research scholarship from the Fonds de Recherche en Santé du Québec (EL, EGS) and by research fellowship awards from the Swiss National Fund and the Novartis Foundation (GM).

References

1. Parodi, P.W. (1997) Cow's milk fat components as potential anticarcinogenic agents. *J. Nutr.*, 127 :1055-60.
2. Giovannucci, E., Stampfer, M.J., Colditz, G., Rimm, E.B., Willet, W.C. (1992) Relationship of diet to risk of colorectal adenoma in man. *J. Natl. Cancer Inst.*, 84 :91-98.
3. Mc Kneown-Eyssen, G.E., Bright-See, E. (1984) Dietary factors in colon cancer : international relationships. *Nutr. Cancer*, 6 : 160-70.
4. Rosén, M., Nystrom, L., Wall, S. (1988) Diet and cancer mortality in the counties of Sweden. *Am. J. Epidemiol.*, 127 : 42-9.
5. Welberg, J.W., Kleineuker, R., Van der Meer, R., Mulder, N.H. (1991) Calcium and the prevention of colon cancer. *Scand. J. Gastroenterol.*, 26 (suppl 188) : 52-9.
6. Glinghammar, B., Venturi, M., Rowland, I.R., Rafter, J.J. (1997) Shift from a dairy product-rich to a dairy product-free diet : influence on cytotoxicity and genotoxicity of fecal water – potential risk factors for colon cancer. *Am. J. Clin. Nutr.*, 66 : 1277-82.
7. Ha, Y.L., Grimm, N.K., Pariza, M.W. (1987) Anticarcinogens from fried ground beef : heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis* , 8 : 1881-1887.
8. [http:// www.wisc.edu/fri/clarefs.htm](http://www.wisc.edu/fri/clarefs.htm)
9. Ha, Y.L., Storkson, J., Pariza, M.W. (1990) Inhibition of benzo{a}pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by

conjugated dienoic derivates of linoleic acid. *Cancer Res.*, 50 : 1097-1101.

10. Ip, C., Singh, M., Thompson, H.J., Scimeca, J. (1994) Conjugated linoleic acid suppresses mammary carcinogenesis and proliferative activity of the mammary gland in the rat. *Cancer Res.*, 54 :1212-1215.

11. Ip, C., Jiang, C., Thompson, H.J., Scimeca, J.A. (1997) Retention of conjugated linoleic acid in the mammary gland is associated with tumor inhibition during the post-initiation phase of carcinogenesis. *Carcinogenesis* , 18: 755-759.

12. Schonberg, S., Krokan, H.E. (1995) The inhibitory effect of conjugated dienoic derivates (CLA) of linoleic acid on the growth of human tumor cell lines is in part due to increased lipid peroxidation. *Anticancer Res.*, 15 :1241-1246.

13. Shultz, T.D., Chew, B.P., Seaman, W.R., Luedecke, L.O. (1992) Inhibitory effect of conjugated dienoic derivates of linoleic acid and β -carotene on the in vitro growth of human cancer cells. *Cancer Lett.*, 63 : 125-133.

14. Pariza, M.W., Park, Y., Cook, M.E. (2000) Mechanisms of action of conjugated linoleic acid : evidence and speculation. *Proc. Soc.Exp.Biol.Med.*, 223 :8-13.

15. Li, Y., Watkins, B.A. (1998) Conjugated linoleic acid alter bone fatty acid composition and reduce ex vivo prostaglandin E₂ biosynthesis in rats fed n-6 or n-3 fatty acids. *Lipids* , 33 : 243-248.

16. Kavanaugh, C.J., Liu, K.L., Belury, M.A. (1999) Effect of dietary conjugated linoleic acid on phorbol ester-induced PGE₂

production and hyperplasia in mouse epidermis. *Nutr. Cancer* , 33(2) :132-138.

17. Liu, K.L., Belury, M.A. (1998) Conjugated linoleic acid reduces arachidonic acid content and PGE₂ synthesis in murine keratinocytes. *Cancer Lett.*, 127 :15-22.

18. Velasquez, O.C., Lederer, H.M., Rombeau, J.L. (1996) Butyrate and the colonocyte. Implications for neoplasia. *Dig. Dis. Sci.*, 41 :727-9.

19. Kim, Y.S., Tsao, D., Siddiqui, B., Whitehead, J.S., Arnstein P., Bennette, J., Hicks, J. (1980) Effects of sodium butyrate and dimethylsulfoxide on biochemical properties of human colon cancer cells. *Cancer* , 45 : 1185-1192.

20. Barnard, J.A, Warwick, G. (1993) Butyrate rapidly induces growth inhibition and differentiation in HT29 cells. *Cell Growth Differ.*, 4 :495-501.

21. Hague, A., Paraskeva, C. (1995) The short-chain fatty acid butyrate induces apoptosis in colorectal tumor cell lines. *Eur. J. Cancer Prev.*, 4 :359-64.

22. Boffa, L.C., Vidali, G., Mann, R.S., Alfrey, V.G. (1978) Suppression of histone deacetylation in vivo and in vitro by sodium butyrate. *J. Biol. Chem.*, 25 :3364-3366.

23. Litvak, D.A., Evers, B.M., Hwang, K.O., Hellmich, M.R., Ko, T.C., Townsend Jr, C.M. (1998) Butyrate-induced differentiation of Caco-2 cells is associated with apoptosis and early induction of p21 Waf1/Cip1 and p27 Kip1. *Surgery* , 124 :161-69.

24. Siavoshian, S., Segain, J.P., Kornprobst, M., Bonnet, C., Cherbut, C., Galmiche, J.P., Blottière, H.M. (2000) Butyrate and trichostatin A effects on the proliferation/differentiation of human intestinal epithelial cells; induction of cyclin D3 and p21 expression. *Gut*, 46 :507-14.
25. Harrison, L.E., Wang, Q.M., Studzinski, G.P. (1999) Butyrate-induced G2/M block in Caco-2 colon cancer cells is associated with decreased p34cdc2 activity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 222 (2) : 150-6.
26. Ruemmele, F.M, Dionne, S., Qureshi, I., Sarma, D.S.R., Levy, E., Seidman, E.G. (1999) Butyrate mediates Caco-2 cell apoptosis via up-regulation of pro-apoptotic BAK and inducing caspase-3 mediated cleavage of poly-(ADP-ribose) polymerase (PARP). *Cell Death Differ.*, 6 :729-735.
27. Fan, Y.Y., Zhang, J., Barhoumi, R., Burghardt, R.C., Turner, N.D., Lupton, J.R., Chapkin, R.S. (1999) Antagonism of CD95 signaling blocks butyrate induction of apoptosis in young adult mouse colonic cells. *Am. J. Physiol.*, 277 (2 Pt 1) : C310-19.
28. Wachtershauser, A., Loitsch, S.M., Stein, J. (2000) PPAR-gamma is selectively upregulated in Caco-2 cells by butyrate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 272(2) :380-5.
29. Kamitani, H., Geller, M., Eling, T. (1998) Expression of 15-lipoxygenase by human colorectal carcinoma Caco-2 cells during apoptosis and cell differentiation. *J. Biol. Chem.*, 34 :21569-21577.
30. Crew, T.E., Elder, D.J., Paraskeva, C. (2000) A cyclooxygenase-2 (COX-2) selective non-steroidal anti-inflammatory drug enhances the growth inhibitory effect of butyrate

in colorectal carcinoma cells expressing COX-2 protein : regulation of COX-2 by butyrate. *Carcinogenesis* , 21(1) :69-77.

31. Hannun, Y.A. (1994) The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide. *J. Biol. Chem.*, 269 :3125-8.

32. Jayadev, S., Liu, B., Bielawska, A.E., Lee, J.Y., Nazaire, F., Pushkareva, M.Y., Obeid, L.M., Hannun, Y.A. (1995) Role for ceramide in cell cycle arrest. *J. Biol. Chem.*, 270 :2047-52.

33. Sweeney, E.A., Inokuchi, J., Igarashi, Y. (1998) Inhibition of sphingolipid induced apoptosis by caspase inhibitors indicates that sphingosine acts in an earlier part of the apoptotic pathway than ceramide. *FEBS Lett.*, 425(1) :61-5.

34. Spiegel, S., Cuvillier, O., Edsall, L.C., Kohama, T., Menzeleev, R., Olah, Z., Olivera, A., Pirianov, G., Thomas, D.M., Tu, Z., Van Brocklyn, J.R., Wang, F. (1998) Sphingosine-1-phosphate in cell growth and cell death. *Ann. N.Y. Acad.Sci.*, 845 :11-18.

35. Dillehay, D.L., Webb, S.K., Schmelz, E.M., Merril, A.H. (1994) Dietary sphingomyelin inhibits 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in CF1 mice. *J. Nutr.*, 124 :615-20.

36. Schmelz, E.M., Dillehay, D.L., Webb, S.K., Reiter, A., Adams, J., Merril, A.H. (1996) Sphingomyelin consumption suppresses aberrant colonic crypt foci and increases the proportion of adenomas versus adenocarcinomas in CF1 mice treated with 1,2 dimethylhydrazine : implications for dietary sphingolipids and colon carcinogenesis. *Cancer Res.*, 56(21) :4936-41).

37. Levy, E., Mehran, M., Seidman, E.G. (1995) Caco-2 cells as a model for intestinal lipoprotein synthesis and secretion. *FASEB J.*, 9(8) :626-35.
38. Perrault, N., Beaulieu, J.F. (1996) Use of the dissociating enzyme thermolysin to generate viable human normal intestinal epithelial cell cultures. *Exp. Cell Res.*, 224 :354-64.
39. Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.*, 72 :248-254.
40. Messer, M., Dalhqvist, A. (1966) A one step ultramicromethod for the assay of intestinal disaccharidases. *Anal.Biochem.*, 14 :376-392
41. Lloyd, J.B., Whelan, W.J. (1969) An improved method for enzyme determination of glucose in the presence of maltose. *Anal. Biochem.*, 30 :467-470.
42. Tsujii, M., Kawano, S., DuBois, R.N. (1997) Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* , 94 :3336-3340.
43. Subbaramaiah, K., Zakim, D., Weksler, B.B., Dannenberg, A.J. (1997) Inhibition of cyclooxygenase : a novel approach to cancer prevention. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 216 :201-210.
44. Eberhart, C.E., Coffey, R.J., Radhika, A., Giardiello, F.M., Ferrenbach, S., DuBois, R.N. (1994) Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* , 107 :1183-1188.

45. Pugh, S., Thomas, G.A.O. (1994) Patients with adenomatous polyps and carcinomas have increased colonic mucosal prostaglandin E₂. *Gut* , 35 :675-678.
46. Qiao,L., Kozoni, V., Tsioulis, G.J., Koutsos, M.I., Hanif, R., Shiff, S.J., Rigas, B. (1995) Selected eicosanoids increase the proliferation rate of human colon carcinoma cell lines and mouse colonocytes in vivo. *Biochim.Biophys.Acta* , 1258 :215-223.
47. Banni, S., Angioni, E., Casu, V., Melis, M.P., Carta, G., Corongiu, F.P., Thompson, H., Ip, C. (1999) Decrease in linoleic acid metabolites as a potential mechanism in cancer risk reduction by conjugated linoleic acid. *Carcinogenesis* , 20 :1019-1024.

Figure Legends

Fig.1 - Effect of conjugated linoleic acid on human colorectal carcinoma Caco-2 cell proliferation. Colon cancer cells were cultured in a medium supplemented with conjugated linoleic acid (5, 10, 20 or 40uM) at different times (24,48,72 or 96h). Proliferation was measured by the incorporation of ³H-labeled thymidine. Results are expressed as mean \pm standard deviation versus control for at least 3 experiments (in triplicate). *p< 0.05; **p< 0.01.

Fig.2 - Effect of conjugated linoleic acid, butyrate and sphingomyelin on nontransformed human intestinal epithelial HIEC cell proliferation. Results of normal intestinal cell growth, cultured in a medium supplemented with conjugated linoleic acid (40, 100uM), butyrate (1mM) or sphingomyelin (1.5mg/ml) for up to 72h, are expressed as percentage of control (mean \pm standard deviation of 4 experiments, in triplicate). *p<0.05, **p<0.01.

Fig.3 - Effect of conjugated linoleic acid and butyrate on human colorectal carcinoma Caco-2 cell proliferation. Caco-2 cells were stimulated with butyrate (1mM), conjugated linoleic acid (20uM) or butyrate (1mM) and conjugated linoleic acid (20uM) for 72 and 96h. Growth was assessed using the ³H thymidine assay. Each bar represents the mean \pm standard deviation of three experiments, in triplicate. *p<0.05, **p<0.01.

Fig.4 - Effect of sphingomyelin on human colorectal carcinoma Caco-2 cell proliferation. Caco-2 cells were cultured with different concentrations of sphingomyelin (0.5,1.0, 1.5 mg/ml) for up to 96h. Basal proliferation with vehicle (acetic acid addition) was set as 100%. Results are expressed as mean \pm standard deviation for at least 3 experiments, in triplicate. *p<0.05, **p<0.01.

Fig.5 - Effect of conjugated linoleic acid, butyrate and sphingomyelin on human colorectal carcinoma Caco-2 cell differentiation. Milk factors (conjugated linoleic acid: 40 or 100 μ M; butyrate: 10mM; sphingomyelin:1.0 and 1.5mg/ml) were added for 72h and sucrase activity was expressed as percent of control. Each bar represents the mean \pm standard deviation of three separate experiments. * p <0.05, ** p <0.01. A) at 15 day of culture; B) at 21 day of culture.

Fig. 6 - Effect of butyrate on human colorectal carcinoma Caco-2 cell death. Cell death of butyrate-treated Caco-2 cells (10mM, 48h) was quantified by flow cytometric assay (propidium iodide uptake). * p <0.05 vs control.

Fig. 7 - Morphological signs of apoptosis : Hoechst nuclear stain in Caco-2 cells. Apoptosis was increased in butyrate-treated Caco-2 cells at 48 hours (10mM), but not in conjugated linoleic acid (100 μ M) or sphingomyelin (1.5mg/ml) Caco-2 treated cells compared with respective controls.

Fig. 8 - Cyclooxygenase - 2 expression in conjugated linoleic acid and butyrate treated Caco-2 cells. Western blot analysis revealed that both conjugated linoleic acid (100 μ M) and butyrate (10mM) were able to down-regulate Caco-2 cell Cyclooxygenase-2 expression (69kDa). β -actin was used as control.

Fig. 9 - Poly- (ADP-ribose) polymerase degradation induced by butyrate treated Caco-2 cells. The cleavage of poly-(ADP-ribose) polymerase (113kDa) into a 89kDa fragment was seen in response to butyrate (10mM; fig. A and B), but not with conjugated linoleic acid (100 μ M, fig A) or sphingomyelin (1.5mg/ml, fig.B).

Abbreviations

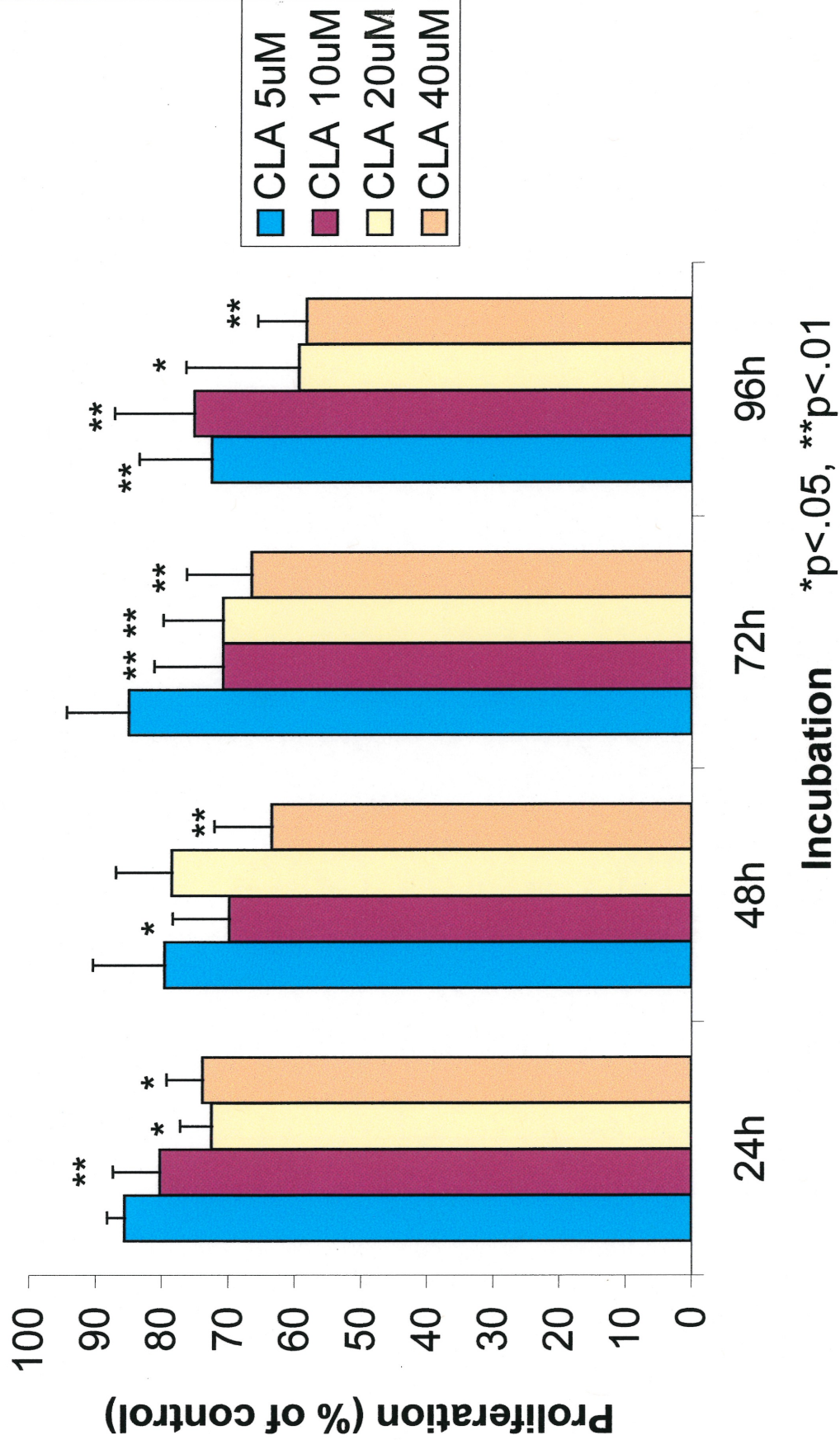
AA	- Arachidonic acid
Caco-2 cells	- an intestinal cell line derived from a human colorectal carcinoma
CLA	- Conjugated linoleic acid
Cox	- Cyclooxygenase
HIEC	- a nontransformed human intestinal epithelial cell line
LA	- Linoleic acid
PARP	- Poly- (ADP-ribose) polymerase
PG	- Prostaglandins
SM	- Sphingomyelin

Running Heads

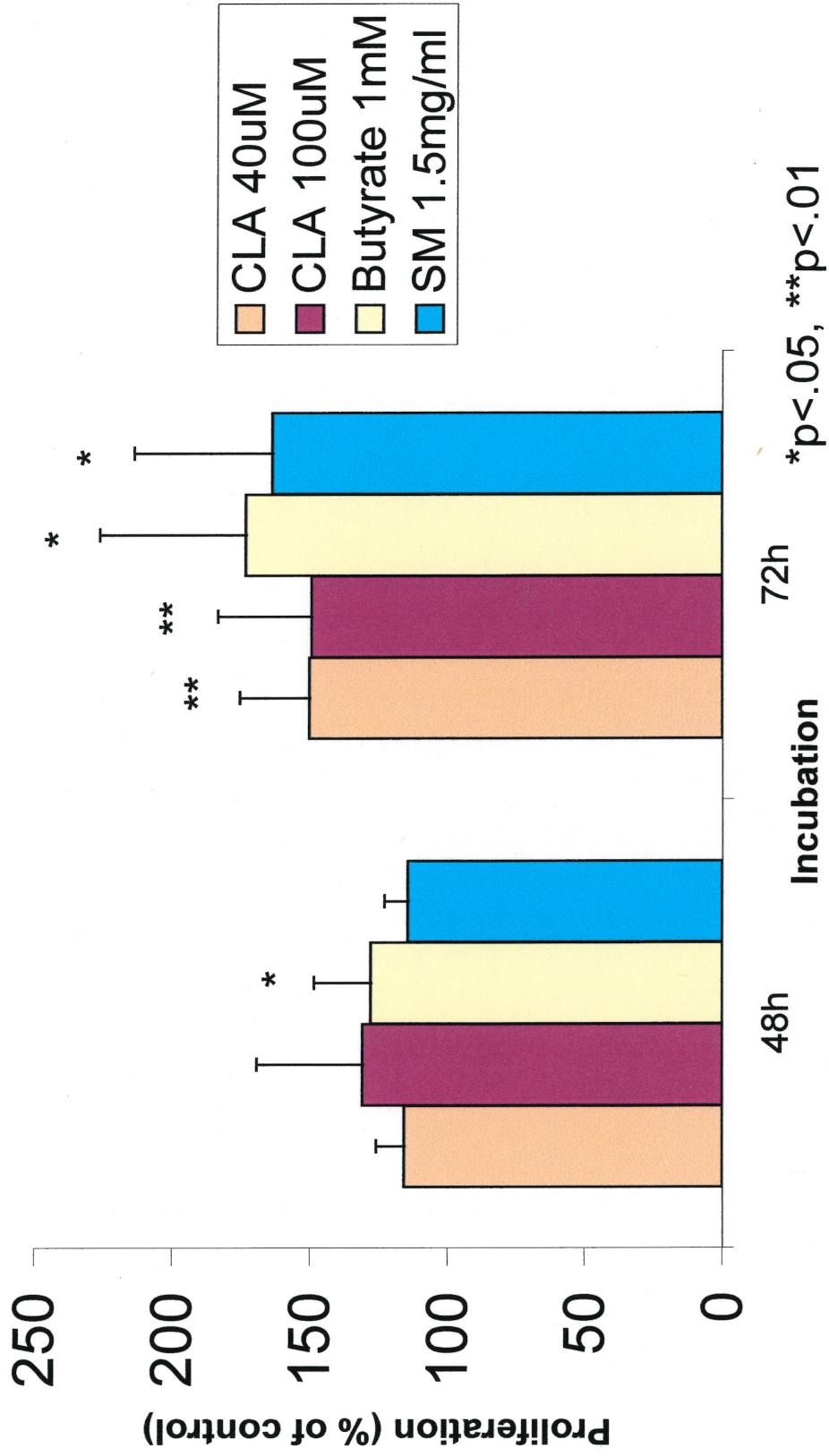
Milk fat components effects on intestinal cells

Figure 1

Effect of CLA on Caco-2 cell Proliferation

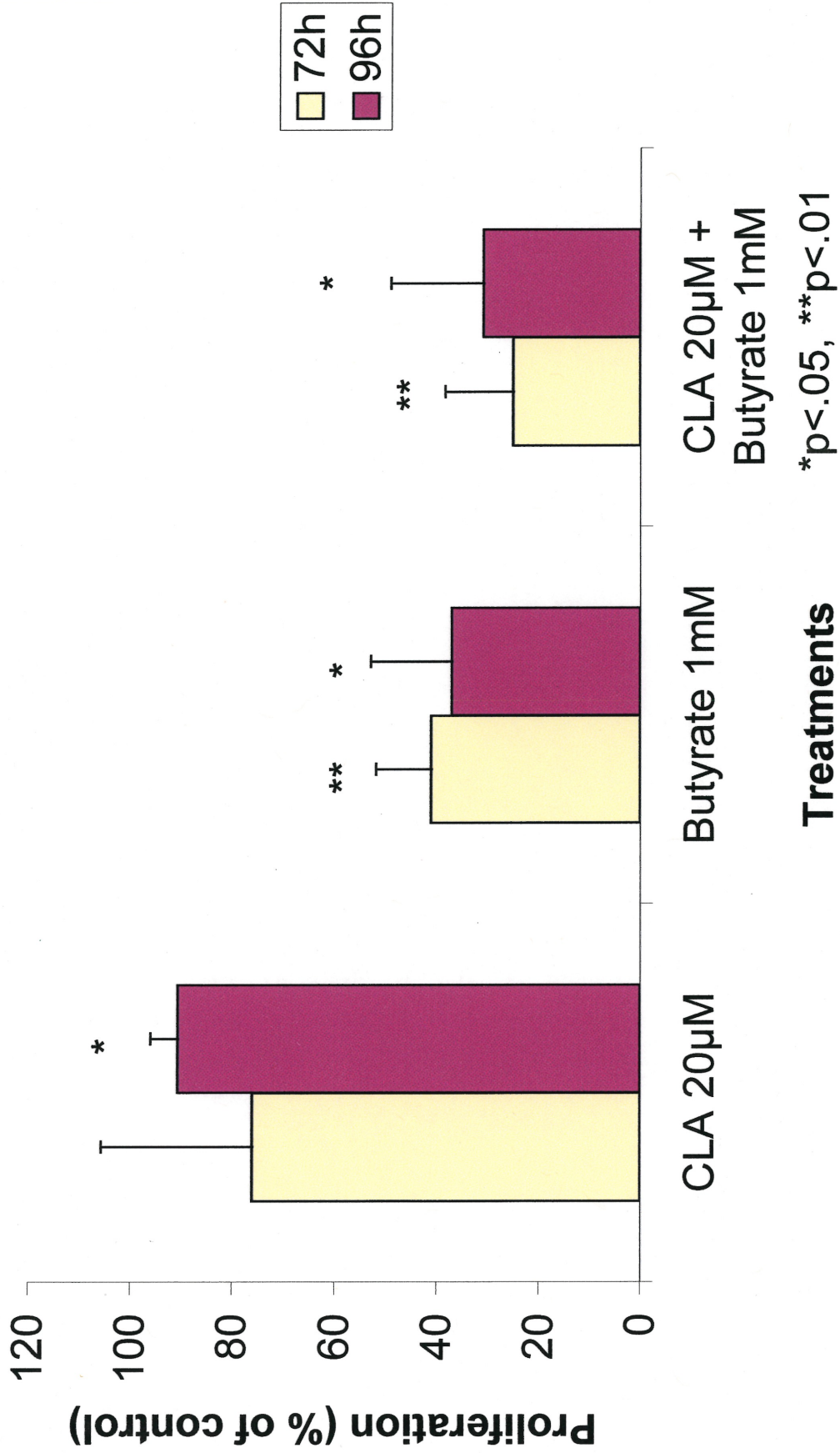


Effect of milk fat components on HIEC cell proliferation



Proliferation of Caco-2 cells

Figure 3



Effect of Sphingomyelin on Caco-2 cell Proliferation

Figure 4

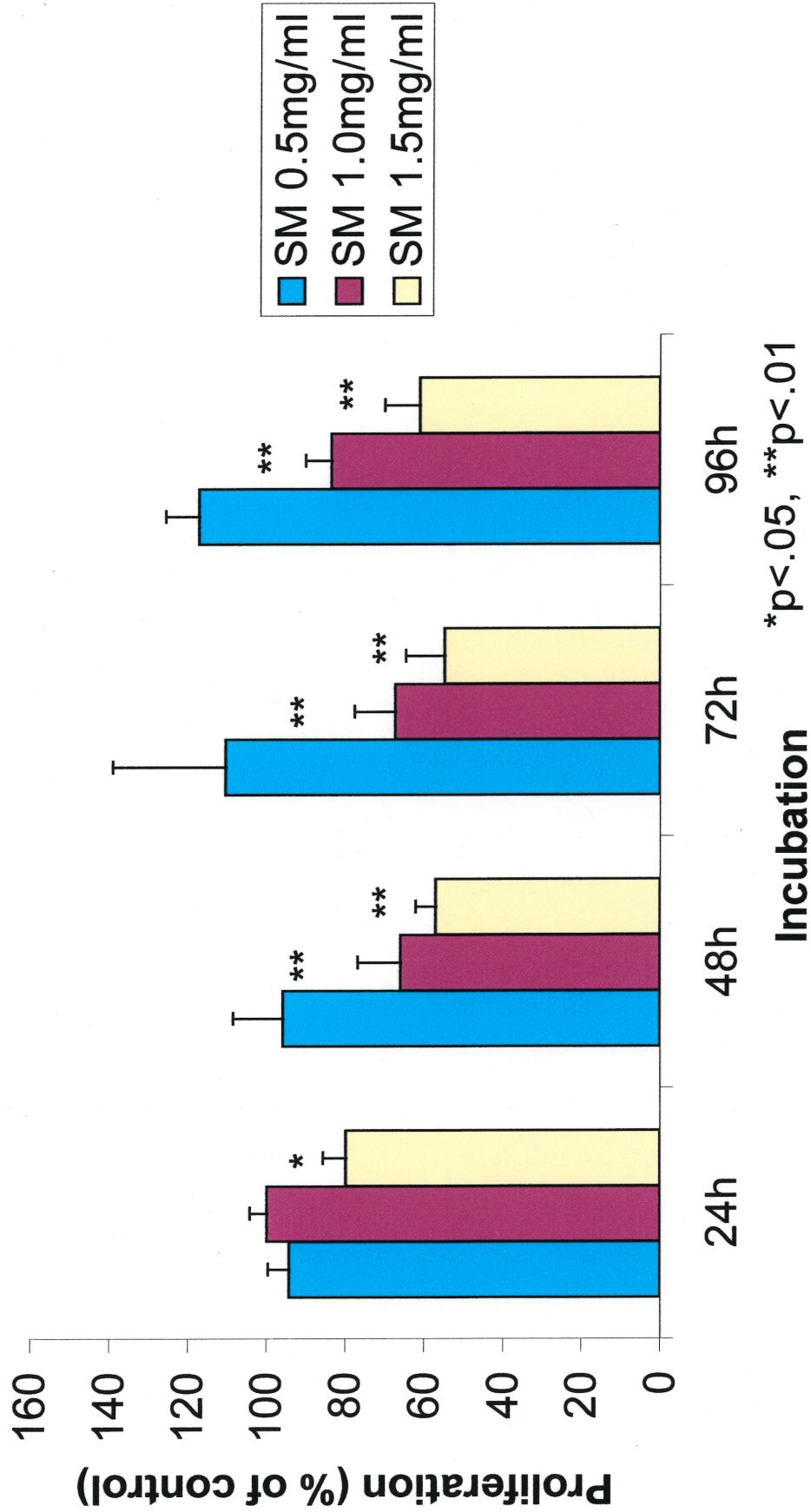
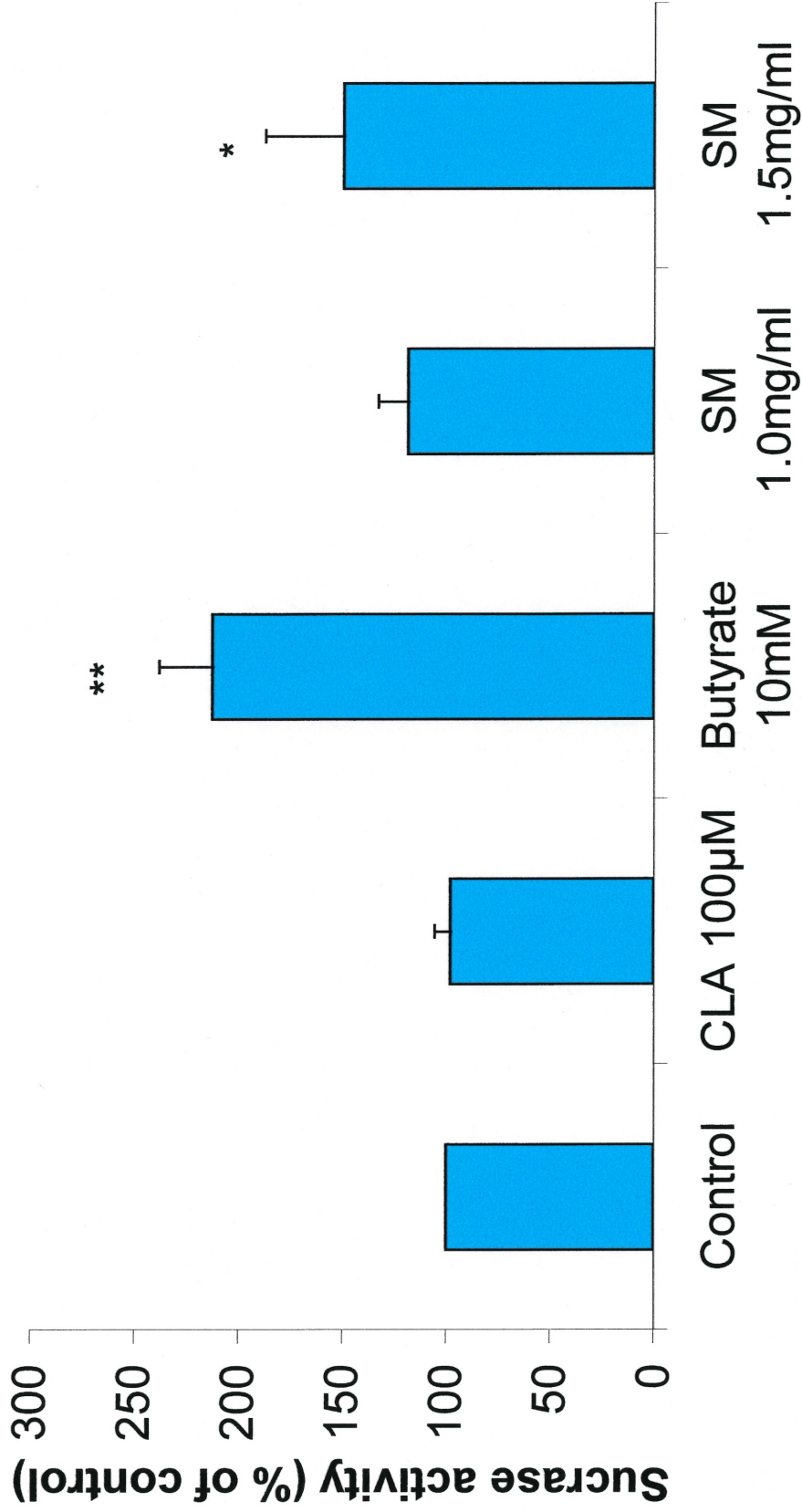


Figure 5a

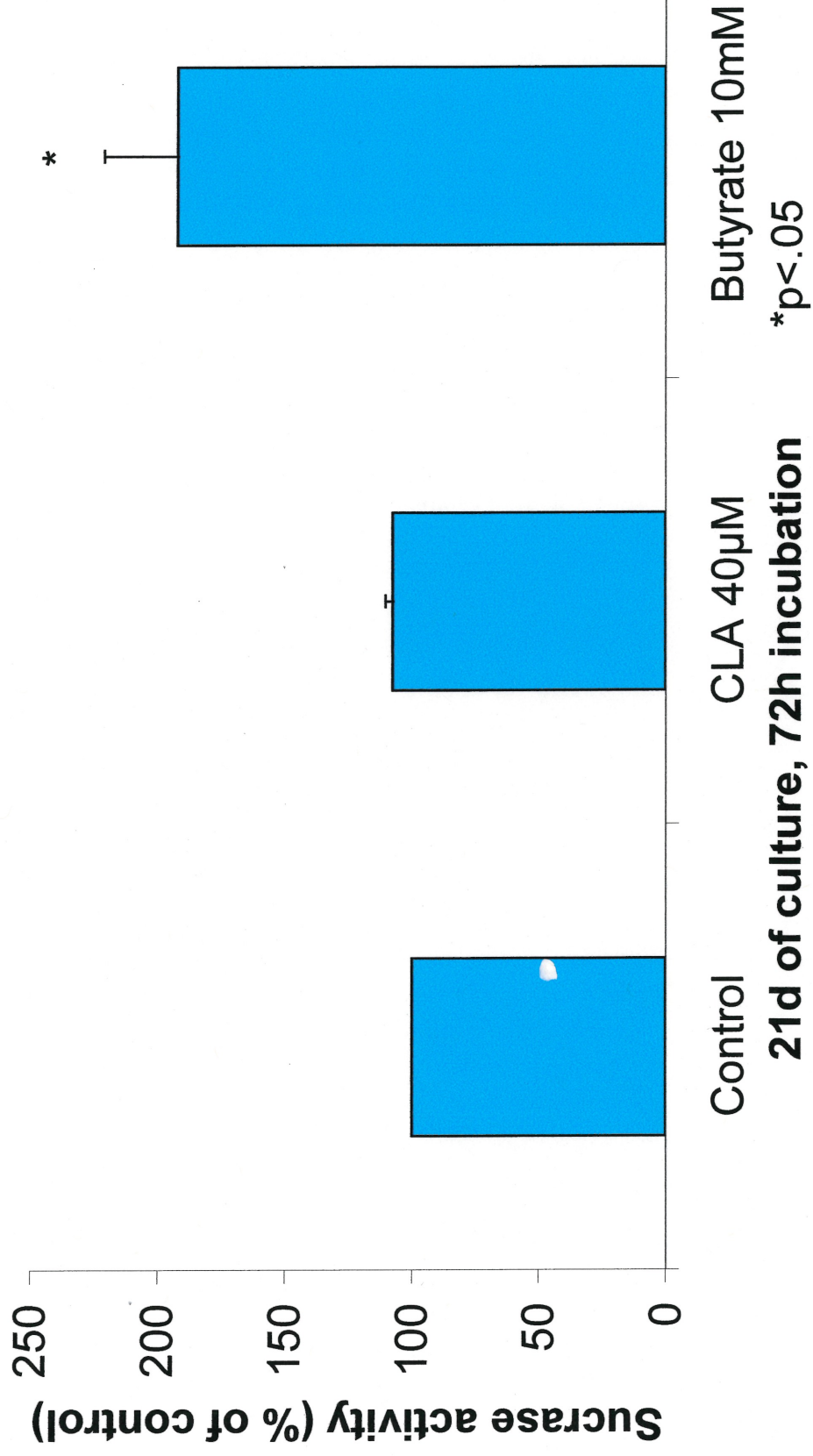
Effect of CLA, Butyrate and SM on Caco-2 Differentiation



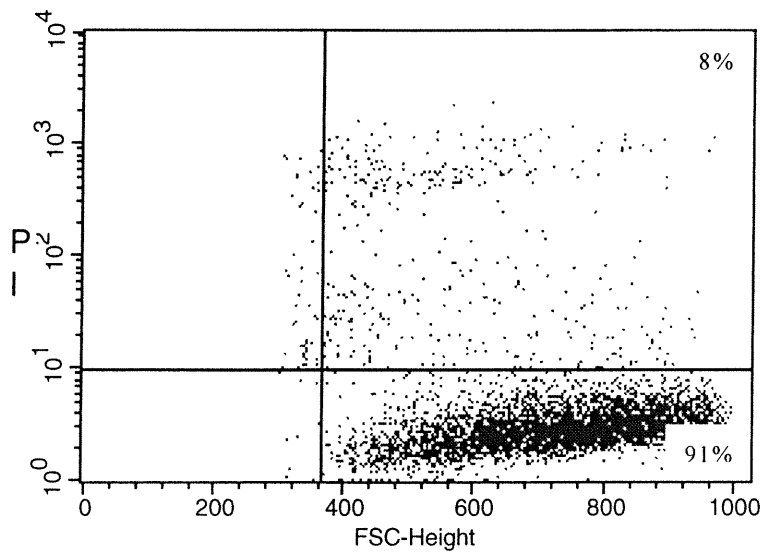
15d of culture, 72h incubation *p<.05, **p<.01

Figure 5b

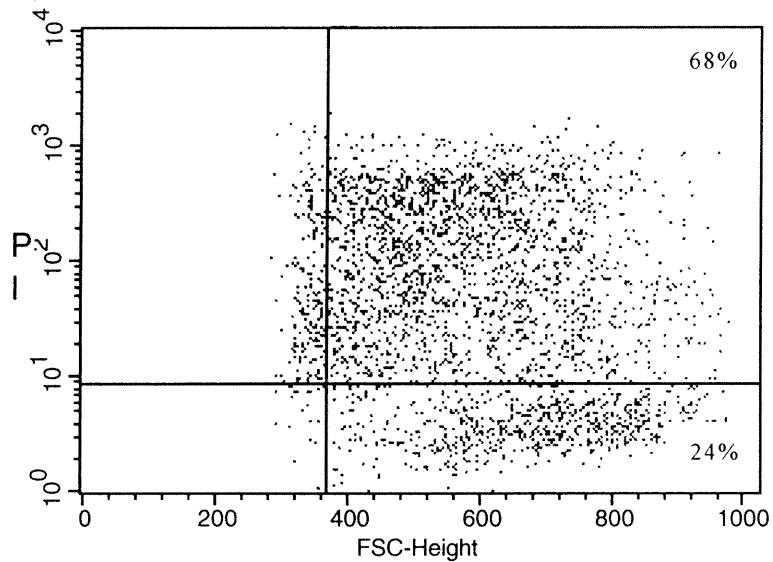
Effect of CLA and Butyrate on Caco-2 Differentiation



Control



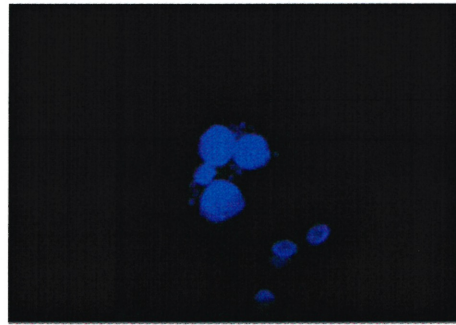
Butyrate 10mM (48 Hrs)



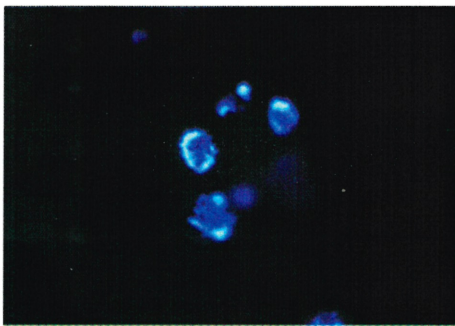
**CaCO₂ cell death; propidium iodide (PI)
flow cytometric assay.**

Figure 6

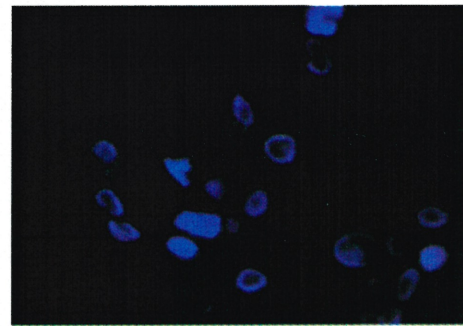
Morphological signs of apoptosis : Hoechst nuclear stain in Caco-2 cells



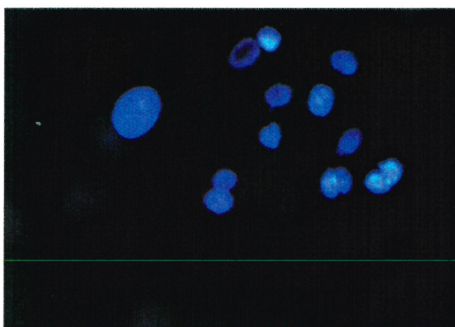
Control



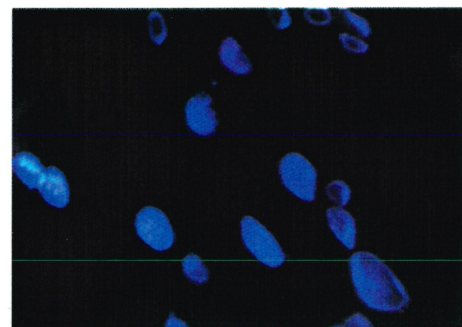
Butyrate



Conjugated Linoleic Acid



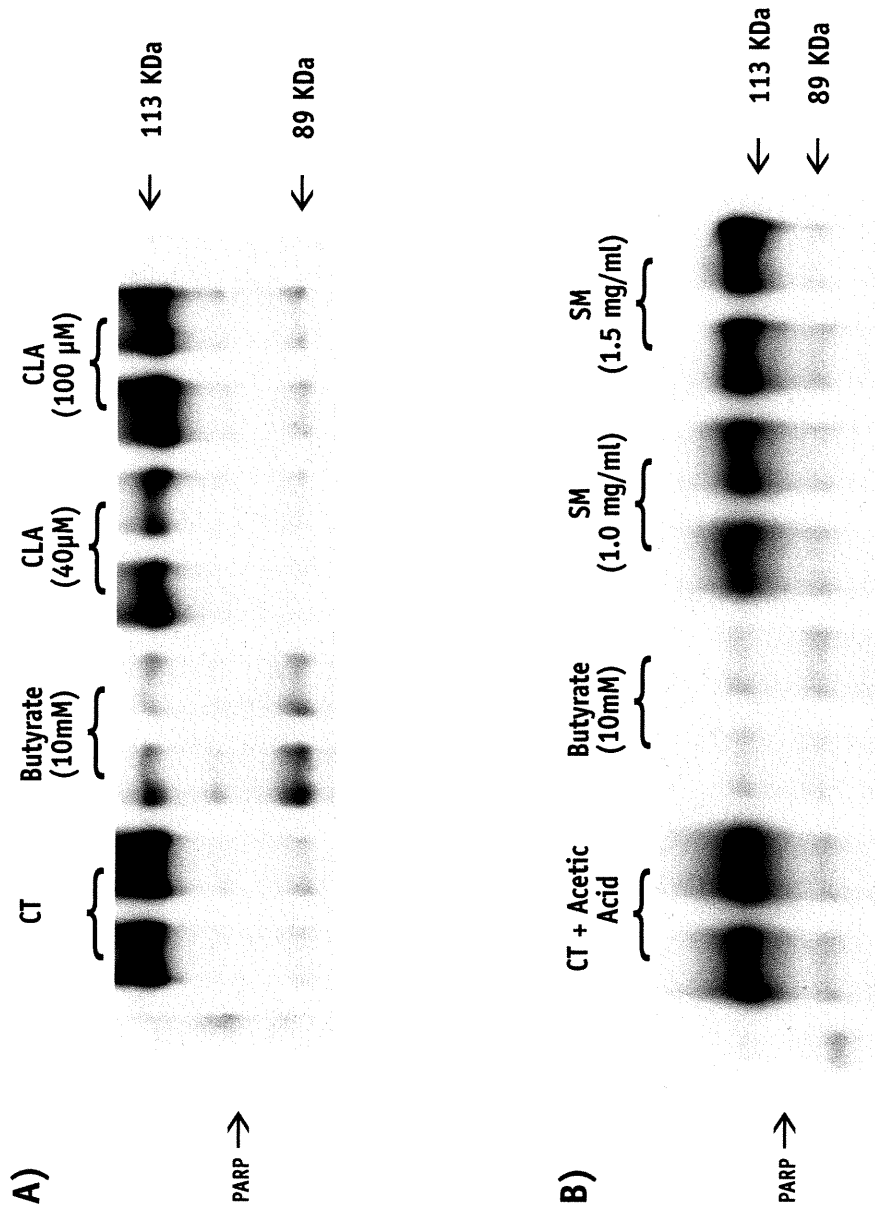
Acetic Acid Control



Sphingomyelin

Figure 7

Figure 9



**Carnitine Enhances the Antitumoral Effects of Butyrate on Human
Colon Cancer Cells**

George Marx, Monica Lannes, Serge Dionne, Ijaz Qureshi,

Dittikavi SRP Sarma*, Emile Levy, Ernest G. Seidman

*Division of Gastroenterology & Nutrition,
Centre de Recherche, Ste. Justine Hospital,
Departments of Pediatrics and Nutrition, University of Montreal,
and the *Department of Pathobiology and Laboratory Medicine,
University of Toronto, Canada*

Running title : Carnitine and butyrate inhibit Caco-2 cells

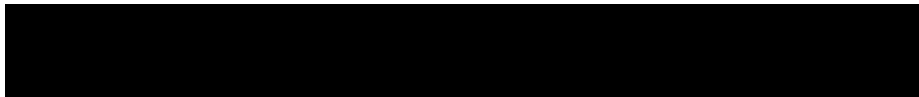
Financial support and acknowledgements

This study was supported by a grant from the Dairy Farmers of Canada, by research fellowship awards from the Swiss National Fund and the Novartis Research Foundation (GM), and by research scholarship awards from the Fonds de Recherche en Santé du Québec (EL, EGS).

This work was presented, in part, at the 101st Digestive Disease Week of the American Gastroenterological Association in San Diego, CA, May 2000, and published in abstract form (Gastroenterology 2000;118-A178).

Address for correspondence and reprint requests:

Ernest G. Seidman, Chief, Division of Gastroenterology & Nutrition,
Ste Justine Hospital, 3175 Cote Ste.-Catherine Rd.,
Montreal, Quebec, H3T 1C5, Canada



ABSTRACT

Normal colonocytes utilize butyrate as their preferred energy source. In contrast, cancerous intestinal cells stop proliferating in the presence of butyrate and undergo apoptosis. The potential colon tumor-preventing effects of butyrate *in vitro* have not been consistently demonstrated *in vivo*, perhaps due to its low bioavailability. Carnitine can conjugate with short chain fatty acids and facilitate their transport and availability intracellularly. Our hypothesis is that butyrate in combination with carnitine has additional beneficial effects in preventing intestinal tumor development. To test this hypothesis, the Caco-2 human colon cancer cell line was employed as an *in vitro* model. Butyrate and carnitine individually inhibited Caco-2 cell proliferation in a dose- and-time dependant manner. Their combination resulted in an accentuation of the growth inhibitory effect. The increased bioavailability of butyrate in the presence of carnitine was then confirmed *in vivo*. Colonic mucosa of C57BL/6J mice had increased free carnitine and acylcarnitine concentrations when carnitine was added to the high milk-fat diet. The activity of carnitine acetyltransferase also increased in the colon with carnitine supplementation, indicating the mobilization of short chain acylcarnitine pools, which would include butyryl carnitine. Taken together, these data provide evidence that the bioavailability of butyrate is facilitated by carnitine *in vitro* and *in vivo*, enhancing its anti-tumor effect.

Key words: Butyrate, carnitine, colon cancer, Caco-2 cells, short chain fatty acids, apoptosis, caspase, carnitine acetyltransferase.

INTRODUCTION

Several nutrients in cow's milk are thought to have potent anticarcinogenic effects, including short chain fatty acids, particularly butyrate, and L-carnitine (1-4). An inverse relationship between colon tumor mass and fecal butyrate levels was observed in an experimental rat model of colon cancer, supporting this hypothesis (5). Butyrate is the preferred energy source for normal colonic epithelial cells and has been shown to inhibit cancer cell growth, leading to differentiation (6-8). Furthermore, butyrate is a potent inducer of apoptosis in cancer cells *in vitro* (9,10). Administration of butyrate in form of an enteric-resistant slow-release pellet significantly increased colonocyte apoptosis in a rat model, indicating a potential anti-cancer effect *in vivo* (11). We recently observed (12) that butyrate mediates Caco-2 cell apoptosis via upregulation of pro-apoptotic BAK and by inducing caspase-3 mediated cleavage of poly- (ADP-ribose) polymerase (PARP). Despite evidence from several *in vitro* studies suggesting that butyrate can be a potential therapeutic agent in controlling growth of certain cancer cells, *in vivo* animal studies have not consistently demonstrated a benefit (9,11,13,14). The short plasma half-life and rapid metabolism of butyrate likely interfere with its potential beneficial effects *in vivo* (15). One potential explanation may relate to butyrate induction of decreased circulating carnitine levels (16), a condition associated with cancer (2). L-carnitine and its congeners regulate substrate flux and energy balance across cell membranes by modulating the transport of fatty acids into mitochondria and their subsequent β -oxidation (2,17). In addition to a high content of butyrate, cow's milk provides substantial amounts of carnitine (150-200 nmol/ml), even after commercial pasteurization (18,19). We therefore hypothesized that the co-consumption of carnitine and butyrate in milk might explain the epidemiological evidence that dairy products decrease the risk of colon cancer.

In this study, the combination of butyrate and carnitine additively inhibited the growth and induced apoptosis of a colon cancer cell line. Our *in vivo* studies in C57BL mice confirm that conjugation of butyryl-CoA with carnitine forms butyrylcarnitine, which enhanced the *in vivo* availability of ingested butyrate. Taken together, the data support a potential role of carnitine added to butyrate in the chemoprevention of colon cancer.

MATERIAL AND METHODS

Cell culture and materials: Caco-2 cells between passages 30-45 (American Type Culture Collection, Rockville, MD) were cultured at 37°C with 5% CO₂ in Minimal Essential Medium (MEM, Gibco, Grand Island, NY), containing 1% penicillin/streptomycin, 1% MEM non-essential amino acids (Gibco) and 5% fetal calf serum (FCS, Gibco). The agents used in the study were: Na-butyrate (Sigma, St. Louis, MO), L-carnitine (Sigma, Steinheim, Germany), the caspase-3 substrate and inhibitor zDEVK-FMK (Kamyia, Thousand Oaks, CA), the ICE-inhibitor zVAD-FMK (Kamyia), propidium iodide (PI, Sigma), and HOECHST 33342-DNA stain (Boehringer, Mannheim, Germany), carnitine acetyltransferase (Boehringer Mannheim, Germany), and ¹⁴C Acetyl-coenzyme A (Amersham Pharma Biotech).

Proliferation assay: These experiments were performed in 24-multi-well plates (Falcon Plastics, Oxnard, CA) at a density of 5 x 10⁴ cells/ml. After a 24 h stabilization period in FSC-free medium, Caco-2 cells were cultured in the absence (control) or presence of butyrate (0.01-10mM), carnitine (0.01-100mM), or butyrate (0.01-100mM) in combination with carnitine (0.01-100mM). Proliferation was quantified by monitoring changes in DNA synthesis, as measured by ³H-thymidine uptake (2μCi/ml) added during the last 2h of culture, as previously described (20). Results were expressed as percentage of ³H-incorporation relative to control wells without butyrate.

Apoptosis assay: Caco-2 cells were cultured in 24-multi-well plates to sub-confluence and stimulated with butyrate alone (0.1-50mM), carnitine alone (0.1-50mM), and butyrate in combination with carnitine (each 0.1-50mM) and/or zDEVK-FMK (0.1-200 μM), or zVAD-FMK (1-300μM) for up to 72h. Apoptotic and/or necrotic cells were identified using the Apo-Alert Annexin V kit (Clontech, Palo Alto, CA), according to the manufacturer's instructions. This

assay allows the detection of phosphatidyl-serine on the external cell membrane, an early marker of apoptotic cell death. Increased permeability for the DNA-dye PI was evaluated as a marker of late phase apoptosis. Quantification of apoptotic and necrotic cells was measured by flow cytometry (FACScan, Becton Dickinson, Mississauga, Ont, Canada). In parallel, the typical morphological criteria of apoptosis were confirmed by immunofluorescence after staining with the DNA-dye HOECHST 33342 (1 μ g/ml).

Animals: C57BL/6J mice were obtained from Jackson laboratories, Bar Harbor, ME. All animals had food (AIN 93G) and water ad libitum and were cared in accordance with the National Research Council's Guide for the Use and Care of Experimental Animals.

Diets: AIN 93G, the basal diet, contains only 5% corn oil. This was supplemented with 15% safflower oil or with 15% milk fat to generate high fat diets. Carnitine and butyrate were added where indicated at the expense of carbohydrate. To prevent lipid oxidation, diets were prepared weekly and kept in a cold room. The feed was refreshed every second day.

***In vivo* experiments:** Six-week-old male C57BL/6J mice were acclimatized for one week on routine chow (AIN 93G) and drinking water ad libitum. The mice were then randomly divided into different dietary groups (n=30/group): Group 1: AIN 93G (5% corn oil); Group 2: AIN + safflower oil 15%; Group 3: AIN + milk fat 15%; Group 4: AIN + milk fat + 0.08% carnitine (twice the amount of present in milk solids). After 15 weeks, the colons of 12 mice per group were processed for carnitine levels.

Determination of carnitine: Free, short and long chain acylcarnitine profiles were estimated in intestinal and colonic tissue by the method of Hoppel (21). The C57BL/6J mice were sacrificed, their colon was recuperated, weighed and homogenized in perchloric

acid 3%. The homogenates were centrifuged at 3500 rpm for 2 min. The supernatants were treated with 2M bicarbonate to determine free carnitine levels. The pellet was stabilized in KOH (1N) to determine long chain acetylcarnitine. After a series of centrifugations and incubations, ^{14}C acetyl-CoA (1mM) and carnitine acetyltransferase CAT (0.5mg/ml) are added. CAT converts tissue carnitine and ^{14}C acetyl-CoA into radioactive acetylcarnitine, which is separated from CoA on top of a column of Dowex 1X-8. The radioactivity is then measured in liquid scintillator. The determined acetylcarnitine reflects the quantity of total carnitine. The percentage of tissue carnitine is expressed as nmol/mg protein. The determination of protein levels was done as described by Lowry et al (22).

Determination of Carnitine Acetyltransferase Activity (CAT):

Colonic CAT activity was assayed by the radioenzymatic method described by Kalaria and Harik (23). The colon of the C57BL mice was isolated and homogenized in sodium phosphate buffer, pH 7.0 containing 0.025% of Triton X-100. After centrifugation at 1000 rpm for 5 min, the incubation medium (20 μ l of 10mM phosphate buffer at pH 7, 0.5mM EDTA, 150mM NaCl, 2mM L-carnitine, 1mM eserine salicylate, 0.4mM ^{14}C -acetyl-CoA) was added to 25 μ l of the homogenate. After an incubation period of 10 min at 37 $^{\circ}$ C the reaction was interrupted by placing the tube on ice. Subsequently, 5ml of 10mM phosphate buffer containing 50mg/l of acetylcarnitine was added, followed by 2ml of acetonitril containing 1.5% of tetraphenyl borate. The radioactivity was measured by liquid scintillation. Tissue CAT activity was expressed as nmoles of produced acetylcarnitine per mg tissue protein per minute. The determination of protein levels was done as described by Lowry et al (22).

Experimental design and statistical analysis: All experiments were performed in duplicate and were repeated at least four times.

Representative experiments or mean values \pm standard deviation are shown, as indicated. Statistical significance was determined by ANOVA, followed by a t test for comparison of pairs and groups. Differences with p values < 0.05 were considered significant.

RESULTS

Effect of butyrate and carnitine on Caco-2 cell proliferation

Butyrate and carnitine individually inhibited Caco-2 cell proliferation in a time-and-dose dependent manner (Fig 1a,b). This effect was shown at concentrations varying from 1 to 100mM. The combination of carnitine and butyrate had an additive effect on the growth arrest of Caco-2 cells ($p < 0.01$). Maximal inhibition was noted for the combination of butyrate and carnitine at 100 mM of each product after an incubation period of 24 hours ($15 \pm 6\%$ versus control, $p < 0.01$).

Effect of butyrate and carnitine on Caco-2 cell apoptosis

Near confluent Caco-2 cell monolayers showed a spontaneous apoptosis/necrosis of $15 \pm 1.5\%$ after 24 h. This gradually increased to $17.3 \pm 5\%$ at 72 h. Incubation of Caco-2 cells with butyrate, carnitine or butyrate in combination with carnitine induced increased apoptosis/necrosis in a dose-and-time dependant manner. A maximal apoptotic effect ($75 \pm 8\%$) was observed with 50mM butyrate in combination with 50mM of carnitine at 72 hours ($p < 0.05$ vs control). At low concentrations (1mM) no significant effect was shown for butyrate or carnitine alone, or for the combination of butyrate with carnitine after an incubation period of 24 to 72 hours. (Fig 2a,b).

Butyrate, carnitine and butyrate in combination with carnitine treated cells showed the typical morphologic characteristics of apoptosis when analyzed by immunofluorescence. After staining with the DNA-dye HOECHST 33342, nuclear condensation and fragmentation were observed, as was the formation of characteristic apoptotic bodies (Fig 3). Incubation of Caco-2 cells with butyrate,

carnitine and their combination using FITC-labeled Annexin V revealed the presence of phosphatidyl-serine on the external leaf of the plasma membrane, an event characteristic of early apoptosis (Fig 2c).

The role of caspase-3 in butyrate induced Caco-2 cell apoptosis

The role of caspase-3 in butyrate and carnitine induced Caco-2 cell apoptosis was examined using zDEVD-FMK, a specific inhibitor of the enzyme. This tetrapeptide corresponds to the sequence at the cleavage site of PARP, a known substrate of caspase-3. During its proteolysis, zDEVD-FMK binds irreversibly to caspase-3, thereby inactivating the enzyme. As shown in Figure 4a, increasing doses of zDEVK-FMK not only suppressed the apoptotic effect of butyrate, but also that of the butyrate and carnitine combination. Complete inhibition of butyrate in combination with carnitine (10mM each) induced apoptosis was observed with zDEVD-FMK concentrations of 100 μ M and higher. However, when Caco-2 cells were treated with carnitine alone this inhibition of apoptosis was not observed at all. The caspase inhibitor zVAD-FMK primarily inhibits caspases of the ICE-group, and at higher doses also blocks caspase-3 and -6. ZVAD-FMK also significantly reduced Caco-2 cell apoptosis induced by butyrate and butyrate in combination with carnitine. However, that induced by carnitine alone was again unaffected (Fig 4b).

Colonic tissue carnitine levels

The effect of carnitine supplementation to the diet on mouse colonic tissue carnitine levels is shown in Table 1. Concentrations of total and free carnitine were significantly increased compared to animals receiving high fat diets without carnitine supplementation. In keeping with these findings, dietary carnitine supplementation also

resulted in higher carnitine acyltransferase activity in the colon of mice compared to those who received high milk fat diet without carnitine supplementation (Table 2).

DISCUSSION

This *in vitro* and *in vivo* study provides new insight into the increased bioavailability and effect of butyrate by L-carnitine supplementation. Using the Caco-2 cell model, the data presented demonstrate that the antitumoral activity of butyrate is increased by adding L-carnitine. The *in vivo* experiments with C57BL/6J mice confirm that the addition of carnitine to the diet can increase colonic tissue stores of this nutrient (Table 1).

The results obtained herein show that butyrate and carnitine are both able to inhibit the proliferation and induce apoptotic cell death of Caco-2 cells. The combination of butyrate and carnitine had an additive effect on these parameters. Furthermore, we found that apoptotic cell death induced by the combination of butyrate and carnitine was mediated via activation of the caspase pathway, as observed with butyrate alone. Inactivation of caspase-3 using zDEVD-FMK, which irreversibly binds to its catalytic site with a very high affinity, was not inhibited in carnitine-induced cell death. The use of the broad-range caspase-inhibitor zVAD-FMK, which blocks ICE-like caspases (caspase 1,4, and 5) at low concentrations and CPP-32-like caspases (caspase 3) at higher concentrations, confirmed that the caspase cascade is essential to butyrate induced Caco-2 cell death, but not in that induced by carnitine alone.

L-Carnitine plays an important role in the metabolism of fatty acids. It is a required cofactor for long-chain fatty acid transport across the inner membrane of mitochondria, where long chain fatty acids become available for β oxidation and subsequent gluconeogenesis and energy production (24). Acyl-coenzyme A is transferred into the intermembrane space and exchanges with carnitine to yield acylcarnitine. Transport of acylcarnitine through the inner membrane is followed by acyl transfer back to coenzyme A and initiation of oxidation. The formation of acylcarnitine releases

coenzyme A, thus facilitating oxidation of SCFA such as butyrate (25,26).

The major sources of intestinal butyrate and L-carnitine are dietary. Butyrate is an end-product of the colonic fermentation of fiber and milk fat. L-carnitine is present in foods of animal origin, particularly cow's milk (18,19). Normal, non-transformed colonocytes utilize SCFA as a major and preferred source of energy. However, butyrate (5,12, 27) and butyrate in combination with carnitine rapidly induces colon cancer cell death, as shown herein. In this report we have provided evidence suggesting that carnitine increases the bioavailability of butyrate *in vitro*. Cell death in butyrate and butyrate in combination with carnitine treated Caco-2 cells is mediated via the caspase cascade.

Our *in vivo* animal studies have shown that supplementation of carnitine orally results in increased tissue stores of carnitine in the colonic mucosa. Furthermore, activity of carnitine acyltransferase was depleted in concert with tissue stores, when animals were fed high milk fat diets. The activity of this enzyme was restored to normal levels in carnitine supplemented animals.

There are no reports in the literature regarding the carnitine content of colonic mucosa and the activity of carnitine acetyltransferase. This enzyme, which reversibly acylates all short-chain fatty acids including butyrate, may be extremely important to be studied in the colon in the context of carcinogenesis. Carnitine acetyltransferase may be instrumental in not only buffering colonic butyrate, but also in modulating its bioavailability. Maintenance of the short-chain acylcarnitine/carnitine and acylCoA/CoA ratios in various colonocyte organelles (mitochondria, peroxisomes and the endoplasmic reticulum) by colonic acetyltransferase may be as important as in the hepatocyte (28). Taken together, these data provide evidence that the antitumoral activity of butyrate is

enhanced by carnitine supplementation. These findings may explain, in part, the epidemiological evidence for a chemoprotective effect of dairy product consumption in colon cancer.

REFERENCES

1. Parodi PW. Cows' milk fat components as potential anticarcinogenic agents. *J Nutr* 1997; 127:1055-60.
2. Peluso G. et al. Cancer and anti-cancer therapy-induced modifications on metabolism mediated by carnitine. *J Cell Physiol* 2000; 182:339-50.
3. Van der Meer R., et al. Mechanisms of the intestinal effects of dietary fats and milk products on colon carcinogenesis. *Cancer Lett* 1997; 114:75-83.
4. Holt PR. Et al. Modulation of abnormal colonic epithelial cell proliferation and differentiation by low fat dairy foods: a randomized controlled trial. *JAMA* 1998; 280:1074-79.
5. McIntyre A, Gibson PR, Young GP. Butyrate production from dietary fibers and protection against large bowel cancer in rat model. *Gut* 1993; 34:386-391.
6. Toscani A, Soprano DR and Soprano KJ. Molecular analysis of sodium butyrate-induced growth arrest. *Oncogene Res* 1988; 3:233-238.
7. Kim YS, Tsao D, Siddiqui B, Whitehead JS, Armstein P, Bennett J, Hicks J. Effects of sodium butyrate and dimethylsulfoxide on biochemical properties of human colon cancer cells. *Cancer* 1980; 45:1185-92.
8. Whitehead RH, Young GP, Bhatl PS. Effects of short chain fatty acids on a new human colon cancer cell line (LIM 1215). *Gut* 1980; 27:1457-1466.
9. Medina V, Alfonso JJ, Alvarez-Arguelles H, Hernandez C and Gonzalez F. Sodium butyrate inhibits carcinoma development in a 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon cancer. *JPEN* 1998; 22:14-17.
10. Calabrese C, Venturini L, Ronco G, Villa P, Chomienne C, Belpomme D. Butyric acid and its monosaccharide ester induce apoptosis in the HL-60 cell. *Biochem Biophys Res Comm* 1993; 195:31-38.

11. Caderni G, Luceri G, Lancioni L, Tessitore L, Dolara P. Slow release pellets of sodium butyrate increase apoptosis in the colon rats treated with azoxymethane, without affecting aberrant crypt foci and colonic proliferation. *Nutr Cancer* 1998; 30(3):175-81.
12. Ruemmele FM, Dionne S, Qureshi I, Sarma DSR, Levy E and Seidman EG. Butyrate mediates CACO-2 cell apoptosis via up-regulation of pro-apoptotic BAK and inducing caspase-3 mediated cleavage of poly-(ADP-ribose) polymerase (PARP). *Cell Death and Diff* 1999; 6:729-35.
13. Velazquez OC, Lederer HM, Rombeau JL. Butyrate and the colonocyte. Implications for neoplasia. *Dig Dis Sci* 1996; 41:727-729.
14. Freeman HJ. Effects of differing concentrations of sodium butyrate on 1,2-dimethylhydrazine-induced rat intestine neoplasia. *Gastroenterology* 1986; 91:596-602.
15. Miller AA, Kurschel E, Osieka R, Schmidt CG. Clinical pharmacology of sodium butyrate in patients with acute leukemia. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1993; 193:330-336.
16. Chalmers RA, Roe CR, Stacey TE, Hoppel CL. Urinary excretion of L-carnitine and acylcarnitine by patients with disorders of organic acid metabolism: Evidence for secondary insufficiency of L-carnitine. *Pediatr Res* 1984; 18:1325-1328.
17. Boerrigter ME, Franceschi C, Arrigoni-Martelli E, Wei JY, Vijg J. The effect of L-carnitine and acyl-L-carnitine on the disappearance of DNA single strand breaks in human peripheral blood lymphocytes. *Carcinogenesis* 1993; 14:2131-36.
18. Sandor A, Pecsuvac K, Kerner J, Alkonyi I. On carnitine content of the human breast milk. *Pediatr Res* 1982;16:89-91.
19. Penn D, Dolderer M, Schmidt-Sommerfeld E. Carnitine concentrations in the milk of different species and infant formulas. *Biol Neonate* 1987;52:70-79.
20. Ruemmele FM, Gurbindo C, Mansour AM, Marchand R, Levy E, Seidman EG. Effect of interferon gamma on growth, apoptosis

and class II antigen expression of immature intestinal crypt (IEC-6) cells. *J Cell Physiol* 1998;176:120-126.

21. Minkler PE, Hoppel CL. Determination of free carnitine and « total » carnitine in human urine : derivitization with 4'-bromophenylacyl trifluoromethanesulfonate and high performance liquid chromatography. *Clin Chim Acta* 1992; 212 :55-64.

22. Lowry O, Rosenrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 265-274.

23. Kalaria RN, Harik SI. Carnitine acetyltransferase activity in the human brain and its microvessels is decreased in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1992;32:583-586.

24. Rebouche CHJ. Carnitine function and requirements during the life cycle. *FASEB J.* 1992;6:3379-3386.

25. Scheppach W, Sommer H, Kirchner T, Paganelli GM, Batram P, Christl FR, Dusel G and Kasper H. Effect of butyrate enemas on the colonic mucosa in distal ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1992;103:51-56.

26. Johnson JA. L-carnitine treatment of distal ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1992;103:1709-1710.

27. Hague A, Manning AM, Hanlon KA, Huchtscha LL, Hart D and Pareskeva C. Sodium butyrate induces apoptois in human colonic tumor cell lines in a p53-independent pthway:implication for the possible role of dietary fibers in the prevention of large bowel cancer. *Int J Cancer* 1993;55:498-505.

28. Ramsay RR. The carnitine acyltransferases : modulators of acyl-CoA-dependent reactions. *Biochem Soc Trans* 2000;28 :182-6.

Figure legends

Fig.1 Effect of butyrate and carnitine, alone and in combination, on Caco-2 cell proliferation. Caco-2 cells were cultured in the absence (control) or presence of butyrate (B), carnitine (C) or carnitine in combination with butyrate (C+B) for 24 h (Fig.1a) or 72 h (Fig.1b). Proliferation was measured by the incorporation of ³H-labeled thymidine, added 2h prior to termination of the experiment. Basal proliferation without butyrate, carnitine or the combination of butyrate and carnitine was set at 100%. Results are expressed as mean \pm standard deviation versus control wells for 4 experiments, each in triplicate. * $p < 0.01$ vs other group(s) at same concentration.

Fig.2 Effect of butyrate and carnitine, alone and in combination, on Caco-2 cell apoptosis and cell death. Stimulation with butyrate, carnitine and their combination induced Caco-2 cell death in a dose and time dependent manner after an incubation period of 24 hours (Fig 2a) and 72 hours (Fig 2b), as quantified by flow cytometry. * $p < 0.01$ (B+C vs B or C). **Fig 2c:** Phosphatidyl serine expression was observed on the outer plasma membrane leaflet on apoptotic Caco-2 cells, and propidium iodide (PI) expression on necrotic Caco-2 cells in response to butyrate, with or without carnitine. During early apoptosis, butyrate-treated Caco-2 cells expressed phosphatidyl serine which binds FITC-labeled Annexin V, allowing quantification by flow cytometry. Necrotic cells are quantified by their incorporation of PI.

Fig.3 Morphological assessment of the effect of the combination of butyrate and carnitine on Caco-2 cell apoptosis. Immunofluorescence microscopy after staining with the HOECHST 33342 DNA dye revealed the typical features of apoptotic cells (bottom), with nuclear shrinkage, condensation and fragmentation in

butyrate and carnitine treated Caco-2 cells. The nuclei of untreated cells (top) have a uniformly regular, oval shape. Original magnification x 800.

Fig.4 Effect of caspase inhibition on the induction of Caco-2 cell apoptosis by butyrate and carnitine, alone or in combination. Butyrate, carnitine and their combination – induced cell apoptotic death, as quantified by flow cytometry using the Apo-Alert-Annexin V assay. **a)** The addition of z DEVD-FMK (0.1-200 μ M), a caspase-3 inhibitor, potently blocked the apoptosis induced by butyrate and by butyrate in combination with carnitine, in a dose-dependent manner (* $p < 0.01$). However, carnitine induced apoptosis was unaffected. **b)** Similarly, the ICE-inhibitor zVAD-FMK (100 μ M), a broad-range caspase inhibitor, also blocked apoptosis induced by butyrate and butyrate in combination with carnitine at higher concentrations (>10 μ M) (* $p < 0.01$). Once again, carnitine induced apoptosis was not affected by the caspase inhibitor zVAD-FMK.

Table 1 Effect of feeding milk fat with and without carnitine on carnitine levels in colonic tissue ¹

<i>Diet</i>	<i>Total Carnitine</i>	<i>Free Carnitine</i>	<i>n</i>
AIN	1.51 +/- 0.25	1.08 +/- 0.27	12
AIN + Safflower Oil	1.49 +/- 0.26	1.14 +/- 0.16	12
AIN + Milk Fat	1.35 +/- 0.26	0.50 +/- 0.29	12
AIN + Milk Fat + Carnitine	2.15 +/- 0.27*	1.75 +/- 0.41*	12

*p < 0.01;

¹(nMol/mg protein)

Table 2 Carnitine acetyltransferase (CAT) activity in colons of mice fed with different diets for 49 weeks.

<i>Diet</i>	<i>CAT activity (nmol/mg protein/hr)</i>	<i>n</i>
AIN	80.4 +/- 9.4	8
AIN + Safflower Oil	60.4 +/- 10.8	8
AIN + Milk Fat	44.3 +/- 5.8*	8
AIN + Milk Fat + Carnitine	64.0 +/- 10.6	8

*p < 0.05

Figure 1a

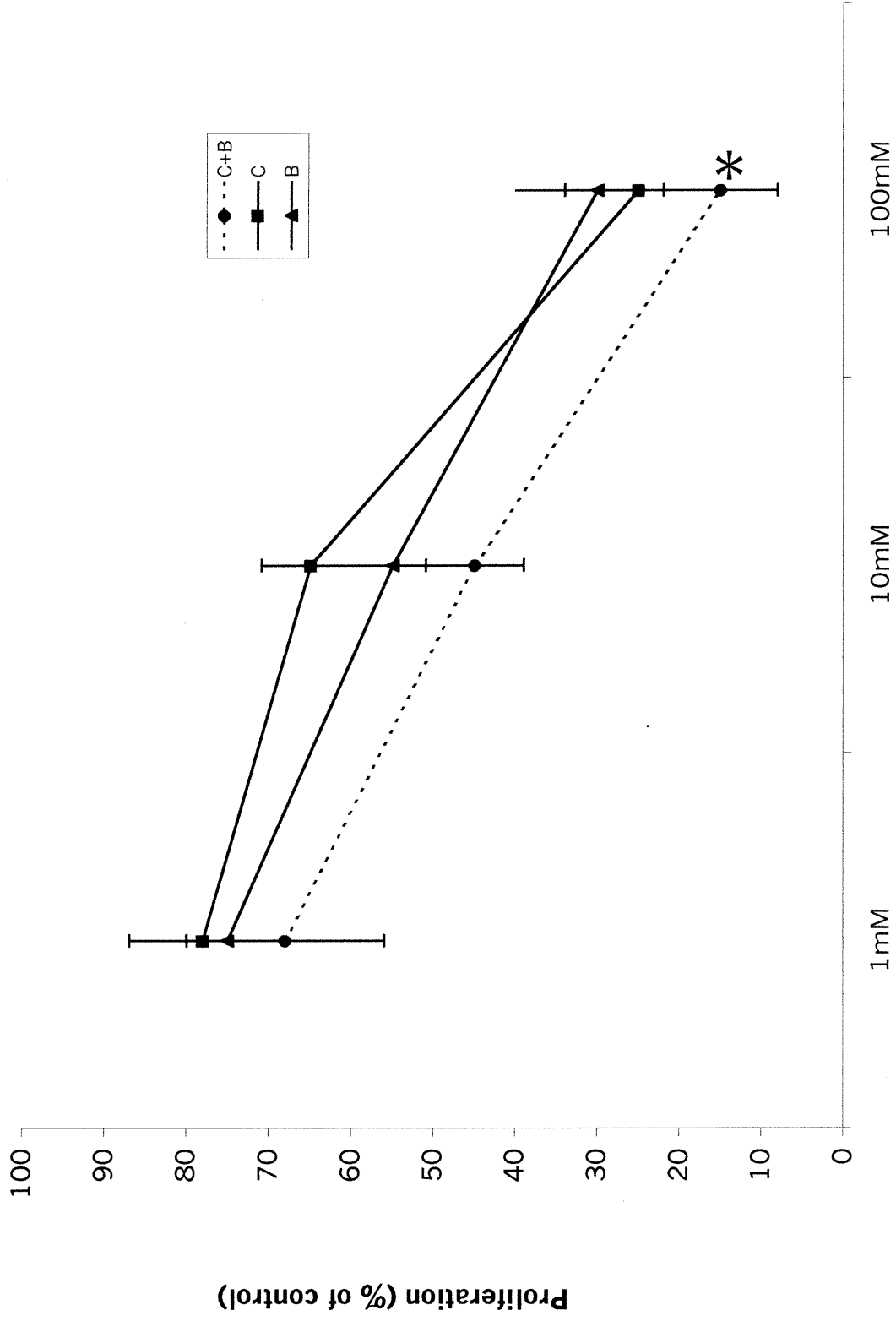


Figure 1b

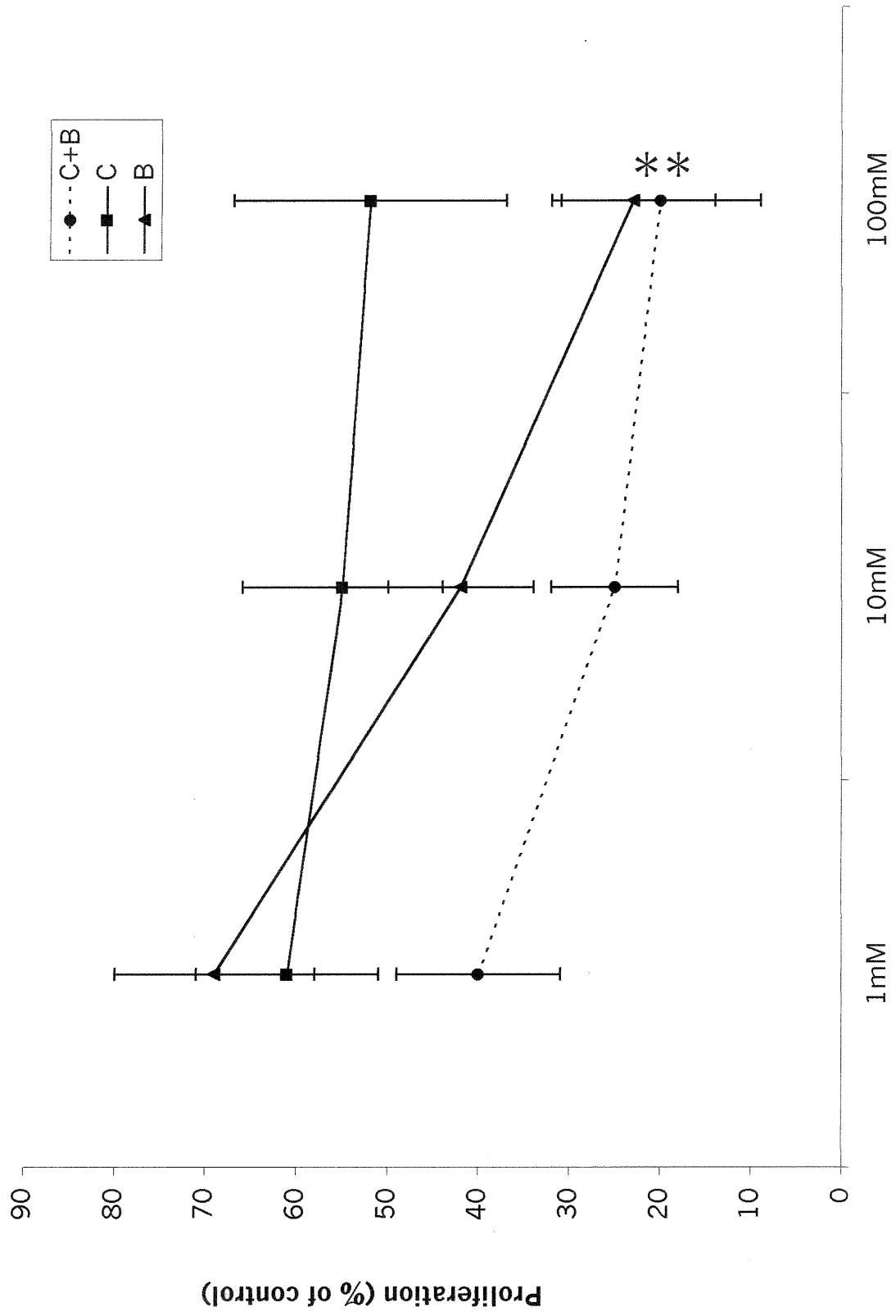


Figure 2a

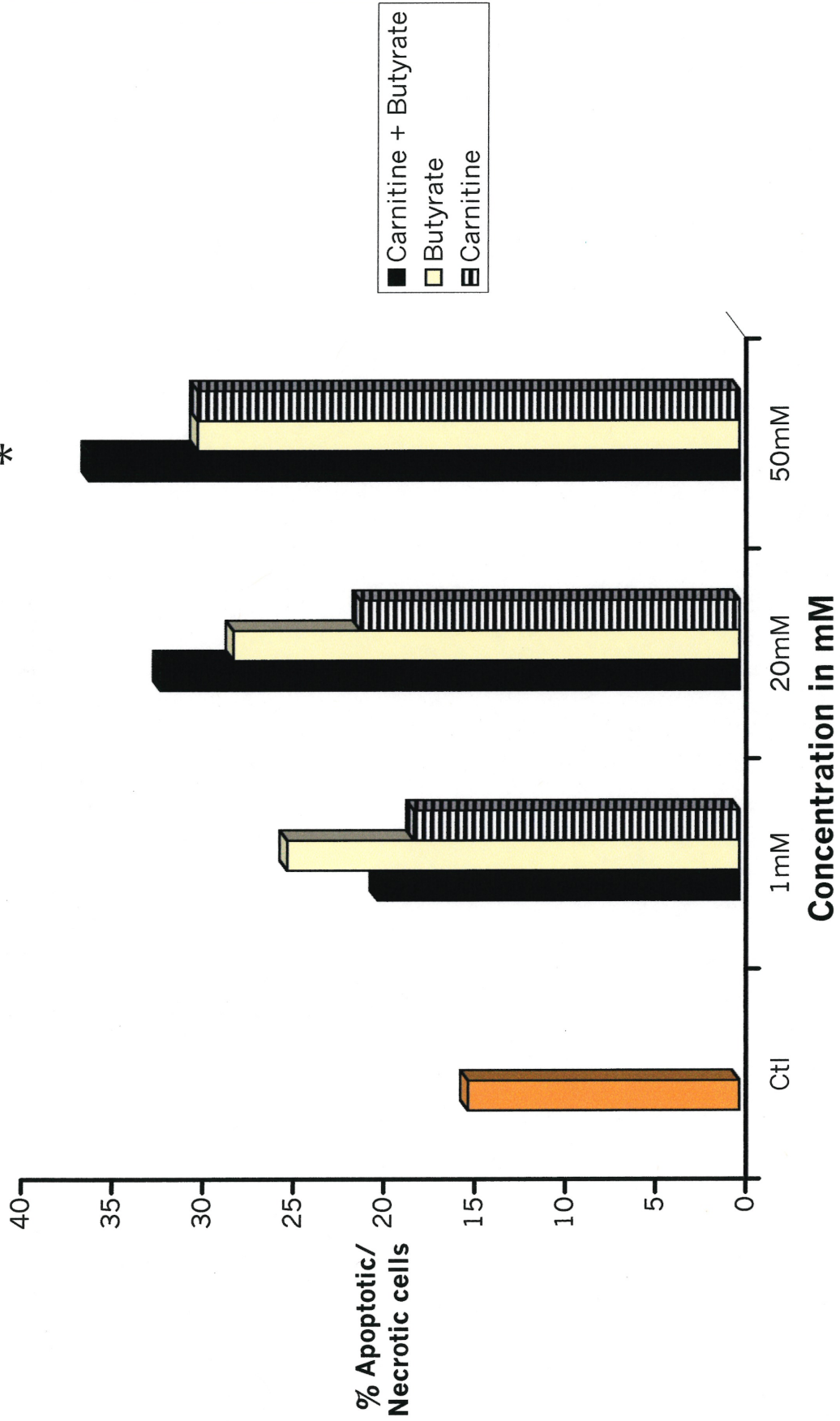
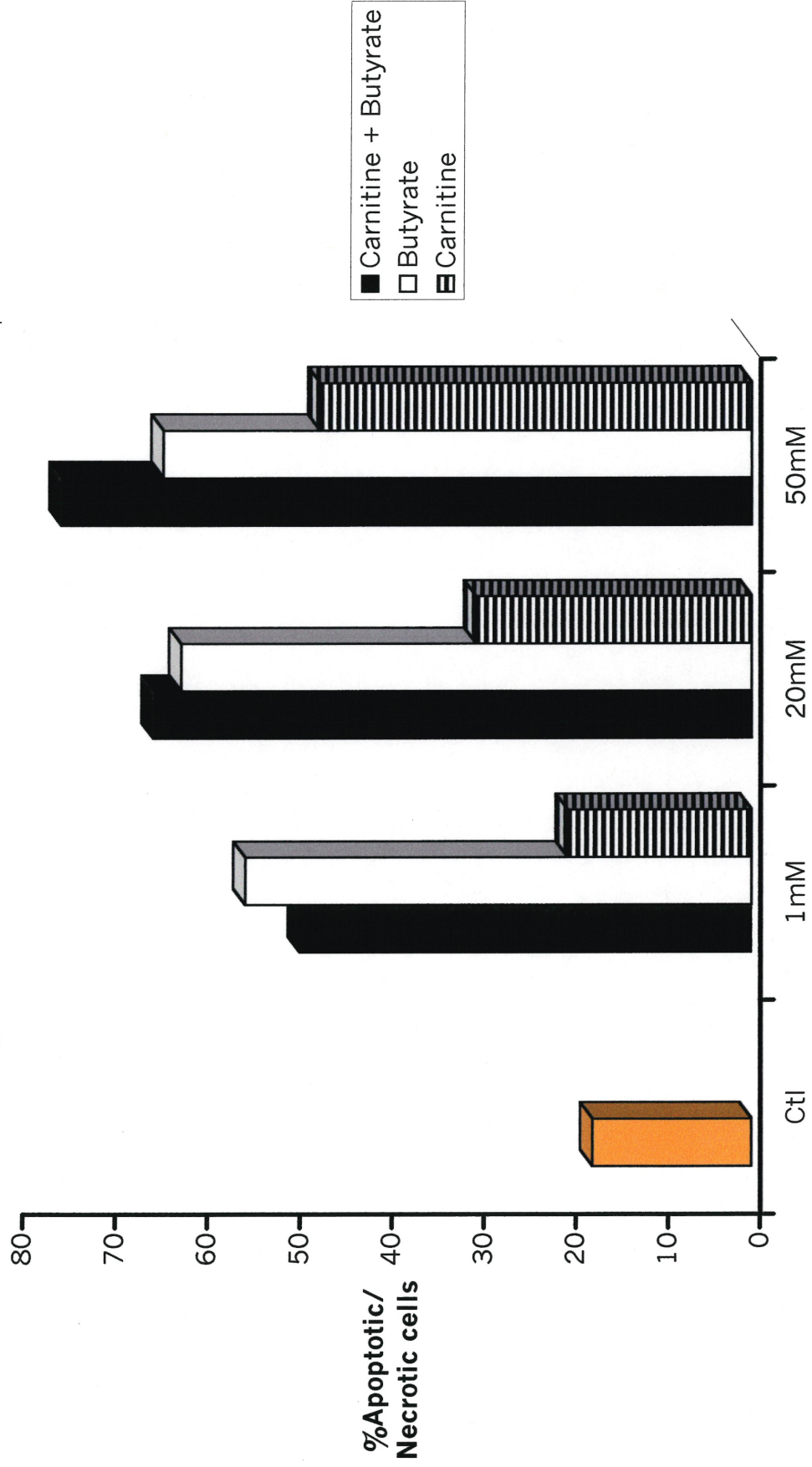


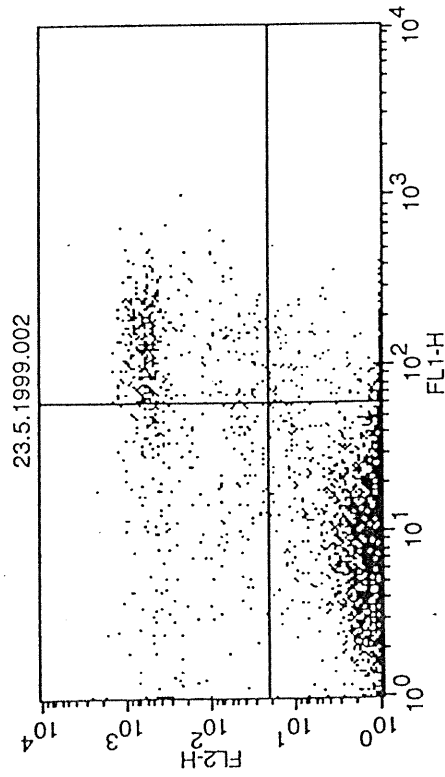
Figure 2b



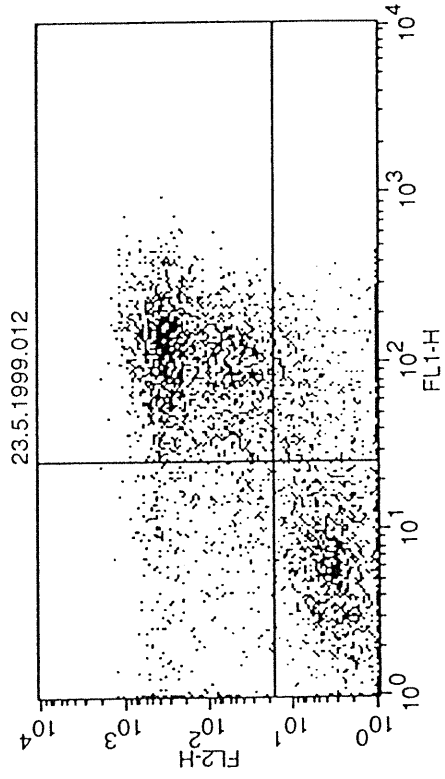
ANNEXIN-V-FITC

Figure 2c

- CONTROL
- B + C 50 mM 48 h of incubation



- LL: 60% (normal cells)
- UR + LR: 18% (cell death)



- LL: 10%
- UR + LR: 67%

LL: Lower Left, UR: Upper right, LR: Lower Right

Fig.3 Morphological assessment of the effect of the combination of butyrate and carnitine on Caco-2 cell apoptosis.

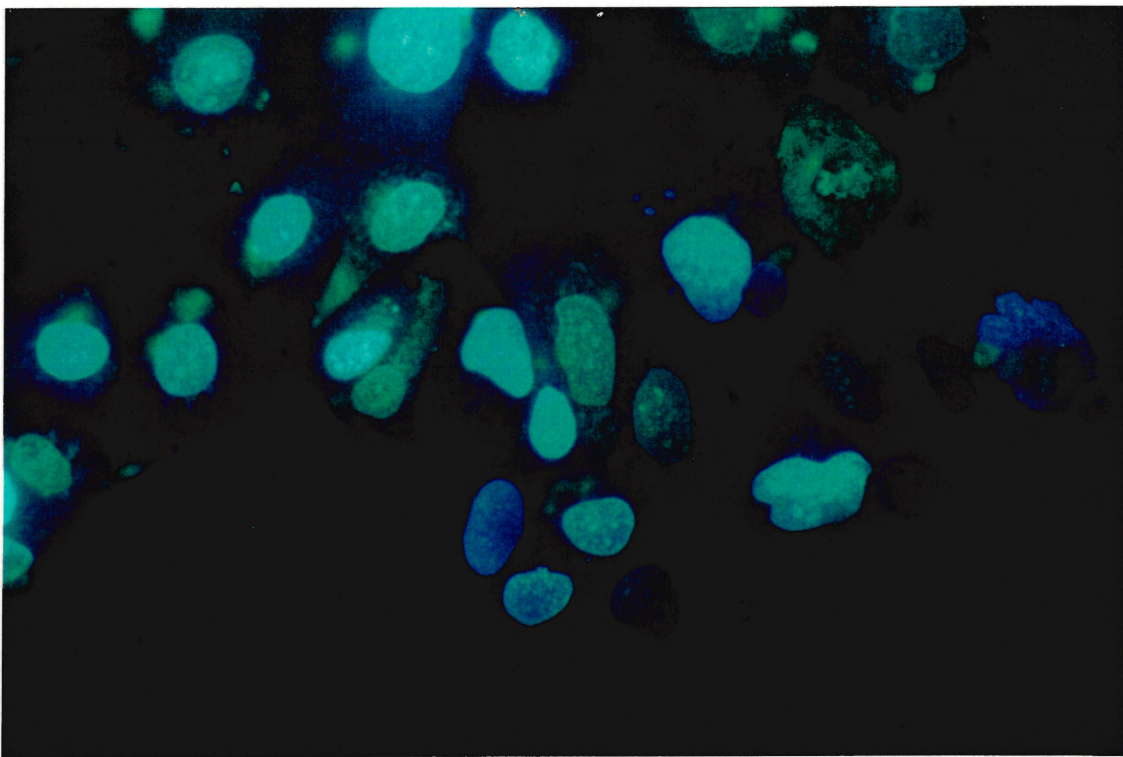


Figure 4a

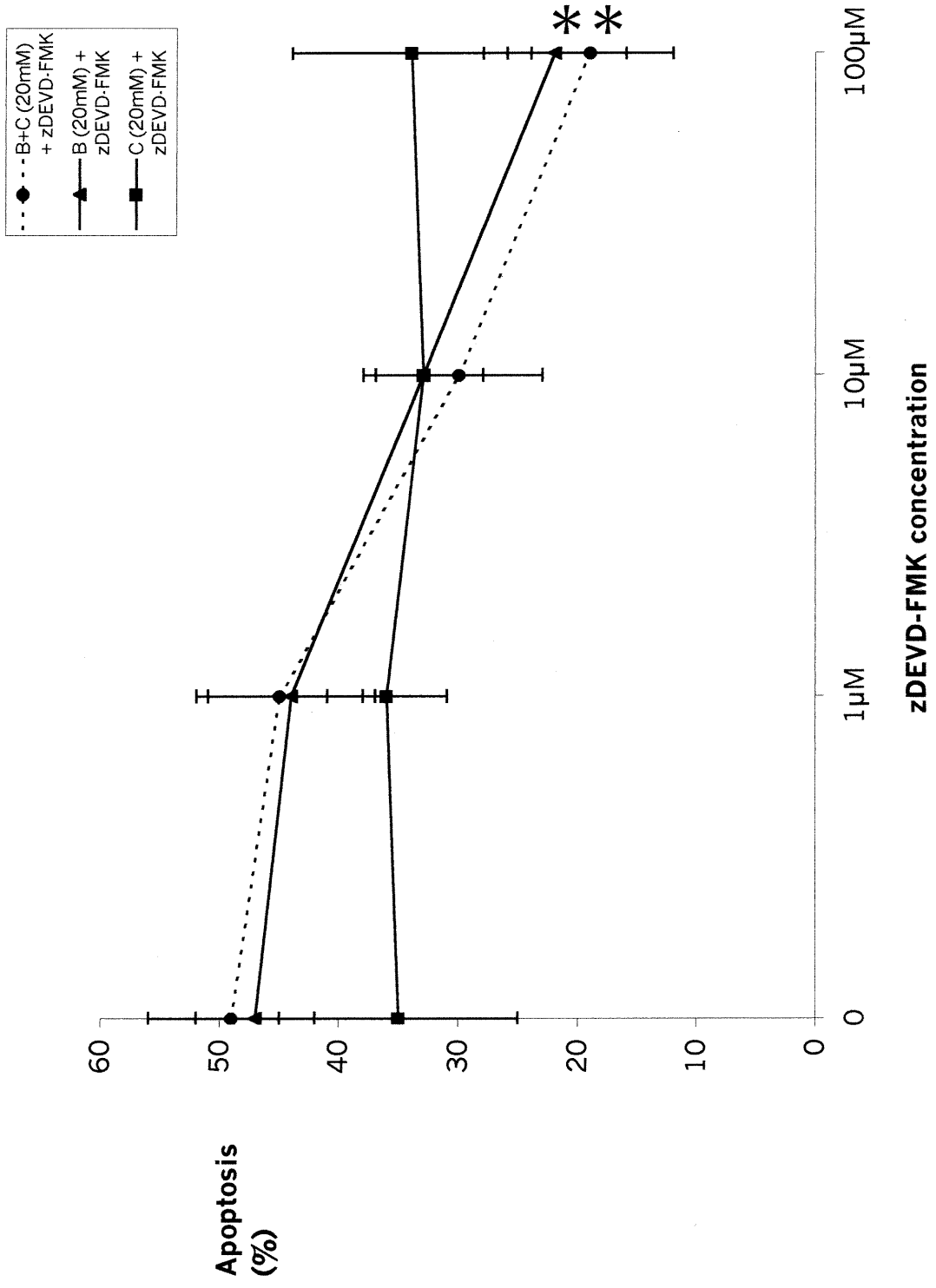
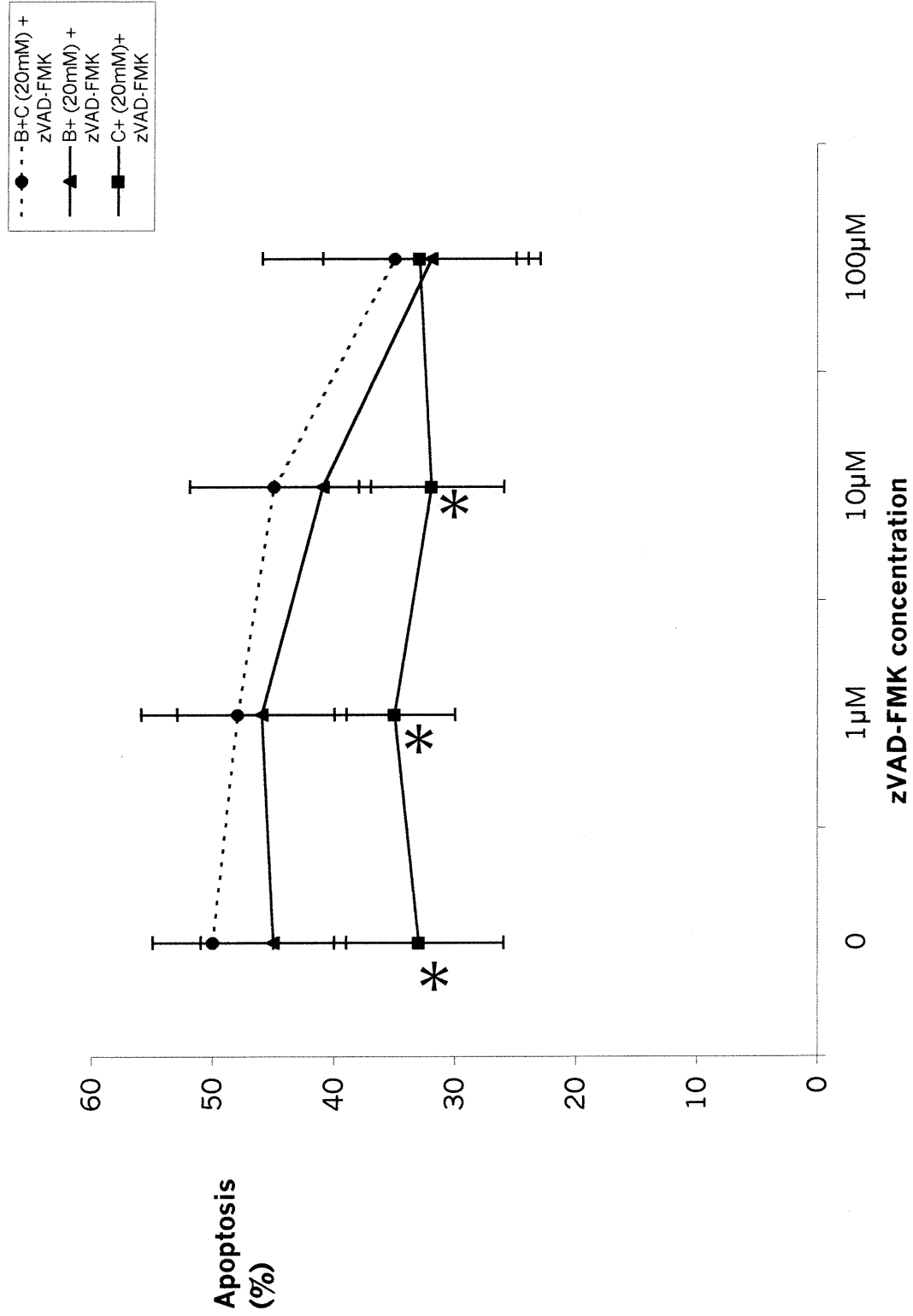


Figure 4b



Discussion et conclusion générales

Des évidences convaincantes appuient la thèse du rôle protecteur de certains composants du lait contre la carcinogenèse colorectale. Dans cette étude, on a examiné les effets spécifiques de l'acide linoléique conjugué, le butyrate, la sphingomyéline et la carnitine, seuls ou en combinaison, sur la modulation du renouvellement et de la différenciation des cellules épithéliales intestinales du côlon humain. De plus, les mécanismes potentiels régissant la régulation de ces processus par les nutriments laitiers ont été aussi vérifiés.

En premier, on a démontré que l'acide linoléique conjugué, le butyrate, la sphingomyéline et la carnitine, en concentrations physiologiques présentes dans le lait ou dans la lumière du côlon, sont capables d'inhiber significativement la prolifération des cellules cancéreuses du côlon - Caco-2. Un effet additif inhibiteur sur la croissance cellulaire a été observé avec la combinaison butyrate + carnitine, mais pas avec la combinaison butyrate + CLA. Cette observation appuie l'hypothèse selon laquelle la carnitine pourrait augmenter la demi-vie du butyrate dans la lumière intestinale, en augmentant sa potentialité sur les colonocytes. Les études *in vivo* ont démontré que les souris dont la diète a été supplémentée en carnitine, présentaient des concentrations significativement plus élevées de cela dans la muqueuse du côlon, et avaient une activité de l'enzyme carnitine acétyltransférase plus adéquate, dans les niveaux normaux. Ceci favorise la formation de butyrylcarnitine, ce qui peut proportionner une augmentation de la disponibilité et du pouvoir d'action du butyrate sur les cellules cancéreuses.

Pour savoir si l'effet inhibiteur de ces nutriments sur la prolifération était spécifique pour les cellules cancéreuses, on a

testé leur impact sur une lignée de cellules non transformées de l'intestin humain, les HIECs. Contrairement, l'acide linoléique conjugué dans les mêmes concentrations, n'a pas empêché la croissance de ces cellules normales, comme il a stimulé leur prolifération. Cet effet paradoxal a été trouvé aussi en présence de butyrate, ce qui est en accord avec les travaux antérieurs (56), et aussi en présence de la sphingomyéline. Cette étude suggère que ces composants lipidiques du lait aient une réponse diversifiée au niveau moléculaire, ce qui nous incite à identifier les possibles gènes responsables de l'activité de ces nutriments sur les colonocytes (111). L'expression altérée de certains gènes était associée avec le développement du cancer colorectal ou sa progression (112). Par exemple, le homeobox gènes Cdx1 et Cdx2 jouent un rôle crucial dans la prolifération et la différenciation des cellules intestinales. Le gène Cdx2 est un gène suppresseur de tumeur, pendant que Cdx1 est un oncogène. Il a été observé récemment, que les cellules Caco-2 et HT-29 (deux lignées distinctes de cellules cancéreuses du côlon humain) exprimaient ces gènes de façon impropre: Cdx-2 était sous exprimé pendant que le Cdx1 était surexprimé (113). De plus, l'expression d'autres protéines comme p53 (produit du gène p53 suppresseur de tumeur), des protéines inhibitrices du cycle cellulaire comme p21 et p27, des protéines pro-apoptotiques comme Bax, Bak, et Bik et des protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 et Bcl-X1 peut être directement associée au renouvellement et à la différenciation de plusieurs types cellulaires, incluant les cellules cancéreuses du côlon (114). Des études antérieures menées sur des cellules cancéreuses du foie, de l'estomac et du côlon ont démontré que le traitement avec le butyrate, qui peut être cellule-type spécifique (61, 62, 65, 114, 116, 117, 118), était associé à une dérégulation de certaines de ces protéines. Caractériser l'effet du butyrate, de la sphingomyéline, de la carnitine et de l'acide linoléique conjugué sur l'expression et la régulation de ces protéines pourra être le but des prochaines

expériences à la recherche des mécanismes responsables de cette dichotomie entre les cellules tumorales et non tumorales.

Un phénomène semblable a été vérifié dans une étude réalisée par Tsai et al (115) en examinant l'effet des acides gras polyinsaturés sur les cellules normales (NIH3T3) et cancéreuses (SIC) du sigmoïde humain *in vitro*. L'addition exogène (concentrations entre 10-20ug/ml) de l'acide eicosapentanoïque (EPA, n-3) et de l'acide docosahexanoïque (DHA, n-3) a provoqué des réponses différents en aux cellules normales et leurs transformés. L'inhibition de la prolifération cellulaire était beaucoup plus significative chez les cellules SIC tumorales par rapport aux cellules NIH3T3 non tumorales. Ces résultats appuient l'hypothèse que la réponse cellulaire face aux acides gras polyinsaturés est modifiée pendant la période de transformation maligne, et que le EPA ainsi comme le DHA semblent avoir des effets inhibiteurs spécifiques sur les cellules cancéreuses, en favorisant la défense de l'organisme contre le cancer colorectal.

Dans l'étape suivante, on a déterminé l'effet de ces composants sur la différenciation des cellules Caco-2. A travers le dosage de l'activité de la sucrase, une enzyme de la bordure en brosse fortement présente dans les cellules matures, on a démontré que le butyrate et la sphingomyéline induisent la différenciation des cellules Caco-2 de façon significative mais pas avec la présence de CLA. Ces résultats confirment le rôle stimulateur du butyrate sur la différenciation des cellules tumorales décrit précédemment (61). La synthèse de la céramide et de la sphingosine par l'hydrolyse de la SM pourrait expliquer son effet inducteur sur la différenciation cellulaire.

Pour répondre à la question suivante : Est-ce que le CLA, le butyrate, la SM et la carnitine peuvent affecter la mort programmée des cellules cancéreuses du côlon? Nous avons examiné l'effet de

ces composants du lait sur l'apoptose. La majorité des cellules Caco-2 meurent en présence de butyrate et de butyrate + carnitine. Cet effet, dépendant de la dose, a été détecté par le détachement des cellules dans le milieu et quantifié par la cytométrie en flux. Cette mort semble être due à l'apoptose cellulaire, selon la présence des cellules fortement brillantes avec la fragmentation nucléaire typique et des corps apoptotiques, observés à travers la microscopie par fluorescence. On a démontré ensuite, la dégradation de PARP par le butyrate. PARP est un des principaux substrats de la caspase 3. Ces résultats confirment le rôle inducteur de l'apoptose par le butyrate via la voie de signalisation des caspases, en accord avec nos études antérieures (65). Toutefois, le CLA et la SM ne semblent pas avoir un rôle stimulateur de l'apoptose dans les cellules Caco-2, dans tous nos essais expérimentaux.

Les mécanismes qui expliquent comment le CLA protège contre le cancer n'ont pas été établis. Plusieurs hypothèses ont été suggérées : le CLA pourrait agir comme antioxydant (Ha et al 1990, Ip et al 1991); il pourrait avoir un effet pro-oxydant cytotoxique (Krokan 1995); il pourrait inhiber la synthèse des nucléotides (Shultz et al 1992); il pourrait réduire la prolifération cellulaire (Ip et al 1994); il pourrait inhiber l'activation des carcinogènes (Liew 1995).

L'hypothèse la plus récente et qui semble être la plus probable est basée sur la capacité du CLA d'altérer le métabolisme des eicosanoïdes, en provoquant la diminution de la synthèse des prostaglandines. Il a été proposé que le CLA puisse remplacer l'acide arachidonique dans la membrane plasmique, en réduisant la disponibilité de ce substrat pour la synthèse de prostaglandines (105). Bien qu'il puisse disputer avec l'AA pour les cyclooxygénases (enzymes responsables de la conversion de l'AA en PGs). Une augmentation de la synthèse de PGs est associée au développement des cancers (106). La PGE₂ est un stimulateur de croissance des cellules tumorales *in vitro* (107).

Dans cette étude nous avons examiné l'effet du CLA et du butyrate sur l'expression de la protéine Cox-2 par les cellules Caco-2. Suite à l'observation qu'une surexpression de Cox-2 (jusqu'à 90%) a été démontrée dans la plupart des cancers colorectaux (90,91), l'activité de cette enzyme et son rôle dans la cancérogenèse a mérité beaucoup d'attention. Récemment, le traitement avec des inhibiteurs sélectifs pour le Cox-2 a inhibé le développement du cancer du côlon *in vivo* (93).

Les cellules Caco-2 expriment Cox-2 de façon constitutive (108,109). On a constaté une diminution significative de l'expression de cette protéine suite aux traitements avec le butyrate et le CLA. Nos résultats démontrent que les deux composants sont capables d'inhiber l'activité enzymatique de Cox-2. L'expression de Cox-2 a été également réprimée dans les cellules Caco-2 incubées avec le butyrate dans l'étude conduite par Kamitani et al (109). Contrairement, dans l'étude faite par Crew et al, la stimulation des cellules HT29 (une autre lignée de cellules cancéreuses du côlon humaine qui expriment Cox-2 normalement) par le butyrate, a augmenté le niveau de la protéine Cox-2 (110), ce qui suggère un effet fortement dépendant du type de lignée de cellules cancéreuses du côlon. Dans ce cas, l'hypothèse que les cellules HT29 aient la capacité de surexprimer la protéine Cox-2, comme mécanisme de résistance à l'apoptose et comme manière de neutraliser l'effet pro-apoptotique induit par le butyrate a été proposée.

L'ensemble de nos résultats suggèrent des mécanismes d'action anticancéreuse par des composants du lait, résumés dans la figure 7.

En conclusion, notre étude appuie l'hypothèse selon laquelle les lipides dérivés du lait et les produits laitiers contiennent des composants potentiellement anticancéreux. Nous avons démontré

que des concentrations physiologiques d'acide linoléique conjugué, de butyrate, de sphingomyéline et de carnitine sont capables de moduler la croissance, la différenciation et l'apoptose des cellules Caco-2. De plus, l'acide linoléique conjugué, le butyrate et la sphingomyéline ne sont pas cytotoxiques pour les cellules épithéliales non-transformées - HIEC, et jouent même un rôle stimulateur sur leur prolifération. Au niveau moléculaire, la régulation de l'activité de l'enzyme Cox-2 par le butyrate et le CLA peut expliquer, en partie, son effet anticancéreux.

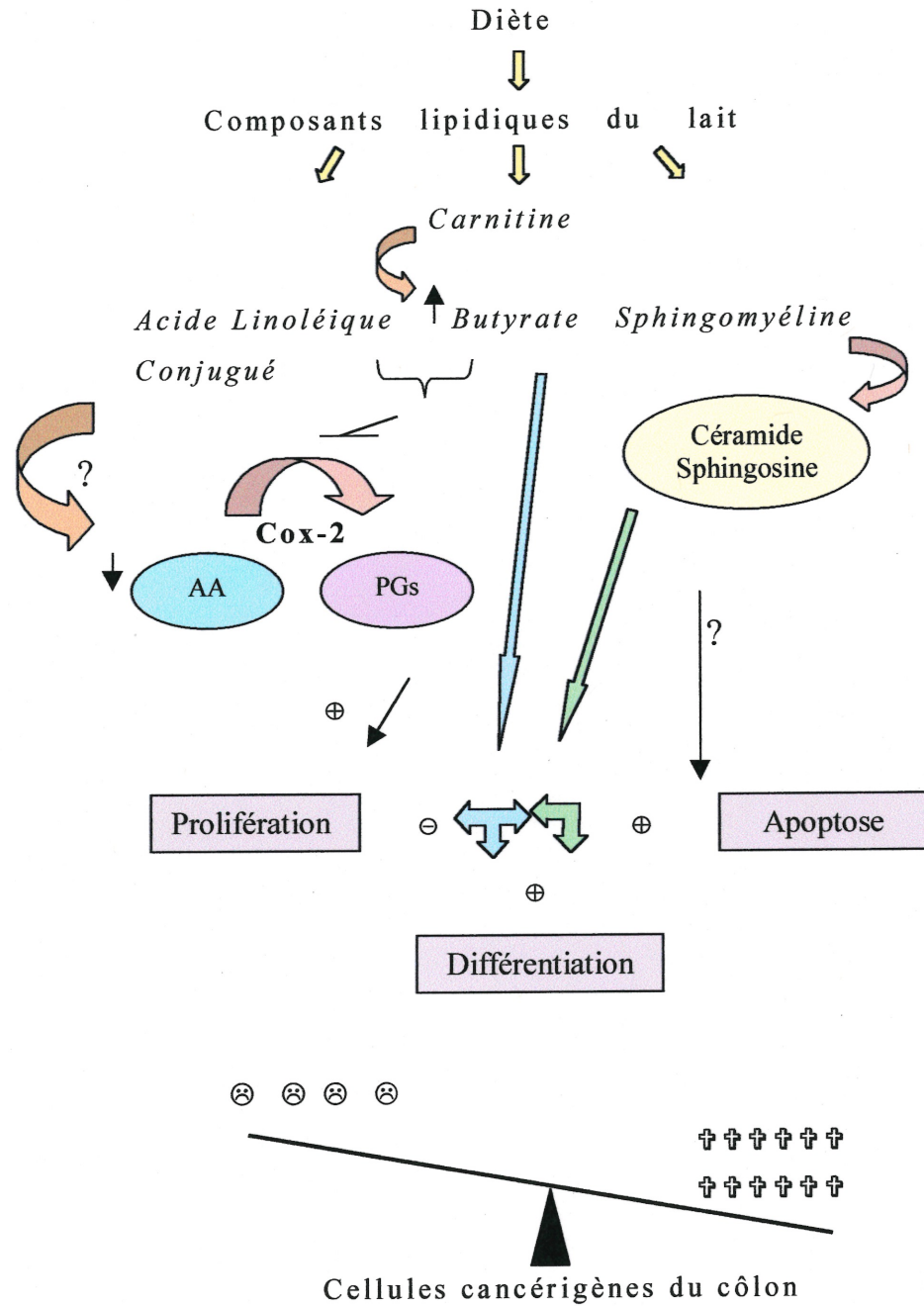


Fig. 7. Modèle pour la prévention du cancer du côlon par les composants lipidiques du lait.

Le combat entre les cellules cancéreuses du côlon vs les composants lipidiques du lait est déclenché : le premier triomphe est attribué au

butyrate, avec son pouvoir d'empêcher la croissance, forcer la différenciation et inciter les cellules tumorales à se rendre et commettre leur propre suicide (nommé apoptose). Le butyrate compte sur l'aide de la carnitine pour augmenter son potentiel d'action. Ainsi comme le butyrate, l'acide linoléique conjugué est capable d'inhiber la prolifération de ces cellules adversaires, probablement en dérangeant l'activité d'enzyme Cox-2 (une arme très puissante de l'ennemi) ce qui provoque, par conséquence, une baisse dans la concentration de prostaglandines (l'essence pour les cellules transformées). Il est possible que l'acide linoléique conjugué puisse aussi interférer au niveau de la synthèse de prostaglandines en réduisant la disponibilité de l'acide arachidonique, son principal substrat. Les nutriments gagnent plus d'appui avec la participation de la sphingomyéline. Cela génère deux autres alliés : la céramide et la sphingosine, qui ont de grandes propriétés comme la capacité d'inhiber la croissance, d'induire la différenciation et probablement de stimuler la mort programmée des cellules malignes du côlon. Voilà ! La victoire semble appartenir aux composants laitiers et la prévention est garantie !

Bibliographie

1. American Cancer Society. *Cancer facts and figures, 2000*. Atlanta, Georgia : Am. Cancer Soc. 2000 ; publication no. 5008.00.
2. Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Wingo PA. *Cancer statistics, 2000*. CA Cancer J. Clin. 2000;50 :7-33.
3. Institut National du Cancer du Canada. *Statistiques canadiennes sur le cancer, 1999*. Toronto, 1999.
4. Doll R, Peto R. *The causes of cancer : quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today*. J. Natl. Cancer Inst. 1981;66 :1191-1308.
5. Vogel V, McPherson RS. *Dietary epidemiology of colon cancer*. Hematol. Oncol. Clin. North Am. 1989;3 :35-63.
6. Whittemore AS. *Colorectal cancer incidence among chinese in North America and the people's Republic of China : variation with age, sex, and anatomical site*. Int. J. Epidemiol. 1989;18 :563-8.
7. Haenszel W, Berg JW, Segi M, Kurihara M, Locke FB. *Large bowel cancer in hawaiian japanese*. J. Natl. Cancer Inst. 1973;51 :1765-79.
8. Fulgani VL; Ramirez AG. *Cancer : the role of diet, nutrition, and fitness*. Am. Cancer Soc. 1998; 8 :1775-1783.
9. Potter JD, Slattery ML, Bostick RM, Gapstur SM. *Colon cancer, a review of the epidemiology*. Epidemiol. Rev. 1993;15 :499-545.

10. Boutron-Ruault MC. Conférence de consensus – Textes des experts; *Alimentation et cancérogénèse colorectale : éléments pour une prévention primaire*. Gastroen. Clin. Biol. 1998; 22 : S12-S20.
11. Jain M, Cook GM, Davis FG, Grace MG, Howe GR, Miller AB. *A case-control study of diet and colon-rectal cancer*. *Intr. J. Cancer*, 1980;26 :757-68.
12. Whittemore AS, Wu-Williams AH, Lee M, Zheng S, Gallagher RP, Jiao DA et al. *Diet, physical activity, and colorectal cancer among Chinese in North America and China*. *J. Natl. Cancer Inst.* 1990;82 :915-26.
13. Bartsch H, Nair J, Owen RW. *Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum : emerging evidence for their role as risk modifiers*. *Carcinogenesis* 1999;20(12) :2209-18.
14. Franceschi S. *Nutrients and food groups and large bowel cancer in Europe*. *Eur. J. Cancer Prev.* 1999;8 Suppl 1 :S49-52.
15. De Deckere EA. *Possible beneficial effect of fish and fish n-3 polyunsaturated fatty acids in breast and colorectal cancer*. *Eur. J. Cancer Prev.* 1999; 8 (3) :213-21.
16. Willet WC, Stampfer MJ, Colditz GA, Rosner BA, Speizer FE. *Relation of meat, fat and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study among women*. *N. Engl. J. Med.* 1990;323 :1664-72.
17. Sinha R, Chow WH, Kulldorff M, Denobile J, Butler J, Garcia-Closas M, Weil R, Hoover RN, Rothman N. *Well-done, grilled red meat increases the risk of colorectal adenomas*. *Cancer Res.* 1999; 59 :4320-4324.

18. Gerhardsson de Verdier M, Hagman U, Peters RK, Steineck G, Overvik E. *Meat, cooking methods and colorectal cancer : a case-different study in Stockholm*. In. J. Cancer 1991;49 :520-5.
19. Giovannucci E, Goldin B. *The role of fat, fatty acids, and total energy intake in the etiology of human colon cancer*. Am. J. Clin. Nutr. 1997;66 (suppl) :1564S-71S.
20. Herbert C. Conférence de consensus – Textes du groupe de travail; *La prévention primaire du cancer colorectal : rôle des anti-inflammatoires non stéroïdiens et de l' alimentation*. Gastroenterol. Clin. Biol. 1998; 22 :S202-217.
21. Longnecker MP, Orza MJ, Adams ME, Vioque J, Chalmers TC. *A meta-analysis of alcoholic beverage consumption in relation to risk of colorectal cancer*. Cancer Causes Control 1990;1 :59-68.
22. Bostick RM, Potter JD, Kushi LH, Seller TA, Steinmetz KA, McKenzie DR et al. *Sugar, meat, and fat intake, and non-dietary risk factors for colon cancer incidence in Iowa women (United States)*. Cancer Causes Control 1994;5 :38-52.
23. Nelson RL, Davis FG, Sutter E, Sobin LH, Kikendale JW, Bowen P. *Body iron stores and risk of colonic neoplasia*. J. Natl. Cancer Inst. 1994;86(6) :455-60.
24. Wurzelmann JJ, Silver A, Schreinemachers DM, Sandler RS, Everson RB. *Iron intake and the risk fo colorectal cancer*. Cancer Epid. Bio. Prev. 1996;5(7) :503-7.
25. Trock B, Lanza E, Greenwald P. *Dietary fiber, vegetables, and colon cancer : critical review and meta-analysis of the epidemiologic evidence*. J. Natl. Cancer Inst. 1990;82 :650-661.

26. Howe GR, Benito E, Castelleto R, Cornée J, Estève J, Gallagher RP, Shu Z et al. *Dietary intake of fiber and decreased risk of cancers of the colon and rectum: evidence from the combined analysis of 13-case-control studies.* J. Natl. Cancer Inst. 1992;84 :1887-1896.

27. Friedenreich CM, Brant RF, Riboli E. *Influence of methodologic factors in a pooled analysis of 13-case control studies of colorectal cancer and dietary fiber.* Epidemiology 1994; 5 :66-79.

28. American Gastroenterological Association (AGA) Clinical Practice and Practice Economics Committee. *AGA technical review: impact of dietary fiber on colon cancer occurrence.* Gastroenterology 2000;118 :1235-1257.

29. DeCosse JJ, Miller HH, Lesser ML. *Effect of wheat fiber and vitamin C and E on rectal polyps in patients with familial adenomatous polyps.* J. Natl. Cancer Inst. 1989;81 :1290-1297.

30. Alberts DS, Ritenbaugh C, Story JA, Aickin M, Rees-McGee S, Buller MK, Atwood J, Phelps J, Ramanujam PS, Bellapravalu S, Patel J, Bettinger L, Clark L. *Randomized, double-blinded placebo-controlled study of effect of wheat bran fiber and calcium on fecal bile acids in patients with resected adenomatous colon polyps.* J. Natl. Cancer Inst. 1996;88 :81-92.

31. MacLenna R, Macrae F, Bain C, Battistutta D, Chapuis P, Gratten H, Lambert J, Newland RC, Ngu M, Russel A, Ward M, Wahlqvist ML, Australian Polyp Prevention Project. *Randomized trial of intake of fat, fiber, and beta carotene to prevent colorectal adenomas.* J. Natl. Cancer Inst. 1995;87 :1760-1766.

32. Alberts DS, Einspahr J, Ritenbaugh C, Aickin M, Rees-McGee S, Atwood J, Emerson S, Mason-Liddil N, Bettinger L, Patel J,

Bellapravalu S, Ramanujam PS, Phelps J, Clark L. *The effect of wheat bran fiber and calcium supplementation on rectal mucosal proliferation rates in patients with resected adenomatous colorectal polyps.* Cancer Epid. Bio. Prev. 1997;6 :161-169.

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

34. Pence BC. *Role of calcium in colon cancer prevention : experimental and clinical studies.* Mutat. Res. 1993;290 :87-95.

35. Lipkin M, Newmark H. *Effect of added dietary calcium on colonic epithelial-cell proliferation in subjects at high risk for familial colonic cancer.* N. Engl. J. Med. 1985;313 :1381-4.

36. Bostick RM, Fosdick L, Wood JR, Grambsch P, Grandits GA, Lillemoe TJ, Louis TA, Potter JD. *Calcium and colorectal epithelial cell proliferation in sporadic adenoma patients : a randomized, double-blinded, placebo-controlled clinical trial.* J. Natl. Cancer Inst. 1995;87 :1307-15.

37. Baron JA, Tosteson TD, Wargovich MJ, Sandler R, Mandel J, Bond J et al. *Calcium supplementation and rectal mucosal proliferation : a randomized controlled trial.* J. Natl. Cancer Inst. 1995;87 :1303-7.

38. Holt PR, Atillasoy EO, Gilman J, Guss J, Moss SF, Newmark H, Fan K, Yang K, Lipkin M. *Modulation of abnormal colonic epithelial cell proliferation and differentiation by low-fat dairy foods : a randomized controlled trial.* JAMA 1998;280 :1074-9.

39.Lapre JA, De Vries T, Termont DS, Kleibeuker J, De Vries EG, Van Der Meer R. *Mechanism of the protective effect of supplemental dietary calcium on cytolytic activity of fecal water.* Cancer Res. 1993;53 :248-53.

40.Martinez ME, Willet WC. *Calcium, vitamin D, and colorectal cancer : a review of the epidemiologic evidence.* Cancer Epidemiol. Bio. Prev. 1998;7 :163-8.

41.Hyman J, Baron JA, Dain B, Sandler R, Haile R, Mandel J et al. *Dietary and supplemental calcium and the recurrence of colorectal adenomas.* Cancer Epidemiol. Bio. Prev. 1998;7 :291-5.

42.Baron JA, Beach M, Mandel JS, Van Stolk RV, Haile RW, Sandler RS, Rothstein R, Summers RW, Snover DC, Beck GJ, Bond JH, Greenberg ER. *Calcium supplements for the prevention of colorectal adenomas.* N. Engl. J. Med. 1999;340 :101-7.

43.Prichard RS, Gerhardsson de Verdier M. *Dietary calcium, vitamin , and the risk of colorectal in Stockholm, Sweden.* Cancer Epidemiol. Bio. Prev. 1996;5(11) :897-900.

44.Martinez ME, Giovannucci EL, Colditz GA, Stampfer MJ, Hunter DJ, Speizer FE, Wing A, Willett WC. *Calcium, vitamin D, and the occurrence of colorectal cancer among women.* J. Natl. Cancer Inst. 1996;88(19) :1375-82.

45.Garland CF, Garland FC, Shaw EK, Comstock GW, Helsing KJ, Gorham ED. *Serum 25-hydroxyvitamin D and colon cancer : eight-year prospective study.* Lancet 1989;2 :1176-1178.

46.Garland D, Barret-Connor E, Ross AH, Shekelle RB, Criqui MH, Paul O. *Dietary vitamin D and calcium and risk of colorectal cancer : a 19-year prospective study in men.* Lancet 1985;1: 307-9.

47. Mason JB, Levesque T. *Folate :effects on carcinogenesis and the potential for cancer prevention*. *Oncology* 1996;10 :1727-1744.

48. Kim YI. *Folate and carcinogenesis : evidence, mechanisms and implications*. *J. Nut. Biochem.* 1999;10 :66-88.

49. Cravo ML, Mason JB, Dayal Y, Hutchinson M, Smith D, Selhub J, Rosemberg IH. *Folate deficiency enhances the development of colonic neoplasia in dimethylhydrazine-treated rats*. *Cancer Res.* 1992;52 :5002-5006.

50. Kim YI, Salomon RN, Graeme-Cook F, Choi SW, Smith DE, Dallal GE, Mason JB. *Dietary folate protects against the development of macroscopic colonic neoplasia in a dose-response manner in rats*. *Gut* 1996;39 :732-740.

51. McKeown-Elyssen GE, Bright-See E. *Dietary factors in colon cancer international relationships*. *Nutr. Cancer* 1984;6 :160-70.

52. Newmark HL, Wargovich M, Bruce R. *Colon cancer and dietary fat, phosphate, and calcium : a hypothesis*. *J. Natl. Cancer Inst.* 1984;72 :1323-5.

53. Van Der Meer R, Welberg JWM, Kuipers F, Kleibeuker JH, Mulder NH, Termont DSML, Vonk RJ, De Vries HT, De Vries EGE. *Effects of supplemental dietary calcium on the intestinal association of calcium, phosphate, and bile acids*. *Gastroenterology* 1990;99 :1653-9.

54. Glinghammar B, Venturi M, Rowland IR, Rafter JJ. *Shift from a dairy product-rich to a dairy product free-diet : influence on cytotoxicity and genotoxicity of fecal water – potential risk factors for colon cancer*. *Am. J. Clin. Nut.* 1997;66 :1277-82.

55. Parodi, PW. *Cow's milk fat components as potential anticarcinogenic agents*. J. Nutr. 1997;127 :1055-60.
56. Velasquez OC, Lederer HM, Rombeau JL. *Butyrate and the colonocyte. Implications for neoplasia*. Dig. Dis. Sci. 1996;41:727-9.
57. Siavoshian S, Blottière HM, Le Foll E, Kaeffer B, Cherbut C, Galmiche JP. *Comparison of the effect of different short chain fatty acids on the growth and differentiation of the human colonic carcinoma cell lines*. Cell Biol. Int. 1997;21 :281-7.
58. Kim YS, Tsao D, Siddiqui B, Whitehead JS, Arnstein P, Bennette J, Hicks J. *Effects of sodium butyrate and dimethylsulfoxide on biochemical properties of human colon cancer cells*. Cancer 1980;45 :1185-1192.
59. Bernard JA, Warwick G. *Butyrate rapidly induces growth inhibition and differentiation in HT29 cells*. Cell Growth Differ. 1993;4 :495-501.
60. Boffa LC, Vidali G, Mann RS, Allfrey VG. *Suppression of histone deacetylation in vivo and in vitro by sodium butyrate*. J. Biol. Chem. 1978;253 :3364-3366.
61. Litvak DA, Evers BM, Hwang KO, Hellmich MR, Ko TC, Townsend Jr CM. *Butyrate-induced differentiation of Caco-2 cells is associated with apoptosis and early induction of p21Waf1/Cip1 and p27kip1*. Surgery 1998;124 :161-69.
62. Siavoshian S, Segain JP, Kornprobst M, Bonnet C, Galmiche JP, Blottière HM. *Butyrate and trichostatin A effects on the proliferation/differentiation of human intestinal epithelial cells : induction of cyclin D3 and p21 expression*. Gut 2000;46 :507-514.

63. Harrison LE, Wang QM, Studzinski GP. *Butyrate-induced G2/M block in Caco-2 colon cancer cells is associated with decreased p34cdc2 activity*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1999;222(2) :150-6.
64. Hague A, Paraskeva C. *The short-chain fatty acid butyrate induces apoptosis in colorectal tumor cell lines*. Eur. J. Cancer Prev. 1995;4 :359-64.
65. Ruemmele FM, Dionne S, Qureshi I, Sarma DSR, Levy E, Seidman EG. *Butyrate mediates Caco-2 cell apoptosis via up-regulation of pro-apoptotic BAK and inducing caspase-3 mediated cleavage of poly-(ADP-ribose)polymerase (PARP)*. Cell Death and Differen. 1999;6 :729-735.
66. Wachtershauser A, Loitsch SM, Stein J. *PPAR- γ is selectively upregulated in Caco-2 cells by butyrate*. Biochem. and Bioph. Res. Commun. 2000;272(2) :380-5.
67. McIntyre A, Gibson PR, Young GP. *Butyrate production from dietary fibre and protection against large bowel cancer in a rat model*. Gut 1993;34 :386-391.
68. Medina V, Afonso JJ, Alvarez-Arguelles H, Hernandez C, Gonzalez F. *Sodium butyrate inhibits carcinoma development in a 1,2 dimethylhydrazine-induced rat colon cancer*. JPEN 1998;22:14-17.
69. D'Argenio G, Cosenza V, Cave MD, Iovino P, Valle ND, Lombardi G, Mazzacca G. *Butyrate enemas in experimental colitis and protection against large bowel cancer in a rat model*. Gastroenterology 1996;110 :1727-1734.
70. Zoran DL, Turner ND, Taddeo SS, Chapkin RS, Lupton JR. *Wheat bran diet reduces tumor incidence in a rat model of colon*

cancer independent of effects of distal luminal butyrate concentrations. J. Nutr. 1997;127 :2217-2225.

71.Siavoshian S, Blottière HM, Le Foll E, Segain JP, Kaeffer B, Cherbut C. *Effet du butyrate sur la prolifération, la différenciation et l' expression des protéines régulatrices du cycle cellulaire des cellules épithéliales intestinales non tumorales IEC-6.* Gastroenterol. Clin. Biol. 1997;21 :A206.

72.Basson MD, Sgambati SA. *Effects of short-chain fatty acids on human rectosigmoid mucosal colonocyte brush-border enzymes.* Metabolism. 1998;47(2) :133-4.

73.Ruemmele FM, Ruemmele C, Levy E, Seidman EG. *Les mécanismes moléculaires de la régulation du renouvellement des cellules épithéliales intestinales par des nutriments.* Gastroenterol. Clin. Biol. 1999;23;47-55.

74.Chin SF, Storkson JM, Liu W, Albright KJ, Pariza MW. *Conjugated linoleic acid (9,11- and 10,12-octadecadienoic acid) is produced in conventional but not germ-free rats fed linoleic acid.* J. Nutr. 1994; 124(5) :694-701.

75.Herbel BK, Mcguire MK, Mcguire MA, Shultz TD. *Safflower oil consumption does not increase plasma conjugated linoleic acid concentrations in humans.* Am. J. Clin. Nutr. 1998; 67 :332-7.

76.Ha YL, Grimm NK, Pariza MW. *Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid.* Carcinogenesis 1987; 8 :1881-1887.

77.Ha YL, Stokson J, Pariza MW. *Inhibition of benzo(a)pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by conjugated linoleic dienoic derivatives of linoleic acid.* Cancer Res. 1990;50 :1097-1101.

78. Ip C, Chin SF, Scimeca JA, Pariza MW. *Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivate of linoleic acid*. Cancer Res. 1991;51 :6118-6124.

79. Ip C, Singh M, Thompson HJ, Scimeca JA. *Conjugated linoleic acid supresses mammary carcinogenesis and proliferative activity of the mammary gland in the rat*. Cancer Res. 1994;54 :1212-1215.

80. Liew C, Schut HAJ, Chin SF, Pariza MW, Dashwood RH. *Protection of conjugated linoleic acids against 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline-induced colon carcinogenesis in the F344 rat : a study of inhibitory mechanisms*. Carcinogenesis 1995;15 :3037-3043.

81. Shultz TD, Chew BP, Seaman WR, Luedecke LO. *Inhibitory effect of conjugated dienoic derivatives of linoleic acid and β -carotene on the in vitro growth of human cancer cells*. Cancer Lett. 1992; 63 :125-133.

82. O'Shea M, Stanton C, Devery R. *Antioxidant enzyme defence responses of human MCF-7 and SW480 cancer cells to conjugated linoleic acid*. Anticancer Res. 1999;19 :1953-9.

83. Schonberg S, Krokan HE. *The inhibitory effect of conjugated dienoic derivatives (CLA) of linoleic acid on the growth of human tumor cell lines is in part due to increased lipid peroxidation*. Anticancer Res. 1995;15 :1241-1246.

84. Durgam VR, Fernandes G. *The growth inhibitory effect of conjugated linoleic acid on MCF-7 cells is related to estrogen response system*. Cancer Lett. 1997;116 :121-130.

85. Kavanaugh CJ, Liu KL, Belury MA. *Effect of dietary conjugated linoleic acid on phorbol ester-induced PGE₂ production and hyperplasia in mouse epidermis.* Nutr. Cancer 1999 ;33 :132-138.
86. Smalley W, Dubois RN. *Colorectal cancer and non steroidal anti-inflammatory drugs.* Adv. Pharmacol 1997 ; 39 :1-20.
87. Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, Oshima H, Hancock B, Kwong E, Trzaskos JM, Evans JF, Taketo MM. *Suppression of intestinal polyposis in APC Δ 716 knockout mice by inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase-2 (COX-2).* Cell 1996; 87 :803-809.
88. Thun MJ, Namboodiri MM, Heath CWJ. *Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer.* N. Engl. J. Med. 1991;325-1593-1596.
89. Giovannucci E, Egan KM, Hunter DJ, Stampfer MJ, Colditz GA, Willet WC, Speizer FE. *Aspirin and the risk of colorectal cancer in women.* N. Engl. J. Med. 1995;333 :609-614.
90. Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardello FM, Ferrenbach S, Dubois RN. *Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas.* Gastroenterology 1994;107 :1183-8.
91. Fujita T, Matsui M, Takaku K, et al. *Size- and invasion-dependent increase in cyclooxygenase 2 levels in human colorectal carcinomas.* Cancer Res. 1998;58 :4823-6.
92. Tsujii M, Dubois RN. *Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase-2.* Cell 1995;83 :493-501.

93. Reddy BS, Yoshinobu H, Lubet R, Steele V, Kelloff G, Paulson S, Seibert K, Rao CV. *Chemoprevention of colon cancer by specific cyclooxygenase-2 inhibitor, Celecoxib, administered during different stages of carcinogenesis.* Cancer Res. 2000; 60 :293-297.
94. Moya-Camarena SY, Van den Heuvel JP, Blanchard SG, Leesnitzer LA, Belury MA. *Conjugated linoleic acid is a potent naturally occurring ligand and activator of PPAR α .* J. Lipid Res. 1999; 40 :1426-33.
95. Kolesnick R. *1,2 diacylglycerols but not phorbol esters stimulate sphingomyelin hydrolysis in GH3 pituitary cells.* J. Biol. Chem. 1987;262 :16759-62.
96. Duan RD. *Sphingomyelin hydrolysis in the gut and clinical implications in colorectal tumorigenesis and other gastrointestinal diseases.* Scand. J. Gastroenterol. 1998;33 :673-83.
97. Obeid LM, Linardic CM, Karolak LA, Hannun YA. *Programmed cell death induced by ceramide.* Science 1993 ;259 :1769-71.
98. Schmelz EM, Dillehay DL, Webb SK, Reiter A, Adams J, Merrill AH Jr. *Sphingomyelin consumption suppresses aberrant colonic crypt foci and increases the proportion of adenomas versus adenocarcinomas in CF1 mice treated with 1,2-dimethylhydrazine : implications for dietary sphingolipids and colon carcinogenesis.* Cancer Res. 1996;56 (21) :4936-41.
99. Schmelz EM, Dilleray DL, Liotta DC, Merrill AH Jr. *Suppression of aberrant colonic crypt foci by synthetic sphingomyelin with saturated or unsaturated sphingolipid base backbones.* Nutr Cancer 1997;28 :81-5.

100.Hertervig E, Nilsson A, Bjork J, Hultkarantz R, Duan R-D. *Alkaline sphingomyelinase activity is markedly decreased in familial adenomatous polyposis and colorectal adenomas : a key factor to the unrestrained cell proliferation?* Gastroenterology 1998;114 : A610.

101.Famularo G, De Simone C. *A new era for carnitine?* Immunol. Today 1995;16 :211-213.

102.Boerrigter ME, Franceschi C, Arrigoni-Martelli E, Wei JY, Vijg J. *The effect of L-carnitine and acyl-L-carnitine on the disappearance of DNA single strand breaks in human peripheral blood lymphocytes.* Carcinogenesis 1993;14 :2131-2136.

103.Langman M, Boyle P. *Chemoprevention of colorectal cancer.* Gut 1998;43 :578-85.

104.Levy E, Mehran M, Seidman EG. *Caco-2 cells as a model for intestinal lipoprotein synthesis and secretion.* FASEB J. 1995;9 :626-35.

105.Banni S, Angioni E, Casu V, Melis MP, Carta G, Corongiu FP, Thompson H, Ip C. *Decrease in linoleic acid metabolites as a potential mechanism in cancer risk reduction by conjugated linoleic acid.* Carcinogenesis 2000;20 :1019-1024.

106.Qiao L, Kozoni V, Tsioulis GJ, Koutsos MI, Hanif R, Shiff SJ, Rigas B. *Selected eicosanoids increase the proliferation rate of human colon carcinoma cell lines and mouse colonocytes in vivo.* Biochim. Biophys. Acta 1995; 1258 :215-223.

107.Pugh S, Thomas GAO. *Patients with adenomatous polyps and carcinomas have increased colonic mucosal prostaglandin E₂.* Gut, 35 :675-678.

108. Tsujii M, Kawano S, Dubois RN. *Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA;1997; 84 :3336-3340.
109. Kamitani H, Geller M, Eling T. *Expression of 15-lipoxygenase by human colorectal carcinoma Caco-2 cells during apoptosis and cell differentiation*. J. Biol. Chem. 1998;34 :21569-21577.
110. Crew TE, Elder DJE, Pareskeva C. *A cyclooxygenase-2 (COX-2) selective non-steroidal anti-inflammatory drug enhances the growth inhibitory effect of butyrate in colorectal carcinoma cell expressing COX-2 protein : regulation of COX-2 by butyrate*. Carcinogenesis 2000; 21 :69-77.
111. Basson MD, Liu YW, Hanly AM, Emenaker NJ, Shenoy SG, Gould Rothberg BE. *Identification and comparative analysis of human colonocyte short-chain fatty acid response genes*. J. Gastrointest. Surg. 2000;4(5) :501-12.
112. Mallo GV, Soubeyran P, Lissitzky JC, Andre F, Farnarier C, Marvaldi J, Dagorn JC; Iovanna JL. *Expression of the Cdx1 and Cdx2 homeotic genes leads to reduced malignancy in colon cancer-derived cells*. J. Biol. Chem. 1998;273(22) :14030-6.
113. Lorentz O, Cadoret A, Duluc I, Capeau J, Gespach C, Cherqui G, Freund JN. *Downregulation of the colon tumour-suppressor homeobox gene Cdx-2 by oncogenic ras*. Oncogene 1999;18(1) :87-92.
114. Litvak DA, Hwang KO, Evers BM, Townsend Jr CM. *Induction of apoptosis in human gastric cancer by sodium butyrate*. Anticancer Res. 2000;20 :779-784.

115. Tsai WS, Nagawa H, Kaizaki S, Tsuruo T, Muto T. Inhibitory effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on sigmoid colon cancer transformants. *J. Gastroenterol.* 1998 ;33(2) :206-12.

116. Wang XM, Wang X, Li J, Evers BM. *Effects of 5-azacytidine and butyrate on differentiation and apoptosis of hepatic cancer cell lines.* *Ann. Surg.* 1998 ;227 :922-931.

117. Hetsch SW. *To die or not to die : an overview of apoptosis and its role in disease.* *JAMA* 1998; 79 :300-307.

118. Hague A, Diaz GD, Hicks DJ, Krajewski S, Reed JC, Paraskeva C. *Bcl₂ and bak may play a pivotal role in sodium butyrate-induced apoptosis in colonic epithelial cells; however overexpression of bcl₂ does not protect against bak-mediated apoptosis.* *Int. J. Cancer* 1997;72 :898-905.