



HAL
open science

Effet protecteur du calcium alimentaire lors de la carcinogénèse colique chimio-induite chez le rat Wistar

Slimane Belbraouet

► **To cite this version:**

Slimane Belbraouet. Effet protecteur du calcium alimentaire lors de la carcinogénèse colique chimio-induite chez le rat Wistar. Médecine humaine et pathologie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 1994. Français. NNT : 1994NAN10021 . tel-01747486

HAL Id: tel-01747486

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01747486>

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Université de Nancy I

Ecole doctorale "Biologie & Santé"

Thèse de Doctorat



Spécialité: "Biologie Structurale, Moléculaire & Cellulaire"

Slimane BELBRAOUIET

(Centre de Nutrition Humaine)

Effet Protecteur du Calcium Alimentaire lors de la Carcinogénèse Colique Chimio-Induite chez le Rat Wistar

Soutenue le 17 Mars 1994 devant la Commission d'Examen:

<u>Président:</u>	<i>G. DEBRY</i>	<i>Université de Nancy I</i>
<u>Rapporteurs:</u>	<i>E. RIBOLI</i>	<i>C.I.R.C Lyon</i>
	<i>M. RIOTTOT</i>	<i>Université d'Orsay</i>
<u>Examineurs:</u>	<i>J. FLOQUET</i>	<i>Université de Nancy I</i>
	<i>J.L. GUEANT</i>	<i>Université de Nancy I</i>
	<i>X. PELLETTIER</i>	<i>C.N.H. Nancy</i>

A ceux que j'aime,

pour les sacrifices consentis.

"C'est ce qui manque qui donne la raison d'être"

Lao Tseu

Avant-propos

A notre Maître, Monsieur Gérard DEBRY, Professeur de Médecine et Directeur du Centre de Nutrition Humaine, qui a assumé la direction de nos recherches, j'adresse mes plus sincères remerciements et ma profonde gratitude pour m'avoir accepté dans son laboratoire et avoir dirigé ce travail. Je suis fier d'être son élève.

A Monsieur Elio RIBOLI, Chef du Programme Nutrition et Cancer du Centre International de Recherches sur le Cancer, pour l'honneur qu'il m'a fait de s'intéresser de près à ce travail et de prendre de son temps précieux pour en être le rapporteur; je présente mes remerciements et ma grande estime.

A Monsieur Michel RIOTTOT, Docteur d'état, Ingénieur de Recherche CNRS, qui a bien voulu être le rapporteur de cette thèse, j'exprime mes plus vifs remerciements pour les encouragements et l'aide précieuse qu'il n'a cessé de me prodiguer. Par vos qualités morales et scientifiques, vous avez été très patient avec moi et vous avez su me remettre sur la voie à chaque fois que je m'en écartai.

A Monsieur Jean FLOQUET, Professeur de Médecine, j'exprime ma gratitude pour avoir réalisé la partie histologique du travail et avoir accepté d'examiner cette thèse.

A Monsieur Jean-Louis GUEANT, Professeur de Médecine, pour avoir participé activement à l'élaboration de ce travail et pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, j'exprime ma profonde gratitude. Votre esprit scientifique et votre compétence ont toujours suscité ma grande admiration.

A Monsieur Xavier PELLETIER, Responsable du Service Biochimie Physiologie du Centre de Nutrition Humaine, qui a dirigé une grande partie de ce travail, j'adresse mes remerciements les plus sincères. Par votre grandeur d'âme, vous avez toujours trouvé les mots qu'il fallait pour tempérer mon humeur... "méditerranéenne". Que de pics !!!

Je tiens également à remercier tout spécialement:

Monsieur le Professeur C. Lutton pour m'avoir accepté dans son laboratoire où j'ai fait les premiers pas dans le monde des stéroïdes et des acides biliaires. J'exprime également mon amitié à tous les chercheurs et le personnel du Laboratoire de Physiologie de la Nutrition et en particulier M. Parquet, J. Férézou, N. Delarue, pour leur gentillesse et leur entière disponibilité;

Monsieur D. Mayeux pour l'analyse statistique des résultats;

Monsieur F. Felden pour l'aide précieuse qu'il m'a apportée dans la réalisation des dosages RIA et pour l'amitié qu'il m'a témoignée; Madame I. Gustin, Monsieur P. Gérard et tout le personnel du Laboratoire de Biochimie du Professeur Guéant;

Monsieur H. Biaudet et tous les chercheurs et le personnel du Centre de Nutrition Humaine en particulier V. Ledroit (qui a pris grand soin des animaux), H. Biégo, L. Chevrier, T. Desarmenien, T. Marchand et A. Toto.

Didier Quilliot, Térésa Bamberg et Youssef Saïdi pour leur amitié dans les moments les plus difficiles.

Liste des travaux à l'appui de la thèse

Communications:

affichée:

QUILLOT D., BELBRAQUET S., PELLETIER X., DEBRY G. *Etude sur le rat Wistar du rôle du calcium donné per os lors de l'induction de tumeurs coliques par un composé N-nitrosé, en association avec un régime enrichi en acides gras n-6.*

5èmes Journées du G.E.R.M., Montpellier 1993.

orale:

BELBRAQUET S., FELDEN F., PELLETIER X., LAMBERT D., GUEANT J.L., DEBRY G. *Protective effect of dietary calcium salts against chemically induced colon carcinogenesis in rat.*

The 8th International Symposium on Prevention and Detection of Cancer, Nice 1993.

Publications:

abstract:

BELBRAQUET S., FELDEN F., PELLETIER X., LAMBERT D., GUEANT J.L., DEBRY G. *Protective effect of dietary calcium salts against chemically induced colon carcinogenesis in rat. Cancer Detection and Prevention 1993; 17(1):146.*

acceptée avec corrections:

BELBRAQUET S., FELDEN F., PELLETIER X., GASTIN I., LAMBERT D., FLOQUET J., GUEANT J.L., DEBRY G. *Dietary calcium salts as protective agents and laminin P1 as biochemical marker in chemically induced colon carcinogenesis in rat. Cancer Detection and Prevention.*

soumise:

BELBRAQUET S., PELLETIER X., FLOQUET J., DEBRY G. *Dietary calcium salts exhibit a protective effect in colon carcinogenesis depending on their chemical form. Role of fecal pH. Annals of Nutrition and Metabolism.*

en préparation:

QUILLOT D., BELBRAQUET S., PELLETIER X., FLOQUET J., DEBRY G. *The influence of dietary calcium carbonate on chemically-induced colon cancer in Wistar rat.*

BELBRAQUET S., PELLETIER X., GASTIN I., GUEANT J.L., FELDEN F., FLOQUET J., DEBRY G. *Protective effect of dietary calcium salts in chemically-induced rat colon carcinogenesis evaluated by histological examination and laminin P1 blood level.*

Liste des abréviations

<i>ADN:</i>	<i>Acide désoxyribonucléique</i>
<i>AG:</i>	<i>Acides gras</i>
<i>AMM:</i>	<i>Acétate de méthylazoxyméthanol</i>
<i>AOM:</i>	<i>Azoxyméthane</i>
<i>APC:</i>	<i>Deleted in colorectal carcinomas</i>
<i>BSTFA:</i>	<i>Bis (triméthylsilyl) trifluoroacétamide</i>
<i>CPG:</i>	<i>Chromatographie en phase gazeuse</i>
<i>CUD:</i>	<i>Coefficient d'utilisation digestive</i>
<i>D_a:</i>	<i>Dalton</i>
<i>DCC:</i>	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
<i>DMAB:</i>	<i>Diméthyl-aminobiphényle</i>
<i>DMH:</i>	<i>Diméthylhydrazine</i>
<i>EDTA:</i>	<i>Ethylène diamine tétraacétique</i>
<i>F344:</i>	<i>Fisher 344</i>
<i>IOPS:</i>	<i>Indemnes d'organismes pathogènes spécifiques</i>
<i>LI:</i>	<i>Labeling index</i>
<i>LP₁:</i>	<i>Laminine P₁</i>
<i>MNNG:</i>	<i>Méthyl-nitro-nitroso-guanidine</i>
<i>NMU:</i>	<i>Nitroso-méthyl-urée</i>
<i>ODC:</i>	<i>Ornithine décarboxylase</i>
<i>RRT:</i>	<i>Temps de rétention relatif</i>
<i>SD:</i>	<i>Sprague Dawley</i>
<i>TMCS:</i>	<i>Triméthylchlorosilane</i>
<i>TSIM:</i>	<i>Triméthylsilylimidazole</i>
<i>vs:</i>	<i>versus</i>

Schémas, figures & tableaux

Schéma 1: Influence des facteurs alimentaires sur l'initiation et la promotion de la carcinogenèse

Schéma 2: Morphogenèse du cancer intestinal expérimental chez le rat

Schéma 3: Effets modulateurs des lipides et du calcium sur la carcinogenèse colique chez le rat

Figure 1: Evolution pondérale hebdomadaire (1° expérimentation)

Figure 2: Evolution pondérale hebdomadaire (2° expérimentation)

Figure 3: Distribution du taux de LP1 des différents lots

Figure 4: Distribution du taux de LP1 chez les animaux sains, avec dysplasie ou carcinome

Figure 5: Distribution du taux de LP1 selon les lots et les prélèvements

Tableau 1: Résultats des études prospectives sur l'alimentation et les cancers du côlon et rectum

Tableau 2: Résultats d'études cas-témoins sur l'alimentation et les cancers du côlon et du rectum

Tableau 3: Influence des lipides alimentaires sur l'incidence des tumeurs chez des rats traités au DMH

Tableau 4: Effet des régimes hyperlipidiques sur la carcinogenèse expérimentale du côlon

Tableau 5: Structure chimique des acides biliaires

Tableau 6: Calcium et risque de cancer colique

Tableau 7: Prolifération cellulaire et calcium

Tableau 8: Effet de différentes formes de calcium sur la promotion des tumeurs coliques chez le rat.

Tableau 9: Résultats d'anatomie de quelques travaux utilisant la NMU

Tableau 10: Temps de rétention relatif (RRT) au C18:0, de différents acides gras méthylés

Tableau 11: Temps de rétention relatif (RRT) au 5 α cholestane des stérols neutres silylés

Tableau 12: Temps de rétention relatif (RRT) au 5 α cholestane de différents acides biliaires méthylés et silylés

Tableau Ia: Composition des régimes standard et expérimentaux (1° expérimentation)

Tableau Ib: Répartition des lots selon les régimes et le traitement à la NMU

Tableau II: Evolution de la quantité d'aliments ingérés, du poids des selles et du CUD a

Tableau III: Evolution du Ca ingéré, fécal, urinaire, absorbé et retenu

Tableau IV: Evolution du pH des selles lyophilisées

Tableau Va: Evolution des lipides totaux et des acides gras

Tableau Vb: Concentration et flux des stérols fécaux

Tableau Vc: Evolution des phytostérols

Tableau VI: Incidence des tumeurs coliques

Tableau VII: Composition des régimes (2° expérimentation)

Tableau VIII: Evolution des quantités ingérées, du poids des selles et du CUDa

Tableau IX: Evolution du Ca ingéré, fécal, urinaire, absorbé et retenu

Tableau X: Evolution du pH des selles lyophilisées

Tableau XIa: Evolution des lipides totaux et des acides gras

Tableau XIb: Evolution des stérols fécaux

Tableau XIc: Evolution des phytostérols

Tableau XIIa: Evolution des acides biliaires fécaux

Tableau XIIb: Distribution des acides biliaires fécaux

Tableau XIII: Synthèse du cholestérol

Tableau XIV: Nombre et % d'animaux atteints de tumeurs et nombre de tumeurs par rat atteint

Tableau XV: Corrélations

Sommaire

Effet protecteur du calcium alimentaire lors de la carcinogénèse colique chimio-induite chez le rat Wistar

<i>Introduction</i>	1
---------------------	---

Etude bibliographique

<i>1: Carcinogénèse</i>	4
1-1: <i>Initiation et promotion</i>	4
1-2: <i>Modèle animal</i>	5
1-2-1: <i>Carcinogénèse chimio-induite</i>	5
1-2-2: <i>Prolifération cellulaire</i>	7
1-3: <i>Génétique et cancer du côlon</i>	8
<i>2: Rôle des lipides dans la carcinogénèse colique</i>	9
2-1: <i>Etudes épidémiologiques</i>	9
2-2: <i>Lipides et carcinogénèse expérimentale</i>	12
2-2-1: <i>Carcinogénèse chimio-induite</i>	12
2-2-2: <i>Métabolisme du cholestérol et des acides biliaires</i>	15
2-2-3: <i>Rôle des stérols et des acides biliaires</i>	19
2-2-4: <i>Influence de la microflore intestinale</i>	23
2-2-5: <i>Influence du pH du côlon</i>	23
2-2-6: <i>Conclusion</i>	25
<i>3: Protection par le calcium</i>	25
3-1: <i>Etudes épidémiologiques</i>	25
3-2: <i>Calcium et carcinogénèse expérimentale</i>	26
3-3: <i>Mécanismes de protection</i>	30
3-3-1: <i>Absorption intestinale du calcium</i>	30
3-3-2: <i>Hypothèse de Newmark</i>	31
3-3-3: <i>Hypothèse de Buset</i>	31
3-3-4: <i>Conclusion</i>	32
<i>4: La laminine: un marqueur tumoral</i>	33

Travail personnel

A: 1ère expérimentation: rôle du carbonate de calcium donné per os lors de l'induction de tumeurs coliques par la NMU en association avec un régime enrichi en acides gras n-6.

1: Matériels et méthodes	37
1-1: Animaux	37
1-2: Régimes	37
1-3: Instillation du carcinogène	37
1-4: Recueils	37
1-5: Dosages biochimiques	38
1-5-1: Lipides totaux	38
1-5-2: Stérols	38
1-5-3: Calcium fécal	38
1-5-4: Calcium urinaire	39
1-5-5: pH des selles lyophilisée	39
1-5-6: Analyse statistique	39
2: Résultats et discussions	40
2-1: Poids corporel	40
2-2: Evolution des ingérés, du poids des selles et du CUDa	40
2-3: Calcium	40
2-4: pH des selles lyophilisées	41
2-5: Lipides totaux.	41
2-6: Stérols	41
2-6-1: Stérols totaux fécaux	41
2-6-2: Stérols animaux	41
2-6-3: Phytostérols	42
2-7: Anatomie pathologique	42
2-7-1: Lésions macroscopiques	42
2-7-2: Lésions microscopiques	42
2-7-3: Répartition des tumeurs	42
3: Conclusions	43
3-1: Rôle de la NMU	43
3-2: Influence du carbonate de calcium	43

β- 2ème expérimentation: rôle de trois différents sels de calcium donnés per os lors de l'induction de tumeurs coliques par la NMU en association avec un régime enrichi en acides gras saturés.

1: Matériels et méthodes	46
1-1: Animaux et régimes	46
1-2: Instillation du carcinogène	46
1-3: Recueils et prélèvements	46
1-4: pH des selles lyophilisée	47
1-5: Calcium fécal et urinaire	47
1-6: Lipides totaux.	47
1-7: Acides gras	47
1-8: Stérois	49
1-9: Acides biliaires	49
1-10: Laminine P1 sérique	51
1-11: Etude anatomo-pathologique	52
1-12: Analyses statistiques	52
2: Résultats et discussions	53
2-1: Evolution pondérale	53
2-2: Evolution des ingérés, du poids des selles et du CUDa	53
2-3: Calcium	54
2-4: pH des selles lyophilisées	54
2-5: Lipides totaux et acides gras	55
2-6: Stérois	56
2-6-1: Stérois totaux et animaux	56
2-6-2: Phytostérois	57
2-7: Acides biliaires	58
2-7-1: Acides biliaires totaux	58
2-7-2: Distribution et répartition des acides biliaires	59
2-7-3: Transformations microbiennes et acides biliaires	59
2-8: Synthèse de cholestérol	61
2-9: Laminine P1 sérique	61
2-10: Anatomie pathologique	62
2-11: Corrélations	63
3: Conclusions	65
3-1: Rôles des lipides saturés	65
3-2: Influence des différentes formes de calcium	66
3-3: Laminine P1	67

Conclusions générales

<i>1: Mécanismes de promotion par les lipides</i>	69
<i>2: Mécanismes de protection par le calcium</i>	70
<i>3: Perspectives</i>	73

Références bibliographiques

Introduction

Le cancer colorectal est l'une des maladies les plus répandues dans les pays occidentaux. Ce cancer se situe aux premiers rangs des pathologies cancéreuses pour les deux sexes confondus. Les différences géographiques dans l'incidence et la fréquence du cancer colorectal sont bien connues. Ainsi, l'incidence est plus élevée en Europe de l'Ouest et Amérique du Nord par rapport aux pays d'Afrique, d'Asie et d'Amérique Latine. Ces variations suggèrent l'importance des habitudes alimentaires dans le développement du cancer du côlon chez l'homme, importance confirmée par les études épidémiologiques et sur l'animal de laboratoire.

Notre appréhension des causes du cancer et des moyens de le prévenir connaît encore de larges lacunes, et ceci résulte de la complexité du processus néoplasique. En effet, deux concepts fondamentaux émergent de l'étiologie et de la prévention du cancer: son origine pluricausale et son évolution par étapes multiples. La prévention peut être envisagée tout au long du décours des événements qui conduisent de la transformation cellulaire à la progression tumorale.

Ces dernières années, des efforts importants ont été consentis, non seulement pour identifier les facteurs environnementaux responsables d'une large proportion de cancers, mais également pour développer des mesures préventives et de protection afin de réduire l'incidence de l'affection et sa mortalité. Si le facteur environnemental est primordial dans l'étiologie du cancer colorectal, il n'en demeure pas moins que le terrain génétique favorise la tumorigenèse par différentes mutations. Environ 10% des cancers colorectaux cliniquement identifiés actuellement sont sous-tendus par une prédisposition familiale flagrante, héréditairement transmise.

Malgré l'importance de cette maladie, son étiologie et sa pathogenèse ne sont pas encore bien définies. Plusieurs travaux ont examiné les mécanismes par lesquels le régime alimentaire peut influencer la carcinogenèse et l'effet inhibiteur ou promoteur des nutriments et des composés, alimentaires ou non. Le principal facteur de risque est représenté par un régime riche en viande et pauvre en légumes. Ainsi a-t-on mis en évidence que non seulement les styles de vie sont des variables importantes, mais aussi les régimes particulièrement riches en lipides totaux, pauvres en fibres et en certains micronutriments.

La différence de fréquences du cancer du côlon semble s'expliquer au moins partiellement par le biais des modifications de la flore intestinale. Certaines observations suggèrent que les acides biliaires peuvent être impliqués indirectement ou non. Le régime a donc de l'importance, d'une part en fournissant le substrat capable de former des substances co-carcinogènes, et d'autre part en modifiant la composition de la flore intestinale.

L'ingestion de régimes à teneur élevée en calcium est associée à une faible incidence de cancer colique dans plusieurs études épidémiologiques. Dans les études expérimentales, l'ingestion de calcium réduit souvent mais pas toujours, l'incidence des tumeurs coliques.

Notre travail s'articule autour de deux axes principaux: dans un premier temps, nous définirons le rôle des lipides alimentaires (saturés ou non) dans la carcinogenèse colique, et dans une seconde étape, l'effet protecteur éventuel de différentes formes de calcium (carbonate, lactate et gluconate).

Pour atteindre ces objectifs nous utiliserons la NMU (Nitroso-méthyl-urée) comme initiateur chimique direct et le rat Wistar comme modèle expérimental. L'examen anatomo-pathologique permettra de caractériser les lésions du côlon. Les analyses biochimiques des selles nous renseigneront sur l'évolution de différents paramètres au cours de la carcinogenèse. Si la maîtrise d'un cancer dépend de l'efficacité des moyens mis en œuvre pour le traiter, elle repose essentiellement sur son diagnostic précoce. Aussi a-t-on proposé un marqueur tumoral, la laminine sérique, dont nous suivrons l'évolution tout au long de l'expérimentation.

Etude bibliographique

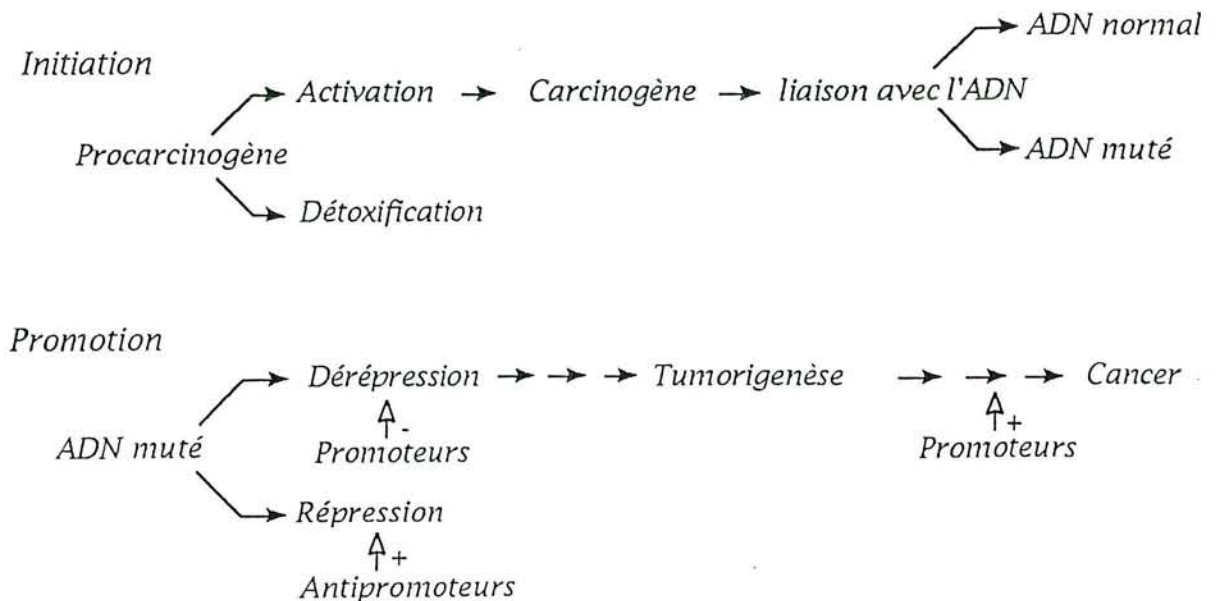
1: Carcinogénèse

La carcinogénèse recouvre l'ensemble des processus qui vont aboutir à la formation d'un cancer. La multiplicité des agents responsables de la cancérisation fait que le processus est dit *multifactoriel*. Celui-ci débute au sein d'une cellule normale dont le comportement va être complètement dérégulé jusqu'à sa transformation en cellule tumorale. Vue l'origine clonale des cancers, il est admis qu'une tumeur dérive d'une seule cellule (Decloitre 1993).

1-1: Initiation et promotion

Il est généralement établi qu'un cancer se développe en deux temps, provoqués par des agents de deux types différents, l'initiateur et le promoteur (*schéma 1*).

Schéma 1: Influence des facteurs alimentaires sur l'initiation et la promotion de la carcinogénèse (d'après Cohen 1987)



L'initiation est la première étape d'une série d'événements complexes aboutissant au développement du cancer. Les initiateurs sont les agents génotoxiques capables de générer des cellules transformées. Ils sont de deux sortes: procarcinogènes et carcinogènes directs. Les carcinogènes directs tels que la NMU, interagissent directement avec l'ADN. Pour initier un cancer, le procarcinogène doit être activé. Cette activation métabolique est assurée par des systèmes enzymatiques de phase I (mono-oxygénases à fonction mixte) catalysés par des cytochromes P 450. Les activités de détoxification font appel à des enzymes de phase II permettant la formation de complexes entre les métabolites et les agents endogènes. L'équilibre entre les voies

enzymatiques de détoxification et d'activation va conditionner la suite du processus néoplasique.

La mutation provoquée peut être réparée par des mécanismes propres à la cellule. Dans le cas contraire, deux possibilités se présentent: l'ADN muté est soit réprimé par des antipromoteurs (vitamines A, C et E, sélénium, indoles); soit déréprimé sous l'effet d'autres agents promoteurs (lipides par exemple). Dans ce cas, les cellules transformées vont proliférer, conduisant éventuellement à une tumeur (Pariza 1988).

De plus, l'observation clinique et expérimentale a montré que le processus de carcinogenèse est *multiphasique*. En effet, certaines formations précancéreuses peuvent régresser alors que d'autres évolueront vers la malignité (Decloitre 1993).

Les êtres vivants sont exposés au cours de leur existence, à des combinaisons multiples de facteurs. Ceci rend particulièrement difficile l'identification d'un facteur étiologique dans les cancers humains. La situation est relativement plus simple en carcinogenèse expérimentale où l'on peut étudier un facteur isolément (Decloitre 1993).

La seconde notion importante est celle du temps de latence requis pour l'apparition d'une tumeur. Le développement d'un cancer est généralement fort lent s'étendant sur la moitié ou le tiers de la durée de vie normale de l'homme (Lederer 1986). D'où l'intérêt d'un modèle expérimental utilisant un animal et un agent initiateur.

1-2: Modèle animal

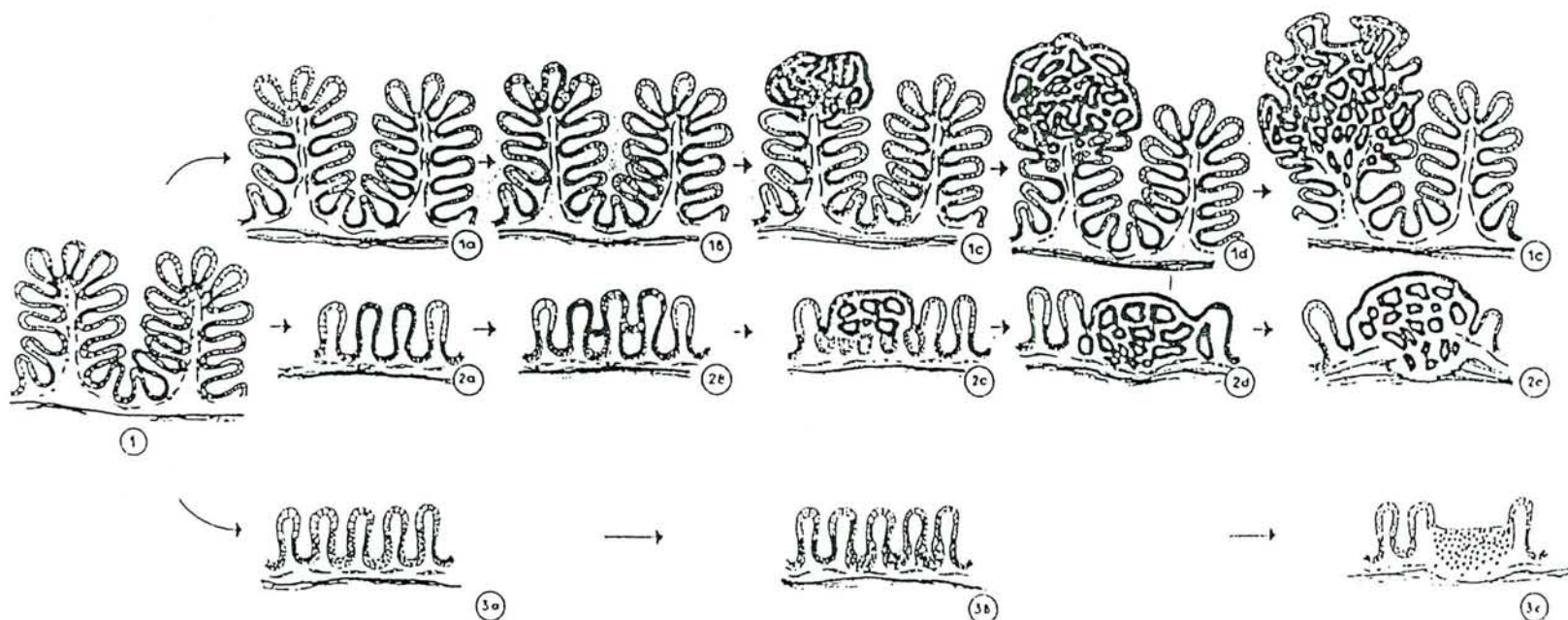
1-2-1: Carcinogenèse chimio-induite

Les études de la carcinogenèse colique ont débuté dès 1960 avec des modèles expérimentaux mimant le cancer colique humain. Plusieurs laboratoires se sont intéressés alors aux expérimentations animales en mimant les régimes occidentaux chez les rongeurs (Mc Michael & Potter 1980; Reddy *et al.*, 1978^b; Rogers & Nauss 1985).

Les carcinogènes chimiques représentent actuellement le moyen le plus utilisé pour induire des cancers digestifs chez l'animal de laboratoire. Les cancers spontanés de l'intestin sont en effet exceptionnels chez l'animal. Il existe, cependant, des exceptions. Miyamoto et Takizawa (1975) avaient signalé des cancers coliques spontanés, apparaissant vers l'âge de 6 mois chez des rats consanguins *Wistar-Furth*.

Pour étudier la pathogenèse du cancer du côlon, de nombreux modèles animaux ainsi que des agents chimiques initiateurs sont disponibles (Weisburger & Fiala 1983). De tous les modèles, celui lié à l'utilisation des rats et de l'azoxyméthane (AOM) comme agent carcinogène est le plus répandu. A cet égard, les rats, particulièrement les Fisher (F344), ont des côlons dont la morphologie et des propriétés histochimiques sont voisines de ceux de l'homme (Shamsuddin 1983). D'autres agents chimiques sont utilisés en routine pour induire les tumeurs coliques: amines aromatiques telles que le

Schéma 2: Morphogenèse du cancer intestinal chez le rat
(d'après Pozhariski 1990)



1- Muqueuse colique normale. 1a: Extension des zones prolifératives des cryptes dans l'apex du pli muqueux. 1b: Carcinome in situ à l'apex du pli. 1d: Adénocarcinome exophyte sans invasion de la basale. 1e: Adénocarcinome exophyte invasif. 2a: Extension de la zone proliférative des cryptes située entre les plis. 2b: Carcinome in situ entre les plis. 2c: Carcinome superficiel entre les plis. 2d: Adénocarcinome envahissant la muqueuse; la sous-muqueuse demeurant intacte. 2e: Adénocarcinome endophyte invasif. 3a: Accumulation de nombreuses cellules calciformes au fond des cryptes. 3b: Les cellules calciformes prennent la forme d'anneau; certaines envahissant la membrane basale. 3c: Carcinome développé.

3,2'-diméthyl-4-aminobiphényle (DMAB), 1,2-diméthylhydrazine (DMH) ou l'acétate méthylazoxyméthanol (AMM); et en administration intrarectale des carcinogènes à action directe telles que la N-méthylnitrosourée (NMU) ou la N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NMNG). En règle générale, l'action d'un carcinogène chimique varie avec la dose, la voie d'administration, le rythme et la durée totale de son administration. De même, les animaux répondent différemment selon l'espèce, la souche, l'âge et le sexe. Les cancers intestinaux induits par le DMH, le NMNG ou l'AOM apparaissent plus vite chez les mâles que chez les femelles qui semblent donc moins sensibles aux cancers colorectaux (Balish *et al.*, 1977; Martin *et al.*, 1973).

L'histogénèse des cancers intestinaux a été étudiée sur des séries d'animaux sacrifiés à intervalles variables pendant la période d'administration de l'agent carcinogène. Les adénocarcinomes n'apparaissent macroscopiquement qu'au bout de 18 à 24 semaines après l'initiation. Deux concepts opposés ont cours dans la littérature. Une notion traditionnelle dont les auteurs affirment que le cancer chez le rat est précédé par une hyperplasie de la muqueuse et un développement de polype adénomateux (Madara *et al.*, 1983). D'autres chercheurs par contre, maintiennent que, chez le rat, la plupart des cancers apparaissent *de novo* à partir de lésions dysplasiques naissant dans la muqueuse macroscopiquement normale (Martin & Martin 1988; Maskens & Dujardin-Loits 1981).

La morphogénèse du cancer intestinal chez les rats est résumée dans le schéma 2.

Le spectre des lésions obtenues chez les rats est proche de celui observé chez les différents types de maladies néoplasiques du côlon et du rectum humains (Reddy *et al.*, 1977^a)

Histologiquement, elles revêtent deux types principaux, les adénocarcinomes plus ou moins différenciés et les adénomes:

- les adénocarcinomes sont d'après Martin (1982) de loin les tumeurs les plus fréquentes. Morphologiquement, ils se présentent sous forme de masses polypoïdes, parfois bourgeonnantes, susceptibles d'entraîner une invagination qui obstrue la lumière intestinale, ou sous forme de lésions aplaties. Ces tumeurs peuvent atteindre un diamètre de 3 cm, mais des tumeurs inférieures à 2 mm peuvent déjà être invasives. Les cancers sont définis par l'invasion de la musculature muqueuse, signant le caractère invasif des lésions (Martin *et al.*, 1973). Ces cancers ne donnent pas habituellement de métastases ganglionnaires ou à distance.
- les adénomes: tumeurs bénignes pédiculée ou sessile de l'épithélium glandulaire présentant des atypies de degrés variables. Des foyers dysplasiques peuvent être observés dans les adénomes.

D'autres lésions, polypes inflammatoires, zones d'hyperplasies simples de la

muqueuse, peuvent être également observées.

1-2-2: Prolifération cellulaire

Des travaux récents ont permis de montrer qu'une autre anomalie pouvait être associée aux cancers coliques ou précéder leur apparition: une prolifération anormale de l'épithélium colique sans anomalie morphologique détectable par les techniques histologiques classiques.

La surface de la muqueuse colorectale normale présente un épithélium monostratifié qui pénètre à l'intérieur de cryptes nombreuses et régulièrement espacées (Meunier *et al.*, 1988). Ces cryptes sont divisées en trois zones majeures: les zones de prolifération, de différenciation et de maturation. La prolifération cellulaire dans le gros intestin suit un modèle d'état stationnaire (Deshner & Lipkin 1975). La perte de cellules est compensée par des cellules de remplacement (Wargovich 1988) et le phénomène de division cellulaire est parfaitement réglé par l'exfoliation des cellules de la surface de la muqueuse. Toute situation perturbant cet équilibre peut résulter en une accumulation excessive de cellules à la surface et la formation d'un polype. Le mécanisme responsable de l'hyperprolifération des cellules épithéliales du côlon n'est pas bien connu, mais les études à court terme suggèrent qu'elle peut représenter une compensation après attaque de la surface des cellules épithéliales (Bird *et al.*, 1985).

La prolifération cellulaire paraît jouer un rôle important dans la carcinogenèse du côlon des modèles animaux (Bird *et al.*, 1985). Son étude pourrait représenter une alternative à l'anatomie pathologique. Un des aspects de la promotion des tumeurs chez les animaux consiste en l'augmentation de la prolifération cellulaire de la muqueuse colique précédant l'apparition des tumeurs coliques (Hattori *et al.*, 1983).

L'augmentation de la prolifération cellulaire a pour conséquences l'apparition d'adénomes pouvant évoluer en dysplasies et carcinomes (Vogelstein *et al.*, 1989).

Les lésions chroniques de la muqueuse colique aboutissant à l'exagération de l'activité proliférative sont un facteur prédisposant au développement ultérieur et à l'augmentation de l'incidence du cancer du côlon. Cette prolifération cellulaire peut être mesurée par l'incorporation de la thymidine tritiée dans des biopsies rectales d'animaux. Elle est plus importante chez les patients porteurs de polypes ou de cancers que chez les témoins dont l'épithélium est quiescent (Stadler *et al.* 1988^a), et elle est considérée comme un bon marqueur de l'activité promotrice d'une substance (Jacobs 1988).

D'autres moyens sont utilisés pour évaluer la prolifération cellulaire telle que l'augmentation de l'activité de l'ornithine décarboxylase (ODC) que Reddy (1992) associe à l'altération de la muqueuse colique.

1-3: Génétique et cancer colique

Plusieurs gènes identifiés contribuent probablement au développement des cancers héréditaires et sporadiques. Ce sont le Ki ras, le gène de P53, les gènes DCC (*deleted in colorectal carcinomas*) et APC (*adenomatous polyposis coli*). Le gène APC de transmission familiale, prédisposant au cancer colique, est actuellement le seul à porter des lésions héréditairement transmissibles (Grandjouan 1991). Il est retrouvé chez au moins 10% des sujets atteints de cancer colorectal.

Les autres marqueurs moléculaires ne sont pas spécifiques de la carcinogenèse colique. Ces marqueurs sont des formes lésées de gènes situés sur les chromosomes 12, 17 et 18. Ce sont des marqueurs de progression tumorale. En effet, les lésions qui les activent (pour l'oncogène Ki ras), ou les inactivent (pour les gènes P53 et DCC) augmentent en fréquence au cours de la progression tumorale des cellules coliques (*ibid.*). La protéine P53, portée par le chromosome 17p, est impliquée dans le contrôle de l'entrée des cellules en cycle de division mitotique. Le gène codant pour le P53 pourrait perdre des substances et muter (Finlay 1993). Le gène DCC serait une cible possible des pertes alléliques de 18q. Ce gène code pour une protéine dont la séquence ressemble à celle de protéines d'adhésion cellulaire.

2: Rôle des lipides dans la carcinogenèse colique

2-1: Etudes épidémiologiques

Les études de la distribution géographique de la mortalité par cancers ont révélé des différences majeures dans leur incidence colorectale (Armstrong & Doll 1975). L'incidence la plus élevée se trouve dans l'Amérique du Nord, la Nouvelle Zélande et l'Europe de l'Ouest (exceptée la Finlande). La plus faible est signalée en Afrique, en Asie et en Amérique Latine (exceptés l'Uruguay et l'Argentine). En France, le cancer colorectal se situe au deuxième rang des pathologies cancéreuses pour les deux sexes confondus, dont il représente près de 15% (Bedenne 1991).

Si ces différences peuvent être dues partiellement aux facteurs génétiques ou environnementaux (Breuer & Goebell 1987), le rôle particulier de l'alimentation dans la carcinogenèse du côlon est suggéré par plusieurs études épidémiologiques (Armstrong & Doll 1975; Drasar & Irving 1973; Jensen 1983). Certaines ont démontré que les migrants des pays à risque faible (Japonais, Polonais) vers des pays à risque élevé (USA, Australie) augmentent leur risque de cancer du côlon lorsqu'ils adoptent les habitudes alimentaires de leur pays d'accueil (Willett 1990^b).

La notion de relation entre la nutrition et le cancer est déjà ancienne. Tannenbaum a démontré non seulement par ses travaux sur des animaux mais aussi par quelques études de corrélation concernant les populations humaines, une association positive entre l'excès de poids et certains types de cancers (cité par Kritcheski & Klurfeld 1981). Il a notamment établi que l'excès alimentaire (en quantité) favorise le développement et l'évolution du cancer du côlon.

Wynder et Shigematsu (1967) sont les premiers à avoir annoncé que les facteurs alimentaires en général et les différences dans la consommation de graisses en particulier, sont responsables de variations internationales de l'incidence du cancer colique.

Dans une étude de comparaison des données alimentaires de 37 pays, Drasar et Irving (1973) mettent en évidence une forte corrélation entre l'incidence du cancer colorectal et la consommation de graisses et de protéines. Un peu plus tard, Carroll et Khor (1975) suggèrent une corrélation positive entre la consommation lipidique *per capita* et la mortalité ajustée par rapport à l'âge, par certains cancers dont le cancer du côlon.

Se basant sur des données internationales, Armstrong et Doll (1975) confirment la corrélation directe entre l'incidence du cancer colorectal et la consommation de graisses *per capita*. Une analyse plus récente des données de mortalité par McKeown-Eyssen et Bright-See (1984) identifie les graisses animales comme étant les facteurs les

plus fortement corrélés avec le cancer colorectal.

On estime que près de 1.25 milliards d'individus dans le monde ont un régime alimentaire dont 40% de l'énergie provient des lipides (Willett 1990^b). La comparaison des habitudes alimentaires des Américains du Nord (population à haut risque) et des Japonais (faible risque) indique que plus de 40% des calories totales de la première population provient des lipides, alors que pour les Japonais elles ne représentaient que 10 à 20%. Une augmentation de 180% de la consommation de graisses chez les Japonais de 1959 à 1985 s'est accompagnée d'une augmentation proportionnelle de l'incidence et de la mortalité par cancer colorectal avec un décalage de 15 ans (Willett 1989).

L'étude de la mortalité des adeptes de certaines sectes religieuses offre un intérêt particulier dans la mesure où certaines religions comportent souvent des obligations d'ordre alimentaire (alimentation végétarienne, riche en fibres, pauvre en protéines). Les études de populations spécifiques, telles que les Mormons (Lyon *et al.*, 1976) ou les Adventistes du 7ème Jour (Phillips 1975) indiquent que l'incidence des cancers est beaucoup plus faible que dans le reste de la population générale. Elles concluent à la prééminence du facteur environnemental sur le terrain génétique ou racial.

Les premières études prospectives ne montraient pas de relation de cause à effet entre la consommation de lipides et le développement du cancer colorectal (*tableau 1*). Hirayama (1981) trouve paradoxalement un effet protecteur de la consommation de viande vis-à-vis du cancer colorectal. Récemment, Willett (1990^b) associe significativement la consommation de graisses et ce type de cancer.

Tableau 1: Résultats des études prospectives sur l'alimentation et les cancers du côlon et rectum (d'après Riboli 1992)

<i>Année</i>	<i>Premier auteur</i>	<i>Pays</i>	<i>Lipides</i>	<i>Viande</i>
1981	Hirayama	Japon		-
1984	Stemmermann	Hawaii	± ^a	0
1985	Phillips	USA	0	
1990 ^b	Willett	USA	+	± ^c

+ : risque augmenté; - : risque diminué; 0 : pas d'association.

^a: risque diminué pour le cancer du côlon, légèrement augmenté pour le cancer du rectum.

^c: risque augmenté pour le bœuf, le porc et l'agneau et diminué pour la volaille et les poissons.

La plupart des études cas-témoins indiquent une élévation du risque relatif de cancers colique et rectal avec la consommation de graisses totales. Ceci est particulièrement mis en évidence dans l'étude de Graham *et al.* (1988) après standardisation sur l'âge, les fibres et l'indice de Quetelet. Les mêmes conclusions sont tirées par Jain *et al.* (1980); Potter et McMichael (1986); Kune *et al.* (1987); Slattery *et al.* (1988 ^{a,b}) et d'autres études rapportées dans le *tableau 2*.

Tableau 2: Résultats d'études cas-témoins sur l'alimentation et les cancers du côlon et du rectum (d'après Riboli 1992)

Année	Premier auteur	Pays	Lipides	Viande
1973	Haenszel	Hawaii		+
1975	Phillips	USA	+	+
1978	Graham	USA		0
1979	Dales	USA	(+) ^a	(+)
1979	Martinez	Porto-Rico	+	+
1980	Haenszel	Japon		0
1980	Jain	Canada	+	+ ^b
1983	Miller	Canada		
1986	Macquart-Moulin	France	0	0
1986	Potter	Australie	+ ^c	
1987	Kune	Australie	0/+	± ^d
1987; 1988	Tuyns	Belgique	0/- ^e	± ^d
1988; 1988	Slattery	USA	+	
1988	Graham	USA	+	
1990	Lee	Singapour	0	+ ^f
1990	Wittemore	USA/Chine		+
1990	Benito	Espagne	0	+
1990	Gerhardsson	Suède	+	
1990	Freudenheim	USA	+	
1991	Hu	Chine		-
1992	Iscovich	Argentine	0	-
1992	Bidoli	Italie		0

+ : risque augmenté; - : risque diminué; 0 : pas d'association; () : risque à la limite de la signification.

^a : risque augmenté pour régimes riches en lipides et pauvres en fibres vs régimes pauvres en lipides et riches en fibres;

^b : cancer rectal seulement;

^c : risque augmenté chez les femmes seulement;

^d : risque augmenté pour le bœuf, et diminué pour le porc;

^e : risque diminué pour les lipides polyinsaturés;

^f : risque augmenté pour un régime dont le rapport viande/légumes est élevé.

D'autre part, les études de cas-témoins mettent en évidence une relation entre le risque de cancer colorectal et la consommation de graisses ou de viande, isolées ou ensemble, mais les résultats sont encore inconsistants (Burnstein 1993). En effet, dans la plupart de ces études, l'information sur les habitudes alimentaires est recueillie par des questionnaires de fréquence qui varient considérablement. L'étude de Pickle *et al.* (1984) rapporte une corrélation entre la consommation de viande et la mortalité par cancer colorectal. Deux études australiennes (Kune *et al.*, 1987; Potter & McMichael 1986) apportent des résultats contradictoires concernant l'influence des lipides alimentaires. De même, l'étude française (Macquart-Moulin *et al.*, 1986) n'est pas en faveur d'une relation entre la surconsommation de lipides et la mortalité par cancer du côlon.

Ainsi, les recherches épidémiologiques sur les effets des lipides alimentaires vis-à-vis du cancer colique comportent beaucoup de controverses.

Ces résultats contradictoires peuvent provenir du fait que plusieurs travaux ne tiennent pas compte de l'effet modulateur des fibres et des interactions possibles avec les autres nutriments du régime (Cheah 1990; Reddy & Cohen 1986).

De plus, certaines études ne font pas de distinction entre le cancer du côlon et celui du rectum, dont la distribution épidémiologique est probablement différente. Certains auteurs suggèrent des différences dans l'étiologie et la pathogenèse (Correa & Haenszel 1978; Reddy & Cohen 1986; Wynder & Shigematsu 1967). En effet, il faut noter, que dans le passé, le cancer rectal était souvent considéré avec le cancer du côlon sous le vocable de cancer colorectal ou du gros intestin, alors que ces deux types de cancers sont différents (Birt 1987). Alors que le cancer du côlon est également réparti dans les deux sexes, le cancer du rectum est plus fréquent chez les hommes. La forte incidence des carcinomes coliques est généralement associée à une aussi forte incidence des carcinomes rectaux. Cependant, dans les pays à faible incidence, une grande proportion des carcinomes du gros intestin est représentée par des carcinomes du rectum (Correa & Haenszel 1978).

2-2: Lipides et carcinogenèse expérimentale

2-2-1 Carcinogenèse chimio-induite

Nigro *et al.* (1975) sont les premiers à rapporter une augmentation du cancer colique induit par l'AOM chez des rats nourris avec des régimes hyperlipidiques. Malheureusement, cette étude n'a pas tenu compte de la dilution des autres nutriments (protéines, vitamines, minéraux et fibres) à la suite de la supplémentation en lipides.

L'influence des régimes hyperlipidiques sur les tumeurs du côlon expérimentalement induites a été étudiée par la suite par plusieurs chercheurs, avec des résultats contradictoires (Broitman *et al.*, 1977; Nauss *et al.*, 1983 et 1984; Reddy &

Maeura 1984; Reddy *et al.*, 1976^{a,b} et 1977^{a,c,d}; Rogers *et al.*, 1980;). La composition des régimes (quantité et le type de lipides) ainsi que la durée du régime hyperlipidique, le type de carcinogène, la méthode d'administration et les techniques histopathologiques sont autant de facteurs non exhaustifs pouvant expliquer les divergences dans les résultats entre les laboratoires (Burnstein 1993; Clinton & Visek 1986).

Nonobstant le type de carcinogène administré ou son mode d'action (direct ou indirect), les rats ayant un régime dont 40% des calories proviennent des lipides, ont une plus grande incidence du cancer du côlon que ceux nourris avec un régime dont l'apport énergétique des lipides ne représente que 10% (Williams & Weisburger 1986).

Dans les études publiées (*tableaux 3 et 4*), la qualité de lipides alimentaires (animaux ou végétaux) au taux de 20% (en quantité) n'est pas décisive et n'implique pas des différences significatives dans l'apparition des tumeurs. Toutefois quelques exceptions sont signalées dans la littérature. Les huiles d'olive et de noix de coco, composées essentiellement d'acides gras monoinsaturés (Wargovich *et al.*, 1991), ou les huiles de poisson riches en acides gras *n-3* (Nigro *et al.*, 1986; Reddy 1986; Reddy & Maeura 1984) diminueraient l'incidence des cancers coliques. D'autre part, la tumorigenèse du côlon est augmentée chez des rats nourris avec des régimes contenant des quantités élevées de graisses de boeuf, d'huile de maïs ou de lard et traités avec des carcinogènes gastro-intestinaux spécifiques (Reddy *et al.*, 1977^{a,c,d}). Chez la souris, l'huile de maïs ingérée en bolus entraîne une prolifération accrue des cellules coliques (Caderni *et al.*, 1988). Cet effet est prolongé si l'alimentation hyperlipidique (huile végétale) est donnée de façon chronique à des souris (Bird *et al.*, 1986).

En deçà de 20%, les lipides polyinsaturés *n-6* auraient un effet promoteur plus prononcé que les autres types (Rogers & Nauss 1985). Carroll et Khor (1975) constatent chez des rats SD traités au DMH et nourris avec 20% de lipides, un effet promoteur croissant en fonction du degré d'insaturation. Ceci n'est pas mis en évidence lorsque le taux de lipides est plus élevé (Mohr & Lewkowski 1989).

Tableau 3: Influence des lipides alimentaires sur l'incidence des tumeurs chez des rats traités au DMH (d'après Reddy 1975)

lipides alimentaires	Supplément de lipides en % dans le régime	nombre de rats	nombre de rats avec tumeurs	tumeurs par rat atteint
huile de maïs	5	22	8	2.11
lard	5	23	4	1.26
huile de maïs	20	22	14	2.44
lard	20	24	16	2.25
contrôle	-	20	5	1.00

Tableau 4: Effet des régimes hyperlipidiques sur la carcinogénèse expérimentale du côlon (d'après Newberne & Nauss 1986)

Type de lipides	nombre d'études	fréquence augmentée	incidence augmentée	sans changement
graisses végétales polyinsaturées	12	2	5	5
graisses végétales saturées	3	1	0	2
graisses animales saturées	13	5	4	5
total	28	8	9	12

D'autres travaux ne concluent pas à une influence consistante ni du taux ni du type de lipides alimentaires sur la carcinogenèse colique induite par le DMH ou le NMU (Locniskar *et al.*, 1985; Nauss *et al.*, 1983 et 1984). En examinant le développement des tumeurs coliques dans trois groupes de rats différents par le régime et traités par le DMH, ces auteurs n'observent pas de différences significatives dans l'incidence des tumeurs coliques concernant les rats consommant 24% de graisses animales, 24% de graisses insaturées, 24% de lipides partiellement hydrogénés ou 5% de mélange lipidique.

Une controverse subsiste encore quant au rôle promotionnel du régime hyperlipidique selon qu'il est instauré avant, pendant ou après l'initiation. L'idée selon laquelle les régimes hyperlipidiques agissent principalement pendant la phase de promotion est annoncée par l'étude de Reddy (1983) qui a montré que l'incidence des tumeurs intestinales est augmentée par un régime hyperlipidique après le traitement par l'AOM. Toutefois, les régimes riches en graisses animales (composées essentiellement d'acides gras saturés) augmentent la carcinogenèse lorsque l'inducteur chimique est le DMH, l'AMM ou la NMU et lorsque les régimes hyperlipidiques sont consommés avant, durant ou après le traitement au carcinogène (Reddy *et al.*, 1977^c). De même, les études de Broitman *et al.* (1977) indiquent une augmentation des carcinomes du côlon quand les régimes supplémentés en huile de tournesol (particulièrement riche en acides gras polyinsaturés *n-6*) sont consommés avant, durant ou après le traitement avec le DMH.

Les graisses et les lipides alimentaires semblent donc être des stimulateurs de tumeurs à partir de populations cellulaires exposées à des carcinogènes initiateurs en augmentant la prolifération cellulaire, laquelle peut entraîner une augmentation du nombre de cellules avec un ADN anormal (Lipkin & Newmark 1985).

2-2-2: métabolisme du cholestérol et des acides biliaires

Le cholestérol est le stérol le plus abondant des tissus animaux, 1 à 2 mg/g, où il représente 30% des constituants des membranes plasmiques. Son métabolisme ou biodynamique dans l'organisme animal est maintenant bien connu (Mathé & Lutton 1984) même si certains aspects de régulation restent à élucider. Chez l'animal, le cholestérol a une double origine, exogène, il provient de l'absorption intestinale du cholestérol alimentaire, et endogène, il est synthétisé dans tous les tissus. Ainsi, on peut définir deux processus d'entrée du cholestérol dans l'organisme par leur vitesse, la vitesse d'absorption du cholestérol alimentaire ou *Ma* et la vitesse de biosynthèse ou *Ms*. Il est éliminé de l'organisme par la desquamation de la peau, la voie urinaire (stéroïdes hormonaux) et la voie fécale, cette dernière représente près de 98% de la sortie

du cholestérol de l'organisme. Ainsi, on peut définir deux processus d'élimination du cholestérol hors de l'organisme, chacun caractérisé par son débit journalier ou vitesse, l'élimination urinaire (M_u), l'élimination fécale de cholestérol et de ses dérivés microbiens (M_f). Dans les fèces, le cholestérol a une triple origine, alimentaire (celui qui n'a pas été absorbé), plasmatique (celui qui provient des sécrétions digestives, bile principalement, et qui n'a pas été absorbé), et cellulaire (celui qui est issu de la desquamation de l'épithélium intestinal et qui n'a pas été absorbé). Cette distinction permet de décomposer la sortie fécale de cholestérol comme la somme (M_f) des vitesses de sorties du cholestérol, alimentaire non absorbé (M_{na}), plasmatique non réabsorbé (M_e) et d'origine épithéliale (M_{se}). D'où une première relation:

$$[1] \quad M_f = M_{na} + M_e + M_{se}$$

Le cholestérol est aussi éliminé dans les fèces sous forme d'acides biliaires. En effet, dans l'hépatocyte le cholestérol est, en partie, converti en acides biliaires, lesquels sont sécrétés dans les voies biliaires, passent dans l'intestin où ils favorisent l'absorption des lipides. Les acides biliaires qui échappent à la réabsorption sont éliminés dans les fèces. Cette élimination fécale chez l'animal adulte, définie par une vitesse M_t , est compensée par une biosynthèse équivalente dans le foie. L'analyse des origines du cholestérol dans les fèces et la connaissance des échanges cellulaires et plasmatique de cette molécule et de ses dérivés ont permis à Chevallier et Lutton (1966) de définir les conditions d'équilibre de la biodynamique du cholestérol dans l'organisme. Chez l'animal adulte en équilibre physiologique, la somme des vitesses d'entrée du cholestérol dans l'organisme est égale à la somme des vitesses de sortie ce qui conduit à la relation suivante:

$$[2] \quad M_a + M_s = M_u + M_e + M_t$$

En effet, le cholestérol non absorbé et celui qui provient de la desquamation cellulaire ne participent pas à l'équilibre dynamique; à l'état stationnaire ou état d'équilibre dynamique, cas de l'animal adulte adapté à une alimentation donnée, M_u peut être négligée car l'excrétion urinaire des stéroïdes hormonaux est très faible; ainsi, l'équation d'équilibre devient:

$$M_a + M_s = M_e + M_t$$

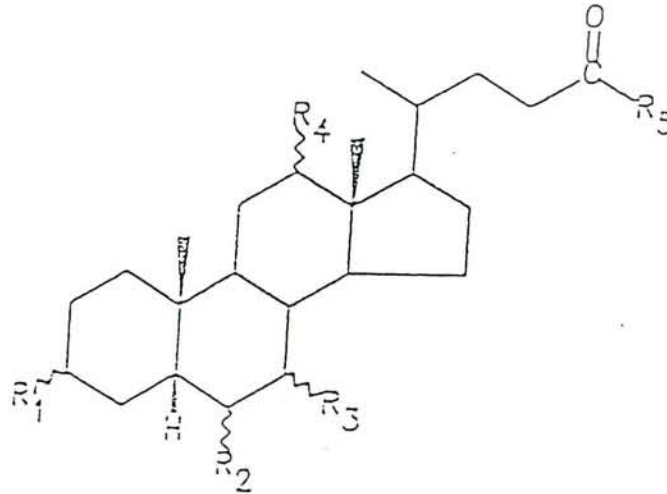
Chez un rat qui ne reçoit pas de cholestérol dans son alimentation (aliment semi-synthétique), les vitesses M_a et M_{na} sont nulles et les deux relations deviennent:

$$[1'] \quad M_f = M_e + M_{se}$$

$$[2'] \quad M_s = M_e + M_t$$

Mathé et Lutton (1984) ont étudié les variations des processus d'entrée et de sortie du cholestérol de l'organisme dans plus de 60 conditions expérimentales. Il ressort de cette étude, que chez le rat le cholestérol provenant du plasma et celui venant de l'épithélium intestinal contribuent chacun pour environ la moitié de l'excrétion fécale totale de cholestérol ce qui entraîne:

Tableau 5: Structure chimique des acides biliaires



Nom trivial	Abrév.	R ₁ (C ₃)	R ₂ (C ₆)	R ₃ (C ₇)	R ₄ (C ₁₂)	R ₅ (C ₂₄)
Acide Cholique	CA	α OH		α OH	α OH	O ⁻
Acide Chénodéoxycholique	CDCA	α OH		α OH		O ⁻
Acide β Muricholique	β Muri	α OH	β OH	β OH		O ⁻
Acide Lithocholique	LCA	α OH				O ⁻
Acide Déoxycholique	DCA	α OH			α OH	O ⁻
Acide Murocholique	Muro	α OH	β OH			O ⁻
Acide Hyodéoxycholique	HDCA	α OH	α OH			O ⁻
Acide Ursocholique	UCA	α OH		β OH	α OH	O ⁻
Acide Ursodéoxycholique	UDCA	α OH		β OH		O ⁻
Acide Hyocholique	HCA	α OH	α OH	α OH		O ⁻
Acide ω Muricholique	ω Muri	α OH	α OH	β OH		O ⁻

$$M_f = 2 M_e = 2 M_s$$

Ainsi, chez le rat qui ne reçoit pas de cholestérol dans son alimentation, on peut aisément calculer la synthèse endogène de cette molécule par la relation approchée suivante:

$$[3] \quad M_s = 1/2 M_f + M_t.$$

La détermination des quantités de cholestérol et d'acides biliaires excrétées journalièrement suffit donc, dans ces conditions particulières, à évaluer la biosynthèse de cholestérol.

La biosynthèse des acides biliaires représente chez l'homme comme chez l'animal la voie principale d'élimination du cholestérol de l'organisme (50% chez le premier et 80% chez le rat). Cependant, les acides biliaires qui n'ont pas été réabsorbés dans l'intestin grêle, passent dans le côlon où ils subissent l'action enzymatique des bactéries hébergées dans ce segment intestinal. En particulier, les acides biliaires endogènes ou primaires, cholique et chénodéoxycholique chez l'homme, ou, cholique, chénodéoxycholique et β muricholique chez le rat, sont déconjugués (hydrolyse de la liaison amide avec la taurine ou la glycine) et 7α déhydroxylés. Ils aboutissent respectivement aux acides déoxycholique, lithocholique et hyodéoxycholique et à quelques autres composés mineurs figurant dans le *tableau 5*. Ces acides d'origine microbienne sont appelés acides biliaires secondaires. Ils peuvent représenter plus de 90% des acides biliaires retrouvés dans les fèces (Riottot 1987). Ces acides biliaires secondaires seraient plus spécifiquement que les acides primaires impliqués dans la carcinogénèse colique (Reddy *et al.*, 1977^d).

2-2-3: Rôle des stérols et acides biliaires

Les stérols particulièrement le cholestérol et son métabolite bactérien le coprostanol sont impliqués dans l'étiologie du cancer (Owen *et al.*, 1987^a). Plusieurs études ont montré que l'excrétion de stérols fécaux est élevée chez les sujets avec un cancer colorectal, mais sans preuve tangible (Reddy & Wynder 1977). Nomura *et al.* (1983) observent que les Japonais à haut risque de cancer colique ont une plus forte concentration de cholestérol et de stérols animaux dans les fèces.

L'addition de cholestérol au régime alimentaire augmente la fréquence du cancer colique expérimental chimiquement induit chez les animaux (Cruse *et al.*, 1978). La tumorigénécité de l'AOM est significativement augmentée chez les animaux recevant un régime supplémenté avec 1% de cholestérol, lequel fait augmenter l'excrétion fécale des acides biliaires (Hiramatsu *et al.*, 1983). Des suppléments alimentaires de cholestérol en combinaison avec les acides gras polyinsaturés augmentent la tumorigénécité (Broitman *et al.*, 1977). Un régime riche en cholestérol et acides gras polyinsaturés est également promoteur de tumeurs (Broitman *et al.*, 1977). Les régimes hyperlipidiques sont des promoteurs chez les rongeurs qui excrètent plus de cholestérol fécal et de sels biliaires que les témoins (Cruse *et al.*, 1979). Les études expérimentales indiquent que le cholestérol, soit sous forme libre soit présent dans la viande ou le lard, provoque une augmentation du pourcentage de tumeurs par animal et du nombre moyen de tumeurs par animal (Bansal *et al.*, 1978; Broitman *et al.*, 1977; Cruse *et al.*, 1978; Nigro *et al.*, 1975; Reddy *et al.*, 1976^{a,b}), ainsi que de l'incidence des métastases (Bansal *et al.*, 1978; Cruse *et al.*, 1978; Nigro *et al.*, 1975).

Ainsi, le cholestérol pourrait avoir un rôle cocarcinogène direct (Cruse *et al.*, 1979) ou indirect, par l'intermédiaire des acides biliaires.

En effet, il existe plusieurs preuves de l'implication des acides biliaires dans la carcinogenèse colique, et la concentration totale des acides biliaires fécaux est très bien corrélée avec l'incidence du cancer gros intestin dans les études de populations (Reddy & Wynder 1977).

La quantité et la composition des acides biliaires fécaux sont très influencées par le type de régime ingéré. Un régime à risque élevé (riche en viande et en lipides) est associé avec une augmentation significative de l'excrétion des acides biliaires secondaires (Reddy 1975). Cette relation est définie par une augmentation des acides biliaires dans le foie et dans les fèces lors d'un régime hyperlipidique (Hill *et al.*, 1971 et 1982).

Des travaux ont montré que dans les populations à haut risque de cancer colorectal, les concentrations des acides biliaires fécaux sont élevées; ceci indépendamment des régions géographiques (Hill & Drasar 1973), des contrées en

Scandinavie (Reddy *et al.*, 1978^a; Hill *et al.*, 1982), des groupes ethniques (Mac Keigne *et al.*, 1989; Reddy & Wynder 1973), des sous groupes religieux (Turjman *et al.*, 1982), des groupes raciaux (Antonis & Bersohn 1962), ou des groupes socio-économiques (Hill *et al.*, 1979).

Hill *et al.* (1971) sont les premiers à avoir associé la mortalité par cancer du côlon et l'excrétion des acides biliaires. Le risque de développer le cancer colorectal dépend de la concentration des acides biliaires fécaux totaux (Hill *et al.*, 1971; Reddy & Wynder 1973; Crowther *et al.*, 1976).

Les patients atteints d'un adénome ou d'un cancer colorectal ont des concentrations plus élevées d'acides biliaires que les témoins (Crowther *et al.*, 1976; Hill *et al.*, 1975; Hill *et al.*, 1982; Reddy *et al.*, 1977^b; Reddy & Wynder 1977; Sicard *et al.*, 1988). Il en est de même chez les porteurs de polypes (Reddy & Wynder 1977).

Par ailleurs, si les concentrations en acides biliaires fécaux sont élevées dans les populations à haut risque, les études cas-témoins ne permettent pas de conclure à un effet direct des acides biliaires totaux (Owen *et al.*, 1987^{a,b}; Hill 1991). Certaines de ces études révèlent une corrélation positive (Hill *et al.*, 1975; Reddy & Wynder 1977) alors que d'autres ne montrent pas d'association (Moskovitz *et al.*, 1978; Mudd *et al.*, 1978; Murray *et al.*, 1980). Ces divergences ont pour origine des variations de certains facteurs physiologiques tels que le bol fécal, le pH fécal, le temps de transit et l'humidité des selles, qui influencent la concentration des acides biliaires dans les fèces (Bayerdörffer *et al.*, 1993). Paradoxalement, les populations dont le régime est riche en phytostérols ont un risque de cancer colique très faible (Korpela *et al.*, 1988).

La nature et les concentrations relatives des acides biliaires secondaires sont utilisés comme discriminant dans les groupes à haut risque. Le rapport LCA/DCA est élevé dans les selles de ces groupes; ce serait un excellent marqueur du risque de cancer du côlon (Owen *et al.*, 1977^b et 1984).

Le degré de déhydroxylation semble être un paramètre important. Le rapport acides biliaires déhydroxylés ou monohydroxylés sur acides biliaires trihydroxylés varie de 1.5 à 10 lorsque le risque est important. Une corrélation positive entre le risque de cancer colorectal et l'activité de déhydroxylation a été rapportée dans la population de Hong-Kong (Crowther *et al.*, 1976; Reddy *et al.*, 1978^b).

L'intérêt a été stimulé également par le fait que les acides biliaires puissent être expérimentalement des promoteurs de la carcinogenèse colique (Narisawa *et al.*, 1974). Les acides biliaires et leurs métabolites sont suspectés d'agir avec les carcinogènes dans la promotion néoplasique chez les rongeurs (Chomchai *et al.*, 1974; Narisawa *et al.*, 1974; Reddy *et al.*, 1977^a). Les conditions expérimentales tendant à augmenter la concentration des acides biliaires dans le côlon (régime hyperlipidique, instillation intrarectale d'acides biliaires, ingestion d'acide cholique, transection de l'intestin) réduisent la période de latence et augmentent l'incidence des tumeurs chez les animaux

traités avec des carcinogènes coliques (Appleton *et al.*, 1986; Cohen *et al.*, 1980; Narisawa *et al.*, 1974; Reddy *et al.*, 1978^b).

Les acides biliaires sont impliqués dans la promotion de la carcinogénèse colique dans des expérimentations animales (Deschner *et al.*, 1981; Reddy *et al.*, 1975^{a,b}; Reddy *et al.*, 1977^{a,c,d}). Lorsque les acides biliaires sont incorporés dans le régime ou injectés par voie intrarectale chez des rats exposés à des carcinogènes, le nombre des tumeurs augmente.

Les acides biliaires administrés *per os* ont, selon leur nature, des effets variables sur la carcinogénèse. Les acides biliaires secondaires (LCA et DCA) sont cocarcinogènes du côlon des rats, alors que les acides biliaires primaires (CA et CDCA) ne le sont que s'ils peuvent subir le métabolisme microbien (Cohen *et al.*, 1980). L'induction des tumeurs par le DMH est plus faible chez les animaux sans germe (lesquels ont moins d'acides biliaires fécaux) que les chez les animaux conventionnels. La simple addition d'acide cholique au régime ou la dérivation chirurgicale du cholédoque dans le côlon, augmente le nombre d'aberrations nucléaires et le nombre de tumeurs coliques chez des animaux exposés à un initiateur (Nair 1988).

Donc, les acides biliaires sont des promoteurs importants, en particulier les acides biliaires secondaires lithocholique et déoxycholique (Reddy *et al.*, 1976^b; Reddy *et al.*, 1977^a). Lorsqu'ils sont instillés dans le côlon, le LCA et le DCA sont cocarcinogènes (Cohen *et al.*, 1980; Martin *et al.*, 1981; Narisawa *et al.*, 1974; Reddy *et al.*, 1977^d; Robblee *et al.*, 1989) ou comutagènes (Silverman & Andrews 1977). Ils provoquent chez les souris des dommages nucléaires et des transformations chimiques des fibroblastes *in vitro* (Suzuki & Bruce 1986). Narisawa *et al.* (1974) indiquent que l'instillation de MNNG se traduit par une incidence de 25% de tumeurs chez des rats. Lorsque le MNNG est donné avec du lithocholique ou du taurodéoxycholique, cette incidence passe à 52 et 62% respectivement. Ces deux acides biliaires n'exercent pas d'effet tumorigènes quand ils sont donnés seuls. Ceci suggère que les concentrations du LCA, du DCA et de la somme des deux peuvent être des facteurs de risque dans la carcinogénèse colique. Wilpart *et al.* (1983) reprenant les études de Silverman et Andrews (1977) mais en utilisant le DMH comme agent mutagène, montrèrent que le LCA et le DCA sont comutagènes. Cependant, lorsque ces deux acides biliaires sont mélangés, cet effet mutagène n'est pas retrouvé.

En outre, les régimes riches en acides gras polyinsaturés sont des promoteurs des tumeurs coliques expérimentales en augmentant l'excrétion fécale des acides biliaires, particulièrement celle du LCA (Sakaguchi *et al.*, 1986). Des rats prétraités avec la DMH (carcinogène potentiel) développent autant de tumeurs avec un régime hyperlipidique qu'avec une instillation d'acides biliaires directement dans l'intestin ou par cholecystectomie (Korn 1990).

Si les acides biliaires sont les responsables majeurs de la tumorigenèse, leur séquestration ou leur diminution devrait permettre la réduction du taux d'apparition tumorale. La cholestyramine ou l'hydroxyde d'aluminium restent cependant sans effet (Cruse *et al.*, 1981) ou augmentent la carcinogenèse induite par la DMH (Kritchevsky & Klurfeld 1981; Nigrò *et al.*, 1973). Il est vraisemblable que ces agents, diminuant l'absorption des acides biliaires dans l'intestin, en augmentent le flux dans le côlon et donc les possibilités de contact entre les cellules coliques et les acides biliaires.

Les études expérimentales montrent une association entre la consommation alimentaire et le taux de prolifération cellulaire (Jacobs 1988). Le côlon est exposé à plusieurs facteurs alimentaires influençant le renouvellement cellulaire. Le régime peut être un facteur important dans la prolifération en étant en même temps une source d'agents promoteurs de tumeurs (lipides alimentaires par exemple) et d'agents stabilisant la prolifération cellulaire (Wargovich & Baer 1989). Certains acides gras et acides biliaires secondaires induisent fortement la prolifération (Wargovich *et al.*, 1983; Wargovich *et al.*, 1984) et sont par conséquent des promoteurs de tumeurs (Reddy 1986). Ces dommages sont souvent causés par les acides biliaires et gras en solution (Stadler *et al.*, 1988^{a,b}) qui sont considérés comme toxiques, même à des concentrations physiologiques, pour l'épithélium du côlon (Bruce 1987; Moskovitz *et al.*, 1979; Rafter *et al.*, 1987^b). Leur concentration dans les selles est affectée par le régime (Rafter *et al.*, 1987^a). Les instillations d'acides biliaires dihydroxylés, tels que le DCA, causent des préjudices considérables aux cellules coliques, entraînant des altérations de la membrane, une involution des jonctions serrées (tight junctions) et une mort cellulaire suivie d'une hyperprolifération compensatoire (Cohen *et al.*, 1980). Les acides gras ionisés agissent de manière similaire. Paradoxalement, la consommation de β sitostérol alimentaire par des rats instillés avec la NMU, diminue significativement le taux de prolifération des cellules épithéliales du côlon (Deschner & Lipkin 1976).

La fraction réellement soluble des acides biliaires totaux serait prépondérante dans les processus d'altération de la muqueuse colique et par conséquent dans l'hyperprolifération de l'épithélium du côlon (Rafter *et al.*, 1987^b).

Le mécanisme exact reliant le régime au risque de cancer colorectal n'est pas bien déterminé (Galloway *et al.*, 1986). Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer les mécanismes de promotion de la tumorigenèse colique, dont la conversion en co-carcinogènes des acides biliaires par certaines bactéries (Hill *et al.*, 1971); l'influence sur le métabolisme du carcinogène (Wargovich & Felkner 1982); l'induction de la prolifération cellulaire par les acides biliaires et les lipides digérés (Kritchevsky 1986).

Le tractus gastro-intestinal est directement exposé aux lipides. Le mécanisme le plus simple qu'on puisse évoquer est que certains composés lipidiques, le cholestérol par exemple, sont métabolisés en carcinogènes actifs. Certains acides biliaires et stérols

neutres peuvent être un lien possible par leur similarité stérique avec certains carcinogènes connus (Lacassagne *et al.*, 1966). Cependant, aucun carcinogène actif dérivant des acides biliaires n'a été isolé des fèces humaines ou animales (Shamberger 1984).

Les régimes riches en lipides ne peuvent être qualifiés sensu stricto de promoteurs (Pariza 1988), mais provoquent chez l'homme et les animaux une excrétion fécale importante d'acides biliaires, accélèrent la prolifération cellulaire de la muqueuse rectale de volontaires (Stadler 1988^b) et augmentent le nombre de tumeurs chez les rats ayant reçu un initiateur (Le Quintrec 1984).

2-2-4: Influence de la microflore intestinale

Aries *et al.* (1969) ont suggéré que les co-carcinogènes sont produits dans le côlon par l'action de la flore bactérienne sur un substrat endogène ou exogène. Chez les animaux non ruminants, en l'occurrence chez les rats, la flore gastro-intestinale est estimée à 10^{10} bactéries par gramme de contenu intestinal (Raibaud *et al.*, 1966). Dans le caecum, la flore microbienne déconjugue les acides biliaires et les transforme en acides biliaires secondaires par une 7α déhydroxylase (Midvedt & Norman 1968). Cette activité semble être corrélée avec la présence de *Bactéroïdes* (Hill *et al.*, 1971) qui possède une activité de 7α déhydroxylation. Reddy (1983) suggère que les régimes hyperlipidiques altèrent la microflore intestinale et augmentent les concentrations des acides biliaires ou leurs métabolites qui atteignent le côlon.

Chez le rat, le métabolisme des acides biliaires est différent de celui de l'homme par la présence de l'acide β muricholique. Celui-ci se transforme en acide ω muricholique, lequel à son tour est converti en acide hyodéoxycholique (Sacquet *et al.*, 1979).

2-2-4: Influence du pH du côlon

Le pH fécal donne un aperçu sur le pH colique quand il est mesuré rapidement après émission des selles (Lapré 1992). Le pH fécal est lié aux produits résultants de la fermentation dans le caecum et le côlon, notamment la production des acides gras fixes (acides lactique, pyruvique...) et volatils (acides acétique, propionique, butyrique...) ainsi que des amines et de l'ammoniaque. Il dépend aussi des sécrétions glandulaires bilio-pancréatiques et intestinales riches en bicarbonates. Les bicarbonates contribuent de façon importante (après l'ammoniac) à l'alcalinité du côlon. Ils sont sécrétés dans la lumière colique en échange avec les acides gras à courte chaîne. Ces acides sont les principaux responsables de la neutralisation des bases et de l'acidification du contenu du côlon et des fèces (Newmark & Lupton 1990).

Chez l'homme, les régimes riches en viandes sont associés à une augmentation du pH des selles. Il a été démontré que le pH fécal est élevé dans les régions géographiques à haut risque, de même que chez les cancéreux dans des études cas-témoins (Bruce 1987).

Le pH fécal pourrait probablement être abaissé par les glucides complexes peu digestibles dont la fermentation aboutit à la formation d'acides gras volatils utilisés par les colonocytes (Bingham 1988). Un supplément alimentaire de son, de lactulose ou de sulfate de sodium, abaisse légèrement le pH du contenu intestinal des animaux et inhibe l'agression et la prolifération des cellules de la muqueuse colique provoquées par les acides biliaries (Rafter *et al.*, 1986). Il diminue également le nombre de tumeurs chez des rats exposés à un initiateur (Samelson *et al.*, 1985). Alors que certaines études expérimentales montrent un effet protecteur vis-à-vis du cancer du côlon par l'acidification du contenu colique (Samelson *et al.*, 1985), d'autres observent qu'un contenu colique plus acide est associé à l'augmentation de la prolifération cellulaire (Lupton *et al.*, 1988) et de la tumorigenèse (Jacobs et Lupton 1986).

D'autres auteurs n'observent pas de relation entre le temps de renouvellement cellulaire et le pH du côlon. Par rapport à l'amidon normal, l'amidon riche en amylose entraîne un plus grand flux des acides biliaries (Sacquet *et al.*, 1983) et une diminution plus importante du pH caecocolique (Andrieux *et al.*, 1989). De plus, Meslin *et al.* (1992) ne rapportent pas de relation entre le renouvellement cellulaire de l'épithélium intestinal et la quantité d'acides biliaries dans le côlon.

Le régime influence le pH fécal et la composition de la flore intestinale, qui est responsable de la 7 α déhydroxylation et par conséquent de la quantité des acides biliaries secondaires (McDonald *et al.*, 1978^{a,b}). L'enzyme clé dans la production des acides biliaries secondaires, la 7 α déhydroxylase, est augmentée dans les contenus coliques de patients ayant des adénomes du côlon (Finegold *et al.*, 1975).

En perfusant des côlons de rats avec du DCA à pH tamponné à 7.9, Rafter *et al.* (1986) observent une augmentation importante de la prolifération cellulaire. Cependant, si le pH est abaissé à 5.5 par exemple, cet effet est complètement inhibé. En effet, à ce pH tous les acides biliaries sont sous la forme non ionisée et insolubles en milieu aqueux. Selon la formule d'Henderson, le pH est égal au pK_a plus log[A⁻]/[AH]. Ainsi, à pH 7.5:

$$7.5 - 6^* = \log[A^-]/[AH] \quad \Rightarrow \quad [A^-]/[AH] = 10^{1.5}$$

Donc, les acides biliaries se trouvent sous forme ionisée; ce qui favorise la formation de sels de calcium probablement insolubles et par conséquent favorise leur excrétion.

* pK_a moyen des acides biliaries libres (Nair & Kritchevsky 1971)

Ainsi, il s'avère que les dommages sur l'épithélium sont corrélés avec les acides biliaries réellement en solution c'est à dire avec des acides biliaries disponibles. De même, si du calcium est perfusé, il est possible d'inhiber l'effet néfaste du DCA sur la

muqueuse intestinale par sa précipitation sous forme de savons de calcium.

2-2-5: Conclusion

Le régime hyperlipidique modifie la quantité et la composition des acides biliaires ainsi que l'activité de la flore bactérienne laquelle en retour pourrait produire des substances promotrices à partir des acides biliaires primaires dans la lumière intestinale (Hill et al., 1971; Reddy et al., 1978^b et 1986).

Une hypothèse de l'étiologie du cancer du côlon est fondée sur le fait que les acides biliaires secondaires de la lumière intestinale seraient responsables de la carcinogenèse intestinale. L'augmentation de la prolifération cellulaire est induite par les acides gras et biliaires du contenu colique et pourraient être impliqués dans la promotion de la carcinogenèse par les lipides alimentaires (Palmer 1979).

3: Protection par le calcium

3-1: Etudes épidémiologiques

L'observation des associations entre les taux de cancers dans différentes populations et les habitudes alimentaires correspondantes suggère l'implication du calcium alimentaire contre la carcinogenèse colique. Deux indicateurs de la consommation de calcium sont disponibles: estimation du calcium alimentaire de toutes les sources, ou au contraire examen de la consommation d'aliments riches en calcium tels que le lait et les produits laitiers.

Certaines études d'épidémiologie analytique confirment la relation inverse entre la consommation d'aliments riches en calcium (lait et produits laitiers) et le cancer du côlon (*tableau 6*).

Les chercheurs qui ont montré une corrélation négative, n'ont pas tous tenu compte des lipides alimentaires qui sont un facteur associé positivement avec le cancer colorectal et la consommation des produits laitiers.

Il est probable que la première observation épidémiologique de l'effet protecteur du lait vis-à-vis du risque du cancer est l'étude de Stocks et Karn en 1933, citée par Alder et McKeown-Eyssen (1988). Phillips (1975) observe chez les Adventistes du 7^o Jour que le risque de cancer colique est négativement associé à la consommation de lait. Garland *et al.* (1985) dans l'étude prospective sur 19 ans, observent un effet protecteur de la consommation élevée d'aliments riches en calcium.

D'autres études épidémiologiques remettent en question cette protection

présumée du calcium. Ainsi, Heilbrun *et al.* (1985), utilisant également une étude cas-témoins, ne rapportent aucune différence de risque entre les groupes. Il faut noter tout de même que la méthode des 24 heures (recall) utilisée est inadéquate pour sérier la consommation alimentaire individuelle dans la majorité des populations (Willett 1990^b).

Tableau 6: Calcium et risque de cancer colique (d'après Pence 1993)

Références (1er auteur et année)	Population étudiée	Méthode	Risque estimé
Phillips (1975)	Adventistes 7 ^e Jour	Cohorte	lait: OR= 0.30
McKeown-Eyssen (1984)	Angleterre	Cas-témoins	lait: OR= 0.60
Garland (1985)	USA (Chicago)	Prospective	calcium: OR= 0.32
Heilbrun (1985)	USA (Hawaii)	Cohorte	calcium: RR= 0.76 NS
Kune (1987)	Australie	Cas-témoins	lait: ORs=1.50/0.59 ^a
Slattery (1988)	USA (Utah)	Cas-témoins	calcium: ORs=1.50/0.59 ^a
Stemmermann (1990)	USA (Hawaii)	Prospective	calcium: RRs= 1.0/0.6 ^a
Negri (1990)	Italie	Cas-témoins	calcium: RRs= 0.9/1.2 NS

OR: Odd ratio; RR: Risque relatif; a: hommes/femmes; NS: non significatif; s: lié au sexe.

3-2: Calcium et carcinogenèse expérimentale

Les expérimentations animales ont montré que les acides gras et biliaires peuvent être toxiques pour l'épithélium colique et que le calcium alimentaire peut réduire cette pathogénécité. Ainsi, le calcium alimentaire diminue l'incidence des tumeurs coliques induites par la DMH (Pence & Buddingh 1988) ou par l'AOM (Wargovich *et al.*, 1984). Karkare *et al.* (1991), montrent que les taux élevés de calcium alimentaire abaissent seulement l'incidence des polypes, alors que le nombre d'adénocarcinomes et de tumeurs totales n'est pas affecté significativement. Wargovich *et al.* (1990) ont recherché l'effet du lactate de calcium donné à des rats à des taux reproduisant la densité nutritionnelle humaine. Après induction par l'azoxyméthane, le résultat majeur observé est la répression de la progression de l'adénome à l'adénocarcinome invasif. Le calcium exercerait donc un effet régulateur tardif sur la carcinogenèse.

Les études expérimentales, utilisant l'analyse de la prolifération cellulaire pour

évaluer l'effet de la supplémentation en calcium sur l'épithélium intestinal (*tableau 7*), vont dans le même sens que les études de population (Lipkin *et al.*, 1985; Rafter *et al.*, 1986; Wargovich *et al.*, 1983 et 1984.).

Plusieurs études *in vivo* indiquent que la supplémentation calcique des régimes des rongeurs retardent l'hyperprolifération stimulée par les lipides alimentaires. Les études expérimentales sur animaux révèlent que la prolifération cellulaire induite par les acides gras ou biliaries peut être diminuée par un excès de calcium dans le régime.

L'idée que le calcium réduit les effets promoteurs des lipides alimentaires est renforcée par deux études où des acides biliaries et acides gras ionisés sont utilisés comme mitogènes pour la muqueuse colique. Chez des souris instillées par voie intrarectale, avec du DCA ionisé ou de l'acide oléique, la toxicité intestinale est minimisée et l'hyperprolifération annulée après consommation de quantités élevées de sels de calcium (Wargovich *et al.*, 1983 et 1984).

Par un tout autre système, l'effet sur la prolifération colique est évalué par addition d'acide cholique à un régime contenant 0.1, 0.5 ou 1% de calcium. La prolifération est augmentée avec les taux faibles de calcium et diminuée par addition de 1% de calcium.

Appleton *et al.* (1986 et 1987^{a,b}) ont examiné l'inhibition des tumeurs par le calcium chez des rats après entérectomie. Dans ces expériences, l'excrétion et la réabsorption des acides biliaries sont altérées par la suppression d'une portion de l'intestin grêle. Ces chercheurs ont montré que cette procédure chirurgicale augmente la tumorigenèse induite par l'AOM après réanastomose intestinale car le flux d'acides biliaries est directement déversé dans le côlon. La promotion des tumeurs est cependant diminuée par addition du lactate de calcium dans l'eau de boisson; le mécanisme d'action évoqué étant la liaison du calcium avec les acides biliaries non réabsorbés.

Le DCA administré intrarectalement à des concentrations proches de celle de l'acide biliaire contenu dans les fèces, induit des dommages de l'épithélium. Le calcium, sous forme de lactate ou de carbonate, est capable d'inhiber ces altérations lorsqu'il est pris oralement juste avant l'acide biliaire (Wargovich *et al.*, 1984). Des résultats similaires sont observés avec les sels d'acides gras (McKeown-Eyssen & Bright-See 1984).

Les effets des acides biliaries et du calcium sont aussi examinés sur le côlon en perfusion. Les rats perfusés avec des doses croissantes d'acides biliaries (DCA), montrent des perturbations de la morphométrie des cellules coliques et une perte d'ADN dans le flux de perfusion. Cet effet est visible à partir de 2 mM d'acides biliaries, mais la dose de 5 mM provoque un maximum d'altérations. Celles-ci sont cependant évitées si l'acide biliaire est mélangé à une solution de sels de calcium avant la perfusion (Rafter *et al.*, 1986).

Tableau 7: Prolifération cellulaire et calcium (d'après Pence 1993)

Références	Effets du calcium
Wargovich et al., (1983)	- : hyperprolifération par diminution de l'ODC
Wargovich et al., (1984)	-: hyperprolifération due aux acides gras
Bird et al., (1986)	-: hyperprolifération due à l'acide cholique
Appleton et al., (1986)	-: hyperprolifération due à la résection intestinale
Buset et al., (1986)	inhibition de la prolifération cellulaire
Reshef et al., (1989)	-: hyperprolifération due à la MNNG
Baer et Wargovich (1989)	- : induction de l'ODC due à l'acide cholique
Newmark et al., (1990)	-: hyperprolifération due à un stress nutritionnel
Hu et al., (1989)	- : hyperprolifération par diminution de l'ODC
Arlow et al., (1989)	-: ODC et tyrosine kinase
Cohen et al., (1989)	-: mortalité par l'acide cholique

-: diminution; ODC: Ornithine décarboxylase; MNNG: Méthyl-N-Nitroso-Guanidine.

La supplémentation en calcium chez les hommes et les animaux peut diminuer le risque de cancer colique (Nelson *et al.*, 1987).

Les études épidémiologiques et expérimentales supportent l'hypothèse de Newmark *et al.* (1984) selon laquelle le régime occidental est déficient en calcium par rapport à une consommation élevée en lipides. Ces auteurs suggèrent donc que la liaison du calcium alimentaire aux lipides, aux acides gras et aux sels biliaires dans la lumière intestinale pour former des complexes insolubles, est probablement le mécanisme de protection.

Les études à long terme concernant le rôle du calcium dans la carcinogenèse sont en cours dans de nombreux laboratoires. Elles tendent à démontrer l'effet protecteur du calcium. Le développement des techniques de culture à long terme sur des cellules épithéliales normales a rendu possible l'étude *in vitro* sur l'épithélium colique humain. En modifiant, dans les limites physiologiques, la concentration de calcium dans le milieu, il est possible de démontrer l'inhibition de la prolifération mesurée par l'incorporation de la thymidine tritiée et l'autoradiographie (Rozen 1991).

Des résultats similaires sont obtenus par Lipkin *et al.* (1989) après exposition *in vitro* des cellules épithéliales du côlon humain à des quantités croissantes de calcium.

Les études de l'effet des taux de calcium dans les cancers de côlon humain en culture sont controversées car les cellules tumorales prolifèrent indépendamment de la concentration en calcium (Wargovich 1988). Buset *et al.* (1990) ont également remarqué que si le calcium peut inhiber la prolifération des cellules coliques normales *in vitro*, il reste sans effet sur la croissance des cellules cancéreuses coliques en culture.

Parce que plusieurs études ont reporté des résultats encourageants concernant le rôle du calcium dans la chimioprévention du cancer colique, certaines études d'intervention sur l'homme ont été entreprises.

Lipkin et Newmark (1985) ont dirigé une petite étude pilote de supplémentation en carbonate de calcium chez des sujets à haut risque de cancer colique. Un supplément oral de 1250 mg/jour de calcium élément permet un arrêt de l'hyperprolifération de l'épithélium.

Une étude d'intervention sur des patients avec adénomes fut entreprise conjointement en Israël et en Allemagne (Rozen *et al.*, 1987). La prolifération des cellules coliques se trouve réduite de 30% après traitement avec 1250 mg/jour de carbonate ou de gluconate et lactate de calcium.

Une étude plus récente conduite par Wargovich *et al.* (1990) aboutit à une réduction significative de la prolifération lors de la supplémentation chez des patients avec adénomes.

Par contre, dans une étude canadienne, Gregoire *et al.* (1989) n'ont pas montré une diminution des récives lors de la supplémentation en calcium au taux de 1200 mg/j chez des sujets ayant subi une exérèse d'un cancer du côlon.

Enfin, les suppléments de carbonate de calcium à raison de 1200 mg de calcium élément par jour ne diminuent pas la prolifération cellulaire de l'épithélium colique après une période de 8 semaines chez des patients avec des adénomes sporadiques (Bostick *et al.*, 1993).

Les divergences dans les résultats épidémiologiques peuvent être dus aux différentes sources de calcium (*tableau 8*) et d'autres facteurs de confusion (Welberg *et al.*, 1991). Ceci a conduit à rechercher chez l'animal les facteurs en cause.

Le carbonate (Behling *et al.*, 1990^b), le gluconate et le lactate (Appleton *et al.*, 1987^{a,b}; Pence & Buddingh 1988; Wargovich *et al.*, 1983) ainsi que le phosphate de calcium (Bull *et al.*, 1987^a; Lapré *et al.*, 1992) sont utilisés pour évaluer l'effet protecteur éventuel du calcium. Ainsi, le lactate de calcium est unanimement inhibiteur (Wargovich & Baer 1989) alors que le carbonate de calcium est parfois inhibiteur parfois sans effet en fonction du régime: s'il est synthétique ou non, hyperlipidique ou pauvre en lipides (Nelson *et al.*, 1987; Skrypec & Bursley 1988). Le gluconate de calcium est protecteur lorsque les rats sont nourris avec un régime hyperlipidique (Dwivedi *et al.*, 1989; Pence & Buddingh 1988).

Tableau 8: Effet de différentes formes de calcium sur la promotion des tumeurs coliques chez le rat.

Forme de calcium	Souche de rat	Effet sur la promotion	Références
Lactate	SD	-	Appleton et al. (1987 ^{a,b})
Lactate	F344	-	Wargovich et al. (1990)
Gluconate	F344	-	Pence & Buddingh (1988)
Phosphate	F344	-	Bull et al. (1987 ^{a,b})
Phosphate	Wistar	-	Laopré et al. (1992)
Carbonate	F344	0	Nelson et al. (1987)
Carbonate	F344	0	Behling et al. (1990 ^b)
Carbonate	F344	-	Skrypec (1991)

-: Diminution de l'incidence; 0: Sans effet sur l'incidence

3-3: Mécanismes de protection

3-3-1: Absorption intestinale du calcium

L'absorption intestinale du calcium suit deux voies: la première est paracellulaire et liée essentiellement au gradient de concentration; la seconde est cellulaire et suppose des mécanismes actifs.

La voie paracellulaire représente une simple diffusion et n'est donc pas saturable. Elle dépend du contenu intestinal et non pas des besoins de l'organisme. Dans les conditions alimentaires normales, on estime chez l'homme, que 16% environ du calcium est absorbé par cette voie (Meunier *et al.*, 1988). Si la charge calcique est beaucoup plus élevée, le transport insaturable peut devenir plus important, notamment dans l'iléon où pratiquement 90% de l'absorption peut être paracellulaire. Il ne faut cependant pas exagérer l'importance *physiologique* de ce transport. L'expérimentation incite à croire que la structure des jonctions serrées limite notablement l'absorption du calcium par cette voie.

Le transport actif du calcium permet d'abord sa pénétration au pôle apical de l'entérocyte par diffusion facilitée soit à travers un canal voltage-dépendant soit par l'intermédiaire d'un transporteur. Ce transfert prédomine au duodénum. Après sa pénétration, le calcium se lie à une protéine de transport, la Calcium Binding Protein (CaBP) qui permet son passage du pôle apical au pôle basal. L'extrusion du calcium vers le milieu extracellulaire implique un échange actif entre le calcium et le sodium et/ou le calcium et le magnésium.

Plusieurs théories ont été élaborées pour expliquer le mécanisme de l'effet protecteur du calcium vis-à-vis de la cancérogenèse colique. Parmi celles-ci on notera: la liaison du calcium avec les acides biliaires et les acides gras pour former des savons inertes (Newmark *et al.*, 1984); l'induction directe par le calcium de la différenciation terminale des cellules de l'épithélium colique (Buset *et al.*, 1987).

3-3-2: Hypothèse de Newmark

L'hypothèse la plus prometteuse repose sur la possibilité des ions calcium de se lier aux acides biliaires et/ou acides gras pour diminuer leur effet mitogène sur la muqueuse intestinale (Newmark *et al.*, 1984).

Le comportement des lipides vis à vis des tissus coliques dépend du pH du côlon. Quand le pH fécal dépasse le pK_a nécessaire à l'ionisation (ce qui est le cas dans un environnement basique), les lipides s'attaquent à l'intégrité de l'épithélium colique (Wargovich *et al.*, 1991) provoquant ainsi une hyperprolifération. Les acides gras et biliaires et acides gras libres sont moins solubles dans l'eau fécale, et donc moins toxiques, aux pH bas (Corpet 1989).

Le calcium est requis pour l'adhésion cellulaire au niveau du tube digestif, et la chélation de ce minéral par des composés tels que l'EDTA résulte dans la rupture des jonctions serrées et la desquamation des cellules (Donowitz & Madara 1982). Wargovich et Baer (1989) ainsi que Newmark *et al.* (1985) considèrent que l'effet des lipides ionisés dans la lumière colique est similaire à celui des chélateurs de cations divalents tels que l'EDTA. Les acides gras et biliaires sous leur forme soluble endommagent donc l'épithélium colique chez l'homme (Ammon & Phillips 1972; Ammon *et al.*, 1974) probablement par épuisement du calcium interstitiel des tissus causant un détachement des cellules de la lame basale ou par entrée dans la phase lipidique des membranes cellulaires. La désagrégation des cellules de l'épithélium colique par les effets détergents des acides biliaires ou des acides gras, se manifeste par la séquestration du calcium (Wargovich *et al.*, 1984). Des complexes de savons de calcium et d'acides gras sont alors formés. L'une des conséquences est la réduction simultanée des dommages épithéliaux et de la réponse proliférative (Bird *et al.*, 1986, Wargovich *et al.*, 1983; Wargovich *et al.*, 1988). Selon cette hypothèse, l'effet protecteur du calcium se manifeste avant qu'il ne soit absorbé par la bordure en brosse de l'intestin (Newmark *et al.*, 1984; Rafter *et al.*, 1986), bien que des preuves contraires aient été rapportées (Bruce 1987).

3-3-3: Hypothèse de Buset

D'autres mécanismes ont été avancés pour expliquer l'effet protecteur du calcium. Bresalier et Kim (1985) signalent que l'augmentation du calcium alimentaire

provoque une diminution de la 1,25-dihydroxyvitamine D et évoquent l'effet trophique de cette vitamine sur l'intestin grêle (Bikle *et al.*, 1981).

Donc, la suppression de la prolifération cellulaire par le calcium peut être due soit à la liaison des acides gras et biliaires réduisant ainsi leur effet néfaste sur les cellules de l'épithélium colique, soit au renforcement des jonctions intercellulaires, soit à une action systémique à travers le métabolisme de la vitamine D (Lubin *et al.*, 1991).

Buset *et al.* (1986) ont avancé l'hypothèse selon laquelle le calcium en quantités normales dans des régimes ordinaires, peut inhiber la prolifération des cellules de l'épithélium colique en induisant leur différenciation terminale et la limitation de leur croissance.

Les mécanismes biochimiques et moléculaires concernant les effets régulateurs du calcium sur la prolifération cellulaire ne sont pas complètement élucidés. Les concentrations du calcium intracellulaire sont étroitement contrôlés par les protéines se liant au calcium (Wargovich 1988). Le complexe calcium-calmoduline active un certain nombre d'enzymes ralentissant le processus de prolifération (Hait & Lazo 1986). Il a été reporté que les taux de calmoduline sont bas dans les cellules normales et élevés dans les cellules malignes, suggérant une relation entre le comportement cellulaire et le taux de cette protéine (Hickle *et al.*, 1983).

Des altérations du métabolisme du calcium et de la vitamine D ont été proposées comme explications possibles des variations géographiques du taux de mortalité par cancer du côlon, taux qui tend à augmenter avec la latitude et à diminuer avec l'intensité de l'ensoleillement (Garland & Garland 1980).

Pence et Buddingh (1988) ont examiné l'effet du gluconate de calcium sur la carcinogenèse du colon chez des rats nourris avec des régimes hypo- ou hyperlipidiques lors des modifications du taux de cholécalférol alimentaire. L'augmentation du taux de cholécalférol dans le régime hyperlipidique inhibe la tumorigenèse. La combinaison des deux traitements (calcium et cholécalférol) s'avère inefficace. Ces résultats indiquent que le calcium absorbé rapidement par l'effet hormonal de la vitamine D, n'a pas la possibilité de chélater les acides gras et biliaires.

Enfin, un troisième mécanisme proposé par Reddy et Wynder (1977), se base sur la modification, par le calcium et les lipides, de l'activité de la microflore intestinale.

Cependant, l'un des mécanismes n'exclue pas l'autre puisqu'on peut supposer que les savons de calcium peuvent former un substrat supplémentaire pour les bactéries du caecum (Behling *et al.*, 1990^b).

3-3-4: Conclusion

Le calcium est donc supposé réduire le risque de cancer colique en diminuant la cytotoxicité des acides gras libres et des acides biliaires, en modifiant le pH du contenu du côlon, ou en agissant comme régulateur de la

prolifération cellulaire.

La question qui demeure posée est de rechercher la meilleure source de calcium alimentaire.

L'adaptation à long terme du côlon au carbonate de calcium résulte en de profonds changements du pH fécal (vers un environnement basique), alors que les sels de calcium susceptibles d'être fermentés ou métabolisés comme le lactate ou le gluconate de calcium peuvent contribuer au maintien de l'acidité du côlon et éviter l'ionisation des lipides (Wargovich *et al.*, 1988).

4: La laminine: un marqueur tumoral

La laminine, une glycoprotéine dont le poids moléculaire peut atteindre 1000 kDa, est l'un des principaux constituants des membranes basales. L'attachement des cellules épithéliales à la membrane basale est médié par des glycoprotéines adhésives telles que la laminine ou le collagène IV (Kleinman *et al.*, 1981). Schématiquement, la laminine est une molécule cruciforme résultant de l'assemblage de trois chaînes polypeptidiques. La molécule intacte se compose de trois sous-unités d'environ 220, 250 et 450 kDa.

La laminine P₁ (LP₁) est un fragment de la laminine résistant à la pepsine (PM: 200 à 300 kDa). Elle se compose de fragments des trois chaînes et est décelée par le RIA-gnost[®] Laminine P₁.

La perte d'adhésion, résultant de l'interruption de la structure de la membrane basale, est un facteur important dans le détachement cellulaire de la tumeur primaire, et dans le développement de métastases à distance (Renkes *et al.*, 1994).

Burtin *et al.* (1972) sont les premiers à avoir montré des altérations de la distribution de la laminine dans les membranes basales d'adénocarcinomes coliques. La nature biochimique à l'origine de ces perturbations n'est pas définie. Plusieurs hypothèses sont avancées: synthèse anormale de laminine par les cellules cancéreuses, action des protéases libérées par les cellules cancéreuses ou par les cellules de l'hôte, absence de fixation des antigènes aux membranes basales, masquage des sites antigéniques par des dépôts de substances non encore identifiées (Liottat *et al.*, 1983). Un grand nombre de cellules tumorales sont capables de dégrader la laminine.

En cas de troubles accompagnés d'une hausse du taux de renouvellement des membranes basales, le dosage de laminine sérique constitue un moyen non invasif de suivre l'évolution clinique et peut avoir une valeur pronostique.

Le calcium joue également un rôle au niveau de la lame basale. Le complexe laminine-nidogène est calcium-dépendant. Le calcium est également nécessaire à la polymérisation de la laminine. On peut donc supposer que des modifications des

concentrations calciques dans le milieu puissent avoir des actions sur le taux de laminine.

Travail personnel

Cette étude a pour objectif d'évaluer le rôle protecteur du calcium alimentaire vis-à-vis de la carcinogenèse colique chimio-induite en association avec un régime hyperlipidique. Nous avons adopté le modèle rat Wistar car il a fait l'objet de plusieurs travaux réalisés au Centre de Nutrition Humaine (Nancy).

La première expérimentation permettra d'aborder le rôle initiateur de la NMU chez des rats Wistar nourris avec un régime riche en lipides insaturés (n-6). Nous aborderons également l'effet protecteur éventuel du calcium vis-à-vis de la carcinogenèse colique.

Dans la deuxième expérimentation, nous tenterons de comprendre les mécanismes par lesquels le calcium alimentaire peut protéger contre la tumorigenèse colique chez le rat Wistar.

A: 1ère expérimentation

Rôle du carbonate de calcium donné per os lors de l'induction de tumeurs coliques par la NMU en association avec un régime enrichi en acides gras n-6

1: Matériels & Méthodes

1-1: Animaux

L'étude est réalisée sur 80 rates *Wistar* âgées de 4 semaines en début d'expérimentation, pesant 65 g et maintenues dans des cages individuelles. L'animalerie présente une température de 23°C et un degré hygrométrique de 55%. Une alternance jour et nuit de 12 heures est assurée. Les animaux sont répartis de façon aléatoire en 4 lots de 20 et sont pesés une fois par semaine pendant toute la durée de l'expérimentation (36 semaines).

1-2: Régimes (tableau Ia)

Après 4 semaines d'adaptation à un régime standard, tous les animaux reçoivent une alimentation hyperlipidique contenant 24 % d'huile de tournesol composée essentiellement d'acides gras polyinsaturés n-6. Elle renferme également des phytostérols (225 mg dont 55% de β sitostérol, 7% de campestérol et 8% de stigmastérol). Cette supplémentation en lipides est réalisée aux dépens de l'amidon, la ration protéique étant équivalente par ailleurs. Deux lots reçoivent une supplémentation en calcium (1.5%) sous forme de carbonate. Les aliments proposés aux animaux sont préparés au laboratoire deux fois par semaine. Les mangeoires sont pesées tous les deux ou trois jours et la quantité ingérée est déterminée pour chaque animal.

1-3: Instillation du carcinogène (tableau Ib)

Après 4 semaines d'acclimatation, les rates sont réparties en 4 groupes. Deux groupes d'animaux reçoivent des instillations de sérum physiologique (lots 1 et 2) et les deux autres (lots 3 et 4), deux instillations intrarectales de NMU (*Nitroso-méthyl-urée*) effectuées à deux jours d'intervalle, et à 8 cm de la marge anale. La quantité de NMU totale instillée est de 5 mg, selon le protocole décrit par Sawada *et al.*, (1987).

1-4: Recueils

Les selles et les urines sont recueillies toutes les quatre semaines pendant une semaine. Les selles sont lyophilisées puis broyées et conservées ainsi que les urines à -20°C.

Les recueils sont effectués dans des cages à métabolisme selon le planning suivant:

R₁= recueil à 4 semaines (fin de la période d'adaptation et avant l'initiation chimique)

R₂= recueil à 34 semaines (2 semaines avant le sacrifice)

Tableau Ib

Répartition des lots selon les régimes et le traitement à la NMU

<i>Lots</i>	<i>n</i>	<i>% de lipides dans le régime</i>	<i>% de supplément calcique</i>	<i>NMU</i>
<i>1</i>	<i>19</i>	<i>24</i>	<i>0</i>	<i>0</i>
<i>2</i>	<i>19</i>	<i>24</i>	<i>1,50</i>	<i>0</i>
<i>3</i>	<i>19</i>	<i>24</i>	<i>0</i>	<i>+</i>
<i>4</i>	<i>20</i>	<i>24</i>	<i>1,50</i>	<i>+</i>

NMU: Deux instillations intrarectales de 2,5 mg chacune

1-5: Dosages biochimiques

1-5-1: Lipides totaux

L'extraction des lipides totaux est réalisée selon la méthode de Folch *et al.* (1957). Une masse de selles déterminée est mise en présence de 20 volumes de mélange chloroforme : méthanol (2:1). Après 30 mn d'agitation, le mélange est centrifugé pendant 10 mn à 500 g puis filtré sur filtre plissé. L'opération est renouvelée trois fois afin d'épuiser entièrement le contenu des selles en composés organiques. On ajoute alors une solution de KCl à 9‰ et on agite avec une baguette en verre. La phase aqueuse est évacuée à l'aide d'une trompe à vide. Les dernières traces d'eau sont éliminées par un filtre séparateur de phases "Whatman".

1-5-2: Stérols

L'extraction est effectuée selon la méthode décrite par D'Hollander et Chevallier (1969).

Les lipides extraits sont saponifiés par addition de KOH méthanolique 2N et chauffage à 80°C pendant 2 heures. Les stérols sont alors extraits par 5 ml d'éther de pétrole. L'extraction est renouvelée 3 fois.

L'étalon externe (5 α cholestane) est ajouté avant la dérivation des stérols. La silylation par le BSTFA-TMCS permet de rendre plus volatils les stérols en substituant l'hydrogène des groupements hydroxyles par un groupement silyl.

Le chromatographe utilisé est un "Delsi DI200" équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et connecté à un intégrateur "Shimadzu CR3A".

Conditions chromatographiques:

- Colonne capillaire (*Chrompack CP SIL 19CB*): 25 m de long et 0.32 mm de diamètre interne.
- Débit du gaz vecteur (hydrogène): 0.5 ml/mn.
- Températures: isotherme de 250°C (four); 265°C (injecteur et détecteur).

Les temps de rétentions relatifs au 5 α cholestane sont déterminés avec des standards commerciaux.

1-5-3: Calcium fécal

Incinération

Une prise d'essai de masse connue de selles (lyophilisées et broyées) est introduite dans un creuset en porcelaine et portée à 600°C dans un four à moufle pendant 8 heures.

Minéralisation

Le contenu du creuset est minéralisé par addition d'acide chlorhydrique et chauffage à 100°C jusqu'à obtention d'une solution jaunâtre.

1-5-4: Calcium urinaire

Les urines décongelées sont grossièrement filtrées sur filtre sans cendres. L'échantillon subit une deuxième filtration sur acétate de cellulose 0.2 mm.

Le dosage du calcium fécal et du calcium urinaire est réalisé avec un spectrophotomètre d'émission plasma "Beckman type Spectraspan IV".

1-5-5: pH des selles lyophilisées

100 mg de selles lyophilisées et broyées sont reprises dans 0.5 ml d'eau distillée. Un pH-mètre de surface type "Horiba" est utilisé.

1-5-6: Analyse statistique

Le test utilisé est celui de Wilcoxon permettant de comparer les variations de populations d'effectifs inférieurs à 30. Pour chaque variable on fournit:

- l'effectif avec mesure de chaque classe
- la moyenne des rangs dans chaque classe
- le degré de signification par approximation gaussienne.

Les symboles utilisés sont les suivants:

r: pour tester l'effet du régime hyperlipidique selon les recueils (R1 vs R2);

c: pour tester l'effet de la supplémentation calcique selon les différents lots (lots 1 vs 2 et lots 3 vs 4);

n: pour tester l'effet de la NMU (lots 1 vs 3 et lots 2 vs 4).

2: Résultats & Discussions

2-1: Poids corporel (figure 1)

Le poids corporel suit une évolution régulière mais accuse une diminution dans les lots (2 et 4) supplémentés en carbonate de calcium ($p \leq 0.05$) par rapport aux lots non supplémentés (1 et 3). Ceci est retrouvé dans deux autres études (Karkare *et al.*, 1990; Skrypec 1991). Par ailleurs et en accord avec les travaux utilisant la NMU (Sawada *et al.*, 1987; Tanida *et al.*, 1989), aucune influence de ce carcinogène sur l'évolution du poids n'est mise en évidence.

2-2: Evolution des ingérés, du poids des selles et du CUD apparent (tableau II).

La consommation alimentaire n'est modifiée ni par l'instauration du régime hyperlipidique ni par la NMU. Cependant, les animaux nourris aux régimes (1 et 3) ont une prise alimentaire légèrement supérieure à celle des groupes supplémentés en carbonate de calcium. Skrypec (1991), utilisant différents taux de suppléments calciques, ne montre de diminution significative des ingérés qu'après une supplémentation calcique 3 fois supérieure aux besoins recommandés.

Ni l'instauration du régime hyperlipidique, ni l'instillation à la NMU n'augmentent le poids des selles. Par contre, nous observons un accroissement important (de l'ordre de 35%) du poids des selles des animaux nourris avec les régimes 2 et 4 (supplémentés en calcium).

Concernant le coefficient d'utilisation digestive apparent (CUD_a), la supplémentation calcique paraît avoir un effet défavorable sur ce paramètre ($p \leq 0.01$).

2-3: Calcium (tableau III)

Le calcium ingéré est augmenté principalement par la supplémentation calcique ($p \leq 0.01$). Cette augmentation, bien que très importante (de l'ordre de 55 %), ne reflète pas la composition du régime dont le taux de calcium supplémentaire est de 150%. Le calcium excrété dans les selles est augmenté non seulement par effet de la supplémentation calcique ($p \leq 0.001$), mais également par l'instauration du régime hyperlipidique ($p \leq 0.05$). Ceci est probablement le résultat de la complexation du calcium par les lipides entraînant ainsi une diminution de l'absorption de ce minéral. Cette absorption est par ailleurs plus importante dans les lots supplémentés ($p \leq 0.001$).

Figure 1 : Evolution pondérale hebdomadaire

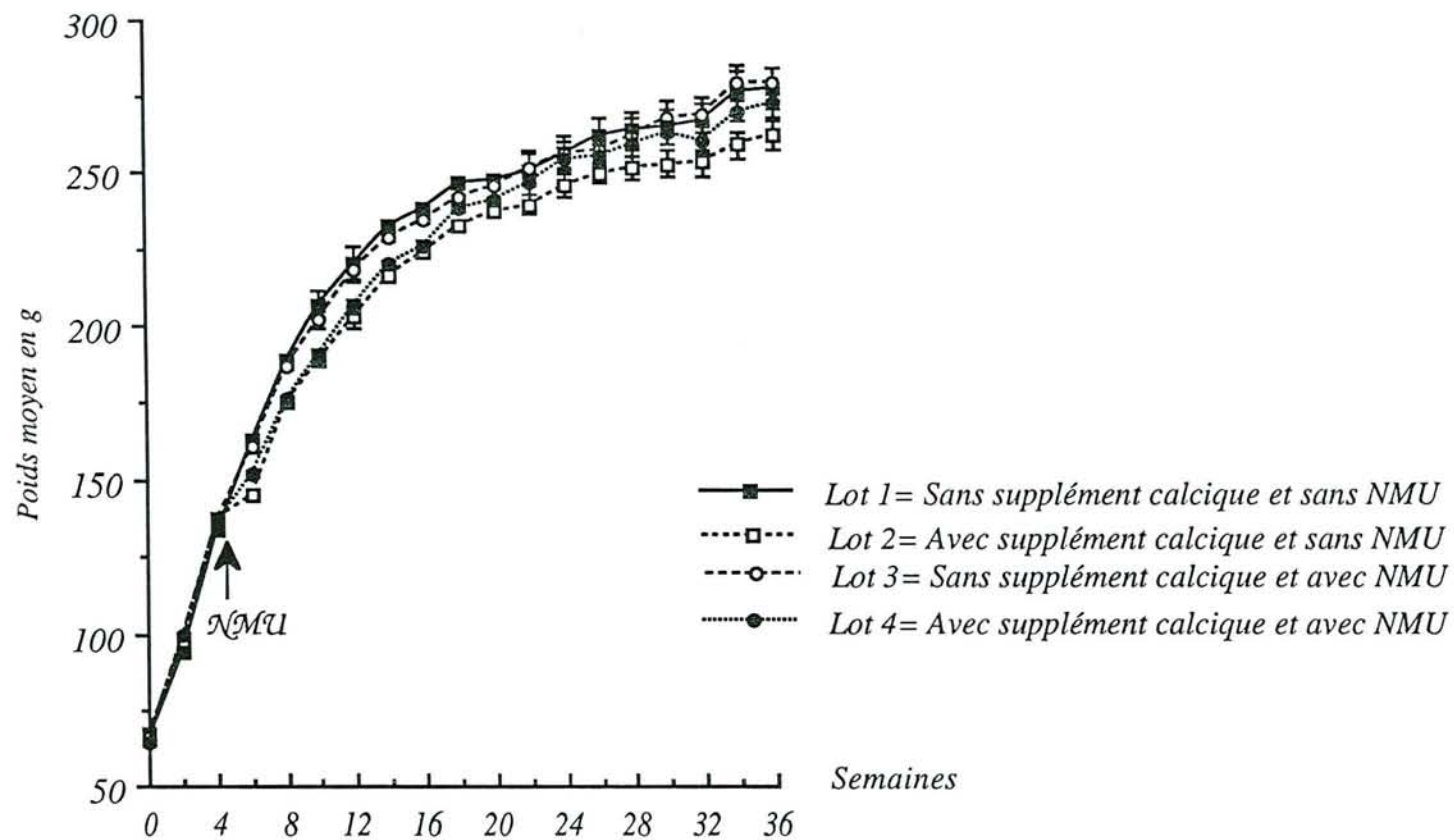


Tableau II

Evolution de la quantité d'aliments ingérés, du poids des selles lyophilisées en g/j (moy±sem) et CUDa= (I-S).100/(I)

Semaines	n	Ingérés (I)	Poids des selles (S)	CUDa= (I-S).100/(I)
4				
Lots	1 19	13,5 ± 4,1	1,7 ± 0,3	87,7
	2 19	12,0 ± 3,7	1,7 ± 0,4	85,8
	3 19	10,9 ± 1,6	1,6 ± 0,3	84,9
	4 20	11,4 ± 3,3	1,6 ± 0,3	85,8
8				
Lots	1 19	13,5 ± 3,0	1,6 ± 0,5	87,8
	2 19	12,6 ± 2,1	2,1 ± 0,6	83,1
	3 19	11,6 ± 2,8	1,4 ± 0,4	87,6
	4 20	11,3 ± 2,4	2,2 ± 0,7	80,6
26				
Lots	1 19	13,0 ± 2,7	1,7 ± 0,5	87,0
	2 19	11,0 ± 2,7	2,5 ± 0,7	77,7
	3 19	10,5 ± 4,2	1,6 ± 0,4	84,7
	4 20	9,5 ± 2,4	2,6 ± 0,8	72,3
34				
Lots	1 19	12,9 ± 3,0	1,7 ± 0,5	86,6
	2 19	11,4 ± 3,0	2,5 ± 0,6 ccc	78,0 cc
	3 19	11,8 ± 3,2 c	1,5 ± 0,5	87,0
	4 20	9,8 ± 3,3	2,5 ± 0,7 ccc	74,9 cc

Statistiques:

Test de Wilcoxon

r

c { $p \leq 0,05$

n

rr

cc { $p \leq 0,01$

nn

rrr

ccc { $p \leq 0,001$

nnn

Abréviations

r: comparaison entre les semaines 4 et 34 (effet temps)

c: comparaison entre les lots 1-2 et 3-4 (effet calcium)

n: comparaison entre les lots 1-3 et 2-4 (effet NMU)

Lots:

1: régime sans supplément calcique

2: régime supplémenté en calcium

3: régime sans supplément calcique et animaux instillés avec la NMU

4: régime supplémenté en calcium et animaux instillés avec la NMU

Semaines:

4: fin adaptation et avant initiation

34: avant sacrifice

Tableau III

Evolution du calcium ingéré, fécal, urinaire, absorbé et retenu en mg/j (moy±sem) à 4, 8, 26 et 34 semaines expérimentales

Semaines	n	Ingéré (I)	Fécal (F)	Urinaire (U)	Absorbé= (I- F)	Retenu= (I-F-U)
4						
Lots	1 19	135,1 ± 24,1	53,4 ± 2,4	2,2 ± 0,9	81,7 ± 24,2	79,6 ± 24,3
	2 19	119,7 ± 23,7	56,5 ± 2,5	2,0 ± 0,7	63,2 ± 23,8	61,2 ± 23,8
	3 19	109,0 ± 21,5	61,7 ± 2,5	1,3 ± 0,6	47,3 ± 21,6	46,1 ± 21,7
	4 20	113,6 ± 33,3	48,7 ± 2,6	1,7 ± 0,8	64,9 ± 33,4	63,2 ± 33,4
8						
Lots	1 19	135,0 ± 26,3	70,2 ± 2,2	1,5 ± 0,7	64,8 ± 26,4	63,3 ± 26,4
	2 19	315,0 ± 37,8	133,0 ± 4,3	2,9 ± 0,7	182,0 ± 38,0	179,1 ± 38,0
	3 19	116,0 ± 24,1	57,1 ± 2,1	1,3 ± 0,7	58,9 ± 24,2	57,6 ± 24,2
	4 20	282,1 ± 44,2	154,0 ± 5,5	2,7 ± 0,9	128,2 ± 44,5	125,5 ± 44,5
26						
Lots	1 19	130,1 ± 24,6	73,1 ± 2,0	1,9 ± 0,7	57,0 ± 24,7	55,1 ± 24,7
	2 19	275,7 ± 30,8	168,5 ± 4,5	3,3 ± 1,0	107,2 ± 31,1	103,9 ± 31,2
	3 19	104,6 ± 17,7	62,7 ± 2,0	1,6 ± 0,6	41,9 ± 17,8	40,3 ± 17,9
	4 20	236,4 ± 44,5	171,4 ± 3,7	4,0 ± 0,9	65,0 ± 44,7	61,0 ± 44,7
34						
Lots	1 19	129,4 ± 22,7	71,6 ± 2,9	r	57,8 ± 22,9	r
	2 19	284,6 ± 29,3	183,7 ± 3,0	cc	100,9 ± 29,5	ccc
	3 19	118,4 ± 25,8	68,4 ± 1,3		50,0 ± 25,8	
	4 20	246,1 ± 44,9	174,1 ± 4,2	cc	72,0 ± 45,1	ccc

Statistiques:

Test de Wilcoxon

r
c { p ≤ 0,05
n

rr
cc { p ≤ 0,01
nn

rrr
ccc { p ≤ 0,001
mnn

Abréviations

r: comparaison entre les semaines 4 et 34 (effet temps)
c: comparaison entre les lots 1-2 et 3-4 (effet calcium)
n: comparaison entre les lots 1-3 et 2-4 (effet NMU)

Lots:

1: régime sans supplément calcique
2: régime supplémenté en calcium
3: régime sans supplément calcique et animaux instillés avec la NMU
4: régime supplémenté en calcium et animaux instillés avec la NMU

Semaines:

4: fin adaptation et avant initiation
34: avant sacrifice

Le calcium urinaire ne variant pas, le calcium retenu suit la même évolution que celui absorbé.

2-4: pH des selles lyophilisées (tableau IV)

Le régime hyperlipidique et l'instillation avec la NMU ne modifient pas significativement l'acidité des selles. Le pH des selles est augmenté de 0.8 unité en moyenne après supplémentation en carbonate de calcium ($p \leq 0.001$). Cette alcalinisation des selles est observée également par Behling *et al.* (1990) qui l'expliquent par la complexation des acides (gras et biliaries) par le calcium, formant ainsi des savons inertes.

2-5: Lipides totaux (tableau V a)

Le régime hyperlipidique se traduit par une augmentation significative ($p \leq 0.01$) de la concentration (35%) et de la quantité (47%) des lipides fécaux. Ces augmentations sont très inférieures aux supplémentations des régimes dont la surcharge en lipides représente 300%.

De même, le carbonate de calcium accroît fortement, de l'ordre de 50%, l'excrétion des lipides ($p \leq 0.001$). Ce résultat est en accord avec les études cliniques et expérimentales (Behling *et al.*, 1990).

2-6: Stérols (tableaux V b et V c)

2-6-1: Stérols totaux fécaux

La concentration et la quantité des stérols totaux sont significativement augmentées ($p \leq 0.05$) sous l'effet du régime hyperlipidique.

Les instillations avec la NMU ne semblent pas modifier de façon significative ces paramètres fécaux. Par contre, sous l'effet de la supplémentation calcique, on observe un accroissement de leur concentration (30%) et surtout de leur quantité (50%). Ceci est probablement dû à l'augmentation du poids des selles dans les régimes supplémentés en carbonate de calcium. Behling *et al.* (1990^a) rapportent également une augmentation des quantités de stérols totaux en utilisant la même forme de calcium et des lipides saturés. Par contre, Skrypec (1991) observe une diminution des concentrations de ces stérols sous l'effet du carbonate de calcium.

2-6-2: Stérols animaux (tableau V b)

La concentration et la quantité des stérols neutres animaux sont insensibles à la surcharge lipidique et à l'instillation du carcinogène. Cependant, la supplémentation calcique augmente particulièrement les quantités de ces stérols ($p \leq 0.001$).

Les rats utilisés sont des "IOPS" (Indemnes d'organismes pathogènes spécifiques), ce qui signifie que leur flore microbienne digestive n'est pas une flore de rat. Cette microflore n'a pas toutes les capacités fermentaires d'une flore de rat conventionnel. En conséquence, la transformation microbienne du cholestérol en coprostanol est limitée. Par ailleurs, l'addition de calcium au régime stimule l'excrétion fécale des stérols (50%), mais diminue aussi la transformation microbienne du cholestérol de 50%.

2-6-3: Phytostérols (tableau V c)

L'adoption du régime hyperlipidique (relativement riche en phytostérols) s'accompagne d'une augmentation significative ($p \leq 0.01$) de ces composés et en particulier du β sitostérol.

Le calcium accroît également leur quantité dans les selles mais non leur concentration fécale. Dans cette étude, nous n'avons pas tenu compte du dosage du β coprostanol.

Aucune différence significative n'est observée dans la répartition des phytostérols.

2-7: Anatomie pathologique (tableau VI)

2-7-1: Lésions macroscopiques

11 tumeurs dont 8 lésions polypoïdes ont été observées macroscopiquement .

2-7-2: Lésions microscopiques

- carcinomes: l'observation microscopique a révélé 1 adénocarcinome de type *lieberkühnien* sans envahissement de la *muscularis mucosae* et 1 sarcome fibromeux de la paroi colique ayant entraîné la mort de l'animal peu avant la fin de l'expérimentation. Ce cas n'est pas pris en compte dans l'analyse des résultats.

- dysplasies: les résultats de l'anatomie pathologique indiquent 16 lésions de type dysplasique chez 12 animaux (lots 3 et 4). Ces lésions constituent des états précancéreux de 0.5 mm à 0.5 cm de diamètre.

2-7-3: Répartition des tumeurs (tableau VI)

Les animaux ne recevant pas de NMU ne développent pas de tumeurs. Toutes les lésions observées se trouvent dans les groupes 3 et 4. L'analyse statistique ne met en évidence aucune différence significative dans la survenue des polypes dysplasiques ou de cancer entre les lots 3 et 4. Ce résultat est également rapporté par Behling *et al.* (1990^{a,b}) en utilisant la même forme de calcium.

Tableau IV
 Evolution du pH des selles lyophilisées à 4 et 34 semaines (moy±sem)

Semaines		n		pH	
4	Lots	1	19	moy	sem
		2	19	7,42	± 0,04
		3	19	7,50	± 0,04
		4	20	7,50	± 0,02
34	Lots	1	19	7,48	± 0,03
		2	19	7,72	± 0,03
		3	19	8,43	± 0,05
		4	20	7,81	± 0,04
		4	20	8,67	± 0,02 ccc

Statistiques:

Test de Wilcoxon

r

c { $p \leq 0,05$

n

rr

cc { $p \leq 0,01$

nn

rrr

ccc { $p \leq 0,001$

nnn

Abréviations

r: comparaison entre les semaines 4 et 34 (effet temps)

c: comparaison entre les lots 1-2 et 3-4 (effet calcium)

n: comparaison entre les lots 1-3 et 2-4 (effet NMU)

Lots:

1: régime sans supplément calcique

2: régime supplémenté en de calcium

3: régime sans supplément calcique et animaux instillés avec la NMU

4: régime supplémenté en calcium et animaux instillés avec la NMU

Semaines:

4: fin adaptation et avant initiation

34: avant sacrifice

Tableau Va

Evolution de la concentration en mg/g et de la quantité en mg/j des lipides totaux des selles à 4 et 34 semaines (moy±sem)

Semaines		n	Concentration	Quantité
4			(mg/g)	(mg/j)
Lots	1	19	30,6 ± 4,6	50,7 ± 4,6
	2	20	45,0 ± 4,9	76,5 ± 4,9
	3	20	43,6 ± 4,5	71,7 ± 4,5
	4	20	40,2 ± 3,5	64,8 ± 3,5
34				
Lots	1	19	47,0 ± 6,4 rr	81,2 ± 6,5 rr
	2	20	61,2 ± 10,7 cc	153,6 ± 10,7 ccc
	3	20	58,5 ± 3,1	89,8 ± 3,1
	4	20	73,6 ± 9,6 cc	181,5 ± 9,6 ccc

Statistiques:

Test de Wilcoxon

r

rr

rrr

c { $p \leq 0,05$

cc { $p \leq 0,01$

ccc { $p \leq 0,001$

n

nn

nnn

Abréviations

r: comparaison entre les semaines 4 et 34 (effet temps)

c: comparaison entre les lots 1-2 et 3-4 (effet calcium)

n: comparaison entre les lots 1-3 et 2-4 (effet NMU)

Lots:

1: régime sans supplément calcique

2: régime supplémenté en calcium

3: régime sans supplément calcique et animaux instillés avec la NMU

4: régime supplémenté en calcium et animaux instillés avec la NMU

Semaines:

4: fin adaptation et avant initiation

34: avant sacrifice

Tableau Vb

Evolution des concentration en mg/g et quantité en mg/j des stérols fécaux (moy±sem), et répartition en % des stérols neutres animaux

Semaines	n	Stérols neutres totaux		Stérols animaux		Cholestérol	Coprostanol		
		(mg/g)	(mg/j)	(mg/g)	(mg/j)	(%)	(%)		
4	Lots	1	19	3,39 ± 0,14	5,63 ± 0,32	1,87 ± 0,12	3,13 ± 0,23	82,35 rr	17,65
		2	19	4,20 ± 0,28	7,12 ± 0,51	2,37 ± 0,21	4,00 ± 0,31	81,43	18,57
		3	19	3,39 ± 0,21	5,60 ± 0,34	1,89 ± 0,17	3,12 ± 0,26	83,60	16,40
		4	20	3,71 ± 0,17	5,96 ± 0,28	2,07 ± 0,24	3,32 ± 0,27	83,57	16,43
34	Lots	1	19	4,39 ± 0,19 r	7,90 ± 0,67 r	2,10 ± 0,19	3,88 ± 0,13	60,95	39,05 rr cc
		2	19	6,14 ± 0,30 cc	15,20 ± 0,89 ccc	3,65 ± 0,28 c	8,96 ± 0,41 ccc	79,45 cc	20,55
		3	19	4,69 ± 0,26	8,31 ± 0,35	3,07 ± 0,30	4,54 ± 0,26 r	51,47	48,53 ccc
		4	20	6,76 ± 0,76	16,45 ± 0,95 ccc	3,82 ± 0,19	9,27 ± 0,48 ccc	82,47 ccc	17,54

Statistiques:

Test de Wilcoxon

r
c { p ≤ 0,05
n

rr
cc { p ≤ 0,01
nn

rrr
ccc { p ≤ 0,001
nnn

Abréviations

r: comparaison entre les semaines 4 et 34 (effet temps)
c: comparaison entre les lots 1-2 et 3-4 (effet calcium)
n: comparaison entre les lots 1-3 et 2-4 (effet NMU)

Lots:

- 1: régime sans supplément calcique
- 2: régime supplémenté en calcium
- 3: régime sans supplément calcique et animaux instillés avec la NMU
- 4: régime supplémenté en calcium et animaux instillés avec la NMU

Semaines:

- 4: fin adaptation et avant initiation
- 34: avant sacrifice

Tableau Vc

Evolution des concentrations en mg/g et des quantités en mg/j des phytostérols fécaux (moy±sem) et leur répartition en %

Semaines	n	Phytostérols (mg/g)	Phytostérols (mg/j)	β Sitostérol %	Campestérol %	Stigmastérol %	
4	Lots	1 19	1,60 ± 0,06	2,66 ± 0,02	78,75	13,75	7,50
		2 19	1,81 ± 0,10	3,08 ± 0,04	80,11	12,15	7,73
		3 19	1,55 ± 0,07	2,55 ± 0,02	78,71	14,19	7,10
		4 20	1,68 ± 0,05	2,71 ± 0,02	77,98	14,29	7,74
34	Lots	1 19	2,30 ± 0,10	3,98 ± 0,05	81,74	10,00	8,26
		2 19	2,53 ± 0,16	6,35 ± 0,10	80,24	11,46	8,30
		3 19	2,48 ± 0,09	3,81 ± 0,05	81,85	10,89	7,26
		4 20	2,94 ± 0,24	7,25 ± 0,17	82,99	8,84	8,16

Statistiques:

Test de Wilcoxon

r rr rrr
 $c \left\{ \begin{array}{l} p \leq 0,05 \\ n \end{array} \right.$ $cc \left\{ \begin{array}{l} p \leq 0,01 \\ nn \end{array} \right.$ $ccc \left\{ \begin{array}{l} p \leq 0,001 \\ nnn \end{array} \right.$

Abréviations

r: comparaison entre les semaines 4 et 34 (effet temps)
c: comparaison entre les lots 1-2 et 3-4 (effet calcium)
n: comparaison entre les lots 1-3 et 2-4 (effet NMU)

Lots:

- 1: régime sans supplément calcique
- 2: régime supplémenté en calcium
- 3: régime sans supplément calcique et animaux instillés avec la NMU
- 4: régime supplémenté en calcium et animaux instillés avec la NMU

Semaines:

- 4: fin adaptation et avant initiation
- 34: avant sacrifice

Tableau VI
Proportion d'animaux atteints de tumeurs (%) et nombre de tumeurs par rat atteint

<i>Lots</i>	<i>n</i>	<i>NMU</i>	<i>CaCO3</i>	<i>% d'animaux avec tumeurs</i>	<i>nombre de tumeurs par rat atteint</i>	<i>Localisation</i>
1	19	-	-	0	0	-
2	19	-	+	0	0	-
3	19	+	-	31	1,17	10 derniers cm
4	20	+	+	30	1,33	10 derniers cm

Lots:

- 1: régime sans supplément calcique et animaux non instillés avec la NMU
- 2: régime supplémenté en calcium et animaux non instillés avec la NMU
- 3: régime sans supplément calcique et animaux instillés avec la NMU
- 4: régime supplémenté en calcium et animaux instillés avec la NMU

3: Conclusions

3-1: Rôle de la NMU

Les cancérogènes chimiques représentent actuellement le moyen le plus utilisé pour induire des cancers coliques chez l'animal de laboratoire. Dans notre expérimentation, nous avons dénombré 30% de rats porteurs de tumeurs. Cette proportion est plus faible par rapport à celle rapportée par la littérature.

L'initiation étant une relation dose/effet, la quantité de carcinogène à laquelle sont exposés les animaux affecte l'incidence des tumeurs. Avec une dose de 4 mg, l'incidence théorique serait de 60% de tumeurs après six mois; ces tumeurs étant des adénocarcinomes développés à partir de lésions dysplasiques (Martin 1982).

Cependant, les résultats utilisant la NMU sont très variables comme l'indique le résumé des travaux utilisant la NMU pour l'initiation des cancer coliques chez le rat (tableau 9).

Tableau 9 : Résultats d'anatomie de quelques travaux utilisant la NMU

Références	Dose	tumeurs	adénomes
Sawada et al. (1987)	2.5 mg x 2	88%	60%
Kawaura et al. (1990)	1 mg/semaine x 40	15%	57%
Oda et al. (1990)	2 mg x 5	31%	71%

3-2: Influence du carbonate de calcium

La supplémentation calcique sous forme de carbonate ne semble pas influencer directement la tumorigenèse puisque nous observons le même nombre de tumeurs chez les animaux supplémentés ou non en CaCO₃.

La quantité de stérols (cholestérol et coprostanol) dans le lot 4 est deux fois plus grande que dans le lot 3. Or on trouve le même nombre de tumeurs dans ces deux lots. Il ne semble donc pas que l'augmentation des quantités fécales de cholestérol et dérivés soit associée à l'accroissement du nombre de tumeurs. Cependant, dans les groupes supplémentés en carbonate de calcium, la quantité et la concentration des fèces en cholestérol et ses dérivés microbiens sont beaucoup plus élevées que dans les groupes non supplémentés. Ceci devrait selon Cruse *et al.* (1979) accroître le nombre de tumeurs. Or nous observons que le CaCO₃ empêche la dégradation microbienne du cholestérol. Il est vraisemblable que la diminution des concentrations et des quantités de stérols microbiens soient un des facteurs de protection.

En conséquence, dans cette expérimentation, quelques points importants sont mis en évidence :

- la NMU est un carcinogène direct induisant des tumeurs dont le nombre dépend des doses instillées et probablement de la souche et du sexe du rat;
- les acides gras n-6 présents dans le régime hyperlipidique ne sont pas des promoteurs très actifs dans le modèle précis que nous avons adopté (rat Wistar femelle, NMU);
- le carbonate de calcium ne semble pas influencer directement la tumorigenèse, bien qu'il diminue fortement la dégradation microbienne du cholestérol.

Pour améliorer ce modèle de carcinogenèse, nous avons apporté quelques modifications au protocole expérimental. Une deuxième expérimentation est entreprise, utilisant des rats mâles Wistar, un régime enrichi en lipides saturés et trois sels de calcium (carbonate, lactate et gluconate).

B: 2ème expérimentation

Rôle de trois différents sels de calcium données per os lors de l'induction de tumeurs coliques par la NMU en association avec un régime enrichi en acides gras saturés

Tableau VII
Composition des régimes standard et expérimentaux (g/100g)

<i>Ingrédients</i>	<i>Régime standard (Adaptation)</i>	<i>Régime 1 Sans supplément calcique</i>	<i>Régime 2 Supplément: carbonate de calcium</i>	<i>Régime 3 Supplément: lactate de calcium</i>	<i>Régime 4 Supplément: gluconate de calcium</i>
<i>Caséine</i>	12,00	12,00	12,00	12,00	12,00
<i>Amidon</i>	63,00	47,00	43,25	35,44	30,20
<i>Huile de tournesol</i>	8,00	-	-	-	-
<i>Huile de noix de coco hydrogénée</i>	-	23,50	23,50	23,50	23,50
<i>Huile de pépin de raisin</i>	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
<i>Cellulose</i>	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
<i>Mélange minéral*</i>	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
<i>Mélange vitaminique**</i>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
<i>Carbonate de calcium</i>	-	-	3,75	-	-
<i>Lactate de calcium</i>	-	-	-	11,50	-
<i>Gluconate de calcium</i>	-	-	-	-	16,80

*: Mélange minéral (U.A.R. 205 b) (mg/g): Ca (100), P (77.5), K (60), Na (40), Mg (10), Fe (3),
Mn (0.8), Zn (0.45), Cu (0.125), I (0.0049), Co (0.0009).

** : Mélange vitaminique (U.A.R. 200).

1: Matériels & Méthodes

1-1: Animaux et régimes (tableau VII)

120 rats *Wistar* mâles pris au sevrage (Iffa-Credo, France) pesant 68 à 88 g, sont mis individuellement, dans des cages individuelles. Dans l'animalerie, toutes les conditions optimales sont réunies: température (22-24°C); Humidité relative (55%); cycle jour et nuit de 12h.

Après 4 semaines d'adaptation (régime standard à 8% de lipides), les animaux sont répartis au hasard et affectés à l'un des 4 régimes (tableau VII).

Les régimes sont formulés à partir de produits purifiés (U.A.R., France). La supplémentation lipidique (23.5%) est réalisée par l'huile de noix de coco hydrogénée provenant du commerce (*Végétaline*). Cette huile est composée essentiellement d'acides gras saturés à chaînes longue et moyenne: C10 (6%); C12 (48%); C14 (20%); C16 (12%) et C18 (15%). Elle contient également 81mg de phytostérols /100 g dont 55% de β sitostérol, 15% de stigmastérol et 20% de campestérol. 0.5% d'huile de pépins de raisin sont ajoutés à tous les régimes pour assurer la couverture des besoins en acides gras essentiels. L'apport de lactate par le lactate de calcium et du gluconate par le gluconate de calcium est compensé par une diminution de l'amidon. Pour avoir des régimes isoénergétiques, 1.1 g sont ajoutés pour remplacer chaque gramme d'amidon.

Parmi les 4 groupes de rats, 3 reçoivent un supplément calcique à raison de 1.5% de calcium élément soit sous forme de carbonate (Merck; Allemagne), de lactate (Aldrich; France) ou de gluconate (Merck; Allemagne).

L'alimentation comme l'eau de boisson (eau distillée) sont données *ad libitum* durant toute l'expérimentation.

La consommation alimentaire ainsi que le poids corporel sont évalués hebdomadairement.

10 rats *Wistar* (groupe contrôle), maintenus avec le régime standard pendant toute la durée de l'expérimentation, serviront à évaluer le taux de référence de la laminine sérique.

1-2: Instillation du carcinogène

Après 4 semaines d'adaptation, tous les animaux sont instillés selon le protocole cité dans le § 1-3 de la première expérimentation.

1-3: Recueils et prélèvements

20 rats de chaque lot sont placés dans des cages métaboliques afin de recueillir

leurs *excreta*. Les selles et les urines sont recueillies pour chaque rat par pool d'une semaine en suivant le protocole suivant:

- 1er recueil à 4 semaines (à l'issue de la période d'adaptation et avant l'instillation du carcinogène);
- 2ème recueil à 8 semaines;
- 3ème recueil à 26 semaines (avant le premier sacrifice);
- 4ème recueil à 32 semaines (avant le second sacrifice).

Les selles sont pesées avant et après 48 h de lyophilisation, ce qui permet de calculer leur poids sec et le pourcentage d'humidité. Les selles sont ensuite broyées et maintenues à -20°C. Les urines sont immédiatement congelées à -20 °C.

Les prélèvements sanguins sont effectués sur tous les animaux à 4, 8, 26 et 32 semaines, par ponction de la veine caudale, après brève anesthésie à l'éther.

1-4: pH des selles lyophilisées

Le pH des selles est mesuré comme lors de la première expérimentation à l'aide du pH-mètre de surface type "Horiba" (cf. § 1-5-5 de la première expérimentation).

1-5: Calcium fécal et urinaire

Ces paramètres sont quantifiés selon la procédure décrite dans la première expérimentation dans les § 1-5-3 et 1-5-4.

1-6: Lipides totaux

Après extraction selon la méthode de Folch *et al.* (1957) détaillée précédemment (cf. § 1-5-1), les lipides sont quantifiés par pesée.

1-7: Acides gras

La méthode utilisée est celle décrite par Lepage et Roy (1986) que nous avons adaptée pour quantifier simultanément les acides gras et les stérols fécaux.

Méthylation

Dans un tube à essai, une masse déterminée (200 mg) de selles lyophilisées et broyées est mise en présence d'un agent méthylant (HCl méthanolique) et d'un solvant organique (benzène). Des standards internes sont ajoutés pour calculer le rendement final: le C:17 pour les acides gras et dihydrocholestérol pour les stérols. La méthylation se fait à 80°C pendant 2 heures. Après refroidissement dans un bain de glace, 5 ml de KCl à 9 g/l sont additionnés. Deux extractions à l'éther éthylique et une troisième au chloroforme-méthanol (2:1) sont effectuées. Les phases organiques sont rassemblées et après évaporation sous azote, les acides gras sont séparés des stérols par

chromatographie sur couche mince *Si 60* dans un solvant hexane-éther (7:3). Une révélation à la primuline permet de visualiser les différents composés et de les éluer soit avec de l'hexane-éther (1:1) pour les acides gras, soit avec de l'éther de pétrole pour les stérols.

Analyse chromatographique

Après évaporation, les acides gras sont repris par de l'hexane et injectés dans un chromatographe en phase gazeuse (*VARIAN 3400*) couplé à un enregistreur (*SHIMADZU CR 3a*). L'identification et la quantification sont réalisées à l'aide de standards commerciaux ou d'huile de composition connue (*tableau 10*).

Tableau 10: Temps de rétention relatif (RRT) au C18:0, de différents acides gras méthylés

<i>Acides gras</i>	<i>RRT</i>	<i>Acides gras</i>	<i>RRT</i>
<i>C12:0</i>	<i>0.15</i>	<i>C20: 1n-7</i>	<i>1.79</i>
<i>C14:0</i>	<i>0.27</i>	<i>C20: 2n-9</i>	<i>1.89</i>
<i>C14: 1n-9</i>	<i>0.30</i>	<i>C20: 2n-6</i>	<i>1.95</i>
<i>C16:0</i>	<i>0.54</i>	<i>C20: 3n-9</i>	<i>2.02</i>
<i>C16: 1n-9</i>	<i>0.58</i>	<i>C20: 3n-6</i>	<i>2.08</i>
<i>C16: 1n-7</i>	<i>0.61</i>	<i>C20: 3n-3</i>	<i>2.22</i>
<i>C17:0</i>	<i>0.75</i>	<i>C20: 4n-6</i>	<i>2.13</i>
<i>C18:0</i>	<i>1.00</i>	<i>C20: 4n-3</i>	<i>2.32</i>
<i>C18: 1n-9</i>	<i>1.04</i>	<i>C20: 5n-3</i>	<i>2.40</i>
<i>C18: 1n-7</i>	<i>1.06</i>	<i>C22:0</i>	<i>2.60</i>
<i>C18: 2n-6</i>	<i>1.16</i>	<i>C22: 1n-11</i>	<i>2.61</i>
<i>C18: 3n-6</i>	<i>1.22</i>	<i>C22: 1n-9</i>	<i>2.63</i>
<i>C18: 3n-3</i>	<i>1.35</i>	<i>C22: 4n-6</i>	<i>3.16</i>
<i>C18: 4n-3</i>	<i>1.46</i>	<i>C22: 5n-6</i>	<i>3.35</i>
<i>C20:0</i>	<i>1.69</i>	<i>C22: 5n-3</i>	<i>3.53</i>
<i>C20: 1n-11</i>	<i>1.73</i>	<i>C22: 6n-3</i>	<i>3.71</i>
<i>C20: 1n-9</i>	<i>1.75</i>	<i>C24:0</i>	<i>3.77</i>

Conditions chromatographiques:

Colonne capillaire "Chrompack CP-WAX 52 CB" de 25 m de long et 0.32 mm de diamètre;

Températures: four (165-180°C; 2°C/mn), injecteur et détecteur (200°C);

Gaz vecteur: hydrogène.

1-8: Stérols

Après évaporation de l'extrait, les stérols sont silylés dans du BSTFA -TMCS pendant 30 mn à 70°C puis injectés dans un chromatographe "Delsi DI200". Les temps de rétention relatifs au 5 α cholestane sont présentés dans le *tableau 11*. Les stérols dont les standards ne sont pas commercialisés ont été identifiés par spectrophotométrie de masse.

Tableau 11: Temps de rétention relatif (RRT) au 5 α cholestane des stérols neutres silylés

Stérols neutres	RRT
Coprostanol: 5 β -cholestan-3 β -ol	1.58
Cholestérol: Cholest-5-ene-3 β -ol	2.03
Dihydroxycholestérol: 5 α -cholestane-3 β -ol	2.08
Lathostérol: 3 β -hydroxy-5 α ,7-cholestene	2.35
Copro β sitostérol: 24 α -éthyl-5 β -cholestane-3 β -ol	2.49
Campestérol: 24 α -méthyl--cholest-5-ene-3 β -ol	2.63
Stigmastérol: 3 β -hydroxy-24-éthyl-5,22, cholestadiene	2.82
β Sitostérol: 24 α -éthyl-cholest-5-ene-3 β -ol	3.23

Conditions chromatographiques:

- Colonne (Chrompack CP SIL 19CB) de 25 m de long; 0.32 mm de diamètre interne.
- Températures: four (isotherme de 250°C); injecteur et détecteur (265°C)
- Débit du gaz vecteur (hydrogène): 2ml/mn.

1-9: Acides biliaires

Extraction et séparation

100 mg de selles lyophilisées sont hydrolysés selon la technique modifiée de Grundy *et al.* (1965): 3 heures d'hydrolyse alcaline (0.8 ml de NaOH 10 N) à 120°C en milieu éthanolique (3.2 ml). Pour calculer les rendements, et à défaut de standard marqué, l'acide nordéoxycholique (NDCA) est pris comme étalon interne. Après arrêt de l'hydrolyse alcaline par 5 ml d'eau distillée, les lipides neutres sont éliminés par une extraction à l'éther de pétrole.

L'acidification à pH 1.5 permet une solubilisation des acides biliaires qui sont alors extraits par l'éther éthylique (3 x 5 ml) et conservés à 4°C dans du méthanol.

Dérivations

Les acides biliaires sont méthylés par le diazométhane dans un milieu méthanolique et en présence de diméthoxypropane pour éliminer toute trace d'eau.

La silylation des groupes hydroxyles des acides biliaires est réalisée par le BSTFA et le Dériva-sil (BSTFA/TMCS/TSIM/Pyridine). Elle consiste à fixer un groupe triméthylsilyl sur un hydroxyle. Elle est effectuée en présence de pyridine qui agit comme catalyseur en piégeant l'acide chlorhydrique formé sous forme de chlorure de pyridinium.

Analyse chromatographique

Les acides biliaires méthylés et silylés sont ensuite séparés et quantifiés par chromatographie en phase gazeuse. Un standard externe le 5 α cholestane permet de calculer facteur de réponse pour chaque acide biliaire. Le chromatographe utilisé est un "DELSI DI200" équipé d'un détecteur à ionisation de flamme couplé à un enregistreur "SHIMADZU CR-3A".

Le temps de réponse relatif au 5 α cholestane est indiqué dans le *tableau 12* qui résume ces paramètres obtenus avec différents acides biliaires standards.

L'acide 3 α cétocholanoïque est identifié par une double chromatographie avant et après hydrogénation des acides biliaires méthylés par le borohydrure de sodium, l'hydrogénation donnant de l'acide lithocholique

Tableau 12: Temps de rétention relatif (RRT) au 5 α cholestane de différents acides biliaires méthylés et silylés

Acides biliaires	RRT
Acide Nordéoxycholique (NDCA): acide 3 α 12 α dihydroxycholanoïque	2.21
Acide Lithocholique (LCA): acide 3 α monohydroxycholanoïque	2.71
Acide Déoxycholique (DCA): acide 3 α 12 α dihydroxycholanoïque	3.05
Acide Cholique (CA): acide 3 α 7 α 12 α trihydroxycholanoïque	3.15
Acide Chénodéoxycholique (CDCA): acide 3 α 7 α dihydroxycholanoïque	3.27
Acide Murocholique (Muro): acide 3 α 6 β dihydroxycholanoïque	3.29
Acide Hyodéoxycholique (HDCA): acide 3 α 6 α dihydroxycholanoïque	3.60
Acide Ursocholique (UCA): Acide 3 α 7 β 12 α trihydroxycholanoïque	3.71
Acide Ursodéoxycholique (UDCA): acide 3 α 7 β dihydroxycholanoïque	3.80
Acide Hyocholique (HCA): acide 3 α 6 α 7 α trihydroxycholanoïque	4.18
Acide β Muricholique (β Muri): acide 3 α 6 β 7 β trihydroxycholanoïque	4.40
Acide ω Muricholique (ω Muri): acide 3 α 6 α 7 β trihydroxycholanoïque	6.20
Acide 3 α cétocholanoïque	5.16
Autres acides cétoniques	> 6

Conditions chromatographiques:

- Colonne (Chrompack CP SIL 19CB) de 25 m de long; 0.32 mm de diamètre externe.
- Températures: four (isotherme de 240°C), injecteur et détecteur (260°C)
- Débit du gaz vecteur (hydrogène): 0.5ml/mn.

1-10: Laminine P₁ sérique

Principe

Les dosages de LP₁ sérique sont réalisés avec la trousse RIA Laminine P₁ (Behring), technique radioimmunologique par compétition entre un traceur iodé (¹²⁵I) et la fraction Fab d'un anticorps spécifique anti-laminine P₁.

Sur le plan méthodologique, il s'agit d'un dosage radioimmunologique à double anticorps, qui permet de séparer la laminine libre de celle fixée à des anticorps spécifiques, grâce à un anticorps IgG. Au cours de la première étape, la laminine contenue dans le sérum entre en compétition avec le traceur LP₁, marquée par un isotope, vis-à-vis des sites des anticorps de lapin hautement spécifiques de la laminine; la fixation de la LP₁ marquée par l'iode 125 sur l'anticorps est inversement proportionnelle à la quantité de laminine présente dans le sérum. Après équilibration de la réaction, on ajoute un deuxième anticorps, dirigé contre les IgG de lapin, afin de précipiter le complexe immun. Il se forme alors un précipité que l'on peut centrifuger. On décante ensuite le surnageant et on mesure la radioactivité de l'iode 125 présente dans le culot, à l'aide d'un compteur à scintillation gamma. La limite inférieure de détection (deux écart du S₀) est environ 0.01 U (unité arbitraire) de laminine par ml.

Validation

Le taux de LP₁ est déterminé sur des homogénats de muqueuse intestinale de rat, préparés selon la méthode décrite par Guéant *et al.* (1991) utilisant du tampon Tris-Hcl contenant 1% de triton X-100 comme détergent. Des dilutions croissantes sont effectuées sur les grêles proximal, moyen et distal ainsi que sur le côlon.

Dosage

100 ml de chacun des standards (S₀ à S₇), du sérum contrôle ainsi que des sérums à doser sont répartis dans des tubes à incubation. 200 ml d'antisérum sont alors introduits dans tous les tubes sauf celui qui servira au contrôle de la radioactivité totale. L'ensemble est homogénéisé et incubé pendant 16 à 24 heures à +4°C. On délivre ensuite 100 ml de ¹²⁵I LP₁ dans chaque tube qui sont à nouveau incubés dans les mêmes conditions pendant 6 à 7 heures. On ajoute enfin 0.5 ml de réactif précipitant dans chaque tube et l'ensemble est incubé une troisième fois pendant 16 à 24 heures. Après centrifugation (1500 g pendant 20 mn à +4°C), on élimine le surnageant. Le culot est lavé par addition de 0.8 ml de tampon de lavage. La radioactivité des tubes est mesurée dans un compteur gamma "Packard Minoxa 1000".

Les résultats des échantillons sont évalués après étalonnage avec les solutions standards.

1-11: Etude anatomo-pathologique

Après 26 ou 32 semaines d'expérimentation, les animaux sont sacrifiés et tous les organes sont examinés. Le tractus intestinal est ouvert de l'anus au caecum pour visualiser macroscopiquement toute lésion éventuelle. Quatre prélèvements systématiques de 2 cm sont réalisés à des endroits précis de l'intestin (marge anale, caecum, et à 7 et 14 cm de l'anus); les parties intermédiaires sont fixées dans une solution de Bouin. Toutes les lésions et tous les prélèvements systématiques sont examinés sur le plan histologique par l'équipe du Professeur Floquet (Service d'Anatomie Pathologique, Hôpital de Brabois, Nancy).

Les lésions sont identifiées soit comme dysplasies (légère, moyenne ou sévère), soit comme adénocarcinomes (infiltrant ou non). Le nombre de tumeurs totales est la somme des dysplasies totales et des adénocarcinomes.

1-12: Analyses statistiques

Ces analyses ont été réalisées en collaboration avec le Dr Mayeux du Service d'Informatique Médical (Hôpital Central de Nancy).

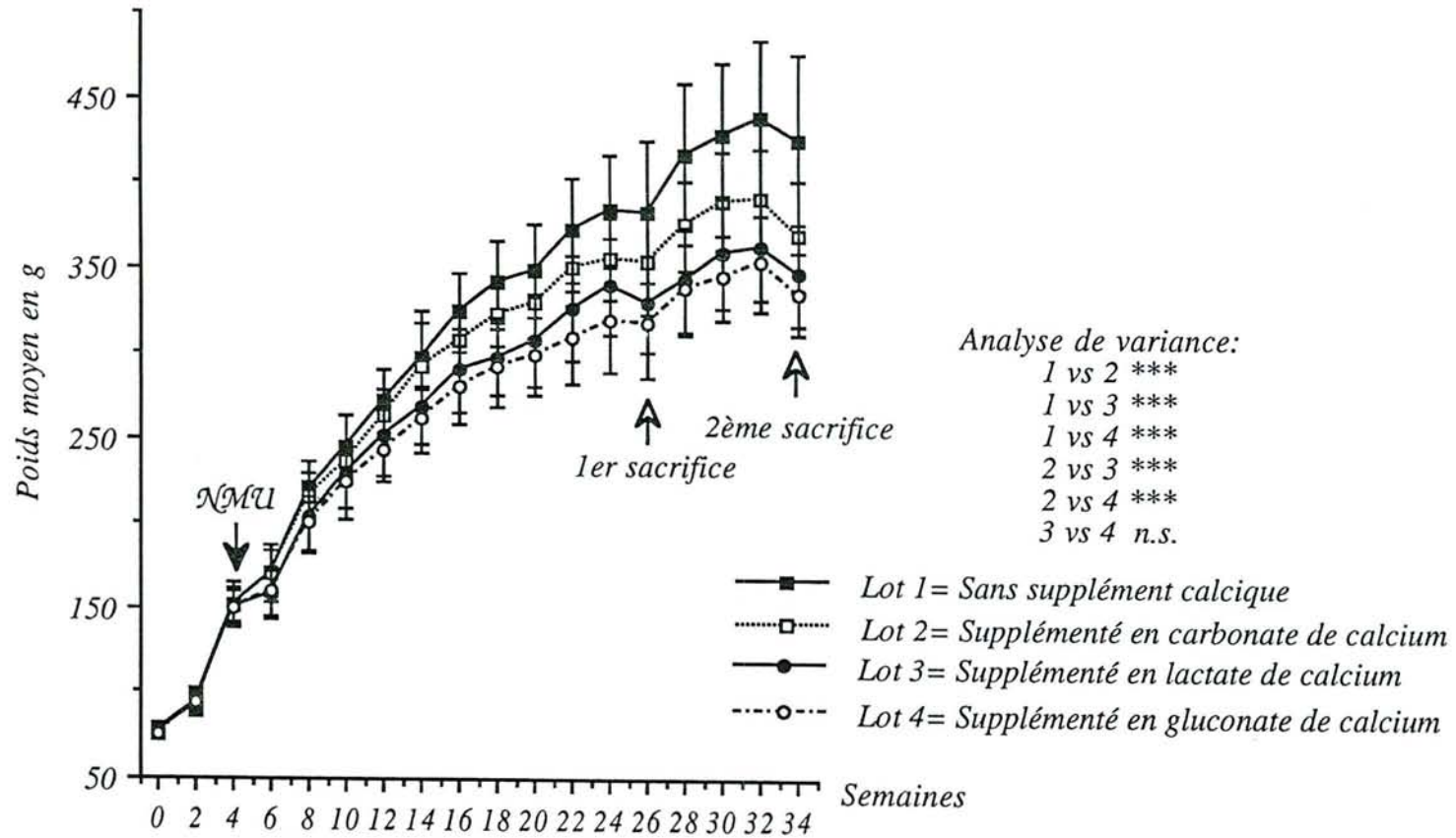
Les comparaisons des moyennes obtenues pour chaque paramètre dans les différents lots sont effectuées par l'analyse de variance à trois facteurs: sujet, temps et traitement. La comparaison retenue est l'analyse du résultat supplémentation-temps. Pour cela, le test de chi-deux est principalement utilisé. Lorsque le nombre de valeurs est inférieur ou égal à 5, le test de Fisher est choisi. Dans toutes les situations envisagées, la différence est supposée significative lorsque $p \leq 0.05$.

Concernant les différences entre les résultats de l'anatomie pathologique, l'analyse de variance à un seul facteur est réalisée pour comparer la moyenne d'une variable dans les différents groupes. Les tests statistiques évaluent les différences des incidences de chaque type de lésion (pourcentage d'animaux atteints) et le nombre de tumeurs par rat atteint. L'influence du temps de sacrifice sur l'anatomie pathologique est également testée.

Quant aux corrélations entre les différents paramètres et l'incidence des tumeurs, deux situations sont envisagées:

- pour les valeurs du début de l'expérimentation jusqu'au premier sacrifice (0 à 26 semaines), le test paramétrique de donnant le coefficient de corrélation suivi du degré de signification de l'hypothèse " $H_0: R=0$ ";
- pour les valeurs du premier sacrifice jusqu'à la fin de l'expérimentation (26 à 34 semaines), un test non paramétrique donnant le coefficient de corrélation de Spearman avec son degré de signification.

Figure 2 : Evolution pondérale hebdomadaire



2: Résultats & Discussions

2-1: Evolution pondérale (figure 2)

La courbe de poids suit une évolution régulière pour atteindre un plateau à 32 semaines. L'évolution pondérale est plus faible ($p \leq 0.001$) dans les lots supplémentés en calcium comme nous l'avons déjà observé dans la première expérimentation où la supplémentation en calcium est associée à un ralentissement du gain de poids.

Parmi les lots supplémentés en calcium, on remarque que les rats du lot 2 ont une évolution pondérale significativement plus importante ($p \leq 0.001$) par rapport à ceux supplémentés en lactate ou gluconate de calcium. Aucune différence entre les lots 3 et 4 n'est signalée.

A ce propos, certains auteurs (Kumar *et al.*, 1990) indiquent que l'incidence des tumeurs est corrélée positivement avec l'augmentation du poids. Par contre, Beaty *et al.* (1993) démontrent que la faible incidence des tumeurs suite à un régime supplémenté en calcium et vitamine D, n'est pas due à une diminution du poids.

2-2: Evolution des ingérés, du poids des selles et du CUD_a (tableau VIII)

La consommation alimentaire est évaluée tous les trois jours le long de l'expérimentation. La moyenne est calculée mensuellement et comme le montre le *tableau VIII*, cette consommation est croissante en fonction du temps jusqu'à atteindre un seuil à partir du 7^o mois. Toutefois, si les rats des lots 1 et 2 semblent consommer plus que ceux des lots 3 et 4, l'analyse de l'interaction supplémentation-temps ne met en évidence de différences statistiquement significatives. Cette observation est en accord avec l'étude de Lapr (1992).

Par ailleurs, la supplémentation calcique, quelle que soit sa forme, s'accompagne d'une augmentation du poids des selles ($p \leq 0.001$). Ceci est également signalé par Lapré *et al.* (1993) avec un régime supplémenté en phosphate de calcium. Parmi les lots supplémentés, les animaux des groupes 2 et 4 excrètent moins que le groupe 3 ($p \leq 0.01$). Aucune différence significative n'est mise en évidence entre les lots 2 et 4. L'augmentation de la masse de selles peut être causée par l'excrétion stimulée des acides gras libres (Lapré *et al.*, 1993) et par d'autres nutriments.

Concernant l'utilisation digestive des différents régimes, on observe une diminution du CUD_a suite à la supplémentation calcique. Cette diminution est plus accentuée dans les lots 3 et 4.

Tableau VIII
Evolution de la quantité d'aliments ingérés, du poids des selles en g/j (moy±sem) et du CUDapparent en %

Semaines			Ingérés (I)		Poids des selles (S)		CUDa= (I-S) .100/(I)
		n	moy	sem	n	moy	sem
4	Lots	1	28	11,3 ± 3,7	19	1,6 ± 0,1	83,0
		2	29	10,9 ± 3,4	20	1,8 ± 0,2	80,8
		3	28	10,6 ± 3,9	20	1,6 ± 0,2	82,0
		4	30	10,7 ± 3,1	20	1,5 ± 0,2	84,9
8	Lots	1	28	17,3 ± 2,1	19	2,4 ± 0,4	86,4
		2	29	17,1 ± 1,5	20	3,6 ± 0,7	79,0
		3	28	16,3 ± 2,2	20	4,2 ± 0,6	73,1
		4	30	14,5 ± 1,9	20	3,4 ± 1,0	76,4
26	Lots	1	28	14,8 ± 1,9	19	2,4 ± 0,2	84,6
		2	29	15,9 ± 1,2	20	3,9 ± 0,4	75,6
		3	28	15,5 ± 1,4	20	3,8 ± 0,4	75,4
		4	30	15,9 ± 2,1	20	3,7 ± 0,9	76,4
32	Lots	1	13	12,7 ± 4,7	13	1,9 ± 0,2	87,0
		2	14	14,3 ± 4,6	14	3,5 ± 0,5	77,0
		3	13	12,8 ± 4,5	13	3,5 ± 0,6	75,7
		4	15	12,7 ± 4,4	15	3,7 ± 0,9	73,4
<i>Analyse de variance</i>							
				N.S.		***	***
				N.S.		***	***
				N.S.		***	***
				N.S.		***	***
				N.S.		N.S.	**
				N.S.		**	N.S.
Lots:		Semaines:			Seuils de signification:		
1: rats sans supplément calcique		4: fin adaptation et avant initiation			N.S.= non significatif		
2: rats supplémentés en carbonate de calcium		8: 4 semaines après initiation			*** p ≤ 0,001		
3: rats supplémentés en lactate de calcium		26: 1er sacrifice			** p ≤ 0,01		
4: rats supplémentés en gluconate de calcium		32: 2ème sacrifice			* p ≤ 0,05		

Tableau IX
Evolution du calcium ingéré, fécal, urinaire, absorbé et retenu en mg/j (moy±sem) à 4, 8, 26 et 32 semaines

Semaines		n	Ingéré (I)	Fécal (F)	Urinaire (U)	Absorbé= (I- F)	Retenu= (I-F-U)	
4	Lots	1	19	124,1 ± 43,7	72,1 ± 11,1	2,9 ± 1,1	52,0 ± 42,3	49,1 ± 42,3
		2	20	102,1 ± 29,1	71,3 ± 8,3	2,1 ± 1,4	30,8 ± 27,9	28,7 ± 27,9
		3	20	98,9 ± 33,3	53,5 ± 11,9	2,2 ± 1,0	45,4 ± 31,1	43,2 ± 31,1
		4	20	113,7 ± 37,8	58,0 ± 5,7	2,8 ± 0,8	55,7 ± 37,4	52,9 ± 37,4
8	Lots	1	19	169,4 ± 24,4	71,9 ± 8,8	2,0 ± 0,9	97,5 ± 22,8	95,5 ± 22,7
		2	20	422,5 ± 36,6	196,0 ± 32,3	3,7 ± 1,4	226,5 ± 17,2	222,8 ± 17,2
		3	20	408,3 ± 56,4	213,0 ± 32,0	3,4 ± 1,4	195,3 ± 46,4	191,9 ± 46,4
		4	20	367,0 ± 46,9	179,3 ± 43,4	3,2 ± 2,1	187,7 ± 17,8	184,5 ± 17,7
26	Lots	1	19	147,6 ± 18,1	90,0 ± 12,4	1,9 ± 0,9	57,6 ± 13,2	55,7 ± 13,2
		2	20	396,2 ± 31,9	250,9 ± 28,5	3,4 ± 1,1	145,3 ± 14,3	141,9 ± 14,3
		3	20	383,9 ± 39,8	250,8 ± 36,7	4,8 ± 2,3	133,1 ± 15,4	128,3 ± 15,2
		4	20	394,7 ± 52,2	239,0 ± 30,6	3,7 ± 2,4	155,7 ± 42,3	152,0 ± 42,2
32	Lots	1	13	144,1 ± 14,7	72,7 ± 6,3	3,0 ± 1,8	71,4 ± 13,3	68,4 ± 13,2
		2	14	376,7 ± 30,4	222,6 ± 30,4	4,7 ± 1,7	154,1 ± 37,8	149,4 ± 37,8
		3	13	359,6 ± 36,5	216,5 ± 30,8	3,9 ± 1,5	143,1 ± 19,6	139,2 ± 19,5
		4	15	352,8 ± 46,6	226,3 ± 37,2	2,1 ± 1,5	126,5 ± 28,1	124,4 ± 28,0
<i>Analyse de variance</i>								
			1 vs 2	***	***	*	***	***
			1 vs 3	***	***	**	***	***
			1 vs 4	***	***	*	***	***
			2 vs 3	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
			2 vs 4	*	**	N.S.	*	*
			3 vs 4	N.S.	**	N.S.	N.S.	N.S.
Lots:			Semaines:			Seuils de signification:		
1: rats sans supplément calcique			4: après adaptation et juste avant initiation			N.S.= non significatif		
2: rats supplémentés en carbonate de calcium			8: 4 semaines après initiation			*** p ≤ 0,001		
3: rats supplémentés en lactate de calcium			26: 1er sacrifice			** p ≤ 0,01		
4: rats supplémentés en gluconate de calcium			32: 2ème sacrifice			* p ≤ 0,05		

2-3: Calcium (tableau IX)

L'excrétion fécale du calcium est peu modifiée par la surcharge lipidique. Par contre elle augmente significativement suite à la supplémentation calcique ($p \leq 0.001$). En effet, l'excrétion fécale du calcium est plus importante (3 à 4 fois supérieure) dans les lots supplémentés (2, 3 et 4) par comparaison au lot 1. Par rapport aux autres lots supplémentés, ce sont les rats nourris au gluconate de calcium qui excrètent le moins ($p \leq 0.01$).

Après la période d'adaptation, l'absorption du calcium est significativement plus élevée dans les lots 2, 3 et 4 (supplémentés en calcium) par rapport au lot 1 (non supplémenté). Cette absorption dépend de la forme de calcium supplémentaire. En effet, nous remarquons que le calcium sous forme de carbonate est plus absorbé que la forme gluconate ($p \leq 0.05$), le lactate se situant entre les deux. Ces différences dans l'absorption sont dues uniquement aux différences déjà signalées concernant le calcium ingéré. En effet, en calculant le pourcentage d'absorption, nous constatons que le régime supplémenté en lactate est moins absorbé relativement aux autres régimes (supplémentés ou non).

La solubilité chimique du calcium est le déterminant principal de son absorption. Le CaCO_3 est un sel très peu soluble et très peu absorbé (Bronner 1993). De ce point de vue, Reshef *et al.* (1990) rapportent également que le lactate de calcium est mieux absorbé chez l'homme que le CaCO_3 .

Nos résultats obtenus dans une situation de stress alimentaire (régime hyperlipidique, instillation d'un carcinogène), ne confirment pas ces observations physiologiques.

Signalons enfin que le calcium retenu évolue dans le même sens que le calcium absorbé.

2-4: pH des selles lyophilisées (tableau X)

Le pH fécal n'est que le reflet très approximatif de l'acidité du contenu du côlon (Lapré *et al.*, 1992). Cette acidité peut varier de façon significative lors du recueil (qui dure une semaine), après lyophilisation, broyage et congélation. Stern *et al.* (1990) font remarquer à ce sujet que même la congélation rapide peut affecter le pH des selles.

Nos résultats indiquent que le pH des selles lyophilisées varie significativement ($p \leq 0.001$) au cours de l'expérimentation. Il tend à devenir plus bas avec le temps, indiquant une acidification du côlon, probablement par suite d'une activité bactérienne plus intense.

De plus, la supplémentation en calcium, quelle que soit sa forme, est associée à une diminution de l'acidité des selles. Ceci est en accord avec Corpet (1989) qui montre que l'augmentation fécale des savons entre le calcium et les acides gras et biliaires

Tableau X
Evolution du pH des selles lyophilisées à 4 et 32 semaines (moy±sem)

Semaines		n		pH	
4				moy	sem
Lots	1	19	7,40	± 0,1	
	2	20	7,42	± 0,2	
	3	20	7,17	± 0,2	
	4	20	7,24	± 0,2	
26					
Lots	1	19	7,24	± 0,2	
	2	20	8,05	± 0,1	
	3	20	8,00	± 0,1	
	4	20	7,69	± 0,3	
32					
Lots	1	13	7,26	± 0,1	
	2	14	8,08	± 0,2	
	3	13	7,83	± 0,1	
	4	15	7,45	± 0,2	
<i>Analyse de variance</i>					

Lots:		Semaines:		Seuils de signification:	
1: rats sans supplément calcique		4: fin adaptation et avant initiation		N.S.= non significatif	
2: rats supplémentés en carbonate de calcium		26: 1er sacrifice		*** $p \leq 0,001$	
3: rats supplémentés en lactate de calcium		32: 2ème sacrifice		** $p \leq 0,01$	
4: rats supplémentés en gluconate de calcium				* $p \leq 0,05$	

Tableau XIa
 Evolution des concentration en mg/g et quantité en mg/j
 des lipides totaux et des acides gras fécaux à 4, 26 et 32 semaines (moy±sem)

Semaines		n	Lipides totaux		Acides gras	
			(mg/g)	(mg/j)	(mg/g)	(mg/j)
4	Lots	1 19	53,1 ± 1,8	95,3 ± 5,5	48,43 ± 1,38	75,17 ± 12,82
		2 20	52,8 ± 1,9	100,4 ± 3,3	50,87 ± 8,13	93,42 ± 15,47
		3 20	54,4 ± 1,5	89,4 ± 2,7	50,43 ± 4,28	82,54 ± 11,91
		4 20	54,3 ± 1,5	82,7 ± 3,9	48,50 ± 6,83	71,64 ± 15,48
26	Lots	1 19	89,6 ± 3,1	206,1 ± 12,9	84,57 ± 3,15	202,07 ± 54,95
		2 20	82,4 ± 2,4	315,3 ± 10,8	75,33 ± 8,77	294,00 ± 36,84
		3 20	92,2 ± 2,7	352,1 ± 12,7	85,87 ± 13,52	322,99 ± 55,16
		4 20	81,7 ± 3,4	300,6 ± 15,9	71,38 ± 12,37	265,15 ± 65,37
32	Lots	1 13	76,2 ± 2,8	141,5 ± 5,6	70,95 ± 3,12	132,06 ± 21,62
		2 14	86,7 ± 3,1	302,2 ± 18,0	79,02 ± 12,50	275,53 ± 66,93
		3 13	83,6 ± 2,7	294,0 ± 18,1	80,06 ± 9,90	281,70 ± 66,09
		4 15	89,7 ± 3,0	331,4 ± 24,6	84,11 ± 11,42	311,00 ± 89,59
Analyse de variance						
		1 vs 2	**	***	*	***
		1 vs 3	N.S.	***	N.S.	***
		1 vs 4	***	***	***	***
		2 vs 3	*	N.S.	N.S.	N.S.
		2 vs 4	N.S.	*	N.S.	*
		3 vs 4	***	***	**	*

Lots:

1: rats sans supplément calcique
 2: rats supplémentés en carbonate de calcium
 3: rats supplémentés en lactate de calcium
 4: rats supplémentés en gluconate de calcium

Semaines:

4: après adaptation et juste avant initiation
 8: 4 semaines après initiation
 26: 1er sacrifice
 32: 2ème sacrifice

Seuils de signification:

N.S.= non significatif
 *** $p \leq 0,001$
 ** $p \leq 0,01$
 * $p \leq 0,05$

entraîne une élévation du pH fécal. Cependant, cette alcalinisation est moins accentuée chez les rats nourris aux régimes 3 et 4 par rapport au régime 2 ($p \leq 0.001$). Le régime 4 (gluconate de calcium) entraîne une plus faible augmentation de pH en comparaison avec les autres formes de calcium ($p \leq 0.001$). Behling & Greger (1988) montrent que les rats recevant du carbonate de calcium ont un pH plus élevé que ceux nourris avec des régimes de yoghourt ou supplémentés en phosphate de calcium. Ainsi, l'adaptation à long terme du côlon au carbonate de calcium se traduit par un pH fécal basique, alors que les sels de calcium avec des composés métabolisables ou fermentescibles (lactate et gluconate) tendent à maintenir un pH colique relativement peu élevé et préviennent de ce fait l'ionisation des lipides (Wargovich 1988).

2-5: Lipides totaux et acides gras (tableau XI a)

Les résultats indiquent que l'excrétion comme la concentration des selles en lipides sont stimulées par la supplémentation calcique ($p \leq 0.001$). Toutes les formes chimiques de calcium sont associées à une augmentation des quantités de lipides dans les selles et donc à une réduction de leur digestibilité. Cette constatation est rapportée par plusieurs auteurs dont Fleishman *et al.* (1966) ainsi que Behling *et al.* (1990^{a,b}). Sous l'effet de la supplémentation calcique, l'augmentation des teneurs en lipides dans les fèces peut indiquer une mauvaise absorption. Cette diminution de la digestibilité est probablement due à la formation de savons entre le calcium et les lipides présents dans le contenu du côlon.

De plus, on remarque que l'augmentation de l'excrétion lipidique est en relation avec la forme de calcium supplémentaire. En effet, dans les groupes supplémentés, cette excrétion fécale est significativement plus importante dans les lots 2 et 3 relativement au lot 4.

Les résultats des acides gras suivent une évolution parallèle à celle des lipides totaux. Les quantités fécales d'acides gras sont plus importantes après l'instauration du régime hyperlipidique. La supplémentation en calcium s'accompagne également d'une augmentation des acides gras fécaux ($p \leq 0.001$). Awad *et al.* (1989^a), étudiant les effets de la graisse de boeuf (AG saturés), du beurre (AG saturés) et de l'huile de carthame (AG polyinsaturés) sur les lipides fécaux lors de la supplémentation en phosphate de calcium, ne signalent pas de différences significatives dans la concentration totale des acides biliaires fécaux mais une augmentation de la concentration des acides gras avec les lipides saturés. Appleton *et al.* (1991) affirment que dans la lumière colique, les acides gras libres sont liés par le calcium et de ce fait, la supplémentation calcique induit une excrétion fécale accrue des acides gras. Ceci rejoint l'hypothèse de Newmark *et al.* (1984) énoncée plus haut (§ 3-3-2).

Lapré *et al.* (1992) affirment que l'excrétion intense des acides gras causée par le

Tableau XIb

Evolution de la quantité en mg/j des stérols neutres fécaux (moy±sem), et répartition en % des stérols neutres animaux

Semaines	n	Stérols neutres totaux	Stérols neutres animaux	Cholestérol	Coprostanol	
4		(mg/j)	(mg/j)	(%)	(%)	
Lots	1	19	4,54 ± 0,12	8,08 ± 0,33	62,9	37,1
	2	20	4,45 ± 0,14	8,55 ± 0,38	62,3	37,7
	3	20	4,55 ± 0,16	7,52 ± 0,36	63,3	36,7
	4	20	4,48 ± 0,14	6,73 ± 0,24	62,4	37,6
26						
Lots	1	19	4,71 ± 0,37	10,95 ± 1,13	67,6	32,4
	2	20	5,66 ± 0,71	22,32 ± 3,45	58,9	41,1
	3	20	5,38 ± 0,27	20,60 ± 1,30	67,9	32,1
	4	20	4,67 ± 0,09	17,33 ± 0,92	66,5	33,5
34						
Lots	1	13	3,10 ± 0,38	5,67 ± 0,78	65,84	34,2
	2	14	3,86 ± 0,49	14,32 ± 1,56	57,52	42,5
	3	13	1,95 ± 0,09	7,84 ± 0,53	68,23	31,8
	4	15	3,64 ± 0,58	13,41 ± 1,87	63,80	36,2

Analyse de variance

1 vs 2	**	*
1 vs 3	***	***
1 vs 4	***	***
2 vs 3	N.S.	N.S.
2 vs 4	N.S.	N.S.
3 vs 4	N.S.	*

Lots:

1: rats sans supplément calcique
 2: rats supplémentés en carbonate de calcium
 3: rats supplémentés en lactate de calcium
 4: rats supplémentés en gluconate de calcium

Semaines:

4: fin adaptation et avant initiation
 26: 1er sacrifice

Seuils de signification:

N.S.= non significatif
 *** $p \leq 0,001$
 ** $p \leq 0,01$
 * $p \leq 0,05$

supplément de calcium est dépendante du type de lipides. Le calcium se lie différemment en fonction du type d'acide gras. Ainsi, les savons de calcium sont augmentés par les acides gras saturés à longue chaîne et diminués par les acides gras polyinsaturés. Ceci indique que l'augmentation drastique des acides gras lors de la supplémentation en calcium est principalement due à la formation de savons insolubles. Ce sont les animaux du groupe 4 qui paraissent excréter plus d'acides gras en comparaison avec les groupes 2 et 3 ($p \leq 0.05$).

Les déterminations du profil des acides gras fécaux ne montrent aucune différence discernable dans leur composition. Aucune différence significative n'est signalée non plus dans le degré d'insaturation de ces acides gras.

2-6: Stérols

2-6-1: Stérols totaux et animaux (tableau XI b)

L'analyse statistique des résultats entre 4 et 26 semaines indique que le régime hyperlipidique n'induit pas d'augmentation significative des quantités de stérols neutres totaux excrétées. Mais il se traduit par un accroissement de l'excrétion des stérols neutres de 26%. Comme l'ont déjà signalés Ide *et al.* (1980), ce sont probablement les phytostérols contenus dans la végétaline qui sont responsables de cette augmentation.

La supplémentation calcique, par contre, est accompagnée d'une excrétion fécale plus importante des stérols neutre totaux et des stérols neutres animaux. En quantités excrétées par jour, les différences sont significatives en faveur d'une augmentation du cholestérol dans les lots supplémentés par rapport au lot témoin. En outre, le lactate de calcium induit une excrétion du cholestérol moins importante par rapport au carbonate ($p \leq 0,01$) et au gluconate de calcium ($p \leq 0.001$). A ce propos, Skrypec (1991) observe une augmentation significative non pas des concentrations mais de l'excrétion des stérols totaux lors de la supplémentation calcique.

L'analyse de variance indique que la dégradation bactérienne du cholestérol en coprostanol n'est influencée ni par la surcharge lipidique ni par la supplémentation calcique puisqu'aucune différence significative n'est observée. Chez le rat, le pourcentage de cholestérol transformé en coprostanol dépend de la composition du régime et varie de 0 à 90% (Sulpice *et al.*, 1978). Le régime alimentaire est un facteur déterminant de la composition de la flore fécale. En fonction du régime, 50% ou plus des stérols totaux des selles peuvent être sous forme de coprostanol. Des études ont aussi montré que la consommation excessive de lipides affecte l'activité métabolique des bactéries fécales et le taux des métabolites fécaux du cholestérol et certains acides biliaires (Hill 1975; Reddy *et al.*, 1975^b). Reddy *et al.*, (1978) n'observent pas de

Tableau XIc

Evolution des concentration en mg/g et quantité en mg/j des phytostérols fécaux (moy±sem), et leur répartition en %

Semaines	n	Phytostérols totaux		β Sitostérol	β Coprostitostérol	Lathostérol	Stigmastérol	Campesterol	
		(mg/g)	(mg/j)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	
4	Lots	1 19	0,87 ± 0,03	1,40 ± 0,06	23,1	26,6	13,0	13,0	26,1
		2 20	0,81 ± 0,05	1,49 ± 0,09	23,6	26,5	8,6	14,4	26,8
		3 20	0,84 ± 0,04	1,38 ± 0,07	23,6	26,1	8,5	15,6	27,3
		4 20	0,84 ± 0,07	1,23 ± 0,11	21,4	33,6	8,0	13,3	24,0
26	Lots	1 19	0,82 ± 0,04	1,95 ± 0,12	18,7	27,7	9,6	16,0	28,2
		2 20	0,86 ± 0,06	3,37 ± 0,22	20,8	25,2	14,4	14,3	25,0
		3 20	0,76 ± 0,05	2,87 ± 0,21	12,2	30,1	14,2	15,1	28,8
		4 20	0,87 ± 0,06	3,26 ± 0,25	19,2	23,2	10,7	13,9	32,9
32	Lots	1 13	0,54 ± 0,08	1,00 ± 0,52	24,3	25,0	8,3	15,7	25,6
		2 14	0,57 ± 0,05	1,98 ± 0,19	22,5	22,5	11,4	15,3	28,6
		3 13	0,30 ± 0,01	1,05 ± 0,07	11,0	40,7	12,7	13,3	23,0
		4 15	0,57 ± 0,06	2,10 ± 0,20	21,2	24,4	13,2	14,2	26,8
Analyse de variance									
		1 vs 2	N.S.	***	N.S.	N.S.	***	N.S.	N.S.
		1 vs 3	**	***	*	*	***	N.S.	N.S.
		1 vs 4	N.S.	***	N.S.	N.S.	***	N.S.	N.S.
		2 vs 3	***	*	***	***	N.S.	N.S.	N.S.
		2 vs 4	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
		3 vs 4	**	**	***	***	N.S.	N.S.	N.S.

Lots:

1: rats sans supplément calcique

2: rats supplémentés en carbonate de calcium

3: rats supplémentés en lactate de calcium

4: rats supplémentés en gluconate de calcium

Semaines:

4: fin adaptation et avant initiation

26: 1er sacrifice

32: 2ème sacrifice

Seuils de signification:

N.S.= non significatif

*** $p \leq 0,001$

** $p \leq 0,01$

* $p \leq 0,05$

différences dans la concentration (mg /g de fèces) du cholestérol et coprostanol entre les groupes de populations étudiées.

Notons enfin que les rats "IOPS" utilisés ont une microflore intestinale transformant moins bien les stérols que les rats conventionnels. L'effet des sels de calcium sur les transformations bactériennes des stérols risque de ne pas être visible.

2-6-2: Phytostérols (tableau XI c)

Les phytostérols proviennent d'une alimentation d'origine végétale. Ils sont contenus, sous forme stérolique, dans la fraction insaponifiable des lipides (Mourot 1989). Le β sitostérol, le campestérol et le stigmastérol sont les principaux phytostérols. La teneur de ces mélanges stéroliques varie selon la nature des huiles.

La muqueuse intestinale possédant un pouvoir de résorption très sélectif à l'égard des stérols alimentaires, l'absorption des phytostérols au cours de la migration dans le tube digestif est très faible: inférieure à 5% de l'ingestion. Ils sont évacués de l'organisme avec la sécrétion biliaire (Chijiwa 1987) sans modification de structure; cette voie d'élimination semblant être la plus importante (Gould *et al.*, 1969). Durant le transit intestinal, les phytostérols subissent des transformations analogues à celles que subit le cholestérol telle que l'hydrogénation du β sitostérol en coprositostérol (Férézou *et al.*, 1978).

L'analyse de variance de l'évolution des phytostérols fécaux suggère que le régime hyperlipidique n'induit pas de modifications importantes de la concentration et de la quantité des phytostérols fécaux. Cette observation semble s'expliquer par la richesse en phytostérols du régime standard (8% de lipides) composé d'huile de tournesol par rapport à la *végétaline* utilisée dans les régimes expérimentaux.

D'autre part, la supplémentation calcique se traduit par une augmentation significative de l'excrétion (mg/j) de ces composés. Ceci pourrait provenir de l'augmentation de la masse des selles chez les animaux supplémentés en calcium. Le calcium alimentaire, quelque soit sa forme chimique, provoque une malabsorption de ces composés végétaux ($p \leq 0.001$). La forme du calcium alimentaire influence cette excrétion. Ce sont toujours les animaux du lot 3 qui excrètent moins de phytostérols relativement aux autres lots supplémentés 2 et 4.

Ces différences significatives sont retrouvées lors de l'analyse du β sitostérol, composé majeur des phytostérols. En effet, les fèces des rats du groupe supplémenté en lactate de calcium sont les moins concentrés en β sitostérol en comparaison avec les groupes 1, 2 et 4.

La distribution du β coprositostérol, métabolite bactérien du β sitostérol, ne diffère que dans le lot 3 (lactate de calcium). Les résultats illustrés par le *tableau XIc* montrent que l'évolution des quantités excrétées du coprositostérol augmentent lorsque

Tableau XIIIa

Evolution des concentration en mg/g et quantité en mg/j des acides biliaires totaux fécaux (moy±sem)

Semaines		n	Concentration	Quantité	
			(mg/g)	(mg/j)	
4	Lots	1	19	0,75 ± 0,03	1,21 ± 0,08
		2	20	0,87 ± 0,04	1,60 ± 0,08
		3	20	1,32 ± 0,06	2,16 ± 0,10
		4	20	1,04 ± 0,06	1,52 ± 0,09
26	Lots	1	19	1,80 ± 0,14	4,28 ± 0,28
		2	20	3,63 ± 0,33	14,21 ± 0,24
		3	20	2,20 ± 0,07	8,31 ± 0,35
		4	20	2,12 ± 0,05	7,94 ± 0,32
32	Lots	1	13	2,08 ± 0,39	3,87 ± 0,87
		2	14	4,26 ± 0,21	14,77 ± 0,79
		3	13	1,75 ± 0,14	6,12 ± 0,46
		4	15	1,85 ± 0,06	6,83 ± 0,50
<i>Analyse de variance</i>					
		1 vs 2	***	***	
		1 vs 3	*	***	
		1 vs 4	N.S.	***	
		2 vs 3	***	***	
		2 vs 4	***	***	
		3 vs 4	N.S.	N.S.	

Lots:

1: rats sans supplément calcique

2: rats supplémentés en carbonate de calcium

3: rats supplémentés en lactate de calcium

4: rats supplémentés en gluconate de calcium

Semaines:

4: fin adaptation et avant initiation

26: 1er sacrifice

32: 2ème sacrifice

Seuils de signification:

N.S.= non significatif

*** $p \leq 0,001$

** $p \leq 0,01$

* $p \leq 0,05$

la forme chimique de calcium supplémentaire est le lactate. On relève également des différences significatives entre les lots supplémentés en calcium, lors de la transformation microbienne du β sitostérol en coprostanol. En effet, le lactate se traduit par une plus forte dégradation bactérienne relativement au carbonate ($p \leq 0.01$) et au gluconate ($p \leq 0.001$). Cependant, le rapport coprostanol : sitostérol est plus faible que le rapport coprostanol : cholestérol en accord avec des observations antérieures (Subbiah *et al.*, 1975; Férézou *et al.*, 1978). La distribution des autres phytostérols ne semble influencée ni par la surcharge lipidique ni par la supplémentation calcique.

2-7: Acides biliaires (tableaux XII a et b)

2-7-1: Acides biliaires totaux (Tableau XIIIa)

Nos résultats montrent une augmentation de la concentration et de la quantité fécales des acides biliaires totaux des selles chez les animaux nourris avec les régimes surchargés en lipides saturés. Hill (1974) fait remarquer que la concentration fécale moyenne des acides biliaires est fonction de la teneur des aliments en lipides. Un régime hyperlipidique entraîne chez l'animal (Reddy & Wynder 1977) et chez l'homme (Stadler *et al.*, 1988^{a,b}; Vogel & McPherson 1989), une augmentation des concentrations fécales des acides biliaires.

La teneur plus élevée en acides biliaires fécaux peut être considérée comme le reflet de l'augmentation de leur synthèse. L'excrétion fécale des acides biliaires est souvent utilisée comme indicateur de la production d'acides biliaires. La composition en acides gras des lipides alimentaires est un déterminant important de la concentration et de l'excrétion des acides biliaires fécaux. Cette élimination plus importante est observée à la suite de l'adoption du régime hyperlipidique contenant une proportion en phytostérols loin d'être négligeable. A ce propos, Mourot (1989) a montré que ces stérols végétaux sont responsables d'une augmentation des acides biliaires fécaux. Ces résultats confirment des études antérieures montrant que les phytostérols et en particulier le β sitostérol, entraînent une augmentation de la sécrétion biliaire et une transformation accrue du cholestérol en acides biliaires par activation de la 7α hydroxylase (Shefer *et al.*, 1973).

Cette augmentation dépend non seulement de la supplémentation mais aussi de la forme de calcium.

En accord avec Skrypec (1991), nous observons que la supplémentation calcique (sous formes carbonate et lactate) augmente de façon significative la concentration fécale des acides biliaires totaux. Seul le supplément gluconate de calcium ne semble pas influencer significativement cette concentration. Lapré *et al.* (1992) n'observent pas non plus d'augmentation significative de la concentration des acides biliaires totaux lors de la supplémentation avec du phosphate de calcium. Plus encore, Appelton *et al.*

Tableau XIIIb
Evolution de la distribution des acides biliaires fécaux en % à 4, 26 et 32 semaines

Semaines		n	CDCA	β MURI	ω MURI	HDCA	UDCA	UCA	HCA	LCA	DCA	CA	Cétones	Voie1	Voie2
4															
Lots	1	19	2,4	8,2	6,8	15,1	2,0	3,1	5,0	8,2	10,9	4,6	33,8	67,6	32,4
	2	20	1,4	8,0	6,9	18,0	2,8	4,1	3,0	8,0	13,0	4,0	30,8	67,6	32,4
	3	20	0,9	5,1	4,0	34,1	5,4	4,0	4,4	5,1	16,1	2,5	18,3	72,3	27,7
	4	20	3,8	6,7	8,1	23,3	5,7	2,0	3,9	6,7	12,6	3,4	23,8	72,1	27,9
26															
Lots	1	19	1,8	5,3	5,2	12,8	2,0	3,3	5,9	9,9	8,8	1,3	43,5	67,9	32,1
	2	20	1,6	4,8	6,2	8,3	3,1	2,0	2,7	7,5	15,8	2,7	45,1	58,9	41,1
	3	20	3,3	1,4	10,0	2,4	3,1	1,0	2,8	17,2	24,8	6,5	27,5	55,0	45,0
	4	20	2,8	2,9	7,5	3,8	2,9	1,0	3,5	8,3	14,5	3,0	49,9	57,6	42,4
32															
Lots	1	13	3,3	4,9	5,1	8,7	1,8	3,0	5,4	9,9	8,7	1,3	48,0	66,0	34,0
	2	14	0,7	1,4	1,2	11,8	2,0	1,0	1,8	14,5	32,9	1,9	30,8	49,8	50,2
	3	13	2,5	2,0	8,2	3,1	8,6	1,4	2,6	11,2	34,5	1,1	24,9	52,0	48,0
	4	15	2,0	3,0	8,1	3,8	2,1	1,1	3,9	9,6	19,1	1,8	45,5	56,3	43,7
Analyse de variance			1 vs 2		1 vs 3		1 vs 4		2 vs 3		2 vs 4		3 vs 4		
Voie 1/ Voie2			***		**		***		***		***		N.S.		

Voie 1: CDCA+ β MURI+ ω MURI+HDCA+HCA+UDCA+UCA+LCA+1/2 Cétones

Voie 2: CA+DCA+1/2 Cétones

Lots:

1: rats sans supplément calcique
2: rats supplémentés en carbonate de calcium
3: rats supplémentés en lactate de calcium
4: rats supplémentés en gluconate de calcium

Semaines:

4: fin adaptation et avant initiation
26: 1er sacrifice
32: 2ème sacrifice

Seuils de signification:

N.S.= non significatif
*** $p \leq 0,001$
** $p \leq 0,01$
* $p \leq 0,05$

(1991) signalent une diminution significative de la concentration des acides biliaires fécaux (mg/g de selles sèches) lors de la supplémentation calcique.

Par contre, et quelle que soit la forme considérée, le calcium supplémentaire augmente uniformément et de façon significative la quantité fécale des acides biliaires totaux. En effet, par rapport au lot 1, les animaux supplémentés en calcium excrètent quotidiennement plus d'acides biliaires totaux ($p \leq 0.001$). La forme carbonate semble responsable d'un flux plus grand en comparaison avec les formes lactate et gluconate ($p \leq 0.001$). Entre les groupes 3 et 4, on ne relève pas de différence statistique.

2-7-2: Distribution et répartition des acides biliaires (tableau XII_b)

Le passage du régime standard (8% de lipides) au régime expérimental (24% de lipides saturés) ne semble pas modifier la composition fécale des acides biliaires. Cette distribution est semblable à 4 semaines : régime standard (voie 1= 67.6 et voie 2= 32.4); à 26 semaines (voie 1= 67.9 et voie 2= 32.1) et à 32 semaines expérimentales (voie 1= 66 et voie 2= 34). Cependant on observe des différences au sein des deux voies métaboliques. En effet, plus de cétones apparaissent après l'instauration du régime hyperlipidique. Elles augmentent de 23% à 26 semaines et de 30% à 32 semaines expérimentales. Cette transformation des acides biliaires en cétones a pour origine principalement les acides β muricholique et cholique.

Concernant l'effet de la supplémentation en calcium alimentaire, on constate que la prépondérance de la voie I par rapport à la voie II est remise en cause. A la 32^{ème} semaine, les deux voies sont quasi équivalentes. Pour cela, le calcium agit selon la forme considérée en augmentant soit la proportion des cétones, soit celle du DCA, soit les deux. Ainsi les cétones sont particulièrement augmentées (de l'ordre de 100%) par le régime supplémenté en gluconate de calcium (groupe 4), alors que la proportion de DCA est accrue dans les lots supplémentés en carbonate (groupe 2) et en lactate (groupe 3). Les différentes formes de calcium agissent donc différemment sur le métabolisme des acides biliaires. Des résultats similaires sont rapportés par Alder *et al.* (1993) qui observent, après une supplémentation en carbonate de calcium chez l'homme, une augmentation significative du DCA sans modification des autres acides biliaires. On peut supposer que le calcium, en se fixant préférentiellement les acides biliaires de la voie I (DCA surtout), empêche leur réabsorption dans le côlon et par conséquent augmente leur excrétion. On peut également mettre en cause la microflore intestinale des rats IOPS qui ressemble plus à une flore humaine qu'à une flore de rat.

2-7-3: Transformations microbiennes des acides biliaires

La composition des acides biliaires fécaux est utilisée pour déterminer les

transformations bactériennes des acides biliaires. Les acides biliaires fécaux sont essentiellement des métabolites bactériens (Sacquet *et al.*, 1975). La présence de la microflore modifie profondément le métabolisme des acides biliaires. Les aliments qui font varier cette flore influencent également les transformations de ces acides (Gustafsson & Norman 1969; Kellogg 1971). Cette flore bactérienne déconjugue les acides biliaires et les transforme en acides biliaires secondaires. Chez le rat, la situation est complexe en raison de la présence des acides muricholiques (Riottot 1987). Les principaux acides biliaires secondaires sont les acides hyodéoxycholique, déoxycholique, lithocholique et ω muricholique (Sacquet *et al.*, 1975) ainsi que de nombreux acides cétoniques.

Les résultats présentés dans les *tableaux XII_a* et *XII_b* indiquent que les proportions des acides biliaires varient en fonction de la teneur du régime en lipides. Ainsi, l'instauration du régime hyperlipidique s'accompagne d'une diminution du pourcentage des acides β muricholique et cholique. L'acide chénodéoxycholique ne semble pas être influencé par la surcharge du régime en lipides saturés.

La formation du HDCA est importante à partir de la 7α déhydroxylation de l'acide ω muricholique. Il semble que le β muricholique puisse être épimérisé en ω muricholique par la flore intestinale du rat (McDonald *et al.*, 1983). Sacquet *et al.* (1979) ont d'ailleurs confirmé cette hypothèse en isolant des fèces des rats une souche de *Clostridium* groupe III responsable de cette transformation. L'UDCA est uniquement un acide biliaire fécal alors que l'UCA se trouve dans la bile et les fèces.

Tous ces changements sont en relation avec les altérations de la flore intestinale (Vogel & McPherson 1989). Nigro *et al.* (1976) rapportent qu'un régime avec des taux élevés de graisse de boeuf augmente l'excrétion de l'acide déoxycholique, et l'expliquent par l'augmentation de la dégradation bactérienne de l'acide cholique. Ceci est également démontré par l'augmentation des acides biliaires fécaux totaux, particulièrement le DCA, chez les animaux consommant de l'acide cholique par rapport aux témoins (Cohen *et al.*, 1980).

Chez les rats supplémentés en calcium, la flore intestinale convertit de façon importante le CA en DCA et probablement en cétones. Des différences sont observées entre le lot 1 et les lots supplémentés en calcium ($p \leq 0.001$). Parmi ceux-ci, c'est le gluconate de calcium qui induit la plus faible transformation en comparaison aux deux autres formes ($p \leq 0.001$).

Le pourcentage de dégradation du CDCA en LCA est tout aussi révélateur de l'importance de l'activité microbienne. La 7α déhydroxylation du CA et du CDCA en DCA et LCA respectivement est la transformation la plus importante. L'interaction temps-traitement démontre que la supplémentation calcique se traduit par l'augmentation de cette activité ($p \leq 0.01$). La forme carbonate semble être celle qui induit une plus grande dégradation bactérienne du CDCA.

Tableau XIII

Evolution de la synthèse du cholestérol en mg/j (moy±sem) à 4, 26 et 32 semaines

<i>Semaines</i>	<i>n</i>	4	<i>n</i>	26	<i>n</i>	32					
<i>Lots</i>	1	19		4,14 ± 0,52	19	9,31 ± 3,43	13	6,08 ± 2,45			
	2	20		4,78 ± 0,60	20	24,09 ± 9,34	14	20,40 ± 5,05			
	3	20		5,29 ± 1,10	20	17,30 ± 3,54	13	8,91 ± 1,98			
	4	20		4,20 ± 0,64	20	15,23 ± 3,27	15	12,52 ± 5,13			
<i>Analyse de variance</i>	1 vs 2		1 vs 3		1 vs 4		2 vs 3		2 vs 4		3 vs 4
	***		***		***		***		**		***

Lots:

1: rats sans supplément calcique

2: rats supplémentés en carbonate de calcium

3: rats supplémentés en lactate de calcium

4: rats supplémentés en gluconate de calcium

Semaines:

4: après adaptation et juste avant initiation

26: 1er sacrifice

32: 2ème sacrifice

Seuils de signification:

N.S.= non significatif

*** $p \leq 0,001$

** $p \leq 0,01$

* $p \leq 0,05$

Figure 3: Distribution du taux de LP1 des différents lots

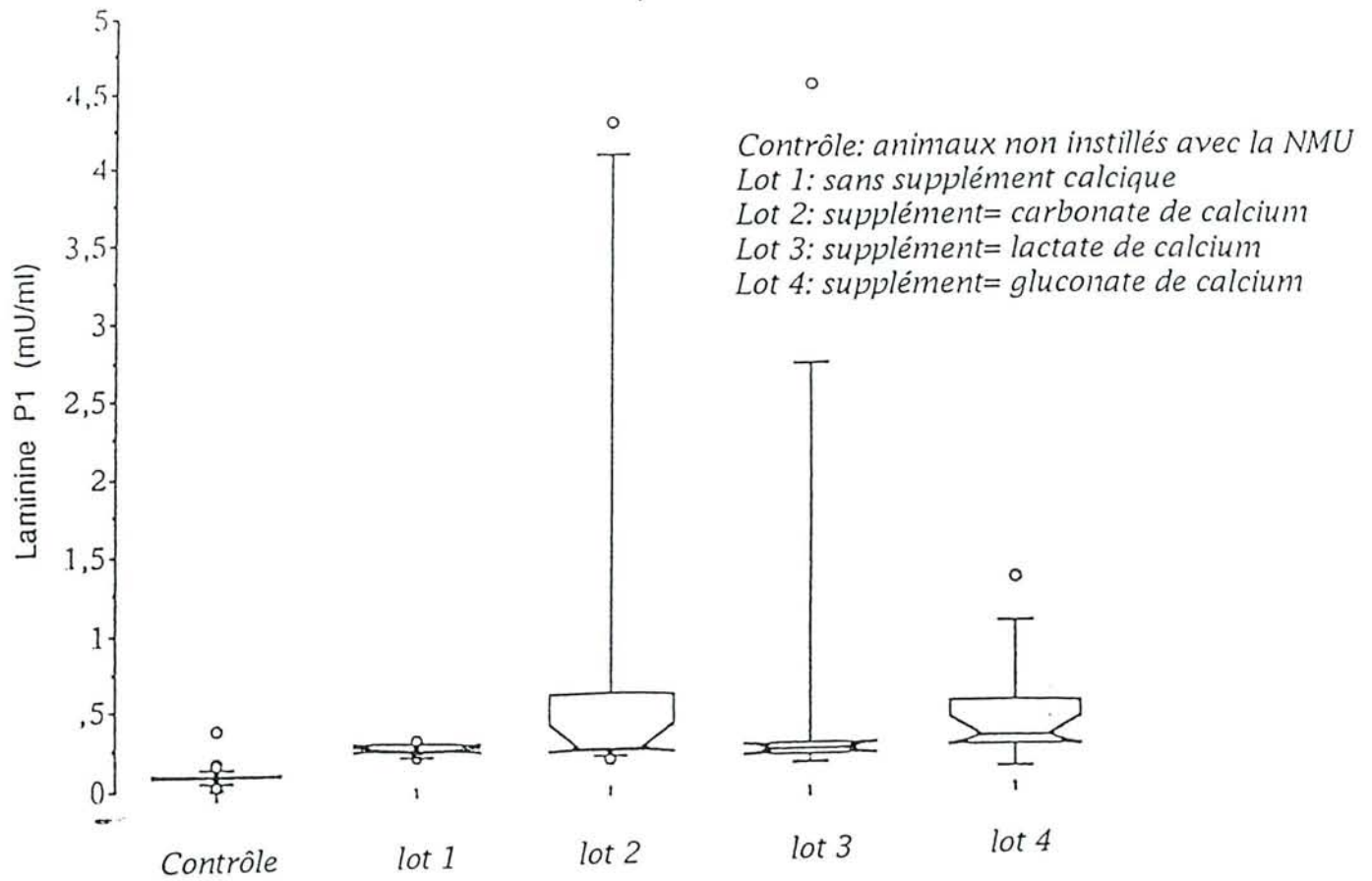
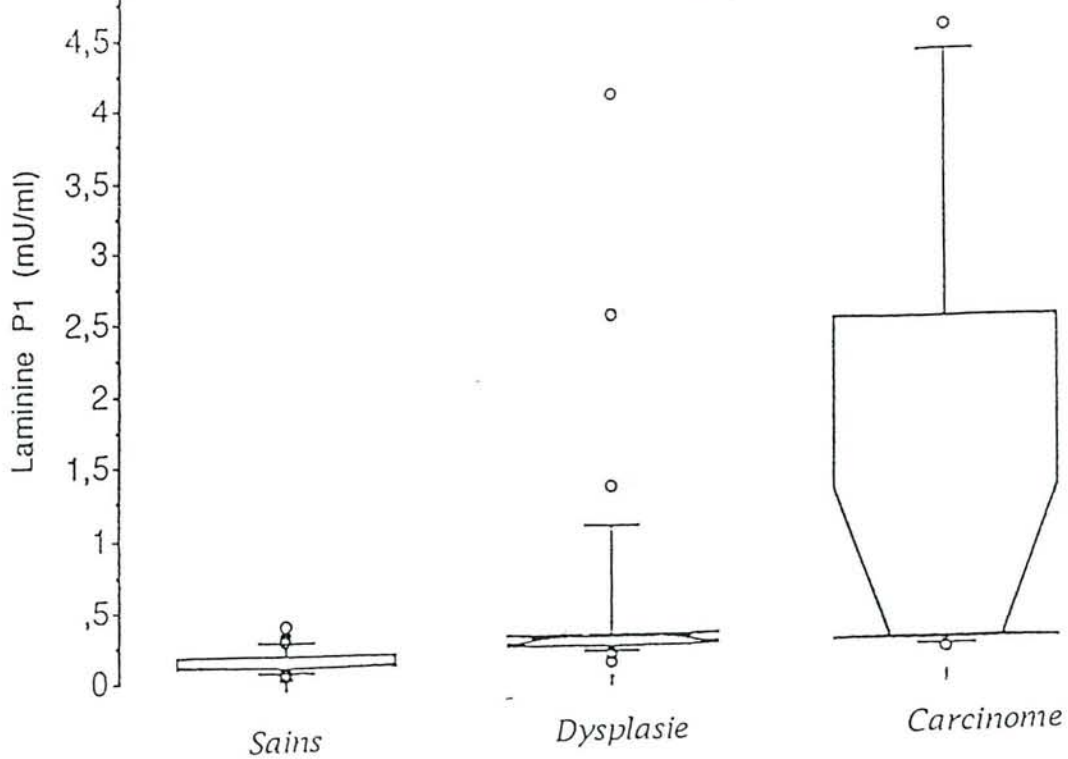


Figure 4: Distribution du taux de LP1 chez les animaux sains, avec dysplasie ou carcinome



La dégradation de l'acide β muricholique en HDCA ou en acide ω muricholique varie en fonction, d'une part, de la supplémentation calcique et d'autre part, de la forme de calcium. En effet, le pourcentage d'acide β muricholique non dégradé augmente significativement dans le lot 2 ($p \leq 0.01$) et diminue dans le lot supplémenté en lactate de calcium ($p \leq 0.001$). Ce paramètre ne varie pas significativement dans le groupe nourri au gluconate de calcium.

La dégradation *in vivo* de l'acide β muricholique en HDCA augmente avec la supplémentation en calcium ($p \leq 0.01$). Le carbonate de calcium semble induire la plus forte transformation par rapport au lactate et gluconate de calcium ($p \leq 0.001$). Inversement, cette dernière forme ainsi que le régime non supplémenté en calcium se traduisent par une augmentation plus importante de la dégradation de l'acide β muricholique en acide ω muricholique ($p \leq 0.001$).

2-8: Synthèse du cholestérol (tableau XIII)

Les résultats illustrés par le *tableau XIII* montrent que la synthèse de cholestérol est davantage stimulée lors de la surcharge du régime en lipides saturés. L'augmentation est significative et passe de 4.14 avec le régime standard à 9.31 et 6.08 avec les régimes expérimentaux à 26 et 32 semaines respectivement.

L'excrétion du cholestérol est influencée par de nombreux facteurs dont le régime puisque les lipides alimentaires stimulent la synthèse hépatique du cholestérol et des acides biliaries (Sorenson *et al.*, 1988). Elle est augmentée également par le remplacement des acides gras polyinsaturés par des acides gras saturés (Connor *et al.*, 1969)

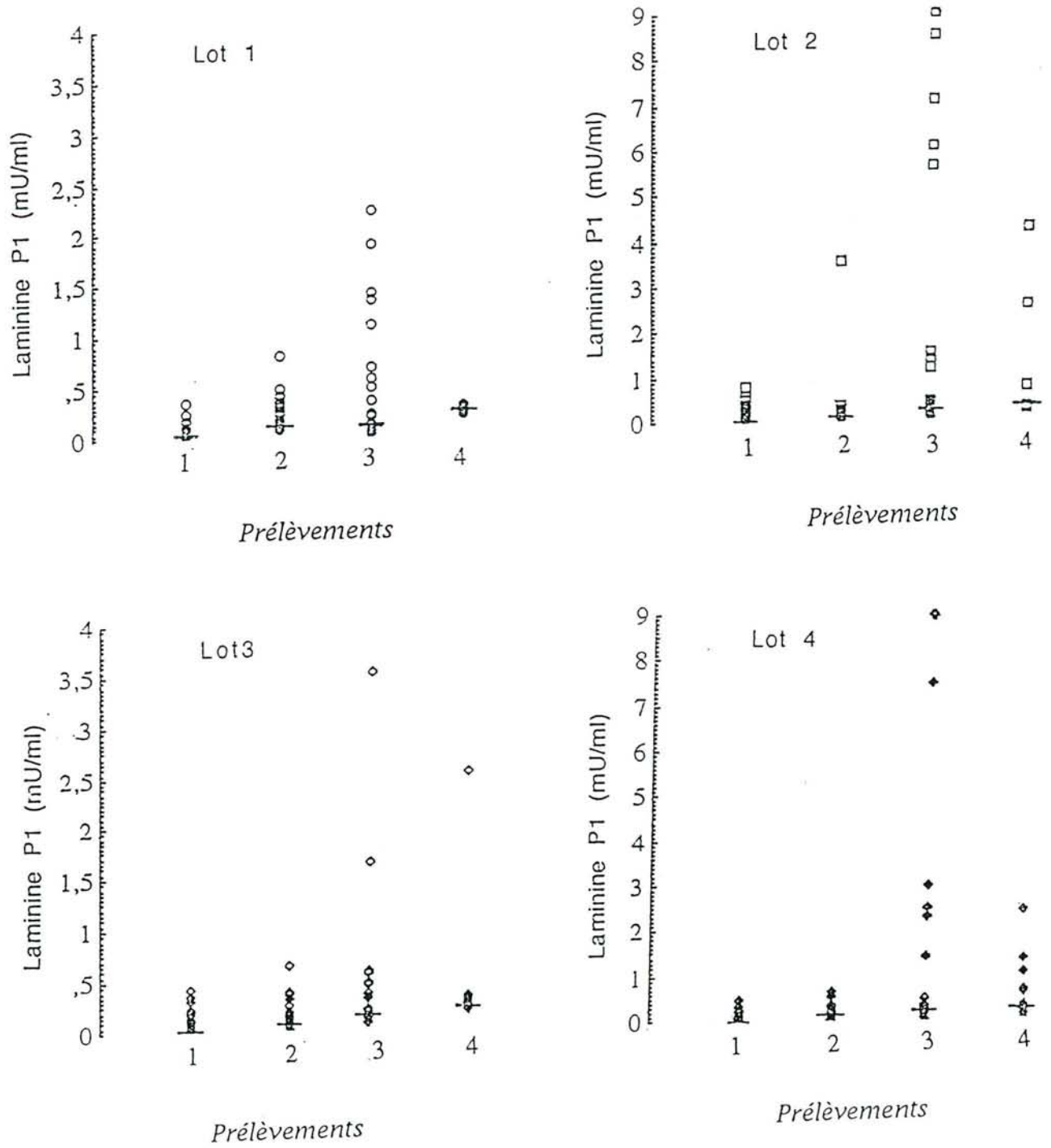
La synthèse est augmentée également de façon significative lors de la supplémentation en calcium ($p \leq 0.001$). Cette augmentation est moins importante chez les rats supplémentés en lactate de calcium relativement aux animaux des lots 2 et 4 ($p \leq 0.001$). La synthèse la plus importante est observée chez les animaux nourris au régime 2 (carbonate de calcium).

Cette augmentation de la synthèse peut être due soit à une compétition avec les phytostérols (Mourot 1989; Raicht *et al.*, 1975), soit à une complexation des acides biliaries par le calcium. Nos résultats militeraient plutôt pour cette dernière hypothèse, car le régime supplémenté en carbonate de calcium qui induit une synthèse de cholestérol plus accrue, est celui qui se caractérise par une excrétion fécale plus importante d'acides biliaries totaux.

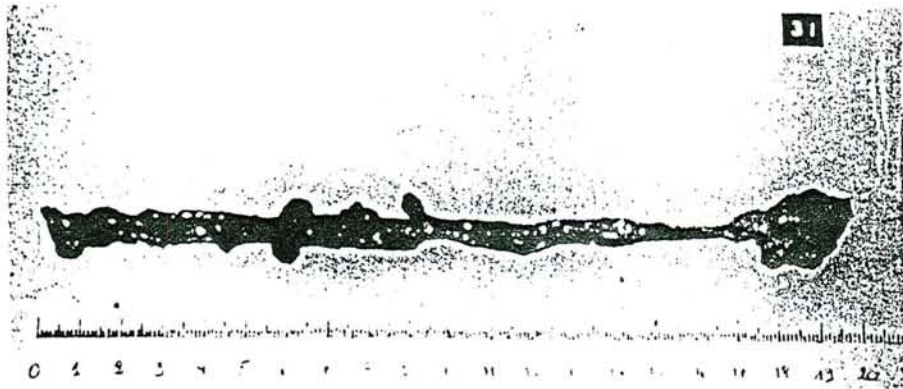
2-9: Laminine P_1 sérique (figures 3, 4 et 5)

La LP_1 est détectée dans les homogénats de la muqueuse de l'intestin grêle et du côlon du rat *Wistar*. Les taux varient de 4.5 à 10.9 U/ml.

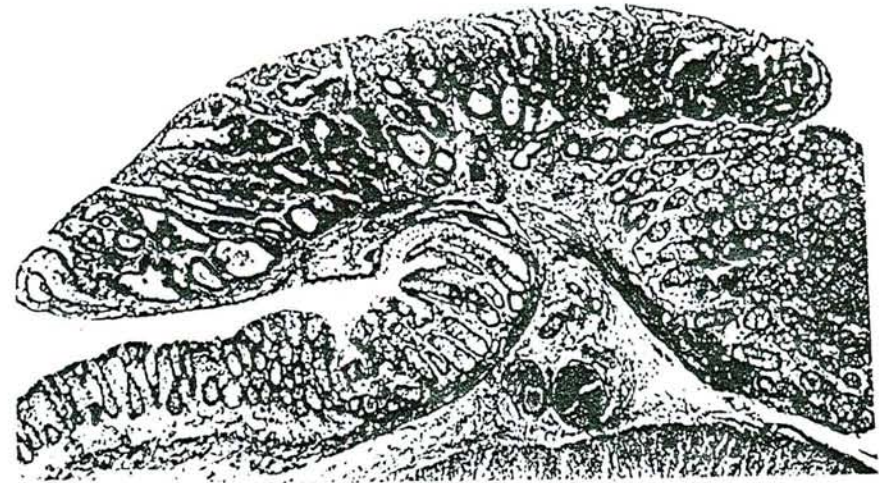
Figure 5: Distribution du taux de Lp1 selon les lots et les prélèvements



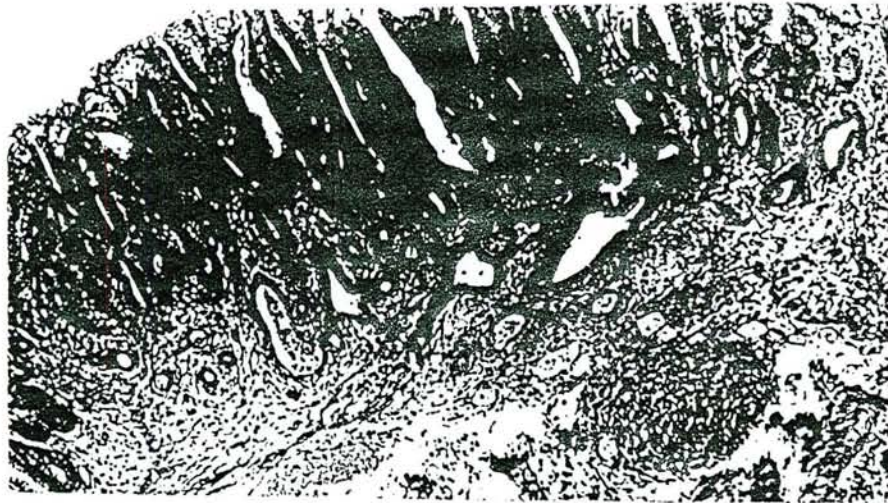
Lot 1: sans supplément calcique
 Lot 2: supplément= carbonate de calcium
 Lot 3: supplément= lactate de calcium
 Lot 4: supplément= gluconate de calcium



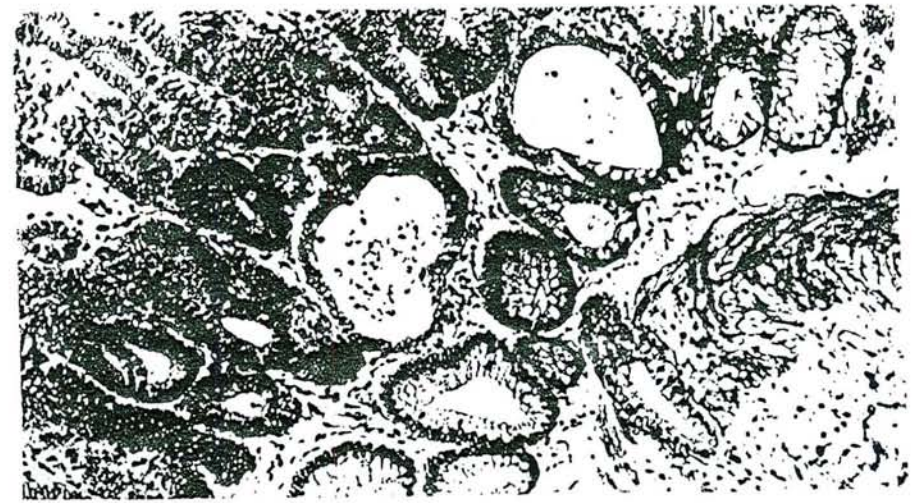
*Photo A: Côlon avec plusieurs polypes
(Rat 31; lot 2)*



*Photo B: Coupe longitudinale d'une lésion débutante
(Rat 42; lot 2)*



*Photo C: Zone dysplasique (dédifférenciation cellulaire)
(Rat 10; lot 1)*



*Photo D: Carcinome (glande envahissant la musculaire)
(Rat 42; lot 2)*

Le taux sérique de LP₁ tend à augmenter dans les dysplasies et les carcinomes du côlon (*figure 3*). Dans notre étude, la carcinogénèse est réellement associée avec une augmentation de la concentration de laminine (lots 1, 2, 3, et 4 *vs* contrôle). Cette augmentation correspond à la synthèse de laminine par les tumeurs, synthèse démontrée *in vitro* dans les cultures cellulaires de carcinomes colorectaux (D'Ardenne 1989).

Dans les lots expérimentaux, aucune différence significative n'est signalée en dépit d'une tendance à l'augmentation lors de la supplémentation en calcium (*figure 4*). Ni la supplémentation, ni l'interaction supplémentation-temps ne semblent influencer significativement le taux de LP₁ dans le sérum. Cependant, la LP₁ est en relation avec l'initiation chimique de la carcinogénèse par le NMU. En effet, on observe une augmentation significative de cette protéine dans les groupes instillés par le NMU par rapport au contrôle ($p \leq 0.001$).

La *figure 5* représente un scattergraphe montrant la distribution du taux de LP₁ sérique en fonction des lots et des prélèvements. L'analyse statistique du facteur temps indique une augmentation de la concentration de la LP₁ en fonction des prélèvements.

2-10: Anatomie pathologique (*photos A, B, C, D et tableau XIV*)

Après examen macroscopique du côlon (*photos A*), diverses formations sont décrites avec un degré de gravité croissant. La classification histopathologique révèle que les tumeurs polypoïdes sont les plus fréquemment observées (*photos B*). Ces tumeurs sont principalement des dysplasies (*photos C*). Très peu de lésions sont des adénocarcinomes invasifs (*photos D*).

L'incidence des tumeurs du côlon induites par le NMU sont résumées dans le *tableau XIV*. Il n'y a pas de différence significative concernant le taux d'infiltration. Aucune métastase n'est décelée.

L'incidence de tumeurs (pourcentage d'animaux avec tumeur), mesurée par les lésions néoplasiques totales diminuent significativement dans le lot 3 (supplémenté en lactate) relativement au lot 1 (non supplémenté en calcium) ($p \leq 0.05$) et au lot 4 (supplémenté en gluconate de calcium) ($p \leq 0.05$).

Notre étude montre que l'incidence des dysplasies est abaissée de 83.3% dans le lot 1 à 65.5% et 64.3% dans les lots 2 et 3 respectivement. L'analyse statistique des dysplasies totales montre des différences significatives entre le groupe 1 et les groupes 2 ($p \leq 0.05$) et 3 ($p \leq 0.05$). Aucun changement notable n'est observé dans le lot 4 sauf une augmentation significative des dysplasies moyennes par rapport au lot non supplémenté en calcium.

L'incidence des adénocarcinomes tend à diminuer dans les lots supplémentés en calcium; exception faite pour la forme carbonate qui n'a aucune influence. Ainsi, les carcinomes passent de 25% dans le lot non supplémenté à 10.7% et 6.7% respectivement

Tableau XIV

Nombre et (%) d'animaux atteints de tumeurs, et nombre de tumeurs par rat atteint

Temps de sacrifice		n	Dysplasies	Carcinomes	Tumeurs totales	Animaux sains	Nombre de tumeurs par rat atteint
26 semaines							
Lots	1	15	14 (93,3)	5 (33,3)	14 (93,3)	1 (6,7)	2,3
	2	15	10 (66,7)	5 (33,3)	12 (80,0)	3 (20,0)	3,8
	3	15	9 (60,0)	2 (13,3)	9 (60,0)	6 (40,0)	2,8
	4	15	12 (80,0)	1 (6,7)	13 (86,7)	2 (13,3)	2,6
34 semaines							
Lots	1	13	11 (84,6)	2 (15,4)	11 (84,6)	2 (15,4)	2,3
	2	14	9 (64,3)	2 (14,3)	10 (71,4)	4 (28,6)	1,7
	3	13	9 (69,2)	1 (7,7)	9 (69,2)	4 (30,8)	3,1
	4	15	13 (86,7)	1 (6,7)	13 (86,7)	2 (13,3)	1,8
Total							
Lots	1	28	25 (89,3)	7 (25,0)	25 (89,3)	3 (10,7)	2,3
	2	29	19 (65,5)	7 (24,1)	22 (75,9)	7 (24,1)	2,7
	3	28	18 (64,3)	3 (10,7)	18 (64,3)	10 (35,7)	2,9
	4	30	25 (83,3)	2 (6,7)	26 (86,7)	4 (13,3)	2,2
Analyse statistique							
1 vs 2			*	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
1 vs 3			*	N.S.	*	*	N.S.
1 vs 4			N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
2 vs 3			N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
2 vs 4			N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
3 vs 4			N.S.	N.S.	*	*	N.S.

Lots:

1: rats sans supplément calcique

2: rats supplémentés en carbonate de calcium

3: rats supplémentés en lactate de calcium

4: rats supplémentés en gluconate de calcium

Seuils de signification :

N.S.= non significatif

*** $p \leq 0,001$

** $p \leq 0,01$

* $p \leq 0,05$

dans les lots supplémentés en lactate et en gluconate de calcium. Toutefois, vu le nombre limité des adénocarcinomes, ces différences ne sont pas significatives.

Aucune différence n'est à signaler concernant les différents groupes au sujet de la localisation des tumeurs. Elles sont généralement localisées au niveau de l'instillation de la NMU, entre 7 et 8 cm de la marge anale.

Aucune différence significative n'est détectée non plus au sujet du nombre de tumeurs par rat atteint. On n'observe pas d'effet des suppléments calciques ni sur la taille ni l'infiltration des tumeurs.

Les durées de l'expérimentation (26 et 34 semaines) ne semblent avoir d'effet ni sur l'incidence ni sur le nombre de tumeurs par animal atteint.

2-11: Corrélations (tableau XV)

Le test non paramétrique de Spearman indique un coefficient de corrélation positif entre l'excrétion fécale journalière des stérols totaux et l'incidence des adénocarcinomes ($r = +0.31$; $p \leq 0.05$). Ceci est également observé par Hill *et al.* (1971) qui rapportent une corrélation entre les concentrations fécales élevées en stérols neutres et acides biliaires et l'incidence du cancer colique dans différentes populations. Les quantités de stéroïdes fécaux neutres et acides correspondent aux quantités de lipides ingérés (Shamberger 1984). La quantité de stérols neutres totaux des fèces et la concentration fécale du coprostanol sont également augmentées chez les rats *Wistar-Furth*.

L'incidence des dysplasies est corrélée avec la concentration (mg/g) et la quantité (mg/j) du cholestérol fécal ($r = +0.28$; $p \leq 0.05$) et ($r = +0.30$; $p \leq 0.05$) respectivement. La quantité fécale de cholestérol est également bien corrélée avec l'incidence des carcinomes ($r = +0.39$; $p \leq 0.01$). Notons, en outre, une corrélation positive ($r = +0.36$; $p \leq 0.01$) entre la synthèse de cholestérol et l'incidence des carcinomes.

La concentration fécale des phytostérols à la 34ème semaine est corrélée positivement avec l'incidence des dysplasies totales ($r = +0.28$; $p \leq 0.05$).

D'autre part, nos résultats montrent une association positive entre la quantité d'acides biliaires totaux excrétées quotidiennement et l'incidence des adénocarcinomes totaux ($r = +0.26$; $p \leq 0.05$). Dans la littérature, les acides biliaires (en quantités absolues) sont plus élevés chez les sujets avec un cancer du côlon (Crowther *et al.*, 1976). Nigro *et al.* (1973) ont observé qu'une augmentation des sels biliaires dans le côlon des rats après l'ingestion de cholestyramine a pour conséquence un nombre de tumeurs coliques plus grand. La synthèse des acides biliaires peut être influencée par l'état nutritionnel, la consommation alimentaire et le bilan du cholestérol. La présence de tumeurs dans le côlon peut modifier chacun de ces facteurs (Gilbert *et al.*, 1986).

Tableau XV
*Corrélations entre différents paramètres biochimiques
 et l'analyse anatomopathologique à 32 semaines expérimentales*

<i>Paramètres fécaux</i>	<i>Tumeurs</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
	<i>type</i>		
<i>Stérols neutres totaux (mg/j)</i>	<i>Carcinomes</i>	+ 0.31	*
<i>Cholestérol (mg/g)</i>	<i>Dysplasies</i>	+ 0.28	*
<i>Cholestérol (mg/j)</i>	<i>Carcinomes</i>	+ 0.39	**
<i>Cholestérol (mg/j)</i>	<i>Dysplasies</i>	+ 0.30	*
<i>Synthèse Cholestérol</i>	<i>Carcinomes</i>	+ 0.36	**
<i>Phytostérols (mg/g)</i>	<i>Dysplasies</i>	+ 0.28	*
<i>Acides biliaires totaux (mg/j)</i>	<i>Carcinomes</i>	+ 0.26	*
<i>Acides biliaires secondaires (mg/j)</i>	<i>Carcinomes</i>	+ 0.27	*
<i>DCA (mg/j)</i>	<i>Carcinomes</i>	+ 0.32	**
<i>LCA (mg/j)</i>	<i>Carcinomes</i>	+ 0.25	*

Seuils de signification:

N.S.= non significatif

**** $p \leq 0,001$*

*** $p \leq 0,01$*

** $p \leq 0,05$*

Les divergences entre les différents travaux peuvent provenir du mode de présentation des résultats (concentration vs quantité).

De plus, le test non paramétrique des rangs de Spearman révèle une corrélation positive ($r = +0.27$; $p \leq 0.05$) entre l'excrétion journalière d'acides biliaires secondaires et l'incidence des adénocarcinomes. Signalons enfin des associations entre le DCA (mg/j) et l'incidence des adénocarcinomes ($r = +0.32$; $p \leq 0.01$) et entre le LCA (mg/j) et l'incidence des adénocarcinomes ($r = +0.25$; $p \leq 0.05$). Chez les rats conventionnels et sans germes, le LCA et le DCA sont des promoteurs de la formation des adénocarcinomes coliques (Reddy *et al.*, 1976^b). Chez les rats *Wistar-Furth* (souche de rats connue pour développer des cancers coliques spontanés), la concentration fécale des acides biliaires et surtout du DCA est significativement plus élevée que chez les animaux témoins (Hayashi *et al.*, 1986). Stadler *et al.* (1988^a) observent également une corrélation positive entre l'index de prolifération cellulaire et le taux des acides biliaires dans les selles et particulièrement l'acide lithocholique.

3: Conclusions

Nous avons utilisé dans notre étude une surcharge lipidique (24%) car les régimes hyperlipidiques sont considérés par la plupart des études comme promoteurs de la carcinogenèse colique chimio-induite (Beaty *et al.*, 1993). Ce pourcentage représente la quantité moyenne habituellement consommée dans les pays occidentaux. De plus, il a été reporté que le calcium inhibe la tumorigenèse lorsque les animaux consomment un régime hyperlipidique mais non quand ils sont nourris avec un régime pauvre en lipides (Karkare *et al.*, 1991; McSherry *et al.*, 1989; Nelson *et al.*, 1987; Pence & Buddingh 1988).

Les résultats présentés nous renseignent sur le rôle des lipides saturés dans la carcinogenèse colique chimio-induite chez le rat *Wistar* et le rôle protecteur du calcium.

3-1: Rôle des lipides saturés

Les lipides alimentaires saturés, en présence de NMU, augmentent l'incidence des dysplasies et des carcinomes. Ce sont donc des promoteurs potentiels de la carcinogenèse du côlon chez le rat *Wistar*.

Les études de laboratoire sur des animaux suggèrent que les lipides alimentaires sont responsables de la promotion plutôt que de l'initiation des cancers du côlon (Bull *et al.*, 1979; Reddy 1987). En temps que promoteurs, les lipides amplifient, accélèrent ou stimulent l'émergence de tumeurs à partir de cellules exposées à un initiateur.

La promotion de la carcinogenèse colique par les lipides saturés est observée chez plusieurs souches de rats (Bull *et al.*, 1979; Nigro *et al.*, 1975; Reddy *et al.*, 1977^{a,c,d}). Alors que certaines études montrent que le degré de désaturation n'altère pas l'augmentation de la tumorigenèse par les lipides (Trudel *et al.*, 1983), d'autres rapportent par contre que les régimes riches en acides gras polyinsaturés (huiles de maïs et de carthame) entraînent une incidence plus grande (Reddy et Maeura 1984) ou une fréquence plus élevée (Broitman *et al.*, 1977) que les régimes apportant des acides gras monoinsaturés (huiles de noix de coco ou d'olive).

La stimulation de la tumorigenèse serait en relation avec la peroxydation des acides gras (Bull *et al.*, 1984). Les lipides peroxydés en effet, sont spécialement agressifs pour les colonocytes et particulièrement capables d'induire la synthèse de l'ADN et de stimuler l'activité de l'ornithine décarboxylase (ODC). La nature des lipides administrés a été bien étudiée. Les acides gras, particulièrement sous forme ionisée, sont expérimentalement responsables de l'irritation du côlon et donc de la réponse inflammatoire locale (Bird *et al.*, 1985; Wargovich *et al.*, 1984).

Ainsi, les acides gras polyinsaturés sont suspectés de promouvoir plus fortement

la carcinogénèse colique que les acides gras saturés (Zhao *et al.*, 1991). Par contre, Bird et Bruce (1983) signalent que la fréquence des aberrations nucléaires dans le côlon des animaux consommant des produits riches en graisses animales est significativement élevée. Nicholson *et al.* (1990) renforce cette suggestion en observant que les lipides riches en acide linoléique produisent moins de tumeurs que les lipides saturés. Ceci rejoint également les conclusions de la plupart des études épidémiologiques qui suggèrent que les lipides saturés sont des facteurs de risque importants du cancer du côlon (Willett 1990^{a,b}). Lapré *et al.* (1992) affirment que l'excrétion intense des acides gras causée par le supplément de calcium est dépendante du type de lipides. Le calcium se lie différemment en fonction du type d'acide gras. Ainsi, les savons de calcium sont augmentés par les acides gras saturés à longue chaîne et diminués par les acides gras polyinsaturés (Jandacek 1991).

3-2: Influence des différentes formes de calcium

Nous avons testé trois différentes formes dans une même étude afin de limiter les difficultés de comparaison, et de déterminer les mécanismes par lesquels ces différentes formes peuvent éventuellement protéger lors de la genèse du cancer colique induit par la NMU. Les résultats de cette deuxième expérimentation indiquent que la protection par le calcium est dépendante de sa forme chimique.

En effet, le lactate de calcium semble mieux protéger que le gluconate et le carbonate de calcium. Dans la littérature décrite précédemment, seul le lactate de calcium paraît faire l'unanimité chez les auteurs. C'est la forme qui réduit le nombre de tumeurs totales en agissant principalement sur l'étape (ou les étapes) permettant le passage de la cellule normale aux dysplasies. Il diminue également le nombre de carcinome totaux. Cependant, vu le nombre restreint d'animaux atteints de carcinomes, la diminution dont le lactate (et le gluconate) de calcium sont responsables, n'est pas statistiquement significative.

Nos résultats indiquent aussi que les formes carbonate et gluconate ne protègent pas efficacement contre la tumorigénèse et que leur action n'est pas similaire. Alors que le gluconate de calcium diminue le nombre de carcinomes, il reste sans aucun effet sur le nombre de dysplasies. D'où l'idée que le gluconate de calcium aurait un effet sur la transition biologique de la dysplasie en adénocarcinome. A ce propos, Bertram *et al.* (1991), suggèrent que le calcium réduit le nombre de carcinomes infiltrants sans modifier le nombre de tumeurs totales. Par contre, le carbonate de calcium, qui est sans effet sur cette étape, inhiberait le passage des cellules normales à la dysplasie.

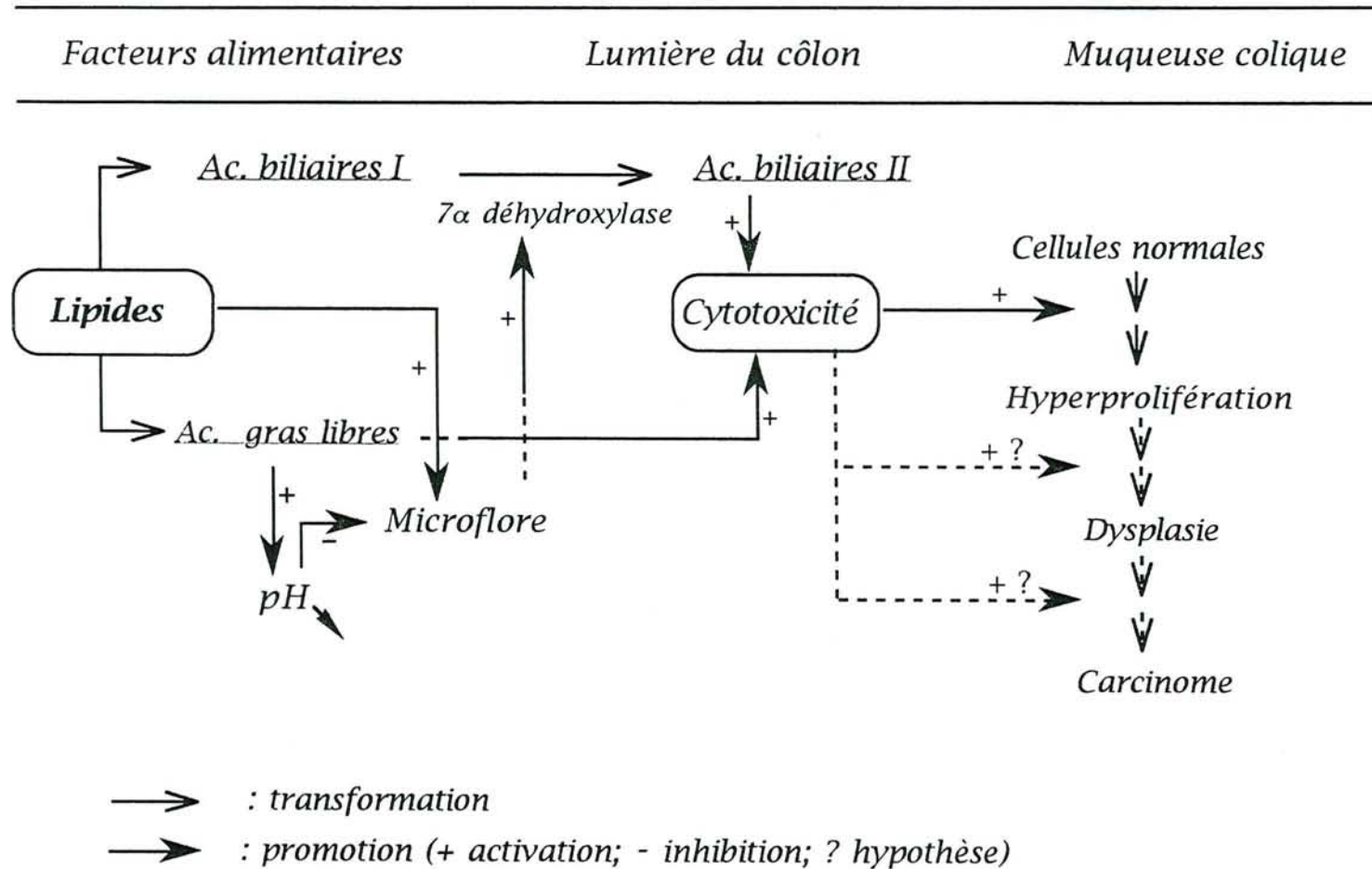
3-3: La laminine P₁:

La carcinogenèse est réellement associée à une augmentation de la laminine P₁ (groupes 1, 2, 3 et 4 vs T). La LP₁ du sérum peut être utilisée pour détecter les carcinomes du côlon chez le rat. Le taux de LP₁ est augmenté dans les dysplasies ou les carcinomes portés par les rats. Cette augmentation correspondrait à la synthèse de laminine par la tumeur (Felden *et al.*, 1991; D'Ardennes 1989). Cette hypothèse est démontrée dans les cultures de cellules cancéreuses du côlon (Stallmach 1990).

Seulement, si le taux sérique de cette protéine dépend du calcium (comme probablement d'autres facteurs), il faudrait en tenir compte lors de son utilisation, comme marqueur tumoral, dans les études d'intervention. L'augmentation importante du taux de LP₁ dans les lots supplémentés en calcium laisse supposer que ce minéral induit une synthèse accrue de laminine. Le calcium joue un rôle important dans la polymérisation de laminine (), et toute modification des concentrations calciques au niveau intestinal pourrait influencer le taux de cette protéine.

Conclusions générales

Schéma 3 : Effets promoteurs des lipides lors de la carcinogénèse colique



1: Mécanismes de promotion par les lipides

Une part importante des recherches expérimentale et épidémiologique est l'identification d'une connexion métabolique possible entre les lipides alimentaires et le cancer du côlon. L'un des aspects de ces investigations est l'examen de l'excrétion fécale des stéroïdes.

L'analyse du cholestérol et de ses métabolites est le reflet non seulement de l'excrétion biliaire et de la sécrétion externe mais également du métabolisme microbien.

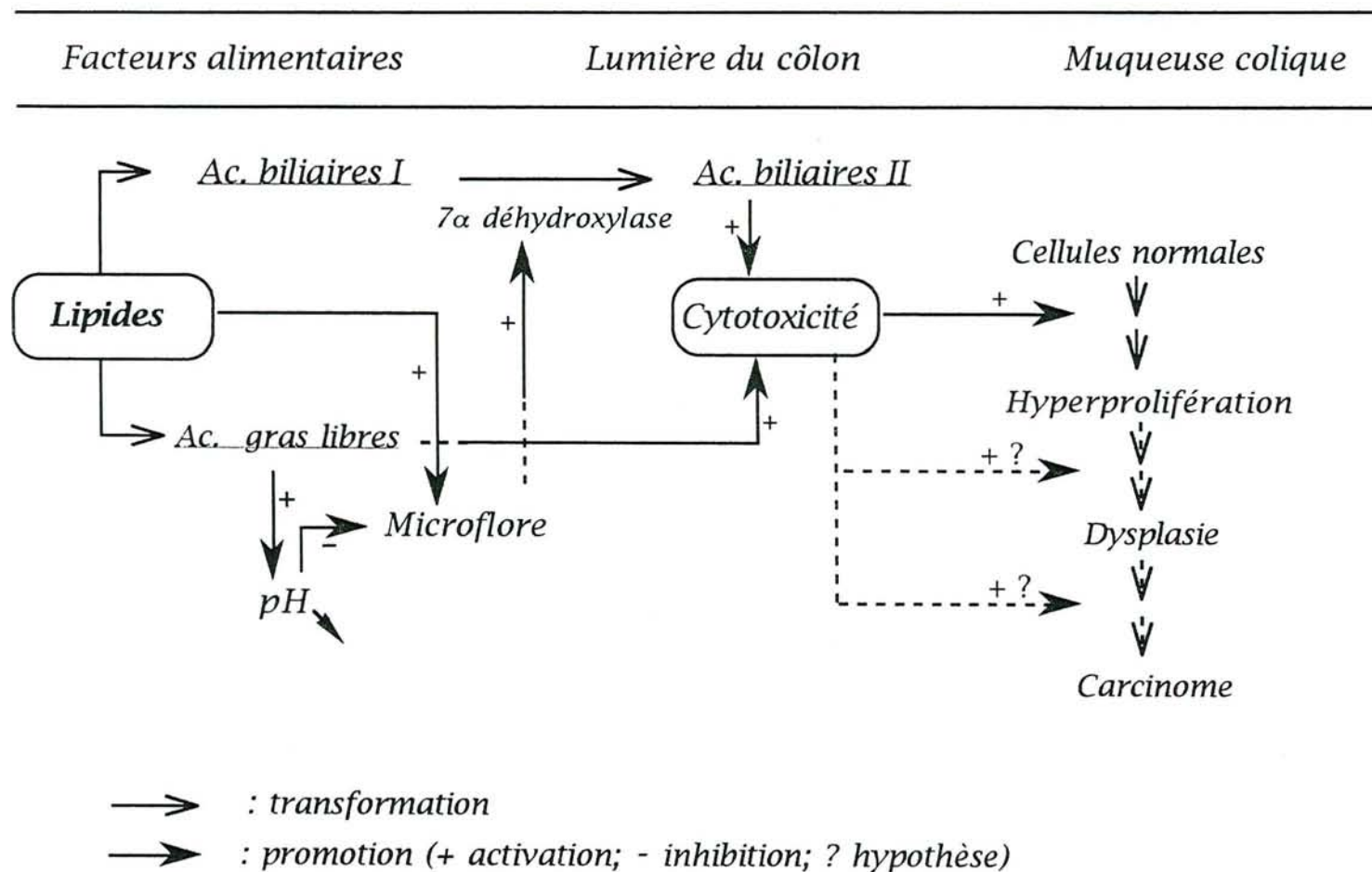
Nos résultats font état d'une augmentation des stérols fécaux totaux lors de l'enrichissement du régime en lipides. Le profil de ces stérols semble dépendre, entre autres, de la composition en acides gras des lipides. En effet, l'huile de tournesol (riche en acides gras *n-6*) utilisée dans la première expérimentation provoque une augmentation de la transformation bactérienne du cholestérol en coprostanol. Par contre les acides gras saturés (*végétaline*) ne modifient pas la proportion du coprostanol. Le rapport coprostanol/stérols animaux n'est pas corrélé avec l'incidence des tumeurs, ce qui semble contredire certaines données de la littérature.

Cependant, la synthèse de cholestérol, qui est positivement associée à l'incidence des adénocarcinomes, est augmentée dans la deuxième expérimentation. S'agit-il d'une saturation de l'activité enzymatique bactérienne transformant le cholestérol en coprostanol ou d'une compétition avec les phytostérols (qui subissent les mêmes transformations microbiennes) présents dans la *végétaline* ?

Par ailleurs, le mécanisme le plus plausible par lequel les lipides pourraient promouvoir le cancer du côlon est le changement de la concentration et de la quantité des acides biliaires fécaux (*schéma 3*). Ces composés représentent les produits du métabolisme du cholestérol, provenant aussi bien de la lumière intestinale que de la matière bactérienne.

Un effet important des régimes hyperlipidiques observé dans notre étude est l'augmentation significative de la concentration et de l'excrétion du DCA et du LCA. Dans le cas où le régime est hyperlipidique, la flore est surtout anaérobie et les acides biliaires primaires sont convertis en acides biliaires secondaires (DCA et LCA) (Statland 1992). Nos résultats tendent à démontrer que l'excrétion fécale totale des acides biliaires et acides gras est le médiateur de la carcinogenèse confirmant ainsi d'autres travaux notamment ceux de Newmark *et al.*, (1984), Wargovich *et al.*, (1983 et 1984).

Schéma 3 : Effets promoteurs des lipides lors de la carcinogénèse colique



2: Mécanismes de protection par le calcium

Dans les études précédentes, les résultats de la protection ou non du calcium alimentaire vis-à-vis de la carcinogenèse du côlon chez le rat sont souvent contradictoires et suggèrent une importance de la forme chimique de cet élément minéral.

Notre étude avait pour objectif de contribuer à améliorer la compréhension des mécanismes et du rôle varié des différentes formes de calcium dans la protection lors de la carcinogenèse colique. Seul le lactate de calcium paraît avoir un rôle protecteur en réduisant d'abord sur le nombre de dysplasies et ensuite le nombre de carcinomes. Le carbonate de calcium supplémentaire diminue les dysplasies mais n'intervient pas sur l'étape permettant l'évolution des dysplasies en carcinomes. Enfin le gluconate de calcium donné en supplément ne semble pas diminuer significativement le nombre de tumeurs qu'elles soient dysplasiques ou malignes.

L'administration du calcium inhibe l'hyperprolifération des cellules coliques probablement en se liant aux acides biliaires et gras pour former des savons inertes (Newmark *et al.*, 1984), ou directement en affectant le cycle cellulaire, réduisant la prolifération et induisant la différenciation terminale des cellules de l'épithélium du côlon (Buset *et al.*, 1987).

Selon la forme de calcium, le calcium peut agir:

- par voie intraluminaire, surtout en présence de régime hyperlipidique, par la formation de savons inertes et insolubles;
- localement sur la muqueuse, en particulier lorsque le résidu qui accompagne l'ion calcium est fermentescible ou métabolisable modifiant l'environnement basique du côlon;
- et/ou systémiquement, lorsque la forme du sel de calcium est bien absorbée.

Nous disposons de plusieurs moyens pour analyser les mécanismes d'action des différentes formes de calcium:

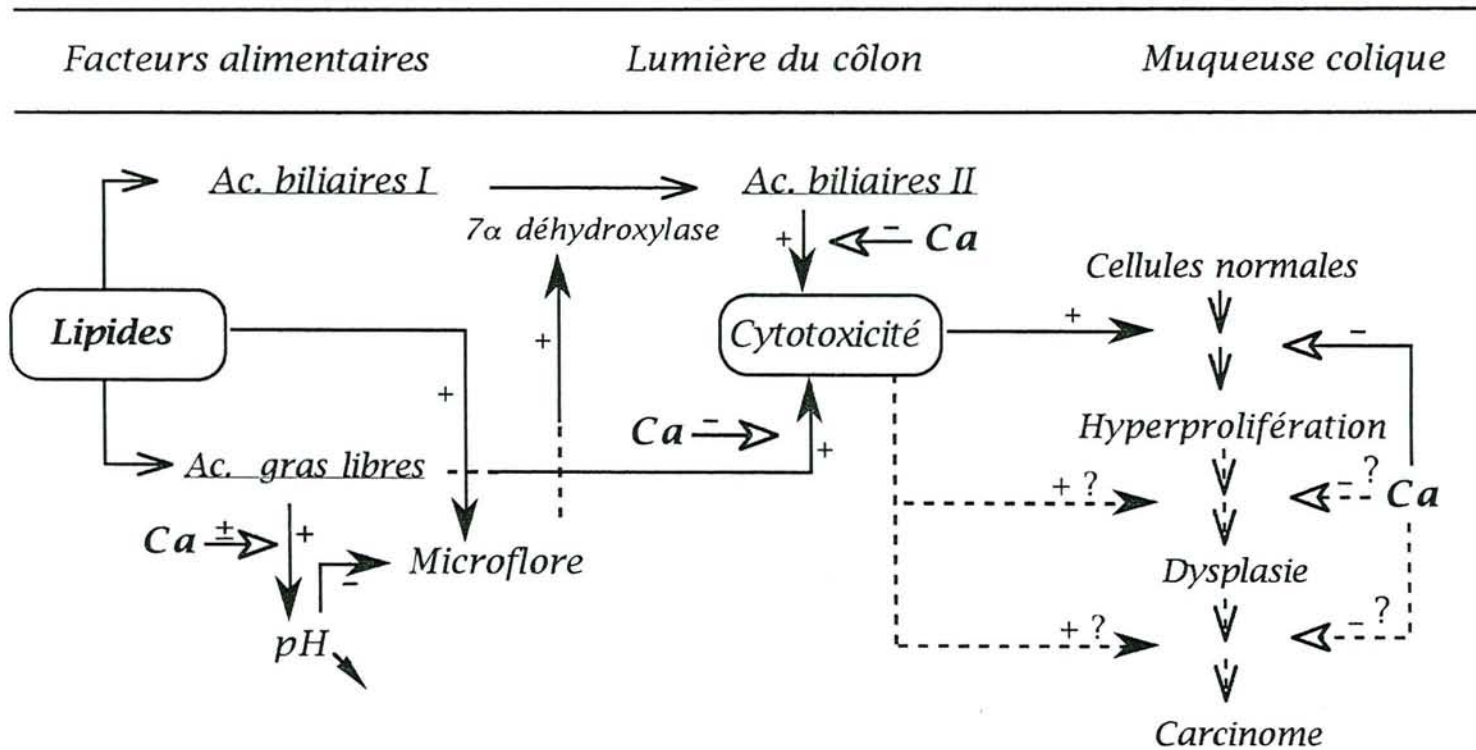
- quantités excrétées de calcium en relation avec l'excrétion fécale des acides biliaires et acides gras et donc la formation de savons;
- quantité de calcium retenue en relation avec la solubilité chimique du minéral;
- dégradations bactériennes en relation avec le pH colique.

Les modes d'action de réduction de la prolifération par le calcium sont illustrés par le schéma 4.

Action luminale:

Un régime hyperlipidique comme le régime occidental typique est capable de provoquer une hyperprolifération aussi bien chez les rongeurs que chez l'homme

Schéma 4: Effets modulateurs du calcium sur la carcinogénèse colique



- : transformation
- : promotion (+ activation; - inhibition)
- : modulation (- inhibition; ± inhibition ou activation selon le sel de calcium)
- ? : inconnu

(Bostick *et al.*, 1993^{a,b}). Ces changements sont dus en partie à l'augmentation de la production des acides biliaires et gras, qui par leur toxicité pour l'épithélium, entraînent une hyperprolifération compensatoire (Wargovich *et al.*, 1984; Deschner *et al.*, 1982).

Dans notre expérimentation, le lactate et le carbonate de calcium alimentaires agissent en se liant avec les acides biliaires et les acides gras diminuant de ce fait leur effet mitogène sur la muqueuse intestinale.

En effet, les régimes supplémentés en ces deux sels de calcium sont ceux qui:

- provoquent une excrétion fécale de calcium et une absorption calcique plus importantes;
 - induisent une plus grande augmentation du pH des selles;
 - se traduisent par un flux d'acides biliaires et de stérols plus accrus;
- et enfin dont l'influence sur le nombre de dysplasies est significative.

Toutefois, l'action anticarcinogénique indirecte du Ca^{2+} proposée par Newmark *et al.* (1984) n'est confirmée que partiellement par nos résultats puisque le carbonate de calcium ne réduit pas significativement le nombre de tumeurs totales.

Action locale:

Pour comprendre les mécanismes par lesquels le calcium influence le métabolisme des acides biliaires, nous avons étudié l'effet de cet élément minéral sur leur composition ainsi que sur le pH des selles lyophilisées.

L'ingestion des différentes formes de calcium modifie graduellement les transformations bactériennes. Plusieurs de ces changements sont similaires et ne varient pas avec le sel de calcium donné en supplément. Par contre, les différentes formes de calcium ont des effets différents sur le pH fécal et sur la carcinogenèse colique. Ces changements de pH peuvent influencer la flore intestinale et la solubilité des acides biliaires fécaux et des savons (Behling *et al.*, 1990^{a,b}).

L'effet limité du carbonate de calcium peut être relié à l'augmentation du pH fécal comme l'avaient suggéré Behling *et al.*, (1990^a) ainsi que Behling et Greger (1988). La possibilité qu'a le calcium à former des savons avec les acides gras libres et les acides biliaires contribue à augmenter le pH du côlon (Newmark & Lupton 1990). Les formes organiques du calcium (lactate et gluconate) tendent à diminuer cette alcalinisation probablement à travers leur susceptibilité d'être fermentées (Wargovich & Baer 1989). Cependant, nos résultats indiquent que cette acidification relative est limitée par d'autres contraintes de l'environnement. Les mesures du pH fécal montrent une faible acidification des contenus coliques durant toute l'expérimentation (Wargovich *et al.*, 1990).

La forme de calcium peut affecter le pH fécal; et l'acidification du contenu du côlon peut être un mécanisme de protection (Nelson *et al.*, 1987). L'abaissement du pH

du côlon inhibe la 7α déhydroxylase qui est responsable de la formation des acides biliaires secondaires cytotoxiques à partir des acides biliaires primaires (Dwivedi *et al.*, 1989).

L'action locale n'est donc pas totalement vérifiée par nos résultats car le gluconate et le lactate de calcium sont les sels qui:

- atténuent l'alcalinisation des selles due à la chélation des acides gras et biliaires par le calcium;
- agissent différemment puisque la forme gluconate est sans effet sur l'apparition des dysplasies bien qu'elle tende à arrêter le processus de carcinogenèse en diminuant l'incidence des carcinomes.

Action systémique:

Le calcium est un important médiateur de plusieurs processus biologiques. En étudiant les effets du calcium alimentaire sur le risque de cancer colique, une distinction s'avère indispensable concernant les effets directs du calcium sur l'épithélium du côlon et les effets médiés par la liaison avec les acides gras et biliaires.

Nos résultats montrent que le calcium n'agit pas uniquement par voie systémique car le gluconate est le sel de calcium:

- qui entraîne la plus faible excrétion fécale de calcium, d'acides gras et biliaires;
- qui est la moins retenue;
- et qui protège le moins vis-à-vis de la carcinogenèse.

Certains résultats d'études *in vitro* indiquent que les effets favorables du calcium sont la conséquence d'une influence directe sur la prolifération cellulaire (Welberg *et al.*, 1991). Actuellement, on connaît certaines voies principales par lesquelles le Ca^{2+} et la vitamine D_3 peuvent affecter la carcinogenèse du côlon. Les cellules normales du côlon nécessitent une faible quantité (0.1 mM) de Ca^{2+} pour proliférer normalement. Lorsque la quantité de Ca^{2+} est physiologique ou sub-physiologique (1.0 à 6.0 mM), la prolifération est stoppée et la différenciation est probablement déclenchée (Whitfield 1991). L'exposition à des concentrations physiologiques de Ca^{2+} arrête également la prolifération des cellules pré-malignes et retarde ou inhibe la formation de tumeurs et la progression néoplasique. La vitamine D_3 peut inhiber la prolifération de ces cellules pré-malignes en les sensibilisant au Ca^{2+} et en stimulant l'absorption calcique. Seulement, cette action directe est limitée car le Ca^{2+} provoque l'expansion clonale de cellules précancéreuses (Lipkin *et al.*, 1989). Les concentrations de Ca^{2+} physiologiques n'arrêtent pas la prolifération de ces cellules (Whitfield 1991).

Conclusion:

L'effet protecteur du calcium se manifeste selon différents mécanismes. Le supplément lactate de calcium agirait simultanément selon les trois voies (luminale, systémique). Il inhibe directement la cytotoxicité des acides gras et biliaires sur les cellules coliques par chélation et formation de savons insolubles. Il diminue également l'hyperprolifération des colonocytes, probablement par induction de leur différenciation. L'action locale (acidification du contenu colique) est envisageable bien que le pH du côlon n'a pu être mesuré.

De plus, en fonction de sa forme, le supplément calcique semble agir préférentiellement soit sur l'étape de promotion soit sur celle de progression soit sur les deux.

Ainsi, le carbonate de calcium inhiberait l'étape qui aboutit aux dysplasies (promotion), le gluconate de calcium agirait en freinant le passage des dysplasies aux carcinomes (progression), alors que le lactate de calcium semble intervenir au niveau des deux étapes.

3: Perspectives

Les effets du calcium se manifestent à plusieurs niveaux et l'action de ce minéral est probablement luminale, systémique et locale. En effet, le lactate de calcium étant la forme la plus efficace, agit par l'augmentation de l'absorption calcique, par la diminution relative de l'acidité des selles, et par une excrétion fécale accrue d'acides gras et d'acides biliaires.

Ces effets dépendent non seulement de la forme du supplément calcique, mais aussi du type d'acides gras des lipides. En effet, la tumorigenèse n'est pas réduite par le calcium lorsque le régime est enrichi en acides gras polyinsaturés n-6 (première expérimentation). Par contre, en utilisant des acides gras saturés (deuxième expérimentation), le calcium agit selon les mécanismes détaillés plus haut. Ces constatations supportent les travaux de Lapré et al. (1992) qui font état des mêmes conclusions avec des lipides saturés ou non et du phosphate de calcium comme supplément.

Plusieurs marqueurs peuvent être pris en compte pour évaluer l'impact du régime sur la tumorigenèse. On remarque que le lactate de calcium provoque une diminution de:

- la synthèse de cholestérol; laquelle est bien corrélée dans notre étude à l'incidence des carcinomes;*
- la transformation microbienne du cholestérol en coprostanol;*
- la voie I du métabolisme des acides biliaires.*

La plupart des études épidémiologiques, expérimentales et cliniques tendent à démontrer le rôle bénéfique du calcium dans la prévention du cancer du côlon. Nos résultats montrent clairement que le calcium joue un rôle clé dans la protection vis à vis de la carcinogenèse induite chimiquement chez le rat Wistar. Les actions directe (Newmark et al., 1984) indirecte (Buset et al., 1987) sont retrouvées dans notre étude. Ainsi le calcium agirait comme protecteur via la chélation des acides biliaires et surtout des acides gras et à travers la diminution de la prolifération cellulaire.

La recherche des mécanismes régissant l'intervention du calcium dans la carcinogenèse colique n'est qu'à ses débuts et d'autres études sont nécessaires pour en cerner la complexité.

L'analyse du profil lipidique sanguin doit être envisagée afin d'éclaircir l'influence du calcium sur le cholestérol et les lipoprotéines.

Le rôle du pH des contenus coliques mesuré par des méthodes directes, serait intéressant à déterminer en vue d'en évaluer l'importance sur le comportement physico-chimique des acides gras et biliaires en présence de sels de calcium.

De plus, l'utilisation des techniques isotopiques est nécessaire pour suivre le métabolisme du cholestérol et des stéroïdes et pour déterminer le flux des acides biliaires dans les différents compartiments de l'intestin.

Ces techniques isotopiques permettent également d'évaluer la prolifération cellulaire et déceler précocement les éventuelles anomalies cellulaires. Pour cela, de plus en plus de travaux s'appuient sur la détermination du "labeling index" (LI) en utilisant la thymidine tritiée ou la bromodéoxyuridine marquée.

L'expérimentation animale de long terme, avec tous les aléas qu'elle comporte, demeure toutefois indispensable dans les études de carcinogenèse. Une alternative à l'instillation intrarectale de la NMU devrait être permettre l'usage (per os) de microcapsules délivrant le carcinogène au niveau du côlon.

Si les résultats que nous avons obtenus se confirmaient, les perspectives de la chimioprévention de cancer colique seraient intéressantes. Les essais d'intervention menés sur l'homme devront tenir compte de la forme du sel de calcium supplémentaire.

La prévention passe par des conseils simples et des recommandations qui permettraient une diminution des risques. Elle consiste essentiellement à diminuer l'apport lipidique global vers 25% des calories, avec un équilibre entre les acides gras saturés, mono- et polyinsaturés de l'ordre 1:1:1, à augmenter l'apport de fibres vers 30g/j provenant de légumes verts et de fruits. On peut également encourager la consommation de poissons et de lait partiellement

écrémé (riche en calcium).

Mais ne faudrait-il pas surtout conseiller une modification des habitudes alimentaires et une hygiène de vie plus saine?

Références bibliographiques

- ALDER R.J., MAC KEOWN-EYSSSEN G. Calcium intake and risk of colorectal cancer. *Front. Gastrointest. Res.* 1988; 14: 177-187.
- ALDER R.J., MAC KEOWN-EYSSSEN G., BRIGHT-SEE E. Randomized trial of the effect of calcium supplementation on fecal risk factors for colorectal cancer. *Am. J. Epidemiol.* 1993; 138: 804-814.
- AMMON H.V., THOMAS P.J., PHILLIPS S.F. Effect of oleic and ricinoleic acids on net jejunal water and electrolyte movement. Perfusion studies in man. *J. Clin. Invest.* 1974; 53: 374-379.
- AMMON H.V., PHILLIPS S.F. Fatty acids inhibit intestinal water absorption in man. *Fatty acid diarrhoea. Gastroenterol.* 1972; 62: 717-718.
- ANDRIEUX C., GADELLE D., LEPRINCE C., SACQUET E. Effects of some poorly digestible carbohydrates on bile acid transformation in the rat. *Br. J. Nutr.* 1989; 62: 103-119.
- ANTONIS A., BERSOHN I. The influence of diet on faecal lipids in South African White and Bantu prisoners. *Am. J. Clin. Nutr.* 1962; 11: 142-155.
- APPLETON G.V.N., BRISTOL J.B., WILLIAMSON R.C.N. Increased dietary calcium and small bowel resection have opposite effects on colonic cell turnover. *Brit. J. Surg.* 1986; 73: 1018-1021.
- APPLETON G.V.N., BRISTOL J.B., WILLIAMSON R.C.N. Calcium reduces colonic cell turnover in both normal and hyperproliferative states. *Coloproctology* 1987^a; 9: 94-98.
- APPLETON G.V.N., DAVIES P.W., BRISTOL J.B., WILLIAMSON R.C.N. Inhibition of intestinal carcinogenesis by dietary supplementation with calcium. *Brit. J. Surg.* 1987^b; 74: 523-525.
- APPLETON G.V.N., OWEN R.W., WHEELER E.E., CHALLACOMBE D.N., WILLIAMSON R.C.N. Effect of dietary calcium on the colonic luminal environment. *Gut* 1991; 32: 1374-1377.
- ARIES V.C., CROWTHER J.W., DRASAR B.S., HILL M.G., WILLIAMS R.E.O. Bacteria and aetiology of cancer of the large bowel. *Gut* 1969; 10: 334-335.
- ARLOW F.L., WALCZAK S., MAJUMDAR A.P.N. Attenuation of azoxymethane (AOM)-induced colonic mucosal ornithine decarboxylase (ODC) and tyrosine kinase (TYR-K) activity by calcium in rats. *Gastroenterol.* 1989; 96: A74 (Abstract).
- ARMSTRONG B., DOLL R. Environmental factors and cancer incidence and mortality in different countries with special reference to dietary practices. *Int. J. Cancer* 1975; 15: 617-631.
- AWAD A.B., CHATTOPADHYAY J.P., DANAHY M.E. Effect of dietary fat composition on rat colon plasma membranes and fecal lipids. *J. Nutr.* 1989; 119: 1376-1382.
- AWAD A.B., SHORT M.E., FINK C.S. Effect of excess dietary calcium on colon mucosal membranes and fecal lipids. *Lipids* 1989; 25: 379-382.
- BAER A.R., WARGOVICH M.J. Dietary calcium and vitamin D₃ (vit. D) inhibit ornithine decarboxylase (ODC) activity induced by bile acids. *FASEB J.* 1989; 3: A469 (Abstract).
- BALISH E., SHIH C.N., CROFT W.A., PAMUKCU A.M., LOWER G., BRYAN G.T., YALE C.E. Effect of age, sex and intestinal flora on the induction of colon tumours in rats. *J. Natl. Cancer Inst.* 1977; 58: 1103-1106.
- BANSAL B.R., RHOADS J.E., BANSAL S.C. Effects of diet on colon carcinogenesis and the immune system in rats treated with 1,1-dimethylhydrazine. *Cancer Res.* 1978; 38: 3293-3303.

BAYERDÖRFFER E., MANNES G.A., RICHTER W.O., OCHSENKÜHN T., WIEBECKE B., KÖPCKE W., PAUMGARTNER G. Increased serum deoxycholic acid levels in men with colorectal adenomas. *Gastroenterol.* 1993; 104: 145-151.

BEATY M.M., LEE E.Y., GLAUERT H.P. Influence of dietary calcium and vitamin D on colon epithelial cell proliferation and 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis in rats fed high fat diets. *J. Nutr.* 1993; 123: 144-152.

BEDENNE L. Populations et sujets à risque de cancer colorectal. *Path. Biol.* 1991; 39: 902-903.

BEHLING A.R., GREGER J.L. Mineral metabolism of ageing female rats fed various commercially available calcium supplements or yoghurt. *Pharmacol. Res.* 1988; 5: 501-505.

BEHLING A.R., KAUP S.M., CHOQUETTE L.L., GREGER J.L. Lipid absorption and intestinal tumour incidence in rats fed on varying levels of calcium and butterfat. *Brit. J. Nutr.* 1990^a; 64: 505-513.

BEHLING A.R., KAUP S.M., GREGER J.L. Changes in intestinal function of rats initiated with DMH and fed varying levels of butterfat, calcium, and magnesium. *Nutr. Cancer* 1990^b; 13: 189-199.

BERTRAM I., COHEN B.I., MOSBACH E.H. Effects of bile acids and sterols in animal models of colorectal cancer. In *Calcium, vitamin D, and prevention of colon cancer*. M Lipkin, HL Newmark, G Kelloff (eds.). CRC Press Boca Raton 1991; 209-227.

BIDOLI E., FRANCESCHI S., TALAMINI R., BARRA S., LA VECCHIA C. Food consumption and cancer of the colon and rectum in north-eastern Italy. *Int. J. cancer* 1992; 50: 223-229.

BIKLE D.D., MORISSEY R.L., ZOLOCK D.T., RASMUSSEN H. The intestinal response to vitamin D. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 1981; 89: 63-142.

BINGHAM S.A. Meat, starch and non starch polysaccharides and large bowel cancer. *Am. J. Clin. Nutr.* 1988; 48: 762-767.

BIRD R.P., BRUCE W.R. Toxicity of dietary components to colonic mucosa *in vivo*. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 1983; 24: 89 (Abstract).

BIRD R.P., MEDLINE A., FURRER R. BRUCE W.R. Toxicity of oral administered fat to the colonic epithelium of mice. *Carcinogenesis* 1985; 6: 1063-1066.

BIRD R.P., SCHNEIDER R., STAMP D., BRUCE W.R. Effect of dietary calcium and cholic acid on the proliferation indices of murine colonic epithelium. *Carcinogenesis* 1986; 7: 1657-1671.

BIRT D.F. Fat and calorie effects on carcinogenesis at sites other than the mammary gland. 1987; 45: 203-209. BIRT D.F. Fat and calorie effects on carcinogenesis at sites other than the mammary gland. 1987; 45: 203-209.

BOSTICK R.M., POTTER J.D., SELLERS T.A., MC KENZIE D.R., KUSHI L.H., FOLSOM A.R. Relation of calcium, vitamin D, and dairy food intake to incidence of colon cancer among older women. *Am. J. Epidemiol.* 1993^a; 137: 1302-1317.

BOSTICK R.M., POTTER J.D., FOSDICK L., GRAMBSCH P., LAMPE J.W., WOOD J.R., LOUIS T.A., GANZ R., GRANDITS G. Calcium and colorectal epithelial cell proliferation: a preliminary randomised, double-blinded, placebo-controlled clinical trial. *J. Natl. Cancer Inst.* 1993^b; 85: 132-141.

BRESALIER R.S., KIM Y.S. Diet and colon cancer putting the puzzle together. *Editorial. New Engl. J. Med.* 1985; 313: 1413-1414.

- BREUER N., GOEBELL H. The role of bile acids in colonic carcinogenesis. *Klin. Wochenschr.* 1987; 63: 97-105.
- BROITMAN S.A., VITALE J.J., JUKABA E.V., GOTTLIEB L.S. Polyunsaturated fat, cholesterol and large bowel tumorigenesis. *Cancer* 1977; 40: 2455-2463.
- BRONNER F. Nutrient bioavailability, with special reference to calcium. *J. Nutr.* 1993; 123: 797-802.
- BRUCE W.R. Recent hypotheses for the origin of colon cancer. *Cancer Res.* 1987; 47: 4237-4242.
- BULL A., BIRD R.P., BRUCE W.R., NIGRO N.D., MEDLINE A. Effect of calcium on azoxymethane induced tumours in rats. *Gastroenterol.* 1987^a; 92: 1332 (Abstract).
- BULL A., NIGRO N.D., GOLEMBIESKI W.A., CRISSMAN J.D., MARNETT L.J. *In vitro* stimulation of DNA synthesis and induction of ornithine decarboxylase in rat colon by fatty acid hydroperoxides, autoxidation products of unsaturated fatty acids. *Cancer Res.* 1984; 44: 4924-4928.
- BULL A., SOULLIER B.K., WILSON P.S., HAYDEN M.T., NIGRO N.D. Promotion of azoxymethane-induced intestinal cancer by high-fat diet in rats. *Cancer Res.* 1979; 39: 4956-4959.
- BULL A.W., SOULIER E.K., WILSON P.S., HAYDEN M.T., NIGRO N.D. Promotion of azoxymethane-induced intestinal cancer by high-fat in rats. *Cancer Res.* 1987^b; 39: 4959-4965.
- BURNSTEIN M.J. Dietary factors related to colorectal neoplasms. *Surg. Clin. North Am.* 1993; 73: 13-29.
- BURTIN P., CHAVANEL G., FOIDART J.M., MARTIN E. Antigens of the basement membrane and the peritumoral stroma in human colonic adenocarcinomas: an immunofluorescence study. *Int. J. Cancer* 1982; 30: 13-20.
- BUSET M., LIPKIN M., WINAWER S., SWAROOP S., FRIEDMAN E. Inhibition of human colonic epithelial cell proliferation *in vivo* and *in vitro* by calcium. *Cancer Res.* 1986; 46: 5426-5430.
- BUSET M., GALAND P., LIPKIN M., WINAWER S., FRIEDMAN E. Injury induced by fatty acids or bile acids in isolated human colonocytes prevented by calcium. *Cancer Lett.* 1990; 50: 221-226.
- BUSET M., WINAWER S., FRIEDMAN E. Defining conditions to promote the attachment of adult human colonic epithelial cells. *In vitro* 1987; 23: 403-412.
- CADERNI G., STUART E.W., BRUCE W.R. Dietary factors affecting the proliferation of epithelial cells in the mouse colon. *Nutr. Cancer* 1988; 11: 147-153.
- CAROLL K.K., KHOR H.T. Dietary fat in relation to tumorigenesis. *Prog. Biochem. Pharmacol.* 1975; 10: 308-353.
- CHEAH P.Y. Hypotheses for the aetiology of colorectal cancer. An overview. *Nutr. Cancer* 1990; 14: 5-13.
- CHEVALLIER F., LUTTON C. Vitesses de renouvellement du cholestérol contenu dans son espace de transfert chez le rat. I Méthodes et résultats obtenus dans le cas d'un régime semi-synthétique témoin. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1966; 48: 715-729.
- CHIIJIWA K. Distribution and partitioning of cholesterol and β sitosterol in micellar bile salt solutions. *Am. J. Physiol.* 1987; 253: G258-G267.

CHOMCHAI C., BHADRACHARI N., NIGRO N.D. The effect of bile on the induction of experimental intestinal tumours in rats. *Dis. colon Rectum* 1974; 17: 310-312.

CLINTON S.K., VISEK W.J. The macronutrients in experimental carcinogenesis of the breast, colon and pancreas. In *Dietary fat and cancer*. Alan R. Liss Inc. 1986; pp 377-401.

COHEN L.A. Diet and cancer. *Scientific Am.* 1987; 5: 42-48.

COHEN B.I., MOSBACH E.M., MACSHERRY C.K., MATOBA N., STENGER R.J. Dietary calcium ameliorates cholic acid toxicity in a hamster model of cholelithiasis. *Gastroenterol.* 1989; 58: A586 (Abstract).

COHEN B.I., RAICHT R.F., DESCHER E.E., TAKAHASHI M., SARWAL A.N., FAZZINZ E. Effect of cholic acid feeding on N-methyl-N-nitrosourea induced colon tumours and cell kinetics in rats. *J. Natl. Cancer Inst.* 1980; 64: 573-578.

CONNOR W.E., WITIAK D.T., STONE D.B., ARMSTRONG M.L. Cholesterol balance and fecal neutral steroid and bile acid excretion in normal man fed dietary fats of different fatty acid composition. *J. Clin. Invest.* 1969; 48: 1363-1369.

CORPET D.E. Alimentation et étiologie du cancer du côlon. *Cah. Nutr. Diét.*, 1989; 5: 375-378.

CORREA P., HAENSZEL W. The epidemiology of large bowel cancer. *Adv. Cancer Res.* 1978; 26: 1-41.

CROWTHER J.S., DRASAR B.S., HILL M.J., MAC LENNAN R., MAGNIN D., PEACH S., TEAH-CHAN C.H. Fecal steroids and bacteria and large bowel cancer in Hong Kong by socio-economic groups. *Brit. J. Cancer* 1976; 34 : 191-198.

CRUSE J.P., LEWIN M.R., CLARK C.G. Dietary cholesterol is co-carcinogenic for human colon cancer. *Lancet* 1979; i: 752-755.

CRUSE J.P., LEWIN M.R., CLARK C.G. The effect of cholic acid and bile salt binding agents on 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis in the rats. *Carcinogenesis* 1981; 2: 439-443.

CRUSE J.P., LEWIN M.R., FERULANO G.P., CLARK C.G. Co-carcinogenic effects of dietary cholesterol in experimental colon cancer. *Nature* 1978; 276: 822-825.

DALES L.G., FRIEDMAN G.D., URY H.K., GROSSMAN S., WILLIAMS S.R. A case-control study of relationships of diet and other traits to colorectal cancer in American Blacks. *Am. J. Epidemiol.* 1979; 109: 132-144.

D'ARDENNE A.J. Use of basement membrane markers in tumor diagnosis. *J. Clin. Pathol.* 1989; 42: 449-457.

DECLOITRE F. Impact des facteurs alimentaires sur les mécanismes de la cancérogenèse: bases d'une prévention des cancers par l'alimentation. *Cah. Nutr. Diét.* 1993; 2:85-95.

DESCHNER E.E. COHEN B.I., RAICHT R.F. Acute and chronic effect of dietary cholic acid on colonic epithelial cell proliferation. *Digestion* 1981; 21: 290-296.

DESCHNER E.E. COHEN B.I., RAICHT R.F. The kinetics of the protective effect of b-sitosterol against MNU induced colonic mucosa. *Cancer Res. Clin. Oncol.* 1982; 103: 49-54.

DESCHNER E.E., LIPKIN M. Proliferative patterns in colonic mucosa in familiar polyposis. *Cancer* 1975; 34: 878-888.

DESCHNER E.E., LIPKIN M. Cell proliferation in normal, preneoplastic and neoplastic gastrointestinal cells. *Clin. Gastroenterol.* 1976; 5: 545-561.

- DONOWITZ M., MADARA J. Effect of extra cellular depletion on epithelial structure and function in rabbit ileum: model for selective crypt or villus epithelial cell damage. *Gastroenterology* 1982; 83: 1231.
- DRASAR B.S., IRVING D. Environmental factors and cancer of the colon and breast. *Brit. J. Cancer* 1973; 27: 167-172.
- DWIVEDI C., OREDIPE O.A., BARTH R.F., DOWNIE A.A., WEBB T.E. Effects of the experimental chemopreventive agent, glucarate, on intestinal carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis* 1989; 10: 1539-1541.
- FELDEN F., RENKES P., FREMONT S., CHAMBRE J.F., CHAMPIGNEULLE B., GAUCHER P., GUEANT J.L. Serum laminin P1 in metastatic colon carcinoma. *Clin. Chem.* 1991; 37: 1795-1796.
- FEREZOU J., GOUFFIER E., COSTE T., CHEVALLIER F. Daily elimination of fecal neutral sterols by humans. *Digestion* 1978; 18: 201-212.
- FINEGOLD S.M., FLORA D.J., ATTEBERRY H.R. Faecal bacteriology of colonic polyp patients and control patients. *Cancer Res.* 1975; 35: 3407-3417.
- FINLAY G.J. Genetic, molecular biology and colorectal cancer. *Mutation Res.* 1993; 290: 3-12.
- FLEISCHMAN A.I., YACOWITZ H., HAYTON T., BIERENBAUM M.L. Effect of dietary calcium upon lipid metabolism in mature male rats fed beef tallow. *J. Nutr.* 1966; 88: 255-260.
- FOLCH J., LEES M., SLOANE-STANLEY G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 1957; 226: 497-509.
- FREUENHEIM J.L., GRAHAM S., MARSHALL J.R., HAUGHEY B.P., WILKINSON G. Risks associated with source of fiber and fiber components in cancer of the colon and rectum. *Cancer Res.* 1990; 50: 3295-3300.
- GALLOWAY D.J., OWEN R.W., JARETT F., BOYLE P., HILL M.J., GEORGE W.D. Experimental colorectal cancer: the relationship of diet and faecal bile acid concentration to tumour induction. *Br. J. Surg.* 1986; 73: 233-237.
- GARLAND C.F., GARLAND F.C. Do sunlight and vitamin D reduce the risk of colon cancer. *Int. J. Epidemiol.* 1980; 9: 227.
- GARLAND C., SHEKELLE B., BARRETT-CONNOR E., CRIQUI M.H., ROSSOF A.H., PAUL O. Dietary vitamin D and calcium and risk of colorectal cancer : a 19-year prospective study in men. *Lancet*, 1985; 1: 307-309.
- GILBERT J.M., SETCHELL K.D.R., LAWSON A.M., ROYSTON J.P., WORTHINGTON J., KARK A. Detailed faecal bile acid profile: a diagnosis test for colorectal cancer? *Eur. J. Surg. Oncol.* 1986; 12: 359-365.
- GOULD R.G., JONES R.J., LEROY G.V., WISSLER R.W., TAYLOR C.B. Absorbability of β sitosterol in humans. *Metabolism* 1969; 18: 652-662.
- GRAHAM S., MARSHALL J., HAUGHEY B. Dietary epidemiology of cancer of the colon in Western New York. *Am. J. Epidemiol.* 1988; 128: 490-503.
- GRANDJOUAN S. Cancers colorectaux et biologie moléculaire. *Path. Biol.* 1991; 9: 904-905.
- GREGOIRE R., STERN H.S., YEUNG K.S., STADLER J., LANGLEY S. FURRER R., BRUCE W.R. Effect of calcium supplementation on mucosal cell proliferation in high risk patients for colon cancer. *Gut* 1989; 30: 376-382.

GRUNDY S.M., ARHENS E.H., MIETTINEN T.A. Quantitative isolation and gas-liquid chromatographic analysis of fecal bile acids. *J. Lip. Res.* 1965; 6: 397-410.

GUEANT J.L., SCHOHN H., BRULE H., SAUNIER M., GRASBECK R., NICOLAS J.P. Binding assay and physicochemical characteristics of solubilized intrinsic factor receptor in ileal mucosal homogenates using phenyl sepharose to separate the saturated receptor from free intrinsic factor. *Biophys. Biochem. Acta* 1991; 1073: 614-618.

GUSTAFSSON B.E., NORMAN A. Influence of the diet on the turnover of bile acids in germ-free and conventional rats. *BRIT. J. Nutr.* 1969; 23: 429-442.

HAENSZEL W., BERG J.W., SEGI M., KURIHARA M. LOCKE F.B. Large-bowel cancer in Japan. *J. Natl. Cancer Inst.* 1973; 51: 1765-1779.

HAIT W.N., LAZO J.S. Calmodulin: a potential target for cancer chemotherapeutic agents. *J. Clin. Oncol.* 1986; 4: 994-1012.

HATTORI T., HELPAP B., GEDIGK P. Development and cell kinetics of colonic tumours induced in mice by dimethylhydrazine. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 1983; 105: 148-157.

HAYASHI E., AMURO Y., ENDO T., YAMAMOTO H., MIYAMOTO M., KISHIMOTO S. Faecal bile acids and neutral sterols in rats with spontaneous colon cancer. *Int. J. Cancer* 1986; 37: 629-632.

HEILBRUN L.K., HANKIN H.J., STEMMERMANN G.N. Dietary vitamin D and calcium and risk of colorectal cancer. *Lancet* 1985; 1: 925.

HICKLE R.A., WEI J.W., BLYTH L.M. WONG D., KLAASEN D. Cations and calmodulin in normal and neoplastic growth regulation. *Can. J. Biochem. Cell. Biol.* 1983; 61: 934-641.

HILL M.J. Colon cancer: a disease of fiber depletion or of dietary excess? *Digestion* 1974; 11: 289-306.

HILL M.J. Metabolic epidemiology of dietary factors in large bowel cancer. *Cancer Res.* 1975; 35: 3398-3402.

HILL M.J. Bile acids and colorectal cancer: hypothesis. *Eur. J. Cancer Prev.* 1991; 1 (suppl. 2): 69-72.

HILL M.J., CROWTHER J.S., DRASAR B.S., HAWKSWORTH G., ARIES V., WILLIAMS R.E.O. Bacteria and aetiology of cancer of large bowel. *Lancet*, 1971; 1: 95-100.

HILL M.J., DRASAR B.S. Bacteria and the aetiology of cancer of the intestine. In *Anaerobic bacteria: role in disease*. A Balows, E De Haan, V Dowell, L Guze (eds.). Thomas, Springfield, 1973; pp 119-133.

HILL M.J., DRASAR B.S., WILLIAMS R.E.O., MEADE T.W., COX A.G., SIMPSON J.E.P., MORSON B.C. Faecal bile-acids and clostridia in patients with cancer of the large bowel. *Lancet* 1975; 1: 535-539.

HILL M.J., MAC LENNAN R., NEWCOMBE J. Diet and large bowel cancer in three socio-economic groups in Hong Kong. *Lancet* 1979; i: 436.

HILL M.J., MORSON B.C, THOMPSON M.H. The presence of faecal bile acids in the large bowel carcinogenesis. *Brit. J. Cancer* 1983; 48: 143.

HILL M.J., TAYLOR A.J., THOMPSON M.H., WAIT R. Fecal steroids and urinary volatile phenols in four Scandinavian populations. *Nutr. Cancer* 1982; 4: 69-73.

HINGGINSON J. Etiologic factors in gastrointestinal cancer in man. *J. Natl. Cancer Inst.* 1966; 37: 527-545.

HIRAMATSU Y., TAKADA H., YAMAMURA M., HIOKI K., SAITO K., YAMAMOTO M. Effect of dietary cholesterol on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis* 1983; 4: 553-558.

HIRAYAMA T. Diet and cancer. *Nutr. Cancer* 1975; 1: 67-81.

HIRAYAMA T. A large-scale cohort study on the relationship between diet and selected cancers of digestive organs. In Bruce WR, Correa P, Lipkin M, Tannenbaum SR, Wilkins TD (eds.). *Banbury Report 7: Gastrointestinal cancer: Endogenous factors*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 1981; pp. 409-429.

HU P.J., BAER A.R., WARGOVICH M.J. Calcium and phosphate: effect of two dietary confounder on colonic epithelial cell proliferation. *Nutr. Res.* 1989; 9: 545-553.

IDE T., GOTOH Y., SUGANO M. Dietary regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and cholesterol synthetic activities in fasted -refed rats-. *J. Nutr.* 1980; 110: 158-168.

JACOBS L.R. Role of dietary factors in cell replication and colon cancer. *Am. J. Clin. Nutr.* 1988; 48: 775-779.

JACOBS L.R., LUPTON J.R. Relationship between colonic luminal pH, cell proliferation, and colon carcinogenesis in 1,2-dimethylhydrazine-treated rats fed high fiber diets. *Cancer Res.* 1986; 46: 1727-1734.

JAIN M., COOK G.M., DAVIS F.G., GRACE M.G., HOWE G.R., MILLER A.B. A case-control study of diet and colorectal cancer. *Int. J. Cancer* 1980; 26: 757-768.

JANDACEK R.J. The solubilisation of calcium soaps by fatty acids. *Lipids* 1991; 26: 250-253.

JENSEN O.M. colon cancer epidemiology. In *Experimental colon carcinogenesis*. H Autrup, GM Williams (eds.) CRC Press, Boca Raton 1983; pp. 3-23.

KARKARE M.R., CLARK T.D., GLAUERT H.P. Effect of dietary calcium on colon carcinogenesis induced by a single injection of 1,2-dimethylhydrazine in rats. *American Institute of Nutrition*, 1990; 568-570.

KARKARE M.R., CLARK T.D. and GLAUERT H.P. Effect of dietary calcium on colon carcinogenesis induced by a single injection of 1,2-dimethylhydrazine in rats. *J. Nutr.* 1991; 121: 568-577.

KAWAURA A., TAKAHASHI A., TANIDA N., ODA M., SAWADA K., SAWADA Y., MAEKAWA S., SHIMOYAMA T. 1 OH vitamin D₃ suppresses colonic tumorigenesis induced by repetitive intrarectal injection of NMU in rats. *Cancer Lett.* 1990; 55: 149-152.

KELLOGG T.F. Microbiological aspect of enterohepatic sterol and bile acid metabolism. *Fed. Proc.* 1971; 30: 1808-1814.

KLEINMAN H.K., KLEBE R.J., MARTIN G.R. Role of collagenous matrices in the adhesion and growth of cells. *J. Cell Biol.* 1981; 88: 473-485.

KORN J.E. Colon cancer epidemiology: Fat, fiber and fertility. In Shrock T.R. (ed.): *Perspectives in colon and rectal surgery*, St Louis, Quality Medical Publishing, 1990, pp 297.

KORPELLA J., ADLERCREUTZ H., TURNEN M. Fecal free and conjugate bile acids and neutral sterols in vegetarians, omnivores, and patients with colorectal cancer. *Scand. J. Gastroenterol.* 1988; 23: 277-283.

KRITCHEVSKY D. Fat, calories, and fiber. *Prog. Clin. Biol. Res.* 1986; 222: 495-515.

KRITCHEVSKY D., KLURFELD D.M. Fat and cancer. In Nutrition and cancer, aetiology and treatment, R Newell and NM Ellison (eds.). Raven Press, New York, 1981: pp173-185.

KUMAR S.P., ROY S.J., TOKUMO K., REDDY B.S. Effect of different levels of caloric restriction on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in male F344 rats. *Cancer Res.* 1990; 50: 5761-5766.

KUNE S., KUNE G.G., WATSON L.F. Case-control study of dietary etiologic factors: the Melbourne colorectal cancer study. *Nutr. Cancer* 1987; 9: 21-42.

LACASSAGNE A., BUU-HOI N.P., ZAJDELA F. Carcinogenic activity *in situ* of further steroid compounds. *Nature* 1966; 209: 1026-1027.

LAPRE J.A. Dietary calcium as a possible anti-promoter of colon carcinogenesis. Thèse 1992; Ede, Hollande.

LAPRE J.A., TERMONT D.S.M.L., VAN DER MEER R. Lytic effects of mixed micelles of bile acids and fatty acids. *Am. J. Physiol.* 1992; 263: G333-G337.

LAPRE J.A., DE VRIES H.T., VAN DER MEER R. Cytotoxicity of faecal water is dependent on the type of dietary fat and is reduced by supplemental calcium phosphate in rats. *J. Nutr.* 1993; 123: 578-585.

LEDERER J. Alimentation et cancer. Maloine, Paris 1986.

LE QUINTREC Y. Nutrition, acides biliaries et cancer du côlon. *Cah. Nutr. Diét.* 1984; 19: 151-154.

LEPAGE G., ROY C.C. Direct transesterification of all classes of lipids in one-step reaction. *J. Lipid Res.* 1986; 27: 114-120.

LIOTTAT L.A., RAO N.C., BARSKY S.H. Tumor invasion and the extracellular matrix. *Lab. Invest.* 1983; 49: 636-649.

LIPKIN M., FRIEDMAN E., WINAWER S.J., NEWMARK H. colonic epithelial cell proliferation in responders and non-responders to supplemental dietary calcium. *Cancer Res.* 1989; 49: 248-254.

LIPKIN M., NEWMARK H. Effect of added dietary calcium on colonic epithelial-cell proliferation in subjects at high risk for familial colonic cancer. *New Engl. J. Med.* 1985; 313: 1381-1383.

LIPKIN M., REDDY B.S., WEISBURGER J., SCHECHTER L. Non degradation of fecal cholesterol in subjects at high risk for cancer of the large intestine. *J. Clin. Invest.* 1981; 48: 768-774.

LOCNISKAR M., NAUSS K.M., KAUFMANN P., NEWBERNE P.M. Interaction of dietary fat and route of carcinogen administration on 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis* 1985; 6: 649-654.

LUBIN F., BOEING H., ROZEN P. Design an background of the Tel Aviv - Heidelberg dietary study of colonic adenoma patients and calcium intervention trial. In: Rozen P, Reich CB, Winawer SJ (eds.): Large bowel cancer: policy, prevention, research and treatment. *Front. Gastrointest. Res.* Basel, Karger, 1991; 18, pp 74-87.

LYON J.L., KLAUBERT M.R., GARDNER J.W. Cancer incidence in Mormons and non-Mormons in Utah, 1966-1970. *N. Engl. J. Med.* 1976; 294: 129-133.

MAC DONALD I.A., BOKKENHEUSER V.D., WINTER J., MAC LERNON A.M., MOSBACH E.H. Degradation of steroids in the human gut. *J. Lipid Res.* 1983; 24: 675-699.

- MAC DONALD I.A., SINGH G., MAHONY D.E., MEIR C.E. Effect of pH on bile salt degradation by mixed fecal cultures. *Steroids* 1978^a; 32: 245-251.
- MAC DONALD I.A., WEBB G.R., MAHONY D.E. Faecal hydroxysteroid dehydrogenase activities in vegetarian Seventh-Day Adventists, control subjects, and bowel cancer patients. *Am. J. Clin. Nutr.* 1978^b; 31: S233-S238.
- MAC KEOWN-EYSSSEN G.E., BRIGHT-SEE E. Dietary factors in colon cancer : International relationships. *Nutr. Cancer* 1984, 6: 160-170.
- MAC MICHAEL A.J., POTTER J.D. Reproduction, endogenous and exogenous sex hormones, and colon cancer: a review and hypothesis. *J. Natl. cancer Inst.* 1980; 65: 1201-1207.
- MACQUART-MOULIN G., RIBOLI E., CORNEE J., CHARNAY B., BERTHEZENE P., DAY N. Case-control study on colorectal cancer and diet in Marseilles. *Int. J. Cancer* 1986; 38: 183-191.
- MAC SHERRY C.K., COHEN B.I., BOKKENHEUSER V.D., MOSBACH E.H., WINTER J., MATOBA N., SHOLES J. Effects of calcium and bile acid feeding on colon tumours in the rat. *Cancer Res.* 1989; 49: 6039-6043.
- MADARA J.L., HARTE P., DEASY J., ROSS D., LAHEY S., STEELE G. Evidence for adenoma-carcinoma sequence in dimethylhydrazine-induced neoplasms of rat intestinal epithelium. *Am. J. Pathol.* 1983; 110: 230-235.
- MARTIN M., MARTIN F. La cancérogénèse colique humaine et expérimentale. *Méd. Sciences* 1988; 5: 281-286.
- MARTIN M., MARTIN F., MICHIELS R., BASTIEN H., JUSTRABO E., BORDES M., VIRY B. An experimental model for cancer of the colon and rectum. Intestinal carcinoma induced in the rat by 1,2-dimethylhydrazine. *Digestion* 1973; 8: 22-34.
- MARTIN M., JUSTRABO E., JEANNIN J.F., LECLERC A., MARTIN F. Effect of dietary chenodeoxycholic acid on intestinal carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine in mice. *Brit. J. Cancer* 1981; 43: 884-886.
- MARTIN M.S. Cancérogénèse colique expérimentale. *Gastroenterol Clin. Biol.* 1982; 6: 382-391.
- MARTINEZ I., TORRES R., FRIAS Z., COLON R.J., FERNANDEZ M. Factors associated with adenocarcinomas of the large bowel in Puerto Rico. In: Birch JM (ed.), *Advances in medical oncology, research and education*, vol 3, Pergamon: Oxford 1979; pp. 45-52.
- MASKENS A.P., DUJARDIN LOITS R.M. Experimental adenomas and carcinomas of the colon in an inbred strain of rats. *Cancer* 1981; 47: 81-89.
- MATHE D., LUTTON C. Le cholestérol. Aspects dynamiques et métaboliques. *J. Physiol.* 1984; 79: 41-97.
- MESLIN J.C., ANDRIEUX C., RIOTTOT M. Intestinal mucosal morphometry and ileal epithelial renewal in conventional and germ-free rats fed an amylo maize starch diet. *Reprod. Nutr. Dev.* 1992; 32: 73-81.
- MEUNIER P., MINAIRE Y., LAMBERT R. *La digestion*, SIMEP, Paris 1988.
- MILLER A.B., HOWE G.R., JAIN M., CRAIB K.J.P., HARRISON L. Food items and food groups as risk factors in a case-control study of diet and colo-rectal cancer. *Int. J. Cancer* 1983; 32: 155-161.

- MITVEDT T., NORMAN A. Anaerobic bile acid transforming micro-organisms in rat intestinal content. *Acta Path. Microbiol. Scand.* 1968; 72: 337-344.
- MOHR U., LEWKOWSKI J.P. The effect of diet on tumour development in animals. Edition Medizin, VCH, Weinheim 1989; pp141.
- MOSKOVITZ M., WHITE C., BARNETT R.N., STEVENS S., RUSSEL E. Diet, fecal bile acids and neutral sterols in carcinoma of the colon. *Dig. Dis. Sci.* 1979; 24: 746-751.
- MOSKOVITZ M., WHITE C., FLOCH M. Bile acid and neutral steroid excretion in carcinoma of the colon, other cancers and control subjects. *Gastroenterol.* 1978; 75: 1071-1075.
- MOUROT M.J. Contribution à l'étude du rôle des phytostérols sur le métabolisme du cholestérol et des lipides chez le rat. Thèse de Doctorat d'état, Université de Nancy I, 1989.
- MUDD D.G., MAC KELVEY S.T., SLOAN J.M., ELMORE D.T. Faecal bile acid concentrations in patients at increased risk of large bowel cancer. *Acta Gastroenterol. Belg.* 1978; 41: 241-244.
- MURRAY W.R., BLACKWOOD A., TROTTER J.M., CALMAN K.C., MAC KAY C. Faecal bile acids and clostridia in the aetiology of colorectal cancer. *Brit. J. Cancer* 1980; 41: 923-928.
- NAIR P. Role of bile acids and neutral sterols in carcinogenesis. *Am. J. Clin. Nutr.* 1988; 48: 768-774.
- NAIR P., KRITCHEVSKY D. The bile acids. Tome 1: Chemistry. Plenum Press, 1971.
- NARISAWA T., MAGADIA N.E., WEISBURGER J.H., WYNDER E.L. Promoting effect of bile acids on colon carcinogenesis after intrarectal instillation of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in rats. *J. Natl. Cancer Inst.* 1974; 53: 1903-1907.
- NARISAWA T., REDDY B.S., WEISBURGER J.H. Effect of bile acids and dietary fat on large bowel carcinogenesis in animal models. *Gastroenterol. Jap.* 1978; 13: 206-216.
- NAUSS K., LOCNISKAR M., NEWBERNE P. Effects of alterations in the quality and quantity of dietary fat on 1,2-dimethylhydrazine-induced colon tumorigenesis in rats. *Cancer Res.* 1983, 43: 4083-4090.
- NAUSS K., LOCNISKAR M., SANDERGAARD D., NEWBERNE P. Lack of effect of dietary fat on N-nitrosomethylurea (NMU)-induced colon tumorigenesis in rats. *Carcinogenesis*, 1984, 5: 255-260.
- NEGRI E.C., LA VECCHIA B., D'AVANZO B., FRANCESCHI S. Calcium, dairy products and colorectal cancer. *Nutr. Cancer* 1990; 49: 6039-6043.
- NELSON R.L., TANURE J.C., ANDRIANOPOULOS G.A. The effect of dietary milk and calcium on experimental colorectal carcinogenesis. *Dis. colon Rect.* 1987; 30: 947-949.
- NEWBERNE P.M., NAUSS K.M. Dietary fat and colon cancer: variable results in animal models. In *Dietary fat and cancer*. Alan R. Liss, Inc. 1986; pp 311-330.
- NEWMARK H.L., LUPTON. J.R. Determinants and consequences of colonic luminal pH: implications for colon cancer. *Nutr. Cancer* 1990; 14: 161-173.
- NEWMARK H.L., WARGOVICH M.J., BRUCE W.R. Colon cancer and dietary fat, phosphate, and calcium : a hypothesis. *J. Natl. Cancer Inst.* 1984; 72: 1323-1325.
- NEWMARK H.L., WARGOVICH M.J., BRUCE W.R., BOYNTON A.L., WHITFIELD J.F., JANSSON B., CAMERSON I.L. Ions and neoplastic development. In: Mastromarino AJ, Brattain MG (Eds.). *Large bowel cancer*. New York: Praeger 1985: pp102-131.

- NICHOLSON M.L., NEOPTOLEMOS J.P., CLAYTON H.A., TALBOT I.C., BELL P.R.F. Inhibition of experimental colorectal carcinogenesis by dietary *n-6* polyunsaturated fats. *Carcinogenesis* 1990; 11: 2191-2197.
- NIGRO N.D., BHADRACHARI N., CHOMCHAI C. A rat model for study in colonic cancer: effect of cholestyramine on induced tumours. *Dis. colon Rectum* 1973; 16: 438-443.
- NIGRO N.D., BULL A.W, BOYD M.E. Inhibition of intestinal carcinogenesis in rats: effect of difluoromethylornithine with piroxicam or fish oil. *J. Natl. Cancer Inst.* 1986; 77: 1309-1313.
- NIGRO N., CAMPBELL R., SINGH D., LIN Y.N. Effect of diet high in beef fat on the composition of fecal bile acids during intestinal carcinogenesis in the rat. *J. Natl. Cancer Inst.* 1976; 57: 883-888.
- NIGRO N., SINGH D., CAMPBELL R., PAK M. Effect of dietary beef fat on intestinal tumour formation by azoxymethane in rats. *J. Natl. Cancer Inst.* 1975; 54: 439-442.
- NOMURA A.M.Y., WILKINS E.L., KAMIYAMI S., HEILBRUN L.K., SHIMADA A., TEMMERMANN G.N., MOWER H.F. Faecal neutral steroids in two Japanese populations with different colon cancer risks. *Cancer Res.* 1983; 43: 1910-1913.
- ODA M., KAWAURA A., TANIDA N., SAWADA K., MAEKAWA S., KANO M., SHIMOYAMA T. Effect of 1-OH vitamin D₃ on NMU induces colonic tumorigenesis and fecal bile acid profiles with respect to soluble and precipitated phases in rats. *Tokushima J. Exp. Med.* 1990; 37: 75-81.
- OWEN R.W., DODO M., THOMPSON M.H., HILL M.J. Faecal ratio of lithocholic acid to the deoxycholic acid may be an etiologic factor in colorectal cancer. *Bioch. Soc. Trans.* 1984; 12: 861.
- OWEN R.W., DODO M., THOMPSON M.H., HILL M.J. Faecal steroids and colorectal Cancer. *Nutr. Cancer* 1987^a; 9: 73-80.
- OWEN R.W., THOMPSON M.H., HILL M.J., WILPART M., MAINGUET P. ROBERFROID M. The importance of the ratio of lithocholic to deoxycholic acid in the large bowel carcinogenesis. *Nutr. Cancer* 1987^b; 9: 67-71.
- PALMER R.H. Bile acid heterogeneity and the gastrointestinal epithelium. From diarrhoea to colon cancer. Editorial. *J. Lab. Clin. Med.* 1979; 94: 655-660.
- PARIZA M.W. Dietary fat and cancer risk: evidence and research needs. *Ann. Rev. Nutr.* 1988; 8: 167-183.
- PENCE B.C. Role of calcium in colon cancer prevention: experimental and clinical studies. *Mutation Res.* 1993; 290: 87-95.
- PENCE B.C., BUDDINGH F. Inhibition of dietary fat-promoted colon carcinogenesis in rats by supplemental calcium or vitamin D₃. *Carcinogenesis* 1988; 9: 187-190.
- PHILIP W., JAMES T., RALPH A. Dietary fats and cancer. *Nutr. Res.* 1992; 12 (suppl 1): S147-S158.
- PHILLIPS R.L. Role of life-style and dietary habits in risk of cancer among Seventh-Day Adventists. *Cancer Res.* 1975; 35: 3513-3522.
- PICKLE L.W., GREEN M.H., ZIEGLER R.G. TOLEDO A., HOOVER R., LYNCH H.T., FRAUMENI J.F. Colorectal cancer in rural Nebraska. *Cancer Res.* 1984; 44: 363-369.
- POTTER J.D., MAC MICHAEL A.J. Diet and cancer of the colon and rectum: a case-control study. *J. Natl. Cancer Inst.* 1986; 76: 557-569.

- POZHARISSKI K.M. Tumours of the intestines. In Pathology of tumours in laboratory animals. Vol. I - Tumours of the rat. V. TURUSOV et U. MOHR (eds.) IARC, Lyon 1990; pp. 159-180.
- RAFTER J.J., CHILD P., ANDERSON A.M., ALDER R., ENG V., BRUCE W.R. Cellular toxicity of faecal water depends on diet. *Am. J. Clin. Nutr.* 1987^a; 45: 559-563.
- RAFTER J.J., ENG V.W.S., FURRER R., MEDLINE A., BRUCE W.R. Effects of calcium and pH on the mucosal damage produced by deoxycholic acid in the rat colon. *Gut* 1986; 27: 1320-1329.
- RAFTER J.J., GELTNER U., BRUCE W.R. Cellular toxicity of human faecal water-possible role in aetiology of colon cancer. *Scan. J. Gastroenterol.* 1987^b; 22 (suppl 129): 245-250.
- RAIBAUD P., DICKINSON A.B., SACQUET E., CHARLIER H., MOCQUOT G. La microflore du tube digestif du rat. II- Dénombrement de différents genres microbiens dans l'estomac et l'intestin de rats conventionnels. Variations quantitatives individuelles et en fonction de l'âge. *Ann. Inst. Pasteur* 1966; 110: 861-876.
- RAICHT R.F., COHEN B.I., FAZZINI E.P., SARWAL A.N., TAKAHASHI M. Protective effect of plant sterols against chemically induced colon tumors in rats. *Cancer Res.* 1980; 40: 403-405.
- REDDY B.S. Role of bile metabolites in colon carcinogenesis, animal models. *Cancer* 1975; 36: 2401-2406.
- REDDY B.S. Dietary fat and colon cancer. In *Experimental colon carcinogenesis*. H Autrup, GM Williams (eds.) CRC Press, Boca Raton, 1983; pp 225-239.
- REDDY B.S. Amount and type of dietary fat and colon cancer: animal model studies. In *Dietary fat and cancer*. Ip C, Birt DF, Rogers AE, Mettlin C (eds.) Alan Liss, New York 1986; 295-311.
- REDDY B.S. Dietary fat and colon cancer: animal models. *Prev. Med.* 1987; 16: 460.
- REDDY B.S. Dietary fat and colon cancer: animal model studies. *Lipids* 1992; 10: 807-813.
- REDDY B.S., COHEN L.A. Diet, nutrition and cancer: a critical evaluation. Vol.1: *Macronutrients and cancer*. CRC Press 1986.
- REDDY B.S., HEDGES A.R., LAAKSO K., WYNDER E.L. Metabolic epidemiology of large bowel cancer. Fecal bulk and constituents of high-risk North American and low-risk Finnish population. *Cancer* 1978^a; 42: 2832-2838.
- REDDY B.S., MANGAT S., SHEINFIL A., WEISBURGER J.H., WYNDER E.L. Effect of type and amount of dietary fat and 1,2 dimethylhydrazine on biliary bile acids, faecal bile acids, and neutral sterols in rats. *Cancer Res.* 1977^a; 37: 2132-2137.
- REDDY BS, MAEURA Y. Tumour promotion by dietary fat in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in female F344 rats: influence of amount and source of dietary fat. *J. Natl. Cancer Inst.* 1984; 72: 745-750.
- REDDY B.S., MARTIN C.W., WYNDER E.L. Fecal bile acids and cholesterol metabolites of patients with ulcerative colitis, a high risk group for the development of colon cancer. *Cancer Res.* 1977^b; 37: 1697-1701.
- REDDY B.S., NARISAWA K., MARONPOT R., WEISBURGER J.H., WYNDER E.L. Animal models for the study of dietary factors and cancer of the large bowel. *Cancer Res.* 1975^a; 35: 3421-3426.

- REDDY B.S., NARISAWA K., VUKISICH D., WEISBURGER J.H., WYNDER E.L. Effect of quality and quantity of dietary fat on dimethylhydrazine in colon carcinogenesis in rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1976^a; 151: 237-239.
- REDDY B.S., NARISAWA T., WEISBURGER J.H., WYNDER E.L. Promoting effect of sodium deoxycholate on colon adenocarcinomas in germ free rats. *J. Natl. Cancer Inst.* 1976^b; 56: 441-442.
- REDDY B.S., WATANABE K., WEISBURGER J.H. Effect of high-fat diet on colon carcinogenesis in F344 rats treated with 1,2-dimethylhydrazine, methylazoxymethanol acetate or methylnitrosourea. *Cancer Res.* 1977^c; 37: 4156-4159
- REDDY B.S., WATANABE K., WEISBURGER J.H., WYNDER E.L. Promoting effect of bile acids in colon carcinogenesis in germ-free and conventional F344 rats. *Cancer Res.* 1977^d; 37: 3238-3242.
- REDDY B.S., WEISBURGER J.H., WYNDER E.L. Effects of high risk and low risk diets for colon carcinogenesis on faecal microflora and steroids in man. *J. Nutr.* 1975^b; 56: 441-442.
- REDDY B.S., WEISBURGER J.H., WYNDER E.L. Mechanisms of tumour promotion and cocarcinogenesis. Vol. 2 New York: Raven Press, 1978^b; 453
- REDDY B.S., WYNDER E.L. Large bowel carcinogenesis: faecal constituents of populations with diverse incidence rates of colon cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 1973; 50: 1437-1442.
- REDDY B.S., WYNDER E.L. Metabolic epidemiology of colon cancer: fecal bile acids and neutral sterols in colon cancer patients and patients with adenomatous polyps. *Cancer* 1977; 39: 2533-2539.
- RENKES P., FELDEN F., BIGARD M-D., GAUCHER P., GUEANT J.L. Intérêt physiopathologique et clinique de la laminine en cancérologie digestive. *Gastroentérol. Clin. Biol.* 1994 (sous presse).
- RESHEF R., ROZEN P., FEREMAN Z., FINE N., BARZILAI M., SHASHA S.M., SHKOLNIK T. Effect of a calcium-enriched diet on the colonic epithelial hyperproliferation induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in rats on a low calcium and fat diet. *Cancer Res.* 1990; 50: 1764-1767.
- RIBOLI E. Dietary habits and risk of colorectal cancer: review of the epidemiological data. In F.P. Rossini *et al.* (eds.) Recent progress in colorectal cancer: biology and management of high risk groups. Elsevier Science Publishers, 1992; pp 133-136.
- RIOTTOT M. Métabolisme des acides biliaires chez le rat. Influence de la flore microbienne du tractus digestif et des glucides alimentaires. Thèse d'état en Sciences, ORSAY, n° 3411, 1987.
- ROBBLEE N.M., MAC LELLAN E.A., BIRD R.P. Measurement of the Proliferative status of colonic epithelium as a risk marker for colon carcinogenesis : effect of bile acid and dietary fiber. *Nutr. Cancer* 1989; 12: 301-310.
- ROGERS A.E., LENHART G., MORRISON G. Influence of dietary lipotrope and lipid content on aflatoxin B1, N-1-fluorylacetamide, and 1,2-dimethylhydrazine carcinogenesis in rats. *Cancer Res.* 1980; 40: 2801-2807.

- ROGERS A.E., NAUSS K.M. Contributions of laboratory animal studies of colon carcinogenesis. In Large bowel cancer. Mastromarino AJ, Brattain MG (eds.), Praeger Press, New York 1985; 1-46.
- ROZEN P. Short-term calcium intervention studies, in animals and humans, using epithelial proliferation as biomarker of response. The initiation of a calcium intervention trial in adenoma patients. In Lipkin M, Newmark HL, Kelloff G. (eds.) Calcium, vitamin D, and prevention of colon cancer. CRC Press Boca Raton 1991; pp 251-265.
- ROZEN P., FIREMAN Z., WAX Y., RON E. Oral calcium suppresses increased colonic mucosal proliferation of persons at risk for colorectal neoplasia. *Gastroenterol.* 1987; 92: 1603 (abstract).
- SACQUET E., LEPRINCE C., RIOTTOT M. Effect of amylo maize starch on cholesterol and bile acid metabolism in germ-free (axenic) and conventional (holoxenic) rats. *Reprod. Nutr. Dev.* 1983; 23: 783-792.
- SACQUET E., RAIBAUD P.M., MEJEAN C., RIOTTOT M., LEPRINCE C., LEGLISE P.C. Bacterial formation of w-muricholic acid in rats. *Appl. Environ. Microbiol.* 1979; 6: 1127-1131.
- SACQUET E., VAN HEIJENOORT Y., RIOTTOT M., LEPRINCE C. Action de la flore microbienne du tractus digestif sur le métabolisme des acides biliaries chez le rat. *Biochem. Biophys. Acta* 1975; 380: 52-65.
- SAMELSON S.L., NELSON R.L., NYHUS L.M. Protective role of faecal pH in Experimental colon carcinogenesis. *J. Royal Soc. Med.* 1985; 78: 230-233.
- SAKAGUCHI M, MINOURA T., HIRAMATSU Y., TAKADA H., YAMAMURA M., HIOKI K., YAMAMOTO M. Effects of dietary saturated and unsaturated fatty acids on faecal bile acids and colon carcinogenesis induced by azoxymethane in rats. *Cancer Res.* 1986; 46: 61-65.
- SAWADA K., KAWAURA A., TANIDA N., SCHIMOYAMA T., NARISAWA T. Promoting effect of 5b-Chol-3-en-24-oic acid on N-Methyl-N-nitrosourea-induced colonic tumorigenesis in rats. *Jpn. J. Cancer Res.* 1987; 78: 908-914.
- SHAMSUDDIN A.K.M. *In vivo* induction of colon cancer dose and animal species. In: Autrup H, Williams GM (eds.). *Experimental colon carcinogenesis*, Boca Raton: CRC Press 1983; pp 51-62.
- SHEFER S., HAUSER S., LAPAR V., MOSBACH E.H. Regulatory effect of dietary sterols and bile acids on rat intestinal HMG CoA reductase. *J. Lipid Res.* 1973; 14: 400-405.
- SICARD F., NORES J.M. et REMY J.M. Alimentation et cancérogénèse. *Revue de la littérature. Sem. Hôp. Paris*, Déc. 1988: 2929-2934.
- SILVERMAN S.J., ANDREWS A.W. Bile acids: co-mutagenic activity in the Salmonella-mammalian-microsome mutagenicity test. Brief communication. *J. Natl. Cancer Inst.* 1977; 59: 1557-1559.
- SKRYPEC D.J. Effect of dietary calcium on azoxymethane-induced intestinal carcinogenesis in male F344 rats fed high fat diets. In Calcium, vitamin D and prevention of colon cancer. Ed: Lipkin M, Newmark HG, Kelloff GJ. Boca Raton CRC Press 1991; pp. 241-246.
- SKRYPEC D.J., BURSEY R.G. Effect of dietary calcium on azoxymethane-induced intestinal carcinogenesis in male F344 rats fed high fat diets. *FASEB* 1988; 2: A857.
- SLATTERY M.L., SCHUMACHER M.C., SMITH K.R., WEST D.W., ABDELGHANY N. Physical activity, diet, and risk of colon cancer in Utah. *Am. J. Epidemiol.* 1988^a; 5: 989-999.

- SLATTERY M.L., SORENSON A.W., FORD M.H. Dietary calcium intake as a mitigating factor in colon cancer. *Am. J. Epidemiol.* 1988^b; 128: 504-513.
- SORENSON A.W., SLATTERY M.L., FORD M.H. Calcium and colon cancer: a review. *Nutr. Cancer* 1988; 11: 135-145.
- STADLER J., STERN H.S., YEUNG K.S., MAC GUIRE V., FURRER R., MARCON N. and BRUCE W.R. Effect of high fat consumption on cell proliferation activity of colorectal mucosa and on soluble faecal bile acids. *Gut* 1988^a; 29: 1326-1331.
- STADLER J., YEUNG K.S., FURRER R., MARCON N., HIMAL H.S., BRUCE W.R. Proliferative activity of rectal mucosa and soluble fecal bile acids in patients with normal colons and in patients with colonic polyps or cancer. *Cancer Lett.* 1988^b; 38:315-320.
- STALLMACH A., SCHUPPAN D., DAX J., HANSKI C., RIEKEN E.O. Identification of laminin binding protein in cell membranes of a human colon adenocarcinoma cell-line. *Gut* 1990; 31: 70-76.
- STATLAND B.E. *Nutrition and cancer* 1992; 38: 1587-1594.
- STEMMERMANN G.N., NOMURA A.M.Y., HEILBRUN L.K. Dietary fat and the risk of colorectal cancer. *Cancer Res.* 1984; 44: 4633-4637.
- STERN H.C., GREGOIRE R.C., HASHTAN H., STADLER J., BRUCE R.W. Long-term effects of dietary calcium on risk markers for colon cancer in patients with familial polyposis. *Surgery* 1990; 108: 528-533.
- SUBBIAH M.T., KOTTKE B.A., CARLO I.A., NAYLOR M.C. Human intestinal specificity toward dietary sterols studied by balance methods. *Nutr. Metab.* 1975; 18: 13-30.
- SULPICE J.C., FERZOU J., LUTTON C., MATHE D., CHEVALLIER F. Diet and sterol biohydrogenation in the rat. Occurrence of epicoprostanol. *Lipids* 1978; 13: 217-224.
- SUZUKI K., BRUCE W.R. Increase by deoxycholic acid of the colonic nuclear damage induced by known carcinogens in C57BL/6J mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 1986; 76: 1129-1132.
- TANIDA N., SAWADA K., KAWAURA A., ODA M., SHIMOYAMA T., NARISAWA T. Effects of oral administration of sulfolithocholic acid disodium salt and lithocholic acid sodium salt on N-methyl-N-nitrosourea-induced colonic tumorigenesis in conventional rats. *Cancer Res.* 1989; 49: 1178-1181.
- TRUDEL J.L., SENTERMAN M.K., BROWN R.A. The fat/fiber antagonism in experimental colon carcinogenesis. *Surgery* 1983; 94: 691-696.
- TURJMAN N., GUIDRY G., JAEGER B., MENDELOFF A., CALKINS B. Faecal bile acids and neutral steroids among 7th Day Adventists and the general population in California. In *colon and nutrition*, W Kaspar and H Goebell (eds.), Lancaster, UK: MTP Press 1982; pp 291-298.
- TUYNS A.J. Salt and gastrointestinal cancer. *Nutr. Cancer* 1988; 11: 229-232.
- TUYNS A.J. HAELTERMAN M., KAAKS R. Colorectal cancer and the intake of nutrients: oligosaccharides are a risk factor, fats are not. A case-control study in Belgium. *Nutr. Cancer* 1987; 10: 181-196.
- VOGEL V.G., MAC PHERSON R.S. Dietary epidemiology of colon cancer. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 1989; 3: 35-63.
- VOGELSTEIN B., FEARON E.R., KERN S.E., HAMILTON S.R., PREISINGER A.C., NAKAMURA Y., WHITE R. Allelotype of colorectal carcinomas. *Science* 1989; 244: 207-211.

- WARGOVICH M.J. Calcium and colon cancer. *J. Am. Coll. Nutr.* 1988; 7: 295-300.
- WARGOVICH M.J., ALLNUT D., PALMER C., ANAYA P., STEPHENS L.C. Inhibition of the promotional phase of azoxymethane-induced colon carcinogenesis in the F344 rat by calcium lactate: effect of stimulating two human nutrient density levels. *Cancer Lett.* 1990; 53: 17-25.
- WARGOVICH M.J., BAER A.R. Basic and clinical investigations of dietary calcium in the prevention of colorectal cancer. *Preventive medicine* 1989; 18: 672-679.
- WARGOVICH M.J., BAER A.R., HU P.J., SUMIYOSHI H. Diet factors and colorectal cancer. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 1988; 17: 727-745.
- WARGOVICH M.J., ENG V.W.S., NEWMARK H.L., BRUCE W.R. Calcium ameliorates the toxic effect of deoxycholic acid on colonic epithelium. *Carcinogenesis* 1983; 4: 1205-1207.
- WARGOVICH M.J., ENG V.W.S., NEWMARK H.L. Calcium inhibits the damaging and compensatory effects of fatty acid on mouse epithelium. *Cancer Lett* 1984; 23: 253-258.
- WARGOVICH M.J., FELKNER I.C. Metabolic activation of DMH by colonic microsomes: a process influenced by type of dietary fat. *Nutr. Cancer* 1982; 4: 146-153.
- WARGOVICH M.J., LYNCH B., LEVIN B. Modulating effects of calcium in animal models of colon carcinogenesis and short-term studies in subjects at increased risk for colon cancer. *Am. J. Clin. Nutr.* 1991; 54: 202S-205S.
- WEISBURGER J.H., FIALA E.S. Experimental colon carcinogens and their mode of action. In: Autrup H, Williams GM (eds.). *Experimental colon carcinogenesis*. Boca Raton: CRC Press 1983; pp 27-50.
- WELBERG J.W.M., KLEIBEUKER J.H., VAN DER MEER R., MULDER N.H. Calcium and the prevention of colon cancer. *Scand. J. Gastroenterol.* 1991; 26 (suppl): 52-59.
- WHILTFIELD J.F. Calcium switches, cell cycles, differentiation, and death. In Lipkin M, Newmark HL, Kelloff G. (eds.) *Calcium, vitamin D, and prevention of colon cancer*. CRC Press Boca Raton 1991. pp 31-77.
- WILLETT W. The search for the causes of breast and colon cancer. *Nature* 1989; 338: 389-394.
- WILLETT W. *Nutritional epidemiology. Monographs in epidemiology and biostatistics, vol. 15*, New York: Oxford University Press. 1990^a.
- WILLETT W.C., STAMPFER M.J. COLDITZ G.A., ROSNER B.A., SPEIZER F.E. Relation of meat, fat, and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study among women. *N. Eng. J. Med.* 1990^b; 323: 1664-1672.
- WILLIAMS G.M., WEISBURGER J.H. Food and cancer: causes and effects. *Surg. Clin. North Am.* 1986; 66: 873-889.
- WILPART M., MAINGUET P., MASKENS A., ROBERFROID M. Mutagenicity of 1,2-dimethylhydrazine towards *Salmonella typhimurium* : co-mutagenic effect of secondary biliary acids. *Carcinogenesis* 1983; 4: 45-48.
- WINDER E.L., SHIGEMATSU T. Environmental factors of cancer of the colon and rectum. *Cancer* 1967; 20: 1520-1560.
- ZHAO L.P., KUSHI L.H., KLEIN R.D., PRENTICE R.L. Quantitative review of dietary fat and rat colon carcinoma. *Nutr. Cancer* 1991; 15: 169-177.



UNIVERSITE DE NANCY I

NOM DE L'ETUDIANT : Monsieur BELBRAOUE Slimane

NATURE DE LA THESE : DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE NANCY I

en BIOLOGIE STRUCTURALE, MOLECULAIRE & CELLULAIRE

VU, APPROUVE ET PERMIS D'IMPRIMER

NANCY, le 14 MARS 1994 - u^e 86

LE PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DE NANCY I



Effet protecteur du calcium alimentaire lors de la carcinogénèse colique chimio-induite chez le rat Wistar.

Résumé:

Ce travail analyse chez les rats Wistar, le rôle promoteur des régimes hyperlipidiques polyinsaturés (n-6) et saturés (végétaline) ainsi que l'influence de la supplémentation calcique (1.5%) sous forme carbonate, lactate ou gluconate vis-à-vis de la carcinogénèse colique induite par la NMU.

Les lipides saturés, en présence de la NMU, sont des promoteurs potentiels de la carcinogénèse colique.

La protection vis-à-vis de la carcinogénèse colique dépend de la forme chimique du sel de calcium. Le lactate de calcium semble avoir plus d'effets relativement au carbonate et gluconate de calcium.

Cet effet protecteur du calcium se manifeste sur plusieurs niveaux (luminal et systémique) et à différentes étapes de la carcinogénèse (prolifération, promotion et progression). Le calcium agit principalement par la chélation des acides biliaires et surtout des acides gras et à travers la modulation des transformations bactériennes du cholestérol et de ses dérivés. Les bilans calciques suggèrent que l'effet du lactate de calcium est également systémique à travers la diminution de la prolifération cellulaire.

La laminine P1 est proposée comme un marqueur tumoral. Les taux sériques de cette protéine sont associés à la tumorigénèse colique.

Mots-clés: Calcium alimentaire; Protection; Carcinogénèse; Côlon; N-nitrosométhylurée; Lipides; Rats.

Summary:

The aim of the study was to evaluate in Wistar rats the promoting effect of polyunsaturated (n-6) or saturated (végétaline) fats (24%) in colon carcinogenesis and the influence of supplemental calcium (1.5%) in this process. NMU was intrarectally instilled to induce colon carcinogenesis. Three different calcium salts (carbonate, lactate, and gluconate) were tested.

Colon cancer incidence was higher in rats fed saturated fats than in those consuming unsaturated ones.

The calcium supplementation exhibits a protective effect depending on the chemical form used. Calcium lactate provide better protection than carbonate or gluconate.

From the parameters those were used to follow carcinogenesis, results indicate that calcium salt acts through several ways, luminal and systemic. It chelates fatty acids and bile acids in the lumen and modulates the microbial transformations of cholesterol and bile acids, thus reflecting a modification of the intestinal microflora. The calcium balance suggests that the protective effect of calcium lactate is also efficient in reducing the cellular proliferation.

Laminin P1 is proposed as a possible tumoral marker. Its serum levels are associated with colon tumorigenesis.

Key-words: Dietary calcium ; Protection; Carcinogenesis; Colon; N-nitrosomethylurea; Lipids; Rats.