



HAL
open science

Effet de l'anxiété sur l'association entre viande rouge et risque de cancer colorectal : une approche multidisciplinaire

Marie Beslay

► **To cite this version:**

Marie Beslay. Effet de l'anxiété sur l'association entre viande rouge et risque de cancer colorectal : une approche multidisciplinaire. Autre [q-bio.OT]. Institut National Polytechnique de Toulouse - INPT, 2021. Français. NNT : 2021INPT0041 . tel-04170650

HAL Id: tel-04170650

<https://theses.hal.science/tel-04170650v1>

Submitted on 25 Jul 2023

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.



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (Toulouse INP)

Discipline ou spécialité :

Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

Présentée et soutenue par :

Mme MARIE BESLAY

le mardi 13 avril 2021

Titre :

Effet de l'anxiété sur l'association entre viande rouge et risque de cancer
colorectal: une approche multidisciplinaire

Ecole doctorale :

Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :

Toxicologie Alimentaire (ToxAlim)

Directeur(s) de Thèse :

M. FABRICE PIERRE

MME VASSILIA THEODOROU

Rapporteurs :

M. MOÏSE COEFFIER, UNIVERSITE DE ROUEN

M. STEFAAN DE SMET, GHENT UNIVERSITY

Membre(s) du jury :

M. BRUNO GUIARD, UNIVERSITE TOULOUSE 3, Président

M. FABRICE PIERRE, INRA TOULOUSE, Membre

Mme INGE HUYBRECHTS, CENTRE INTER DE RECHERCHE SUR LE CANCER, Membre

Mme JACQUELINE CLAVEL, INSERM VILLEJUIF, Membre

Mme MATHILDE TOUVIER, UNIVERSITE PARIS 13, Membre

Mme VASSILIA THEODOROU, INRA TOULOUSE, Membre

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier **le Dr. Moïse Coëffier** et **le Dr. Stefaan De Smet** d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail, ainsi que **le Dr. Inge Huybrechts**, **le Dr. Jacqueline Clavel** et **le Dr. Mathilde Touvier** d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Enfin, merci au **Dr. Bruno Guiard** d'avoir présidé mon jury.

Je remercie tout particulièrement mon directeur de thèse, **le Dr. Fabrice Pierre** et ma co-directrice de thèse, **le Pr. Vassilia Théodorou** qui m'ont permis de vivre cette belle expérience dans un cadre scientifique et humain très enrichissant. **Fabrice**, merci d'avoir toujours su te rendre disponible et compréhensif, merci pour ta gentillesse, ton optimisme et pour tes conseils précieux. Bref, un immense merci pour tout ce que tu m'as appris ! **Vassilia**, merci pour ton regard expert sur la barrière intestinale, pour tous nos échanges intéressants et pour ta gentillesse. J'ai eu beaucoup de chance de vous avoir tous les deux comme directeurs de thèse !

Je remercie tous les membres de **l'équipe PPCA** qui ont été des collègues formidables et qui ont rendu ces trois ans de thèse très agréables. Merci à mes super stagiaires **Tom**, **Clara** et **Ophélie** pour leur aide précieuse et pour ces belles expériences d'encadrement. **Edwin**, merci de m'avoir supporté dans notre bureau pendant ces trois années, et surtout un immense merci pour toute l'aide que tu m'as apporté aussi bien en culture cellulaire que pour les expérimentations animales sur nos petites souris, je ne sais pas comment j'aurais fait sans toi ! **Cécile**, merci pour ta gentillesse, nos cafés vont me manquer, j'espère que l'on continuera en visio ! **Nathalie**, merci d'avoir toujours été à l'écoute. **Jacques**, merci pour ta bonne humeur et pour ton aide en culture cellulaire, en particulier avec la génotox ! **Pascale**, merci pour ton aide précieuse en immuno-histologie qui m'aura permis d'avoir de beaux résultats et de belles photos ☺ **Françoise**, merci pour nos échanges, pour ta gentillesse et pour tes conseils précieux. **Charline**, **Claire** et **Elodie**, merci pour votre soutien et pour votre bonne humeur !

Je remercie également bien chaleureusement tous les membres de **l'équipe NGN** de m'avoir accueilli dans leur équipe. Et plus particulièrement merci à **Christine**, **Valérie Bé**, **Valérie Ba** et **Corinne** avec qui j'ai eu la chance de travailler ! **Maiwenn**, merci beaucoup pour les analyses du microbiote et pour ta gentillesse. Merci également à **Mathilde**, **Valérie T**, **Hervé**, **Muriel**, **Cathy** pour les bons moments passés ensemble. Un grand merci à **Laurent** pour tous nos

échanges passionnants au début de ma thèse, j'ai beaucoup aimé discuter avec toi, dommage que tu sois parti si vite !

Je remercie également les membres de l'**EREN** et plus particulièrement **Mathilde Touvier** et **Bernard Srour**. Merci de m'avoir permis de venir à l'EREN et pour votre aide précieuse dans les analyses. J'ai beaucoup apprécié notre collaboration et j'espère que l'on aura de nouveau l'occasion de travailler ensemble !

Merci également aux autres personnes de Toxalim avec qui j'ai eu la chance de travailler, ou de partager des bons moments. Merci à **Gladys, Anne, Julien** et **Aurélie** pour votre aide précieuse en génotox ! Ça a été un plaisir de travailler avec vous, même si le confinement a un peu écourté nos manip. Merci également à **Aurélia** pour ton aide à l'animalerie, les souris ont de la chance de t'avoir. Et merci aux **graines de Toxalim** pour tous les bons moments passés ensemble !

Anaïs, Adèle, Loïc, Kévin, Fabiana, Pedro et **Jasper**, merci pour votre soutien, pour votre bonne humeur, et pour tous les bons moments passés ensemble au labo ou autour d'un bon repas. Vous avez rendu ces trois années de thèse particulièrement agréables, et j'espère que l'on retrouvera de nombreuses occasions de se voir, à Toulouse ou ailleurs ! **Jasper**, merci pour tes précieux conseils et pour ton soutien sans failles, particulièrement pendant ma dernière année de thèse 😊 **Anaïs**, ma sœur de thèse, merci pour ta bonne humeur, bon courage pour la fin de ta thèse, que tu vas brillamment terminer j'en suis sûre ! **Loïc**, merci pour ton soutien et ton optimisme, tes super chaussettes et tes bonnes blagues vont me manquer... **Adèle**, ça aura été un plaisir d'avoir été ta (presque) voisine, en particulier ces derniers mois pendant lesquels nos sorties étaient très limitées ! **Kévin**, on a commencé cette aventure en même temps à Toxalim, merci pour ton accueil chaleureux quand je suis arrivée au labo, je te souhaite le meilleur pour la suite ! **Fabiana**, merci pour ta gentillesse, même si on ne s'est pas beaucoup croisées à Toxalim, on aura eu l'occasion de passer de bons moments en dehors du labo. **Pedro**, le petit nouveau 😊 je te souhaite beaucoup de courage pour la thèse mais tu as l'air très bien parti donc je ne me fais pas de soucis pour toi !

Nathalie, Manon, Laury et **Camille**, merci pour votre soutien sans failles pendant ces trois années de thèse, malgré la distance ♥ (un petit cœur rien que pour toi Manon 😊). On s'est lancées au même moment dans l'aventure de la thèse, et ça n'a pas toujours été facile mais

finalement on s'en est sorties ! Laury et Nathalie, bon courage pour la dernière ligne droite !
 On pourra bientôt retourner boire une bière en terrasse pour fêter nos thèses !

Et pour terminer, merci à ma famille. Merci à mes parents pour la relecture de ma thèse et de m'avoir écouté répéter ma soutenance de thèse 😊 Merci à **Pierre, François** et **Mathilde** pour leur soutien pendant ces trois ans. Pierre, bon courage pour ta thèse qui va, j'en suis sûre, être passionnante !

Résumé

Les études épidémiologiques ont associé avec des niveaux de preuve élevés les consommations de viande rouge (« probable ») et de charcuterie (« convaincant ») au risque de cancer colorectal. Les travaux expérimentaux ont permis d'identifier le fer héminique comme étant un facteur central pour expliquer l'effet cancérigène de ces viandes. Son effet serait expliqué par sa capacité à catalyser la néoformation d'alcénals issus de la peroxydation des lipides au niveau de la lumière colique. D'autre part, il a été montré que le stress psychologique et l'anxiété entraînent une augmentation de la perméabilité de la barrière épithéliale intestinale. Dans cette thèse, nous avons fait l'hypothèse que le stress psychologique et l'anxiété, en raison de leur effet délétère sur la fonction de barrière de l'intestin, pourraient augmenter le risque de cancer colorectal associé à la consommation de viande rouge et charcuterie. Cette hypothèse a été étudiée grâce à une approche multidisciplinaire combinant études épidémiologiques et expérimentales. Une étude épidémiologique sur la cohorte Nutrinet-Santé nous a permis de montrer que le risque de cancer (toutes localisations confondues et colorectal) associé à la consommation de viande rouge et charcuterie était augmenté de manière plus importante chez les participants anxieux que dans la population générale. Des résultats similaires ont été obtenus pour l'association entre le fer héminique provenant de ces viandes et le risque de cancer. Une étude expérimentale menée chez la souris (C57Bl6/J) nous a permis de montrer que le stress de séparation maternelle augmentait la génotoxicité et l'hyperprolifération induites par le fer héminique sur la muqueuse colique. Enfin, des expérimentations menées sur un modèle cellulaire de barrière épithéliale intestinale (Caco-2) nous ont permis de montrer que l'augmentation de perméabilité induite *in vitro* par des cytokines inflammatoires n'augmentait pas la cyto- et génotoxicité des alcénals. Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que l'effet cancérigène du fer héminique provenant de la consommation de viande rouge et de charcuterie pourrait être augmenté par le stress psychologique et l'anxiété par des mécanismes qui demandent encore à être explorés.

Abstract

Epidemiological studies show high-evidenced associations between the consumption of red ("probable") and processed ("convincing") meats with colorectal cancer risk. Experimental studies have identified heme iron as a central factor explaining the carcinogenic effect of red and processed meats. Its effect would be explained by its ability to catalyze the luminal neoformation of alkenals resulting from lipid peroxidation. On the other hand, it has been shown that psychological stress and anxiety lead to an increased permeability of the intestinal epithelial barrier. In this thesis, we hypothesized that psychological stress and anxiety, due to their deleterious effect on the intestinal barrier function, could increase the risk of colorectal cancer associated with the consumption of red and processed meat. This hypothesis has been investigated through a multi-disciplinary approach combining epidemiological and experimental studies. An epidemiological study on the Nutrinet-Santé cohort showed that overall and colorectal cancer risk associated with the consumption of red and processed meat was increased more significantly among anxious participants than in the general population. Similar results were obtained for the association between heme iron from these meats and cancer risk. An experimental study in mice (C57Bl6/J) showed that early life stress increased the genotoxicity and hyperproliferation induced by heme iron on the colonic mucosa. Finally, experiments on a cellular model of the intestinal epithelial barrier (Caco-2) showed that the increased permeability induced *in vitro* by inflammatory cytokines did not increase the cyto- and genotoxicity of alkenals. Overall, these results suggest that the carcinogenic effect of heme iron from red and processed meat consumption could be increased by psychological stress and anxiety through mechanisms that still need to be explored.

TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations.....	10
Liste des figures et tableaux	12
Contexte bibliographique	15
1. Le cancer colorectal.....	16
1.1. Prévalence, incidence et mortalité du cancer colorectal.....	16
1.2. Étapes de la carcinogénèse colorectale	17
1.3. Les cancers héréditaires	20
1.4. Les cancers sporadiques.....	22
1.5. Facteurs de risques du cancer colorectal.....	24
2. Alimentation et risque de cancer : les différentes approches.....	25
2.1. Approche épidémiologique observationnelle.....	25
2.2. Approches interventionnelles	28
2.3. Juger du niveau de preuve des associations	35
3. Recommandations nutritionnelles pour la prévention des cancers.....	37
3.1. Le World Cancer Research Fund (WCRF)	37
3.2. Le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC).....	40
3.3. Prévention du cancer par l'alimentation en France.....	41
3.4. Bilan actuel des associations entre alimentation et cancer et recommandations nutritionnelles	44
4. Viande et cancer.....	51
4.1. Données épidémiologiques.....	51
4.2. Mécanismes impliqués dans la cancérogénicité de la viande rouge et de la charcuterie	58
5. La fonction de barrière de l'intestin.....	67
5.1. Anatomie et physiologie de la barrière intestinale.....	67
5.2. Notion de perméabilité intestinale	76
6. Impact du stress psychologique sur la santé	80
6.1. Stress psychologique et anxiété.....	80
6.2. Conséquences physiologiques du stress	81
6.3. Impact sur la barrière intestinale	83
6.4. Stress psychologique et risque de cancer	85
6.5. Modèle de stress de séparation maternelle	86

7.	Objectifs de la thèse et stratégie	89
7.1.	Hypothèse	89
7.2.	Objectifs et stratégie	89
Études réalisées et résultats.....		92
1.	Etude épidémiologique	92
1.1.	Introduction à l'article.....	92
1.2.	Article 1	96
1.3.	Discussion	106
2.	Étude expérimentale chez la souris	110
2.1.	Introduction à l'article.....	110
2.2.	Article 2	112
2.3.	Discussion	134
3.	Cytotoxicité des alcénals in vitro sur barrière épithéliale intestinale saine ou altérée...	140
3.1.	Mise au point d'un modèle in vitro de barrière épithéliale intestinale altérée	141
3.2.	Effets des alcénals sur la cytotoxicité, la TEER et la génotoxicité des Caco-2 en situation de barrière saine ou altérée.....	153
Discussion et perspectives.....		160
1.	Résultats et réponse aux objectifs	160
1.1.	Bilan des résultats au regard de notre hypothèse de départ	160
1.2.	Résultats supplémentaires	162
1.3.	Forces et limites des études.....	163
2.	Perspectives.....	167
2.1.	D'autres études épidémiologiques sont nécessaires.....	168
2.2.	Étudier l'impact des anxiolytiques sur la perméabilité intestinale.....	170
2.3.	Étudier l'effet du fer héminique en situation de stress psychologique dans un modèle de CCR chez la souris.....	171
2.4.	Mieux comprendre les mécanismes	173
3.	Enjeux sociétaux et impact de la thèse	175
3.1.	Diminuer l'impact santé de la viande rouge ou arrêter d'en consommer ?.....	175
3.2.	Intégrer les messages sur l'anxiété dans les recommandations alimentation- cancer ?	178
Annexes		180
Références		192

LISTE DES ABREVIATIONS

4-HNE : 4-hydroxynonenal
ACF : Aberrant Crypt Foci (foyer de cryptes aberrantes)
AFSCA : Agence fédérale pour la sécurité de la chaîne alimentaire
AGCC : Acides Gras à Chaîne Courtes
AGPI : Acides Gras Poly-Insaturés
AGS : Acides Gras Saturés
AHC : Amines Hétérocycliques
AICR : American Institute for Cancer Research (Institut Américain pour la Recherche sur le Cancer)
AMPs : Antimicrobial Proteins (protéines antimicrobiennes)
ANOVA : Analyse de Variance
Anses : Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
AOM : Azoxyméthane
APC : Adenomatous Polyposis Coli
CCR Cancer Colorectal
CD : Cellules Dendritiques
CEI : Cellule Epithéliale Intestinale
CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer
DGS : Direction Générale de la Santé
DHN-MA : 1,4-Dihydroxynonene Mercapturic Acid
DSS : Dextran Sodium Sulfate
FPN : ferroportine
GLOBOCAN : Global Cancer Observatoy
GR : Glucocorticoid receptors (Récepteurs aux glucocorticoïdes)
HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
HCP1 : Heme Carrier Protein 1
HCSP : Haut Comité de Santé Publique
HMOX : Hème Oxygénase
HNPPC : Hereditary Non-Polyposis Colon Cancer (cancer colorectal héréditaire sans polypose)
HPA axis : Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis (axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien)
IC : Intervalle de Confiance
IFN- γ : Interféron γ
INCa : Institut National du Cancer
JAM : Junctional Adhesion Molecule (molécule d'adhésion)
MDA : malondialdehyde
MDF : Mucin Depleted Foci (foyer déplété en mucine)

Liste des abréviations

Min : Multiple intestinal neoplasia (néoplasie intestinale multiple)
MMR : MisMatch Repair (réparation des mésappariements des bases de l'ADN)
MR : Mineralocorticoid Receptors
MSI : Instabilité Microsatellitaire
Nf-kb : Nuclear factor-kappa B
NOCs : *N*-nitroso compounds (composés *N*-nitrosés)
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PAF : Polypose Adénomateuse Familiale
PDX : Patient-derived tumor xenografts (xénogreffes dérivées de patients)
PKC : Protéine Kinase C
PNAN : Programme National de l'Alimentation et de la Nutrition
PNNS : Plan National Nutrition-Santé
PRR : Pattern-Recognition Receptors (récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires)
ROS : Reactive Oxygen Species (espèce réactive de l'oxygène)
SNA : Système Nerveux Autonome
SVF : Sérum de Veau Foetal
TBARs : Thiobarbituric Acid Reactive Substances
TEER : TransEpithelial Electrical Resistance (résistance électrique trans-épithéliale)
Treg : cellules T-régulatrices
VE : vésicules extracellulaires
WCRF : World Cancer Research Fund
ZO : Zonula Occludens

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figures :

Figure 1 : Incidence du cancer colorectal en 2018 dans le monde (Bray <i>et al.</i> 2018)	17
Figure 2 : Les différentes voies de développement de la carcinogénèse colorectale (Dekker <i>et al.</i> 2019).....	18
Figure 3 : Voie de signalisation Wnt, inactivée en absence du ligand Wnt (à gauche) ou activée en présence du ligand Wnt (à droite) (Stampella, Monteagudo, and Lories 2017).	20
Figure 4 : Corrélation génotype-phénotype pour le gène APC (Leoz <i>et al.</i> 2015)	22
Figure 5: Modèle de séquence adéome-carcinome pour l'instabilité chromosomique dans le cancer colorectal (Walther <i>et al.</i> 2009).....	23
Figure 6 : Facteurs associés à une augmentation ou diminution du risque de cancer colorectal, en fonction du niveau de preuve de l'association (WCRF b. 2018)	39
Figure 7 : Nombre de nouveaux cas de cancer attribuables aux facteurs liés au mode de vie et à l'environnement en France en 2015 parmi les adultes de 30 ans et plus (IARC, 2018)	45
Figure 9: Facteurs nutritionnels associés à une diminution du risque de cancer (Nacre, WCRF rapport 2018)	46
Figure 8: Facteurs nutritionnels associés à une augmentation du risque de cancer (Nacre, WCRF rapport 2018).....	46
Figure 10: Recommandations nutritionnelles dans le cadre de la prévention du risque de cancer (Nacre, WCRF rapport 2018)	48
Figure 11: Recommandations du PNNS (mangerbouger.fr)	49
Figure 12 : Méta-analyse dose réponse de la consommation de viande rouge et transformée et du risque de cancer colorectal pour 100 grammes par jour (WCRF b. 2018)	52
Figure 13 : Méta-analyse dose réponse de la consommation de viande rouge et du risque de cancer colorectal pour 100 grammes par jour (WCRF b. 2018).....	53

Liste des figures et tableaux

Figure 14 : Méta-analyse dose réponse de la consommation de viande transformée et du risque de cancer colorectal pour 100 grammes par jour (WCRF b. 2018).....	54
Figure 15 : consommation de viandes rouges et transformées et risque de cancer, selon le CIRC	55
Figure 16 : Evolution de la consommation de produits carnés en France (enquêtes CCAF 2007, 2020, 2013 et 2016)	57
Figure 17 : Structure du fer héminique	60
Figure 18: Anatomie de l'intestin grêle (Société canadienne du cancer)	67
Figure 19: Anatomie du gros intestin (Société canadienne du cancer)	67
Figure 20: Histologie de l'intestin grêle (Société canadienne du cancer)	68
Figure 21 : Protéines des jonctions serrées (Zeisel, Dhawan, and Baumert 2019)	70
Figure 22 : Anatomie du système immunitaire intestinal (Abreu 2010)	71
Figure 23 : Rôles de la MLCK dans la régulation de la jonction serrée (He <i>et al.</i> 2020)	78
Figure 24: Activation de l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien en réponse à un stress	82
Figure 25 : Mécanisme proposé pour expliquer l'augmentation de perméabilité intestinale induite par le stress. Adapté de Ait-Belgnaoui <i>et al.</i> 2005	84
Figure 26 : Impact du stress de séparation maternelle sur l'anxiété, la dépression, la mémoire et le poids corporel chez la C57Bl/6 (Tractenberg <i>et al.</i> 2016).....	87
Figure 22: Risque relatif de cancer lorsque la consommation de viande rouge et charcuterie augmente de 50g/jour ou lorsque l'apport en fer héminique provenant de ces viandes augmente de 1mg/jour	106
Figure 23 : Croissance et différenciation des Caco-2 sur insert.....	142
Figure 24 : Mesure de la TEER d'une monocouche de cellules différenciées sur insert.....	143
Figure 25 : Résistance électrique trans-épithéliale des Caco-2 différenciées sur inserts lors de l'exposition à des cytokines inflammatoires à 12, 24, 48 et 72 heures.	148
Figure 26 : Résultats des différents tests de cytotoxicité effectués sur des Caco-2 cultivées sur inserts et exposées pendant 24 heures à du HNE à 160 µM.	150

Liste des figures et tableaux

Figure 27: Protocole de mise en place du modèle de barrière épithéliale intestinale altérée in vitro.	152
Figure 28 : Viabilité cellulaire des Caco-2 en situation de barrière épithéliale saine ou altérée, exposées à plusieurs doses (0, 80, 120 et 160 μ M) de HNE.	156
Figure 29 : TEER des Caco-2 en situation de barrière épithéliale saine ou altérée, exposées à une dose non cytotoxique de HNE (40 μ M).....	157
Figure 30 : γ -H2AX nucléaire de Caco-2 en situation de barrière épithéliale saine ou altérée, exposées à une dose non cytotoxique de HNE (40 μ M).	158
Figure 31 : Teneur en fer héminique et en acides gras polyinsaturés dans les jambons et dans les autres charcuteries (Ciqual). Les valeurs sont des moyennes \pm SEM.....	162
Figure 32 : Perméabilité intestinale mesurée à PND 50	165
Figure 33 : Production mondiale de viande par continent, de 1961 à 2018 (UN Food and Agriculture Organization).....	177
Figure 34 : Production mondiale de viande par animal, de 1961 à 2018 (UN Food and Agriculture Organization).....	177
Figure 35 : Evolution de la taille des troupeaux (en nombre d'animaux) dans le monde jusqu'en 2050, selon les projections de la FAO, en fonction des différents scénarios de durabilité (FAO, 2018).....	178

Tableaux :

Tableau 1 : P-values des tests évaluant l'effet du sexe, du stress et du régime, et des interactions entre ces facteurs et différences entre les groupes (en %), P-values estimées par test de comparaison multiples du Tukey	139
Tableau 2 : Hétérogénéité des protocoles d'altération de la perméabilité d'une monocouche de Caco-2 par des cytokines inflammatoires	144

CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE

Ce contexte bibliographique, en plus de la présentation de l'état de l'art sur les principaux sujets de cette thèse que sont le **cancer colorectal**, **l'effet cancérigène de la viande rouge et de la charcuterie**, la **barrière intestinale** et le **stress psychologique**, met en évidence la nécessaire **complémentarité entre études expérimentales et observationnelles** pour explorer les relations alimentation-cancer et établir les **recommandations nutritionnelles**.

La première partie présente les principales **caractéristiques épidémiologiques et mécanistiques du cancer colorectal**.

La deuxième partie détaille les **différents types d'études scientifiques** qui explorent les **liens entre alimentation et risque de cancer**, ainsi que les critères de Hill qui permettent de **juger du niveau de preuve d'une association**.

La troisième partie recense les principaux **organismes** nationaux et internationaux **chargés de la prévention du cancer**, et résume leur **démarche** pour mettre en évidence les liens entre alimentation et risque de cancer et aboutir à la **mise en place de recommandations nutritionnelles**.

La quatrième partie est consacrée aux liens entre **consommation de viande rouge et de charcuterie** et **risque de cancer colorectal**, et détaille les mécanismes proposés pour expliquer ces liens. Nous nous intéressons plus particulièrement au **fer héminique**, proposé comme étant le **principal facteur responsable de l'effet cancérigène de la viande rouge et de la charcuterie**.

La cinquième partie définit le concept de **barrière intestinale** et introduit la notion de **perméabilité intestinale**, après une brève description anatomique de l'intestin.

La sixième partie définit les notions de stress psychologique et d'anxiété et détaille les **mécanismes** par lesquels le **stress augmente la perméabilité intestinale**.

La septième partie énonce les **hypothèses** retenues pour cette thèse et en précise les **objectifs**.

1. LE CANCER COLORECTAL

Les données sur la prévalence et l'incidence du cancer colorectal montrent que cette pathologie est devenue un problème de santé majeur. L'état actuel des connaissances sur la pathogénèse et les facteurs de risque du cancer colorectal permettent de conclure qu'il est possible de prévenir une partie des cas incidents par une modification du mode de vie, et notamment de l'alimentation.

1.1. Prévalence, incidence et mortalité du cancer colorectal

Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), 43,8 millions de personnes sont atteintes de cancer à travers le monde. 18,1 millions de nouveaux cas de cancers et 9,6 millions de décès liés au cancer ont été recensés dans le monde en 2018. Un homme sur cinq et une femme sur six dans le monde développeront un cancer au cours de leur vie, et un homme sur huit et une femme sur 11 meurent de cette maladie (Bray *et al.* 2018).

Selon le rapport du Global Cancer Observatory (GLOBOCAN) de 2018, le cancer colorectal (CCR) représente 10,2% des cas incidents de cancers dans le monde (Bray *et al.* 2018). Il s'agit du **deuxième cancer le plus meurtrier** (9,2% des décès par cancer) après le cancer des poumons et du **3^{ème} cancer le plus fréquent** après le cancer des poumons et le cancer du sein. Le CCR est le 3^{ème} cancer le plus fréquent chez les hommes, après le cancer des poumons et le cancer de la prostate, et il est le 2^{ème} cancer le plus fréquent chez les femmes, après le cancer du sein. **1,85 millions de nouveaux cas de CCR sont diagnostiqués chaque année** et il est responsable de plus de **860 000 décès par an**. Le taux de survie moyen à 5 ans pour les personnes atteintes d'une maladie diagnostiquée à un stade précoce (stades I et II) est d'environ 90% mais il passe à 13,1% lorsque le cancer est diagnostiqué à un stade avancé (Simon 2016).

Le taux d'incidence du CCR varie considérablement entre les régions du monde en **fonction du développement socio-économique** (Figure 1). Le taux d'incidence a tendance à augmenter proportionnellement à l'augmentation de l'indice de développement humain (IDH). La croissance démographique, le développement social et économique ainsi que le vieillissement de la population participeraient à l'augmentation du nombre de cas de cancer.

Contexte bibliographique

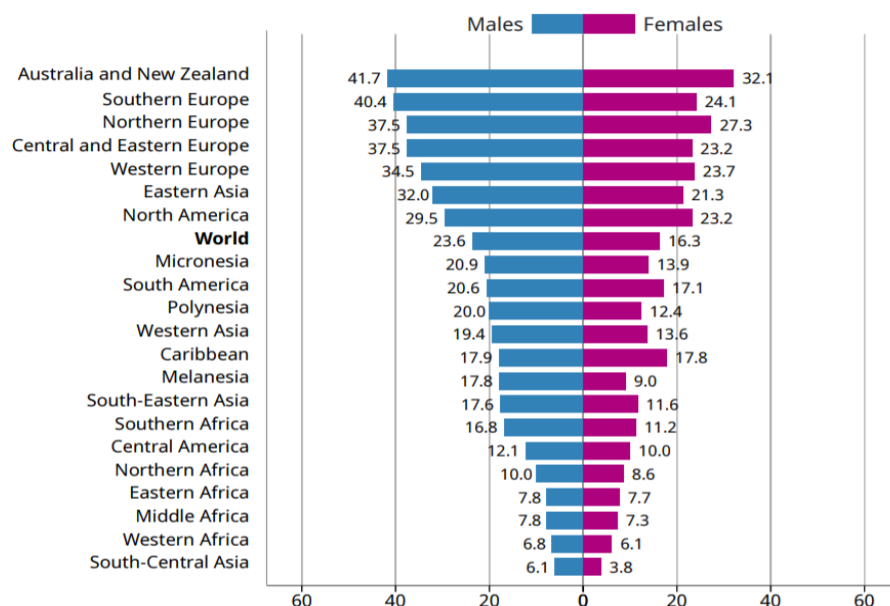


Figure 1 : Incidence du cancer colorectal en 2018 dans le monde (Bray et al. 2018)

En France, **43 336 nouveaux cas** de cancer colorectaux ont été recensés en **2018** (23 216 hommes et 20 120 femmes). Ce cancer constitue la **deuxième cause de décès par cancer**: 17 117 décès par CCR estimés en 2018 en France (9 294 hommes et 8 390 femmes) (Defossez et al., 2019).

1.2. Étapes de la carcinogénèse colorectale

Entre 5 et 10% des cas de cancers colorectaux seraient des formes **héréditaires**, mais la grande **majorité** des cas sont des **formes sporadiques** (Stoffel and Yurgelun, 2016). Les CCR apparaissent le plus souvent au niveau de la muqueuse et s'étendent ensuite aux autres couches de la paroi colique au fur et à mesure qu'ils se développent.

▪ **Voies impliquées dans la carcinogénèse colorectale**

La grande majorité des CCR, que ce soient les formes héréditaires ou sporadiques, présentent une **instabilité génétique**, ces instabilités se présentent sous au moins deux formes : il peut s'agir **d'instabilité chromosomique** (qui conduit à des anomalies visibles à l'échelle chromosomique) ou **d'instabilité génomique** induite par des anomalies de réparation des mésappariements des bases de l'ADN.

Contexte bibliographique

Il existe trois grandes voies distinctes responsables du développement du cancer colorectal (Figure 2):

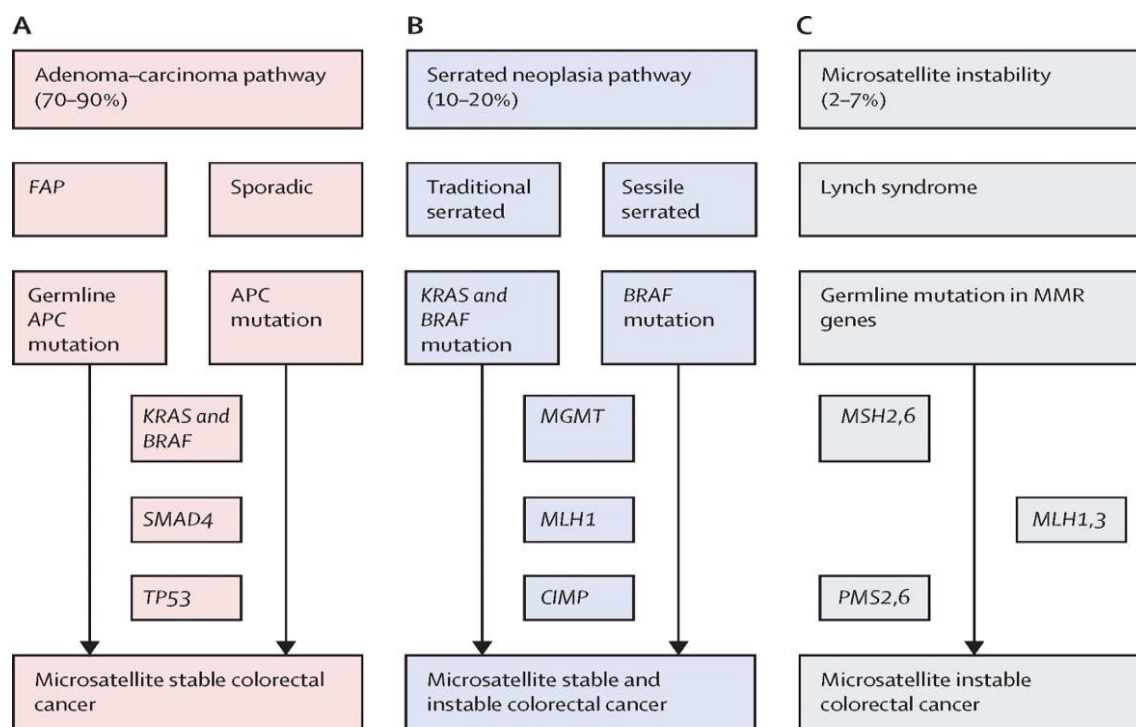


Figure 2 : Les différentes voies de développement de la carcinogénèse colorectale (Dekker et al. 2019)

- La « **séquence adénome-carcinome** », qui correspond à une séquence de mutations responsables de l'évolution d'un adénome en carcinome, est à l'origine de 70 à 90 % des CCR : cette séquence correspond aux **formes sporadiques** et de type **polypose adénomateuse familiale** (PAF ou FAP en anglais pour Familial Adenomatous Polyposis) décrites ci-dessous. La **mutation** du gène **APC** constitue la **première étape** de cette voie, qui est responsable de phénotypes d'instabilité chromosomique. Les mécanismes impliqués dans le développement de la PAF et des CCR sporadiques sont détaillés plus bas.
- La **voie des adénomes dentelés** (10 à 20 % des CCR). Cette voie est associée aux mutations des gènes *KRAS* et *BRAF*, et à une instabilité épigénétique, caractérisée par le phénotype de méthylation des îlots CpG. Ces types de CCR peuvent aussi être caractérisés par des **phénotypes de microsatellites stables**, dans le cas où les tumeurs acquièrent par la suite une mutation sur le gène antitumoral *P53* conduisant à une activation de voies pro-oncogènes par exemple, ou à des **phénotypes de microsatellites instables**, dans le cas où les tumeurs acquièrent une mutation au niveau d'un gène de réparation des mésappariements des bases de l'ADN (MMR) par exemple (Nguyen et al., 2020).

Contexte bibliographique

- La voie impliquant des **mutations dans les gènes du système de détection des mésappariements des bases de l'ADN** au moment de la réplication, induisant un phénotype d'instabilité des microsatellites, et correspondant au **syndrome de Lynch** (2 à 7 % des CCR) décrit ci-dessous. (Dekker *et al.*, 2019)

- ***Le gène adenomatous polyposis coli (APC)***

Un des **premiers événements** dans l'**initiation** et la progression de la majorité des cas de **CCR** est la survenue de **mutations au niveau du gène suppresseur de tumeur APC**. Des mutations somatiques de ce gène sont en effet retrouvées dans 60 à 80% des cancers colorectaux sporadiques. Et la polypose adénomateuse familiale résulte d'une mutation germinale au niveau de ce gène (Narayan and Roy, 2003; Zhang and Shay, 2017).

Le gène *APC* est situé sur le chromosome 5q21-q22. Il est composé de 8535 nucléotides et s'étend sur 21 exons. Ce gène code pour une protéine de 310 kDa qui est composée de 2843 acides aminés. Environ 75% de la séquence codante est située sur l'exon 15, qui semble être la région la plus fréquemment touchée par des mutations germinales et somatiques. La protéine APC joue un rôle dans l'adhésion cellule-cellule, la migration cellulaire, la ségrégation chromosomique et l'apoptose dans la crypte colique (Fearon and Vogelstein, 1990; Zhang and Shay, 2017).

La protéine **APC**, via sa liaison à la **β -caténine**, **inhibe la voie de signalisation Wnt**. En effet, à l'état basal, le « complexe de destruction » constitué des protéines APC, Axine, Caséine kinase et GSK-3b (glycogen synthase kinase 3 beta) est responsable de la phosphorylation de la β -caténine entraînant sa dégradation par le système ubiquitine-protéasome. La perte de la protéine APC provoque **l'activation de la voie Wnt** et **l'accumulation de la β -caténine** dans le cytoplasme. La β -caténine va alors migrer dans le noyau où elle agit comme un **coactivateur transcriptionnel**, activant l'expression de **gènes impliqués dans le contrôle la prolifération et la différenciation cellulaire** (Figure 3).

La protéine APC interagit également avec les **microtubules** qui ont un rôle fondamental dans la séparation du fuseau mitotique. Une anomalie de la protéine APC entraîne donc une **augmentation de la fréquence des anomalies chromosomiques** au moment de la division cellulaire.

Contexte bibliographique

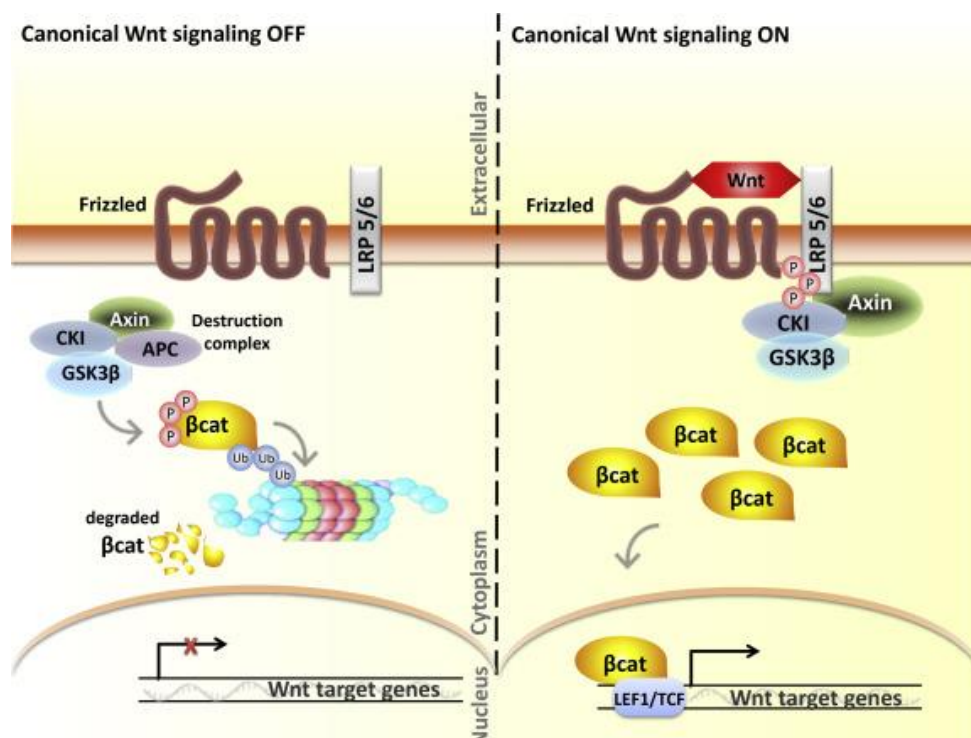


Figure 3 : Voie de signalisation Wnt, inactivée en absence du ligand Wnt (à gauche) ou activée en présence du ligand Wnt (à droite) (Stampella, Monteagudo, and Lories 2017).

1.3. Les cancers héréditaires

Les deux principaux types de cancers héréditaires sont la **polypose adénomateuse familiale** (PAF) et le **cancer colorectal héréditaire sans polypose** (HNPCC en anglais pour Hereditary Non-Polyposis Colon Cancer).

1.3.1. Le cancer colorectal héréditaire sans polypose (HNPCC) ou syndrome de Lynch

Le **syndrome de Lynch** est le **CCR héréditaire le plus courant**, mais il ne représente que 3% des cas de CCR. Il s'agit d'une maladie génétique héréditaire **autosomique dominante** provoquée par une **mutation germinale** dans l'un des **gènes MMR**. Les personnes atteintes de ce syndrome présentent un risque de développer un CCR au cours de leur vie qui est de l'ordre de 10% à 50 ans et 40% à 70 ans (Bansidhar and Silinsky, 2012).

Chez les sujets atteints du syndrome de Lynch, la plupart des adénomes présentent une **perte d'expression d'une protéine MMR** et une **instabilité des microsatellites** (Pellat *et al.*, 2019). Les microsatellites sont de courtes répétitions de mono, di ou trinuécléotides dans une région non codante du génome humain. Les motifs de répétition de ces microsatellites sont propres

Contexte bibliographique

à chaque individu et sont transmis intacts aux cellules filles au moment de la réplication. Des tumeurs qui présentent une instabilité des microsatellites se développent chez les patients atteints du syndrome de Lynch en raison de la transmission d'une mutation germinale dans les mécanismes de réparation de la disparité de l'ADN. Le corps humain possède plusieurs mécanismes différents pour réparer les décalages de paires de bases dans l'ADN répliqué. Au moment de la réplication de l'ADN, l'ADN polymérase peut occasionnellement faire des erreurs d'appariement des nucléotides. Ces erreurs se produisent le plus souvent dans des séquences nucléotidiques répétitives comme celles observées dans les microsatellites. Des mécanismes de réparation des mésappariements existent pour corriger ces nucléotides mal appariés dans l'ADN nouvellement répliqué. Notamment, les gènes MMR sont impliqués dans la **détection de ces mésappariements**. Les patients atteints du syndrome de Lynch ont hérité d'au moins un allèle défectueux d'un gène MMR : très généralement les gènes MLH1 ou MSH2, MSH6 plus rarement et PMS2 exceptionnellement. Cela provoque des variations au sein des microsatellites, se manifestant par un gain ou une perte de la longueur de répétition. Ces mutations dans les mécanismes de détections des mésappariements augmentent considérablement le **risque de développer des mutations spontanées**, facilitant la **cancérisation de ces cellules**.

1.3.1. Polypose adénomateuse familiale

La PAF est la deuxième plus courante forme de cancer héréditaire après le syndrome de Lynch. Il s'agit cependant d'un **syndrome rare** qui représente moins de 1% de tous les cas de CCR. Les personnes atteintes par ce syndrome présentent des centaines ou des milliers d'adénomes coliques débutant à l'adolescence (Lung *et al.*, 2015). Les symptômes sont peu fréquents chez l'adolescent jusqu'à ce que les adénomes soient importants et provoquent un saignement rectal ou même une anémie. Presque tous les patients développent un CCR s'ils ne sont pas diagnostiqués et traités à un stade précoce. Cette forme de cancer est cependant rare aujourd'hui car la majorité des patients sont diagnostiqués avant que le cancer ne se développe, et une ablation partielle ou totale du côlon est souvent réalisée (Bansidhar and Silinsky 2012).

La PAF résulte d'une mutation germinale, le plus souvent de décalage de cadre ou non-sens, au niveau du gène *APC*. Il existe des **variantes** de la PAF en fonction du nombre de polypes ou

Contexte bibliographique

des manifestations extra-coliques. La PAF **atténuée** est une forme moins grave de la maladie, caractérisée par moins de polypes adénomateux, un âge plus tardif d'apparition des adénomes et du cancer, et un risque plus faible de développer un CCR.

La gravité de la PAF dépend de la **localisation de la mutation sur le gène APC**: des mutations entre les codons 1250 et 1465 sont associées à une forme plus agressive alors que des mutations dans des régions 5' et 3' sont associées à une PAF atténuée (Figure 4) (Leoz *et al.*, 2015).

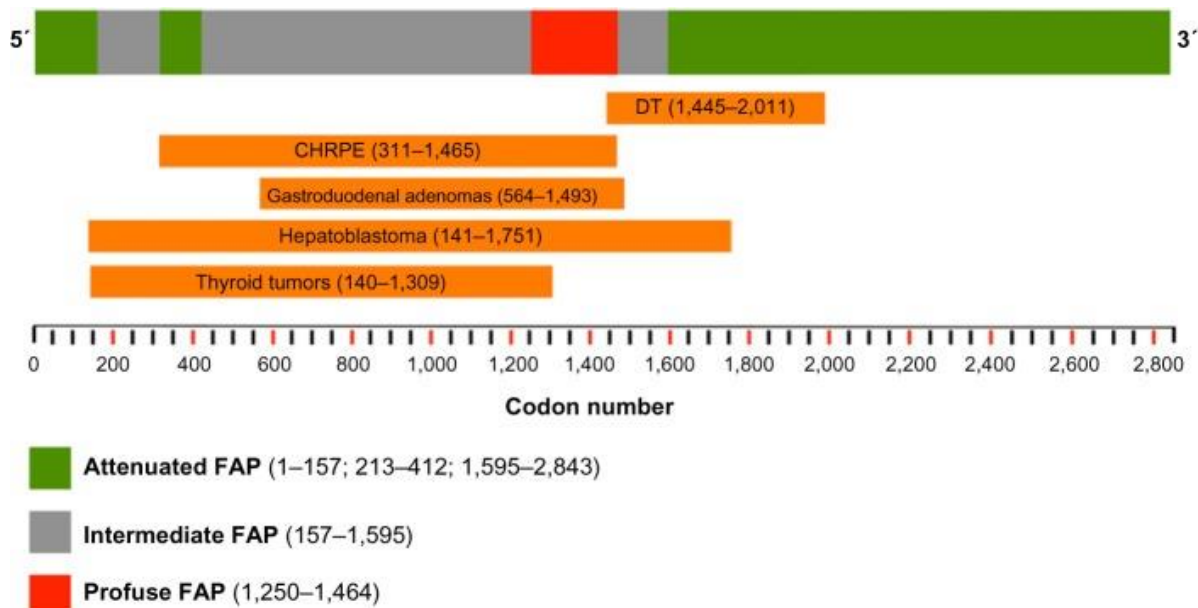


Figure 4 : Corrélation génotype-phénotype pour le gène APC (Leoz *et al.* 2015)

Plus de 70% des patients atteints de PAF développent des manifestations extra-intestinales, telles que des ostéomes multiples, des anomalies dentaires et diverses autres lésions localisées dans tout le corps. De la même manière que la PAF classique, la gravité des manifestations extra-intestinales dépend de la localisation de la mutation au niveau du gène APC (Dinarvand *et al.*, 2019).

1.4. Les cancers sporadiques

Les cancers sporadiques sont les **cancers colorectaux les plus fréquents**. Ces formes de CCR se développent lentement sur plusieurs années selon un processus progressif allant de l'adénome au carcinome (Kinzler and Vogelstein, 1996). La majorité des CCR sporadiques sont caractérisés par l'accumulation séquentielle de mutations. Il n'existe pas de schéma unique des modifications génétiques conduisant au développement du CCR, néanmoins, certaines séquences de mutations sont particulièrement fréquentes. Un **modèle de mutations**

Contexte bibliographique

séquentielles permettant de passer de l'adénome au carcinome est représenté dans la Figure 5 (Walther *et al.*, 2009).

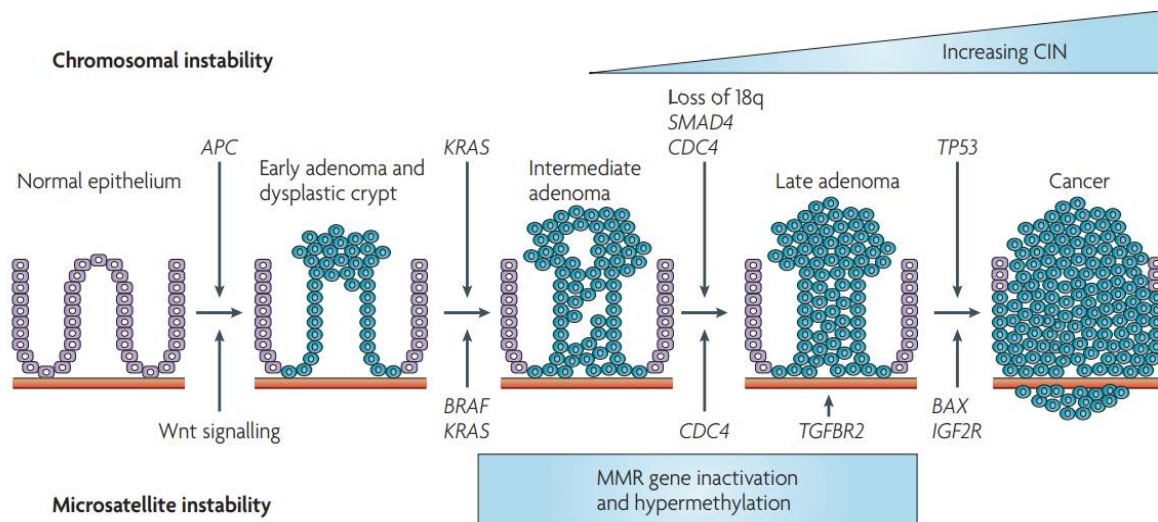


Figure 5: Modèle de séquence adénome-carcinome pour l'instabilité chromosomique dans le cancer colorectal (Walther *et al.* 2009)

Des **mutations du gène APC** sont présentes dans 70 à 80% des adénomes colorectaux (Kinzler and Vogelstein 1996). Ces mutations semblent faire partie des événements les plus précoces puisqu'elles sont également présentes dans les petits polypes bénins. L'implication de la protéine APC dans le cancer colorectal résulterait principalement de sa **fonction de régulation de la protéine β -caténine dans la voie de signalisation Wnt**. Parmi les tumeurs ne présentant pas de mutation au niveau du gène APC, plusieurs possèdent des **mutations activatrices** au niveau de la **voie Wnt** telles que la mutation du gène codant la β -caténine (Novellademunt *et al.*, 2015).

La plupart des adénomes présentant des mutations au niveau du gène APC, évolueront en carcinome par l'acquisition ultérieures de mutations, notamment des **mutations activatrices** au niveau du **gène KRAS**. Des mutations somatiques de KRAS se trouvent dans environ 40% des CCR, en général au niveau du codon 12. Les protéines RAS sont des petites GTPases qui jouent un rôle important dans la **division cellulaire**, la **différenciation cellulaire** et l'**apoptose**. La voie de signalisation ERK (Extracellular signal-regulated kinases), qui est impliquée dans le contrôle de la progression du cycle cellulaire, est régulée par K-RAS. En activant cette voie de signalisation, la protéine K-Ras participe à l'augmentation de la prolifération, et est donc considérée comme **proto-oncogène** (Nguyen *et al.*, 2020).

Contexte bibliographique

L'étape suivante menant à l'évolution de l'adénome en carcinome correspond à des mutations au niveau du bras long du chromosome 18. **SMAD4**, un gène situé sur ce chromosome, est un membre de la voie de signalisation TGF- β (transforming growth factor beta). Cette voie de signalisation joue un rôle essentiel dans la régulation de la croissance, de la différenciation et du développement cellulaire. **SMAD4** est un gène suppresseur de tumeur impliqué dans de nombreux processus biologiques tels que le cycle cellulaire et l'apoptose, et la mutation de ce gène favorise la tumorigénèse (Zhao, Mishra, and Deng 2018).

1.5. Facteurs de risques du cancer colorectal

Le CCR est une maladie multifactorielle impliquant des facteurs de risque génétiques, environnementaux et liés au mode de vie (Brenner, Kloor, and Pox 2014). Nous avons vu que la **composante héréditaire** expliquerait 5 à 10% des cas de CCR, mais le mode de vie joue également un rôle majeur dans la survenue et le développement du CCR. Les principaux facteurs de risques liés au mode de vie qui augmentent le risque de développer un CCR sont une **forte consommation d'alcool, l'obésité, l'inactivité physique** et une **alimentation riche en viande rouge et charcuterie** (Cho *et al.*, 2019). En France, plus de la moitié (56%) des cas de CCR seraient attribuables à des facteurs de risque évitables (Soerjomataram *et al.*, 2018). Tous les mécanismes par lesquels ces facteurs modifient le risque de CCR ne sont pas encore complètement compris, il semblerait que les effets biologiques de chaque facteur soient de nature pléiotropique.

La prévention du CCR est devenue un problème majeur de santé publique ces dernières décennies. Selon le WCRF (World Cancer Research Fund), le CCR est l'un des cancers les plus faciles à prévenir et plus de 40% des cas pourraient être évités par un changement de mode de vie, y compris une modification de son alimentation.

Plusieurs approches ont été utilisées pour explorer les relations alimentation-cancer, que nous allons maintenant détailler. Les organismes chargés de la prévention du cancer s'appuient sur la synthèse de ces études pour établir des recommandations nutritionnelles.

2. ALIMENTATION ET RISQUE DE CANCER : LES DIFFERENTES APPROCHES

L'incidence de cancer augmente chaque année depuis 30 ans en France et dans le monde, principalement en raison du vieillissement de la population et de l'amélioration des méthodes de diagnostic, et il représente aujourd'hui la première cause de mortalité prématurée en France. Les recommandations nutritionnelles, qui occupent une place majeure dans la prévention des cancers, sont établies à partir de synthèses de la littérature. Les études qui explorent les liens entre l'alimentation et le risque de cancer peuvent être regroupées en deux grandes catégories : les études épidémiologiques observationnelles et les études interventionnelles (épidémiologiques, *in vivo* et *in vitro*). Alors que les études épidémiologiques observationnelles mettent en évidence des **associations** entre des groupes d'aliments et la présence ou la survenue de cas de cancer, les études interventionnelles permettent d'établir **un lien de causalité** et explorent les mécanismes biologiques expliquant les associations mises en évidence par les études observationnelles.

2.1. Approche épidémiologique observationnelle

2.1.1. Types d'études épidémiologiques observationnelles

L'OMS définit l'**épidémiologie** comme « une étude de la **distribution des maladies** et des invalidités **dans les populations humaines**, ainsi que des **influences** qui déterminent cette distribution ». Les études épidémiologiques permettent **d'évaluer la fréquence d'une maladie** dans une population et **d'identifier les facteurs de risques** dans le but de prévenir l'apparition de maladies. On peut différencier les études **observationnelles**, dans lesquelles l'investigateur n'intervient pas, des études **d'intervention**. Les études observationnelles peuvent être **descriptives** (description d'une maladie dans une population) ou **analytiques** (analyse des relations entre plusieurs variables). Il existe quatre types d'études analytiques, les relations alimentation-santé étant explorées principalement par des études cas-témoin ou par des études de cohorte :

Les **études écologiques** sont des études dans lesquelles les analyses sont réalisées sur des groupes d'individus et qui permettent principalement de **formuler des hypothèses**. Par

Contexte bibliographique

exemple, une récente étude écologique a exploré l'association entre les déterminants sociaux de santé et le rapport mortalité/incidence de cancer dans le monde. Cette étude a montré que les populations ayant un meilleur système d'éducation, des revenus plus élevés, moins d'inégalités, des politiques et des programmes actifs de lutte contre le cancer et des systèmes de santé performants étaient celles qui avaient les plus faibles rapports mortalité/incidence de cancer, pour les cancers du poumon, du sein, du col de l'utérus et le CCR (McDaniel *et al.*, 2019).

Les **études transversales** mesurent l'exposition et la prévalence d'une maladie à un même temps donné. Par exemple une étude menée chez les mexicains-américains a montré que la **consommation de fruits et légumes était inversement associée au nombre de cancer** dans cette population (Wu *et al.*, 2019)

Les **études cas-témoin** sont effectuées sur les personnes atteintes d'une maladie que l'on souhaite étudier et sur un groupe témoin approprié. Par exemple, **EPICAP** est une étude cas-témoin qui explore le rôle des **facteurs de risque environnementaux et génétiques** chez les sujets de moins de 75 ans atteints d'un **cancer de la prostate** en population française (Menegaux *et al.*, 2014). Dans les études cas-témoin, les données sont recueillies sur les causes possibles de la maladie qui sont survenues avant l'entrée dans l'étude. Ce sont des études longitudinales (évolution dans le temps) rétrospectives (on regarde ce qui s'est passé avant l'entrée dans l'étude). Lorsque l'on étudie les liens entre alimentation et cancer, les participants doivent donc se rappeler de ce qu'ils ont mangé dans le passé, ce qui est source d'erreur, on parle de **biais de mémoire** (« **recall bias** » en anglais).

Les **études de cohortes** impliquent l'inclusion de sujets « sains » qui sont suivis dans le temps. Il s'agit d'études longitudinales (suivi dans le temps) prospectives (l'exposition est mesurée avant la survenue de la maladie). Ces études reposent sur la collecte d'informations sur des sujets suivis dans le temps, via des questionnaires. Cela permet de **comparer l'incidence d'évènements de santé en fonction des caractéristiques des participants**. Ces études n'impliquant pas d'intervention mais un suivi observationnel des participants, l'inclusion de participants est plus facile que pour une étude interventionnelle, et un nombre important de participants peut être inclus dans les études de cohorte. Les vastes études de cohortes occupent un **rôle central dans l'identification des déterminants de santé publique**. Cependant, dans les études de cohorte, l'ensemble des facteurs pouvant intervenir dans la

Contexte bibliographique

relation nutrition et cancer ne pouvant être contrôlés, la mise en évidence d'une association ne permet pas de conclure de façon formelle à une relation causale même si les critères de Hill (voir page 32) permettent de juger du niveau de preuve. Un biais supplémentaire est que la cohorte est rarement complètement représentative de la population générale, il est donc difficile de généraliser les résultats à la population générale. En France, il existe plusieurs études de cohorte investiguant les liens entre mode de vie/alimentation et risque de cancer, nous détaillons ci-dessous l'exemple de la cohorte Nutrinet-Santé.

2.1.2. Exemple d'une vaste étude de cohorte française : Nutrinet-Santé

Les études de cohortes prospectives portant sur de très grandes populations ont un rôle majeur dans la mise en évidence des associations entre l'alimentation et le risque de maladies telles que le cancer. Elles nécessitent une estimation précise des apports alimentaires et des événements de santé et la collecte des informations utiles permettant le contrôle des facteurs de confusion potentiels.

Nutrinet-Santé est une large étude de cohorte prospective française **basée sur internet** et dont l'objectif général est **d'étudier les relations entre notre alimentation et les événements de santé**. Le recrutement des participants, basé sur le volontariat, a été **lancé en mai 2009** et se poursuit encore aujourd'hui. Le **suivi** des participants se fait par des questionnaires **en ligne**, sur un site dédié (www.etude-nutrinet-sante.fr). Cette étude est caractérisée par une **évaluation détaillée des expositions alimentaires** et un suivi régulier des événements de santé. Les participants répondent en lignes à des questionnaires portant sur l'alimentation, le mode de vie, les données anthropométriques, les données de santé et l'activité physique (Hercberg *et al.*, 2010).

Plus de 171 000 participants sont actuellement inclus dans cette étude, et plusieurs milliers d'évènements de santé (incidence de cancers, de maladies cardiovasculaires etc.) ont été rapportées depuis le lancement de la cohorte. Cette vaste cohorte permet de **mettre en évidence des associations entre l'alimentation et la survenue de maladies**, et **d'identifier des aliments ou groupes d'aliments à risque ou protecteurs**. Cette vaste étude de cohorte a donné lieu à la publication de plusieurs centaines d'articles scientifiques dans des revues internationales, dont beaucoup ont été pris en compte dans les expertises collectives internationales sur les liens entre alimentation et santé.

Contexte bibliographique

2.1.3. Les méta-analyses

Les **revues systématiques de la littérature** sont des études regroupant l'ensemble des résultats des études indépendantes menées sur un sujet précis. Elles peuvent inclure une **méta-analyse**, qui est une **méthode statistique** de combinaison et de synthèse de l'ensemble de ces résultats. La méta-analyse est un **outil de synthèse puissant** qui repose sur une **methodologie rigoureuse et reproductible**, permettant de **tirer des conclusions à partir de l'ensemble des données** publiées sur un sujet. Il s'agit d'une étude dite secondaire car elle regroupe les résultats d'études publiées indépendamment, et la **qualité des études incluses** joue un rôle majeur dans la **qualité globale de la méta-analyse**. De plus, le nombre d'études incluses dans la méta-analyse doit être suffisamment important pour pouvoir réaliser des tests statistiques, et le **niveau de preuve de chaque étude** incluse doit être **pris en compte** pour pouvoir estimer le **niveau de preuve global**. La complexité la méta-analyse réside dans la prise en compte de **l'hétérogénéité** liée au regroupement de données provenant de différentes études aux différents designs et protocoles (Paul and Leibovici, 2014).

Les méta-analyses occupent une **place essentielle dans la mise en évidence des liens entre alimentation et risque de cancer** : les organisations nationales et internationales se basent sur les résultats de méta-analyses pour déterminer quels sont les aliments ou groupes d'aliments qui augmentent ou au contraire diminuent le risque de cancer.

2.2. Approches interventionnelles

Les associations observées dans les études épidémiologiques doivent être complétées par des études expérimentales qui vont explorer la plausibilité des mécanismes biologiques proposés.

La force des approches expérimentales réside dans la possibilité de ne faire varier qu'un seul paramètre à la fois. Ainsi, ces études permettent de valider ou invalider une hypothèse d'association positive ou négative entre ce paramètre et le risque de survenue de la maladie, basée sur des études d'observations. Elles sont **indispensables pour prouver l'existence d'un lien causal**.

2.2.1. Étude d'intervention chez l'Homme

Les études d'interventions avec le niveau de preuve le plus élevé sont les essais randomisés en aveugle. Dans ce type d'études, les individus sont répartis aléatoirement soit dans un

Contexte bibliographique

groupe contrôle soit dans le groupe d'intervention (randomisation) et ni le participant ni l'expérimentateur ne connaissent cette répartition (double aveugle). Ainsi on élimine les biais liés à la sélection de l'individu et on réduit les biais liés aux facteurs de confusion. Cette approche méthodologique est essentielle dans l'obtention de la preuve d'une relation causale entre le facteur nutritionnel étudié et le risque de cancer. Il existe deux types d'études interventionnelles chez l'Homme pour explorer le lien entre l'alimentation et le risque de CCR: on peut étudier l'effet d'un (groupe d')aliment ou nutriment sur **l'incidence de cas** ou sur la **récurrence de polypes**. Cependant, il est difficile d'intervenir sur l'alimentation sans que les participants en aient conscience. De plus, dans une étude d'intervention nutritionnelle, on peut mesurer l'impact d'un facteur nutritionnel protecteur seulement, mais il n'est pas possible, pour des raisons éthiques, de mesurer l'impact d'un facteur nutritionnel présumé à risque.

Cependant, en particulier pour les aliments associés à une augmentation du risque mais d'une manière générale aussi, des **études à court terme** chez des **volontaires** permettent d'explorer la **modulation par l'alimentation de biomarqueurs associés au risque de cancer**. Des études cliniques réalisées chez des volontaires sains ont par exemple permis de mettre en évidence la présence de **biomarqueurs fécaux associés à la promotion de la carcinogénèse induite par la charcuterie** (Pierre *et al.*, 2013). Ces études cliniques permettent donc de vérifier certaines hypothèses générées par les études menées sur les animaux. Il a notamment été montré que les nitrites de la charcuterie favorisent la production endogène de composés *N*-nitrosés (NOCs) chez des volontaires sains (Joosen *et al.*, 2009).

2.2.2. *Expérimentations in vivo chez l'animal*

Les expérimentations sur les animaux (rongeurs) permettent d'étudier une association établie par l'épidémiologie et les mécanismes d'action d'un facteur sur la survenue d'une maladie à l'échelle d'un organisme entier. Appliqué à la relation alimentation-cancer, on peut étudier les mécanismes d'action des aliments présumés à risque sur le processus de cancérogenèse, ce qui est impossible à faire chez l'Homme. La **combinaison d'étude épidémiologique observationnelle chez l'Homme et d'étude expérimentale chez l'animal** est donc particulièrement bien **adaptée** pour étudier **l'effet cancérigène d'un aliment ou groupe d'aliment**.

Contexte bibliographique

L'autre avantage du modèle animal est que l'on peut **contrôler l'environnement** de l'expérimentation et ainsi **réduire** de manière importante tous les **biais** liés aux facteurs de confusion qui pourraient impacter la survenue de la maladie. De la même manière, le choix des animaux permet de réduire les biais liés à l'hétérogénéité de la population (génotype etc.). Il est important d'essayer de contrôler le plus de facteurs possibles (tels que le stress physique ou psychologique, la douleur, etc.) qui peuvent impacter les résultats de ces expérimentations.

Dans le **cas du CCR**, les **modèles animaux de carcinogénèse colorectale** ont largement contribué à la mise en évidence d'aliments promoteurs.

▪ **Modèles murins de carcinogénèse colorectale**

Les études portant sur le CCR ont recours à plusieurs **modèles animaux** en raison de la diversité des mécanismes impliqués dans la carcinogénèse colorectale. La méthode la plus ancienne d'induction de CCR chez les animaux, et qui est encore très utilisée aujourd'hui, repose sur **l'administration de composés chimiques cancérigènes** (par alimentation, gavage oral, ou par injection intrapéritonéale, sous-cutanée ou intramusculaire). Un composé chimique couramment utilisé pour induire la carcinogénèse colorectale chez le rat et la souris est **l'azoxyméthane (AOM)**, un agent cancérigène spécifique du côlon. C'est le modèle qui a été utilisé par l'équipe PPCA pour montrer l'effet promoteur de la viande rouge et de la charcuterie sur la carcinogénèse colorectale chez le rat (Pierre *et al.*, 2003, 2004). Le sulfate de dextran sodique (DSS), utilisé pour simuler des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, combiné avec l'AOM a été utilisé comme **modèle de cancer induit par la colite** (Snider *et al.*, 2016). L'avantage de ce modèle induit chimiquement est qu'il reflète bien la progression des foyers de crypte aberrants vers les adénomes et les carcinomes (séquence adénome-carcinome) retrouvée chez l'humain (De Robertis *et al.*, 2011). Cependant, les carcinomes induits chimiquement présentent rarement des propriétés invasives et les métastases sont généralement absentes (Bürtin *et al.*, 2020). Suite à la découverte des différentes voies impliquées dans la carcinogénèse colorectale, des **modèles de souris transgéniques** ont été mis en place pour mimer des mécanismes moléculaires de la carcinogénèse colorectale. La souris Apc^{Min} , nommée ainsi en raison de sa prédisposition à la formation de multiples néoplasmes intestinaux (Multiple intestinal neoplasia, Min), est le premier modèle murin génétiquement modifié de cancer colorectal. Il s'agit de souris C57Bl/6

Contexte bibliographique

présentation une mutation hétérozygote pour le gène *APC*, qui joue un rôle essentiel dans la carcinogénèse colorectale (Powell *et al.*, 1992). La combinaison de ce modèle génétiquement modifié avec l'administration de composés chimiques cancérigènes tels que l'AOM accélère l'apparition de tumeurs (Bürtin *et al.*, 2020). Ces modèles transgéniques sont cependant généralement très coûteux et le processus de sélection des souris implique l'utilisation de nombreuses souris qui ne seront pas utilisées ni pour la reproduction ni pour la recherche, soulevant des problèmes éthiques. En effet, l'obtention de souris Min hétérozygotes nécessite un grand nombre de souris car les souris Min femelles ne sont pas fertiles. Enfin, il existe des modèles de **transplantation de greffons cancéreux** (modèles PDX pour Patient-derived tumor xenografts) qui offrent des perspectives intéressantes en matière de recherche sur le cancer (Bürtin *et al.*, 2020).

▪ **Étude des marqueurs précoces du CCR**

L'étude de l'effet promoteur des aliments n'implique pas nécessairement d'utiliser des modèles de cancérogénèse, elle peut se faire sur des animaux n'ayant pas d'induction de cancer, en explorant des **marqueurs précoces de la carcinogénèse**. Il a par exemple été montré que l'**hyperprolifération** et la **génotoxicité épithéliales coliques** étaient associées à une forte augmentation du risque de cancer colorectal chez l'Homme (Kinzler and Vogelstein, 1996). De plus, plus spécifiquement pour l'effet promoteur du fer héminique sur la cancérogénèse colorectale qui a été lié au moins en partie à une augmentation de la peroxydation lipidique, des **marqueurs de la peroxydation lipidique** ont été utilisés dans les modèles animaux et chez l'homme comme marqueurs de risque de CCR associé à l'apport en fer héminique. Par exemple, le **DHN-MA** urinaire reflète le niveau de peroxydation lipidique lié à l'apport en fer héminique et a été proposé comme étant un biomarqueur à court terme du risque de cancer associé aux régimes à base de viande dans les études nutritionnelles (Pierre *et al.*, 2006). De plus, chez l'homme et chez les rongeurs, la peroxydation lipidique liée à la consommation de viande conduit à l'augmentation des **substances réagissant à l'acide thiobarbituriques (TBARS)** fécaux, qui constituent donc un biomarqueur global de la peroxydation lipidique (Dimitrios, 2017). Ces marqueurs présentent l'avantage d'être mesurables dans les biofluides comme les fèces (TBARS) et urines (DHN-MA), et peuvent donc être dosés de manière non-invasive.

Contexte bibliographique

Parmi les premières études ayant proposé l'effet cancérigène du fer héminique, certaines se sont intéressées uniquement aux marqueurs précoces de la carcinogénèse colorectale tels que l'hyperprolifération des cellules épithéliales coliques et la cytotoxicité des eaux fécales, sur des animaux « sains » (Sesink *et al.*, 1999, 2000, 2001). Ces études ont grandement contribué à l'hypothèse de la cancérogénicité du fer héminique et à la compréhension des mécanismes sous-jacents. Ces marqueurs précoces prédictifs de la carcinogénèse colorectale sont généralement utilisés dans des **études court terme**. Celles-ci sont plus faciles à mettre en place que les études long terme de carcinogénèse, qui impliquent une induction du cancer et une expérimentation nutritionnelle de plusieurs mois pour voir apparaître des tumeurs, ou au moins des lésions pré-néoplasiques.

▪ **Pertinence des modèles animaux et extrapolations à l'Homme**

Les études animales sont nécessaires pour explorer les effets d'aliments ou agents présumés à risque, en particulier dans le cas de la recherche sur le cancer. La faisabilité de ces études est très limitée chez l'humain en raison des **problèmes éthiques** que cela soulève. Le principal inconvénient des expérimentations animales est que la transposition à l'Homme nécessite un regard critique. Les études toxicologiques sont souvent effectuées sur les rongeurs car ils partagent de nombreuses fonctions biologiques avec les humains. Les souris et les humains partagent par exemple 99 % de leurs gènes et présentent une homologie des systèmes nerveux, cardiovasculaire, endocrinien, immunitaire, musculo-squelettique ainsi que d'autres systèmes d'organes internes (Landgraf *et al.*, 2018). Cependant, les rongeurs et les humains présentent des différences importantes concernant la durée de vie, le poids corporel, la morphologie et le microbiote intestinal ainsi que l'expression de nombreux gènes dont ceux du métabolisme, qui peuvent influencer sur l'effet cancérigène ou protecteur d'un agent.

Une méta-analyse comparant les effets d'agents chimio-préventifs dans deux modèles de carcinogénèse colorectale chez le rongeur et chez des volontaires humains a montré que les résultats concordaient globalement entre les études menées sur les rongeurs et celles menées chez l'Homme. Il y avait une forte **corrélation** entre l'efficacité des agents supprimeurs de tumeurs chez les souris Min et chez les rats induits à l'AOM. Cependant, en fonction des agents testés, la corrélation entre les études animales et celles menées chez l'Homme était variable. Les auteurs ont conclu que les études animales ne permettent pas de prédire avec précision l'efficacité de tous les agents chimiopréventifs chez l'homme (Corpet and Pierre, 2005). Une

Contexte bibliographique

revue de la littérature qui s'est intéressée aux modèles animaux de carcinogénèse colorectale et à leur concordance avec l'Homme a conclu que la transposition des modèles animaux à l'Homme était essentiellement dépendante du choix du modèle animal, qui doit être le plus approprié possible à la question posée (Evans *et al.*, 2016; Landgraf *et al.*, 2018).

▪ **Cadre éthique et réglementaire**

Le recours aux animaux de laboratoire reste nécessaire mais il ne peut se faire que dans un **cadre éthique, réglementaire et scientifique** qui garantisse que ce recours est toujours **justifiable** sur le **plan éthique** et **légitime** sur le **plan scientifique**. Un principe éthique fondamental dans la mise en place et la conduite des expérimentations animales est le **principe des 3Rs** (MacArthur Clark, 2018). Il s'agit de :

- **Remplacer** autant que possible les animaux par une espèce moins sensible. Ou si cela est possible d'effectuer une étude ne nécessitant pas le recours à des animaux telle que les études *in vitro*.
- **Réduire** le nombre d'études mais aussi le nombre d'animaux utilisés dans les expérimentations
- **Raffiner**, c'est-à-dire améliorer les procédures scientifiques et limiter les contraintes subies par les animaux

Le principe des 3Rs est intégré dans les législations et réglementations nationales et internationales avec en particulier le NC3R anglais qui fait référence concernant la mise en place de la réglementation sur l'utilisation des animaux de laboratoire (<https://www.nc3rs.org.uk/>).

La mise en place d'une expérimentation animale nécessite une autorisation de projet, des personnes compétentes en expérimentations animales qui sont sous la responsabilité d'une personne en charge du bon déroulement de l'étude et de la conformité avec l'autorisation de projet. Les expérimentations chez l'animal sont donc aujourd'hui encore **indispensables** pour étudier la relation alimentation-cancer, en particulier pour l'étude des aliments augmentant le risque de cancer, bien que **l'encadrement réglementaire et éthique** indispensable de ces expérimentations soit de plus en plus strict et ne facilite pas leur mise en place.

Contexte bibliographique

2.2.3. Expérimentations *in vitro*

Les modèles *in vitro* offrent la possibilité d'explorer un mécanisme particulier de manière encore plus précise que les expérimentations *in vivo* chez l'animal, puisque le principe de ces études repose sur **l'exploration des mécanismes au niveau cellulaire**.

Ces approches permettent d'étudier plus finement les différentes étapes de la transformation d'une cellule normale en une cellule tumorale, les facteurs de signalisation impliqués, notamment dans la régulation du cycle cellulaire, ainsi que sa capacité de prolifération, de migration et d'invasion. L'étude des facteurs nutritionnels ou de leurs métabolites dans ces systèmes peut apporter une information précise sur la ou les cibles potentielles sur lesquelles ces facteurs agissent. Par rapport aux expérimentations *in vivo*, les expérimentations *in vitro* n'impliquent pas de manipulations d'animaux et sont donc soumises à un cadre réglementaire et éthique moins stricte. Cependant, dans les modèles *in vitro*, on **ne prend pas en compte**, par définition, la **totalité des paramètres** physiologiques, biochimiques, hormonaux qui agissent, directement ou indirectement, sur le processus de cancérogenèse, ce qui limite la transposition du résultat à l'échelle d'un organisme. Par ailleurs, la dose d'exposition, souvent élevée, pourrait refléter des actions pharmacologiques plutôt que nutritionnelles.

Les études *in vitro* ont grandement contribué à la **compréhension des mécanismes** impliqués dans la cancérogénicité de la viande rouge et de la charcuterie. Des études explorant les effets des alcénals formés par la peroxydation lipidique hème-induite sur des lignées coliques murines mutées ou non pour *APC* ont permis de mieux comprendre les mécanismes par lesquels les alcénals augmentent le risque de cancer. En effet, il a été montré que la mutation hétérozygote pour *APC* augmente la résistance des cellules à l'apoptose lors de l'exposition aux alcénals cytotoxiques, leur offrant un avantage sélectif par rapport aux cellules saines (Pierre *et al.*, 2007). Ces lignées cellulaires « saines » (*Apc* +/+) ou précancéreuses (*Apc* Min/+) présentent l'avantage d'être adaptées à l'étude des mécanismes de promotion de la carcinogénèse colorectale par des facteurs nutritionnels. En effet, ces modèles associant cellules saines et de cellules mutées pour *APC* miment les stades précoces de la pathologie où les facteurs nutritionnels ont un poids important.

2.3. Juger du niveau de preuve des associations

La **prise en compte du niveau de preuve de la relation causale** entre un facteur et la survenue d'une maladie est **nécessaire pour établir des recommandations de santé publique**, et notamment des recommandations nutritionnelles. Les **critères de Hill**, établis par l'épidémiologiste anglais **Bradford Hill** en 1965 dans le cadre de la controverse sur le rôle causal du tabac dans la survenue du cancer du poumon, permettent de **discuter de la plausibilité d'une relation causale** mise en évidence par des études épidémiologiques. Les critères pour évaluer la causalité d'une association sont les suivants :

1. **Force de l'association** : plus l'ampleur des effets liés à l'association est importante, plus un lien causal est probable, même si un faible effet n'implique pas une absence de lien de causalité ;
2. **Stabilité de l'association** : l'association ne doit pas être ponctuelle et isolée mais au contraire elle doit être retrouvée dans différentes populations et à différents moments ;
3. **Cohérence de l'association** : l'association doit être cohérente avec les connaissances actuelles disponibles concernant la maladie ;
4. **Spécificité de l'association** : une cause doit conduire à un seul effet ;
5. **Relation temporelle** : les causes doivent précéder les conséquences ;
6. **Relation dose-effet** : une exposition plus importante entraîne des effets plus importants ;
7. **Plausibilité biologique de l'association** : l'association doit pouvoir être expliquée par un mécanisme biologique ;
8. **Preuve expérimentale de l'association** : l'association doit être vérifiée par des études expérimentales effectuées chez l'animal ou chez l'homme ;
9. **Analogie de l'association** : l'association doit présenter des analogies par rapport à d'autres relations causales.

Il existe des critères internes aux études épidémiologiques (l'existence d'une association statistique entre l'exposition et la maladie, l'existence d'une relation dose-effet, l'absence d'ambiguïté temporelle etc.) mais également des critères externes, et notamment la présence de mécanismes biologiques démontrés de manière expérimentale. Si une association est proposée par les études épidémiologiques, la **démonstration expérimentale de l'existence d'un mécanisme biologique renforce le niveau de preuve de cette association**. Cela démontre la **complémentarité** entre les **études épidémiologiques**, qui mettent en évidence des associations entre des groupes d'aliments et la survenue de la maladie, et les **études**

Contexte bibliographique

expérimentales, qui explorent la plausibilité biologique de ces associations. Tous les critères ne doivent pas nécessairement être remplis pour conclure à un lien causal, mais le niveau de preuve du lien causal dépend du nombre de critères remplis.

Encore aujourd'hui, les **organismes nationaux et internationaux s'appuient sur ces critères pour établir les niveaux de preuve des associations entre alimentation et cancer** et ainsi adapter les recommandations nutritionnelles.

En conclusion, les études épidémiologiques observationnelles, et plus particulièrement les vastes études de cohorte, jouent un rôle majeur dans la mise en évidence des associations entre l'alimentation et le risque de cancer, à défaut d'études interventionnelles qui ne sont pas réalisables chez l'Homme pour des raisons éthiques pour les aliments augmentant le risque de cancer. Ce sont les méta-analyses, dont le principe est de synthétiser l'ensemble des résultats des études épidémiologiques sur un sujet précis, qui fournissent les éléments nécessaires à l'identification des aliments ou groupes d'aliments associés au risque de cancer. Ces études épidémiologiques ont besoin d'être complétées par des études expérimentales *in vivo* chez l'animal et *in vitro* pour identifier les mécanismes impliqués dans les associations qu'elles ont mises en évidence. Chacune des approches utilisées pour étudier les relations alimentation-cancer présente des forces et des limites. L'ensemble des résultats obtenus, et la concordance entre ces différentes approches permettent de juger du niveau de preuve de la relation causale entre un facteur et la survenue d'une maladie. Lorsque ce niveau de preuve sur la relation alimentation-cancer est élevé, il va servir, comme nous allons le voir, à l'élaboration des politiques de santé publiques visant à prévenir le risque de cancer.

3. RECOMMANDATIONS NUTRITIONNELLES POUR LA PREVENTION DES CANCERS

Les organisations nationales et internationales chargées de la prévention du cancer ont établi des méthodologies rigoureuses pour formuler des recommandations à partir de l'analyse de la littérature scientifique et des liens que celle-ci a démontrés entre facteurs environnementaux et incidence des cancers.

3.1. Le World Cancer Research Fund (WCRF)

Le WCRF est la plus grande organisation mondiale impliquée dans la prévention du cancer. Ses missions sont :

- 1) de financer la recherche sur le lien entre alimentation, activité physique, maintien du poids et risque de cancer,
- 2) d'analyser l'ensemble de la littérature scientifique dans ce domaine,
- 3) et d'informer sur les choix à faire pour réduire le risque de développer un cancer.

Le WCRF a mis en place les Systematic Literature Reviews (SLR) avec la rédaction des rapports d'experts (1997, 2007 & 2018) résumant l'ensemble des données pour toutes les localisations de cancer puis depuis 2006. Ces méta-analyses sont réalisées dans le cadre du **Continuous Update Project (CUP)**, dont l'objectif est **d'analyser en continu la recherche sur les liens entre l'alimentation, l'activité physique et le risque de cancer**. Les recherches scientifiques du monde entier sont continuellement ajoutées à la base de données du CUP, qui est conservée et examinée par une équipe de l'Imperial College de Londres. Les SLR portent sur les associations entre alimentation, nutrition, activité physique et le risque de cancer, et sont conduites pour les différentes localisations de cancers. Un groupe d'experts indépendants procède à des évaluations continues de ces données, et leurs rapports constituent la base des recommandations du réseau du WCRF en matière de prévention du cancer. Ce processus permet que chacun, y compris les décideurs politiques, les professionnels de la santé et le public, ait accès aux informations les plus récentes sur la manière de réduire le risque de développer un cancer. L'analyse des SLR sert de base aux rapports établis par le CUP. Ces rapports incluent également des études expérimentales portant sur les mécanismes biologiques impliqués dans les associations mises en évidence par les SLR. Ces études

Contexte bibliographique

renseignent sur la plausibilité biologique des associations mises en évidence par les SLR, et sont donc des éléments supplémentaires permettant de discuter la causalité de l'association. Ces études expérimentales ne font cependant pas l'objet d'une revue systématique de littérature ou d'une recherche exhaustive.

Le dernier rapport du CUP (WCRF a. 2018) rassemble les toutes dernières recherches, effectuées jusqu'en 2018, sur le lien entre alimentation, poids, activité physique et risque de cancer. Le rapport détaille les impacts des différents groupes d'aliments sur les conséquences physiologiques, les fonctions cellulaires et les voies impactées qui sont susceptibles d'augmenter le risque de cancer. Pour chaque localisation de cancer, sont présentées les données d'incidence et de mortalité, sur la pathogenèse, les facteurs de risques, la méthodologie utilisée ainsi que les problèmes liés à l'interprétation des données.

Dans leur rapport, le WCRF et l'American Institute for Cancer Research (AICR) identifient également le niveau de preuve des associations entre chacune des expositions alimentaires et les risques de cancers et de surpoids, le surpoids étant un facteur de risque de cancer. Chaque relation aliment-cancer peut donc être positive (augmentation du risque) ou négative (diminution du risque) avec un niveau de preuve qui peut être convaincant, probable, suggéré ou non concluant. La Figure 6 représente par exemple les facteurs associés au risque de CCR en intégrant les niveaux de preuves. L'activité physique est par exemple associée à une diminution du risque de CCR avec un niveau de preuve convaincant, et la consommation d'aliments contenant du fer héminique est associée à une augmentation du risque de CCR avec un niveau de preuve limité (WCRF b. 2018).

La méthodologie utilisée pour définir les niveaux de preuves est également très rigoureuse, des critères précis doivent être remplis pour que le niveau de preuve soit jugé convaincant. Juger du niveau de preuve de chaque exposition alimentaire est nécessaire pour pouvoir établir des recommandations (WCRF c. 2018). Il est en effet important de distinguer les niveaux de preuves qui sont assez élevés pour pouvoir faire l'objet de recommandations des niveaux de preuves plus faibles. En se basant sur les critères de Hill, le WCRF et l'AICR ont créé leurs propres critères appliqués à la causalité entre exposition alimentaire et survenue du cancer. Plus les études remplissent un nombre de critères important, plus le niveau de preuve de l'association est fort. Ils estiment par exemple que pour que le niveau de preuve soit convaincant, les critères suivants doivent être respectés :

Contexte bibliographique

2017	DIET, NUTRITION, PHYSICAL ACTIVITY AND COLORECTAL CANCER		
		DECREASES RISK	INCREASES RISK
STRONG EVIDENCE	Convincing	Physical activity ^{1,2}	Processed meat ³ Alcoholic drinks ⁴ Body fatness ⁵ Adult attained height ⁶
	Probable	Wholegrains Foods containing dietary fibre ⁷ Dairy products ⁸ Calcium supplements ⁹	Red meat ¹⁰
LIMITED EVIDENCE	Limited – suggestive	Foods containing vitamin C ¹¹ Fish Vitamin D ¹² Multivitamin supplements ¹³	Low intakes of non-starchy vegetables ¹⁴ Low intakes of fruits ¹⁴ Foods containing haem iron ¹⁵
	Limited – no conclusion	Cereals (grains) and their products; potatoes; animal fat; poultry; shellfish and other seafood; fatty acid composition; cholesterol; dietary n-3 fatty acid from fish; legumes; garlic; non-dairy sources of calcium; foods containing added sugars; sugar (sucrose); coffee; tea; caffeine; carbohydrate; total fat; starch; glycaemic load; glycaemic index; folate; vitamin A; vitamin B6; vitamin E; selenium; low fat; methionine; beta-carotene; alpha-carotene; lycopene; retinol; energy intake; meal frequency; dietary pattern	
STRONG EVIDENCE	Substantial effect on risk unlikely		

Figure 6 : Facteurs associés à une augmentation ou diminution du risque de cancer colorectal, en fonction du niveau de preuve de l'association (WCRF b. 2018)

- L'association doit être retrouvée dans plus d'un type d'étude
- L'association doit être retrouvée dans au moins deux études de cohorte indépendantes
- Aucune hétérogénéité inexplicée ne doit être retrouvée au sein ou entre les types d'études, concernant la présence ou l'absence d'une association ou la direction de l'effet
- Les études doivent être de bonne qualité, permettant d'exclure avec certitude la possibilité que l'association observée résulte d'une erreur aléatoire ou systématique, y compris les facteurs de confusion, les erreurs de mesure et les biais de sélection.
- Présence d'un gradient biologique plausible ("dose-réponse") dans l'association. Un tel gradient n'a pas besoin d'être linéaire ou même dans la même direction à travers les différents niveaux d'exposition, tant que cela peut être expliqué de manière plausible

Contexte bibliographique

- Des preuves expérimentales solides et plausibles, provenant d'études humaines ou modèles animaux pertinents, que des expositions humaines de ce type peuvent entraîner des résultats pertinents en matière de cancer.

3.2. Le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC)

Le CIRC est l'agence de l'OMS spécialisée dans le cancer. Son objectif est de promouvoir la collaboration internationale dans le domaine de la recherche sur le cancer et de conduire des évaluations collectives.

Le CIRC n'intervient pas directement dans la mise en œuvre de mesures de lutte contre le cancer ni dans la conduite de recherches sur les traitements ou sur les soins à prodiguer aux patients mais les résultats des évaluations effectuées par le CIRC influencent les politiques de lutte contre le cancer. Le CIRC s'est également engagé à étudier différentes méthodes de détection précoce du cancer et à procéder à l'évaluation de stratégies de prévention.

Un élément central de l'éventail des activités du CIRC consiste à publier des monographies qui ont pour objectif d'identifier les facteurs de risques de cancer et d'établir un niveau de preuve du danger. Ce travail est pris en charge par des groupes de travail constitués d'experts internationaux et interdisciplinaires qui procèdent à des examens et des évaluations scientifiques des preuves de la cancérogénicité d'un large éventail d'agents, qui peuvent être des entités chimiques, physiques ou biologiques par exemple ou même des professions. Les monographies évaluent le degré de cancérogénicité des agents ainsi que le niveau de preuves, en s'appuyant sur les critères de Hill pour juger de la causalité. Les monographies regroupent trois types de preuves: le cancer chez l'homme, le cancer chez les animaux de laboratoire et les preuves mécanistiques (Cogliano *et al.*, 2008). Le CIRC caractérise également l'exposition à chaque agent. Le processus d'évaluation du degré de cancérogénicité des différents agents comprend plusieurs étapes :

- Étape 1. Identification des informations pertinentes à partir d'un examen exhaustif de la littérature contenue dans les bases de données biomédicales faisant autorité.
- Étape 2. Sélection et organisation des documents à inclure dans l'étude sur la base du titre et du résumé des études sélectionnées, selon des critères d'exclusion prédéfinis.
- Étape 3. Évaluation de la qualité des études incluses.

Contexte bibliographique

- Étape 4. Présentation des caractéristiques des études incluses, y compris l'évaluation de la qualité de l'étude.
- Étape 5. Synthèse et évaluation de la solidité des preuves. Le groupe de travail résume les forces et les limites globales des éléments de preuve provenant des différentes sources de données et évalue ensuite la solidité des preuves.

Ce processus aboutit à une classification de la cancérogénicité qui va de 1 à 4 :

- Groupe 1 : agent cancérogène (parfois appelé cancérogène avéré ou cancérogène certain),
- Groupe 2A : agent probablement cancérogène,
- Groupe 2B : agent peut-être cancérogène (parfois appelé cancérogène possible),
- Groupe 3 : agent inclassable quant à sa cancérogénicité,
- Groupe 4 : agent probablement pas cancérogène.

3.3. Prévention du cancer par l'alimentation en France

3.3.1. *Le Programme National Nutrition Santé (PNNS)*

Le **PNNS**, lancé en janvier 2001 en France, est un plan de santé publique qui vise à améliorer l'état de santé général de la population en agissant sur la nutrition. Le PNNS s'inscrit dans une politique de santé publique plus large qui est le Programme national pour l'alimentation (PNA) 2019-2023 mis en place par le ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation dans le but « d'assurer à la population l'accès à une alimentation sûre, saine, diversifiée, de bonne qualité et en quantité suffisante, produite dans des conditions économiquement et socialement acceptables par tous, favorisant l'emploi, la protection de l'environnement et des paysages et contribuant à l'atténuation et à l'adaptation aux effets du changement climatique ». Le PNA et le PNNS sont les deux principaux outils de la politique nationale de l'alimentation et de la nutrition portés par le gouvernement pour 2019-2023. Ils font partie du programme national de l'alimentation et de la nutrition (PNAN).

Les objectifs nutritionnels de santé publique du PNNS sont fixés par le Haut conseil de la santé publique (HCSP) dont une de ses missions est de « contribuer à la définition des objectifs pluriannuels de santé publique, d'évaluer la réalisation des objectifs nationaux de santé publique et de contribuer au suivi annuel ». Ces objectifs sont de :

Contexte bibliographique

- Réduire l'obésité et le surpoids dans la population
- Augmenter l'activité physique et diminuer la sédentarité à tous les âges
- Améliorer les pratiques alimentaires et les apports nutritionnels, notamment chez les populations à risque
- Réduire la prévalence des pathologies nutritionnelles

De la même manière que pour le WCRF et le CIRC, l'établissement des recommandations nutritionnelles du PNNS fait l'objet d'un processus en plusieurs étapes. Les recommandations actuelles pour la population générale sont basées sur le rapport d'expertise collective de l'Anses de 2016 (ANSES, 2016). Ce rapport est validé par le HCSP. C'est ensuite Santé Publique France qui se charge d'établir les recommandations nutritionnelles via un message clair et accessible.

L'**Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses)** est un établissement public à caractère administratif placé sous la tutelle des ministères chargés de la Santé, de l'Agriculture, de l'Environnement, du Travail et de la Consommation. Cette agence assure des missions de veille, d'expertise, de recherche et de référence sur un large champ couvrant la santé humaine, la santé et le bien-être animal ainsi que la santé végétale. Dans le cadre du PNNS, la Direction générale de la santé (DGS) a saisi l'Anses afin d'élaborer la base scientifique nécessaire à l'actualisation des repères nutritionnels relatifs à l'alimentation et à l'activité physique. Les recommandations du PNNS actuelles sont ainsi basées sur le rapport d'expertise de l'Anses publié en 2016 (ANSES 2016).

3.3.2. Les études INCA

A la demande des ministères de la Santé et de l'Agriculture, l'Anses réalise tous les sept ans une **étude individuelle nationale des consommations alimentaires (INCA)**. L'Anses se base sur ces études pour évaluer les risques et bénéfices liés à l'alimentation en France. Ces études INCA ont pour objectif de mieux prévenir certaines maladies comme le cancer, l'obésité ou les maladies cardiovasculaires et d'améliorer l'état de santé de la population française. L'Anses se base sur ces études pour évaluer et adapter le PNNS.

Contexte bibliographique

Une première étude INCA 1 a été conduite en 1998-1999 (Jean-Luc Volatier, 2000), l'étude INCA 2 a été conduite en 2006-2007 (Bénetier *et al.*, 2006), et la dernière étude réalisée est l'étude INCA 3 (ANSES, 2017) qui a été menée en 2014-2015.

Les études INCA permettent à l'Anses de :

- 1) Savoir si les recommandations de ce programme ont été suivies par les consommateurs
- 2) Apporte des informations utiles aux ministères pour savoir s'il faut poursuivre, renforcer ou modifier les priorités de la politique alimentaire et nutritionnelle en France

3.3.3. *L'Institut National du Cancer (INCa)*

Dans le cadre de la stratégie de lutte contre le cancer, le gouvernement français a également mis en place des « Plan Cancer » dont un des objectifs est la prévention de cette maladie. Parmi les 17 objectifs du plan cancer, un objectif est de « donner à chacun les moyens de réduire son risque de cancer », notamment en « facilitant les choix alimentaires favorables à la santé », « développant l'éducation et la promotion de la nutrition et de la pratique physique », « éclairant les choix individuels en clarifiant la hiérarchie des facteurs de risque de cancers » et en « améliorant la connaissance des perceptions et des comportements vis-à-vis des facteurs de risque de cancers ». **L'INCa est l'agence d'expertise sanitaire et scientifique en cancérologie** de l'État chargée de **coordonner les actions de lutte contre le cancer**. Elle établit des recommandations qui se basent sur celles du WCRF/ AICR mais aussi sur les repères du PNNS, afin de tenir compte autant que possible de l'évolution des connaissances et du contexte français.

L'INCa a publié un rapport en 2015, qui avait pour but d'actualiser les données depuis le dernier rapport du WCRF/ AICR qui datait de 2007. Pour cela, un travail bibliographique a été réalisé par des experts de la nutrition et du cancer du réseau Nacre. Une analyse des publications parues entre le 1er janvier 2006 et le 28 février 2014 a été réalisée, principalement conduite sur les études épidémiologiques et limitée aux méta-analyses, aux analyses poolées et aux essais d'intervention. Dans ce rapport, l'INCa a ainsi estimé que 20 à 25 % des cancers étaient imputables aux comportements nutritionnels (Ancellin *et al.*, 2017).

Contexte bibliographique

3.3.4. NACRe

Le réseau NACRe (Réseau national alimentation cancer recherche) rassemble l'ensemble des équipes de recherche travaillant sur la thématique Nutrition-Cancer, favorisant ainsi les échanges et les collaborations entre différentes expertises. Les missions de ce réseau sont :

- De contribuer au développement des recherches dans le domaine nutrition et cancer en favorisant les échanges scientifiques et le montage de projets pluridisciplinaires
- De transmettre les savoirs vers les publics (agences sanitaires, grand public, professionnels de santé...)

3.4. Bilan actuel des associations entre alimentation et cancer et recommandations nutritionnelles

3.4.1. Bilan du Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC)

Dans son rapport de 2018, le CIRC a estimé la part de cancers attribuables à des facteurs de risque liés au mode de vie et à l'environnement en France en 2015. Treize facteurs de risque classés cancérigènes certains ou probables par le CIRC ont été étudiés. Parmi les 346 000 nouveaux cas de cancer diagnostiqués chez les adultes de 30 ans et plus en France en 2015, **142 000 cas (41% des nouveaux cas)** seraient **attribuables aux facteurs de risque liés au mode de vie et à l'environnement**. Les facteurs responsables du plus grand nombre de nouveaux cas de cancers étaient le **tabac** (responsable de 20% des nouveaux cas), **l'alcool** (8% des nouveaux cas), **l'alimentation** (5,4 % des nouveaux cas), et le **surpoids** et **l'obésité** (5,4 % des nouveaux cas). La contribution de chaque facteur est représentée dans la Figure 7.

Contexte bibliographique

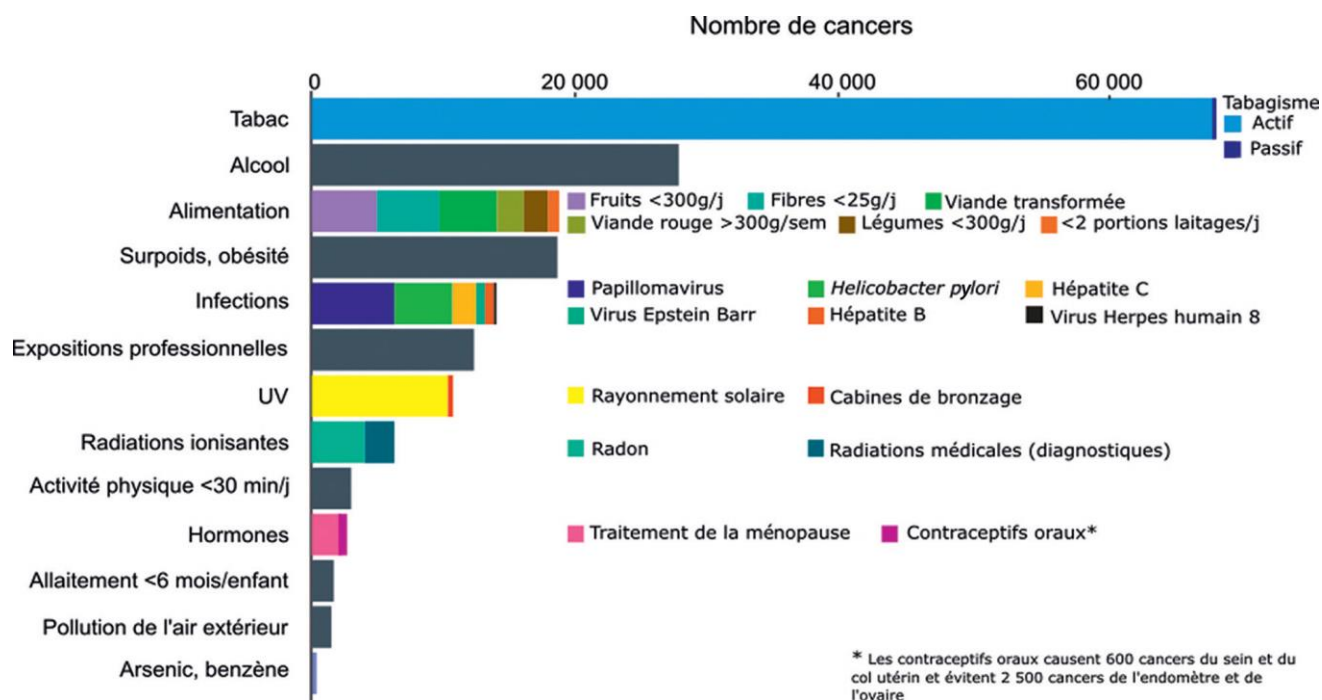


Figure 7 : Nombre de nouveaux cas de cancer attribuables aux facteurs liés au mode de vie et à l'environnement en France en 2015 parmi les adultes de 30 ans et plus (IARC, 2018)

3.4.2. Bilan et recommandations du WCRF et de l'AICR

La prévention du cancer est devenue une préoccupation majeure de santé publique car il s'agit de la principale cause de décès dans de nombreuses régions du monde, alors que le WCRF estime que de nombreux cas de cancer seraient évitables. Le panel d'expert du WCRF estime que ne pas fumer, associé à un régime alimentaire approprié, à l'activité physique et au maintien d'un poids sain, pourrait réduire drastiquement l'incidence mondiale de cancer. Les bilans réalisés par le WCRF et l'AICR dans le cadre du CUP ont permis d'identifier certains groupes d'aliments dont la consommation a été associée au risque de cancer. Certains aliments peuvent diminuer le risque de cancer, et d'autres peuvent au contraire l'augmenter. Les groupes d'aliments pour lesquels les niveaux de preuves de ces associations ont été jugés convaincants ou probables sont présentés dans les Figures 8 et 9.

Contexte bibliographique

Facteur alimentaire ou nutritionnel	Localisation du cancer
Boissons alcoolisées	Bouche, Pharynx, Larynx, Œsophage (<i>carcinome épidermoïde</i>), Foie, Côlon-rectum, Sein (<i>après la ménopause</i>) Sein (<i>avant la ménopause</i>), Estomac
Surpoids et obésité	Œsophage (<i>adénocarcinome</i>), Pancréas, Foie, Côlon-rectum, Sein (<i>après la ménopause</i>), Endomètre, Rein Bouche, Pharynx, Larynx, Vésicule biliaire, Ovaire, Prostate (<i>cancer avancé</i>), Estomac (<i>cardia</i>)
Taille à l'âge adulte	Côlon-rectum, Sein, Ovaire Pancréas, Prostate, Rein, Endomètre, Peau (<i>mélanome malin</i>)
Prise de poids au cours de la vie adulte	Sein (<i>après la ménopause</i>)
Poids de naissance élevé	Sein (<i>avant la ménopause</i>)
Charge glycémique	Endomètre
Viande rouge	Côlon-rectum
Charcuterie	Côlon-rectum
Aflatoxines	Foie
Arsenic dans l'eau potable	Poumon Peau, Vessie
Supplémentation en bêta-carotène	Poumon (<i>à forte dose ; fumeurs et ex-fumeurs</i>)
Aliments conservés par le sel	Estomac
Poisson salé à la cantonaise	Naso-pharynx
Maté	Œsophage (<i>carcinome épidermoïde</i>)

Niveau de preuve : ■ Convaincant

■ Probable

Date d'actualisation : 31/10/2018



Figure 8: Facteurs nutritionnels associés à une augmentation du risque de cancer (Nacre, WCRF rapport 2018)

Facteur alimentaire ou nutritionnel	Localisation du cancer
Activité physique	Côlon Sein (<i>après la ménopause</i>), Sein (<i>AP vigoureuse</i>), Endomètre
Allaitement	Sein
Légumes non féculents et fruits	Cancers aérodigestifs dans leur ensemble (Bouche, Pharynx, Larynx, Nasopharynx, Œsophage, Poumon, Estomac, Côlon-rectum)
Aliments contenant des fibres	Côlon-rectum
Grains entiers	Côlon-rectum
Produits laitiers	Côlon-rectum
Supplémentation en calcium	Côlon-rectum
Café	Foie, Endomètre
Surpoids et obésité	Sein (<i>avant la ménopause</i>)
Surpoids et obésité chez la femme jeune	Sein
Boissons alcoolisées	Rein (<i>moins de 30g d'alcool/jour</i>)

Niveau de preuve : ■ Convaincant

■ Probable

Date d'actualisation : 31/10/2018



Figure 9: Facteurs nutritionnels associés à une diminution du risque de cancer (Nacre, WCRF rapport 2018)

Contexte bibliographique

La consommation de boissons alcoolisées, le surpoids et l'obésité, la consommation de charcuteries font partie des groupes d'aliments associés à une augmentation du risque de cancer avec un niveau de preuve convaincant (Figure 8). Au contraire, l'activité physique est associée à une diminution du risque de cancer avec un niveau de preuve convaincant, et l'allaitement, la consommation de légumes, de fruits, d'aliments contenant des fibres et de produits laitiers sont associés à une diminution du risque de cancer avec un niveau de preuve probable (Figure 9).

Suite à l'identification des groupes d'aliments dont la consommation a été associée au risque de cancer, le WCRF et l'AICR ont pu établir des recommandations en conséquence. Celles-ci ne sont établies que lorsque le groupe d'experts juge les preuves suffisamment solides. Les recommandations sont destinées aux individus, aux familles, aux professionnels de la santé, aux communautés, aux décideurs politiques, et aux médias. L'objectif est d'aider les personnes à faire des choix sains dans leur vie quotidienne afin de réduire le risque de cancer et d'autres maladies non transmissibles, liées à l'alimentation. Le WCRF et l'AICR estiment notamment que 35% des cancers du sein et 45% des cancers colorectaux pourraient être évités par une meilleure adhésion aux recommandations nutritionnelles. L'évaluation de l'adhésion aux recommandations pour la prévention du cancer du rapport d'experts du WCRF et de l'AICR publié en 2007, a montré que plus les gens y adhèrent, plus les risque de cancer et de décès, toutes causes confondues, sont réduits (Wiseman, 2008).

L'identification des groupes d'aliments associés au risque de cancer a permis l'établissement des recommandations. Etre physiquement actif, avoir une alimentation riche en céréales complètes, légumes secs, et en fruits et légumes, limiter la consommation d'aliments transformés, de viandes rouges et charcuteries ainsi que la consommation de boissons sucrées et alcoolisées font partie des recommandations du WCRF et de l'AICR pour prévenir le risque de cancer (Figure 10).

Contexte bibliographique



Figure 10: Recommandations nutritionnelles dans le cadre de la prévention du risque de cancer (Nacre, WCRF rapport 2018)

3.4.3. Recommandations nutritionnelles du PNNS au niveau national

En France, des recommandations sur l'alimentation, l'activité physique et la sédentarité sous forme de messages courts, pratiques et accessibles, sont établis dans le cadre du PNNS. L'objectif est d'aider les personnes à faire de meilleurs choix alimentaires et d'encourager l'activité physique. Il existe des recommandations simplifiées, qui donnent de grandes orientations, et des recommandations plus détaillées pour ceux qui souhaitent aller plus loin. Les nouvelles recommandations intègrent également la question du développement durable en conseillant d'aller une alimentation locale, de saison et, si possible, bio (mangerbouger.fr). En France, les recommandations du PNNS 2017-2021 sont présentées dans la Figure 11.

Contexte bibliographique



Figure 11: Recommandations du PNNS (mangerbouger.fr)

De la même manière que le WCRF et l'AICR, le PNNS recommande d'augmenter la consommation de fruits et légumes, de légumes secs et de fruits à coque, de privilégier le « fait maison » et les aliments complets et de réduire la consommation d'alcool, de boissons sucrées, de viandes rouges et charcuteries. Le PNNS recommande également d'avoir une consommation de produits laitiers suffisante mais limitée et de réduire la consommation de produits avec un Nutri-Score D et E.

Contexte bibliographique

En conclusion, les organismes chargés de la prévention du cancer ont élaboré des méthodologies rigoureuses pour identifier les pratiques alimentaires à risque et établir les recommandations nutritionnelles, en se fondant sur l'ensemble des études scientifiques qui portent sur une association précise. Les critères que privilégient ces méthodologies sont la stabilité, la cohérence et l'effet dose-réponse de l'association, la qualité des études effectuées, mais également la présence de preuves expérimentales. Ce sont eux qui permettent aux organismes de juger du niveau de preuve de l'association entre un aliment/groupe d'aliment et le risque de cancer. Ils confirment l'intérêt de combiner études épidémiologiques et expérimentales, qui, lorsqu'elles présentent des résultats cohérents entre elles, vont contribuer décisivement à l'identification des pratiques augmentant le risque de cancer.

4. VIANDE ET CANCER

Comme nous l'avons vu, la diminution de la consommation de viande rouge et de charcuterie est au cœur des recommandations de santé publique visant à prévenir le risque de CCR. Ce chapitre présente des **synthèses** des données existantes sur **l'association positive entre la consommation de viande rouge et de charcuterie et le risque de cancer** et des **recommandations** des organisations nationales et internationales de prévention du cancer concernant la consommation de viande rouge et de charcuterie. Il détaille ensuite les **mécanismes** proposés par les **études expérimentales** pour expliquer l'effet cancérigène de la viande rouge et de la charcuterie.

La **viande rouge** est définie par le CIRC et le WCRF comme toute **viande issue des tissus musculaires de mammifères** tels que le bœuf, le veau, le porc, l'agneau, le mouton, le cheval et la chèvre. Les **charcuteries (ou viandes transformées)** désignent les viandes transformées par salaison, maturation, fermentation, fumaison ou d'autres processus mis en œuvre pour rehausser leur saveur ou améliorer leur conservation.

4.1. Données épidémiologiques

4.1.1. Conclusions du rapport du CUP (2015)

Dans leur dernier rapport, le WCRF et l'AICR concluent que la consommation de **viande rouge**, avec un **niveau de preuve probable**, et de **charcuterie**, avec un **niveau de preuve avéré**, augmente le risque de CCR (WCRF b. 2018).

- **Consommation de viande rouge et charcuterie et risque de cancer**

Dans le cadre de la revue systématique de la littérature effectuée entre le 1^{er} janvier 2010 et le 30 avril 2015 par le WCRF sur les associations entre alimentation et risque de CCR, des méta-analyses dose-réponse sur les liens entre consommation de viande rouge et charcuterie et risque de CCR ont été réalisées. Ils ont conclu qu'une augmentation de la consommation de viande rouge et de charcuterie de 100g/jour augmentait le risque de développer un CCR de 12% (RR=1,12 [1,04–1,21]; n=31 551 cas) (Figure 12).

Contexte bibliographique

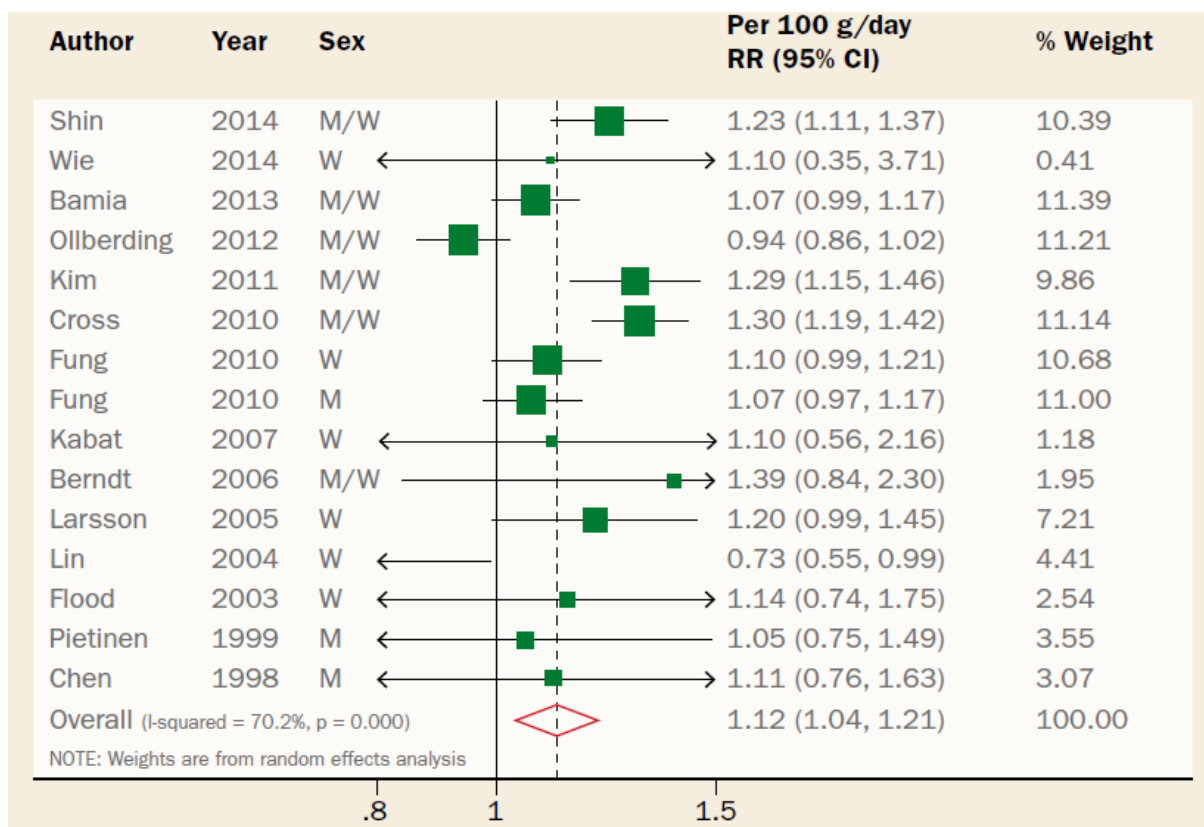


Figure 12 : Méta-analyse dose réponse de la consommation de viande rouge et transformée et du risque de cancer colorectal pour 100 grammes par jour (WCRF b. 2018)

Dans le cadre du CUP, des méta-analyses dose-réponse ont également été réalisées séparément sur les consommations de viande rouge et de charcuterie en lien avec le risque de cancer.

- **Consommation de viande rouge et risque de cancer**

Une méta-analyse dose-réponse incluant 8 études a montré que l'augmentation de la consommation de viande rouge de 100g/jour n'augmentait pas significativement le risque de CCR (RR 1,12 [95% IC 1,00–1,25]) bien que l'association soit proche de la significativité (Figure 13).

Après stratification sur la localisation géographique, un risque significatif était observé en Europe (RR=1,23 [1,08–1,41]) mais pas en Asie ni en Amérique du Nord. Et en stratifiant sur le type de cancer, une augmentation significative du risque a été observée pour le cancer du côlon (RR=1,22 [1,06–1,39]) mais pas pour le cancer du rectum.

Contexte bibliographique

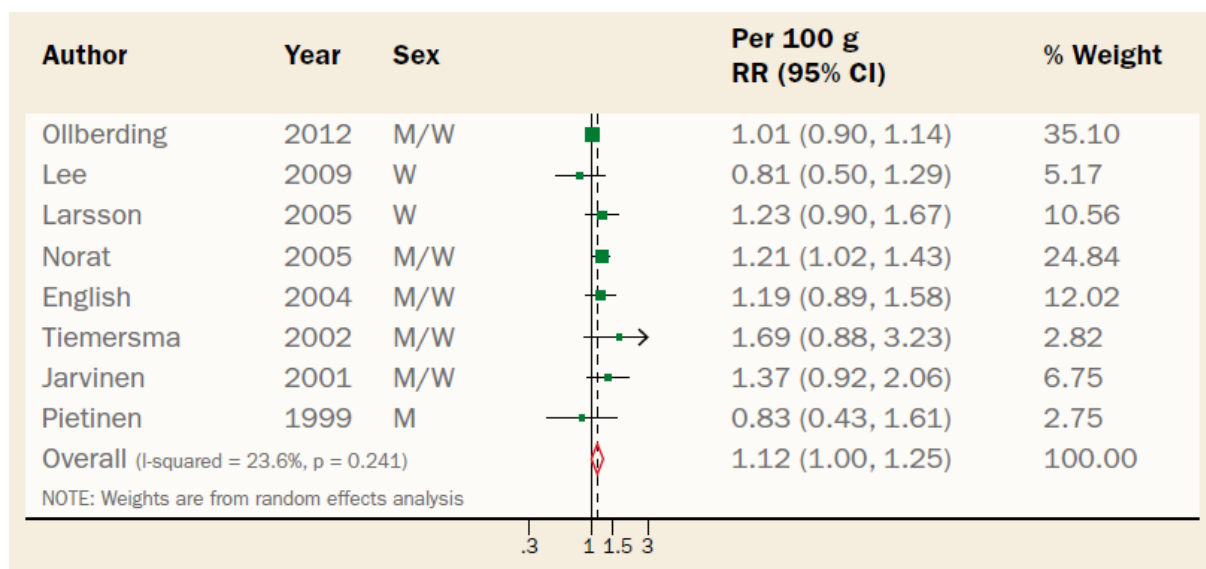


Figure 13 : Méta-analyse dose réponse de la consommation de viande rouge et du risque de cancer colorectal pour 100 grammes par jour (WCRF b. 2018)

Le rapport du CUP a conclu que la **consommation de viande rouge augmentait significativement le risque de cancer du côlon**, mais les associations n'étaient pas significatives pour les cancers colorectal et rectal. Malgré ces résultats non significatifs pour la plupart, les études portant sur la consommation de viande rouge allaient dans le même sens et montraient une augmentation du risque de cancer colorectal, du côlon et du rectum. Le panel a donc conclu que la **consommation de viande rouge était probablement une cause de cancer colorectal** (WCRF d., 2018).

▪ **Consommation de charcuterie et risque de cancer**

Une méta-analyse dose-réponse incluant 10 études a montré une augmentation significative de 16 % du risque de CCR pour une augmentation de la consommation de charcuterie de 50 grammes par jour (RR 1,16 [1,08-1,26] ; n= 10 738 cas, Figure 14).

Après stratification, aucune différence significative du risque n'a été observée chez les hommes (RR=1,11 [0,86-1,43]) et les femmes (RR=1,18 [0,99-1,41]) séparément. Une augmentation significative du risque a été observée en Europe (RR=1,13 [1,03-1,24]), mais pas en Asie ni en Amérique du Nord. Le risque était significativement plus élevé pour le cancer du côlon (RR=1,23 [1,11-1,35]) mais pas pour le cancer du rectum. En raison des études allant généralement dans le même sens montrant que la consommation de charcuterie augmente significativement le risque de CCR, et en raison des preuves solides de l'existence de

Contexte bibliographique

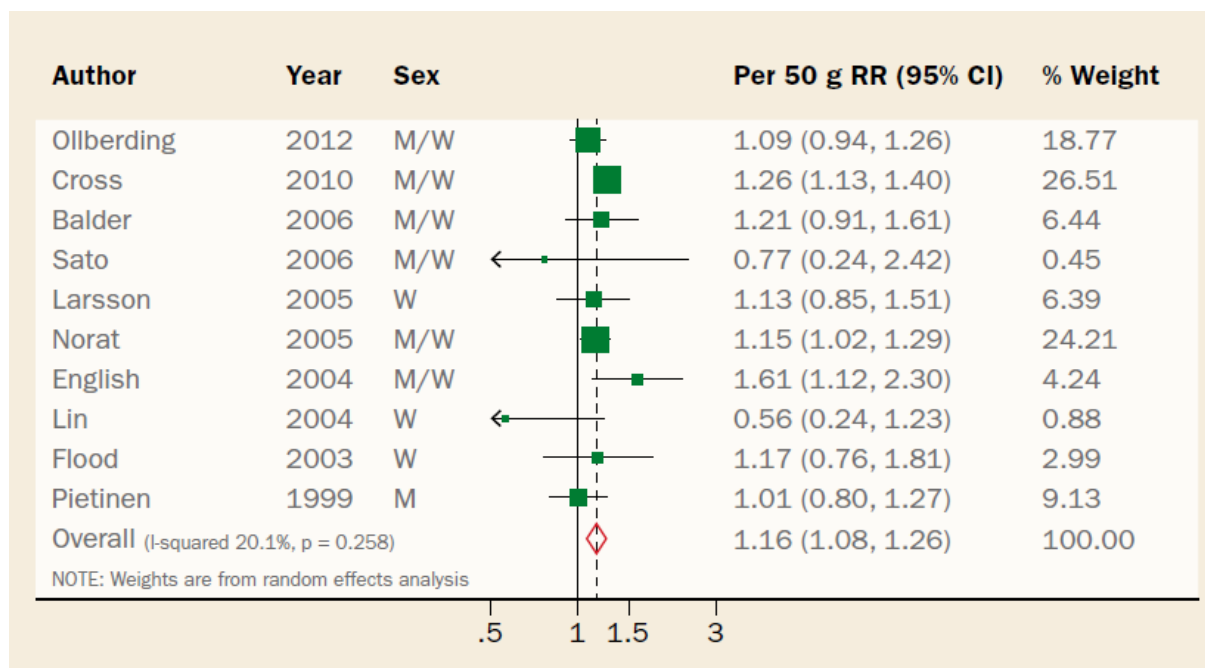


Figure 14 : Méta-analyse dose réponse de la consommation de viande transformée et du risque de cancer colorectal pour 100 grammes par jour (WCRF b. 2018)

mécanismes fonctionnant chez l'homme, le panel du CUP en a conclu que **la consommation de charcuterie était une cause avérée de cancer colorectal** (WCRF d. 2018).

4.1.2. Monographie du CIRC sur viande rouge et charcuterie (2018)

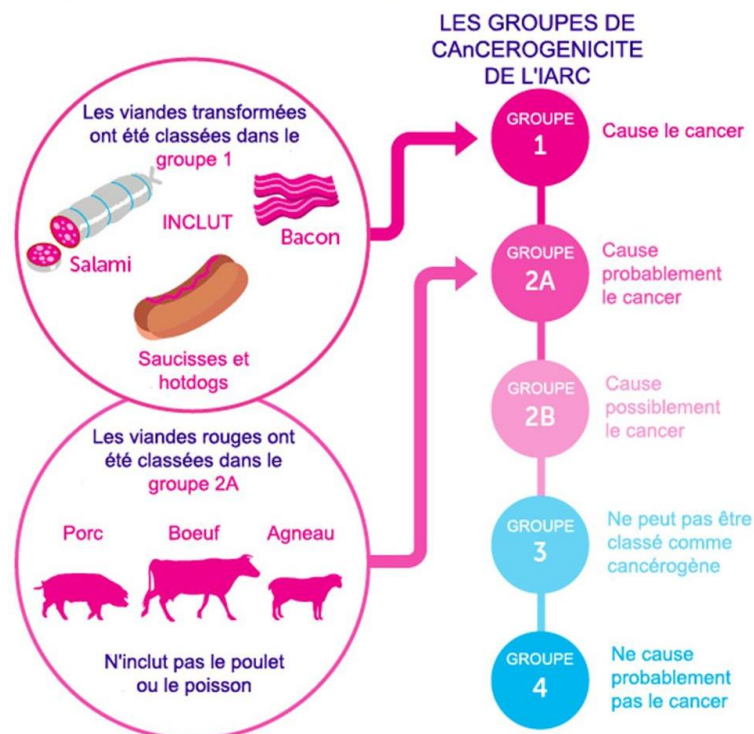
Plus récemment, dans la monographie du CIRC portant sur le risque de cancer lié à la consommation de viande rouge et de charcuterie publié en 2018 (IARC 2018), une méta-analyse comprenant les données de 10 études de cohortes a fait état d'une association dose-réponse statistiquement significative entre la consommation de viande rouge et/ou de viande transformée et le CCR. Les risques relatifs de CCR étaient de 1,17 (1,05-1,31) pour une augmentation de la consommation de viande rouge de 100 g/jour et de 1,18 (1,10-1,28) pour une augmentation de la consommation de viande transformée de 50 g/jour.

Sur la base de ces résultats, et des études chez l'animal et mécanistiques, le groupe de travail a classé :

- La consommation de viande transformée (incluant la charcuterie) comme cancérigène pour l'homme (Groupe 1)
- La consommation de viande rouge comme probablement cancérigène pour l'homme (Groupe 2a) (Figure 15).

VIANDE ET CANCER

A QUEL POINT LES PREUVES SONT-ELLES FIABLES ?



Ces catégories représentent la probabilité pour que quelque chose soit cancérogène pour les humains, et non pas combien de cancers cette chose va créer.

Figure 15 : consommation de viandes rouges et transformées et risque de cancer, selon le CIRC

De plus, une association positive a été mise en évidence entre la consommation de charcuterie et le cancer de l'estomac. La consommation de viande rouge a également été positivement associée au cancer du pancréas et de la prostate.

En plus des études épidémiologiques, c'est l'existence de mécanismes biologiques plausibles proposés par les études expérimentales et expliquant ces effets cancérogènes qui a permis de conclure que le niveau de preuve était fort. L'expertise collective menée par le CIRC a permis de proposer plusieurs mécanismes pour expliquer cette association entre consommation de viande rouge et charcuterie et risque de cancer : génotoxicité liée à la formation de composés N-nitrosés ou à la formation d'amines aromatiques hétérocycliques, stress oxydant lié à l'excès de fer héminique et la formation de produits d'oxydation des lipides dans l'intestin.

Contexte bibliographique

4.1.3. *Recommandations*

En se basant sur les résultats du CUP, le **WCRF** recommande de :

- Limiter sa consommation à environ trois portions par semaine. Trois portions équivalent à environ 350 à 500 grammes de viande rouge cuite.
- Consommer très peu, voire pas du tout, de charcuterie

En France, le **PNNS** recommande de :

- Privilégier la volaille et limiter les autres viandes (porc, bœuf, veau, mouton, agneau, abats) à 500 g par semaine
- Limiter à 150 g par semaine la consommation de charcuterie et de privilégier parmi ces aliments le jambon blanc et le jambon de volaille

4.1.4. *Consommation de viande rouge et charcuterie et adhésion aux recommandations nutritionnelles*

Les données rapportées par le Centre de Recherche pour l'Étude et l'Observation des Conditions de Vie (CRÉDOC) indiquent que la consommation moyenne de viande a fortement baissé en France : elle est passée de 153 g/jour en 2007 à 135 g/jour en 2016. Plus précisément, la consommation de viande rouge est passée de 58 g/jour en 2007 à 46 g/jour en 2016, et la consommation de charcuterie est passée de 35 g/jour en 2007 à 29 g/jour en 2016 (2018) (Figure 16).

Les résultats de l'étude ESTEBAN portant sur les consommations alimentaires des français indiquent qu'en France en 2015, 59% des hommes et 76% des femmes étaient en adéquation avec les recommandations du PNNS 2011-2015 en ce qui concerne la consommation de viande rouge (moins de 500g/semaine). Concernant la **consommation de charcuterie**, seulement 30% des hommes et 43% des femmes étaient en adéquation avec les recommandations du PNNS 2011-2015 (moins de 150g/semaine), donc **la majorité de la population n'adhère pas aux recommandations nutritionnelles concernant la charcuterie** (Santé Publique France, 2019).

Contexte bibliographique

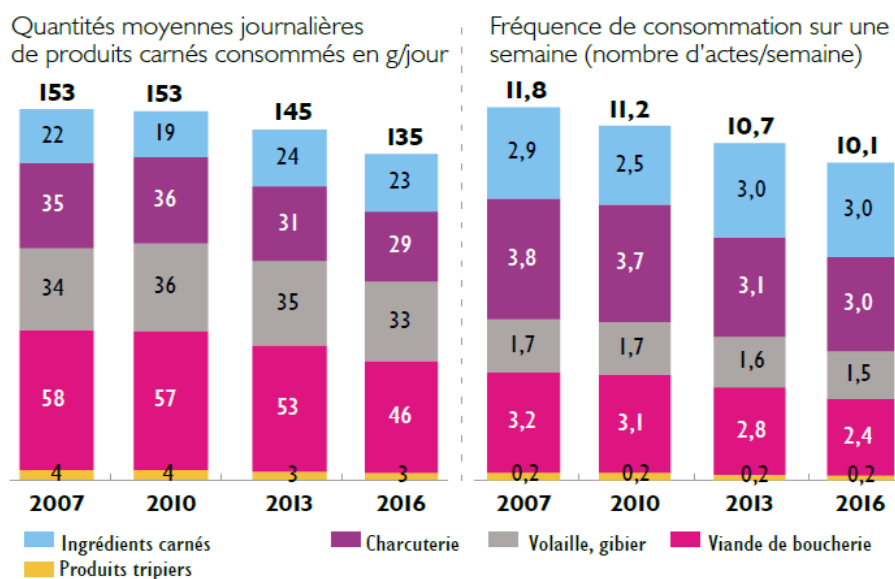


Figure 16 : Evolution de la consommation de produits carnés en France (enquêtes CCAF 2007, 2020, 2013 et 2016)

Les données provenant de la « Nurses' Health Study » et de la « Health Professionals Follow-up Study » menées entre 1986 et 2012 ont indiqué que les hommes appartenant au quintile ayant le plus haut score d'adéquation aux recommandations du WCRF/AICR avaient un risque de développer un cancer colorectal diminué de 36% ($HR_{Q5vsQ1}=0,64$ (0,52-0,77), $p<0,0001$) par rapport aux hommes qui étaient le moins en adéquation avec ces recommandations (Petimar *et al.*, 2019). Cette association était moins forte chez les femmes avec un HR_{Q5vsQ1} de 0,86 (0,72-1,02), $p=0,06$. Lorsque l'on s'intéresse uniquement aux recommandations nutritionnelles, la diminution du risque de cancer colorectal associée à l'adéquation aux recommandations est moins importante : $HR_{Q5vsQ1}=0,74$ (0,61-0,90), $p=0,001$ pour les hommes et $HR_{Q5vsQ1}=0,93$ (0,77-1,12), $p=0,38$ pour les femmes.

En France, une étude menée au sein de la cohorte Nutrinet-Santé a montré qu'une meilleure adhésion aux recommandations du WCRF/AICR était associée à une réduction significative du risque de cancer (12 % pour le cancer global, 14 % pour le cancer du sein et 12 % pour le cancer de la prostate). La réduction du risque de cancer colorectal liée à l'adéquation aux recommandations du WCRF/AICR n'était pas significative ($HR=0,86$ (0,72-1,03) $p=0,09$). Le faible nombre de cas de cancer colorectaux dans cette étude (118 cas) peut expliquer la non-significativité de l'association. En revanche, l'adéquation aux recommandations du PNNS diminuait significativement le risque de cancer colorectal ($HR=0,89$, $IC_{95\%}=0,80-1,00$, $P=0,04$) (Lavalette *et al.*, 2018).

4.2. Mécanismes impliqués dans la cancérogénicité de la viande rouge et de la charcuterie

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer la cancérogénicité de la viande rouge et de la charcuterie, et le poids de chacun de ces mécanismes n'est pas encore bien défini.

4.2.1. Formation de composés *N*-nitrosés

Les **nitrites** sont des composés qui sont ajoutés en tant que conservateur dans les viandes marinées ou transformées, mais ils peuvent également provenir de la réduction des **nitrate**s présents dans les végétaux, lors du cycle entérosalivaire par exemple. En présence d'agents nitrosants comme les nitrites, un processus de ***N*-nitrosation** des amines et des amides a lieu, conduisant à la formation des **composés *N*-nitrosés (NOCs)** dont les nitrosamines, et un processus de **nitrosylation** aboutissant à la formation de **fer héminique nitrosylé**. L'exposition à ces composés est généralement due à leur formation non intentionnelle qui peut avoir lieu dans les aliments ou dans la lumière intestinale. La réaction de *N*-nitrosation peut avoir lieu en milieu acide (par exemple lors de la digestion des aliments) ou dans des conditions de température élevée (par exemple lors de la friture des aliments) (AFSCA, 2010). La formation de NOCs est également facilitée par l'hème présent dans les viandes rouges et charcuteries. Il a été montré chez des volontaires sains que la consommation de viandes rouges et de charcuteries augmentait la formation de composés *N*-Nitrosés dans les fèces (Joosen *et al.*, 2009)

La viande rouge ne contient pas de composés *N*-nitrosés contrairement à la charcuterie, mais l'hème de la viande catalyserait la formation de composés *N*-nitrosés au sein de la lumière colique. Les bactéries anaérobies présentes dans la lumière colique participent également à la formation de ces composés *N*-nitrosés. Des études mécanistiques ont montré que les NOCs étaient de puissants initiateurs de la cancérogénèse. Le CIRC classe les nitrates et nitrites ingérés en catégorie 2A (probablement cancérogènes chez l'homme) pour le cancer de l'estomac du fait de la nitrosation endogène. Des même la diméthylnitrosamine a été classé comme 2A par l'IARC (IARC, 2010).

Cet effet cancérigène résulterait notamment de la capacité des NOCs à former des adduits à l'ADN. Ces dommages à l'ADN conduisent à des mutations ponctuelles et à l'activation de proto-oncogènes. Les travaux de l'équipe PPCA dans le modèle rat pré-traité à l'AOM n'ont

Contexte bibliographique

pas associés les NOCs totaux à l'effet promoteur des produits carnés et du fer héminique, mais ils ont montré un effet promoteur associé à la néoformation d'alcénals et du fer nitrosylé (Bastide *et al.*, 2015).

4.2.2. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des composés organiques non polaires contenant deux ou plusieurs cycles aromatiques fusionnés et présentant des propriétés lipophiles et semi-volatiles. Les HAP se forment principalement à la suite du traitement thermique des aliments, en particulier lors de la cuisson au barbecue ou sur le grill, par pyrolyse de la matière organique, telle que les graisses, les glucides et les protéines, présente dans les aliments (Hamidi *et al.*, 2016). Lors de la cuisson au barbecue, la combustion incomplète du charbon de bois ou l'égouttement de lipides qui entrent ensuite en contact avec la flamme, entraînent également la formation de HAP volatils, qui se déposent à la surface de la viande lorsque la fumée monte.

La bioactivation des HAP est principalement médiée par les enzymes du cytochrome P450 et a lieu principalement dans le foie, l'intestin et le côlon. Cette bioactivation confère aux HAP des propriétés mutagènes, qui deviennent donc des composés cancérigènes. Ils ont fait l'objet d'une évaluation par le CIRC en 2010, et ont été répartis dans les groupes 1 (cancérogène pour l'homme), 2A (probablement cancérogène pour l'homme), 2B (peut-être cancérogène pour l'homme) et 3 (non classé comme cancérogène pour l'homme) (IARC 2018). Le benzopyrène, un des HAP les plus courant et les plus étudiés, est un cancérogène avéré (groupe 1 du CIRC).

La consommation d'aliments contaminés a été identifiée comme la voie principale d'exposition humaine aux HAP, elle contribue à environ 88 à 98 % de cette contamination (Plaza-Bolaños *et al.*, 2010). Cependant des études épidémiologiques ont montré que, bien que les viandes fumées ou grillées au barbecue aient une teneur élevée en HAP, ces aliments ne représentent pas la principale source d'exposition alimentaire aux HAP (Phillips, 1999). Des études épidémiologiques menées en Europe ont montré que les principales sources d'expositions alimentaires seraient les céréales et les graisses au Royaume-Uni (Dennis *et al.*, 1983) et les graisses et le pain suivis par les crustacés et les mollusques en France (Veyrand *et al.*, 2013).

Contexte bibliographique

4.2.3. Fer héminique

Le fer héminique a été proposé comme étant le principal facteur responsable de l'effet cancérigène de la viande rouge et de la charcuterie par les travaux de l'équipe PPCA.

▪ Absorption intestinale et métabolisme

Le fer est un micronutriment essentiel que l'on trouve sous deux formes alimentaires, le fer héminique et le fer non héminique. Ce dernier est présent dans les végétaux et les céréales, tandis que le fer héminique est présent uniquement dans les produits animaux. Le fer héminique présente une meilleure biodisponibilité que le fer non-héminique.

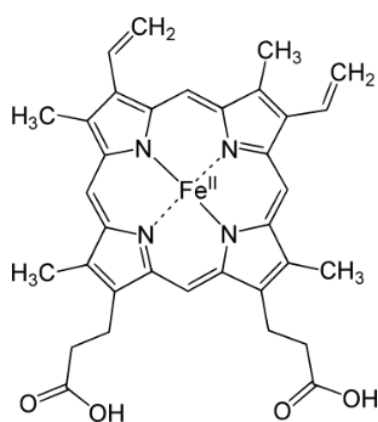


Figure 17 : Structure du fer héminique

Le fer héminique est constitué d'un noyau porphyrine renfermant en son centre un atome de fer (Figure 17).

Suite à son absorption alimentaire, l'hème est libéré de la myoglobine et de l'hémoglobine par l'environnement acide de l'estomac et l'activité protéolytique d'enzymes présentes dans l'estomac et l'intestin grêle (Hooda, Shah, and Zhang 2014).

Dans l'intestin grêle, le fer héminique se fixe sur le transporteur HCP1 (heme carrier protein 1) présent sur la membrane apicale de l'entérocyte, et est endocyté au sein de la cellule. L'hème peut également pénétrer dans les cellules épithéliales intestinales par endocytose à récepteur, l'hème est alors libéré dans les vésicules endosomales et transporté dans le cytosol via HRG1 (heme-responsive gene 1). Dans le cytosol de l'entérocyte, le fer héminique est catabolisé par l'hème oxygénase 1 (HMOX-1) qui est exprimée à la surface du réticulum endoplasmique, le site catalytique de la protéine côté cytosolique (West and Oates, 2008). Les produits de cette réaction sont le monoxyde de carbone (CO), le fer (Fe²⁺) et la biliverdine (qui est par la suite réduite en biliburine par la biliverdine reductase). Le Fe²⁺ est ensuite soit stocké dans l'entérocyte sous forme de Fe³⁺ grâce à la ferritine, soit exporté dans la circulation sanguine via la ferroportine-1 (FPN1). Une fois dans la circulation sanguine, le Fe²⁺ est oxydé en Fe³⁺ et pris en charge par la transferrine (Tf) qui les achemine vers les cellules cibles en se fixant sur son récepteur TfR1 (Transferrine Receptor 1) (Seiwert *et al.*, 2019).

Mais comme l'hème n'est que modérément absorbé dans l'intestin grêle, la grande majorité de l'hème (jusqu'à 90 %) atteint le côlon. L'hème est toxique pour les cellules en raison de sa

Contexte bibliographique

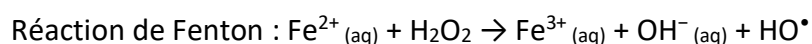
capacité à **catalyser la formation de radicaux hydroxyles**, des espèces réactives de l'oxygène (ROS pour Reactive Oxygen Species en anglais), produits de la réaction de Fenton. L'expression de HMOX-1 est induite en réponse à un niveau accru d'hème, ce qui entraîne ensuite la dégradation de l'hème excédentaire non lié aux protéines. Contrairement à HMOX-1, HMOX-2 est exprimée de manière constitutive et participe à la régulation de l'hème au niveau basal (Shibahara, 2003).

▪ **Propriétés oxydantes du fer héminique**

Le fer héminique catalyse la formation de différents agents qui induisent des dommages à l'ADN, notamment les ROS, les NOC et les produits de peroxydation lipidique.

Formation de ROS

La capacité du fer d'alterner entre les formes oxydées (Fe³⁺) et réduites (Fe²⁺), via la réaction de Fenton contribue à la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS).



Lors de cette réaction, le H₂O₂ est réduit en un anion hydroxyde (OH⁻) et un radical hydroxyle (HO[•]). Le radical hydroxyle est une espèce réactive de l'oxygène (ROS). Ces composés sont très réactifs et vont oxyder d'autres molécules en leur enlevant un électron, les rendant instables. Ils vont ainsi induire des dommages à l'ADN, entraînant possiblement des mutations responsables de l'effet cancérigène de la viande. De plus, les radicaux hydroxyles générés par la réaction de Fenton peuvent réagir avec d'autres molécules telles que les lipides, générant des composés réactifs qui vont également avoir des effets cytotoxiques et/ou génotoxiques (Cillard and Cillard, 2006). De plus, comme évoqué plus haut, l'hème favorise également la nitrosation des amines responsable de la formation de NOCs (Gamage *et al.*, 2018).

Catalyse de la peroxydation lipidique

Les radicaux hydroxyles formés par la réaction de Fenton peuvent notamment réagir avec les lipides insaturés. Cette réaction se déroule en plusieurs étapes (Guéraud *et al.*, 2010):

1. Initiation : le radical hydroxyle prend un hydrogène de la liaison C-H de l'acide gras formant un radical alkyle,

Contexte bibliographique

2. Propagation : le radical alkyle réagit avec $^3\text{O}_2$ pour donner un radical peroxy. Il y a ensuite transfert d'un atome d'hydrogène d'une molécule d'acide gras voisine (qui devient donc un radical alkyle) pour former un hydroperoxyde.
3. Terminaison : La vitesse d'oxydation diminue lorsque les radicaux lipidiques réagissent ensemble pour former des produits non radicalaires.

Ces produits terminaux de la peroxydation lipidique sont majoritairement des alcénals réactifs. Les principaux alcénals issus de la peroxydation des lipides sont le 4-hydroxy-2 (E)-nonenal (4-HNE) et le malondialdéhyde (MDA) (Guéraud *et al.* 2010). Le MDA est le produit de la peroxydation des AGPI (Acides Gras Poly Insaturés) qui contiennent au moins trois doubles liaisons, tels que l'acide arachidonique et le DHA, et c'est le produit de peroxydation lipidique le plus abondant. Le 4-HNE est issu de la peroxydation des acides gras ω_6 . Le 4-hydroxy-2 (E)-hexénal (4-HHE) est formé à partir des acides gras ω_3 . Les ω_6 étant présents en plus grande quantité dans notre alimentation que les ω_3 , il y a donc plus de 4-HNE formé que de 4-HHE.

Les études chez le rat ont également permis de proposer le **DHN-MA** (1,4-Dihydroxynonene Mercapturic Acid, principal métabolite urinaire du HNE) **urinaire** comme étant un **biomarqueur non invasif** de la consommation de fer héminique, associé au risque de développer des lésions préneoplasiques associées, et donc un biomarqueur potentiel du risque de CCR (Pierre *et al.*, 2006). Le MDA (produit de peroxydation lipidique) urinaire et le DHN-MA urinaire sont fortement dépendants des teneurs en hème et en lipides du régime (Guéraud *et al.*, 2015).

▪ **Propriétés toxiques des alcénals et potentiel cancérigène**

Ces alcénals issus de la peroxydation lipidique sont des **composés hautement réactifs** qui peuvent exercer une toxicité par adduction à des molécules, et notamment à l'ADN. Ces adductions à l'ADN, si elles ne sont pas éliminées par la cellule, peuvent provoquer des **mutations**, et contribuer au développement de maladies telles que le cancer (Marnett *et al.*, 2003). Le **MDA** entraîne des insertions, des délétions et des substitutions de paires de bases, principalement au niveau des paires de bases GC. Il a aussi été démontré que le MDA induisait une **génotoxicité** dans les cellules de mammifères (aberrations chromosomiques, formation de micronoyaux, ruptures de brins) (Guéraud *et al.*, 2010). Le **4-HNE** est capable d'établir des

Contexte bibliographique

liens covalents avec l'ADN, et il exercerait une **action génotoxique** via une fragmentation de l'ADN, des échanges de chromatides sœurs et une augmentation dose-dépendante du nombre de mutations (Guéraud *et al.*, 2010).

De nombreuses études sur les rongeurs, notamment menées dans l'équipe PPCA, ont montré que la consommation d'hème et/ou de viande rouge favorisent la formation de substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS) dans les selles, qui corrèlent avec la formation des produits de peroxydation lipidique (Sesink *et al.*, 1999; Pierre *et al.*, 2007, 2008). Des niveaux élevés de TBARS sont associés à une cytotoxicité élevée sur des colonocytes en culture (Pierre *et al.*, 2003). Il a par ailleurs été montré que les alcénals sont plus cytotoxiques vis-à-vis des cellules épithéliales coliques saines (cellules APC+/+) que vis-à-vis des cellules pré-néoplasiques mutées pour le gène *Apc* (cellules APC Min/+) (Baradat *et al.*, 2011; Bastide *et al.*, 2015). Cela s'expliquerait par une capacité de détoxification des alcénals plus importantes dans les cellules mutées pour *Apc* (Baradat *et al.*, 2011; Surya *et al.*, 2016).

▪ **Étude du lien entre fer héminique et risque de cancer colorectal chez les rongeurs**

Les études menées chez le rat et la souris ont grandement contribué à la mise en évidence de la cancérogénicité du fer héminique. En 1998, l'équipe de Sawa *et al.* a été la première à montrer qu'un régime **riche en fer héminique** (hémoglobine) et en **lipides** (huile de carthame) **augmente le risque de cancer du côlon** (adénocarcinomes et tumeurs coliques) chez le rat (Sawa *et al.*, 1998).

Effet hyperproliférateur et catalyseur de la peroxydation lipidique du fer héminique

Il a aussi été montré qu'un régime riche en fer héminique entraînait une **hyperprolifération épithéliale colique** chez le rat (Sesink *et al.*, 1999). Cet effet hyperproliférateur serait expliqué par une inhibition par l'hème de la rétroaction négative de la prolifération, de la surface vers le fond de la crypte (où se trouvent les cellules en prolifération), au niveau de l'épithélium colique (Ijssennagger *et al.*, 2013)

Comme évoqué précédemment, les études chez le rat ont permis de proposer que l'effet promoteur du fer héminique serait expliqué par sa capacité à catalyser la peroxydation lipidique, formant des alcénals génotoxiques et cytotoxiques. Un régime riche en fer héminique et en lipides entraînait une augmentation de la **cytotoxicité des eaux fécales**, mais le fer héminique n'était pas directement responsable de cette cytotoxicité car ajouté seul à

Contexte bibliographique

l'eau fécale témoin, il n'avait pas d'impact sur la cytotoxicité. De plus, les substances réactives à l'acide thiobarbiturique (**TBARS**) étaient considérablement augmentées dans les eaux fécales des rats nourris à l'hème par rapport aux témoins, indiquant une **augmentation de la peroxydation lipidique dans ces groupes** (Sesink *et al.*, 1999). Et en absence de fer héminique, les lipides n'augmentaient pas la cytotoxicité du contenu fécal ou la prolifération épithéliale (Sesink *et al.*, 2000).

Fer héminique : principal responsable de la cancérogénicité des viande rouges et charcuteries ?

Plus récemment, les travaux de l'équipe PPCA ont montré que, parmi les trois mécanismes majeurs proposés pour expliquer la promotion du cancer colorectal induite par les viandes rouges et charcuteries (les amines hétérocycliques, les composés *N*-nitrosés, et le fer héminique), seul le fer héminique augmentait significativement le nombre de lésions préneoplasiques (MDF, Mucin Depleted Foci, Foyer déplété en mucine) chez les rats, sans effet additif ou synergique des amines hétérocycliques et/ou des nitrates/nitrites (Bastide *et al.*, 2015). Et d'autres travaux de l'équipe PPCA ont permis de proposer que l'effet cancérogène du fer héminique proviendrait de sa capacité à oxyder les lipides et former des alcénals et d'une sélection positive des cellules préneoplastiques mutées pour *APC*, en raison d'une plus forte réponse anti-oxydante de ces cellules par rapport aux cellules saines (Surya *et al.* 2016).

Rôle du microbiote dans la cancérogénicité hème-induite

Des études chez la souris ont montré que le **microbiote intestinal** jouait un rôle dans **l'hyperprolifération** induite par l'hème (Ijssennagger *et al.*, 2015). Le microbiote intestinal jouerait également un rôle important dans la catalyse de la peroxydation lipidique par le fer héminique (Martin *et al.*, 2015). L'hème a aussi été associée à une augmentation de l'inflammation, de la perméabilité et de la génotoxicité au niveau de la muqueuse colique chez le rat, et ces altérations étaient étroitement associées à une dysbiose intestinale importante (Martin *et al.*, 2019).

Réduction du risque de cancer hème-induit par le calcium et les antioxydants

Les études menées chez le rat ont permis de montrer que le phosphate de calcium, en chélatant l'hème, inhibait l'hyperprolifération épithéliale colique et la cytotoxicité des eaux fécales induites par un régime riche en hème (Sesink *et al.*, 2000). Il a par la suite été montré que le carbonate de calcium, était plus adapté que le phosphate de calcium pour réduire le

Contexte bibliographique

risque de cancer colorectal associé au fer héminique, en raison de son absence d'effets secondaires (Allam *et al.*, 2011). L'hyperprolifération colique et la toxicité des eaux fécales des rats nourris à l'hème ont également pu être prévenus par un régime riche en épinards, en raison de leur teneur en chlorophylle qui, comme le calcium, est capable de chélater le fer héminique (de Vogel *et al.*, 2005). Les antioxydants ont aussi empêché l'augmentation du nombre et de la taille des lésions pré-néoplasiques (aberrant crypt foci, ACF) induite par un régime riche en fer héminique (hémine) chez le rat, en limitant la peroxydation lipidique luminale, diminuant ainsi la teneur en TBARs et la cytotoxicité des eaux fécales (Pierre *et al.*, 2003).

▪ **Association entre apport en fer héminique et risque de cancer**

L'apport en fer héminique a été associé positivement au risque de cancer colorectal dans plusieurs études de cohortes. Une méta-analyse a regroupé les résultats de 5 études de cohortes prospectives comparant le risque de développer un CCR chez les personnes dans le plus haut quintile d'apport en fer héminique par rapport aux personnes dans le quintile le plus bas. Les personnes ayant l'apport en fer héminique le plus important (dans le quintile le plus haut) avaient un risque augmenté de 18% (RR=1.18[1.06–1.32]) de développer un CCR par rapport aux personnes ayant l'apport en fer héminique le moins important (quintile le plus bas) (Bastide *et al.*, 2011). De plus, l'apport en fer héminique a été significativement associé à une augmentation du risque de développer un adénome colorectal dans la cohorte de femmes E3N (Bastide *et al.*, 2016).

Dans le cadre du CUP, le WCRF et l'AICR ont effectué une méta-analyse dose-réponse de l'association entre consommation d'aliments contenant du fer héminique et risque de CCR, 6 études de cohortes ont été incluses. Le rapport du CUP de 2017 indique qu'une augmentation de l'apport en fer héminique de 1mg/jour augmentait le risque de CCR de 4% (HR=1.04 [0.98-1.10]). Ils ont indiqué que les preuves suggérant que la consommation d'aliments contenant du fer héminique augmente le risque de cancer colorectal étaient limitées (WCRF d., 2018).

En plus des études épidémiologiques, ce sont les études expérimentales chez l'animal qui ont permis de proposer une association entre apport en fer héminique et risque de CCR.

Contexte bibliographique

En conclusion, la consommation de viande rouge et de charcuterie est donc associée à une augmentation du risque de cancer colorectal. Le fer héminique est proposé comme étant le principal facteur responsable de l'effet cancérigène de la viande rouge et de la charcuterie. En catalysant la peroxydation des lipides du régime dans la lumière intestinale, le fer héminique augmente la formation d'alcénals cytotoxiques et génotoxiques dans la lumière intestinale. Nous allons voir que la barrière intestinale joue un rôle essentiel dans la protection de l'organisme vis-à-vis des composés toxiques présents dans la lumière intestinale.

5. LA FONCTION DE BARRIÈRE DE L'INTESTIN

La barrière intestinale joue un rôle essentiel dans la protection de l'organisme vis-à-vis des composants toxiques présents dans la lumière intestinale.

5.1. Anatomie et physiologie de la barrière intestinale

La principale fonction du tube digestif est d'absorber les nutriments (sucres, graisses, acides aminés, vitamines, minéraux...) tout en empêchant la pénétration des substances nocives telles que les microorganismes (bactéries, virus...) et des substances toxiques (pesticides, xénoestrogènes...) dans l'organisme. Il mesure 6 à 7 mètres et comporte deux segments : l'intestin grêle et le gros intestin (Irving and Catchpole, 1992).

L'intestin grêle relie l'estomac au gros intestin, il mesure entre 4,75 et 6 mètres et constitue la plus longue partie du tube digestif. L'intestin grêle est enroulé sur lui-même et se compose de trois segments : le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Il est recouvert par le mésentère (Figure 18).

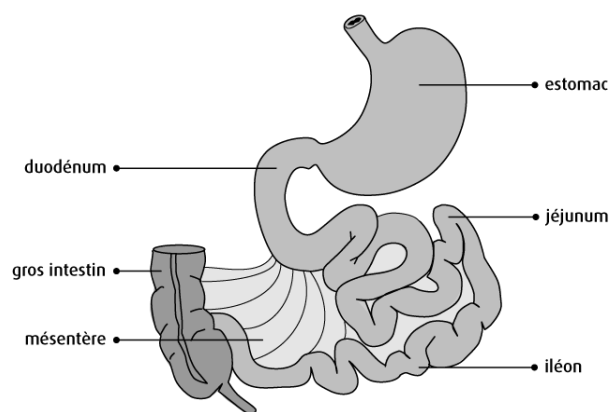


Figure 18: Anatomie de l'intestin grêle (Société canadienne du cancer)

Le gros intestin correspond à la dernière partie du tube digestif, il est constitué du côlon et du rectum. Le côlon est composé de 4 parties: le côlon droit ou ascendant, le côlon transverse, le côlon gauche ou descendant et le côlon sigmoïde. Le rectum se trouve après le côlon sigmoïde et est composé de l'ampoule rectale, qui permet le stockage des matières fécales, et du canal anal, qui permet la continence (Figure 19).

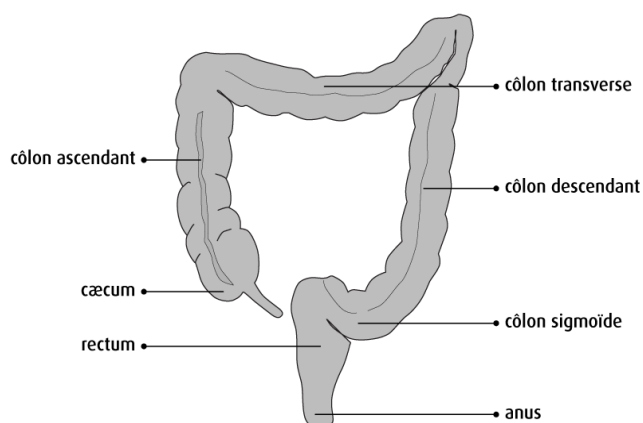


Figure 19: Anatomie du gros intestin (Société canadienne du cancer)

Contexte bibliographique

Du point de vue histologique, la paroi du tube digestif est constituée de quatre couches : la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculuse et l'adventice. La muqueuse intestinale est constituée de trois éléments : l'épithélium, le chorion, la musculaire muqueuse. La structure de l'intestin est optimisée de façon à avoir une importante surface de contact avec le bol alimentaire : il est formé de nombreux replis pour atteindre une surface totale d'environ 32m² (Helander and Fändriks, 2014). Les fonctions de l'intestin grêle et du côlon étant différentes, ils présentent des structures différentes adaptées à leur fonction. Au niveau de l'intestin grêle, la muqueuse est caractérisée par la présence de nombreux replis à plusieurs niveaux : les valvules conniventes au niveau de la muqueuse, les villosités qui sont des replis de l'épithélium, et les microvillosités correspondent aux replis de la membrane plasmique des cellules épithéliales (Figure 20). C'est au niveau de l'intestin grêle que la majorité des nutriments sont absorbés et les nombreux replis augmentent considérablement la surface d'absorption intestinale.

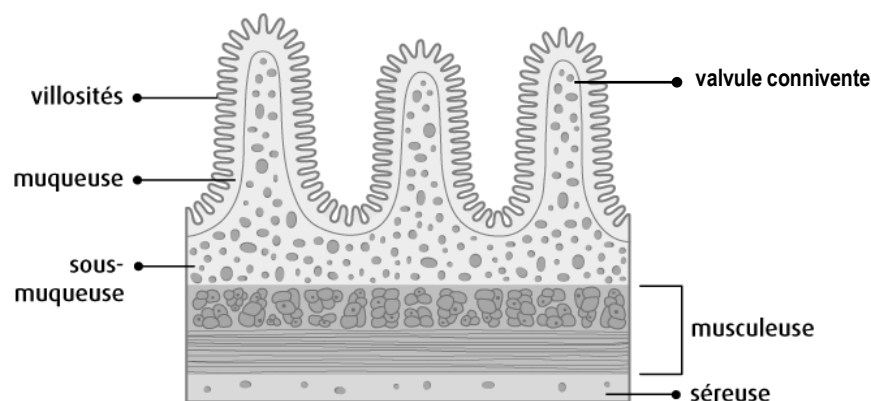


Figure 20: Histologie de l'intestin grêle (Société canadienne du cancer)

Les principales fonctions du côlon sont de stocker les déchets, réabsorber l'eau, maintenir l'équilibre hydrique et absorber certaines vitamines. La muqueuse colique est dépourvue de valvules conniventes et de villosités mais elle présente des invaginations appelées glandes (ou cryptes) de Lieberkühn, que l'on retrouve également dans l'intestin grêle. C'est au niveau des cryptes intestinales que se trouvent les cellules progénitrices et les cellules souches.

L'épithélium intestinal est constitué d'une monocouche de cellules aux fonctions variées. Il constitue la principale barrière physique qui sépare l'intérieur de l'organisme de l'environnement extérieur. L'épithélium intestinal est en étroite interaction avec le microbiote intestinal et le système immunitaire, formant la barrière intestinale.

Contexte bibliographique

5.1.1. *Épithélium intestinal*

L'épithélium intestinal est une monocouche cellulaire dynamique qui sert de barrière entre le contenu luminal et le système immunitaire sous-jacent tout en permettant le transport de l'eau, des nutriments et des ions. Il constitue la principale barrière physique qui sépare l'intérieur de l'organisme de l'environnement extérieur. Cette surface est continuellement renouvelée par les cellules souches épithéliales intestinales pluripotentes qui résident à la base des cryptes. Les quatre principaux types de cellules retrouvés au sein de l'épithélium intestinal sont: les **cellules caliciformes** (ou cellules à mucus), les **cellules entéroendocrines**, les **entérocytes** et les **cellules de Paneth**. La majorité des cellules bordant la lumière intestinale sont des entérocytes, ce sont des cellules absorbives qui permettent l'absorption des nutriments de la lumière de l'intestin grêle vers le milieu intérieur (Peterson and Artis 2014).

Les **cellules épithéliales intestinales (CEIs)** sont connectées entre elles et à la membrane basale par des **complexes jonctionnels** et forment une **monocouche polarisée**. Les trois plus importants complexes sont les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les desmosomes (Vancamelbeke and Vermeire 2017). Les jonctions adhérentes se trouvent sous les jonctions serrées et sont nécessaires à leur assemblage. Les desmosomes et les jonctions adhérentes forment des liaisons adhésives fortes pour maintenir l'intégrité de l'épithélium. Les jonctions serrées et les jonctions adhérentes sont liées à l'anneau péri-jonctionnel d'actine et de myosine qui permet la régulation des jonctions via le cytosquelette (Buckley and Turner, 2018).

▪ **Les jonctions adhérentes**

Les jonctions adhérentes (JA) sont des complexes protéiques situés sur la membrane latérale des cellules épithéliales, au niveau des points de contact cellule-cellule. Les principales jonctions adhérentes sont formées par des interactions cadhérine-caténine (Groschwitz and Hogan, 2009). Les cadhérines épithéliales sont des glycoprotéines qui possèdent une extrémité C-intracellulaire et une extrémité N-extracellulaire. Le domaine extracellulaire forme des interactions homotypiques avec les cadhérines des cellules voisines pour maintenir l'adhésion cellule-cellule (Pokutta and Weis 2007). Le domaine intracellulaire contient un domaine de liaison à la caténine. Les caténines relient les JA au cytosquelette d'actine (Pokutta

Contexte bibliographique

and Weis 2002). Les complexes cadhérine-caténine sont importants non seulement pour relier les cellules adjacentes entre elles, mais également pour maintenir la polarité cellulaire, réguler la migration et la prolifération épithéliales ainsi que la formation d'autres complexes adhésifs tels que les desmosomes (Hermiston and Gordon 1995).

▪ Les jonctions serrées

Les jonctions serrées (JS) sont des complexes protéiques situés aux extrémités apicales des membranes latérales des CEIs. Ils sont constitués de protéines transmembranaires, de protéines membranaires périphériques et de protéines régulatrices (Zeisel *et al.*, 2019).

Il existe trois classes de protéines transmembranaires qui constituent les jonctions serrées (Figure 21):

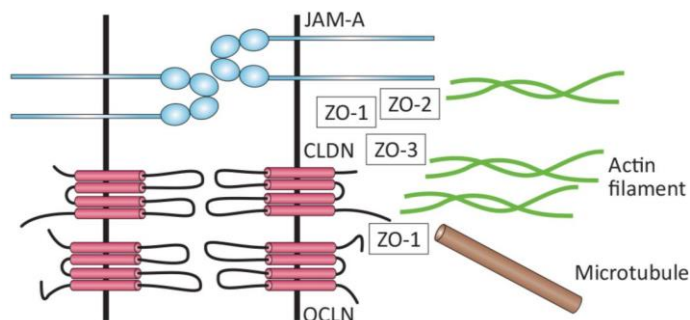


Figure 21 : Protéines des jonctions serrées. OCLN=occludine, CLDN=claudine (Zeisel *et al.* 2019)

- L'**occludine** joue un rôle dans l'assemblage et le désassemblage des jonctions serrées, et sa localisation membranaire est régulée par la phosphorylation des résidus Ser, Thr et Tyr (Sakakibara *et al.*, 1997). L'occludine joue donc un rôle important dans la perméabilité paracellulaire. Certaines kinases, telles que la protéine kinase C (PKC) et la caséine kinase, ont été identifiées comme responsables de sa phosphorylation (Jain *et al.*, 2011).
- Les **claudines** jouent un rôle déterminant dans la fonction de barrière. Leur partie extracellulaire forme des pores permettant un passage sélectif des ions à travers l'espace paracellulaire (Van Itallie and Anderson 2006). Ces protéines sont également régulées par une phosphorylation spécifique des résidus Ser et Thr (Fujibe *et al.*, 2004).
- Les **protéines JAM** (Junctional adhesion molecule) font partie de la superfamille des immunoglobulines. Elles facilitent l'assemblage et la formation de jonctions serrées et jouent un rôle dans la régulation de la perméabilité et de l'inflammation intestinale (Groschwitz and Hogan, 2009).

Contexte bibliographique

Les domaines intracellulaires de ces protéines transmembranaires sont reliés au cytosquelette d'actine par les protéines ZO-1, ZO-2 et ZO-3 (**zonula occludens**). Ces protéines jouent un rôle fondamental dans la perméabilité cellulaire ainsi que dans la régulation de l'adhésion des cellules, la formation et le maintien de la structure de la jonction serrée et dans la transmission de signaux des jonctions intercellulaires à l'intérieur de la cellule afin de réguler des processus tels que la migration cellulaire (Jain *et al.* 2011).

5.1.2. Diversité des cellules épithéliales et mécanismes de défense

Les CEIs étant les principales cellules au contact du microbiote intestinale, elles sont des acteurs essentiels des interactions hôte-microbe (Figure 22).

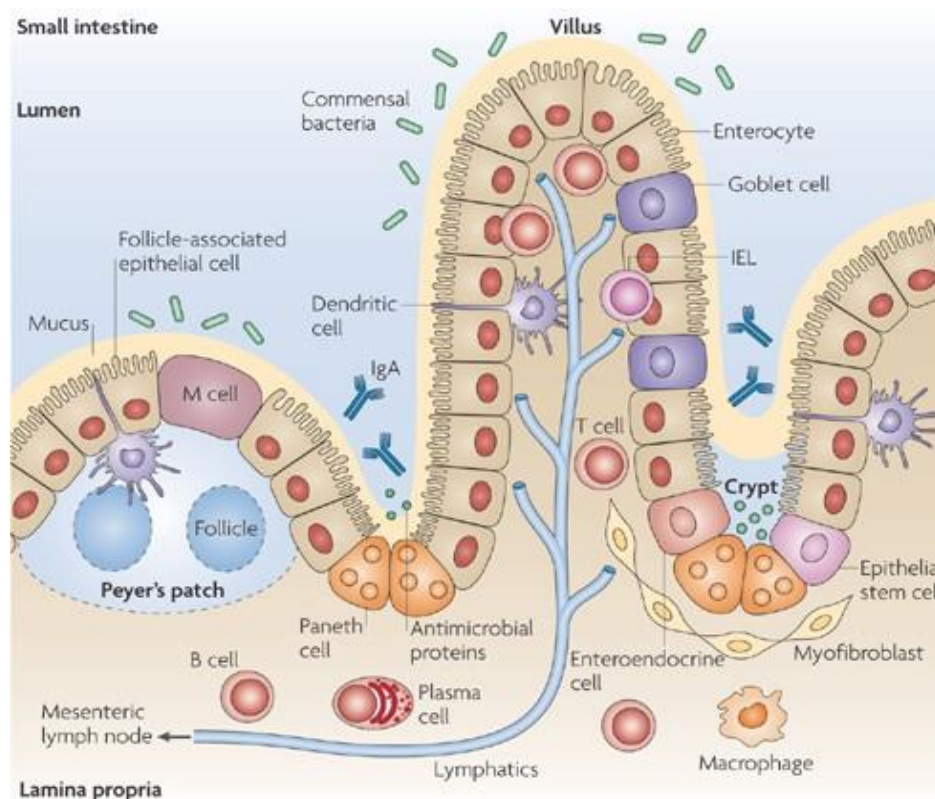


Figure 22 : Anatomie du système immunitaire intestinal (Abreu 2010)

Nous allons voir dans cette partie que les CEIs contribuent à l'amorçage des réponses cellulaires immunitaires adaptatives et à la régulation des réponses effectrices innées.

En plus de la barrière physique formée par l'épithélium intestinal, une couche de mucus protectrice se trouve entre le contenu luminal et l'épithélium, participant ainsi à la fonction de barrière de l'intestin. Le mucus est produit par des **cellules sécrétoires** spécialisées présentes au sein de l'épithélium intestinal. Ces cellules sont spécialisées dans la protection

Contexte bibliographique

de l'hôte contre l'infection et l'exposition aux stimuli inflammatoires (Peterson and Artis, 2014). Elles comprennent les cellules caliciformes et les cellules de Paneth. Les **cellules caliciformes** sécrètent des **mucines** hautement glycosylées dans la lumière intestinale, principales composantes de la couche de mucus. La plus abondante des mucines, la mucine 2 (MUC2), joue un rôle essentiel dans l'organisation des couches de mucus à la surface épithéliale du côlon (Johansson *et al.*, 2008). La déficience en MUC2 entraîne le développement spontané de la colite et une prédisposition au CCR induits par l'inflammation chez les souris (Velcich *et al.*, 2002; Van der Sluis *et al.*, 2006). Les **cellules de Paneth** présentes dans les cryptes de l'intestin grêle sécrètent des **protéines antimicrobiennes (AMPs)** telles que les alpha-défensines, les cathelicidines et le lysozyme dans la couche de mucus (Bevins and Salzman, 2011; Gallo and Hooper, 2012). Ces AMPs renforcent la fonction de barrière en régulant les bactéries commensales et pathogènes et limitant la résistance des bactéries aux réponses antimicrobiennes. Elles limitent ainsi la quantité et la diversité des bactéries qui atteignent la surface épithéliale ou interagissent avec le système immunitaire des muqueuses sous-jacentes (Kim and Ho, 2010; Gallo and Hooper, 2012).

Si la fonction de barrière est essentielle pour isoler le microbiote de l'intérieur de l'organisme, certaines CEIs sont spécialisées dans la présentation des antigènes luminaux et des micro-organismes au système immunitaire muqueux sous-jacent. Il s'agit des **cellules microfoldes** (ou **cellules M**) qui sont retrouvées au niveau de **plaques de Peyer** dans l'intestin grêle et au niveau des **agrégats lymphoïdes** dans le côlon (Mabbott *et al.*, 2013). Les cellules M absorbent les antigènes de manière non spécifique et les micro-organismes via des récepteurs spécifiques. Les cellules caliciformes de l'intestin grêle contribuent également au transport actif du contenu luminal à travers la barrière épithéliale grâce à la transmission d'antigènes luminaux solubles aux **cellules dendritiques (CD) sous-épithéliales** (Peterson and Artis, 2014). La présentation d'antigènes luminaux aux CD provoque la migration des CD vers le ganglion lymphatique mésentérique où elles induisent la différenciation des cellules B en plasmocytes responsables de la sécrétion d'immunoglobulines A (IgA). Ces **IgA** migrent par transcytose à travers l'épithélium intestinal pour se retrouver dans le mucus, où elles participent à la protection contre l'invasion bactérienne (Kelly *et al.*, 2015).

Les CEIs expriment à leur surface des **récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires** (pattern-recognition receptors, **PRR**), capables de reconnaître des signatures moléculaires des

Contexte bibliographique

micro-organismes intestinaux commensaux et pathogènes. L'activation des PRR entraîne l'expression de gènes pro-inflammatoires, la sécrétion de cytokines et de chimiokines puis le recrutement de cellules inflammatoires et l'activation du système immunitaire adaptatif. Les réponses immunitaires innée et adaptative médiées par les CEIs via les PRR sont essentielles pour la protection contre les pathogènes luminaux et la réparation des dommages épithéliaux (Otte *et al.*, 2004). Les PRR entraînent également la sécrétion d'AMPs telles que REGIIIγ (protéine de régénération des îlots de Lecterine de type C IIIγ) par les CEIs, principalement via la voie PRR/MYD88 (Myeloid Differentiation primary response 88) (Soderholm and Pedicord, 2019). Les « Toll-like receptors » (TLR) font partie de la famille des PRR et peuvent activer la voie Nf-kb (Nuclear factor-kappa B), essentielle pour réguler l'homéostasie et la réparation de l'épithélium intestinale. Cependant la voie Nf-kb a également été impliqué dans la progression du cancer colorectal.

L'exposition continue de l'épithélium au microbiote intestinal constitue une source permanente de stimuli immunitaires potentiels ; cependant, dans des conditions homéostatiques, il existe un équilibre entre les réponses inflammatoires et régulatrices pour empêcher une réaction excessive aux antigènes luminaux inoffensifs. Des mécanismes permettent de réguler le signal induit par les PRR et de différencier les bactéries pathogènes des bactéries commensales. Les CEIs expriment des **régulateurs négatifs** de la signalisation pro-inflammatoire dépendante du PRR. La perturbation de ces voies de régulation provoque chez les souris une augmentation de l'inflammation. Des PRR sont retrouvés aux pôles apical et baso-latéral des CEIs mais les voies de signalisation diffèrent, permettant ainsi d'adapter la réponse inflammatoire. Il a également été montré que les signaux induits des bactéries commensales via les PRR régulent la production de mucus par les cellules caliciformes. Les cellules Paneth jouent également un rôle important dans la régulation de la production d'AMP grâce à l'expression de PRRs (Peterson and Artis, 2014).

Les **cellules présentatrices d'antigène** telles que les CD et les macrophages expriment également des TLR qui permettent l'intégration et la dégradation d'agents pathogènes. La sécrétion de cytokines par ces cellules provoque la différenciation des CD4 + T naïfs en cellules T helper (TH1, TH2, TH17), en cellules T-régulatrices (Treg) et en cellules T-régulatrices productrices d'IL-10 (TR1). L'activation des cellules TH1 et TH2 entraîne l'expression de **cytokines pro-inflammatoires** telles que les interleukines IL-4, IL-5 et IL-13, et l'IFN-γ

Contexte bibliographique

(interféron γ). Les cellules TH17 synthétisent l'IL-17 qui stimule les cellules stromales, qui vont à leur tour exprimer des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, l'IL-8 et l'IL-22 (Adak and Khan, 2019).

5.1.3. *Microbiote intestinal*

Notre système gastro-intestinal est colonisé par une multitude de micro-organismes qui forment le microbiote intestinal. Il existe une véritable **symbiose** entre le microbiote et notre organisme : le microbiote participe à la **digestion**, **l'immunité** et à la **résistance aux agents pathogènes** ; et l'hôte fournit au microbiote des nutriments et un environnement anaérobie, chaud et humide. Le microbiote intestinal est un déterminant essentiel de la santé et des maladies humaines et un régulateur clé de la physiologie de l'hôte. L'intestin est colonisé par des micro-organismes après la naissance, atteignant un état d'équilibre entre 2 et 5 ans. Le processus de colonisation microbienne de l'intestin est impacté par des facteurs tels que l'âge de la mère, le mode d'accouchement, l'alimentation (lait maternel ou lait maternisé) et la prise d'antibiotique (Marques *et al.*, 2010).

Avec une concentration bactérienne croissante depuis la lumière gastrique jusqu'au colôn, c'est au niveau du colôn et du rectum que le microbiote atteint sa concentration maximale. Environ 3000 espèces procaryotes ont été identifiées dans le microbiote intestinal humain, et il existe une grande variabilité entre les individus. Les **Firmicutes** (*Lactobacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*) et les **Bacteroidetes** (*Bacteroides*) représentent la majorité des **phyla bactériens** retrouvés dans l'intestin (Dethlefsen, McFall-Ngai, and Relman 2007), mais on trouve également d'autres phyla tels que les *Actinobacteria* (*Bifidobactéries*), les *protéobactéries*, les *fusobactéries*, les *verrucomicrobies* et les *cyanobactéries* (Eckburg *et al.*, 2005).

Le microbiote intestinal joue un rôle important dans la digestion en assurant la fermentation des substrats et des résidus alimentaires non digestibles, en facilitant l'assimilation des nutriments grâce à un ensemble d'enzymes dont l'organisme n'est pas pourvu, en hydrolysant l'amidon, la cellulose et d'autres polysaccharides, en synthétisant certaines vitamines (vitamine K, B12, B8) et en régulant plusieurs voies métaboliques (absorption des acides gras, du calcium, du magnésium etc). Le microbiote intestinal participe également à la mise en place et au fonctionnement du système immunitaire intestinal. Il permet de lutter directement

Contexte bibliographique

contre la colonisation du tube digestif par des espèces pathogènes, par phénomène de compétition et par production de substance bactéricides (bactériocines). Les acides gras à chaîne courtes (AGCC), dont les principaux sont l'acétate, le propionate et le butyrate, produits par le microbiote par fermentation des polysaccharides non digestibles, ont un rôle majeur dans la fonction de barrière intestinale et le maintien de l'homéostasie intestinale et immunitaire. Notamment, les AGCC ont un effet sur l'expression des TLR, essentiels dans la réponse immunitaire intestinale (Tan *et al.*, 2014).

Une fonction essentielle du microbiote intestinal est le développement et le maintien de la fonction de barrière intestinale tout au long de la vie. Chez les individus en bonne santé, le microbiote est relativement stable et forme un rapport mutuellement bénéfique avec l'hôte. Cependant, des perturbations dans la relation hôte-microbiote peuvent avoir de graves conséquences et peuvent aggraver les troubles neurologiques, digestifs et métaboliques (Borre *et al.*, 2014). De nombreuses maladies métaboliques, notamment l'obésité et le diabète, sont associées à des modifications de la composition du microbiote. Les souris nourries avec un régime riche en graisses, et les patients souffrant d'obésité ou de diabète ont des rapports de *Firmicutes* et *Protéobactéries* sur *Bacteroidetes* augmentés (Plovier *et al.*, 2017). D'autre part, *Akkermansia muciniphila* est une espèce bactérienne impliquée dans la régulation de la fonction de barrière intestinale et dont l'abondance est modifiée chez les personnes obèses et diabétiques. Il a été montré que l'administration quotidienne d'*A. Muciniphila* atténuait le dysfonctionnement de la barrière intestinale induit par un régime riche en gras (Everard *et al.*, 2013). Plovier *et al.* ont récemment montré qu'une protéine spécifique de la membrane externe d'*A. Muciniphila*, appelée Amuc100, améliorait l'intégrité de la barrière intestinale et que l'administration de cette protéine permettait de retrouver en partie les effets bénéfiques de *A. muciniphila*. Les vésicules extracellulaires (VE) sécrétées par les bactéries sont d'autres composants majeurs connus pour interagir directement avec les cellules épithéliales intestinales (Plovier *et al.*, 2017). Il a en effet été montré que les VE d'*A. Muciniphila* améliorent les symptômes de la colite induite par le DSS chez la souris (Cryan *et al.*, 2019).

De plus, il a été montré que les facteurs environnementaux auraient un rôle déterminant dans la composition du microbiote intestinal (Adak and Khan, 2019). Notamment, il a été montré que le régime alimentaire influençait fortement la composition du microbiote. Les **régimes**

Contexte bibliographique

riches en aliments d'origine végétale sont associés à une **augmentation** de certaines **Actinobactéries (les Bifidobactéries) et Firmicutes (Lactobacillus)**, et à une **diminution** des **Bacteroidetes** et de **Clostridium perfringens (Firmicute)**, favorisant la formation d'AGCC, **renforçant** en conséquence la **fonction de barrière intestinale**, la **production de cellules T-régulatrices** et **diminuant l'inflammation**. A l'inverse, les **régimes riches en protéines animales** sont associés à une augmentation des **Bacteroidetes (Alistipes, Bilophia et Ruminococcus)** et à une diminution de certaines **Bifidobactéries**, augmentant la production de triméthylamine-N-oxyde, un composé **pro-athérogène** qui augmente le risque de maladie cardiovasculaire, et **diminuant la formation d'AGCC**, augmentant ainsi le risque de **maladies inflammatoires de l'intestin** (Singh *et al.*, 2017). De plus, les régimes occidentaux riches en graisses et en sucres ont été associés à une diminution de la **diversité bactérienne** alors qu'un régime riche en fruits et légumes, à forte teneur en fibres, est associé à une plus grande richesse bactérienne (Filippo *et al.*, 2010).

5.2. Notion de perméabilité intestinale

5.2.1. Définition

La **perméabilité intestinale** peut être définie comme la capacité de la muqueuse intestinale à laisser passer des substances présentes dans la lumière intestinale vers l'intérieur de l'organisme. La perméabilité de l'épithélium intestinal est régulée via deux voies principales: la voie **transcellulaire** et la voie **paracellulaire** (Shen *et al.*, 2011). La perméabilité transcellulaire correspond essentiellement au transport de solutés tels que les acides aminés, les électrolytes, les acides gras à chaîne courte et les sucres à travers les cellules épithéliales, grâce à des transporteurs sélectifs (Kunzelmann and Mall 2002). La perméabilité paracellulaire correspond au transport à travers l'espace entre les cellules épithéliales et est régulée par les complexes jonctionnels (Van Itallie and Anderson 2006). Elle permet le passage sélectif de molécules essentielles au maintien de l'homéostasie, telles que l'eau, des ions, des petits nutriments et de certaines macromolécules, et doit donc être régulée avec précision.

Il existe deux voies de transport paracellulaire à travers les jonctions serrées d'une monocouche épithéliale intacte, appelées **voies de «pore» et de «fuite»**. La voie de pore est une voie de grande capacité, qui présente une sélectivité en fonction de la taille et de la charge, tandis que la voie de fuite présente une faible capacité et a une sélectivité limitée. La

Contexte bibliographique

perméabilité de la voie des pores semble être régulée principalement par la famille des claudines, tandis que la perméabilité de la voie de fuite est régulée par les protéines ZO-1, l'occludine et la kinase à chaîne légère de myosine (MLCK) (Shen *et al.*, 2011). Des dommages épithéliaux tels que des lésions ou des ulcères provoquent la destruction des jonctions serrées provoquant une altération de la fonction de barrière locale. Le contenu luminal traverse alors la barrière intestinale par une troisième voie, appelée **voie «sans restriction»**. La voie sans restriction est de grande capacité et non sélective en ce qui concerne la taille et la charge du soluté. De grosses protéines et même des bactéries entières peuvent traverser la voie sans restriction, ce qui explique en partie les maladies déclenchées par des dommages épithéliaux. Cependant, en absence de pathologies, l'épithélium est généralement intact et la fonction de barrière reflète le flux à travers les voies de pores et de fuite (Buckley and Turner 2018).

5.2.2. Régulation de la perméabilité intestinale

La kinase de la chaîne légère de la myosine (**MLCK**) est une protéine clé impliquée dans l'augmentation de la perméabilité intestinale. Une fois activée, la MLCK va **phosphoryler** la chaîne légère de myosine (**MLC**), ce qui provoque **l'ouverture des jonctions serrées** et la **réorganisation de l'anneau d'actomyosine perijonctionnel (PAMR)**, induisant ainsi une augmentation de la perméabilité paracellulaire (Clayburgh *et al.*, 2005). De plus, il a été montré *in vivo* que des modèles transgéniques exprimant une MLCK constitutivement active avaient une perméabilité paracellulaire augmentée (Su *et al.*, 2009). L'ouverture des jonctions serrées associée à l'activation de la MLCK passerait par une relocalisation de la protéine ZO-1, une endocytose de l'occludine et la dépolymérisation de l'actine (Su *et al.*, 2009).

La perméabilité à travers l'épithélium intestinal est augmentée pendant l'absorption des nutriments. Le co-transport entre le Na⁺ et le nutriment, en activant la MLCK, induit une augmentation de la perméabilité paracellulaire (Turner *et al.*, 1997). Une augmentation de la perméabilité intestinale peut également être associée à une situation pathologique.

Contexte bibliographique

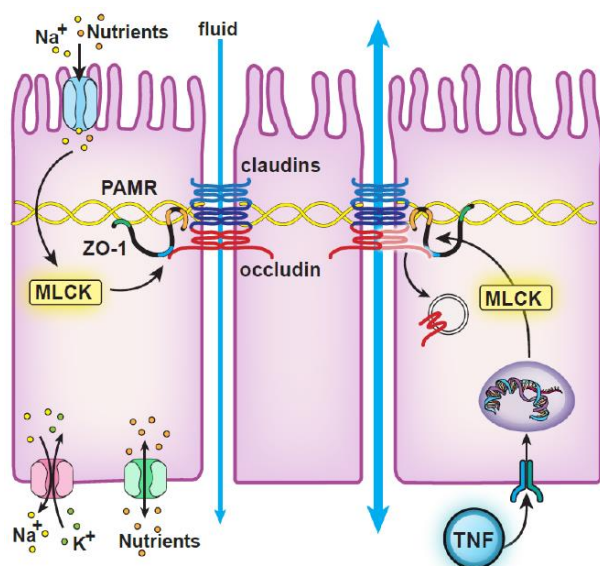


Figure 23 : Rôles de la MLCK dans la régulation de la jonction serrée (He et al. 2020)

Par exemple, l'activation de la MLCK peut résulter d'une infection à *E. coli* (Yuhan *et al.*, 1997) ou d'une stimulation au TNF- α (Tumour Necrosis Factor α), une cytokine inflammatoire (Zolotarevsky *et al.*, 2002) (Figure 23).

La MLCK est donc un nœud de signalisation clé dans la régulation physiologique et physiopathologique des jonctions épithéliales serrées. Des études *in vitro* ont montré que l'activation de la MLCK résultante de la stimulation au TNF α ne

fonctionne qu'après un pré-traitement avec autre cytokine inflammatoire : l'**IFN- γ** . En effet l'IFN- γ provoque la **transcription du récepteur au TNF- α** (Wang *et al.* 2005). Une fois dans la cellule, le TNF- α provoque une **activation** de la **MLCK** mais également une **régulation positive** de la transcription de la MLCK (Wang *et al.*, 2005; He *et al.*, 2020). Un autre mécanisme majeur de régulation des jonctions serrées est la **phosphorylation post-traductionnelle**. Le statut de phosphorylation de l'occludine est étroitement régulé par plusieurs kinases (Rao 2009). A l'état basal, l'occludine est hautement phosphorylée au niveau des résidus sérine et thréonine (Farshori and Kachar, 1999) et interagit avec ZO-1 et d'autres protéines des jonctions serrées. En conditions pathologiques (inflammation, élévation des ROS), des altérations de ce schéma de phosphorylation peuvent modifier les interactions protéine-protéine de l'occludine avec les protéines de la famille ZO, et ainsi altérer l'intégrité de la barrière intestinale épithéliale.

Plusieurs études ont montré que l'**AMPK** (AMP-activated protein kinase), un régulateur majeur du statut énergétique cellulaire, était impliqué dans l'**assemblage des jonctions serrées** (Wang *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 2018). Son activation contribue au maintien de la **fonction de barrière de l'intestin** tandis que son inhibition entraîne une altération de cette fonction. L'AMPK peut être activée lorsque le rapport AMP/ATP augmente ou en réponse à l'augmentation du Ca²⁺ cellulaire mais également en réponse à des facteurs physiologiques, tels que les hormones, les cytokines et les nutriments (Kahn *et al.*, 2005). Son activité peut aussi être impactée par des conditions pathologiques telles que le vieillissement, le syndrome

Contexte bibliographique

métabolique, le cancer et l'inflammation chronique (Steinberg and Kemp 2009). Le rôle de l'AMPK dans l'assemblage des jonctions serrées résulterait d'une phosphorylation des protéines de jonctions serrées. L'AMPK peut également phosphoryler la cinguline, une protéine reliant les jonctions serrées au cytosquelette, ainsi que la girdine, protéine essentielle au maintien de l'intégrité de la jonction serrée (Yano *et al.*, 2013; Aznar *et al.*, 2016).

5.2.3. *Augmentation de la perméabilité intestinale*

Les causes d'une augmentation de perméabilité ne sont pas encore complètement comprises mais de nombreuses études se sont intéressées à ce sujet ces dernières années. Les **composés lumineux** issus de l'alimentation et de l'environnement entrent en contact étroit avec l'épithélium intestinal, et forment donc les principaux stimuli susceptibles de perturber la barrière. Des études récentes ont montré que les graisses alimentaires modulent directement l'intégrité des JS, induisant une altération de la barrière intestinale (Rohr *et al.*, 2020). Par exemple, un régime riche en lipides réduit l'expression des protéines de JS à long terme, et cela est corrélé à une hyperperméabilité intestinale chez la souris (Kirpich *et al.*, 2012). Des résultats similaires ont été retrouvés chez le rat : un **régime riche en lipides** était associé à une **augmentation de la perméabilité intestinale** et une réduction de l'expression de la claudine-1, la claudine-3, l'occludine et JAM-1 au niveau de l'intestin grêle (Suzuki and Hara 2010). En constatant que les rats nourris avec le régime riche en lipides présentaient une concentration sanguine en acides biliaires plus importante que les rats contrôles, les auteurs de cette étude ont émis l'hypothèse que les acides biliaires pourraient être des médiateurs de l'effet du régime riche en lipides sur la perméabilité intestinale. Ils ont donc exploré, *in vitro*, l'effet d'une exposition à de la bile de rats ou à une émulsion de graisses sur des cellules intestinales Caco-2 et ont constaté que ces deux traitements augmentaient la perméabilité épithéliale et réduisaient l'expression de certaines protéines de JS (Suzuki and Hara 2010). D'autres études ont montré que les **acides biliaires**, dont la production est fortement augmentée par un régime riche en graisses, entraînait une augmentation de la perméabilité intestinale (Araki *et al.*, 2005; Murakami *et al.*, 2016).

Une altération de la barrière intestinale est observée dans les maladies intestinales et systémiques et les maladies auto-immunes (Ma 1997). Cependant, on ne sait pas si la perte

Contexte bibliographique

de l'intégrité de la barrière est la cause ou la conséquence de ces maladies. La perte de l'intégrité de la barrière intestinale a aussi été associée à l'apparition de troubles métaboliques tels que l'obésité et le diabète de type II (Chelakkot *et al.*, 2018). Des études cliniques ont montré que la perméabilité intestinale augmentée chez les patients obèses revenait à la normale après une perte de poids (Damms-Machado *et al.*, 2017). L'endotoxémie métabolique, résultant de la perte d'intégrité de la barrière intestinale, serait un facteur majeur contribuant à la résistance à l'insuline et à l'obésité (Cani *et al.*, 2007, 2009). L'altération de la barrière épithéliale intestinale permet le passage de lipopolysaccharide (LPS) et d'autres toxines vers la circulation sanguine. Des souris nourries avec un régime riche en graisses pendant 4 semaines présentaient une augmentation de trois à quatre fois du LPS sérique, indiquant la présence d'une **endotoxémie métabolique** (Cani *et al.*, 2007). Cette maladie peut conduire à une inflammation systémique de bas grade et à une résistance à l'insuline, associée à l'apparition de maladies métaboliques. La réduction de l'endotoxémie métabolique par l'amélioration de la perméabilité de la barrière intestinale pourrait donc présenter une stratégie intéressante pour traiter les troubles métaboliques tels que l'obésité et le diabète.

En conclusion, le système immunitaire intestinal, le microbiote intestinal et l'épithélium intestinal interagissent pour assurer la fonction de barrière de l'intestin, essentielle dans la protection de l'organisme vis-à-vis des composés toxiques présents dans la lumière intestinale. Notamment, la perméabilité intestinale est étroitement associée à l'état de santé, et peut être augmentée par des composés présents dans la lumière intestinale tels que des lipides. De plus, nous allons voir dans le chapitre suivant que des signaux environnementaux extérieurs agissant sur le système nerveux, tels que le stress psychologique, peuvent également augmenter la perméabilité intestinale.

6. IMPACT DU STRESS PSYCHOLOGIQUE SUR LA SANTE

6.1. Stress psychologique et anxiété

Le stress est défini comme étant une réaction de l'organisme à une agression par un agent physique, psychique ou émotionnel entraînant un déséquilibre qui doit être compensé par un travail d'adaptation. Il s'agit, à la base, d'un moyen de mobiliser l'organisme face à des

Contexte bibliographique

agressions extérieures et de faciliter sa survie, mais lorsqu'il est important, le stress peut entraîner un sentiment de peur et d'**anxiété** (Fink 2016). L'**anxiété** est un **état mental de trouble et d'agitation** caractérisé par un **sentiment d'insécurité** indéfinissable, une **peur** sans objet. Le stress psychologique et l'anxiété sont des notions très proches, la principale différence entre ces deux termes réside dans le fait que le stress psychologique provient d'une cause extérieure alors que l'anxiété peut être présente même en absence de stimuli externe (<https://www.apa.org/topics/stress-anxiety-difference>). Ce sont en général des stress répétés qui vont conduire à l'anxiété (Revollo *et al.*, 2011; Magnavita and Fileni, 2014).

L'amélioration de l'état de santé mentale constitue un enjeu majeur en santé publique. Parmi les troubles mentaux affectant la population, les **troubles anxieux** sont les plus fréquents. Selon l'OMS, plus de 260 millions de personnes présenteraient des troubles de l'anxiété dans le monde. Une étude menée dans 6 pays européens a rapporté que 13,6% de la population d'étude avait été confrontée à des troubles anxieux au cours de leur vie (Alonso *et al.* 2004). En France, les troubles anxieux (anxiété généralisée, agoraphobie, phobie sociale, troubles panique et stress post-traumatique) concernaient 17 % des hommes et 25 % des femmes en 2007 (Cohidon, 2007). De plus, 10,7% des hommes et 14,5% des femmes présentaient une anxiété généralisée (Cohidon, 2007).

6.2. Conséquences physiologiques du stress

La réponse biologique au stress implique l'activation de trois grands systèmes interdépendants. Tout d'abord le stress est détecté par les **systèmes sensoriels** du cerveau. Le cerveau active ensuite le **système nerveux autonome** (SNA) qui, par le biais du système sympathico-surrénalien, déclenche une libération rapide de **catécholamines** dont les principales sont la **noradrénaline** et l'**adrénaline**. Les catécholamines augmentent le débit cardiaque et la pression sanguine, détournent le sang de la peau et de l'intestin vers les muscles squelettiques, et déclenchent la libération de glucose du foie dans le flux sanguin. Le cerveau active simultanément l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (*hypothalamic-pituitary-adrenal, HPA*) (Fink 2016).

L'**axe HPA** constitue le **principal axe neuroendocrinien chez les mammifères**, il contrôle les réponses au stress en **régulant** les taux circulants de **glucocorticoïdes**. En réponse à un stress, des peptides de la famille du **CRF** (corticotropin-releasing factor) sont libérées du noyau

Contexte bibliographique

paraventriculaire (PVN) de l'hypothalamus. Les principaux CRF sont la CRH (Corticotropin-releasing hormone), l'urocortine 1, l'urocortine 2 et l'urocortine 3. La **CRH** et les **urocortines** exercent leurs actions biologiques sur les cellules cibles via l'activation de 2 **récepteurs** : **CRF-1** et **CRF-2**. Bien qu'ils partagent 70% de similitude de leur séquence en acides aminés, le CRF-1 et le CRF-2 présentent des affinités différentes pour la CRH. La CRH a une affinité plus élevée (10 à 40 fois plus élevée) pour CRF 1 que pour CRF 2, alors que toutes les urocortines agissent préférentiellement par le CRF 2 (Gjerstad, Lightman, and Spiga 2018).

La libération du CRF stimule la libération de l'hormone **adrénocorticotrophique (ACTH)** par l'hypophyse antérieure. L'ACTH est à son tour sécrétée dans la circulation sanguine, ce qui entraîne la synthèse et la sécrétion **glucocorticoïdes** par le cortex surrénal (Dallman *et al.*, 1987). Une fois dans la circulation systémique, les glucocorticoïdes sont distribués dans tout l'organisme (Figure 24). Les glucocorticoïdes sont des hormones ayant un large éventail d'effets ; elles sont impliquées dans la régulation des processus métaboliques, du système immunitaire, de la reproduction, du comportement et des fonctions cognitives (Gjerstad *et al.*, 2018). Dans les conditions

basales, le schéma de libération des glucocorticoïdes est très dynamique, avec un rythme circadien caractérisé par des niveaux élevés de sécrétion avant la phase active (nuit chez le rat et jour chez l'homme) et des niveaux faibles pendant la phase inactive (Gjerstad, Lightman, and Spiga 2018; Watts, Tanimura, and Sanchez-Watts 2004). Les glucocorticoïdes exercent leurs effets par l'activation du **récepteur aux glucocorticoïdes (GR)** et du **récepteur des minéralocorticoïdes (MR)** (Gjerstad, Lightman, and Spiga 2018; Reul and de Kloet 1985). Après s'être liés aux glucocorticoïdes, le MR et le GR se délocalisent vers le noyau où ils régulent la transcription des gènes et la synthèse des protéines. Ces deux récepteurs sont exprimés dans des tissus différents, présentent des affinités différentes pour les glucocorticoïdes et exercent

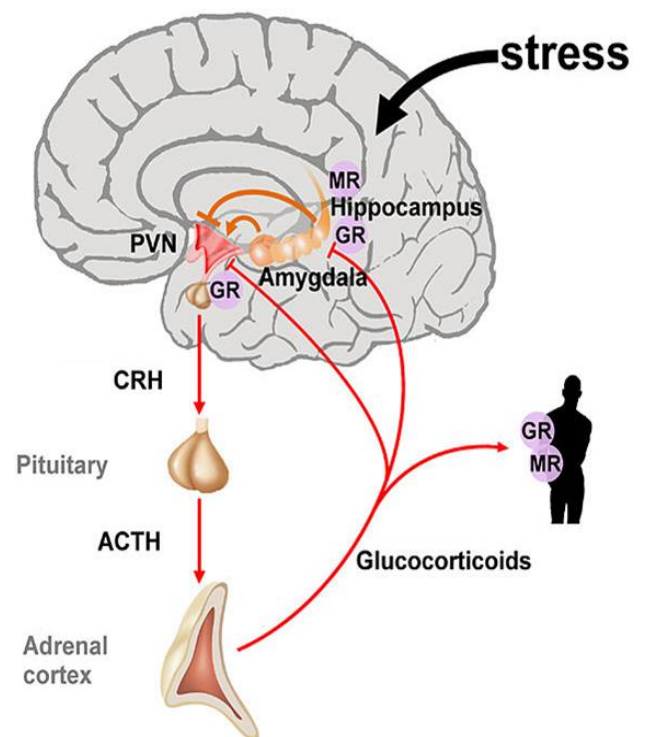


Figure 24: Activation de l'axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien en réponse à un stress

Contexte bibliographique

donc des fonctions physiologiques différentes (Gjerstad, Lightman, and Spiga 2018). Tandis que les MR sont déjà activés à de faibles concentrations de glucocorticoïdes, les GR ne sont activés que lorsque les niveaux de glucocorticoïdes sont élevés. L'expression du GR est omniprésente dans l'organisme et intervient dans la médiation des processus tels que la distribution de l'énergie (par exemple, la glycogénèse, le métabolisme des graisses et des protéines) et la fonction immunitaire. En plus de leurs effets sur le métabolisme et le système immunitaire, les glucocorticoïdes régulent également leur propre sécrétion par un mécanisme de rétrocontrôle négatif, nécessaire pour mettre fin à la réponse de l'axe HPA.

6.3. Impact sur la barrière intestinale

Les études portant sur les effets du stress psychologique sur la physiologie intestinale ont grandement contribué à la mise en évidence de l'existence d'un axe bidirectionnel entre l'intestin et le cerveau. Ces effets ont été surtout étudiés dans le cadre des troubles fonctionnels digestifs et en particulier dans le syndrome de l'intestin irritable (SII). Diverses études cliniques ont également suggéré un effet direct du stress sur l'inflammation intestinale et les ulcères gastro-duodénaux (Konturek *et al.*, 2011).

Il est désormais admis que le stress psychologique provoque une altération de la fonction de barrière intestinale. De nombreuses études se sont intéressées aux conséquences du stress psychologique sur la physiologie intestinale et il a été montré que le stress affecte l'absorption des nutriments, la perméabilité intestinale, la sécrétion de mucus et d'acides gastriques, la fonction des canaux ioniques et l'inflammation gastro-intestinale (Kelly *et al.*, 2015).

Les mécanismes impliqués dans l'effet du stress sur de la barrière intestinale n'ont pas encore été complètement compris mais le **CRF** et ses récepteurs **CRFR1** et **CRFR2** jouent un **rôle clé** dans l'augmentation de la perméabilité intestinale induit par le stress (Kelly *et al.*, 2015). Une étude a montré que des volontaires sains qui devaient faire une présentation orale devant un public, un facteur de stress psychosocial, avaient une perméabilité augmentée au niveau de l'intestin grêle (Vanuytsel *et al.*, 2014). Ils ont également montré que cet effet était médié par **l'activation de l'axe HPA**, reflétée par l'augmentation des niveaux de cortisol, et que cette réponse au stress dépendait de **l'activation des mastocytes**, car un prétraitement avec un stabilisateur de mastocytes bloquait l'augmentation de perméabilité induite par le stress. Enfin, l'administration de CRF exogène a reproduit l'augmentation de perméabilité induite par

Contexte bibliographique

le stress, là encore de manière dépendante des mastocytes. Une étude chez le rat a montré que des récepteurs aux CRF étaient présents sur les mastocytes intestinaux et que la liaison du CRF sur ces récepteurs provoquerait une **dégranulation** des mastocytes et la libération de **médiateurs** (histamine, protéases, TNF- α , etc.) entraînant des effets physiologiques importants dans les tissus locaux et systémiques tels qu'une augmentation de la perméabilité épithéliale intestinale, une activation neuronale et des changements circulatoires. Une étude a également été montrée que l'augmentation de perméabilité intestinale induite par le stress impliquait les lymphocytes CD4+ et l'IFN- γ , ainsi que l'activation de la MLCK, le mécanisme proposé par les auteurs est présenté dans la Figure 25 (Ait-Belgnaoui *et al.*, 2005). Bien que l'activation mastocytaire induite par le stress représente probablement un mécanisme de défense précoce pour mobiliser les ressources nécessaires face à ce stress, une activation mastocytaire excessive ou prolongée est nocive.

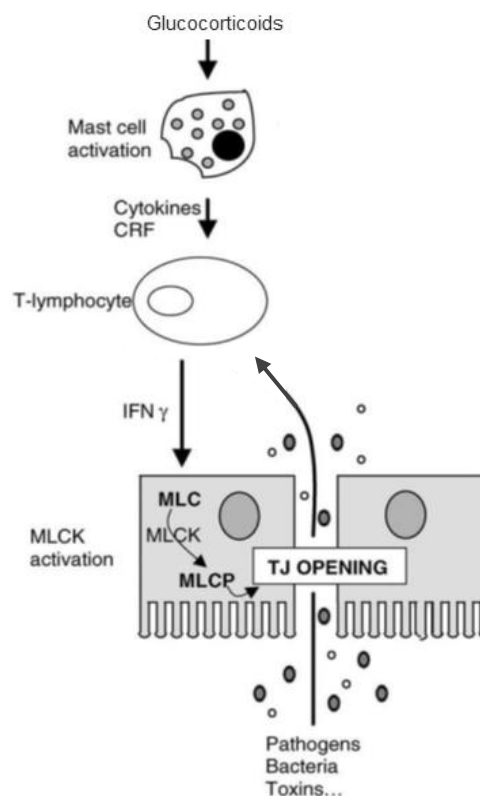


Figure 25 : Mécanisme proposé pour expliquer l'augmentation de perméabilité intestinale induite par le stress. Adapté de Ait-Belgnaoui *et al.* 2005

Le stress augmente également la réponse du système gastro-intestinal à **l'inflammation** (Collins, 2001) via une augmentation de la perméabilité intestinale et du recrutement des lymphocytes T. L'agrégation des lymphocytes conduit à la production de marqueurs inflammatoires, active des voies clés dans l'hypothalamus et entraîne une rétroaction négative due à la sécrétion de CRH, ce qui augmente la susceptibilité aux maladies inflammatoires gastro-intestinales.

Il a récemment été montré que le microbiote intestinal jouait également un rôle important dans la communication bidirectionnelle entre l'intestin et le cerveau, et notamment dans la relation entre stress et barrière intestinale. En effet, plusieurs études ont montré que le stress pouvait modifier la composition du microbiote intestinal (De Palma *et al.*, 2015; Huo *et al.*,

Contexte bibliographique

2017). Le microbiote intestinal est nécessaire au bon développement de l'axe hypothalamique hypophyso-surrénalien (HPA) et il y a une certaine période au début de la vie où la colonisation doit avoir lieu pour assurer le bon développement de cette voie de signalisation (Sudo *et al.*, 2004). Il a été montré que des altérations du microbiote en début de vie, et notamment au moment de la colonisation, pourraient prédisposer à troubles liés au stress à l'âge adulte (Borre *et al.* 2014) et qu'une exposition à une plus faible biodiversité microbienne pourrait contribuer à l'augmentation des troubles inflammatoires chroniques à l'âge adulte, notamment la dépression (Rook, Raison, and Lowry 2014). Il a également été montré qu'un prétraitement probiotique pouvait réduire l'augmentation de la perméabilité intestinale induite par le stress chronique, et cela était corrélé à une réduction de la dégradation des protéines de jonctions serrées dans la muqueuse colique chez les souris stressées (Ait-Belgnaoui *et al.* 2014). En particulier, *Lactobacillus farciminis* supprime l'augmentation de perméabilité, l'activation de l'axe HPA, l'endotoxémie et la neuroinflammation induites par le stress (Ait-Belgnaoui *et al.* 2012).

6.4. Stress psychologique et risque de cancer

De nombreuses études ont exploré les liens entre troubles psychologiques et risque de cancer mais les résultats sont hétérogènes. Concernant le risque de CCR associé au stress psychologique, une étude de cohorte japonaise a mis en évidence une association significative entre le stress perçu et le risque de cancer rectal (Kikuchi *et al.*, 2017) alors qu'une étude danoise a obtenu une association négative entre le stress perçu et le risque de CCR chez les femmes, et pas d'association significative chez les hommes (Nielsen *et al.* 2008). Une méta-analyse explorant les associations entre le stress au travail et le risque de cancer publiée en 2013 n'a pas conclu à une association significative avec le risque de CCR (Heikkilä *et al.*, 2013). Concernant les autres localisations de cancer, cette méta-analyse a conclu que le stress au travail n'était pas significativement associé aux risques de cancer du poumon, de la prostate ou du sein (Heikkilä *et al.*, 2013). A l'inverse, une récente méta-analyse regroupant 11 études a montré que les événements stressants augmentaient de 11% le risque de cancer du sein (RR=1,11 [1,03-1,19]) (Bahri *et al.*, 2019).

En plus de ses effets potentiels, directs ou indirects, sur l'incidence de cancer, le stress psychologique pourrait également être impliqué dans la récurrence du cancer. Une étude

Contexte bibliographique

récente a montré que le stress psychologique, en activant les polynucléaires neutrophiles, pouvait inverser la dormance des cellules tumorales (Perego *et al.*, 2020). Plus précisément, ce seraient les hormones du stress, telles que la norépinéphrine et le cortisol, qui provoqueraient une libération de protéines pro-inflammatoires par les neutrophiles, induisant l'activation de la myéloperoxydase et entraînant une accumulation de lipides oxydés dans les neutrophiles. Lorsque ces lipides oxydés sont libérés par les neutrophiles, ils activent la voie du facteur de croissance des fibroblastes (FGF) dans les cellules tumorales, provoquant la sortie des cellules tumorales de la dormance et la formation de nouvelles lésions tumorales. Le traitement des souris avec des β -bloquants pour inhiber la signalisation de l'hormone de stress a empêché la réactivation des cellules tumorales. Enfin, les auteurs ont trouvé une association entre les concentrations sériques de protéines associées au stress et une récurrence tumorale plus précoce après résection chirurgicale dans une cohorte de patients atteints d'un cancer du poumon.

6.5. Modèle de stress de séparation maternelle

D'après la théorie des origines développementales de la santé (DOHaD pour Developmental Origins of Health and Disease), la période intra-utérine et les premières années de vie sont des phases critiques du développement. L'exposition à un stress au cours de cette période augmente la susceptibilité d'apparition de nombreuses maladies chroniques à l'âge adulte (Charles, 2013). Le stress de début de vie fait référence à tous les événements stressants survenant durant l'enfance et l'adolescence, qui pourraient avoir une répercussion à l'âge adulte.

Le stress du début de la vie chez l'homme a été associé au développement de l'anxiété et de la dépression à l'âge adulte (Jurueña *et al.*, 2020). Cela s'explique par le fait que le stress du début de vie entraîne des modifications permanentes de l'axe HPA pouvant conduire au développement de l'anxiété chez l'adulte. La dysrégulation de l'axe HPA résulterait d'une réduction de la rétroaction inhibitrice, entraînant une augmentation de l'activité de l'axe HPA associée à une hypercortisolémie. Un déséquilibre entre les GR et les MR ou des changements dans la capacité des GC à circuler pour exercer une rétroaction négative sur la sécrétion des hormones HPA par liaison aux GR et à la RM pourraient expliquer ces défauts de rétrocontrôle négatif sur l'axe HPA.

Contexte bibliographique

Le stress de séparation maternelle est un modèle de stress psychologique de début de vie très utilisé chez le rongeur. Chez les rongeurs, après la naissance, il existe une période d'hypersensibilité au stress durant laquelle le maintien de niveaux faibles et stables de corticostérone est nécessaire à la croissance et au développement du SNC. La présence maternelle durant cette période est essentielle pour le bon développement du SNC. La séparation des petits rongeurs de leur mère au début de la période postnatale entraîne une augmentation durable des comportements liés à l'anxiété à l'âge adulte (Romeo *et al.*, 2003; O'Mahony *et al.*, 2011). Cependant, les mâles et les femelles ne répondent pas de la même manière au stress de séparation maternelle. Certaines études menées sur des souris C57Bl/6J ont montré que l'anxiété à l'âge adulte n'était augmentée que chez les mâles. Une revue de la littérature a rapporté les niveaux de preuves obtenus pour les résultats comportementaux et physiologiques rapportés après un stress de séparation maternelle (Tractenberg *et al.*, 2016) (Figure 26). On peut remarquer que, bien que plus d'études aient été menées chez les mâles, une augmentation de l'anxiété était rapportée dans la majorité des études, pour les deux sexes.

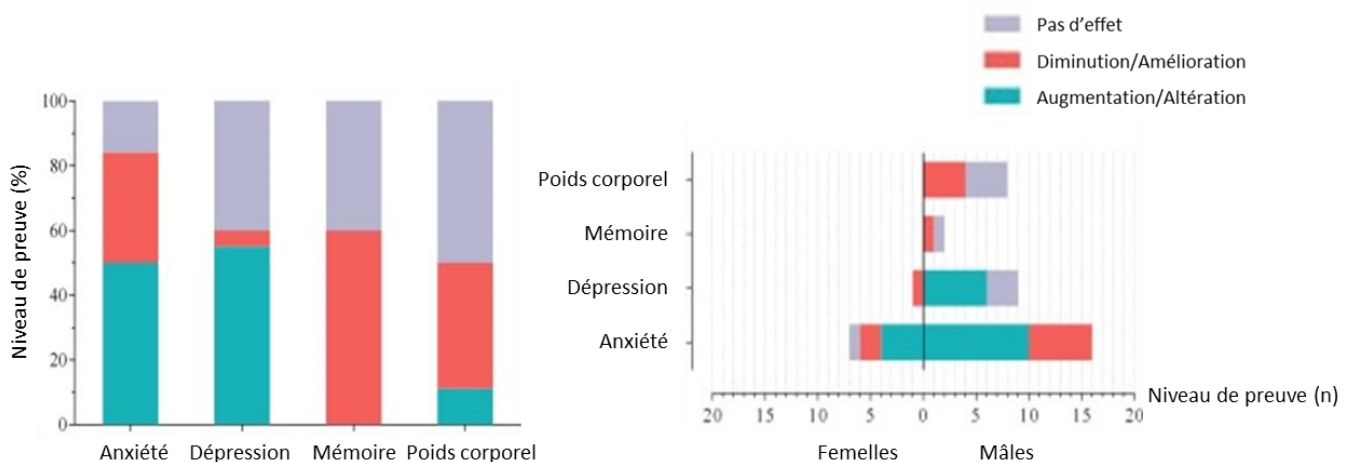


Figure 26 : Impact du stress de séparation maternelle sur l'anxiété, la dépression, la mémoire et le poids corporel chez la C57Bl/6 (Tractenberg *et al.* 2016)

Ces dernières années, le modèle de stress de séparation maternelle chez le rongeur a été très utilisé comme modèle d'étude des MICI en raison de son impact sur la barrière intestinale. En effet, la période néo-natale, en plus d'être une étape cruciale dans le développement du système nerveux, est également caractérisée par une barrière intestinale immature. Les événements stressants survenant pendant cette période provoquent des altérations de la barrière intestinale à l'âge adulte, et prédisposent ainsi aux MICI (Tractenberg *et al.*, 2016).

Contexte bibliographique

Le stress psychologique a des conséquences physiologiques importantes dans l'organisme, principalement médiées par l'activation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien, et l'intestin est une cible bien connue de cette activation. Le stress psychologique altère la fonction de barrière de l'intestin, et augmente ainsi l'exposition de l'organisme aux composés toxiques présents dans la lumière intestinale. Le stress psychologique a également été associé au risque de cancer, et notamment au risque de cancer colorectal, bien que les résultats soient très hétérogènes en fonction des études.

7. OBJECTIFS DE LA THESE ET STRATEGIE

7.1. Hypothèse

La consommation de viande rouge et de charcuterie est associée à une augmentation du risque de CCR. Les travaux de l'équipe PPCA ont permis de proposer que le fer héminique était un facteur central pour expliquer cette association. En effet, le fer héminique, en catalysant l'oxydation des lipides du régime, entraîne la formation d'alcénals cytotoxiques et génotoxiques dans la lumière intestinale, qui favoriserait ainsi la promotion du CCR. D'autre part, il a été montré que le stress psychologique entraînait une altération de la barrière de l'intestin. Les travaux de l'équipe NGN ont notamment permis de proposer que le stress provoque une augmentation de la perméabilité intestinale. La principale fonction de la barrière intestinale étant de protéger l'organisme des molécules toxiques présentes dans la lumière intestinale, nous avons émis **l'hypothèse que l'altération par le stress de cette fonction de barrière pourrait augmenter les effets délétères des alcénals hème-induits**. Autrement dit, notre postulat de départ est que **le stress pourrait augmenter le risque de cancer induit par le fer héminique** en raison de l'altération de la barrière intestinale qu'il provoque.

7.2. Objectifs et stratégie

Les recommandations nutritionnelles actuelles sont basées sur des analyses en profondeur de la littérature, mais elles ne concernent que les aliments ou groupes d'aliments indépendamment du contexte nutritionnel et environnemental.

Les travaux de l'équipe PPCA dans des modèles animaux de carcinogenèse colorectale, en explorant l'impact du contexte nutritionnel et donc de différents régimes alimentaires à base de viande rouge sur le risque de CCR, ont permis de montrer que le calcium et les antioxydants permettaient de réduire le risque de cancer hème-induit. L'effet cancérigène de l'hème est expliqué, au moins en partie, par sa capacité à peroxyder les lipides du régime. Le calcium, en chélatant l'hème, l'empêche de réagir avec les lipides dans la lumière intestinale, et limiterait donc son potentiel cancérigène. Les antioxydants empêchent les réactions de peroxydation des lipides luminale dans les modèles animaux et chez des volontaires sains et limitent également le potentiel cancérigène de l'hème et des produits carnés. Ces travaux permettent

Contexte bibliographique

de proposer qu'en fonction du régime alimentaire, la viande rouge et la charcuterie n'ont pas le même potentiel cancérigène. Il est donc important de considérer un aliment ou groupe d'aliment dans un contexte alimentaire et environnemental, et non individuellement. Cette complexification de la relation alimentation-cancer, qui consiste à replacer l'aliment dans un régime alimentaire et un contexte global, est nécessaire pour mieux comprendre les mécanismes par lesquels la viande rouge augmente le risque de CCR et surtout pour adapter au mieux les politiques de prévention en matière de santé publique.

Puisqu'il est établi que le stress psychologique peut provoquer des altérations importantes de la fonction de barrière intestinale et notamment une augmentation de la perméabilité intestinale, il nous a paru intéressant de vérifier si ces altérations de la barrière intestinale suffisaient à créer un environnement plus propice à la promotion du cancer colorectal hème-induit. **L'objectif général de cette thèse est donc d'étudier l'effet du stress psychologique sur l'association positive entre consommation de viande rouge et charcuterie et risque de cancer colorectal.**

Les **études épidémiologiques observationnelles** permettent de mettre en évidence des associations à l'échelle de la population mais elles ne permettent pas de conclure à un lien de causalité, alors que les **études expérimentales** menées *in vivo* sur les animaux ou *in vitro* permettent de mettre en évidence des mécanismes biologiques. C'est la **combinaison** de ces deux types d'études qui permet de **mettre en évidence les facteurs de risque du cancer**. Nous avons donc choisi de combiner ces différentes approches pour répondre à notre objectif général de thèse.

Plus précisément, la stratégie mise en place pour répondre à cet objectif général est composée de 3 sous-objectifs :

1. Explorer l'effet de l'anxiété sur l'association positive entre consommation de viande rouge et charcuterie et risque de cancer par l'anxiété dans la cohorte Nutrinet-Santé

Dans une cohorte de plus de 100 000 participants (Nutrinet-Santé), à l'aide de modèle de Cox multi-ajustés sur les facteurs de confusions, nous avons exploré (i) l'association entre la consommation de viande rouge et charcuterie et le risque de cancer, (ii) l'association entre l'apport en fer héminique (provenant de la viande rouge et de la charcuterie) et le risque de cancer, et (iii) la modification par l'anxiété de ces associations.

Contexte bibliographique

2. Explorer les conséquences physiopathologiques de la consommation de fer héminique *in vivo* chez des souris ayant subi un stress de séparation maternelle en début de vie

Nous avons soumis des souris C57Bl/6J à un stress de séparation maternelle en début de vie, et à l'âge adulte, ces souris ont été nourries avec un régime riche en fer héminique pendant 4 semaines. Nous avons ainsi comparé les effets délétères du fer héminique sur la muqueuse intestinale des souris ayant été stressées par rapport aux souris n'ayant pas été stressées.

3. Explorer l'effet des alcénals issus de la consommation de fer héminique *in vitro* sur un modèle de barrière épithéliale intestinale saine ou altérée

Nous avons créé un modèle *in vitro* de barrière intestinale altérée en reproduisant l'augmentation de perméabilité intestinale induite par le stress psychologique sur un modèle cellulaire d'épithélium intestinal. Nous avons ensuite comparé les effets cytotoxiques et génotoxiques des alcénals issus de la consommation de fer héminique, en situation de barrière épithéliale saine et altérée. Le but était de voir si l'augmentation de perméabilité augmente les effets cytotoxiques et génotoxiques des alcénals.

ÉTUDES REALISEES ET RESULTATS

1. ETUDE EPIDEMIOLOGIQUE

L'anxiété est un potentiel modificateur de l'association positive entre consommation de viande rouge et charcuterie et risque de cancer: résultats provenant de la cohorte Nutrinet-Santé

1.1. Introduction à l'article

1.1.1. Contexte

Cette étude a pour but de répondre au premier objectif de la thèse qui est d'explorer l'effet de l'anxiété sur l'association positive entre consommation de viande rouge et charcuterie et risque de cancer par l'anxiété dans la cohorte Nutrinet-Santé.

Il est désormais admis que le stress psychologique et l'anxiété ont des effets délétères sur la fonction de barrière de l'intestin (Vanuytsel *et al.*, 2014). L'effet cancérigène des produits carnés provient pour tout ou partie de leur contenu en fer héminique et de sa capacité à peroxyder les lipides du régime, générant des alcénals cytotoxiques et génotoxiques (Bastide *et al.*, 2015). L'anxiété ayant un effet délétère sur la fonction de barrière de l'intestin, nous avons fait l'hypothèse que, dans la lumière intestinale, le fer héminique provenant de la consommation de viande rouge, ainsi que les alcénals résultant de cette consommation, pourrait avoir plus facilement accès à la muqueuse colique chez les personnes anxieuses. Le risque de cancer lié à la consommation de viande rouge et charcuterie serait alors plus important chez les personnes anxieuses.

1.1.2. Objectifs

L'objectif de cette étude a été d'explorer, au sein de la cohorte Nutrinet-Santé :

1) **L'association** entre la **consommation de viande rouge et de charcuterie** et le **risque de cancer** (toutes localisations confondues, colorectal, sein, prostate) dans la population globale **et séparément chez les anxieux et les non-anxieux**

Études réalisées et résultats

2) **L'association** entre **l'apport en fer héminique** provenant de la consommation de viande rouge et de charcuterie et le **risque de cancer** (toutes localisations confondues, colorectal, sein, prostate) dans la population globale et **séparément chez les anxieux et les non-anxieux**.

1.1.3. Méthode

▪ **La cohorte Nutrinet-Santé**

L'étude NutriNet-Santé est une cohorte en ligne lancée en 2009 en France avec pour objectif d'étudier les associations entre nutrition et santé. Les participants âgés de plus de 18 ans ayant accès à Internet sont recrutés en continu depuis mai 2009 dans la population générale, et répondent à des questionnaires en ligne sur un site web dédié (www.etude-nutrinet-sante.fr).

▪ **Collecte des données**

Consommation de viande rouge et charcuterie ; apport en fer héminique

L'alimentation des participants a été estimée par des rappels de 24 heures, et les apports en énergie, alcool et nutriments ont été estimés à l'aide d'un tableau de composition alimentaire. Cela nous a permis d'estimer la consommation quotidienne moyenne de viande rouge et charcuterie des participants, ainsi que l'apport en fer héminique provenant de ces viandes.

Comparé aux autres charcuteries, le jambon contient moins de lipides (7,3 g/100 g contre 26,1 g/100 g dans les autres charcuteries en moyenne) et de fer héminique (0,9 mg/100 g contre 2,8 mg/100 g). Comme notre hypothèse était que le fer héminique, via la catalyse de la peroxydation lipidique, pourrait être responsable de la cancérogénicité de la viande rouge et de la charcuterie, nous avons choisi de mener l'analyse principale en excluant le jambon des charcuteries. Une analyse de sensibilité a été effectuée en incluant le jambon dans les charcuteries. Ainsi, dans cet article, le terme "charcuteries" désigne toutes les charcuteries excepté le jambon.

Anxiété

L'évaluation de l'anxiété était basée sur le traitement pour l'anxiété ; les participants anxieux ont été sélectionnés en trois étapes :

- À leur entrée dans l'étude, les participants ont rempli un questionnaire de base dans lequel ils devaient dire s'ils avaient déjà été traités pour de l'anxiété ou pour des troubles anxieux

Études réalisées et résultats

avant de participer à l'étude, mais il ne leur était pas demandé de préciser le traitement. Les participants qui ont répondu avoir été traités pour de l'anxiété ou des troubles d'anxiété avant l'entrée dans l'étude étaient considérés comme anxieux.

- Tous les six mois, les participants devaient indiquer s'ils avaient été traités pour des troubles d'anxiété ou d'angoisse depuis le dernier questionnaire qu'ils avaient rempli, et là encore, il n'était pas demandé de préciser le traitement. Les participants qui ont déclaré au moins une fois avoir été traités pour de l'anxiété ou pour des troubles anxieux au cours des deux premières années de suivi (et avant un diagnostic de cancer) ont été considérés comme anxieux.

- Dans un autre questionnaire annuel, les participants devaient déclarer tous les médicaments qu'ils avaient pris depuis le dernier questionnaire qu'ils avaient rempli. Les participants qui déclaraient avoir pris un traitement contre l'anxiété (anxiolytiques ou automédication à base de plantes) au cours des deux premières années de suivi (et avant un diagnostic de cancer) étaient considérés comme anxieux.

Co-variables

Lors de l'inscription, les participants ont rempli une série de cinq questionnaires portant sur les **caractéristiques sociodémographiques** et le **mode de vie** (sexe, date de naissance, niveau d'éducation, statut tabagique, nombre d'enfants etc.), les **données anthropométriques** (taille, poids), les **apports alimentaires**, **l'activité physique** (questionnaire IPAQ) et **l'état de santé** (antécédents personnels et familiaux de cancers, le statut ménopausique, prise de médicaments etc.).

Cas incidents de cancers

Les participants ont rempli à l'inclusion, puis tous les six mois, des questionnaires sur leur état de santé dans lequel ils devaient notamment indiquer les cas incidents de cancer. Dans cette étude, tous les premiers cancers diagnostiqués entre l'inclusion et le 9 septembre 2019 ont été considérés comme des cas.

▪ **Analyses statistiques**

Les caractéristiques des participants (données de consommation alimentaire, apport en nutriments, données sociodémographiques et anthropométriques) à l'inclusion ont été

Études réalisées et résultats

rapportées chez les non-anxieux et chez les anxieux. Une étude prospective de l'association entre consommation de viande rouge et charcuterie, ou apport en fer héminique provenant de ces viandes, et le risque de cancer a ensuite été effectuée. Pour cela, la consommation de viande rouge et de charcuterie ainsi que l'apport en fer héminique provenant de ces viandes ont été moyennés sur les deux premières années de suivi, chez les participants ayant au moins deux rappels de 24h validés sur cette période. Des modèles de Cox multi-ajustés sur les facteurs de confusion potentiels ont ensuite été effectués pour étudier les associations entre consommation de viande rouge et charcuterie et risque de cancer, en fonction du statut d'anxiété. Plus précisément, ces modèles de Cox multi-ajustés nous ont permis d'obtenir des hazard ratios (HR) avec des intervalles de confiance (IC) à 95%. Les participants qui ont déclaré avoir été traités pour des troubles d'anxiété ou d'angoisse ou ceux qui ont déclaré avoir pris des anxiolytiques pour la première fois seulement après avoir reçu un diagnostic de cancer ont été considérés comme non anxieux.

Des études de sensibilité consistant à tester d'autres ajustements (dont le nombre de paquets-années de cigarettes), l'exclusion des fumeurs et anciens fumeurs et l'exclusion des cas survenus au cours des deux premières années de suivi, ont été effectuées pour évaluer la solidité des résultats.



Anxiety is a potential effect modifier of the association between red and processed meat consumption and cancer risk: findings from the NutriNet-Santé cohort

Marie Beslay¹ · Bernard Srour² · Mélanie Deschasaux² · Edwin Fouché¹ · Nathalie Naud¹ · Valerie Bacqué¹ · Françoise Guéraud¹ · Valentina A. Andreeva² · Sandrine Péneau² · Eloi Chazelas² · Charlotte Debras² · Serge Hercberg^{2,3} · Paule Latino-Martel² · Vassilia Theodorou¹ · Fabrice Pierre¹ · Mathilde Touvier²

Received: 3 June 2020 / Accepted: 28 August 2020
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

Abstract

Purpose Red and processed meats are recognized by the International Agency for Research on Cancer as probably carcinogenic and carcinogenic to humans, respectively. Heme iron has been proposed as a central factor responsible for this effect. Furthermore, anxiety affects the intestinal barrier function by increasing intestinal permeability. The objective of this work was to assess how anxiety modifies the association between red and processed meat consumption and cancer risk in the NutriNet-Santé prospective cohort (2009–2019).

Methods Using multi-adjusted Cox models in a sample of 101,269 subjects, we studied the associations between the consumption of red and processed meat, the amount of heme iron coming from these meats and overall, colorectal, prostate, and breast cancer risks, overall and separately among participants with and without anxiety.

Results An increase in red and processed meat consumption was associated with an increased risk of developing colorectal cancer in the total population (HR for an increase of 50 g/day = 1.18 (1.01–1.37), $p=0.03$). After stratification on anxiety, the HR 50 g/day was 1.42 (1.03–1.94, $p=0.03$) in anxious participants and 1.12 (0.94–1.33, $p=0.20$) in other participants. Similar trends were observed for overall cancer risk. Analyses conducted with heme iron also provided similar results.

Conclusions Our results strengthen the existing body of evidence supporting that red and processed meat consumption and heme iron intake are associated with an increased risk of overall and more specifically colorectal cancer, and suggest that anxiety modifies these associations, with an increased risk in anxious participants.

Keywords Colorectal cancer · Anxiety · Red and processed meat · Heme iron · Intestinal barrier · Prospective cohort study

Fabrice Pierre and Mathilde Touvier contributed equally to this work.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00394-020-02381-3>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Bernard Srour
b.srou@eren.smbh.univ-paris13.fr

¹ Toxalim (Research Centre in Food Toxicology), Université de Toulouse, INRAE, ENVT, INP-Purpan, UPS, Toulouse, France

² Inserm U1153, Inrae U1125, Cnam, Nutritional Epidemiology Research Team (EREN), Epidemiology and Statistics Research Center—University of Paris (CRESS), Sorbonne Paris Nord University, UFR SMBH - 74, rue Marcel Cachin 93017, Bobigny, France

Introduction

Many epidemiological studies have shown that higher consumption levels of red and processed meats are associated with an increased risk of colorectal cancer compared to

³ Public Health Department, Avicenne Hospital, AP-HP, Bobigny, France

lower consumption levels [RR = 1.12 (1.04–1.21) per 100 g/day according to the WCRF] [1–4]. Supporting the results of observational studies, our previous works showed that red and processed meats promote precancerous lesions in the colon of rats and adenoma in the colon of mice [5]. In 2015, the International Agency for Research on Cancer classified processed meat as “carcinogenic” and red meat as “probably carcinogenic” for humans [6]. In addition, a positive association between consumption of red and processed meat and other types of frequent cancers such as breast and prostate neoplasms has been suggested in recent prospective epidemiological studies [7–9].

Experimental studies have shown that three types of compounds could be responsible for the carcinogenic effect of red and processed meat: heterocyclic amines, *N*-nitroso compounds, and heme iron [10]. Bastide et al. identified heme iron as the major actor in meat-induced promotion of colorectal cancer in rats, without additive or synergistic effects of heterocyclic amines and endogenous *N*-nitroso compounds [11]. A positive association between heme iron intake and risk of colorectal cancer has since been established in several epidemiological studies [12–14]. The carcinogenic effect of heme iron has been linked to its ability to catalyze lipid peroxidation of dietary components, generating cytotoxic and genotoxic aldehydes in the intestinal lumen [11]. Still, other mechanisms are proposed to explain the carcinogenicity of heme iron, such as microbial dysbiosis and immune system dysregulation [15, 16].

Anxiety and stress disorders constitute the largest group of mental disorders in most Western societies and are a leading cause of disability [17]. Psychological stress and anxiety impair the intestinal barrier function, essential to prevent the entry of harmful substances from the intestinal lumen, as reflected by an increase in intestinal permeability [18], increased inflammation, gut microbiota changes [19] and mucus network alteration [20].

In our study, we hypothesize that anxiety, because of its impact on the intestinal barrier, would be an effect modifier of the association between red and processed meat consumption and the risk of cancer, in particular of colorectal cancer. An identification of such finding could potentially contribute to a better understanding of the underlying biological mechanisms and to a better identification of population at risk.

In this study, we aimed (i) to explore the association between red and processed meat consumption and cancer risk in the French NutriNet-Santé cohort, (ii) to explore the association between heme iron intake from red and processed meat and cancer risk, and (iii) to investigate whether anxiety modifies these associations.

Methods

Study population

The NutriNet-Santé study is an ongoing web-based cohort launched in 2009 in France with the objective to study the associations between nutrition and health. This cohort has been previously described [21]. Participants aged over 18 years with access to the Internet are continuously recruited since May 2009 among the general population by means of vast multimedia campaigns. All questionnaires are completed online using a dedicated website (www.etude-nutrinet-sante.fr).

Data collection

Dietary data

Dietary intakes have been assessed at inclusion and every 6 months through a series of three non-consecutive web-based 24 h-dietary records tested and validated against an interview by a trained dietitian and against blood and urinary biomarkers [22–24], randomly assigned over a 2-week period (2 weekdays and 1 weekend day). Participants used a dedicated interface of the study website to declare all foods and beverages consumed during a 24 h-period including their three main meals (breakfast, lunch, dinner) and any other eating occasion. Portion sizes were estimated using validated photographs. Mean daily energy, alcohol and nutrient intakes were estimated using a published French food composition table (> 3,500 items) [25]. Consumed amounts from composite dishes were estimated using French recipes validated by food and nutrition professionals. Dietary underreporting was identified on the basis of the method proposed by Black [26]. Red meat intake was defined as fresh, minced and frozen beef, veal, pork, and lamb. Processed meat intake was defined as mostly pork and beef preserved by methods other than freezing, such as salting, smoking, marinating, air-drying or heating and included bacon, sausages, blood sausages, liver pâté, salami, mortadella, tinned meat. Compared to other processed meats, ham contains less lipids (7.3 g/100 g vs 26.1 g/100 g in other processed meats on average) and heme iron (0.9 mg/100 g vs 2.8 mg/100 g). Since our hypothesis was that heme iron, via catalysis of lipid peroxidation, may be responsible for the carcinogenic effect of meat, we chose to conduct the main analysis without ham in the class of processed meats, with ham included in processed meat in sensitivity analysis. Thus, in this article, the term “processed meat” refers to all processed meats except ham.

Anxiety assessment

At baseline and each year thereafter, participants were asked if they were treated for anxiety or anxiety disorders. Besides, information on all medication used, including anxiety treatments such as anxiolytic (ATC code N05B) or plant-based self-medication, was collected annually after inclusion in the study, with a linkage with the Vidal® drug database gathering virtually all medications available in the French market. In addition, our research team was the first in France to obtain the authorization by Decree in the French Council of State (n°2013-175) to link data from our cohorts to medico-administrative databases of the National health insurance (SNIIRAM database) for participants who have given their consent. These databases provided additional information on dispense, frequency and amount of medication intake. Among anxiolytics, the use of benzodiazepine, which is a class of psychoactive drugs only delivered on medical prescription, was assessed to verify that the increased risk observed in anxious people is not due to benzodiazepine intake as suspected in the study of Iqbal et al. [27]. For this study, we defined anxious participants as people who have been treated for anxiety or anxiety disorders before entering the study or during their first two years of follow-up. Participants who reported being treated for anxiety or anxiety disorders or those who reported taking anxiolytics for the first time only after being diagnosed with cancer were considered non-anxious (detailed in Online supplementary).

Covariates

At inclusion, participants filled a set of five questionnaires related to socio-demographic and lifestyle characteristics (*e.g.*, sex, date of birth, educational level (5.0% missing data)), smoking status, number of children, age of first birth), anthropometrics [28, 29] (*e.g.*, height and weight (0.6% missing data)), dietary intakes (see above), physical activity (validated IPAQ questionnaire, 13.9% missing data) [30] and health status (*e.g.*, personal and family history of diseases, age at menarche, menopausal status, and medication use).

Case ascertainment

Participants' health status was described at enrollment and reassessed every six months by a check-up questionnaire. At any time during follow-up, participants could also declare a health event, a new treatment, or a medical exam via a dedicated and secured online platform. Every reported cancer case was validated by an expert medical committee, based on medical and anatomopathological reports collected from the participants, their physicians and/or hospitals. Cases were classified using the International Classification of Diseases,

10th revision (ICD-10) [31]. The NutriNet-Santé study had also access to databases from the National Health Data System (SNDS). Linkage of the cohort to the national medical databases of the health insurance (SNIIRAM) and to the French cause-specific mortality registry (CépiDC) enabled to complete death and health data, and limited potential bias due to unreported cancer cases. In this study, all first primary cancers diagnosed between the inclusion and September 9th 2019 were considered as cases, except for basal cell carcinoma which were not considered as cancer.

Statistical analyses

The flowchart for participants' selection is presented in Online Supplementary Fig. S1. Estimated red meat, processed meat, and other dietary intakes were based on the average intake for each subject across all 24-h dietary records available in their first two years of follow-up. Baseline characteristics of participants were compared between non-anxious and anxious participants using χ^2 tests or Student's *t*-tests wherever appropriate. We estimated hazard ratios (HR) and 95% confidence intervals (CI) using Cox proportional hazards models, with age as the primary time variable, to characterize the associations between the consumption of red and processed meat, heme iron (from red and processed meat), and overall, colorectal, breast and prostate cancer risks. A competing risks approach was used, and the HRs reported are cause-specific Hazard ratios. We confirmed that the assumptions of proportionality were satisfied through an examination of the Schoenfeld residuals (Online Supplementary Fig. S2) and the assumption of linearity between red and processed meat consumption and overall and colorectal cancer risks was added in the online supplementary material (Supplementary Fig. S3). Participants contributed person-time until the date of cancer diagnosis, the date of last completed questionnaire, the date of death, or September 09, 2019, whichever occurred first. Models were adjusted for age (time-scale), sex, body mass index (BMI), height, physical activity, family history of cancer, smoking status, educational level, number of 24 h dietary records, fruits intake, vegetables intake, saturated fatty acid, dairy products intake, wholegrain products intake, alcohol intake and energy intake. For breast cancer analyses, additional adjustments were performed for the number of biological children, menopausal status at baseline, hormonal treatment for menopause at baseline, oral contraception use at baseline, age at menarche, and age at the first child. Coding for these covariates is indicated in footnotes to Table 2.

To assess the effect modification role of anxiety on the associations between red and processed meat intake and cancer risk, these associations were tested in two strata of the population based on anxiety. An interaction term (product) between red and processed meat intake and anxiety

was added in the model, and the p -value of this estimate (p -interaction) was reported.

The associations between benzodiazepine intake and cancer risk were also tested.

A series of sensitivity analyses were performed to assess the robustness of the findings by testing further adjustments (among which the number of pack-years of cigarettes), exclusion of current and former smokers and exclusion of cases that occurred during the first two years of follow-up (detailed in Online Supplementary Materials and Methods). Breast cancer analyses were also tested in pre- and postmenopause separately. Women contributed person time to the “premenopausal breast cancer model” until their age at menopause and to the “postmenopausal breast cancer model” from their age at menopause.

All tests were two-sided, and $p < 0.05$ was considered statistically significant. SAS version 9.4 (SAS Institute) was used for the analyses.

Results

A total of 101,269 subjects were included in the analyses. Mean number of 24 h dietary records per subject over their first two years of follow-up was 5.68 ± 3.07 . 19,228 participants were qualified as anxious. Among these participants, 11,702 reported being treated for anxiety or anxiety disorders prior to inclusion in the study, 7,624 reported being treated for anxiety or anxiety disorders in their first 2 years of follow-up, 7,037 took anxiolytics during their first two years of follow-up and 940 took plant-based self-medication during their first two years of follow-up.

Characteristics of participants according to anxiety status are described in Table 1. Mean daily red meat intake was 42 ± 39 g/day. Mean daily processed meat intake was 20 ± 24 g/day. The proportion of women and non-smokers was higher in non-anxious people than in anxious people. No major differences in food consumption were observed between anxious and non-anxious participants, and the consumption of red and processed meat was different between groups, but the amounts were not clinically relevant. Characteristics of participants according to sex-specific quartiles of red and processed meat consumption are described in online supplementary Table S1.

During follow-up (median: 5.5 years; 554,364 person-years), 3,126 incident cancer cases were diagnosed, among which 250 colorectal cancers, 910 breast cancers and 369 prostate cancers. Mean age at diagnosis was 59.4 year \pm 12.1 and mean baseline-to-diagnosis time was 4.2 year \pm 2.6. The abandon rate in the NutriNet-Santé cohort was 6.7%.

The assumptions of proportionality were satisfied through an examination of the Schoenfeld residuals for overall and colorectal cancer risks (respective p values for Schoenfeld

Individual Test 0.6, and 0.99) (Online Supplementary Fig. S2) and the linearity assumptions between consumption of red and processed meat and overall and colorectal cancer risks were confirmed by the restricted cubic spline (respective p values for non-linear associations 0.7, and 0.8) (Online Supplementary Fig. S3).

Associations between red and processed meat consumption and overall, colorectal, breast, and prostate cancer risk are presented in Table 2. Red and processed meat consumption were associated with increased overall cancer risk [HR for an increase of 50 g/day of red and processed meat was 1.06 (1.02–1.11), $p = 0.01$] and colorectal cancer risk [HR_{50 g/day} = 1.18 (1.01–1.37), $p = 0.03$]. For breast cancer, HR for an increase of 50 g/day of red and processed meat was 1.09 (0.99–1.19), $p = 0.07$. No association was detected for prostate cancer [HR_{50 g/day} = 1.03 (0.91–1.17), $p = 0.68$]. After stratification on anxiety, red and processed meat intake was associated with increased overall cancer risk [HR_{50 g/day} = 1.13 (1.02–1.25), $p = 0.02$] and colorectal cancer risk [HR_{50 g/day} = 1.42 (1.03–1.94), $p = 0.03$] in participants considered anxious, while these associations were not significant in non-anxious participants [HR_{50 g/day} = 1.05 (1.00–1.10), $p = 0.08$ for overall cancer risk and HR_{50 g/day} = 1.12 (0.94–1.33), $p = 0.2$ for colorectal cancer risk]. Results for breast and prostate cancer risks were not significant in both strata.

Associations between heme iron intake from red and processed meat and overall, colorectal, breast and prostate cancer risks are presented in Table 3. Heme iron intake was associated with increased overall cancer risk [HR_{1 mg/day} = 1.10 (1.04–1.16), $p = 0.001$], colorectal cancer risk [HR_{1 mg/day} = 1.24 (1.04–1.49), $p = 0.02$] and breast cancer risk [HR_{1 mg/day} = 1.16 (1.05–1.29), $p = 0.01$]. No association was detected for prostate cancer risk [HR_{1 mg/day} = 0.97 (0.82–1.15), $p = 0.72$]. After stratification on anxiety, in non-anxious participants, heme iron intake was positively associated with overall cancer risk [HR_{1 mg/day} = 1.07 (1.01–1.14), $p = 0.034$] and breast cancer risk [HR_{1 mg/day} = 1.18 (1.04–1.33), $p = 0.01$] but not with colorectal cancer risk [HR_{1 mg/day} = 1.17 (0.95–1.44), $p = 0.15$]. In anxious participants heme iron intake was associated with increased overall cancer risk [HR_{1 mg/day} = 1.20 (1.07–1.35), $p = 0.002$] and colorectal cancer risk [HR_{1 mg/day} = 1.55 (1.07–2.24), $p = 0.02$] but not with breast cancer risk [HR_{1 mg/day} = 1.11 (0.89–1.39), $p = 0.36$]. Results for prostate cancer risks were not significant in both strata.

No significant associations were observed between the use of benzodiazepines and cancer risk (Online Supplementary Table S2). Overall, sensitivity analyses (e.g. testing further adjustment, the influence of menopausal status on breast cancer results, exclusion of cases that occurred during the first two years of follow-up, multiple imputations) provided similar results and are detailed in Online

Table 1 Baseline characteristics of study population according to anxiety ($n = 101,269$), NutriNet-Santé cohort, France, 2009–19

	All participants ($n = 101,269$)	Non-anxious participants ($n = 82,041$)	Anxious participants ($n = 19,228$)	p value ^a
Age, years	51.2 (14.5)	51.1 (14.6)	51.6 (13.9)	<.0001
Sex, n (%)				
Female	79,734 (79)	63,174 (77)	16,560 (86)	<.0001
Male	21,535 (21)	18,867 (23)	2,668 (14)	
Height, cm	166.7 (8)	167.0 (8)	165.5 (8)	<.0001
Body mass index	23.7 (5)	23.6 (4)	23.9 (5)	<.0001
Family history of cancer, n (%) ^b				
No	63,722 (63)	52,212 (64)	11,510 (60)	<.0001
Yes	37,547 (37)	29,829 (36)	7,718 (40)	
Higher education, n (%)				
No	17,279 (17)	13,593 (17)	3,686 (19)	<.0001
Yes, < 2 years	17,312 (17)	13,830 (17)	3,482 (18)	
Yes, \geq 2 years	66,678 (66)	54,618 (67)	12,060 (63)	
Smoking status, n (%)				
Current	17,513 (17)	13,574 (17)	3,939 (21)	<.0001
Former	32,813 (32)	26,292 (32)	6,521 (34)	
Never	50,943 (50)	42,175 (51)	8,768 (46)	
IPAQ physical activity level, n (%) ^c				
High	28,151 (28)	23,226 (28)	4,925 (26)	<.0001
Moderate	37,580 (37)	30,520 (37)	7,060 (37)	
Low	21,420 (21)	17,020 (21)	4,400 (23)	
Missing	14,118 (14)	11,275 (14)	2,843 (15)	
Energy intake without alcohol, kcal/day	1,851 (452)	1,856 (454)	1,827 (446)	<.0001
Red meat consumption, g/day	42 (39)	42 (39)	40 (38)	<.0001
Processed meat consumption, g/day	20 (24)	20 (24)	19 (23)	<.0001
Ham consumption, g/day	12 (17)	12 (17)	13 (17)	<.0001
Alcohol intake, g/day	8 (12)	8 (12)	7 (12)	<.0001
Vegetable consumption, g/day	217 (117)	217 (117)	215 (120)	0.011
Fruit consumption, g/day	189 (149)	190 (150)	187 (146)	0.0047
Dairy products consumption, g/day	235 (156)	235 (156)	233 (156)	0.176
Heme iron intake, mg/day	1.2 (1.2)	1.2 (1.2)	1.2 (1.2)	0.0002
Saturated fatty acids intake, mg/day	33 (12)	33 (12)	33 (12)	<.0001
Calcium intake, mg/day	922 (299)	923 (298)	918 (300)	0.0288
Fibres intake, mg/day	19 (7)	19 (7)	19 (7)	0.0037

Values are means (SDs) or n (%)

IPAQ International Physical Activity Questionnaire

^a p value for comparison between non-anxious and anxious participants, by Fisher test or χ^2 test where appropriate

^bAmong first-degree relatives

^cAvailable for 87,151 participants; participants were categorized into “high,” “moderate,” and “low” categories according to IPAQ guidelines

supplementary Table S3–S8. Analyses conducted only on never smokers or with ham included in processed meat were consistent although less clear than the main analysis, especially in stratified models (see Online Supplementary Tables S9–S11).

Discussion

In this large prospective cohort, we observed that red and processed meat consumption as well as heme iron intake

Table 2 Associations between the consumption of red and processed meat and the risk of overall, colorectal, breast and prostate cancer in the whole population and in non-anxious and anxious participants from multivariable Cox proportional hazard models^a, NutriNet-Santé cohort, France, 2009–2019 (*n* = 101,269)

	Cases/non cases	HR _{50 g/day} (CI 95%)	<i>p</i>
All participants (<i>n</i> = 101,269)			
Cancer (all locations)	3,126/98,143	1.06 (1.02–1.11)	0.007
Colorectal cancer	250/101,019	1.18 (1.01–1.37)	0.034
Breast cancer ^b	910/78,824	1.09 (0.99–1.19)	0.072
Prostate cancer	369/21,166	1.03 (0.91–1.17)	0.680
Non-anxious participants (<i>n</i> = 82,041)			
Cancer (all locations)	2541/79,500	1.05 (1.00–1.10)	0.075
Colorectal cancer	206/81,835	1.12 (0.94–1.33)	0.201
Breast cancer ^b	710/62,464	1.10 (1.00–1.22)	0.059
Prostate cancer	332/18,535	1.02 (0.89–1.17)	0.786
Anxious participants (<i>n</i> = 19,228)			
Cancer (all locations)	585/18,643	1.13 (1.02–1.25)	0.016
Colorectal cancer	44/19,184	1.42 (1.03–1.94)	0.030
Breast cancer ^b	200/16,360	1.02 (0.84–1.23)	0.878
Prostate cancer	37/2,631	1.07 (0.73–1.58)	0.744

p for interaction between anxiety and consumption of red and processed meat is 0.26 for overall cancer, 0.035 for colorectal cancer, 0.38 for breast cancer and 0.77 for prostate cancer

^aCox proportional hazard models were adjusted for age (time-scale), sex, body mass index (continuous, kg/m²), height (continuous, cm), physical activity (categorical IPAQ variable: high, moderate, low, missing value), smoking status (categorical: never, former, current smokers), educational level (categorical: less than high school degree, less than two years after high school degree, two and more years after high school degree), number of 24-h dietary records (continuous), family history of cancer (categorical: yes, no), energy intake without alcohol (continuous variable: kcal/day), alcohol (continuous, g/day), fruits intake (g/day, continuous), vegetables intake (g/day, continuous), total saturated fatty acid intake (g/day, continuous), dairy products intake (g/day, continuous) and wholegrain products intake (g/day, continuous)

^bBreast cancer models were additionally adjusted for: age at menarche (categorical: <12 years old, >12 years old), age at first child (categorical: no child, before 30 years, 30 years and older), number of biological children (continuous), baseline menopausal status (categorical: menopausal, non-menopausal), oral contraceptive use at baseline (categorical: yes, no) and hormonal treatment for menopause at baseline (categorical: yes, no)

were positively associated with overall and colorectal cancer risks. Our results also suggest an effect modification of these associations by anxiety. Indeed, after stratification on anxiety, red and processed meat consumption were associated with increased overall and colorectal cancer risk in participants considered anxious, but not in their non-anxious counterparts. Red and processed meat consumption was not associated with risks of breast and prostate cancer,

Table 3 Associations between the intake of heme iron from red and processed meat and risk of overall, colorectal, breast and prostate cancer in the whole population and in non-anxious and anxious participants from multivariable Cox proportional hazard models^a, NutriNet-Santé cohort, France, 2009–2019 (*n* = 101,269)

	Cases/non cases	HR _{1mg/day} (CI 95%)	<i>p</i>
All participants (<i>n</i> = 101,269)			
Cancer (all locations)	3,126/98,143	1.10 (1.04–1.16)	0.001
Colorectal cancer	250/101,019	1.24 (1.04–1.49)	0.018
Breast cancer ^b	910/78,824	1.16 (1.05–1.29)	0.005
Prostate cancer	369/21,166	0.97 (0.82–1.15)	0.719
Non-anxious participants (<i>n</i> = 82,041)			
Cancer (all locations)	2541/79,500	1.07 (1.01–1.14)	0.034
Colorectal cancer	206/81,835	1.17 (0.95–1.44)	0.148
Breast cancer ^b	710/62,464	1.18 (1.04–1.33)	0.008
Prostate cancer	332/18,535	0.96 (0.80–1.14)	0.635
Anxious participants (<i>n</i> = 19,228)			
Cancer (all locations)	585/18,643	1.20 (1.07–1.35)	0.002
Colorectal cancer	44/19,184	1.55 (1.07–2.24)	0.019
Breast cancer ^b	200/16,360	1.11 (0.89–1.39)	0.361
Prostate cancer	37/2,631	1.04 (0.62–1.75)	0.874

p for interaction between anxiety and intake of heme iron from red and processed meat is 0.14 for overall cancer, 0.07 for colorectal cancer, 0.54 for breast cancer and 0.93 for prostate cancer

^aCox proportional hazard models were adjusted for age (time-scale), sex, body mass index (continuous, kg/m²), height (continuous, cm), physical activity (categorical IPAQ variable: high, moderate, low, missing value), smoking status (categorical: never, former, current smokers), educational level (categorical: less than high school degree, less than two years after high school degree, two and more years after high school degree), number of 24-h dietary records (continuous), family history of cancer (categorical: yes, no), energy intake without alcohol (continuous variable: kcal/day), alcohol (continuous, g/day), fruits intake (g/day, continuous), vegetables intake (g/day, continuous), total saturated fatty acid intake (g/day, continuous), dairy products intake (g/day, continuous) and wholegrain products intake (g/day, continuous)

^bBreast cancer models were additionally adjusted for: age at menarche (categorical: <12 years old, >12 years old), age at first child (categorical: no child, before 30 years, 30 years and older), number of biological children (continuous), baseline menopausal status (categorical: menopausal, non-menopausal), oral contraceptive use at baseline (categorical: yes, no) and hormonal treatment for menopause at baseline (categorical: yes, no)

and heme iron intake was associated with an increased risk of breast cancer but not with prostate cancer risk.

The positive association between red and processed meat consumption and colorectal cancer risk observed in our study population is consistent with several other epidemiological studies and is today well established [1–3]. Additionally, we observed an association between red and processed meat and overall cancer risk suggesting that other

cancer sites may also be concerned. Indeed, several studies suggested that red and processed meat may also influence breast cancer risk [7, 32]. In our study, we found a borderline association [$HR_{50\text{ g/day}} = 1.09 (0.99-1.19)$] for red and processed meat consumption and breast cancer risk. For prostate cancer, we did not find an association with red and processed meat consumption, in line with the last report of the World Cancer Research Fund (WCRF) [33].

Epidemiological and experimental studies have supported the hypothesis that the carcinogenicity of red and processed meat could be due to their high heme iron content. Experimental studies have proposed that the increased heme-induced lipid peroxidation leads to the formation of cytotoxic and genotoxic aldehydes in the intestinal lumen [11]. It has been established *in vitro* that precancerous cells are resistant to apoptosis induced by these aldehydes, giving these cells a selective advantage and leading to an increased risk of colorectal cancer [34]. Based on a recent meta-analysis, the WCRF concluded in 2017 that consumption of foods containing heme iron increases the risk of colorectal cancer, with limited-suggestive evidence [35]. Likewise, we observed a positive association between heme iron intake (from red and processed meat) and colorectal and overall cancer risks. This may explain why we observed a lower risk of cancer when ham was included in our analyses since ham contains less heme iron and lipids than other processed meats. Similarly, in a previous study conducted in the independent SU.VI.MAX cohort, the positive association between processed meat intake and breast cancer risk was higher and stronger when cooked ham was excluded from processed meat [36]. In the present study, heme iron was also associated with increased risk of breast cancer, in line with other cohort studies [37]. This association is also consistent with results of a previous study conducted by our team in the SU.VI.MAX cohort where a positive association between total dietary iron intake and breast cancer risk was observed [38].

It is widely accepted that anxiety is associated with intestinal barrier dysfunction [39–41]; associations between psychological stress and cancer risk, however, are not consistent, with several studies finding no association [42] [association between anxiety and colorectal cancer in our cohort: $HR = 0.92 (0.66-1.27)$, $p = 0.6$]. Stimulation of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in response to stress leads to increased intestinal barrier permeability through secretion of glucocorticoids and activation of intestinal mast cells [39, 43, 44]. An intact intestinal barrier prevents the permeation of toxic luminal substances, whereas intestinal barrier disruption allows their entry, which may trigger local or systemic inflammation and disease [45]. We hypothesized that this intestinal barrier disruption resulting from anxiety could increase the exposure of the epithelium to the luminal content, notably to aldehydes resulting from

red and processed meat, and increase the passage of these toxic molecules into the body, thereby increasing the risk of colorectal cancer and other types of cancer for which red meat is a potential risk factor. In line with this assumption, the results of the present study suggest that the positive association between red and processed meat and cancer risk may be stronger in anxious participants. Indeed, red and processed meat consumption was associated with higher colorectal cancer risk in anxious participant but not in their non-anxious counterparts (despite higher statistical power in this group). Similar trends were observed for overall cancer risk, and analyses conducted with heme iron also provided similar results. These results are in line with our hypothesis that anxiety, by disrupting the intestinal barrier function, may increase the effect of heme-induced toxic aldehydes. Anxiety could therefore be an effect modifier of the association between meat consumption and colorectal cancer risk. For breast cancer, there was a positive association between heme iron intake from red and processed meat, and the risk of cancer. However, this risk did not seem to be modified by anxiety, as opposed to colorectal cancer risk, which is more directly impacted by intestinal barrier disruption. The fact that the association between breast cancer risk and heme iron intake was significant for the non-anxious group but not for the anxious group can be explained by the higher statistical power in the non-anxious group. Finally, prostate cancer risk did not seem to be linked with heme iron intake or red and processed meat consumption.

Some studies have found a positive association between benzodiazepine intake and the risk of cancer [27, 46]. But in our study, we did not detect an association between benzodiazepine intake and overall, colorectal, breast, or prostate cancer risk. We hypothesize that the potential effect modification of the association between red and processed consumption and cancer risk by anxiety would be caused by intestinal barrier function dysregulation. Since these drugs are not known to alter intestinal barrier function in the literature, it is more likely that the effect modification observed in this study results from anxiety itself rather than from the treatment.

Strengths of this study are its large sample size, the prospective design and the use of repeated detailed and validated 24 h-dietary records based on an up-to-date food composition database with a large choice of items to assess usual dietary intakes. There are, however, certain limitations. The NutriNet-Santé study is a cohort of volunteers which shows more health-conscious behaviors and higher professional and/or educational level compared to the general French population [47]. Thus, unhealthy dietary behaviors (such as very high intakes of red and processed meat) may have been underrepresented, which could have led to reduced contrast between participants and thus weaker associations. Additionally, although the number of overall cancer cases

was reasonably large, the numbers of the different types of cancers was more limited, and the statistical power was, therefore, limited to some cancer locations. Another limitation was that the assessment of anxiety was based on self-reported treatment. Untreated participants were, therefore, considered not anxious, possibly leading to misclassification bias for some participants, also most likely weakening the observed associations. Finally, the observed relationships could be partly affected by unmeasured or residual confounding factors. However, main potential confounders have been accounted for in this study; we thus deem unlikely that residual confounding may entirely explain the observed associations.

In conclusion, in line with the mechanistic hypothesis, this prospective cohort study suggests that red and processed meat consumption and heme iron intake are associated with an increased risk of overall and more specifically colorectal cancer. Besides, to our knowledge, this epidemiological study is the first one to suggest that anxiety may foster these positive associations. These results need replication in independent populations and must be supported by experimental studies. They provide novel insights into the understanding of the complex etiology of cancer and the interplay of nutrition and lifestyle factors.

Acknowledgments The authors warmly thank all the volunteers of the NutriNet-Santé cohort. We also thank Younes Esseddik (IT manager), Thi Hong Van Duong, Régis Gatibelza, and Jagatjit Mohinder (computer scientists), Fabien Szabo de Edelenyi, PhD (data management supervisor), Julien Allègre, Nathalie Arnault, Laurent Bourhis (data-managers/biostatisticians), Fatoumata Diallo, MD, Roland Andrianasolo, MD and Sandrine Kamdem, MD (physicians), and Nathalie Druesne-Pecollo (operational coordinator) for their technical contribution to the NutriNet-Santé study. The authors also thank the scientific support of the French Network for Nutrition And Cancer Research (NACRe network).

Authors' contributions SH, FP, VT, MB and MT designed and conducted the study. BS, MD, FP, MT and VT developed the methodology. SH, MT, VAA, SP, PLM, EF, NN, VB, EC and CD acquired the data. MB analyzed the data and wrote the paper. FP and MT had primary responsibility for the final content; and all authors: were involved in interpreting the results and editing the manuscript and read and approved the final manuscript.

Funding This research was supported by the regular financial support of INRAE. The NutriNet-Santé study was supported by the following public institutions: Ministère de la Santé, Santé Publique France, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement (INRAE), Conservatoire National des Arts et Métiers (CNAM) and Sorbonne Paris Nord University. MB was supported by a doctoral grant from the École d'ingénieurs de Purpan and the region Occitanie. CD was supported by a grant from the French National Cancer Institute (INCa). EC was supported by a Doctoral Funding from Université Paris 13—Galilée Doctoral School. MD was supported by a Post-doctoral grant from the Fondation pour la Recherche Médicale. The funders had no role in study design, data collection and analysis, the decision to publish, or preparation of the manuscript.

Availability of data and material All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Compliance with ethical standard

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethics approval and consent to participate The NutriNet-Santé study, registered at ClinicalTrials.gov as NCT03335644, is conducted according to the Declaration of Helsinki guidelines and was approved by the Institutional Review Board of the French Institute for Health and Medical Research (IRB Inserm n°0000388FWA00005831) and the "Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés" (CNIL n°908450/n°909216). Electronic informed consent is obtained from each participant.

References

1. Norat T, Bingham S, Ferrari P et al (2005) Meat, fish, and colorectal cancer risk: the European prospective investigation into cancer and Nutrition. *JNCI J Natl Cancer Inst* 97:906–916. <https://doi.org/10.1093/jnci/dji164>
2. Lippi G, Mattiuzzi C, Cervellin G (2016) Meat consumption and cancer risk: a critical review of published meta-analyses. *Crit Rev Oncol Hematol* 97:1–14. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.11.008>
3. Zhao Z, Feng Q, Yin Z et al (2017) Red and processed meat consumption and colorectal cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* 8:83306–83314. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20667>
4. Vieira AR, Abar L, Chan DSM et al (2017) Foods and beverages and colorectal cancer risk: a systematic review and meta-analysis of cohort studies, an update of the evidence of the WCRF-AICR Continuous Update Project. *Ann Oncol* 28:1788–1802. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx171>
5. Martin OCB, Naud N, Taché S et al (2018) Targeting colon luminal lipid peroxidation limits colon carcinogenesis associated with red meat consumption. *Cancer Prev Res* 11:569–580. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-17-0361>
6. Bouvard V, Loomis D, Guyton KZ et al (2015) Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. *Lancet Oncol* 16:1599–1600. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00444-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00444-1)
7. Diallo A, Deschasaux M, Latino-Martel P et al (2017) Red and processed meat intake and cancer risk: results from the prospective NutriNet-Santé cohort study. *Int J Cancer* 142:230–237. <https://doi.org/10.1002/ijc.31046>
8. Wu J, Zeng R, Huang J et al (2016) Dietary protein sources and incidence of breast cancer: a dose-response meta-analysis of prospective studies. *Nutrients*. <https://doi.org/10.3390/nu8110730>
9. Bylsma LC, Alexander DD (2015) A review and meta-analysis of prospective studies of red and processed meat, meat cooking methods, heme iron, heterocyclic amines and prostate cancer. *Nutr J* 14:125. <https://doi.org/10.1186/s12937-015-0111-3>
10. Bastide NM, Pierre FHF, Corpet DE (2011) Heme iron from meat and risk of colorectal cancer: a meta-analysis and a review of the mechanisms involved. *Cancer Prev Res* 4:177–184. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-10-0113>
11. Bastide NM, Chenni F, Audebert M et al (2015) A central role for heme iron in colon carcinogenesis associated with red meat intake. *Cancer Res* 75:870–879. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-2554>

12. Bastide N, Morois S, Cadeau C et al (2016) Heme iron intake, dietary antioxidant capacity, and risk of colorectal adenomas in a large cohort study of french women. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 25:640–647. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-15-0724>
13. Fonseca-Nunes A, Jakszyn P, Agudo A (2014) Iron and cancer risk—a systematic review and meta-analysis of the epidemiological evidence. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 23:12–31. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-13-0733>
14. Qiao L, Feng Y (2013) Intakes of heme iron and zinc and colorectal cancer incidence: a meta-analysis of prospective studies. *Cancer Causes Control* 24:1175–1183. <https://doi.org/10.1007/s10552-013-0197-x>
15. Seiwert N, Heylmann D, Hasselwander S, Fahrer J (2019) Mechanism of colorectal carcinogenesis triggered by heme iron from red meat. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 1873:188334. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2019.188334>
16. Martin OCB, Olier M, Ellero-Simatos S et al (2019) Haem iron reshapes colonic luminal environment: impact on mucosal homeostasis and microbiome through aldehyde formation. *Microbiome*. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0685-7>
17. Michael T, Zetsche U, Margraf J (2007) Epidemiology of anxiety disorders. *Psychiatry* 6:136–142. <https://doi.org/10.1016/j.mppsyp.2007.01.007>
18. Vancamelbeke M, Vermeire S (2017) The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 11:821–834. <https://doi.org/10.1080/17474124.2017.1343143>
19. Bailey MT (2016) Psychological stress, immunity, and the effects on indigenous microflora. *Adv Exp Med Biol* 874:225–246. https://doi.org/10.1007/978-3-319-20215-0_11
20. Da Silva S, Robbe-Masselot C, Ait-Belgnaoui A et al (2014) Stress disrupts intestinal mucus barrier in rats via mucin O-glycosylation shift: prevention by a probiotic treatment. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 307:G420–429. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00290.2013>
21. Hercberg S, Castetbon K, Czernichow S et al (2010) The Nutrinet-Santé Study: a web-based prospective study on the relationship between nutrition and health and determinants of dietary patterns and nutritional status. *BMC Public Health* 10:242. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-10-242>
22. Lassale C, Castetbon K, Laporte F et al (2016) Correlations between fruit, vegetables, fish, vitamins, and fatty acids estimated by web-based nonconsecutive dietary records and respective biomarkers of nutritional status. *J Acad Nutr Diet* 116:427–438.e5. <https://doi.org/10.1016/j.jand.2015.09.017>
23. Lassale C, Castetbon K, Laporte F et al (2015) Validation of a Web-based, self-administered, non-consecutive-day dietary record tool against urinary biomarkers. *Br J Nutr* 113:953–962. <https://doi.org/10.1017/S0007114515000057>
24. Touvier M, Kesse-Guyot E, Méjean C et al (2011) Comparison between an interactive web-based self-administered 24 h dietary record and an interview by a dietitian for large-scale epidemiological studies. *Br J Nutr* 105:1055–1064. <https://doi.org/10.1017/S0007114510004617>
25. Arnault N, Caillot L, Keal C (2013) Table de composition des aliments, étude NutriNet-Santé. [Food composition table, NutriNet-Santé study] (in French). Éditions Inser.
26. Black AE (2000) Critical evaluation of energy intake using the Goldberg cut-off for energy intake: basal metabolic rate. A practical guide to its calculation, use and limitations. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24:1119–1130
27. Iqbal U, Nguyen P-A, Syed-Abdul S et al (2015) Is long-term use of benzodiazepine a risk for cancer? *Medicine* 94:e483. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000000483>
28. Lassale C, Péneau S, Touvier M et al (2013) Validity of web-based self-reported weight and height: results of the Nutrinet-Santé study. *J Med Internet Res* 15:e152. <https://doi.org/10.2196/jmir.2575>
29. Touvier M, Méjean C, Kesse-Guyot E et al (2010) Comparison between web-based and paper versions of a self-administered anthropometric questionnaire. *Eur J Epidemiol* 25:287–296. <https://doi.org/10.1007/s10654-010-9433-9>
30. Craig CL, Marshall AL, Sjöström M et al (2003) International physical activity questionnaire: 12-country reliability and validity. *Med Sci Sports Exerc* 35:1381–1395. <https://doi.org/10.1249/01.MSS.0000078924.61453.FB>
31. Centers for Disease Control and Prevention (2020) ICD-ICD-10-CM—International classification of diseases, tenth revision, clinical modification. <https://www.cdc.gov/nchs/icd/icd10cm.htm>. Accessed 27 Jan 2020
32. Dandamudi A, Tommie J, Nommsen-Rivers L, Couch S (2018) Dietary Patterns and Breast Cancer Risk: A Systematic Review. *Anticancer Res* 38:3209–3222. <https://doi.org/10.21873/anticancerres.12586>
33. World Cancer Research Fund (2018) Meat, fish & dairy. <https://www.wcrf.org/dietandcancer/exposures/meat-fish-dairy>. Accessed 27 Jan 2020
34. Pierre F, Tache S, Guéraud F et al (2007) Apc mutation induces resistance of colonic cells to lipoperoxide-triggered apoptosis induced by faecal water from haem-fed rats. *Carcinogenesis* 28:321–327. <https://doi.org/10.1093/carcin/bg1127>
35. World Cancer Res. Fund (2018) Colorectal cancer. <https://www.wcrf.org/dietandcancer/colorectal-cancer>. Accessed 8 Jan 2020
36. Pouchieu C, Deschasaux M, Hercberg S et al (2014) Prospective association between red and processed meat intakes and breast cancer risk: modulation by an antioxidant supplementation in the SU.VI.MAX randomized controlled trial. *Int J Epidemiol* 43:1583–1592. <https://doi.org/10.1093/ije/dyu134>
37. Chang VC, Cotterchio M, Khoo E (2019) Iron intake, body iron status, and risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer*. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5642-0>
38. Diallo A, Deschasaux M, Partula V et al (2016) Dietary iron intake and breast cancer risk: modulation by an antioxidant supplementation. *Oncotarget* 7:79008–79016. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12592>
39. Vanuytsel T, van Wanrooy S, Vanheel H et al (2014) Psychological stress and corticotropin-releasing hormone increase intestinal permeability in humans by a mast cell-dependent mechanism. *Gut* 63:1293–1299. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2013-305690>
40. Gareau MG, Silva MA, Perdue MH (2008) Pathophysiological mechanisms of stress-induced intestinal damage. *Curr Mol Med* 8:274–281
41. Cameron HL, Perdue MH (2005) Stress impairs murine intestinal barrier function: improvement by glucagon-like peptide-2. *J Pharmacol Exp Ther* 314:214–220. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.085373>
42. Heikkilä K, Nyberg ST, Theorell T et al (2013) Work stress and risk of cancer: meta-analysis of 5700 incident cancer events in 116,000 European men and women. *BMJ* 346:f165. <https://doi.org/10.1136/bmj.f165>
43. Keita AV, Söderholm JD, Ericson A-C (2010) Stress-induced barrier disruption of rat follicle-associated epithelium involves corticotropin-releasing hormone, acetylcholine, substance P, and mast cells. *Neurogastroenterol Motil* 22(770–778):e221–222. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2010.01471.x>
44. Vicario M, Guilarte M, Alonso C et al (2010) Chronological assessment of mast cell-mediated gut dysfunction and mucosal inflammation in a rat model of chronic psychosocial stress. *Brain Behav Immun* 24:1166–1175. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.06.002>

45. Fukui H (2016) Increased intestinal permeability and decreased barrier function: does it really influence the risk of inflammation? *Inflamm Intest Dis* 1:135–145. <https://doi.org/10.1159/000447252>
46. Kao C-H, Sun L-M, Su K-P et al (2012) Benzodiazepine use possibly increases cancer risk: a population-based retrospective cohort study in Taiwan. *J Clin Psychiatry* 73:e555–560. <https://doi.org/10.4088/JCP.11m07333>
47. Andreeva VA, Salanave B, Castetbon K et al (2015) Comparison of the sociodemographic characteristics of the large NutriNet-Santé e-cohort with French Census data: the issue of volunteer bias revisited. *J Epidemiol Community Health* 69:893–898. <https://doi.org/10.1136/jech-2014-205263>

1.3. Discussion

1.3.1. Principaux résultats

Cette étude a confirmé que la consommation de viande rouge et charcuterie était associée à une augmentation du risque de cancer (colorectal et toutes localisations confondues) dans la cohorte Nutrinet-Santé. En effet une augmentation de la consommation de viande rouge et de charcuterie de 50 g/jour était associée à une augmentation significative du risque de développer un cancer toutes localisations confondues de 6% (HR : 1,06 (1,02-1,11), **p=0,0007**) et de CCR de 18% (HR : 1,18 (1,01-1,37), **p=0,034**). Après stratification sur l'anxiété, l'augmentation du risque de cancer lié à la consommation de viande rouge et charcuterie était de 12% (HR : 1,12 (0,94-1,33), p=0,201) chez les non-anxieux, et de 42% (HR : 1,42 (1,03-1,94), **p=0,030**) chez les anxieux. De la même manière que pour la viande rouge et la charcuterie, une augmentation de l'apport en fer héminique de 1mg/jour augmentait le risque de CCR de 24% (HR : 1.24 (1,04-1,49), **p=0,018**) dans la population globale et de 55% (HR : 1,55 (1,07-2,24), **p=0,019**) chez les anxieux, et des tendances similaires ont été observées pour les cancers toutes localisations confondues (Figure 22).

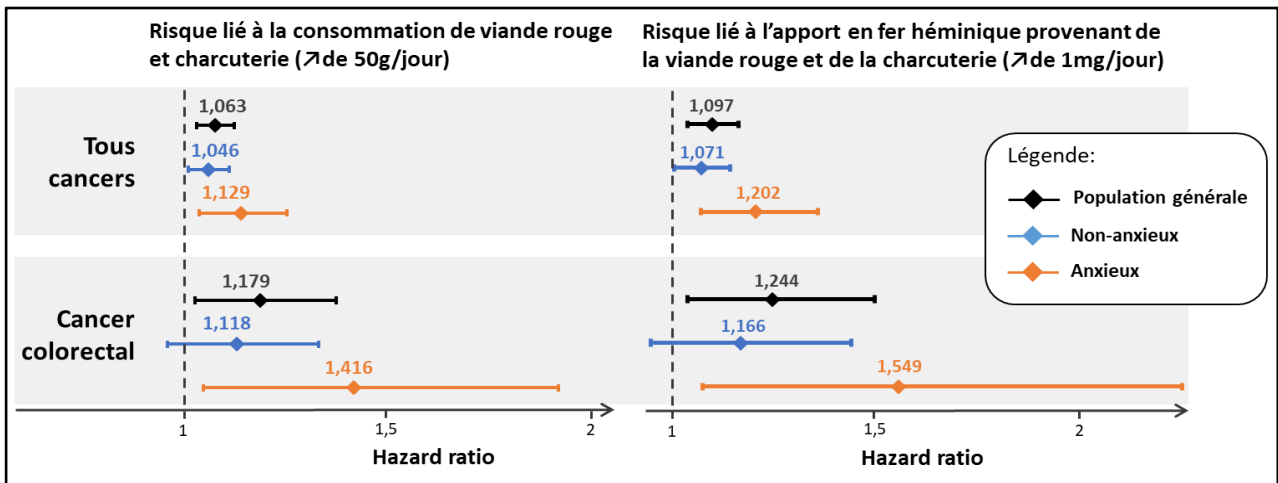


Figure 22: Risque relatif de cancer lorsque la consommation de viande rouge et charcuterie augmente de 50g/jour ou lorsque l'apport en fer héminique provenant de ces viandes augmente de 1mg/jour

Le risque de cancer du sein était également augmenté par la consommation de viande rouge et charcuterie (HR : 1,09 (0,99-1,19), p=0,072) et par l'apport en fer héminique provenant de ces viandes (HR : 1,16 (1,05-1,29), **p=0,005**) dans la population générale, cependant le risque n'était pas augmenté chez les anxieux.

Études réalisées et résultats

Dans la population générale, l'augmentation du risque de cancer (toutes localisations confondues et colorectal) liée à la consommation de viande rouge et de charcuterie était significative mais moins importante lorsque le jambon était inclus dans les charcuteries (résultats présentés dans les *Supplementary data*), mais lorsque le fer héminique provenant de ces viandes était pris comme variable d'exposition, l'association restait importante. Le jambon ne semble donc pas contribuer à l'augmentation du risque de cancer induite par la viande rouge et par la charcuterie dans cette étude, ce qui est cohérent avec notre hypothèse selon laquelle le fer héminique serait responsable de l'effet cancérigène de la viande rouge et de la charcuterie.

Ces résultats sont en accord avec les études épidémiologiques ayant montré une association positive entre consommation de viande rouge et charcuterie et risque de cancer colorectal et entre apport en fer héminique et risque de cancer colorectal.

1.3.2. Comparaison avec les autres études

Les résultats obtenus dans cette étude sont cohérents avec ceux obtenus dans les études précédentes explorant les relations entre consommation de viande rouge et charcuterie, ou l'apport en fer héminique, et le risque de cancer.

Une étude menée au sein de la cohorte européenne EPIC en 2005 a rapporté une augmentation du risque de CCR de 25% (RR 1,25 (1,09–1,41), $p=0,001$) pour une augmentation de la consommation de viande rouge et charcuterie de 100g/jour (Norat *et al.*, 2005). Ces résultats sont cohérents avec l'augmentation de 18% (HR : 1,18 (1,01-1,37), $p=0,034$) du risque de CCR associée à l'augmentation de la consommation de viande rouge de 50g/jour obtenue dans notre étude. Une précédente étude menée dans la cohorte Nutrinet-Santé n'avait pas rapporté de risque significativement augmenté du CCR en lien avec la consommation de viande rouge et charcuterie, mais seulement 120 cas de CCR étaient diagnostiqués au moment de cette étude (contre 250 cas dans notre étude) suggérant que l'absence de résultat significatif provenait probablement d'un manque de puissance statistique (Diallo *et al.*, 2018). En revanche, une augmentation significative du risque de cancer du sein avait été observée (HR : 1,09 (0,99-1,19), $p=0,072$) de manière concordante avec notre étude.

Études réalisées et résultats

L'augmentation de risque de CCR de 24% associée à l'augmentation de l'apport en fer héminique de 1mg/jour est concordante avec une méta-analyse ayant montré que les personnes dans le quintile le plus haut d'apport en fer héminique avaient un risque significativement augmenté de développer un CCR par rapport aux personnes du quintile le plus petit (RR=1,18 (1,06–1,32)) (Bastide et al. 2011). Ils sont également concordants avec une étude ayant rapporté une augmentation de 36% (HR=1,36(1,13-1,65), p-trend=0.001) du risque de développer un adénome colorectal avec l'augmentation de l'apport en fer héminique dans la cohorte de femmes E3N (Bastide *et al.*, 2016).

1.3.3. *Relevance dans le contexte de la prévention du cancer*

Le risque de cancer lié à la consommation de viande rouge et charcuterie a été très étudié, en particulier ces dernières années. En se basant sur cette littérature, l'IARC a classifié la charcuterie comme cancérigène avéré et la viande rouge comme cancérigène probable. Cela a mené à la mise en place de recommandations de santé publique préconisant de limiter la consommation de viande rouge et charcuterie. Cependant, les recommandations de santé publique actuelles ne tiennent pas compte de la dimension psychologique. Le stress et l'anxiété sont pourtant des composantes majeures du mode de vie occidental, dont les effets délétères sur l'organisme ont déjà été constatés dans de nombreuses études. Notre étude est la première à proposer que l'anxiété pourrait modifier l'association entre consommation de viande rouge et risque de cancer. Ces résultats sont conformes à notre hypothèse selon laquelle l'anxiété, en altérant la fonction de barrière intestinale, augmenterait l'exposition de l'organisme au fer héminique de la viande rouge, et aux produits de peroxydation qui en résultent, augmentant ainsi le risque de cancer induit par le fer héminique. Cette étude ne suffit pas pour conclure à un impact de l'anxiété sur l'effet cancérigène de la viande rouge et de la charcuterie, ces résultats doivent être retrouvés dans différentes populations et les mécanismes doivent être explorés dans des études expérimentales. Cependant, si d'autres études confirment ces résultats, nous pouvons supposer que des actions de santé publique visant à réduire l'anxiété pourraient être envisagées pour compléter les recommandations nutritionnelles actuelles.

Études réalisées et résultats

1.3.4. Forces et limites de l'étude

Les principales forces de cette étude sont le nombre de participants (plus de 100 000), le design prospectif, et l'utilisation de rappels de 24h détaillés permettant une estimation précise de la consommation alimentaire. De plus, des analyses de sensibilité qui ont consisté à tester différents ajustements et à tester nos associations uniquement chez les non-fumeurs, ont permis de consolider nos résultats.

Elle présente cependant certaines limites. La sous-estimation des comportements alimentaires malsains, car les participants sont plus soucieux de leur santé que dans la population générale, a pu conduire à réduire les différences entre les participants et donc à des associations plus faibles. De plus, le nombre de cas des différents types de cancer était limité, limitant la puissance statistique des tests effectués.

Enfin, une limite importante de cette étude est l'évaluation de l'anxiété qui est basée sur le traitement pour l'anxiété. En effet, cela plusieurs biais sont à relever dans ce cas :

- Les participants anxieux qui n'ont pas eu recours à un traitement ont été considérés comme non-anxieux. Puisque notre hypothèse est que l'anxiété augmente l'effet cancérigène de la viande rouge, l'association entre consommation de viande rouge et risque de cancer a possiblement été surestimée chez les non-anxieux, atténuant ainsi la différence de risque entre anxieux et non-anxieux.
- D'autre part, si le traitement fonctionne, les participants traités pour l'anxiété ne sont plus anxieux. Cependant, des études ont montré qu'un stress aigu suffisait à augmenter la perméabilité intestinale, nous avons donc supposé que l'anxiété, même si elle n'a été que de courte durée, a pu suffire à augmenter les effets délétères du fer héminique, à condition d'avoir été anxieux au moment de la consommation de viande rouge ou charcuterie.
- Enfin, on peut se demander si les différences observées entre anxieux et non-anxieux ne résultent pas du traitement plus que de l'anxiété. Notre hypothèse étant que l'effet de l'anxiété résulterait de son effet sur la barrière intestinale, et qu'à notre connaissance, les traitements pour l'anxiété n'ont pas ce type d'effet, nous pouvons supposer que nos différences observées entre anxieux et non-anxieux proviennent de l'anxiété et non du traitement.

2. ÉTUDE EXPERIMENTALE CHEZ LA SOURIS

Effets délétères de l'apport en fer héminique sur la muqueuse intestinale de souris soumises à un stress en début de vie

2.1. Introduction à l'article

2.1.1. Contexte

Cette étude a pour but de répondre au deuxième objectif de la thèse qui est d'explorer les effets délétères de l'apport en fer héminique sur la muqueuse intestinale de souris soumises ou non à un stress en début de vie.

Notre étude épidémiologique a montré que la consommation de viande rouge et charcuterie augmentait le risque de développer un cancer colorectal de manière plus importante chez les personnes anxieuses que chez les non-anxieuses. Ces résultats sont cohérents avec notre hypothèse selon laquelle le stress psychologique, en altérant la barrière intestinale, pourrait augmenter l'exposition de l'épithélium colique au fer héminique provenant de la viande, augmentant ainsi le risque de cancer colorectal lié à la consommation de viande rouge. L'épidémiologie nous a permis d'explorer les associations entre consommation de viande rouge et charcuterie et risque de cancer, en stratifiant sur l'anxiété, mais la mise en évidence de ces associations ne permet pas de conclure à un lien causal. Des études expérimentales sont nécessaires pour confirmer que le stress augmente le risque de cancer lié à la consommation de viande rouge et charcuterie, et explorer les mécanismes responsables de ces effets.

2.1.2. Objectifs

L'objectif de cette étude était d'explorer les effets d'un régime riche en fer héminique sur la prolifération et la génotoxicité dans la muqueuse colique de souris ayant subi ou non un stress de séparation maternelle. Plus précisément, nous avons comparé les effets délétères du fer héminique chez des souris ayant subi un stress de séparation maternelle et chez des souris contrôles.

Études réalisées et résultats

2.1.3. Matériel et méthodes

Des souris mâles et femelles ont été séparées de leur mère et du reste de la portée pendant 3 heures par jour pendant les 10 premiers jours de vie, alors que les souris contrôles n'ont pas été manipulées jusqu'au sevrage. Les souriceaux de sexe et de portée identique ont été placés deux par cage, et tous les souriceaux ont été nourris avec un régime d'adaptation (AIN76 modifié). La moitié des souris de chaque groupe a ensuite été nourrie soit avec un régime enrichi en fer héminique sous forme d'hémine, soit avec un régime contrôle identique au régime d'adaptation pendant 4 semaines. Les fèces et les urines ont été récoltés, et à la fin de l'expérimentation les souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale et les côlons ont été prélevés. A partir de la partie proximale du côlon, une extraction des ARN de la muqueuse grattée a été réalisée, suivie d'une RT-qPCR permettant d'explorer l'expression relative de gènes impliqués dans la détoxification des alcénals (l'aldéhyde déshydrogénase ALDH2 et l'aldo-kéto-réductase Akr1b8), le catabolisme de l'hème (HMOX1), l'inflammation (IL-1 β et TNF α), la différenciation en cellules sécrétrices (Atoh1) et la formation de la couche de mucus (Muc2). Le reste du côlon a été fixé au paraformaldéhyde et inclus en paraffine, des coupes au microtome suivie de colorations immuno-histo chimiques ont permis de quantifier la prolifération (marquage « Proliferating Cell Nuclear Antigen », PCNA ; et nombre de cellules en mitoses), le nombre de cellules à mucus et la génotoxicité (nombre de cellules positives au γ H2AX) au niveau des cellules épithéliales coliques.

Les analyses statistiques ont été adaptées au design de cette étude : les résultats ont été analysés soit séparément pour les mâles et femelles lorsque le sexe avait un impact sur les résultats, soit en ayant poolé les 2 sexes lorsque le sexe n'avait pas d'impact. Nous avons donc dans un premier temps déterminé si le sexe avait un effet sur chacun de nos endpoints à l'aide d'ANOVA à 3 facteurs (sexe, stress et régime). Si le sexe avait un effet significatif sur un des paramètres, ou si une interaction significative du stress avec un des deux autres facteurs (stress ou régime) était observé, les analyses (ANOVA 2 facteurs) étaient effectuées séparément sur les deux sexes. Si le sexe n'avait pas d'effet significatif sur un paramètre, les analyses (ANOVA 2 facteurs) étaient effectuées sur les données des mâles et femelles regroupées. Tous les résultats des tests statistiques sont regroupés dans le tableau 1.

Études réalisées et résultats

Early life stress reinforces genotoxic and hyperproliferative effects of heme iron diet on colonic epithelium of adult mice

Marie Beslay^{1,3}, Edwin Fouché^{1,3}, Nathalie Naud^{1,3}, Valerie Bacquié¹, Clara Beneteau¹, Jacques Dupuis^{1,3}, Aurélia Astruc¹, Ingrid Ahn¹, Valérie Bézirard¹, Isabelle Raymond-Letron², Laurent Ferrier¹, Françoise Guéraud^{1,3}, Maïwenn Olier¹, Pascale Plaisancie^{1,3}, Vassilia Theodorou¹, Fabrice Pierre^{1,3}

¹Toxalim (Research Centre in Food Toxicology), Université de Toulouse, INRAE, ENVT, INP-Purpan, UPS, Toulouse, France.

²National Veterinary School of Toulouse; Histology – Pathology; Toulouse, France.

³The French Network for Nutrition And Cancer Research - Réseau NACRe, Jouy-En-Josas, France.

Purpose

Heme iron has been identified as the main factor responsible for the carcinogenic effect of red meat because of its ability to catalyze the peroxidation of dietary lipids, forming cytotoxic and genotoxic alkenals in the gut [2]. Early life stress has been shown to alter intestinal barrier function [3, 4]. Results of a previous epidemiological study suggested that anxiety could increase positive association between heme iron consumption and colorectal cancer risk [5]. In this study, we explored the effects of heme iron consumption in adulthood in mice submitted to maternal separation stress after birth.

Methods

One day-old male and female C57Bl/6 were separated from their mothers and the rest of the litter 3 hours per day for 10 days, and received a heme-rich diet from PND52 during 29 days. Animals were sacrificed at PND81 and colons were collected. Proliferation and genotoxicity markers and relative mRNA expression of genes involved in alkenals detoxification, heme catabolism and inflammatory response were quantified in the colonic mucosa. Fecal water cytotoxicity and genotoxicity were evaluated. Lipid peroxidation markers were assessed in fecal water and urine.

Results

In both sexes, heme diet and early-life stress increased colonic epithelial cell proliferation (number of cells in mitosis and PCNA-positive cells), and genotoxicity in the colonic epithelium, with an additive effect of both factors. The number of goblet cells was decreased by heme diet and early-life stress, without additive effect of the two factors. Lipid peroxidation markers (urinary DHN-MA and TBARs in fecal water) and colonic expression of genes involved in alkenals detoxification were increased by heme diet without effect of early-life stress. Colonic expression of HO1 was increased by heme diet in both sexes, with a synergistic effect of early-life stress in males. Fecal water cytotoxicity and genotoxicity were increased with heme diet, and a synergistic effect with early-life stress was observed in both sexes for fecal genotoxicity and in males for fecal cytotoxicity.

Conclusions

This study showed on the one hand that early-life stress and heme iron have deleterious effects on the colonic mucosa, and on the other hand that genotoxicity and hyperproliferation induced by heme diet in colonic epithelium is amplified by early-life stress. These results suggest that the carcinogenic effect of heme iron is increased by stress, in line with our previous epidemiological study.

Introduction

Colorectal cancer is a major public health problem; it accounts for 10.2% of new cancer cases each year and it is the second most deadly cancer worldwide [1]. Red and processed meat consumption have been associated with an increased risk of colorectal cancer in several epidemiological studies [2, 3]. In 2015, the International Agency for Research on Cancer (IARC) classified processed meat as “carcinogenic” and red meat as “probably carcinogenic” [4]. Experimental studies identified heme iron as one of the major actors mediating this carcinogenic effect of red meat [5, 6] and these results are supported by epidemiological studies [7, 8]. In 2017, the World Cancer Research Fund International (WCRF) concluded that consumption of foods containing heme iron is associated with an increased risk of colorectal cancer, with a limited-suggestive evidence [9]. Heme iron is mainly absorbed in the upper part of the small intestine, but the majority of heme is not absorbed and reaches the large intestine [10]. The carcinogenic effect of heme iron has been linked to its catalytic role in lipid peroxidation of dietary components, leading to the formation of cytotoxic and genotoxic alkenals in the intestinal lumen [5]. The interface between the intestinal lumen and the body is formed by an epithelial layer, which acts as a physical barrier that protects the internal environment from microbial and chemical aggression present in the intestinal lumen [11]. Homeostasis of the colonic epithelium is a balance between proliferation, differentiation and apoptosis, and alterations of this homeostasis are involved in colorectal carcinogenesis [12, 13]. The intake of heme iron has been associated with alterations of epithelial homeostasis, by increasing proliferation and reducing apoptosis [14, 15]. In addition, heme iron intake has been associated with alteration of the intestinal mucus layer, which acts as a chemical and physical barrier involved in the barrier function of the intestine against luminal content [16]. Several studies propose that the deleterious effects of heme iron on gut epithelium result from changes to the composition of the microbiota [17].

Anxiety and stress disorders constitute the largest group of mental disorders in most Western societies and are a leading cause of disability [18]. Several studies have reported deleterious effects of psychological stress on intestinal barrier function. Indeed, the stimulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA) by a stressor results in secretion of glucocorticoids, intestinal mast cell-activation and secretion of mediators responsible for an increased intestinal permeability [19]. It has been shown that psychological stress also increases inflammation, induces changes to the gut microbiota [20] and alterations of the mucus network [21]. Our previous cohort study proposes that anxiety is a potential effect modifier of the carcinogenic effects of heme iron from red and processed meat consumption [22]. Indeed, in this study, the intake of heme iron from red and processed meat was associated with higher colorectal cancer risk in anxious participants ($HR_{50g/day}=1.55(1.07-2.24)$, $p=0.02$) but not in their non-anxious counterparts ($HR_{50g/day}=1.17(0.95-1.44)$, $p=0.15$) [22]. These

Études réalisées et résultats

results suggest that heme iron intake is more carcinogenic in anxious participants. This might be explained by the impact of anxiety on the intestinal barrier increasing the deleterious effects of heme iron on the intestinal epithelium. In mice, maternal separation (MS) during the first days of life is a well-established model of early life stress (ELS), used in studies on anxiety and depression [23]. ELS has several consequences on HPA-axis function in adulthood, affecting both its basal and stress-induced activity [24]. Alterations of the intestinal barrier function have been observed in adult mice submitted to maternal separation after birth [25].

In this study, we aimed to explore the effects of an elevated heme iron intake in adult mice that have been subjected to ELS, on i) gene expression in jejunal and colonic mucosa, ii) genotoxicity and homeostasis of intestinal epithelium and iii) fecal water toxicities.

Material and methods

All experimental protocols described in this study were approved by the local Animal Care Use Committee (Comité d'Éthique de Pharmacologie-Toxicologie de Toulouse – Midi-Pyrénées, France) registered as N°86 at the Ministry of Research and Higher Education (N° 0029/SMVT), and conducted in accordance with the European directive 2010/63/UE. All animals were euthanized by cervical dislocation at the end of the experiment.

1. Animals

In all experiments, mice were kept at 22+/-1°C and maintained on a 12:12 h light/dark cycle (light on at 7h30 am). Food (Harlan, Gannat, France) and water were available ad libitum. After birth (PND1), litters were adjusted to 7 ± 1 pups, 80 pups (40 male and 40 female) were included in the experiment. Weaning was performed on PND24, mice of the same sex and litter were placed two per cage. At PND 52, mice were fed experimental diet during four weeks. Weight was monitored every week between PND 24 and PND 81. On PND 81, all animals were euthanized by cervical dislocation and colonic tissue, and colonic and jejunal mucosa samples were collected.

1.1. Early life stress : maternal separation (MS)

We obtained 20 sixteen-day pregnant C57BL/6 mice (Janvier, Roubaix, France). After birth (19th day of pregnancy, PND0), half of the litters were randomly assigned to the MS group and the other half to the control group. Pups were separated from their mother and the rest of the litter for three consecutive hours (from 9 am to 12 pm) daily during 10 working days, weekend excluded, between PND2 and PND15, as already published [26]. Pups were kept at a controlled temperature (27+/-1 °C). Control pups were left with their dam and were not manipulated. From PND15 to PND24, all pups were maintained with their dam.

Études réalisées et résultats

1.2. Experimental diet

After weaning at PND24, mice were placed under acclimation for 28 days with a modified AIN-76 diet enriched in lipids (5% safflower oil) prepared and formulated in a powdered form by UPAE (INRA, Jouy-en-Josas, France). Calcium level is critical for heme promoting-effect on luminal lipid peroxidation and promotion of carcinogenesis, calcium was thus excluded from mineral mix but dibasic calcium phosphate was included in all diets at a low concentration of 2.7 g/kg. At PND 52, mice were fed experimental diet during four weeks. Control groups received a modified AIN-76 diet identical to that received during acclimatation, and heme groups received a modified AIN-76 diet enriched with 0.094% hemin (Sigma Chemical). Experimental design is presented in Fig. 1.

1.3. Fecal and urinary biomarkers

Twenty-four-hour fecal pellets and urine samples were collected at PND 72 to assess fecal thiobarbituric reactive substances (TBARs) and urinary 1,4 dihydroxynonene mercapturic acid (DHN-MA). Fecal water was prepared with 1mL of distilled water and 50 μ L of butylated hydroxytoluene (Sigma) 0.45 M added to 0.4 g of dried feces, as described previously [16]. To determine the lipid peroxides in the lumen, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were quantified in fecal water as described previously [27, 28]. The results are expressed as the MDA equivalent. Urinary DHN-MA indicates the dietary and endogenous formation of 4-hydroxynonenal. DHN-MA assay was done by competitive enzyme immunoassay as previously described [29, 30]. Urinary creatinine was determined to normalize DHN-MA concentration. The results are expressed as ng of DHN-MA per mg of creatinine. Each urine sample was assayed in duplicate.

2. Histologic analyses of the colon of mice

At the end of the experiment, colon was removed, proximal part was kept for RNA analysis, and the remainder part was fixed in paraformaldehyde 4% and included in paraffin (Swiss-rolls).

2.1. Immunohistochemistry H2AX

Four-micrometer paraffin-embedded sections from formalin-fixed mouse colon were de-waxed in toluene and rehydrated. Sections were incubated in Dako peroxidase blocking solution (Dako S2023) for 5 minutes and in goat serum (1:10, Dako X0907) for 20 minutes at room temperature. Sections were incubated with the rabbit polyclonal anti- γ H2AX antibody (1:400, Cell Signaling Technology #9718) for 50 minutes at room temperature. The secondary antibody (biotinylated goat anti-rabbit, Thermo Scientific TR-060-BN) was applied for 30 minutes at room temperature followed by horseradish peroxidase (HRP)–streptavidin solution (DAB, Dako K0675) for 30 minutes. Peroxidase activity was revealed by DAB substrate (DAKO, K3468) applied during 10 minutes. Sections were counterstained with Harris hematoxylin, dehydrated, and coverslipped. Enterocytes with nuclear

Études réalisées et résultats

γ H2AX-positive foci or complete nuclear labeling were considered positive cells. γ H2AX-positive cells were assessed by counting the positive nuclei in medium and distal colonic segment. The positive counts were expressed as a percentage of positive cells per intestinal gland.

2.2. Immunohistochemistry of proliferation and differentiation markers

Four micrometer thick paraffin-embedded sections from formalin-fixed mouse colon were rehydrated and endogenous peroxidase activity was quenched with 20 min incubation in 5% H₂O₂/PBS. After washing slides, antigen retrieval was carried out by heating sections in 0.01 M citrate buffer (pH 6.0) by microwaving. After incubation in 2.5% normal goat blocking serum (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), sections were incubated for 30 min at room temperature with rabbit anti-PCNA (1/100, ThermoFisher scientific, France) diluted in blocking solution. Samples were incubated for 30 min at room temperature with a ready-to-use peroxidase-labelled secondary reagent (ImmPRESS Polymer Detection kits, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). The slices were then incubated for 2-10 minutes with DAB (3,3'-diaminobenzidine) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) a peroxidase substrate used as chromogen and the revelation was monitored with a binocular microscope. The sections were then counterstained with hematoxylin and mounted in an aqueous mounting medium. (VectaMount AQ Aqueous Mounting Medium, Vector Laboratories).

To allow the quantification of mucus cells, alcian blue (Clinisciences, France) was used to dye the mucins. After rehydratation, sections were incubated for 30 minutes with alcian blue, rinsed and counter-stained with hematoxylin. The sections were then dehydrated and mounted with a mounting medium (VectaMount® Permanent Mounting Medium, Vector Laboratories). The identification of mitosis was performed after staining with hematoxylin eosin.

3. Gene expression in colonic and intestinal mucosa

Mucosa samples from the proximal part of the colon and from the jejunum were stored frozen at -80°C. Total cellular RNA was extracted with Tri reagent (Molecular Research Center). Total RNA samples (1 μ g) were then reverse-transcribed with the iScript™ Reverse Transcription Supermix (Bio-Rad) for real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) analyses. The primers for Sybr Green assays are presented in Supplementary Table. Amplifications were performed on a ViiA 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). The qPCR data were normalized to the level of the RNA Polymerase II Subunit A (POLR2A) messenger RNA (mRNA) and analyzed by the LinRegPCR v.11 software. Tata-box-binding protein (TBP) expression was used as internal standard (IS) for normalization of target mRNA expression.

Études réalisées et résultats

4. *Ex vivo* assays evaluating fecal water cytotoxicity, genotoxicity and impact on transepithelial resistance

Cell line

Apc^{+/+} (derived from C57Bl/6J mice) colon epithelial cells [31] express the heat-labile SV40 T antigen (AgT tsa58) under the control of an interferon γ (IFN γ) inducible promoter. Cell expressed cytokeratin 18, a marker of their epithelial phenotype [31]. The thermolabile tsA58 T antigen confers conditional immortalization: at 33°C with IFN γ , the large T antigen is active and drives cellular proliferation, and at 37°C, the temperature-sensitive mutation yields an inactive protein and cells act like nonproliferating epithelial cells.

Cell viability: neutral red (NR) assay

As a measure for cell viability, the neutral red assay was performed as previously described[32]. Briefly, Apc^{+/+} cells were seeded into 96-well plates at 100 000 cells per well in complete culture medium (DMEM supplemented with 10% of fetal calf serum (FCS), 1% penicillin/streptomycin, 10 U/mL IFN γ and 10 U/ml epidermal growth factor (EGF)) and placed at the permissive temperature of 33°C. After 24 hours, cells were transferred to 37°C without IFN γ and EGF for 24 hours and then treated for 24 hours with filtered fecal water diluted at 1/80 in culture medium without IFN γ and FCS. Culture medium without IFN γ and FCS was used for untreated control wells. Four replicates were performed.

Genotoxicity: γ H2AX assay

Genotoxicity and cytotoxicity of alkenals were measured after 24 hours of treatment of Apc^{+/+} and Apc^{-/+} cells using a γ H2AX in-cell Western blot assay according to Audebert and colleagues [33, 34]. Graillot and colleagues [34] demonstrated that this assay can be used to measure cell viability via DNA quantification. Cells were seeded into 96-well plates at 100 000 cells per well in complete culture medium at the permissive temperature of 33°C. After 24 hours, cells were transferred to 37°C without IFN γ for 24 hours and then treated with filtered fecal water diluted at 1/80 in culture medium without IFN γ and FCS. Culture medium without IFN γ and FCS was used for untreated control wells. Four replicates were performed.

Transepithelial resistance

Apc^{+/+} cells were seeded in 24 well Transwell inserts (0.4 μ m pore size, polyester membrane, Corning, CLS3470 Sigma) at a density of 200,000 cells/insert in complete culture medium and placed at the permissive temperature of 33 °C. After 24 h, the inserts were transferred into a cellZscope module (NanoAnalytics Münster, Germany) at 37 °C (5% CO₂) without IFN γ and EGF. When TEER stabilized, cells were treated for 24 h with filtered fecal waters diluted at 1/80 in culture medium without IFN γ and FCS.

Études réalisées et résultats

5. Statistical analysis

Results were analyzed using GraphPad Prism 8.4.3, and all data are reported as mean \pm SEM. ANOVA three factor (sex, stress and diet) were performed to determine the effect of sex. ANOVA two factor (stress and diet) were used on data of male and female separately when sex had a significant impact on the results (significant effect of sex or significant interaction of sex with one of the factor studied), and on the data of male and female pooled when sex had no significant effect on the results. Tukey's multiple comparisons tests were performed between all groups. All tests were two-sided, and $p < 0.05$ was considered statistically significant. The Supplementary Table 1 provides all the results of the statistical tests performed.

Results

1. Heme diet and ELS both increase genotoxicity and cell proliferation, and decrease number of goblet cells in the colonic epithelium

Heme diet and ELS alone or combined increased the genotoxicity in mice colon epithelium (Fig. 2.A), with no difference between male and female ($P=0.50$, Table S1). The number of γ H2AX-positive cells increased by 26.4% ($P=0.51$) with heme diet and by 52.1% ($P=0.03$) with ELS in comparison to standard diet-fed non-stressed mice. A significant interaction between stress and diet was observed ($P=0.029$), indicating a synergistic additivity of stress and diet on the genotoxicity in the colonic epithelium (+137.4%, $P < 0.0001$ with heme diet and ELS combined in comparison to standard diet-fed non-stressed mice). The number of γ H2AX-positive cells was increased by 87.8% ($P < 0.0001$) in heme diet-fed stressed mice compared to heme diet-fed non-stressed mice.

A significant interaction between heme diet and stress was observed for the number of goblet cells in the colonic epithelium (15.99% of the total variance, $P=0.002$; Fig. 2.B). No difference between the sexes were observed ($P=0.11$, Table S1). Compared to standard diet-fed non-stressed mice, the number of goblet cells was decreased by heme diet (-22.1%, $P=0.0002$) and by early-life stress (-18.4%, $P=0.0025$) and with the two factors combined (-17.7%, $P=0.004$) without additive or synergistic effect.

Heme diet and ELS were also both associated with increased proliferation of colonic epithelial cells (Fig. 2C and 2D). The number of PCNA positive cells was higher in male compared to female ($P=0.004$, Table S1). Compared to standard diet-fed non-stressed mice, the number of PCNA positive cells was increased by 29.9% ($P=0.013$) in male and 21.1% ($P=0.005$) in female with ELS, and by 29.6% ($P=0.014$) in male and 21.4% ($P=0.005$) in female with heme diet. Moreover, an additive effect of heme diet and early-life stress was observed in male (+43.4%, $P=0.0004$) and female (+43.4%, $P < 0.0001$) in comparison to standard diet-fed non-stressed mice. The number of cells in mitosis was higher in female

Études réalisées et résultats

compared to male ($P < 0.0001$, Table S1). In both male and female, compared to standard diet-fed non-stressed mice, the number of cells in mitosis was not significantly increased with heme diet or ELS separately, but an additive effect of the two factors was observed (+98.7%, $P = 0.002$ for male, and +109.8%, $P = 0.003$ for female compared to standard diet-fed non-stressed mice).

2. The relative mRNA expression of genes implicated in alkenals detoxification, heme catabolism, barrier function and inflammation are modified by heme diet.

An increase in the relative mRNA expression of HMOX1 in the colon, the main gene involved in the catabolism of heme, was associated with heme diet (Fig. 3.A). No difference between male and female was observed ($P = 0.58$, Table S1). Compared to standard diet-fed non-stressed mice, the mRNA relative expression of HMOX1 was not modified by stress (+6.43%, $P = 0.995$) but was increased by 146.9% ($P = 0.011$) with heme diet. A significant interaction between diet and stress was observed ($P = 0.03$), with a potentiating effect of early-life stress on the heme diet (+236.6% with heme diet and ELS combined, $P < 0.0001$ compared to standard diet-fed non-stressed mice). The mRNA relative expression of HMOX1 was increased by 36.33% ($P = 0.007$) in heme diet-fed stressed mice compared to heme diet-fed non-stressed mice.

The relative mRNA expression of alkenals detoxification genes in colonic mucosa was increased by heme diet in male and female (Fig. 3.B and 3.C). Sex did not affect the relative mRNA expression of Akr1b8 ($P = 0.15$), but had an effect on the relative mRNA expression of ALDH2 ($P = 0.035$) (Table S1). The relative mRNA expression of Akr1b8 was multiplied by 5 ($P < 0.0001$) with heme diet, and the relative mRNA expression of ALDH2 was increased by 30% ($P < 0.0001$) in male and 18.2% ($P < 0.0001$) in female, with heme diet. ELS had no effect on the relative mRNA expression of Akr1b8 ($P = 0.12$) and ALDH2 ($P = 0.62$ for male and $P = 0.62$ for female).

Heme diet was also associated with the relative Atoh1 mRNA expression, a gene required for the differentiation of intestinal secretory cells (Fig. 3.E), with no differences between the sexes ($P = 0.28$, Table S1). The relative Atoh1 mRNA expression was decreased by 24.8% ($P = 0.0005$) with heme diet, but was not modified by ELS ($P = 0.45$). Heme diet was also associated with the relative mRNA expression of Muc2, gene encoding the principal mucin secreted by goblet cells, with no significant effect of ELS (Fig. 3.F). The relative mRNA expression of Muc2 was higher in male compared to female ($P = 0.0014$, Table S1). Compared to standard diet, the relative Muc2 mRNA expression was decreased by 34.2% ($P = 0.002$) in male and by 27.9% ($P = 0.004$) in female, with heme diet.

Relative mRNA expression of pro-inflammatory cytokine genes was slightly increased by heme (Fig. 3.F and 3.G), with no difference between male and female ($P = 0.34$ for TNF α and $P = 0.40$ for IL-1 β ; Table S1). Compared to standard diet-fed non-stressed mice, relative mRNA expression of TNF α was

Études réalisées et résultats

increased by 28.4% ($P=0.45$) in heme diet-fed non-stressed mice and by 73.9% ($P=0.0039$) in heme diet-fed stressed mice; and relative mRNA expression of IL-1 β was increased by 32.9% ($P=0.64$) in heme diet-fed non-stressed mice and by 94.5% ($P=0.01$) in heme diet-fed stressed mice. The mRNA relative expression of TNF α and IL-1 β were increased by 35.4% ($P=0.13$) and 46.4% ($P=0.16$) respectively, in heme diet-fed stressed mice compared to heme diet-fed non-stressed mice.

3. Heme diet increases urinary and fecal markers of lipid peroxidation

As presented in Fig.4, heme diet significantly increases the amount of lipid peroxidation markers in fecal water and urine. There was no difference between male and female for TBARs in fecal water ($P=0.43$), but the amount of urinary 1,4-dihydroxynonemercapturic acid (DHN-MA), a metabolite of the lipid oxidation product 4-HNE, was higher in female compared to male ($P=0.0032$) (table S1). TBARs in fecal water were multiplied by 16.8 with heme diet ($P<0.0001$) and urinary DHN-MA was multiplied by 90 ($P<0.0001$) in male and by 154 in female ($P<0.0001$) with heme diet. No effect of early-life stress and no interactions between stress and diet have been observed, but compared to heme diet-fed non-stressed mice, urinary DHN-MA was increased by 42.3% ($P=0.13$) for male and by 50.1% ($P=0.09$) for female, in heme diet-fed stressed mice.

4. Heme diet increases cytotoxicity and genotoxicity of fecal water, with a potentiating effect of early-life stress

Heme diet increased the γ H2AX induction in Apc $^{+}/+$ cells exposed to fecal water, with no effect of early-life stress (Fig. 5). Results differ between sexes ($P<0.0001$, Table S1). Heme diet increased the γ H2AX induction of fecal water by 35.9% ($P<0.0001$) in male and by 33.8% ($P<0.0001$) in female compared to standard diet. ELS did not increase the genotoxicity of fecal water, but a significant interaction between diet and stress was observed in cells exposed to male (1.6% of the total variance, $P=0.045$) and female (2.9% of the total variance, $P=0.006$) fecal water, with a synergistic effect of the heme diet and early-life stress (+45.2%, $P<0.0001$ for male and +43.7%, $P<0.0001$ for female).

Heme diet was also associated with a decreased cell viability of cells exposed to fecal water (Fig. 6.A), and there was a significant interaction between sex and ELS ($P<0.0001$). Compared to fecal water of mice fed standard diet, fecal water exposition of mice fed heme diet decreased cell viability by 48.2% ($P<0.0001$) for male and by 60.1% ($P<0.0001$) for female. Despite a lower effect, viability of cells exposed to fecal water was also associated with early-life stress: compared to non-stressed standard diet-fed mice, cell viability of cells exposed to fecal water of stressed mice was not significantly increased in male (+3.3%, $P=0.80$) and female (+6.3%, $P=0.61$). A significant interaction between diet and stress on cell viability was observed in cells exposed to male fecal water with a synergistic effect

Études réalisées et résultats

of the heme diet and early-life stress (-69.8% compared to standard diet-fed non-stressed male mice, $P < 0.0001$).

Heme diet decreased also the TEER of Apc^{+/+} cells exposed to fecal water compared to standard-diet (-29.3%, $P < 0.0001$) (Fig. 6.B), with no effect of ELS ($P = 0.85$) and sex ($P = 0.07$, Table S1).

Discussion

This study designed to address the interaction between heme-induced alkenals and a psychological stress revealed that heme-induced early markers of carcinogenic process in colon epithelium, proliferation, number of mitosis and genotoxicity, are increased by early life stress. Indeed, we observed additive effects of heme diet and ELS on genotoxicity and proliferation in the colonic epithelium. Furthermore, the HO-1 relative mRNA expression in colonic mucosa, and the cytotoxicity and genotoxicity of fecal water were increased by heme diet and these effects were potentiated by ELS. Heme diet increased the relative mRNA expression of genes involved in detoxification of alkenals and in the inflammatory response and decreased the relative mRNA expression of genes involved in mucus barrier function, whereas no significant effects of ELS on these parameters were found.

The deleterious effects of heme diet on intestinal epithelial barrier, as reflected by the increased genotoxicity and cell proliferation measured in the colonic epithelium, are in line with results of previous studies [35–38]. Heme iron diet also decreased the number of goblet cells in the colon, the colonic mRNA relative expression of Muc2, gene encoding the principal mucin secreted by goblet cells, and the colonic mRNA relative expression of Atoh1, a gene required for the differentiation of intestinal secretory cells, such as goblet cells. Taken together, these results reveal a deleterious effect of heme iron diet on mucus barrier function, as it was previously proposed by Ijssennagger et al. [17]. In addition, fecal water from mice fed heme diet were more cytotoxic and genotoxic compared to fecal water of mice fed standard diet, and transepithelial electric resistance of cells exposed to fecal water decreased with heme diet, indicating an increased permeability. These results correlate with the increase of lipid peroxidation markers (TBARs) measured in fecal water from mice fed heme-diet. Therefore, we can suppose that lipid peroxidation products have a role in the cytotoxicity and genotoxicity of fecal content and in the deleterious effects observed on colonic mucosa of mice fed heme-diet, as proposed by previous studies [5, 16, 30]. In addition, mRNA relative expression of pro-inflammatory cytokine genes was increased by heme diet, reflecting a pro-inflammatory effect of heme iron which could also contribute to the carcinogenicity of heme iron, as suggested by the IARC [39].

ELS was also associated with an increased genotoxicity and cell proliferation in the colonic epithelium, and with a lower number of goblet cells. To our knowledge, early-life stress-induced cell proliferation

Études réalisées et résultats

and genotoxicity in the intestinal epithelium have never been studied before. However, in line with our results, a previous study had observed hyperproliferation in rat ileum of rat submitted to chronic stress [40]. In addition, several studies reported a positive association between psychological stress, including ELS, and intestinal barrier dysfunction [41–45]. The stimulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA) by a stressor results in secretion of glucocorticoids and intestinal mast-cell activation, leading to intestinal barrier dysfunction [19, 46]. *In vitro* assays on mouse colonic cells exposed to fecal water showed that ELS had no impact on the cyto- and genotoxicity of the fecal water or the drop in transepithelial resistance induced by fecal water, suggesting that deleterious effects on colonic mucosa did not result from an increased toxicity of the intestinal content. Taken together, these results suggest that the deleterious effects induced by ELS on colonic mucosa results from systemic mechanisms instead of a modification in the intestinal content composition, in line with previous studies.

ELS and heme diet were both associated with alterations of the colonic mucosa, but only the fecal content of heme-fed mice increased cyto- and genotoxicity *in vitro*. We hypothesized that the intestinal barrier alteration caused by ELS could increase the exposition of the colonic epithelium to the luminal content, increasing therefore the deleterious effects of heme iron, and subsequently the risk of cancer. We have previously shown that large quantities of HNE were absorbed upon consumption of heme iron, red meat or black pudding together with PUFAs, in rats, as indicated by the large presence of DHN-MA, the major urinary metabolite of HNE, in their urine. In this study, despite non-significant results, the DHN-MA was higher in urine of heme diet-fed stressed mice compared to heme diet-fed non-stressed mice (+42.27%, $p=0.13$ % for male and +50.07%, $p=0.094$ for female), suggesting an increased absorption and thus exposition to alkenals in stressed mice. This result is in line with the hypothesis that ELS could have increased the exposition of intestinal epithelium to the luminal content. However, ELS did not increase fecal TBARs and the expression of genes responsible for the detoxification of alkenals in the colonic mucosa of mice fed heme diet, suggesting that exposure to alkenals is not increased by stress in the colon. But, if ELS did not directly impact the relative mRNA expression of HO-1 in the colonic epithelium, it did potentiate the increased HO-1 expression induced by heme iron diet. In line with this result, Chen et al. found an accumulation of iron induced by psychological stress in enterocytes of rats fed high iron diet [47]. On this basis, we speculated that the barrier alteration resulting from ELS could have increased the intestinal epithelium exposition to luminal heme, therefore increasing the expression of HO-1 in colonic epithelium. According to a recent review, the pro-tumorigenic activity of dietary heme in the colorectum does not result exclusively from its ability to peroxidize lipids, but implies other mechanisms, including aberrant WNT signaling and hyperproliferation in intestinal epithelium [48]. In our study, heme diet and ELS had a synergistic effect

Études réalisées et résultats

(significant interaction) on the genotoxicity in the colonic epithelium and an additive effect on epithelial hyperproliferation in the colon. In addition, the cytotoxic and genotoxic effects of fecal water from heme-fed mice were slightly potentiated by ELS, while fecal heme-induced TBARs were not modified by ELS. These results suggest that the toxicity of the fecal content is not only the result of alkenals formation resulting from heme diet, but is also impacted by ELS. Besides, the relative mRNA expression on genes involved in pro-inflammatory response were higher in the colonic mucosa of heme diet-fed stressed mice compared to heme diet-fed non stressed mice (+35.41%, $p=0.13$ for TNF α ; +46.37%, $p=0.16$ for IL-1 β). Inflammation has been associated to cancer risk through processes that involve genotoxicity, including production of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β [49]. Therefore, an increased exposition to heme resulting from ELS could have led to an enhanced pro-inflammatory response in the gut, possibly explaining the synergistic effect of ELS and heme diet on colonic genotoxicity, and increasing cancer risk.

To conclude, we confirmed that a diet rich in heme iron increases the toxicity of the intestinal content and induces harmful effects to the colonic mucosa such as hyperproliferation, genotoxicity and barrier function alteration. ELS too was associated with deleterious effects on the colonic epithelium, but these effects were most likely driven by the gut-brain axis, instead of an increased toxicity of the intestinal content. Furthermore, and in line with our previous epidemiological study showing an increased risk of colorectal cancer due to heme iron intake in anxious participants, short term impacts of a colonic exposition to heme iron on early markers of carcinogenic process are potentiated by ELS, suggesting that colorectal cancer risk due to heme iron intake could therefore be even higher in stressed mice. These results opens up interesting avenues for further research on the impact of psychological stress on the positive or negative association between diet and cancer risk.

Études réalisées et résultats

References

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al (2018) Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 68:394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
2. Gonzalez CA, Riboli E (2010) Diet and cancer prevention: Contributions from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Eur J Cancer* 46:2555–2562. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2010.07.025>
3. Zhao Z, Feng Q, Yin Z, et al (2017) Red and processed meat consumption and colorectal cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* 8:83306–83314. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20667>
4. Bouvard V, Loomis D, Guyton KZ, et al (2015) Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. *Lancet Oncol* 16:1599–1600. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00444-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00444-1)
5. Bastide NM, Chenni F, Audebert M, et al (2015) A central role for heme iron in colon carcinogenesis associated with red meat intake. *Cancer Res* 75:870–879. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-2554>
6. Gamage SMK, Dissabandara L, Lam AK-Y, Gopalan V (2018) The role of heme iron molecules derived from red and processed meat in the pathogenesis of colorectal carcinoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 126:121–128. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2018.03.025>
7. Qiao L, Feng Y (2013) Intakes of heme iron and zinc and colorectal cancer incidence: a meta-analysis of prospective studies. *Cancer Causes Control* 24:1175–1183. <https://doi.org/10.1007/s10552-013-0197-x>
8. Bastide NM, Morois S, Cadeau C, et al (2016) Heme Iron Intake, Dietary Antioxidant Capacity, and Risk of Colorectal Adenomas in a Large Cohort Study of French Women. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol* 25:640–647. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-15-0724>
9. Vieira AR, Abar L, Chan DSM, et al (2017) Foods and beverages and colorectal cancer risk: a systematic review and meta-analysis of cohort studies, an update of the evidence of the WCRF-AICR Continuous Update Project. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 28:1788–1802. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx171>
10. West AR, Oates PS (2008) Mechanisms of heme iron absorption: Current questions and controversies. *World J Gastroenterol WJG* 14:4101–4110. <https://doi.org/10.3748/wjg.14.4101>
11. Chelakkot C, Ghim J, Ryu SH (2018) Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications. *Exp Mol Med* 50:1–9. <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0126-x>
12. Santos AJM, Lo Y-H, Mah AT, Kuo CJ (2018) The Intestinal Stem Cell Niche: Homeostasis and Adaptations. *Trends Cell Biol* 28:1062–1078. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.08.001>
13. Wang S, Chen Y-G (2018) BMP signaling in homeostasis, transformation and inflammatory response of intestinal epithelium. *Sci China Life Sci* 61:800–807. <https://doi.org/10.1007/s11427-018-9310-7>

Études réalisées et résultats

14. Ijssennagger N, Rijnierse A, de Wit NJW, et al (2013) Dietary heme induces acute oxidative stress, but delayed cytotoxicity and compensatory hyperproliferation in mouse colon. *Carcinogenesis* 34:1628–1635. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgt084>
15. de Vogel J, van-Eck WB, Sesink ALA, et al (2008) Dietary heme injures surface epithelium resulting in hyperproliferation, inhibition of apoptosis and crypt hyperplasia in rat colon. *Carcinogenesis* 29:398–403. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgm278>
16. Martin O, Olier M, Ellero-Simatós S, et al (2019) Haem iron reshapes colonic luminal environment: impact on mucosal homeostasis and microbiome through aldehyde formation. *Microbiome* 7:. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0685-7>
17. Ijssennagger N, Belzer C, Hooiveld GJ, et al (2015) Gut microbiota facilitates dietary heme-induced epithelial hyperproliferation by opening the mucus barrier in colon. *Proc Natl Acad Sci* 112:10038–10043. <https://doi.org/10.1073/pnas.1507645112>
18. Michael T, Zetsche U, Margraf J (2007) Epidemiology of anxiety disorders. *Psychiatry* 6:136–142. <https://doi.org/10.1016/j.mppsy.2007.01.007>
19. Vanuytsel T, van Wanrooy S, Vanheel H, et al (2014) Psychological stress and corticotropin-releasing hormone increase intestinal permeability in humans by a mast cell-dependent mechanism. *Gut* 63:1293–1299. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2013-305690>
20. Bailey MT (2016) Psychological Stress, Immunity, and the Effects on Indigenous Microflora. *Adv Exp Med Biol* 874:225–246. https://doi.org/10.1007/978-3-319-20215-0_11
21. Da Silva S, Robbe-Masselot C, Ait-Belgnaoui A, et al (2014) Stress disrupts intestinal mucus barrier in rats via mucin O-glycosylation shift: prevention by a probiotic treatment. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 307:G420-429. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00290.2013>
22. Beslay M, Srour B, Deschasaux M, et al (2020) Anxiety is a potential effect modifier of the association between red and processed meat consumption and cancer risk: findings from the NutriNet-Santé cohort. *Eur J Nutr*. <https://doi.org/10.1007/s00394-020-02381-3>
23. Bondar NP, Lepeshko AA, Reshetnikov VV (2018) Effects of Early-Life Stress on Social and Anxiety-Like Behaviors in Adult Mice: Sex-Specific Effects. *Behav Neurol* 2018:1538931. <https://doi.org/10.1155/2018/1538931>
24. de Kloet ER, Sibug RM, Helmerhorst FM, Schmidt M (2005) Stress, genes and the mechanism of programming the brain for later life. *Neurosci Biobehav Rev* 29:271–281. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2004.10.008>
25. Li B, Lee C, Zani A, et al (2014) Early maternal separation induces alterations of colonic epithelial permeability and morphology. *Pediatr Surg Int* 30:1217–1222. <https://doi.org/10.1007/s00383-014-3611-x>
26. Barreau F, Cartier C, Ferrier L, et al (2004) Nerve growth factor mediates alterations of colonic sensitivity and mucosal barrier induced by neonatal stress in rats. *Gastroenterology* 127:524–534. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.05.019>
27. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95:351–358. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)

Études réalisées et résultats

28. Pierre F, Santarelli R, Taché S, et al (2008) Beef meat promotion of dimethylhydrazine-induced colorectal carcinogenesis biomarkers is suppressed by dietary calcium. *Br J Nutr* 99:1000–1006. <https://doi.org/10.1017/S0007114507843558>
29. Guéraud F, Peiro G, Bernard H, et al (2006) Enzyme immunoassay for a urinary metabolite of 4-hydroxynonenal as a marker of lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* 40:54–62. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.08.011>
30. Pierre F, Peiro G, Taché S, et al (2006) New marker of colon cancer risk associated with heme intake: 1,4-dihydroxynonane mercapturic acid. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol* 15:2274–2279. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-06-0085>
31. Forest V, Pierre F, Bassonga E, et al (2003) Apc+/Min colonic epithelial cells express TNF receptors and ICAM-1 when they are co-cultured with large intestine intra-epithelial lymphocytes. *Cell Immunol* 223:70–76. [https://doi.org/10.1016/s0008-8749\(03\)00149-7](https://doi.org/10.1016/s0008-8749(03)00149-7)
32. Repetto G, del Peso A, Zurita JL (2008) Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc* 3:1125–1131. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.75>
33. Audebert M, Dolo L, Perdu E, et al (2011) Use of the γ H2AX assay for assessing the genotoxicity of bisphenol A and bisphenol F in human cell lines. *Arch Toxicol* 85:1463–1473. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0721-2>
34. Graillot V, Takakura N, Hegarat LL, et al (2012) Genotoxicity of pesticide mixtures present in the diet of the French population. *Environ Mol Mutagen* 53:173–184. <https://doi.org/10.1002/em.21676>
35. Ishikawa S, Tamaki S, Ohata M, et al (2010) Heme induces DNA damage and hyperproliferation of colonic epithelial cells via hydrogen peroxide produced by heme oxygenase: a possible mechanism of heme-induced colon cancer. *Mol Nutr Food Res* 54:1182–1191. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200900348>
36. Gleis M, Klenow S, Sauer J, et al (2006) Hemoglobin and hemin induce DNA damage in human colon tumor cells HT29 clone 19A and in primary human colonocytes. *Mutat Res* 594:162–171. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.08.006>
37. de Moura NA, Caetano BFR, Bidinotto LT, et al (2019) Dietary hemin promotes colonic preneoplastic lesions and DNA damage but not tumor development in a medium-term model of colon carcinogenesis in rats. *Mutat Res* 846:403076. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.07.006>
38. Seiwert N, Wecklein S, Demuth P, et al (2020) Heme oxygenase 1 protects human colonocytes against ROS formation, oxidative DNA damage and cytotoxicity induced by heme iron, but not inorganic iron. *Cell Death Dis* 11:. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-02950-8>
39. Domingo JL, Nadal M (2017) Carcinogenicity of consumption of red meat and processed meat: A review of scientific news since the IARC decision. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc* 105:256–261. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.04.028>
40. Boudry G, Jury J, Yang PC, Perdue MH (2007) Chronic psychological stress alters epithelial cell turn-over in rat ileum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292:G1228-1232. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00358.2006>

Études réalisées et résultats

41. Ferrier L, Mazelin L, Cenac N, et al (2003) Stress-induced disruption of colonic epithelial barrier: role of interferon- γ and myosin light chain kinase in mice. *Gastroenterology* 125:795–804. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(03\)01057-6](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(03)01057-6)
42. Hattay P, Prusator DK, Tran L, Greenwood-Van Meerveld B (2017) Psychological stress-induced colonic barrier dysfunction: Role of immune-mediated mechanisms. *Neurogastroenterol Motil Off J Eur Gastrointest Motil Soc* 29:. <https://doi.org/10.1111/nmo.13043>
43. Ayyadurai S, Gibson AJ, D'Costa S, et al (2017) Frontline Science: Corticotropin-releasing factor receptor subtype 1 is a critical modulator of mast cell degranulation and stress-induced pathophysiology. *J Leukoc Biol* 102:1299–1312. <https://doi.org/10.1189/jlb.2HI0317-088RR>
44. Overman EL, Rivier JE, Moeser AJ (2012) CRF Induces Intestinal Epithelial Barrier Injury via the Release of Mast Cell Proteases and TNF- α . *PLoS ONE* 7:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039935>
45. O'Mahony SM, Hyland NP, Dinan TG, Cryan JF (2011) Maternal separation as a model of brain-gut axis dysfunction. *Psychopharmacology (Berl)* 214:71–88. <https://doi.org/10.1007/s00213-010-2010-9>
46. Albert-Bayo M, Paracuellos I, González-Castro AM, et al (2019) Intestinal Mucosal Mast Cells: Key Modulators of Barrier Function and Homeostasis. *Cells* 8:. <https://doi.org/10.3390/cells8020135>
47. Chen J, Shen H, Chen C, et al (2009) The effect of psychological stress on iron absorption in rats. *BMC Gastroenterol* 9:83. <https://doi.org/10.1186/1471-230X-9-83>
48. Seiwert N, Heylmann D, Hasselwander S, Fahrner J (2019) Mechanism of colorectal carcinogenesis triggered by heme iron from red meat. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 1873:188334. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2019.188334>
49. Elinav E, Nowarski R, Thaiss CA, et al (2013) Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. *Nat Rev Cancer* 13:759–771. <https://doi.org/10.1038/nrc3611>

Études réalisées et résultats

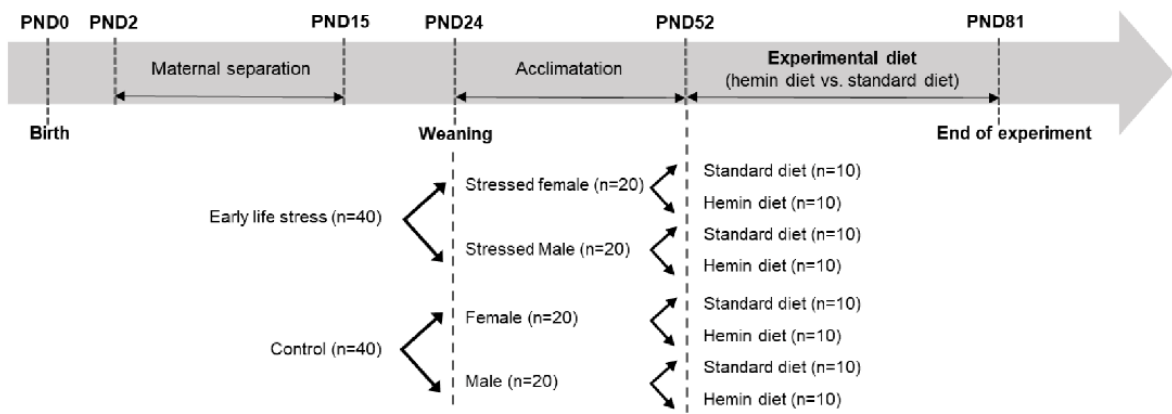


Fig. 1 Experimental design. PND=Post-natal day

Études réalisées et résultats

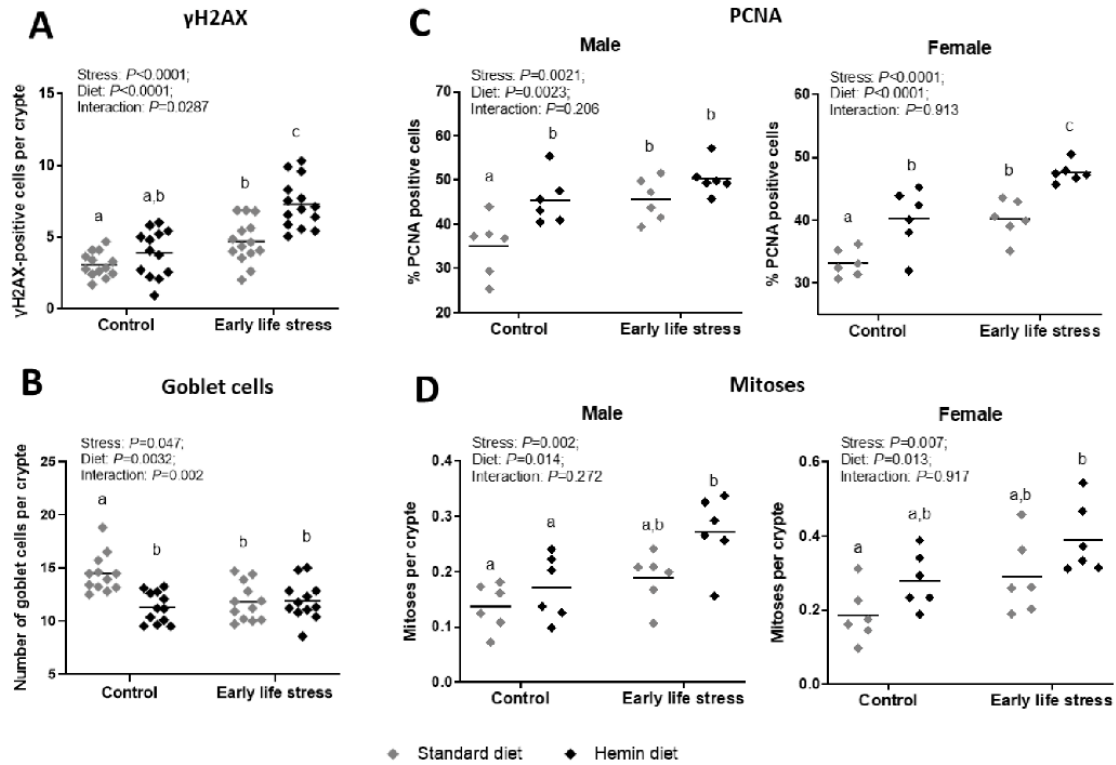


Fig. 2 Hemin diet and early life stress increases proliferation and genotoxicity and decrease the number of goblet cells in the colonic epithelium of mice. **A**, the number of γ H2AX-positive cells per crypt (n=12 to 14). **B**, the number of goblet cells per crypt (n=12 to 14). **C**, the percentage of PCNA-positive cells per crypt in male (n=6 to 7) and female (n=6 to 7). **D**, the number of cells in mitosis per crypt in male (n=6 to 7) and female (n=6 to 7). Same letters indicate no significant difference between the groups. Values are means.

Études réalisées et résultats

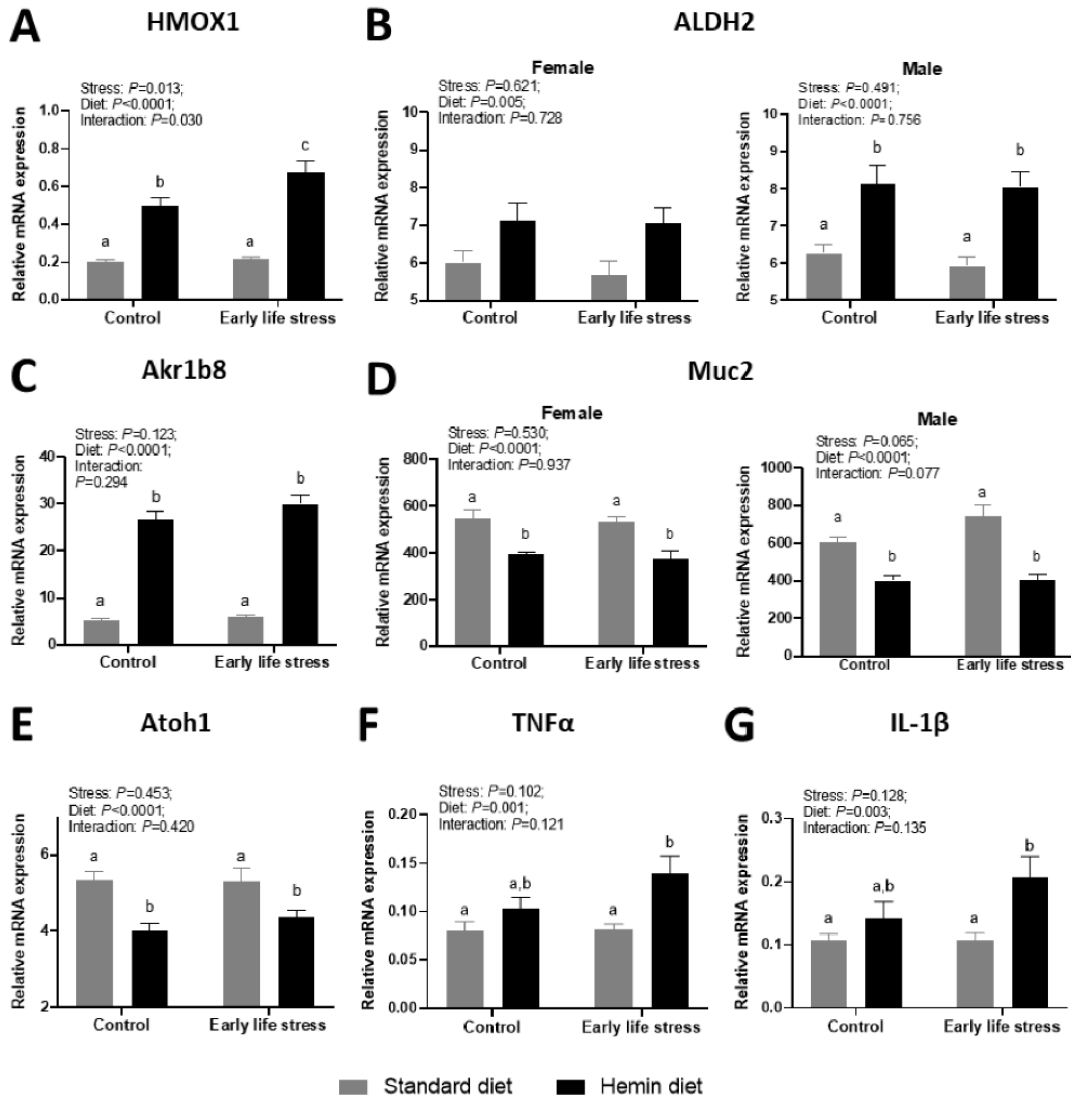


Fig. 3 Relative mRNA expression of genes implicated in heme catabolism (**A**: HMOX1), in aldehyde detoxification (**B**: ALDH2 in male and female, **C**: Akrlb8), in mucus barrier function (**D**: Muc2, **E**: Atoh1), and pro-inflammatory response (**F**: TNF α , **G**: IL-1 β). Same letters indicate no significant difference between the groups. Values are means \pm SEM, $n=10$ when results from male and female are separated, and $n=20$ when results from male and female are pooled.

Études réalisées et résultats



Fig. 4 Urinary and fecal lipid peroxidation markers. **A**, urinary biomarker of lipid peroxidation (DHN-MA) in male and female. **B**, lipid peroxidation in fecal water [measured as TBARs (MDA equivalents)]. Same letters indicate no significant difference between the groups. Values are means \pm SEM, $n=10$ when results from male and female are separated, and $n=20$ when results from male and female are pooled.

Études réalisées et résultats

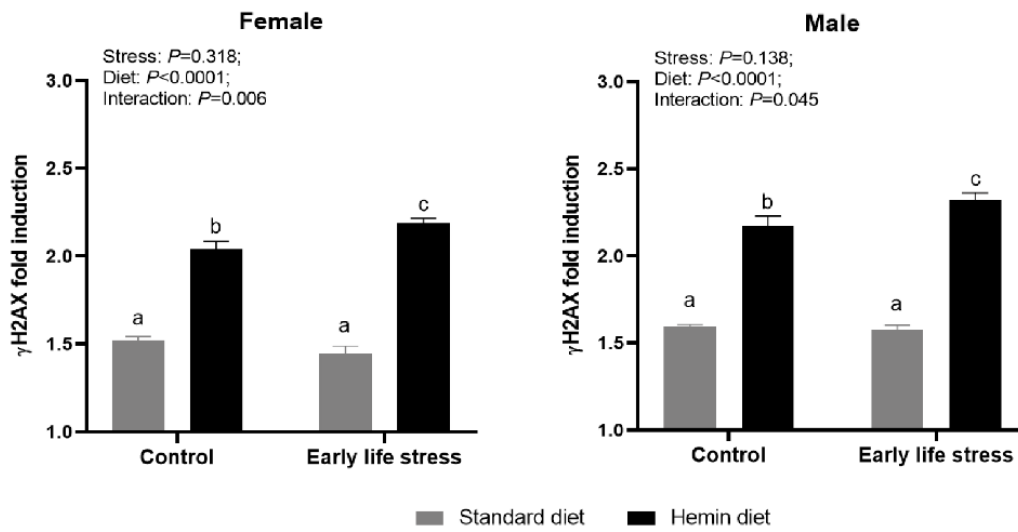


Fig. 5 Genotoxicity of fecal water diluted at 1/160 on *Apc +/+* cells. Values are means \pm SEM, $n=4$. Same letters indicate no significant difference between the groups.

Études réalisées et résultats

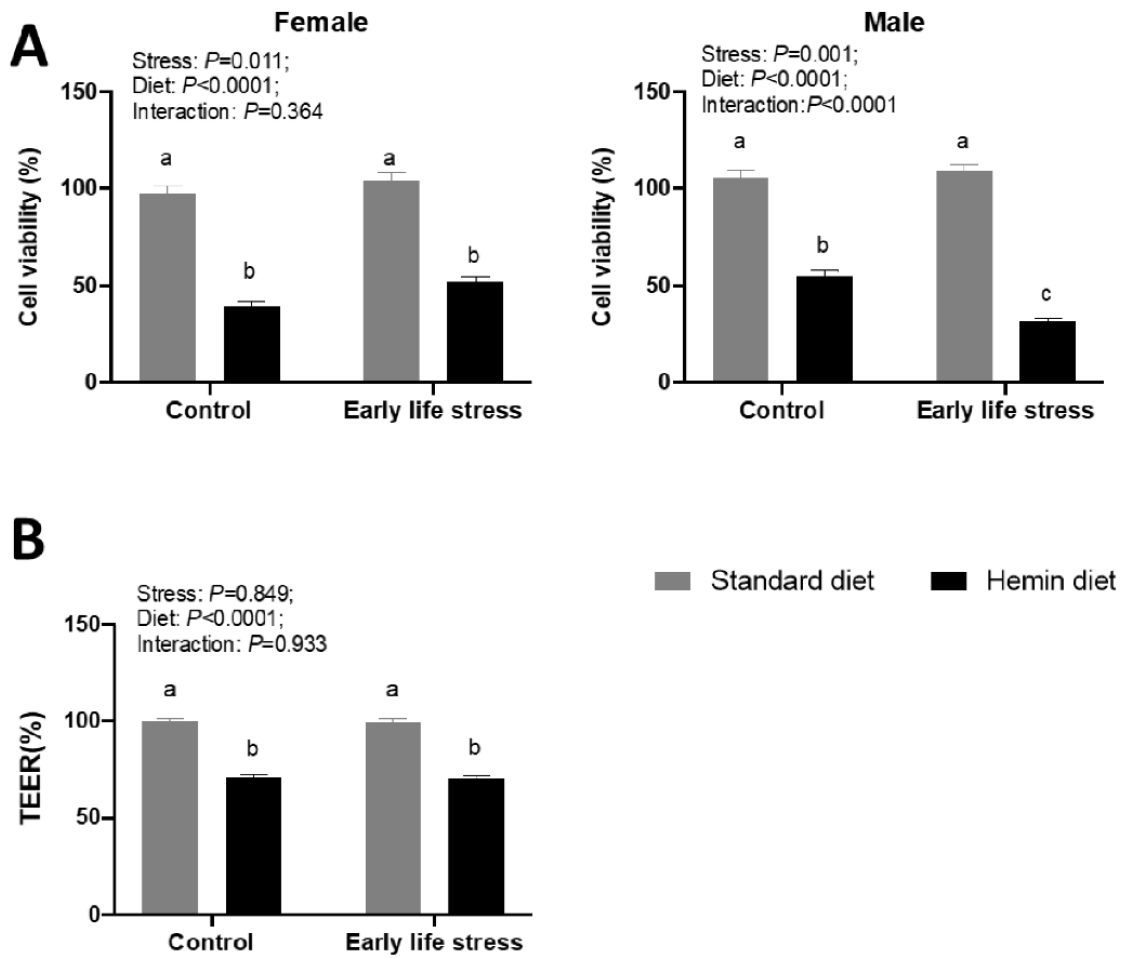


Fig. 6 Cell viability (A) and transepithelial electric resistance (B) of cells exposed to fecal water diluted at 1/80. Values are means \pm SEM, $n=4$. Same letters indicate no significant difference between the groups.

2.3. Discussion

2.3.1. Principaux résultats

Dans cette étude, et en accord avec la littérature, nous avons confirmé que **l'apport en fer héminique** augmentait la **prolifération cellulaire** et la **génétoxicité** au niveau de l'épithélium colique. Le fer héminique était également associé à une diminution du nombre de cellules à mucus, de l'expression colique du gène Muc2, gène codant la principale mucine, et du gène Atoh1, impliqué dans la différenciation des cellules sécrétoires, qui, pris ensemble pourraient par conséquent **altérer la couche de mucus colique**. De plus, comme dans les études précédentes de l'équipe, la cytotoxicité et la génétoxicité des eaux fécales étaient significativement augmentées par le régime riche en fer héminique. Ces résultats corrèlent avec **l'augmentation des produits de peroxydation lipidique** (TBARs) retrouvés dans les **eaux fécales** des souris nourries à l'hème, confirmant l'hypothèse proposée par l'équipe PPCA proposant que les **alcénals** seraient, au moins en partie, responsables de la cyto- et génétoxicité des eaux fécales ainsi que de l'hyperprolifération et la génétoxicité de observées *in vivo*. L'expression colique des **cytokines pro-inflammatoires** IL-1 β et TNF α étaient également **augmentées** par le régime riche en fer héminique, tel que cela a été précédemment observé par l'équipe PPCA chez le rat.

Le **stress de séparation maternelle (SSM)** était également associé à une augmentation de la **prolifération cellulaire** et de la **génétoxicité**, et à un **plus faible nombre de cellules à mucus** au niveau de l'épithélium colique. Le SSM seul n'avait cependant pas d'effet sur la génétoxicité et la cytotoxicité des eaux fécales, suggérant que les effets délétères sur la muqueuse colique ne résultent pas d'une toxicité accrue du contenu intestinal. Dans le sens de cette hypothèse, des études ont proposé que l'altération de la barrière intestinale résultant d'un stress résulterait de l'activation de l'axe HPA conduisant à une sécrétion de glucocorticoïdes et à l'activation des mastocytes intestinaux, provoquant une altération de la barrière intestinale (Barreau *et al.*, 2004b; Vanuytsel *et al.*, 2014; Albert-Bayo *et al.*, 2019). Donc dans ce cas, comme suggéré dans notre étude, l'altération de la barrière intestinale résultant du stress ne provenait pas d'une modification du contenu intestinal.

Par ailleurs, nos résultats montrent que certains **paramètres reflétant l'exposition au fer héminique** étaient **amplifiés** chez les souris nourries à l'hème ayant subi le **SSM**, alors que le

Études réalisées et résultats

SSM seul n'avait pas d'effet sur ces paramètres : 1) **l'expression colique relative de l'ARNm de HO-1**, principal gène impliquée dans le catabolisme de l'hème, était augmenté de 36% ($p=0,007$) chez les souris stressées nourries à l'hème par rapport aux souris non stressées nourries à l'hème ($P_{\text{interaction hème-SSM}}=0,03$) ; 2) le DHN-MA urinaire, métabolite majeur du HNE (un des principaux alcénals résultant de la peroxydation lipidique hème-induite) était augmenté de 42% ($p=0,13$) pour les mâles et 50% ($p=0,09$) pour les femelles chez les souris stressées nourries à l'hème par rapport aux souris non stressées nourries à l'hème (tendance non significative : $P_{\text{interaction hème-SSM}}=0,08$ chez les femelles et 0,13 chez les mâles); 3) les expressions coliques relatives des ARNm des cytokines pro-inflammatoires TNF α et IL-1 β , étaient augmentées de 35% pour le TNF α et de 46% ($p=0,16$) pour IL-1 β chez les souris stressées nourries à l'hème par rapport aux souris non stressées nourries à l'hème (tendance non significative : $P_{\text{interaction hème-SSM}}=0,12$ pour le TNF α et 0,14 pour IL-1 β).

De plus, nos résultats indiquent que le régime riche en fer héminique et le SSM auraient des **effets additifs** ou **synergiques**, sur les **effets délétères observés au niveau de l'épithélium colique**. En effet, la génotoxicité au niveau de l'épithélium colique était augmentée de 52% ($p=0,03$) par le SSM, de 26% ($p=0,51$) par le fer héminique, et de 137% ($p<0,0001$) avec les deux facteurs combinés ($P_{\text{interaction hème-SSM}}=0,03$). Le nombre de mitoses, chez les mâles, était augmenté de 38% ($p=0,37$) par le SSM, de 25% ($p=0,70$) par le fer héminique, et de 99% ($p=0,002$) avec les deux facteurs combinés, et chez les femelles, de 55% ($p=0,21$) par le SSM, de 50% ($p=0,28$) par le fer héminique, et de 110% ($p=0,003$) avec les deux facteurs combinés ($P_{\text{interaction hème-SSM}}>0,05$).

Enfin, nos résultats montrent que le **SSM** a également amplifié l'activité **cytotoxique** (uniquement chez les mâles) et **génotoxique** des **eaux fécales induites par le régime riche en fer héminique, contre des cellules épithéliales en culture**. En effet, malgré l'absence d'effet du SSM sur ces paramètres dans le cadre d'un régime standard, le SSM a par contre augmenté les activités génotoxique (de 6,9%, $P_{\text{interaction hème-SSM}}=0,006$ chez les mâles et de 7,4%, $P_{\text{interaction hème-SSM}}=0,045$ chez les femelles) et cytotoxique (de 42%, $P_{\text{interaction hème-SSM}}<0,0001$ chez les mâles) des eaux fécales dans le cadre d'un régime riche en hème. Les produits de peroxydation lipidique (TBARs) dans les eaux fécales n'ayant pas été impactés par le SSM, cette amplification ne peut pas être expliquée par l'augmentation de la formation d'alcénals. Il est possible que l'augmentation de l'exposition de la muqueuse colique au fer héminique luminal

Études réalisées et résultats

induite par le SSM ait déclenché une réponse inflammatoire (reflétée par l'augmentation de l'expression relative du TNF α et IL-1 β dans la muqueuse colique), conduisant à la sécrétion de molécules pro-inflammatoires dans le contenu intestinal et augmentant ainsi la toxicité des eaux fécales. Dans le sens de cette hypothèse, il a été montré qu'en réponse à une altération de la fonction de barrière intestinale, une réponse inflammatoire se met en place, conduisant à la sécrétion de molécules pro-inflammatoires qui ont été associées à une génotoxicité dans les muqueuses intestinales (Elinav *et al.*, 2013).

Cette étude est préliminaire, nous ne pouvons donc pas conclure avec certitude que le SSM, en augmentant la perméabilité intestinale, aurait augmenté l'exposition de la muqueuse colique au contenu intestinal, d'autant plus que i) nous n'avons pas montré que la perméabilité intestinale était augmentée par le SSM et ii) l'expression des gènes de détoxication des alcénals (ALDH2 et Akr1b8) chez les souris nourries avec le régime riche en hème n'a pas été amplifiée par le SSM.

2.3.2. Comparaison avec les autres études

Les effets génotoxique et hyperprolifératif du fer héminique sur la muqueuse colique sont cohérents avec les résultats d'études précédentes (Glei *et al.*, 2006; Ishikawa *et al.*, 2010; de Moura *et al.*, 2019). Les effets du fer héminique sur le mucus (diminution de l'expression de Muc2 et diminution du nombre de cellules à mucus) sont également cohérents avec une précédente étude ayant montré que l'hème altère la fonction de barrière de mucus, et que cette altération serait médiée par le microbiote intestinal (Ijssennagger *et al.*, 2015). L'augmentation de la cyto- et génotoxicité des eaux fécales des souris nourries avec du fer héminique, associée à une augmentation des produits de la peroxydation lipidique dans ces eaux fécales, est également cohérente avec les études précédentes (Pierre *et al.*, 2006; Bastide *et al.*, 2015; Martin *et al.*, 2019).

A notre connaissance la génotoxicité et la prolifération dans l'épithélium colique induites par le SSM n'avaient encore jamais été explorées. Mais de manière concordante avec l'augmentation de prolifération colique observée chez les souris soumises aux SSM, une précédente étude avait montré que des rats soumis à un stress chronique présentaient une hyperprolifération au niveau de l'iléon (Boudry *et al.*, 2007). Ces résultats sont également cohérents avec les nombreuses études ayant rapporté des effets délétères du SSM sur la

Études réalisées et résultats

fonction de barrière de l'intestin (Ferrier *et al.*, 2003; Overman *et al.*, 2012; Ayyadurai *et al.*, 2017; Hattay *et al.*, 2017).

2.3.3. *Relevance des résultats*

Cette étude **confirme les effets du fer héminique sur la génotoxicité et l'hyperprolifération au niveau de la muqueuse colique**, deux évènements majeurs **précoces** de la **carcinogénèse colorectale**. Mais cette étude a plus particulièrement proposé que **le SSM pourrait amplifier les effets délétères du fer héminique sur la muqueuse colique**, par additivité, synergie ou potentialisation, en fonction des paramètres étudiés.

Ces résultats vont dans le même sens que notre étude épidémiologique ayant montré un plus important risque de cancer hème-induit chez les anxieux. Cela ne contredit pas notre hypothèse selon laquelle le stress, via son impact sur la barrière intestinale, augmenterait les effets délétères du fer héminique et le risque de cancer colorectal. Cependant, cette étude ne nous aura pas permis de montrer que c'est une augmentation de perméabilité générée par le stress qui augmente les effets délétères du fer héminique. Le SSM, de la même manière que le fer héminique, a provoqué des effets délétères sur la muqueuse colique. Les effets délétères retrouvés chez les souris nourries avec un régime riche en fer héminique et ayant subi le SSM ne **résultent donc pas uniquement d'une augmentation de la perméabilité et donc l'exposition de l'épithélium colique au contenu intestinal**, mais ils **incluent les dommages générés par le stress lui-même**.

2.3.4. *Forces et limites de l'étude*

Une des principales forces de cette étude est son design ayant permis de ne faire varier que les paramètres d'intérêt (le stress et le régime) en contrôlant le reste de l'environnement. Les souris ont été aléatoirement réparties dans les différents groupes, ainsi les différences que nous observons entre nos groupes ne résultent que du stress de séparation maternelle ou du régime, ou éventuellement du sexe des animaux lorsque nous avons regardé les différences entre mâles et femelles. De nombreux paramètres ont été analysés pour répondre à notre hypothèse, y compris la génotoxicité et la prolifération cellulaire au niveau de l'épithélium intestinal, deux évènements précoces de la carcinogénèse colorectale.

Études réalisées et résultats

Cependant cette étude comporte certaines limites. Il s'agit d'une étude court terme ne permettant pas d'explorer le risque de carcinogenèse. Le stress de séparation maternelle n'est pas le modèle de stress psychologique le plus représentatif du stress lié au mode de vie retrouvé dans les sociétés occidentales. Les résultats obtenus chez la souris ne sont pas directement transposables à l'Homme, d'autres études, expérimentales ou épidémiologiques observationnelles menées sur l'Homme, sont nécessaires pour confirmer notre hypothèse.

Études réalisées et résultats

Tableau 1 : P-values des tests évaluant l'effet du sexe, du stress et du régime, et des interactions entre ces facteurs et différences entre les groupes (en %), P-values estimées par test de comparaison multiples du Tukey

Effet du sexe (P-value)	P-values par facteur (ANOVA 2 facteurs)				Comparaisons multiples (test de Tukey)(% de différence (P-value))							
	Stress	Diet	Interaction		CS vs. C	H vs. C	HS vs. C	HS vs. H				
	Mâles Femelles	Mâles Femelles	Mâles Femelles		Mâles Femelles	Mâles Femelles	Mâles Femelles	Mâles Femelles				
Marqueurs de prolifération (PCNA et nomres de cellules en mitoses), de génotoxicité (H2AX) et nombre de cellules à mucus dans l'épithélium colique												
PCNA	0,0043	0,002 <0,0001	0,002 <0,0001	0,206 0,913	+29,87% (P=0,013)	+21,16% (P=0,005)	+29,61% (P=0,014)	+21,4% (P=0,005)	+43,37% (P=0,0004)	+43,44% (P<0,0001)	+10,62% (P=0,412)	+18,15% (P=0,004)
Mitoses	<0,0001	0,002 0,007	0,014 0,013	0,272 0,917	+37,65% (P=0,369)	+55,38% (P=0,207)	+24,85% (P=0,696)	+50,43% (P=0,277)	+98,68% (P=0,002)	+109,84% (P=0,003)	+59,13% (P=0,019)	+39,49% (P=0,16)
Cellules à mucus	0,1140	0,047	0,003	0,002	-18,4% (P=0,003)				-17,7% (P=0,004)		+5,59% (P=0,804)	
gH2AX	0,4990	<0,0001	<0,0001	0,029	+52,11% (P=0,034)		+26,37% (P=0,505)		+137,35% (P<0,0001)		+87,83% (P<0,0001)	
Expression relative de l'ARNm de gènes cibles des aldéhydes (Akt1b8 et ALDH2), de l'hème (HMOX1), de gène impliqués dans la sécrétion de mucus (Atoh1 et Muc2) et dans l'inflammation (TNFα et IL-1β)												
Akt1b8	0,1532	0,123	<0,0001	0,294	+12,31% (P=0,984)	+40,54% (P<0,0001)	+68,53% (P<0,0001)	+12,68% (P=0,269)				
ALDH2	0,0349	0,623 0,621	<0,0001 0,005	0,756 0,728	-5,17% (P=0,948)	-5,76% (P=0,924)	+29,98% (P=0,01)	+18,18% (P=0,201)	+28,82% (P=0,02)	+17,18% (P=0,323)	-0,9% (P=0,999)	-0,84% (P=0,9996)
HMOX1	0,5803	0,013	<0,0001	0,030	+6,43% (P=0,995)	+146,89% (P<0,0001)	+236,57% (P<0,0001)	+36,33% (P=0,007)				
Atoh1	0,2787	0,453	<0,0001	0,420	-0,26% (P>0,9999)	-24,81% (P=0,001)	-18,02% (P=0,027)	+9,03% (P=0,701)				
Muc2	0,0014	0,065 0,530	<0,0001 <0,0001	0,077 0,937	+22,51% (P=0,052)	-3,01% (P=0,977)	-34,2% (P=0,002)	-27,9% (P=0,004)	-33,69% (P=0,003)	-31,79% (P=0,001)	+0,77% (P>0,9999)	-5,4% (P=0,96)
TNF α	0,3339	0,102	0,001	0,121	+1,24% (P>0,9999)	+28,4% (P=0,455)	+2,84% (P=0,455)	+73,87% (P=0,004)			+35,41% (P=0,132)	
IL-1 β	0,3976	0,128	0,003	0,135	+0,66% (P>0,9999)	+32,87% (P=0,641)	+94,48% (P=0,01)	+46,37% (P=0,161)				
Marqueurs de la peroxydation lipidique dans les feces (TBARS) et dans les urines (DHN-MA)												
TBARS	0,4277	0,316	<0,0001	0,684	+56,7% (P=0,973)	+1575,13% (P<0,0001)	+1708,66% (P<0,0001)	+7,97% (P=0,74)				
DHN-MA	0,0032	0,126 0,082	<0,0001 <0,0001	0,127 0,080	+4,49% (P>0,9999)	-23,05% (P>0,9999)	+8865% (P<0,0001)	+15283% (P<0,0001)	+12654% (P<0,0001)	+22985% (P<0,0001)	+42,27% (P=0,13)	+50,07% (P=0,094)
Viabilité, génotoxicité et résistance trans-épithéliale (TEER) de cellules Apc\pm exposées aux eaux fécales												
Viabilité	0,1570	0,001 0,011	<0,0001 <0,0001	<0,0001 0,364	+3,31% (P=0,805)	+6,35% (P=0,609)	-48,19% (P<0,0001)	-60,08% (P<0,0001)	-69,82% (P<0,0001)	-47,01% (P<0,0001)	-41,74% (P<0,0001)	+32,74% (P=0,069)
Génotoxicité	<0,0001	0,138 0,318	<0,0001 <0,0001	0,045 0,006	-1,5% (P=0,975)	-4,93% (P=0,469)	+35,86% (P<0,0001)	+33,84% (P<0,0001)	+45,24% (P<0,0001)	+43,69% (P<0,0001)	+6,91% (P=0,065)	+7,36% (P=0,039)
TEER	0,0686	0,849	<0,0001	0,933	-0,41% (P=0,9973)	-29,28% (P<0,0001)			-29,44% (P<0,0001)		-0,23% (P=0,9998)	

3. CYTOTOXICITE DES ALCENALS *IN VITRO* SUR BARRIERE EPITHELIALE INTESTINALE SAINES OU ALTEREE

Les alcénals proviennent de la peroxydation des lipides, qui est favorisée par le fer héminique de la viande rouge et de la charcuterie. Il a été montré *in vivo* et *in vitro* que ces alcénals étaient génotoxiques et cytotoxiques vis-à-vis des cellules épithéliales intestinales. Il a été montré *in vitro*, que les alcénals étaient plus cytotoxiques vis-à-vis de cellules murines saines (cellules Apc +/+) que vis-à-vis de cellules murines précancéreuses qui possèdent une mutation sur le gène Apc (cellules Apc min/+), entraînant une sélection des cellules précancéreuses par rapport aux cellules saines, ce qui pourrait participer à l'augmentation du risque de cancer. La cytotoxicité des alcénals expliquerait donc, au moins en partie, la cancérogénicité de la viande rouge et de la charcuterie.

Notre étude épidémiologique a permis de montrer que l'association positive entre consommation de viande rouge et charcuterie, ou l'apport en fer héminique provenant de ces viandes, et le risque de cancer colorectal était amplifiée chez les personnes anxieuses dans la cohorte Nutrinet-Santé. Notre étude expérimentale effectuée sur la souris a permis de montrer que le stress de séparation maternelle amplifiait les effets délétères sur la muqueuse colique induits par l'apport en fer héminique. Cependant, cette étude ne nous aura pas permis de montrer que c'est une augmentation de la perméabilité intestinale, qui en augmentant l'exposition de l'épithélium colique aux alcénals néoformés dans la lumière intestinale, aurait amplifié leurs effets délétères sur la muqueuse colique.

L'objectif de cette partie a été d'explorer l'effet d'une augmentation de perméabilité intestinale sur la cytotoxicité et la génotoxicité des alcénals, *in vitro*.

Nous avons dans un premier temps procédé à la mise en place d'un modèle *in vitro* de barrière intestinale altérée, et nous avons ensuite exploré la cytotoxicité et la génotoxicité induite par les alcénals, purifiés ou sous forme d'eau fécale, sur ce modèle de barrière intestinale altérée.

3.1. Mise au point d'un modèle *in vitro* de barrière épithéliale intestinale altérée

Dans cette première partie, nous décrivons la démarche méthodologique que nous avons mis en œuvre pour 1) mettre en place notre modèle *in vitro* de barrière épithéliale intestinale altérée, et 2) mesurer la viabilité des cellules de ce modèle après exposition aux alcénals.

3.1.1. Contexte

Dans un premier temps, nous allons exposer les éléments de la littérature et les critères sur lesquels nous nous sommes basés pour élaborer le modèle *in vitro* de barrière épithéliale intestinale altérée, et pour mesurer la viabilité des cellules de ce modèle après exposition aux alcénals.

▪ **Choix de la lignée cellulaire**

La lignée cellulaire Caco-2 (**C**ancer **coli**-2) a été établie à partir d'un adénocarcinome colorectal humain par Jorgen Fogh dans les années 1970. Ces cellules ont la capacité de se différencier spontanément lorsqu'elles atteignent la confluence (Lea, 2015). Une fois confluentes, elles commencent à se polariser en acquérant une bordure en brosse apicale, puis des jonctions serrées se forment entre les cellules adjacentes. Une fois différenciées, les Caco-2 expriment plusieurs propriétés morphologiques et fonctionnelles caractéristiques des entérocytes de l'intestin grêle, des marqueurs de colonocytes sont également présents. Les cellules Caco-2 expriment la plupart des récepteurs, transporteurs et enzymes que l'on trouve dans l'épithélium normal. Il a été montré que les monocouches polarisées de cellules Caco-2 représentent un modèle fiable pour étudier l'absorption de médicaments et d'autres composés après ingestion orale chez l'homme. Une corrélation élevée entre les coefficients de perméabilité des Caco-2 et les données d'absorption chez l'Homme a été rapportée, en particulier en cas de transport paracellulaire passif. En raison de ces propriétés de croissance et de différenciation, les Caco-2 ont été largement utilisées comme modèle de la barrière épithéliale intestinale.

Études réalisées et résultats

▪ Culture des cellules sur inserts et mesure de la TEER

La différenciation morphologique et fonctionnelle des Caco-2 est améliorée lorsque les cellules sont cultivées sur des inserts poreux (Figure 23). Il s'agit de dispositifs de support perméables conçus pour produire un environnement de culture cellulaire ressemblant de près à l'état *in vivo*. La culture sur inserts permet également d'étudier le passage de composés à travers la monocouche de cellules.

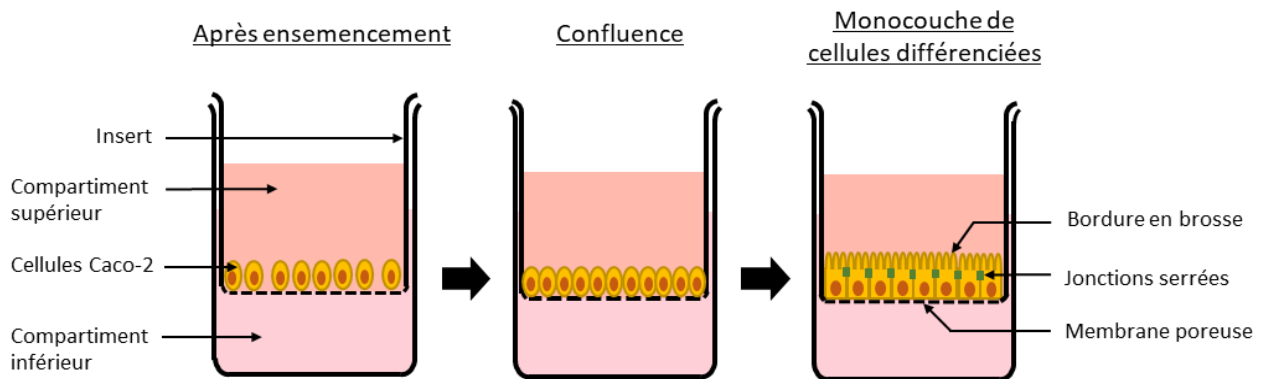


Figure 23 : Croissance et différenciation des Caco-2 sur insert

Une fois à confluence, les cellules Caco-2 se différencient spontanément pour exprimer les caractéristiques morphologiques et fonctionnelles des entérocytes intestinaux. Lorsqu'elle est polarisée et confluite, la couche cellulaire forme une barrière continue entre les compartiments supérieur (apical) et inférieur (basolatéral). De cette manière, la perméabilité, l'absorption et le transport transépithélial de tout composé peut être étudié.

L'accès aux pôles apical et baso-latéral des cellules sur inserts permet de mesurer la résistance électrique trans-épithéliale (TEER) de la monocouche de cellules. Il s'agit d'une méthode très sensible et fiable pour confirmer l'intégrité et la perméabilité de la monocouche. Deux électrodes sont utilisées, une électrode placée dans le compartiment supérieur (pôle apical) et l'autre dans le compartiment inférieur (pôle baso-latéral) et la monocouche cellulaire se trouve entre les 2 électrodes (Figure 24).

Études réalisées et résultats

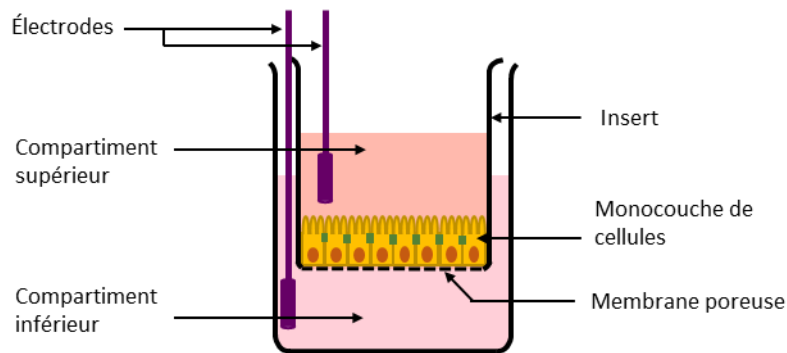


Figure 24 : Mesure de la TEER d'une monocouche de cellules différenciées sur insert

▪ **Altération de la barrière intestinale**

Le facteur de nécrose tumorale α (TNF- α) et l'interféron γ (IFN- γ), qui sont augmentés dans de nombreux états pathologiques, sont des cytokines pro-inflammatoires. Il a été montré *in vivo* et *in vitro* que le TNF- α et l'IFN- γ augmentent la perméabilité de l'épithélium intestinal. Le mécanisme impliqué n'est pas encore complètement compris mais il impliquerait l'activation de la MLCK provoquant l'ouverture des jonctions serrées (Ferrier *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2005; Capaldo and Nusrat, 2009; Capaldo *et al.*, 2014). En effet, la TEER des caco-2 différenciées sur inserts est diminuée suite à l'ajout de TNF- α et/ou d'IFN- γ dans le compartiment baso-latéral. Cependant, selon les études, les protocoles utilisés diffèrent: la densité d'ensemencement des cellules sur les inserts, la durée de croissance des cellules sur insert avant traitement aux cytokines, la présence de SVF dans le milieu concentrations des cytokines, durées d'exposition à ces cytokines (Zolotarevsky *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2005; Cui *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2011, 2012; Cao *et al.*, 2013; Watari *et al.*, 2017). Le Tableau 2 regroupe les différences entre les protocoles retrouvés dans la littérature.

De plus, il a été montré que le nombre de passages des cellules utilisées influait sur la croissance et la morphologie des Caco-2 ainsi que sur la TEER (Briske-Anderson *et al.*, 1997). Enfin, ce modèle est destiné à être utilisé pour étudier l'exposition des alcénals en situation de barrière épithéliale intestinale altérée. Les alcénals s'adduisant sur les protéines du SVF, du milieu sans SVF est utilisé lorsque l'on étudie l'effet des alcénals sur les cellules. Dans la littérature, la présence de SVF lors de l'exposition au TNF- α et à l'IFN- γ est rarement précisée (Tableau 2).

Études réalisées et résultats

Tableau 2 : Hétérogénéité des protocoles d'altération de la perméabilité d'une monocouche de Caco-2 par des cytokines inflammatoires

ARTICLE	DENSITE ENSEMENCEMENT	DUREE CROISSANCE	SVF (%)	[TNF] (NG/ML)	[IFN] (NG/ML)	DUREE TRAITEMENT (HEURES)	EFFET SUR LA TEER
CUI ET AL., 2010	?	21 jours	0	10 or 100	0	0, 4, 8, 16, ou 24	-30% (TNF 10ng/mL ; 24h)
CAO ET AL., 2013	50 000 cellules /cm ²	14 jours	10% ?	10	10	48	-30%
LIU ET AL., 2012	50 000 cellules /cm ²	Après confluence	15% ?	10	10	24 ou 48	-20% à 24 heures; -30% à 48 heures
LIU ET AL., 2011	50 000 cellules /cm ²	Après confluence	15% ?	10	10	48	-25%
WANG ET AL., 2005	?	17 à 20 jours après confluence	?	5 ou 10	10	48	-50% (TNF 5ng/mL) -80% (TNF 10ng/mL)
ZOLOTAREVSKY ET AL., 2002	?	18 à 25 jours après confluence	?	100	100 U/mL	72	-20%
WATARI ET AL., 2017	60 000 cellules / puit	10 à 14 jours	?	10	0	24 ou 48	-40% (à 24 et 48 heures)

▪ Détermination du test à utiliser pour mesurer la viabilité des Caco-2 sur inserts

Les protocoles de tests de cytotoxicité sur inserts sont rares dans la littérature : dans la plupart des études, les effets sur la TEER et la cytotoxicité sont étudiés séparément, et la cytotoxicité est évaluée en plaque P96. Les inserts ayant une influence sur la différenciation et la morphologie des cellules, nous avons effectué le test de viabilité sur insert, dans les mêmes conditions que la mesure de TEER. Le protocole de mesure de viabilité doit donc être adapté pour des cellules différenciées sur inserts. En effet, la culture sur insert implique la présence de deux compartiments (inférieur et supérieur) qui communiquent via une membrane poreuse sur laquelle poussent les cellules. Les composés permettant de mesurer la viabilité ou la cytotoxicité pourraient donc possiblement passer du compartiment supérieur au compartiment inférieur, ou la membrane poreuse de l'insert pourrait interférer avec ces composés, faussant ainsi les résultats du test. Nous avons comparé la reproductibilité de plusieurs tests de viabilité cellulaire après exposition à un alcénal dont nous connaissons la toxicité sur d'autres lignées cellulaires, le HNE.

En raison 1) de la diversité des protocoles trouvés dans la littérature, 2) de la diversité des différentes lignées de Caco-2, et 3) de l'utilisation que nous souhaitons faire de ce modèle de

Études réalisées et résultats

barrière altérée (présence d'alcénals qui nécessitent l'absence de SVF dans le milieu), des expérimentations préliminaires ont été effectuées pour mettre au point notre modèle de barrière épithéliale intestinale altérée.

3.1.2. *Matériel et méthode*

Les cellules Caco-2 ont été utilisées entre les passages 51 et 60. Pour l'entretien de la lignée, les cellules étaient repiquées une fois par semaine dans des flasques T75 en reprenant 1/25^{ème} des cellules (environ 500 000 cellules lorsque la flasque T75 était à 90% de confluence). La croissance et la différenciation des cellules se faisait à 37°C avec 5% de CO₂, avec du milieu complet (DMEM contenant 10% SVF, 5% de L-glutamine et 5% d'un mélange de pénicilline (5000 U/mL) et streptomycine (5000 µg/mL)).

Des inserts stériles de 0,33 cm² avec une membrane en polyester contenant des pores de 0,4 µm de diamètre ont été utilisés pour la croissance et la différenciation des cellules (Corning-Costar).

Un CellZScope® a été utilisé pour mesurer la TEER. Cet appareil permet la mesure de TEER en temps réel de 24 puits simultanément. On y place les inserts en ayant accès aux pôles apical et baso-latéral, une électrode est présente au fond de chaque puit (compartiment inférieur, pôle baso-latéral), et une autre électrode est immergée dans le compartiment supérieur (pôle apical).

▪ ***Mise en place du modèle de barrière épithéliale intestinale altérée***

La mise en place de notre modèle de barrière épithéliale intestinale altérée a consisté à :

- 1)ensemencer 50 000 cellules Caco-2 par insert, les placer dans le CellZScope, les laisser proliférer puis se différencier jusqu'à avoir une stabilisation de la TEER.
- 2) Une fois la TEER stable (vers J14 après ensemencement), du TNF-α et de l'IFN-γ sont ajoutés dans le compartiment inférieur à différentes concentrations, avec ou sans SVF, et la TEER est mesurée pendant 72 heures.
- 3) La viabilité des cellules est mesurée après exposition aux cytokines pour vérifier que la baisse de TEER ne résulte pas d'une cytotoxicité induite par les cytokines.

Études réalisées et résultats

Le TNF- α a été ajouté dans le compartiment inférieur à 100 ng/mL ou 10 ng/mL, avec ou sans présence d'IFN- γ à 10 ng/mL, et IFN- γ à 10 ng/mL sans TNF- α . Les conditions TNF- α à 100 ng/mL \pm IFN- γ à 10 ng/mL ont été testées en présence ou en absence de SVF.

▪ *Comparaison de quatre tests de mesure de la viabilité Caco-2 sur inserts*

Les cellules Caco-2 ont étéensemencées à 50 000 cellules par insert. Le milieu a été changé tous les 2 ou 3 jours jusqu'au traitement. Vingt et un jours après ensemencement, les Caco-2 ont été exposées du HNE à 160 μ M (ajouté en apical) dilué dans du milieu sans SVF pendant 24 heures. Du milieu sans SVF a été ajouté dans les puits contrôles. Dans tous les puits, le milieu du compartiment inférieur a été changé par milieu sans SVF. Après 24 heures, 4 tests de viabilité cellulaires ont été effectués. Chaque test a été effectué sur 3 puits traités au HNE et 3 puits contrôles, la totalité de l'expérimentation a été répétée : 2 essais identiques ont été réalisés pour évaluer la reproductibilité des tests.

1. *Wst-1*

Le principe de ce test est de déterminer la viabilité cellulaire en fonction de la capacité des cellules à réduire le tétrazolium en formazan par l'action d'une enzyme (l'oxydoréductase cellulaire NADPH-dépendante) qui n'est présente que dans les cellules viables. La quantité de formazan formée peut être quantifiée en mesurant l'absorbance de la solution à 440 nm.

Après 24 heures d'exposition aux alcénals, le milieu du compartiment apical a été aspiré et 100 μ L d'une solution de Wst-1 au 1/10 dilué dans du milieu sans SVF a été ajouté dans le compartiment apical. Après 15 minutes d'incubation à 37°C, le contenu du puit a été transféré dans une plaque P96 et l'absorbance à 440 nm a été mesurée.

2. *Rouge neutre*

Le principe de ce test est basé sur la détection de cellules viables via l'absorption du colorant rouge neutre. Les cellules viables peuvent absorber le rouge neutre via un transport actif et incorporer le colorant dans leurs lysosomes, mais les cellules non viables ne peuvent pas absorber ce chromophore. Par conséquent, après lavage et lyse des cellules, le test d'absorption du rouge neutre fournit une mesure quantitative du nombre de cellules viables.

Après 24 heures d'exposition aux alcénals, les tapis cellulaires ont été rincés avec 150 μ L de PBS, puis 100 μ L d'une solution de rouge neutre à 40 μ G/mL sont ajoutés dans le puit. Après 2

Études réalisées et résultats

heures d'incubation à 37°C, les tapis cellulaires ont été rincés avec 150µL de PBS et 150µL d'une solution de lyse (48% d'éthanol absolu, 51% eau milliQ, 1% d'acide acétique) a été ajoutée. La lyse cellulaire s'est effectuée à température ambiante avec agitation, pendant 15 minutes. Le contenu du puit a ensuite été transféré dans une plaque P96 et l'absorbance à 540 nm ainsi que la fluorescence (ex : 530 nm, em : 645 nm) ont été mesurées.

3. *Alamar blue*

Le test de viabilité cellulaire Alamar blue contient un colorant bleu perméable aux cellules, non toxique et faiblement fluorescent, appelé resazurine. La resazurine est utilisée comme un indicateur d'oxydoréduction (REDOX) qui subit un changement colorimétrique lors des réactions de réduction. La forme réduite, la résorufine, est rose et très fluorescente, et l'intensité de la fluorescence produite est proportionnelle au nombre de cellules vivantes métaboliquement actives. L'avantage de ce test est qu'il ne lyse pas les cellules, d'autres analyses peuvent donc être effectuées sur les cellules après la mesure de la viabilité.

Après 24 heures d'exposition aux alcénals, le milieu du compartiment apical a été aspiré et 100µL d'une solution d'Alamar blue au 1/10 dilué dans du milieu sans SVF ont été ajoutés dans le compartiment apical. Après 2 heures d'incubation à 37°C, le contenu du puit a été transféré dans une plaque P96 et l'absorbance à 440 nm a été mesurée.

4. *LDH (CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay)*

La lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme cytosolique présente dans de nombreux types de cellules différents. L'altération de la membrane plasmique entraîne une libération de la LDH dans les milieux de culture cellulaire environnants. Cette LDH extracellulaire peut être quantifiée par une réaction enzymatique couplée pendant laquelle la LDH catalyse la conversion du lactate en pyruvate via la réduction du NAD⁺ en NADH. Le sel de tétrazolium (INT) est réduit par le NADH en un produit de formazan rouge pouvant être mesuré à 492 nm. La formation du formazan est directement proportionnelle à la quantité de LDH sécrétée dans les milieux.

Après 24 heures d'exposition au alcénals, le contenu du compartiment apical a été transféré dans une plaque P96 et dilués au 10^{ème} dans du PBS. Une solution de lyse (provenant du kit) diluée au 10^{ème} dans du milieu sans SVF a été ajoutée. Après 45 minutes d'incubation à 37°C, les lysats ont été transférés dans une plaque P96 et dilués au 50^{ème} dans du PBS. 50µL de cette

Études réalisées et résultats

solution ont été transférés dans un puit vide en duplicat, 50µL de réactif ont été ajoutés. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, 50 µL de solution stop ont été ajoutés, et l'absorbance (à 492 nm) a été mesurée.

▪ *Statistiques*

Des tests de Students ou des ANOVA à 1 facteur avec comparaisons au contrôle ont été effectuées. Une p-value < 0,05 a été considérée significative.

3.1.3. Résultats

▪ *Effet du TNF-α et de l'IFN-γ sur la TEER de Caco-2 différenciées*

Les résultats sont présentés dans la Figure 25. La TEER est représentée en fonction de T0 (la première mesure de TEER) et de la moyenne des puits contrôles (non traités).

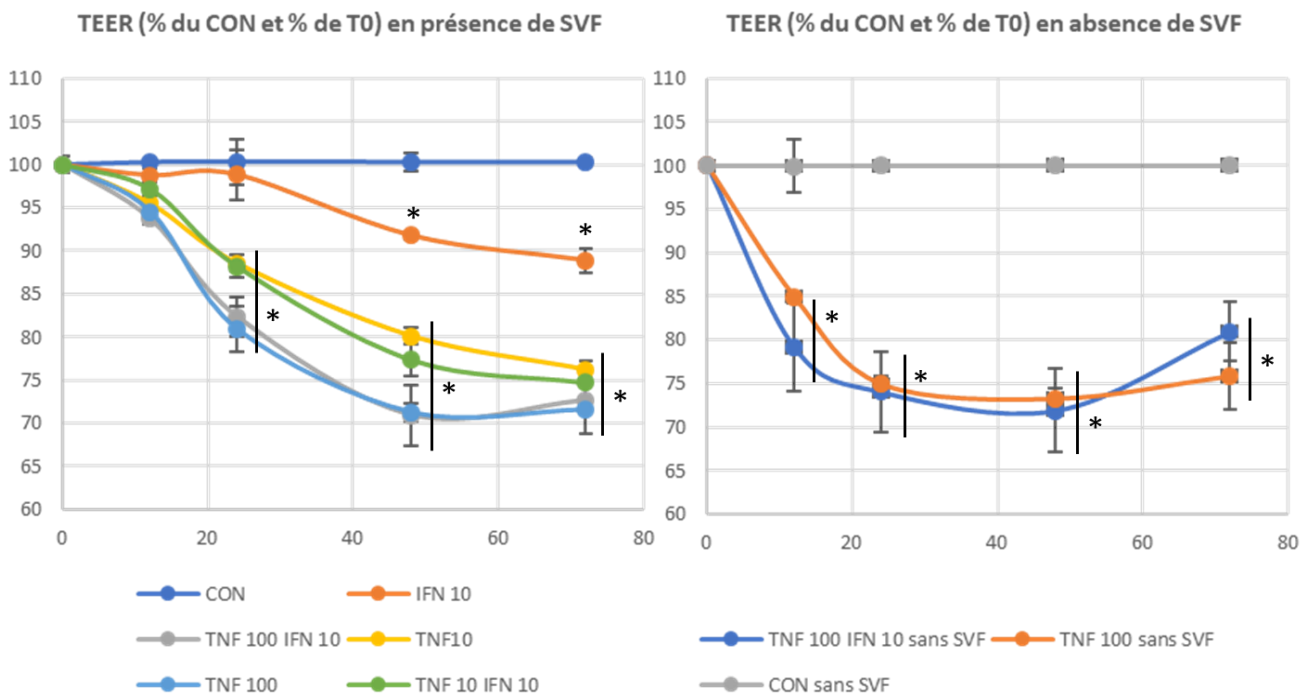


Figure 25 : Résistance électrique trans-épithéliale des Caco-2 différenciées sur inserts lors de l'exposition à des cytokines inflammatoires à 12, 24, 48 et 72 heures.

CON: puits contrôles non traités; TNF 100: puits traités avec du TNF-α à 100 ng/mL; TNF 10: puits traités avec du TNF-α à 10 ng/mL; IFN 10 : puits traités avec de l'IFN-γ à 10 ng/mL ; n=3. Les * indiquent une différence significative avec le CON (avec SVF à gauche, sans SVF à droite) mesuré au même temps.

Études réalisées et résultats

Les résultats (Figure 25) ont montré que :

- 1) En présence de SVF, l'ajout de TNF- α à 100 ng/mL dans le compartiment inférieur des inserts entraîne une diminution de la TEER d'environ 20% ($p=0,0008$) après 24 heures d'exposition, d'environ 30% ($p<0,0001$) après 48 heures ou 72 heures d'exposition. La présence d'IFN- γ à 10 ng/mL en plus du TNF- α ne modifie pas ces résultats ($p=0,999$).
- 2) En présence de SVF, l'ajout de TNF- α à 10 ng/mL dans le compartiment inférieur des inserts entraîne une diminution de la TEER d'environ 12% ($p=0,016$) après 24 heures d'exposition, d'environ 20% ($p=0,0006$) après 48 heures, et d'environ 25% ($p=0,0003$) après 72 heures d'exposition. Aucun effet significatif de l'IFN- γ à 10 ng/mL n'a été observé pour cette concentration de TNF- α ($p=0,999$).
- 3) En absence de SVF, l'ajout de TNF- α à 100 ng/mL dans le compartiment inférieur des inserts entraîne une diminution de la TEER d'environ 25% ($p=0,0002$) après 24 heures d'exposition, d'environ 30% ($p=0,0003$) après 48 heures, et d'environ 22% ($p=0,0017$) après 72 heures d'exposition. Aucun effet significatif de l'ajout d'IFN- γ à 10 ng/mL n'a été observé dans ces conditions ($p>0,84$).

Études réalisées et résultats

■ Comparaison de quatre tests de mesure de la viabilité Caco-2 sur inserts

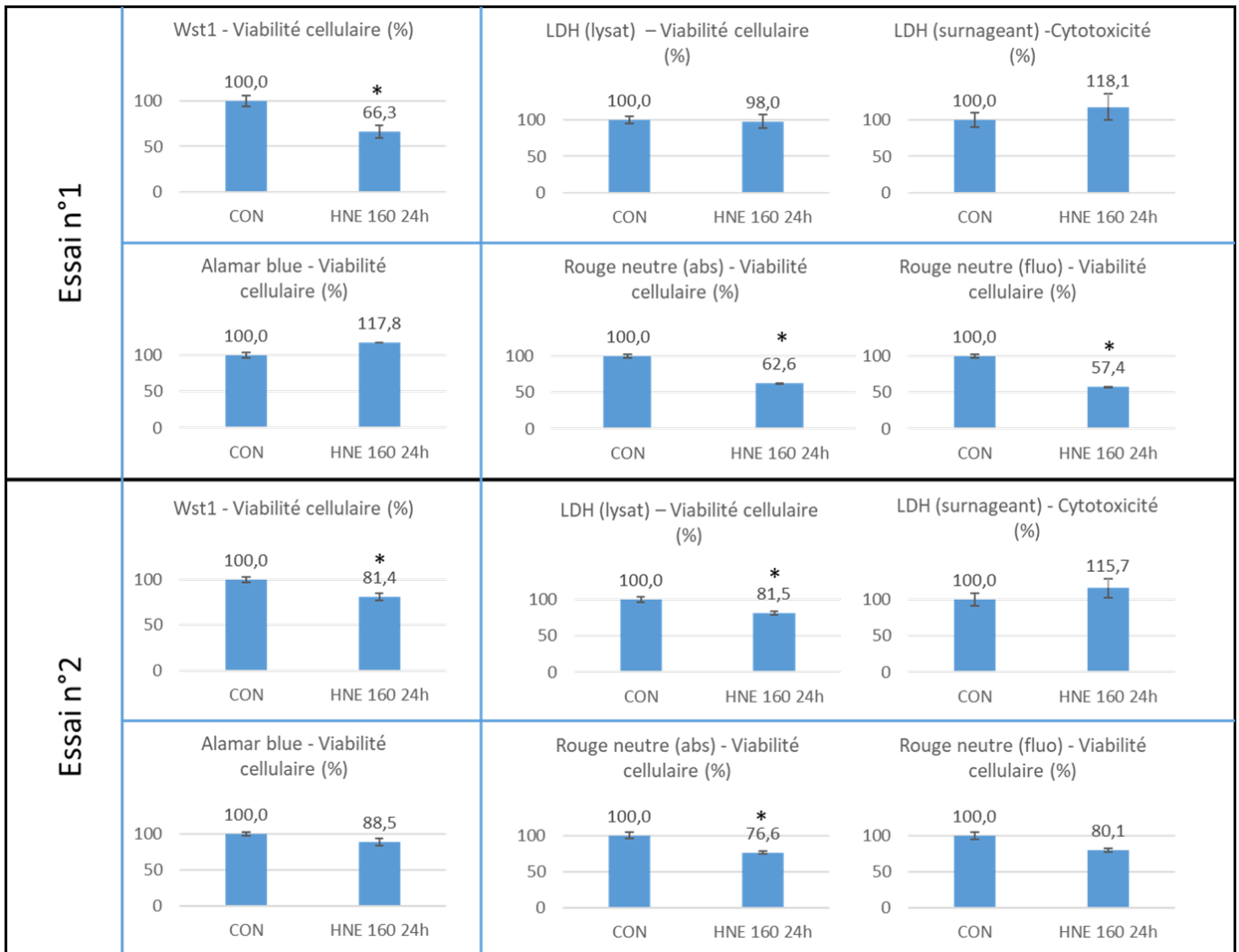


Figure 26 : Résultats des différents tests de cytotoxicité effectués sur des Caco-2 cultivées sur inserts et exposées pendant 24 heures à du HNE à 160 µM. Les * indiquent une différence significative avec le contrôle (CON).

Les résultats sont représentés dans la Figure 26. Les résultats obtenus avec le Wst-1 indiquent une viabilité cellulaire de 66,3% ($p=0,02$) après l'exposition de 24 heures au 4-HNE pour le premier essai, et de 81,4% ($p=0,02$) pour le deuxième essai. Les SEM sont faibles et la différence obtenue entre les deux essais peut résulter d'une réponse des cellules au HNE différente, en raison de la différence de passage ou plus probablement d'une différence de confluence au moment du traitement. Ce test semble donc adapté à la mesure de viabilité des Caco-2 sur inserts.

Les résultats obtenus avec le test LDH indiquent une viabilité cellulaire de 98% ($p=0,8$) après l'exposition de 24 heures au 4-HNE pour le premier essai, et de 81,5% ($p=0,02$) pour le deuxième essai. La mesure de cytotoxicité effectuée à partir du surnageant indique une

Études réalisées et résultats

absence de cytotoxicité ($p=0,43$ pour le premier essai et $p=0,39$ pour le deuxième essai). Les SEM sont importants et indiquent une variabilité importante entre les réplicats. Ce test ne semble donc pas adapté à la mesure de viabilité des Caco-2 sur inserts.

Les résultats obtenus avec le test Alamar blue indiquent une viabilité cellulaire de 118% ($p=0,1$) après l'exposition de 24 heures au 4-HNE pour le premier essai, et de 89% ($p=0,1$) pour le deuxième essai. Bien que les SEM soient relativement faibles, les résultats ne sont pas significatifs et ne vont donc pas dans le même sens dans les deux essais. Ce test ne semble donc pas adapté à la mesure de viabilité des Caco-2 sur inserts.

Les résultats obtenus avec le test au rouge neutre indiquent une viabilité cellulaire de 63% ($p=0,0001$) après l'exposition de 24 heures au 4-HNE pour le premier essai, et de 77% ($p=0,04$) pour le deuxième essai. Les SEM sont faibles et la différence obtenue entre les deux essais est similaire à celle obtenue avec le test au Wst-1. Ce test semble donc adapté à la mesure de viabilité des Caco-2 sur inserts.

Le Wst-1 et le rouge neutre semblaient adaptés à la mesure de viabilité des Caco-2 sur inserts, mais une variabilité moins importante a été obtenue avec le test au rouge neutre qui a donc été choisi pour les mesures de viabilité pour explorer la cytotoxicité des aldéhydes sur barrière saine ou altérée.

3.1.4. Description du modèle, avantages et inconvénients

La combinaison TNF- α à 10 ng/mL avec l'IFN- γ à 10 ng/mL, sans SVF, nous a semblé la plus adaptée car il s'agit des concentrations les plus souvent utilisées dans la littérature, et elles induisent une baisse de la TEER suffisante (plus de 25% après 48 heures d'exposition) avec nos cellules. De plus l'absence de SVF n'a pas impacté l'effet des cytokines sur la TEER. Il s'agit d'un modèle de barrière épithéliale intestinale altérée destiné à être utilisé pour explorer l'effet cytotoxique des alcénals en situation de barrière saine ou altérée. Nous avons décidé d'ajouter les alcénals dans le compartiment apical au bout de 48 heures d'exposition aux cytokines, et de mesurer la viabilité cellulaire après 24 heures d'exposition aux alcénals. Le protocole est représenté dans la Figure 27.

Études réalisées et résultats

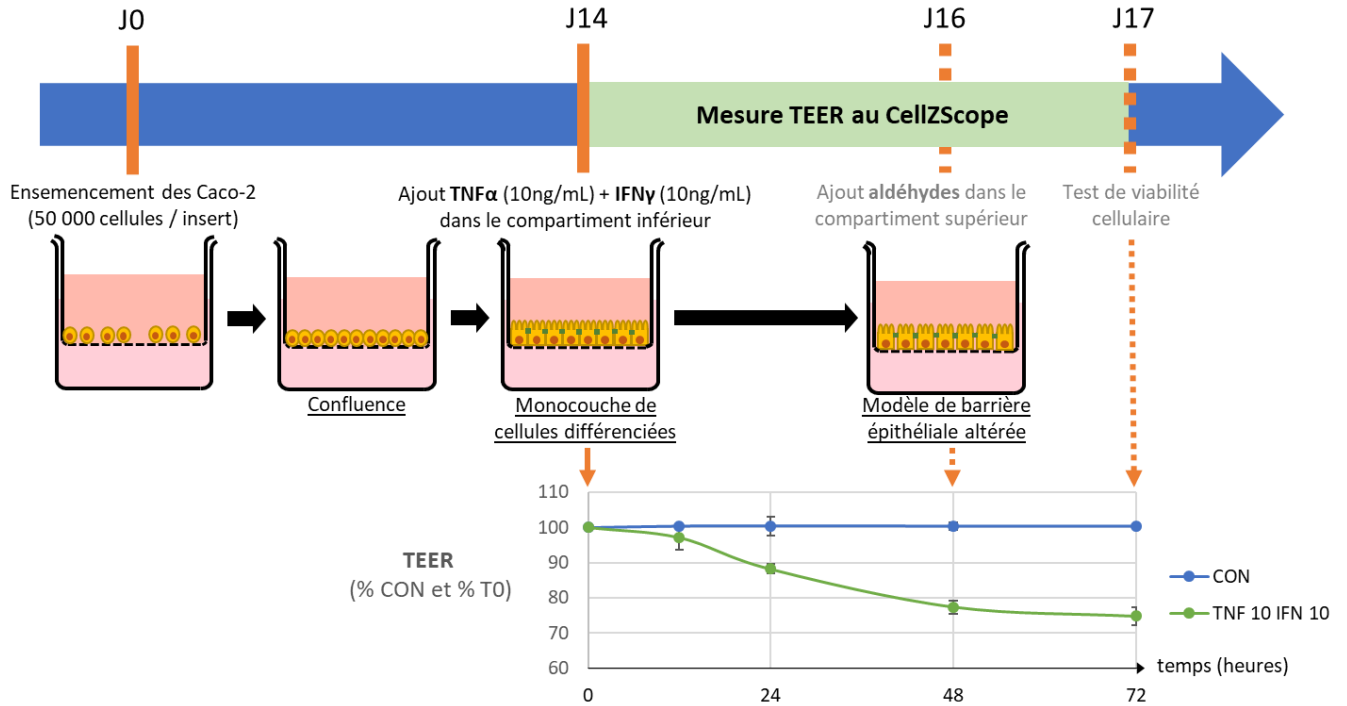


Figure 27: Protocole de mise en place du modèle de barrière épithéliale intestinale altérée *in vitro*. Les traits pleins représentent les étapes de la mise en place du modèle, les traits en pointillés représentent l'utilisation théorique du modèle pour étudier la viabilité cellulaire après exposition aux alcénals. Les valeurs sont des moyennes \pm SEM, $n=4$.

Notre modèle de barrière épithéliale intestinale altérée présente plusieurs avantages. Le stress psychologique augmente la perméabilité intestinale par des mécanismes impliquant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Notre modèle *in vitro* de barrière intestinale altérée par les cytokines inflammatoires est donc cohérent avec les mécanismes physiologiques reliant le stress psychologique à une augmentation de perméabilité intestinale. De plus, les épithéliums étant des monocouches de cellules, les modèles *in vitro* d'épithélium sont faciles à mettre en place, en particulier avec des systèmes adaptés tels que les inserts poreux, et sont donc bien adaptés à l'étude de mécanismes explorant l'augmentation de la perméabilité épithéliale (Srinivasan *et al.*, 2015).

En revanche, en raison des différentes conditions de culture et des différents nombres de passages, les cellules Caco-2 ont souvent acquis des propriétés différentes. Il a été montré que l'expression des marqueurs de différenciation typiques des entérocytes évolue avec le nombre croissant de passages (Artursson and Karlsson, 1991). Des paramètres comme la résistance électrique transépithéliale (TEER) et le taux de prolifération augmentent avec le nombre de passages (Briske-Anderson *et al.*, 1997). Il a également été montré que les cellules

Études réalisées et résultats

de passage tardif peuvent commencer à se développer en multicouches, un phénomène qui affecte les mesures de TEER, et rend difficiles les comparaisons avec les résultats basés sur les cellules de passage précoce (Lea, 2015). De plus, malgré les ressemblances morphologiques et fonctionnelles de notre modèle *in vitro* avec l'épithélium intestinal retrouvé *in vivo*, les cellules Caco-2 seules ne représentent pas l'ensemble des cellules présentes au niveau de l'épithélium intestinal. On y trouve un certain nombre d'autres types de cellules, notamment les cellules à mucus qui ne forment pas de jonctions serrées (Srinivasan *et al.*, 2015). Enfin, l'épithélium intestinal est en étroite relation avec les tissus et composés environnants *in vivo*, ce qui n'est pas pris en compte lorsque l'on travaille uniquement sur des Caco-2. Ces faiblesses du modèle doivent être prises en compte dans l'interprétation des résultats et dans l'extrapolation au *vivo*.

3.2. Effets des alcénals sur la cytotoxicité, la TEER et la génotoxicité des Caco-2 en situation de barrière saine ou altérée

Dans cette partie, nous explorons l'effet d'une augmentation de perméabilité intestinale sur la cytotoxicité, la TEER et la génotoxicité d'un des alcénal résultant de la consommation de viande rouge et charcuterie, le HNE. Le modèle de barrière épithéliale intestinale altérée *in vitro* mis en place (partie 3.1) a été utilisé pour mimer l'augmentation de perméabilité, et le test au rouge neutre, qui nous a semblé le plus adapté à la mesure de viabilité des Caco-2 sur inserts (partie 3.1), a été utilisé pour évaluer la cytotoxicité du HNE.

La quantification de l'histone H2AX phosphorylé (γ -H2AX) nous a permis d'évaluer la génotoxicité du HNE. En effet, les cassures double-brin de l'ADN induisent la phosphorylation du H2AX au niveau de la sérine 139. La phosphorylation γ -H2AX reflète donc une réaction précoce et sensible à une lésion génotoxique pouvant résulter de divers types de dommages à l'ADN (adduits à l'ADN, rupture de brin d'ADN, lésions bloquant la réplication ou la transcription de l'ADN etc.). Il a été montré que la quantification du γ -H2AX était un bon indicateur de génotoxicité dans les lignées cellulaires humaines (Audebert *et al.* 2011).

Études réalisées et résultats

3.2.1. Matériel et méthode

Le modèle de barrière intestinale altérée avec les cellules Caco-2 traitées aux cytokines inflammatoires a été mis en place tel que décrit précédemment. En bref, les caco-2 ont étéensemencées à 50 000 cellules par insert avec du milieu complet en apical et en baso-latéral. 14 jours après ensemencement (=environ 10 jours après confluence), du TNF- α à 10 ng/mL et de l'IFN- γ à 10 ng/mL 10ng/mL ont été ajoutés en baso-latéral dans du milieu sans SVF. Le milieu apical a été remplacé par du milieu sans SVF.

Après 48 heures d'exposition aux cytokines, du HNE a été ajouté dans le compartiment supérieur (au pôle apical des cellules) à des concentrations cytotoxiques (80,120 et 160 μ M) pour l'étude de cytotoxicité, et à une concentration non cytotoxique (40 μ M) pour l'étude de la génotoxicité et de la TEER.

▪ **Evaluation de la cytotoxicité du HNE**

Un test au rouge neutre a été effectué pour mesurer la **viabilité cellulaire** après exposition au HNE, comme décrit précédemment (partie 3.1.2).

▪ **Mesure de la TEER lors de l'exposition au HNE**

La **TEER** a été mesurée avec le CellZScope avant et après l'exposition au TNF- α et à l'IFN- γ , et durant les 24 heures d'exposition au HNE.

▪ **Quantification du γ -H2AX nucléaire pour évaluer la génotoxicité des aldéhydes**

La mesure de **génotoxicité** a été évaluée par quantification immunohistochimique du **γ -H2AX** sur les cellules fixées. Après les 24 heures d'exposition au HNE, le protocole suivant a été réalisé :

- 1) Fixation : les inserts ont été rincés (2 rinçages au PBS), **fixés** au paraformaldéhyde à 4% durant 20 minutes, puis de nouveau rincés au PBS (2 rinçages au PBS froid). Ces étapes ont été effectuées au niveau des pôles apical et basal, à froid (sur la glace).
- 2) Marquage immunohistochimique :
 - Une **perméabilisation** de 15 minutes au triton 0.5X dilué dans du PBS puis un lavage au PBS NP40 0.1% (nonyl phenoxy polyethoxy ethanol type 40) ont été réalisés
 - Un **blocage** de 45 minutes avec du PBS NP40 0.1% BSA 3% a été réalisé

Études réalisées et résultats

- **L'anticorps primaire** (de lapin) **anti- γ -H2AX** (Cell Signaling Technology #9718) a été ajouté au 1/400 en apical pendant 1 heure, et un rinçage rapide suivi de trois rinçages de 10 minutes au PBS NP40 0.1% ont été effectués.
- **L'anticorps secondaire** (souris **anti-lapin**; Alexa Fluor 546) a été ajouté au 1/800 en apical pendant 30 minutes, et un rinçage rapide suivi de deux rinçages de 5 minutes au PBS NP40 0.1% ont été effectués.
- Du **DAPI** (4',6-diamidino-2-phénylindole), une molécule fluorescente capable de se lier fortement aux bases adénine et thymine de l'ADN et utilisée pour détecter les noyaux, a été ajouté à 0,3 μ g/L dans du PBS NP40 0.1% en apical pendant 10 minutes et un rinçage au PBS NP40 0.1% a été effectué, puis du PBS a ensuite été ajouté en apical et en baso-latéral.

Ces étapes ont été effectuées à froid (sur la glace), uniquement en apical lorsqu'aucune précision n'est apportée, et les solutions utilisées étaient à 4°C.

3) Quantification du marquage :

- Les membranes poreuses sur lesquelles adhèrent les cellules ont ensuite été découpées à l'aide d'une lame de scalpel et ont été montées entre lame et lamelle avec du milieu de montage aqueux.
- Des photos en aveugle des lames (3 photos par insert) ont été réalisées au microscope à fluorescence.
- A partir des photos, une quantification du marquage γ -H2AX dans chaque noyau (marqués au DAPI) a été réalisée à l'aide du logiciel image J. Nous avons choisi de moyenner la totalité des marquages nucléaires du γ -H2AX pour chaque condition. **Les cellules non traitées (milieu sans SVF) ont été choisies comme référence.**

▪ **Statistiques**

Des ANOVA à 2 facteurs ont été réalisées pour explorer les effets de l'augmentation de perméabilité induite par le mélange TNF- α /IFN- γ et par le HNE, ainsi que l'interaction entre ces 2 facteurs. Lorsque l'interaction était significative, pour les mesures de viabilité cellulaire et de TEER. Une ANOVA à 1 facteur a été réalisée pour la mesure de génotoxicité. Une p-value < 0,05 a été considérée significative.

Études réalisées et résultats

3.2.2. Résultats

▪ Cytotoxicité du HNE en situation de barrière saine ou altérée

Les résultats sont représentés dans la Figure 28.

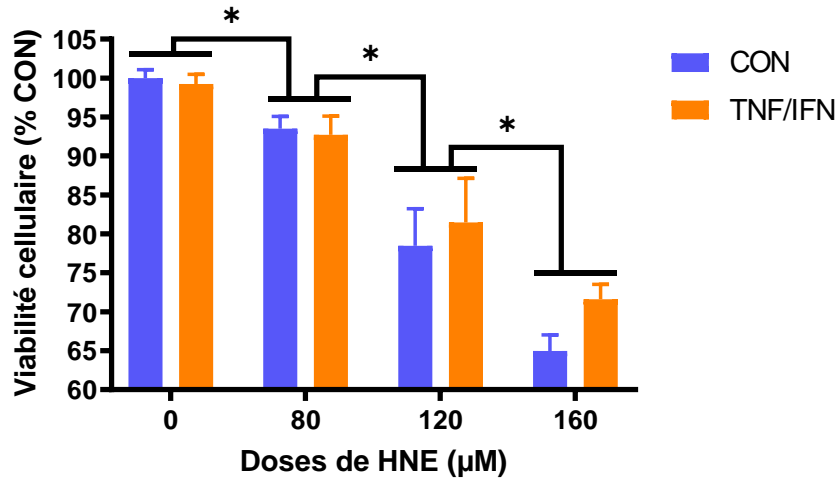


Figure 28 : Viabilité cellulaire des Caco-2 en situation de barrière épithéliale saine ou altérée, exposées à plusieurs doses (0, 80, 120 et 160µM) de HNE. Les * indiquent une différence significative entre les groupes. Les valeurs sont des moyennes \pm SEM, n=4 à 12.

En situation de barrière saine, un **effet dose** de la **cytotoxicité du HNE** sur les Caco-2 a été observé ($p < 0,0001$):

- Le HNE à 80µM entraînait une toxicité de 7% ($p = 0,0004$)
- Le HNE à 120µM entraînait une toxicité de 20% ($p < 0,0001$)
- Le HNE à 160µM entraînait une toxicité de 32% ($p < 0,0001$)

L'augmentation de la perméabilité intestinale induite par le TNF- α et l'IFN- γ n'a pas modifié la toxicité du HNE ($p = 0,29$).

▪ Effets du HNE sur la TEER en situation de barrière saine ou altérée

Les résultats sont présentés dans la Figure 29.

Études réalisées et résultats

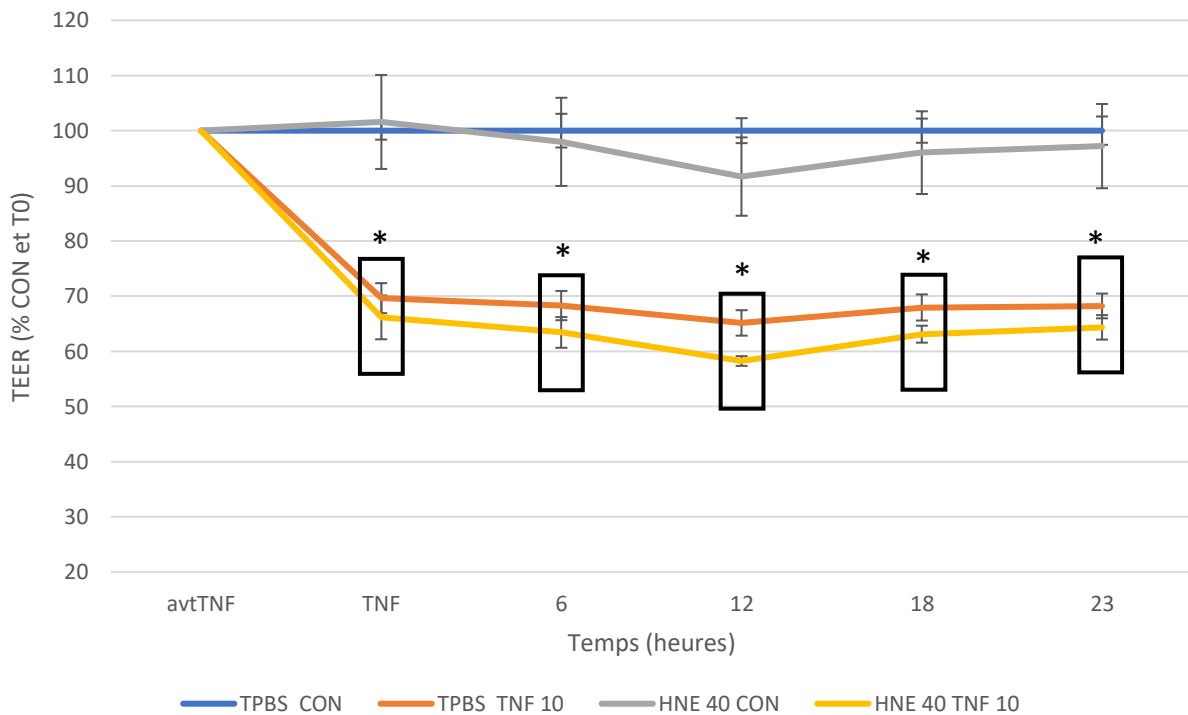


Figure 29 : TEER des Caco-2 en situation de barrière épithéliale saine ou altérée, exposées à une dose non cytotoxique de HNE (40 μ M). Les * indiquent une différence significative avec le contrôle (CON). Les valeurs sont des moyennes \pm SEM, n=3.

Le TNF- α et l'IFN- γ (modèle de barrière altérée) ont bien provoqué une baisse de la TEER de 35% ($p < 0,0001$) après 24 heures, reflétant une augmentation de perméabilité. Cependant, l'exposition des Caco-2 au HNE n'a pas eu d'impact sur la TEER, en situation de barrière épithéliale intestinale saine ou altérée.

▪ **Génotoxicité du HNE en situation de barrière saine ou altérée**

Dans cette partie, les barres d'erreur ne sont pas représentées sur les graphiques en raison de notre choix de moyenniser la totalité des marquages nucléaires du γ -H2AX pour chaque condition : l'hétérogénéité entre les marquages nucléaires moyennés ne représente pas la variabilité entre les répliques, mais de manière beaucoup plus importante l'hétérogénéité du marquage entre les différents noyaux.

Les résultats sont représentés dans la Figure 30.

Le prétraitement au TNF- α et IFN- γ (modèle de barrière épithéliale intestinale altérée) a provoqué de la génotoxicité, tel qu'indiqué par l'augmentation du γ -H2AX nucléaire de 56%

Études réalisées et résultats

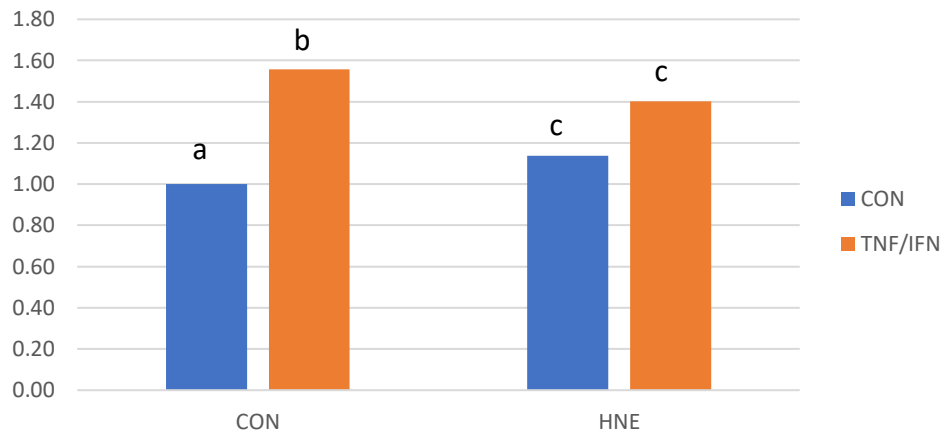


Figure 30 : γ -H2AX nucléaire de Caco-2 en situation de barrière épithéliale saine ou altérée, exposées à une dose non cytotoxique de HNE (40 μ M). Des lettres similaires indiquent une absence de différence significative entre les groupes. Les valeurs sont des moyennes, $n > 3000$ noyaux.

($p < 0,0001$) par rapport au contrôle. Le HNE a provoqué une légère augmentation du γ -H2AX nucléaire (14% par rapport au contrôle, $p = 0,006$).

Aucun effet additif de l'altération de la barrière épithéliale intestinale et du HNE n'a été observé, puisque la combinaison de ces deux facteurs a provoqué une augmentation du γ -H2AX nucléaire de 40% ($p < 0,0001$) par rapport au contrôle.

3.2.3. Discussion

Aucun effet additif, synergique ou potentialisateur n'a été observé entre le HNE et les cytokines inflammatoires (qui provoquent l'altération de barrière intestinale), sur la TEER, la viabilité cellulaire et la génotoxicité.

Le HNE ne présente donc pas de cytotoxicité supérieure lorsque la perméabilité paracellulaire (l'espace entre les cellules) est augmentée. La génotoxicité du HNE était très inférieure à celle induite par le TNF- α et l'IFN- γ , contrairement à ce qu'on attendait. De plus, la génotoxicité du HNE et du TNF- α et IFN- γ combinés était inférieure à la génotoxicité induite par le TNF- α et l'IFN- γ seuls, indiquant que le HNE n'était pas plus génotoxique lorsque la perméabilité paracellulaire était augmentée. Cela suggère que, bien que la surface d'exposition des cellules soit supérieure en raison de l'augmentation de l'espace intercellulaire, les cellules ne présentent pas d'augmentation de l'exposition au HNE. Autrement dit, la totalité du HNE aurait accès aux cellules épithéliales en conditions basales, et l'augmentation de la perméabilité n'aurait donc pas d'impact sur son exposition.

Études réalisées et résultats

Ces résultats indiquent qu'une augmentation de perméabilité à elle seule n'augmente pas la toxicité du HNE *in vitro*. Ils ne vont donc pas dans le sens de notre hypothèse selon laquelle l'augmentation de perméabilité intestinale pourrait augmenter les effets délétères des alcénals en augmentant l'exposition de l'épithélium intestinal à ces molécules. Cependant, il s'agit d'une étude *in vitro* qui n'intègre pas l'ensemble des paramètres retrouvés physiologiquement, et nous ne pouvons pas conclure qu'une augmentation de perméabilité *in vivo* n'a aucun impact sur la toxicité du HNE. *In vivo*, l'augmentation de perméabilité intestinale est associée à la modification de plusieurs paramètres physiologiques, tels qu'une activation du système immunitaire et une sécrétion de mucus, qui ne sont pas intégrés dans notre modèle *in vitro*.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Dans cette thèse, nous avons fait **l'hypothèse** que le stress psychologique augmente l'effet de la consommation de viande rouge et de fer héminique sur le risque de cancer du côlon. **L'hypothèse mécanistique** était que **l'augmentation de perméabilité intestinale induite par le stress pourrait augmenter l'exposition de l'organisme et des cellules épithéliales coliques aux composés luminaux, et plus particulièrement aux alcénals générés par la peroxydation lipidique hème-induite**, augmentant le **risque de cancer colorectal induit par l'hème**. Nous avons choisi de développer une approche multidisciplinaire en combinant les études épidémiologiques et expérimentales (*in vivo* et *in vitro*) pour étudier l'effet du stress psychologique, et les altérations de la barrière intestinale associées, sur l'association positive entre consommation de viande rouge et charcuterie, de fer héminique et risque de cancer colorectal.

Dans cette discussion, nous allons commencer par rappeler les principaux résultats obtenus avec les différentes approches par rapport à notre hypothèse initiale et nous allons discuter des forces et des limites des études réalisées. Nous discuterons ensuite des perspectives possibles. Enfin, nous discuterons de l'impact de ces résultats, et des questions sociétales associées.

1. RESULTATS ET REPOSE AUX OBJECTIFS

1.1. Bilan des résultats au regard de notre hypothèse de départ

Dans cette partie, nous résumons les résultats des études qui ont contribué à répondre à notre objectif de départ.

L'**étude épidémiologique** menée au sein de la cohorte Nutrinet-Santé pendant ce travail de thèse a été la **première** à suggérer que **l'anxiété puisse modifier l'association entre consommation de viande rouge et charcuterie (et l'apport en fer héminique provenant de ces viandes) et le risque de cancer**. En effet le risque de développer un cancer en augmentant sa consommation de viande rouge et charcuterie de 50 g/j était plus important chez les

Discussion et perspectives

participants anxieux que dans la population globale et que chez les non anxieux (figure 22). L'ensemble des résultats de cette étude ont été conformes à notre hypothèse de départ.

Dans notre étude *in vivo* chez la souris exposée au régime riche en fer héminique et ayant été soumise à un stress de séparation maternelle (SSM), nos résultats suggèrent que **l'altération de la barrière intestinale induite par le SSM augmenterait l'exposition de l'épithélium au fer héminique** présent dans la lumière intestinale, conformément à notre hypothèse. En effet, plusieurs paramètres reflétant **l'exposition au fer héminique** étaient **amplifiés chez les souris nourries à l'hème ayant subi le SSM**, alors que **le SSM seul n'avait pas d'effet sur ces paramètres** : 1) **l'expression colique relative de l'ARNm de HMOX-1**; 2) **le DHN-MA urinaire**, métabolite majeur du HNE (tendance non significative); 3) les expressions coliques relatives des ARNm des cytokines pro-inflammatoires **TNF α et IL-1 β** (tendance non significative). De plus, nos résultats indiquent que le régime riche en **fer héminique** et le **SSM** ont des **effets additifs** (pour l'hyperprolifération) ou **synergiques** (pour la génotoxicité) sur les **effets délétères observés au niveau de l'épithélium colique, qui sont des paramètres précoces de la cancérogénèse colorectale**. Enfin, le SSM a également amplifié les activités **génotoxique et cytotoxique** des **eaux fécales induites par le régime riche en fer héminique**. Nous avons proposé qu'une **augmentation de l'exposition de la muqueuse colique au fer héminique luminal** induite par le **SSM** aurait déclenché une réponse inflammatoire, conduisant à la sécrétion de **molécules pro-inflammatoires** dans le contenu intestinal et **augmentant ainsi la toxicité des eaux fécales**.

Globalement, cette étude ne nous aura pas permis de conclure avec certitude que le SSM a augmenté l'exposition de la muqueuse colique au contenu intestinal en augmentant la perméabilité intestinale car i) nous n'avons pas montré que la perméabilité intestinale était augmentée par le SSM et ii) l'expression des gènes de détoxification des alcénals (ALDH2 et Akr1b8) chez les souris nourries avec le régime riche en hème n'a pas été amplifiée par le SSM.

Enfin, l'étude *in vitro* sur un modèle de barrière épithéliale intestinale altérée a permis de montrer que l'augmentation de perméabilité ne suffisait pas à augmenter la cytotoxicité et la génotoxicité d'un alcénal modèle, le HNE.

Dans l'ensemble, ces études *in vivo* et *in vitro* suggèrent fortement que **les effets délétères du régime riche en fer héminique sur la muqueuse colique sont amplifiés par le SSM** et que cette amplification ne résulte pas (uniquement) d'une **augmentation de l'exposition au fer**

Discussion et perspectives

héminique et aux alcénals. Nous émettons l'**hypothèse** que cette amplification pourrait résulter d'une additivité des effets délétères du fer héminique et du SSM lui-même sur la muqueuse, et d'une réponse inflammatoire qui serait induite par l'augmentation de l'exposition colique au fer héminique induite par le SSM.

1.2. Résultats supplémentaires

Cette partie rapporte les résultats supplémentaires qui n'ont pas apporté d'éléments de réponses à nos objectifs initiaux.

L'étude épidémiologique a confirmé que la consommation de viande rouge et charcuterie, ainsi que l'apport en fer héminique provenant de ces viandes, étaient associés à une augmentation du risque de cancer (colorectal et toutes localisations confondues) dans la population générale (de la cohorte Nutrinet-Santé).

Cette étude a également suggéré que le jambon ne participait pas à l'association positive entre consommation de viande rouge et charcuterie et risque de cancer (colorectal et toutes localisations confondues). En effet, lorsque le jambon était inclus dans les charcuteries, les HR étaient plus faibles que lorsqu'il était exclu. Le jambon étant pauvre en fer héminique et en acides gras polyinsaturés par rapport aux autres charcuteries (Figure 31), ce résultat supporte l'hypothèse selon laquelle le fer héminique, en catalysant la peroxydation lipidique, est responsable de l'effet promoteur des viandes rouges et charcuteries.

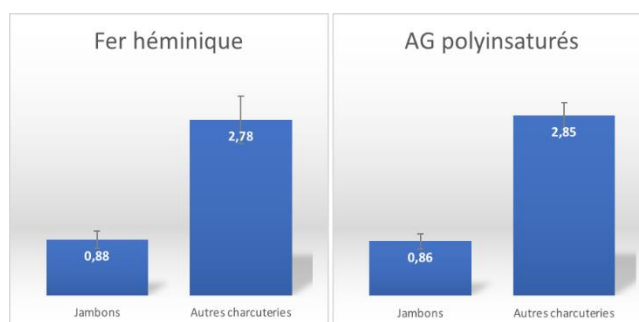


Figure 31 : Teneur en fer héminique et en acides gras polyinsaturés dans les jambons et dans les autres charcuteries (Ciqual). Les valeurs sont des moyennes \pm SEM.

Enfin, en plus du CCR, les risques de cancers du sein et de la prostate ont également été exploré. Dans la population générale, aucune association significative n'a été observée entre la consommation de viande rouge et charcuterie et les cancers du sein et de la prostate. Mais l'augmentation de risque du cancer du sein était « presque » significativement associée à la

Discussion et perspectives

consommation de viande rouge et charcuterie puisque la p-value était de 0.072 et le HR était de 1,09 (0,99-1,19). De plus, le risque de cancer du sein était significativement associé à l'apport en fer héminique provenant de ces viandes (HR=1,16 (1,05-1,29), p=0,005). Mais aucun effet de l'anxiété n'a été observé sur ces associations : l'association entre consommation de viande rouge et de charcuterie et cancer du sein restait presque significative (p=0,059) chez les non-anxieux seulement, et l'association entre apport en fer héminique et cancer du sein restait également significative (p=0,008) uniquement chez les non-anxieux. La plus grande puissance statistique chez les non-anxieux par rapport aux anxieux, en raison du plus grand nombre de participants (62 464 vs. 16 360) et de cas (710 vs. 200), dans cette sous-population, pourrait expliquer le risque significativement augmenté uniquement chez les non-anxieux.

1.3. Forces et limites des études

1.3.1. *Les études réalisées étaient-elles adaptées pour répondre aux objectifs ?*

Les forces et limites des études réalisées ont déjà été évoquées dans les discussions respectives, mais nous allons ici discuter des forces et des limites pour répondre à nos objectifs de thèse.

Les principales forces de l'étude épidémiologique menée au sein de la cohorte Nutrinet-Santé sont le grand nombre de participants (+ de 100 000) et de cas (3 126 cas de cancers) inclus, le design prospectif de l'étude, la qualité de l'estimation des consommations de viande rouge et de charcuterie ainsi que de l'apport en fer héminique provenant de ces viandes, qui auront permis de répondre au premier objectif de cette thèse. La principale limite réside dans le diagnostic de l'anxiété qui reposait sur la déclaration de traitement pour l'anxiété, ne nous permettant pas de conclure avec certitude que c'est l'anxiété et non le traitement qui a modifié l'association entre consommation de viande rouge ou apport en fer héminique et risque de cancer. Le traitement a également pu atténuer les effets de l'anxiété, sous-estimant possiblement l'augmentation du risque de cancer induit par l'hème chez les anxieux.

Les principales forces de l'étude *in vivo* sur la souris sont liées au protocole en carré latin qui permet de faire une analyse par facteur en ne faisant varier que le SSM (stressés vs. non stressés) et le régime (fer héminique vs. standard). De plus, de nombreux paramètres ont été explorés. Une des limites impactant la portée de nos conclusions est la difficulté rencontrée

Discussion et perspectives

pour évaluer la fonction de barrière intestinale. En effet, une évaluation fine de la fonction de barrière intestinale, y compris de la perméabilité intestinale (discuté plus en détail dans la partie « 1.3.2. Mesure de la perméabilité intestinale *in vivo* dans le modèle de SSM»), aurait pu mettre en évidence les effets délétères du SSM sur ces paramètres. De plus, un régime standard plus « sain » aurait été plus adapté à cette étude car il est possible que la forte teneur en sucre de ce régime ait eu un impact sur la barrière intestinale. Nous reviendrons plus en détails sur ce point dans la partie suivante (« 1.3.3. Choix du régime standard utilisé dans l'expérimentation chez la souris »). Enfin, une autre limite ayant impacté la portée de nos conclusions est qu'il s'agissait d'une étude court terme qui ne pouvait pas nous permettre de confirmer notre hypothèse selon laquelle le SSM pourrait amplifier les effets du fer héminique sur la carcinogénèse colorectale.

Enfin, la force de notre étude *in vitro* a été le développement et la mise en place d'un modèle de barrière épithéliale intestinale qui nous a permis d'explorer spécifiquement la géno- et cytotoxicité du HNE, un des principaux alcénal hème-induit, sur des Caco-2 en situation de barrière épithéliale saine ou altérée. Une des limites était que seuls les effets du HNE purifié ont été explorés, ne mimant pas les conditions physiologiques retrouvées au sein d'une eau fécale avec un pool d'alcénals. D'autre part, les Caco-2 sont des cellules cancéreuses immortalisées et ne sont donc pas le modèle le plus adapté pour étudier un mécanisme de promotion de la carcinogénèse colorectale. Mais cette étude aura tout de même permis de répondre en partie à l'objectif fixé au départ, en tenant compte de ces limites.

Donc les principales conclusions que nous pouvons tirer de ces études sont que :

- **L'anxiété semble amplifier l'association positive entre la consommation de viande rouge et de charcuterie, et l'apport en fer héminique provenant de ces viandes, et le risque de cancer (global et colorectal) chez l'Homme;**
- **Le stress de séparation maternelle amplifie les effets délétères du fer héminique sur la muqueuse colique chez la souris, et cet effet ne résulte pas uniquement d'une augmentation de la perméabilité intestinale qui aurait augmenté l'exposition de la muqueuse aux alcénals.**

Discussion et perspectives

1.3.2. Mesure de la perméabilité intestinale *in vivo* dans le modèle de SSM

Dans notre étude *in vivo*, nous avons choisi le modèle de stress de séparation maternelle parce qu'il entraîne une augmentation de la perméabilité intestinale à l'âge adulte (Barreau *et al.*, 2004a; O'Mahony *et al.*, 2011; Lennon *et al.*, 2013). La perméabilité intestinale est un élément central de notre hypothèse de départ. Nous avons bien sûr mis en place un protocole permettant de la mesurer *in vivo* avant de débiter le régime expérimental (à PND 50), dans le but de vérifier que l'augmentation de perméabilité intestinale induite par le SSM était présente au moment du régime expérimental. Nous avons utilisé une méthode courante qui consiste en un gavage avec un fluorochrome (FITC : isothiocyanate de fluorescéine), suivi 4 heures plus tard, d'une mesure de la fluorescence plasmatique, qui permet de déduire la concentration plasmatique du fluorochrome. La concentration plasmatique de FITC dépend de la quantité de fluorochrome qui est passé à travers l'épithélium intestinal, et reflète donc la perméabilité de celui-ci. Les résultats de cette mesure de perméabilité sont représentés dans la figure 32.

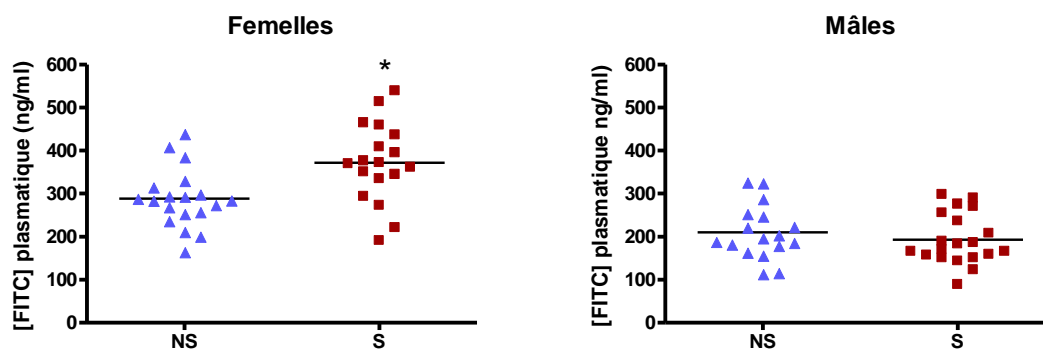


Figure 32 : Perméabilité intestinale mesurée à PND 50. [FITC] plasmatique mesuré 4 heures après gavage d'une solution de FITC à 1mg/mL avec 10µg/mL de NaOH, en fonction du stress de séparation maternelle (NS: non stressés/S: stressés). Les valeurs sont des moyennes. * indique une différence significative avec le groupe NS.

Nous avons obtenu une **augmentation significative de la perméabilité intestinale chez les femelles** ayant subi le SSM par rapport aux femelles contrôles, mais aucune différence chez les mâles. Ces résultats sont cohérents avec une précédente étude qui avait montré que le SSM entraînait un comportement anxieux uniquement chez les C57Bl/6 femelles, suggérant que le SSM a plus d'effet chez les femelles que chez les mâles dans cette lignée (Bondar *et al.*, 2018).

Pour ce type d'étude, le fluorochrome utilisé, le FITC, est couplé à du Dextran (Patel *et al.*, 2012; Cifarelli *et al.*, 2016; Woting and Blaut, 2018) afin d'éviter la réaction de ce dernier avec

Discussion et perspectives

les nucléophiles tels que les amines et sulfhydryles des protéines (Maeda *et al.*, 1969), ce qui induit des biais dans la mesure du FITC sanguin. Malheureusement, et c'est une erreur, nous avons utilisé du FITC libre notre étude. Nous ne pouvons donc pas être certain que notre mesure n'a pas été altérée par l'interaction FITC – nucléophiles, ce qui pose un problème quant à l'interprétation de ces résultats. Pour cette raison, nous n'avons pas intégré pour le moment cette donnée dans la proposition d'article.

1.3.3. *Choix du régime standard utilisé dans l'expérimentation chez la souris*

Pour le choix du régime standard, nous nous sommes basés sur les études similaires (études de l'effet cancérigène du fer héminique chez le rongeur) précédentes (Bastide *et al.*, 2015; Martin *et al.*, 2019), notamment pour pouvoir comparer nos résultats à ces études. Le régime standard était constitué de poudre AIN-76 pauvre en calcium avec 5% d'huile de carthame. La base AIN-76 est couramment utilisée comme régime standard dans les études chez le rongeur. Dans notre étude, le régime riche en fer héminique correspondait au régime standard auquel nous avons ajouté 0.094% d'hémine.

Dans ce régime (poudre AIN-76 modifiée), 49% des calories étaient apportées par le sucre. Il a été montré qu'un tel apport en sucre provoquait chez la souris une intolérance au glucose résultant probablement d'une réduction de la sécrétion d'insuline, et pouvant entraîner divers désordres métaboliques (Sumiyoshi *et al.*, 2006). En 1993, l'Institut Américain de Nutrition a mis en place un nouveau régime (AIN-93) en raison de nombreux problèmes techniques et nutritionnels rencontrés avec le régime AIN-76 (Reeves, 1997). Le groupe de travail de l'Institut Américain de Nutrition a recommandé d'utiliser le régime AIN-93 plutôt que le régime AIN-76 en raison de sa meilleure composition nutritionnelle (Reeves *et al.*, 1993). En plus de la modification de la composition lipidique, la principale différence entre ces régimes était le remplacement de la majorité du sucre par de la fécule de maïs, composée principalement de glucides complexes. Dans le régime AIN-93, la quantité de sucre a été divisée par 5 par rapport au régime AIN-76, le sucre ne représentait donc plus que 10% des calories, correspondant à la recommandation maximale de l'OMS pour l'Homme (2015).

Concernant nos résultats, toutes les souris ayant eu un régime de même composition nutritionnelle, nous pouvons supposer que les différences observées entre nos groupes résultent uniquement du SSM et/ou du fer héminique. Il serait néanmoins intéressant de

Discussion et perspectives

refaire une expérimentation avec un régime standard plus « sain » (le régime AIN-93 par exemple) qui nous permettrait d'exclure l'hypothèse que le régime standard ait pu avoir un impact sur la muqueuse colique des souris.

1.3.4. Complémentarité des approches

La principale force de nos travaux de thèse réside dans la multidisciplinarité et la complémentarité entre les approches utilisées. Notre étude épidémiologique a permis de proposer que l'anxiété pouvait modifier l'association entre consommation de viande rouge et charcuterie et risque de cancer. Mais, comme nous l'avons évoqué dans l'introduction, cette étude de cohorte à elle seule ne permet pas de conclure à un lien causal avec un niveau de preuve élevé et, selon les critères de Hill, le niveau de preuve de l'association peut être renforcé par la présence d'une preuve expérimentale de l'association ou de l'existence d'un mécanisme biologique. La démonstration, dans notre étude *in vivo* que le stress de séparation maternelle amplifie les effets délétères du fer héminique sur la muqueuse colique chez la souris, renforce donc le niveau de preuve de l'association mise en évidence par l'étude épidémiologique. Enfin, notre étude *in vitro* apporte des éléments complémentaires à la compréhension du mécanisme biologique impliquée dans l'effet de l'anxiété sur la relation viande rouge/charcuterie et risque de cancer. Donc **ces études** prises dans leur **ensemble** permettent de proposer que **l'anxiété pourrait modifier l'association positive entre la consommation de viande rouge et le risque de cancer en augmentant l'hyperprolifération et la génotoxicité du fer héminique sur la muqueuse colique**. Si elles ne permettent pas à elles seules de montrer avec un niveau de preuve élevé que l'anxiété augmente le risque de cancer hème-induit, elles offrent des pistes de recherche intéressantes et apportent des éléments qui pourront être complétés par de futures études.

2. PERSPECTIVES

De futures études permettraient de confirmer l'effet du stress sur la promotion du CCR induite par le fer héminique, et de mieux comprendre les mécanismes impliqués. Nous proposons ci-dessous les études qui nous paraissent prioritaires pour compléter les résultats obtenus durant cette thèse.

2.1. D'autres études épidémiologiques sont nécessaires

2.1.1. Inclure une évaluation précise de l'anxiété dans notre étude de cohorte

Une des limites de notre étude épidémiologique est la méthode de diagnostic de l'anxiété. Nous nous sommes basés sur le traitement pour l'anxiété pour explorer les effets de l'anxiété, donc nous ne savons pas si les effets observés résultent de l'anxiété ou du traitement, qui a pu atténuer les effets de l'anxiété. L'utilisation d'une méthode de mesure précise de l'état d'anxiété permettrait de pallier ce problème.

Dans la cohorte Nutrinet-Santé, un questionnaire sur l'état d'anxiété générale permettant d'obtenir un score d'anxiété a été proposé aux participants. Il s'agit de l'échelle STAI-Y de Spielberger qui évalue deux dimensions de l'anxiété : l'anxiété « état » qui correspond à une réaction émotionnelle à un moment donné et l'anxiété « trait » qui correspond à l'anxiété ressentie au quotidien. Dans les 2 cas, une série de 20 propositions permet d'établir un score d'anxiété allant de 20 à 80. L'échelle STAI-Y de Spielberger est une évaluation fiable et validée de l'anxiété qui a déjà été traduite en 48 langues depuis 2011. Il s'agit de l'outil le plus utilisé pour mesurer l'anxiété « état » ou « trait » (Zsido *et al.*, 2020). Nous souhaitons nous baser sur cette évaluation de l'anxiété dans notre étude mais le questionnaire est proposé aux participants 55 mois après leur entrée dans l'étude et peu de participants y avaient répondu au moment où notre étude a été conduite. Le fait que l'anxiété ne soit pas évaluée au moment de l'inclusion n'est pas problématique lorsque l'on se base sur l'évaluation de l'anxiété « trait », car celle-ci est liée à la personnalité et ne dépend donc pas du moment où elle le questionnaire est complété par les participants. Cependant, seulement 30 221 participants avaient répondu à ce questionnaire, et 916 cas de cancers dont 63 cas de CCR étaient recensés dans cette sous-population, la puissance statistique était donc très faible par rapport à celle dans la population générale. Dans cette sous-population, une augmentation de la consommation de viande rouge et charcuterie (jambon exclu) de 50g par jour augmentait le risque global de développer un cancer de 8% (HR=1.08 (0.99-1.19), p=0.08) et le risque de développer un CCR de 16% (HR=1.16 (0.82-1.65), p=0.39). Chez les anxieux (score d'anxiété « trait » supérieur à 46), le risque de cancer était augmenté de 16% (HR=1.16 (1.02-1.32), p=0.03) et le risque de CCR de 35% (HR=1.35 (0.83-2.19), p=0.23) lorsque la consommation de viande rouge et charcuterie (jambon exclu) augmentait de 50g par jour. Les résultats n'ont

Discussion et perspectives

pas été présentés dans notre étude épidémiologique car ils n'étaient pas significatifs pour la plupart en raison du manque de puissance, mais ils allaient dans le même sens que ceux obtenus avec le traitement pour l'anxiété. Il serait intéressant de refaire cette étude quand le nombre de participants ayant répondu à ce questionnaire aura augmenté afin de confirmer les tendances observées.

2.1.2. Répéter pour augmenter le niveau de preuves

Nous avons vu qu'un des critères de Hill qui permet de juger du niveau de preuve d'une association implique que l'association doit être retrouvée dans plusieurs populations. Donc il serait intéressant de voir si l'effet de l'anxiété sur l'association entre consommation de viande rouge et charcuterie (ou l'apport en fer héminique) et le risque de cancer (global, colorectal ou autres localisations) est retrouvé dans d'autres cohortes.

Une cohorte dans laquelle il serait intéressant d'explorer l'association entre la consommation de viande rouge et charcuterie, ou l'apport en fer héminique, et le risque de cancer colorectal en fonction de l'anxiété, est la cohorte française E3N. Il s'agit d'une étude de cohorte prospective comprenant plus de 100 000 femmes suivies depuis 1990 et qui a pour objectif de mieux comprendre l'impact de l'alimentation, du mode de vie, des traitements et de l'environnement sur la santé. Les données alimentaires et les événements de santé, y compris les cas incidents de cancer, sont recueillis (Bastide *et al.*, 2016). De plus, dans cette étude de cohorte, un accès aux remboursements des traitements permet d'estimer l'exposition aux anxiolytiques (Mesrine *et al.*, 2018). Une association positive entre l'apport en fer héminique et le risque d'adénome colorectal avait été retrouvée dans cette cohorte en 2016 (Bastide *et al.*, 2016).

L'Enquête Prospective Européenne sur le Cancer (EPIC) est une étude de cohorte prospective qui inclut plus de 521 000 participants (367 898 femmes et 153 426 hommes) inscrits dans 23 centres présents dans 10 pays européens (<https://epic.iarc.fr>). Par rapport à la cohorte E3N et à la cohorte Nutrinet-Santé, cette cohorte a l'avantage de comprendre un plus grand nombre de participants, et plus particulièrement, un grand nombre d'hommes. Des informations sur le régime alimentaire, le mode de vie, les mesures anthropométriques et les antécédents médicaux ont été recueillies à l'inclusion, entre 1992 et 1999 (<https://epic.iarc.fr>). Notamment, plusieurs questions sur le stress ressenti ont été posées aux

Discussion et perspectives

participants (Surtees *et al.*, 2011). En 2021, 14 163 cas de CCR ont été diagnostiqués dont 5 783 chez les hommes et 8 380 chez les femmes (<https://epic.iarc.fr>). Il serait donc également très intéressant d'évaluer l'effet modificateur du stress sur la relation entre consommation de viande rouge et charcuterie, ou l'apport en fer héminique, et le risque de CCR dans cette vaste cohorte européenne, où un grand nombre de cas de CCR ont été diagnostiqués.

2.2. Étudier l'impact des anxiolytiques sur la perméabilité intestinale

Nous avons fait l'hypothèse dans cette thèse que l'augmentation de perméabilité intestinale induite par le stress pourrait modifier l'association positive entre consommation de viande rouge et charcuterie et risque de cancer. Dans notre étude épidémiologique menée au sein de la cohorte Nutrinet-Santé, l'anxiété a été évaluée par le traitement anxiolytique. Il est possible que le traitement de l'anxiété ait empêché ou atténué l'augmentation de perméabilité induite par le stress, atténuant ainsi l'effet modificateur du stress observé dans cette étude. Il est également possible que les effets observés résultent du traitement anxiolytique et non de l'anxiété. Il a été montré dans une étude préclinique que le traitement par l'antidépresseur desipramine reverse les effets du stress aussi bien sur la sphère digestive que vis-à-vis des comportements mimant la dépression chez le rongeur (Varghese *et al.*, 2006). Bien qu'à notre connaissance, aucune étude n'ait montré que les anxiolytiques pouvaient avoir un impact sur la barrière intestinale, explorer l'effet de ces médicaments sur la barrière intestinale semble nécessaire. De futures études pourraient permettre de savoir si les effets observés résultent de l'anxiété ou du traitement, et de savoir si le traitement a pu impacter les effets de l'anxiété.

Tout d'abord, il serait intéressant de comparer le risque de cancer lié à la consommation de viande rouge et charcuterie en fonction de l'anxiété et du traitement pour l'anxiété. Plus précisément, il faudrait stratifier la population sur l'anxiété, diagnostiquée par une évaluation précise de l'état d'anxiété (échelle de Spielberger par exemple), puis stratifier la population d'anxieux sur le traitement anxiolytique ; et explorer ensuite le risque de cancer lié à la consommation de viande rouge et charcuterie dans chaque sous-populations. Cela nous permettrait de voir si le traitement annule l'effet modificateur de l'anxiété sur la relation consommation de viande rouge et charcuterie et risque de cancer. Cette double stratification

Discussion et perspectives

nécessite d'avoir une large population d'étude afin d'avoir une puissance statistique suffisante dans chacune des sous-populations. De plus, l'évaluation de l'anxiété, la prise du traitement anxiolytique et la consommation de viande rouge et charcuteries doivent être recueillis au même moment car c'est l'effet combiné de ces trois paramètres sur le risque de cancer qui nous intéresse. 84% des anxiolytiques consommés en 2015 étaient des benzodiazépines, et parmi les benzodiazépines anxiolytiques, le bromazépam (durée de vie longue) et l'Alprazolam (durée de vie courte) étaient les plus utilisés (ANSM, 2017). Donc, il serait intéressant d'étudier plus précisément l'effet des benzodiazépines, et notamment du bromazépam et de l'Alprazolam, sur ces mêmes paramètres.

Il serait également intéressant d'explorer l'effet des anxiolytiques sur la perméabilité intestinale *in vivo* en conditions de stress psychologique chez des souris. Un stress psychologique très utilisé chez la souris et facile à mettre en place que l'on pourrait utiliser dans cette étude est le stress de contrainte, qui consiste à placer la souris dans un tube dans lequel elle ne peut-pas se déplacer, pendant une à six heures en fonction des protocoles (Luo *et al.*, 2014). Un protocole en carré latin incluant 4 groupes : stressés vs. non stressés ; traités au bromazépam vs. non traités, qui consisterait à induire un stress de contrainte unique après avoir administré le bromazépam ou un placebo aux souris, suivi d'une mesure de la perméabilité intestinale *in vivo* permettrait de savoir si le bromazépam atténue les effets du stress sur l'augmentation de perméabilité intestinale. Des analyses histologiques du colon et de l'intestin grêle permettraient de caractériser plus finement l'état de l'épithélium intestinal (prolifération, jonctions serrées, inflammation etc.).

2.3. Étudier l'effet du fer héminique en situation de stress psychologique dans un modèle de CCR chez la souris

Notre étude *in vivo* chez la souris nous a permis d'explorer les effets du SSM sur les effets délétères du fer héminique sur la muqueuse colique, afin de comprendre les mécanismes par lesquels le stress augmente le risque de cancer induit par le fer héminique. Une étude long-terme explorant les effets des mêmes facteurs sur la carcinogénèse colorectale serait donc pertinente. Les deux modèles murins de CCR les plus utilisés pour étudier les effets cancérigènes des aliments sont les souris induites à l'AOM-DSS et les souris Min mutées pour APC. La chimio-induction par l'AOM-DSS est généralement utilisée comme modèle de CCR

Discussion et perspectives

associé à une colite en raison des effets délétères importants sur la muqueuse intestinale qu'elle provoque (Snider *et al.*, 2016; Oertel *et al.*, 2017). Nous souhaitons comparer l'effet promoteur du fer héminique en situation de barrière saine (souris non stressées) ou altérée (souris stressées), donc le modèle le plus adapté à cette étude semble être la souris Min qui ne présente pas d'altération de la barrière intestinale. Chez les souris Min, la perte d'hétérozygotie de *APC* se fait *in utero* et pendant les premiers jours de vie des souriceaux (Perkins *et al.*, 2003). Un SSM après la naissance risquerait donc d'impacter l'initiation du CCR, et nous ne pourrions alors pas dissocier l'effet initiateur de l'effet modificateur (sur l'effet promoteur du fer héminique) du SSM. Un modèle de stress qui pourrait être plus adapté à cette étude est le stress chronique aléatoire à l'âge adulte. A l'âge adulte l'initiation chez les souris Min est terminée, donc les effets du stress observés sur le risque de CCR ne concerneront que la promotion, simplifiant l'interprétation des résultats. Le stress chronique aléatoire consiste à soumettre les souris à un stress différent tous les jours de la semaine (stress de contrainte, stress sonore, cage penchée, stress du prédateur, humidification de la sciure, lumière stroboscopique, stress d'isolement par exemple), les différents types de stress étant répartis de manière aléatoire chaque semaine (Bondi *et al.*, 2008; Banasr *et al.*, 2017). Le fait d'appliquer un stress de manière aléatoire permet d'allonger le temps d'habituation aux différents types de stress, le protocole de stress peut ainsi être appliqué pendant une plus longue période, permettant d'explorer les effets chroniques du stress. Une augmentation de la perméabilité intestinale a été retrouvée chez les souris soumises à ce stress (Mehranfard *et al.*, 2020). L'autre avantage du stress chronique aléatoire est qu'il est plus représentatif du stress subi par les participants de notre étude épidémiologique. En effet, nous nous sommes basés, dans l'étude épidémiologique, sur le traitement pour l'anxiété avant l'entrée dans l'étude et pendant les deux premières années de suivi, faisant référence au stress à l'âge adulte. A la fin de l'expérimentation, le dénombrement des lésions pré-néoplasiques dans les colons permettrait de conclure quant aux effets du stress chronique aléatoire et du fer héminique sur la promotion du CCR. Et des analyses complémentaires permettraient d'explorer la fonction de barrière intestinale (inflammation, perméabilité intestinales et microbiote) dans les différents groupes.

2.4. Mieux comprendre les mécanismes

2.4.1. Dissocier les effets des alcénals de ceux du fer héminique

Dans l'étude *in vivo* que nous avons effectué, nous avons administré aux souris un régime riche en fer héminique et en acides gras insaturés (huile de carthame) afin de favoriser la formation des alcénals. Les effets cytotoxiques et génotoxiques des alcénals ont été montrés *in vitro* (Bastide *et al.*, 2015), et les études *in vivo* soutiennent l'hypothèse que ce sont les alcénals qui sont responsables pour tout ou partie de la carcinogénicité du fer héminique (Pierre *et al.*, 2013; Bastide *et al.*, 2015; Martin *et al.*, 2018). *In vitro*, la chélation des alcénals a inhibé l'effet cytotoxique et des eaux fécales de souris nourries à l'hème (Martin *et al.*, 2019). Cependant, *in vivo*, la présence d'alcénals est généralement associée à la présence de fer héminique. Il serait donc intéressant de définir le poids relatif du fer héminique et des alcénals dans les phénotypes observés.

Un exemple d'expérimentation qui permettrait de dissocier les effets du fer héminique de ceux des alcénals consisterait à administrer séparément ces deux composés avec un protocole en carré latin (HNE vs. contrôle ; HEM vs. standard). Le HNE est un des principaux alcénal généré par la peroxydation lipidique induite par le fer héminique, il pourrait donc être utilisé dans cette expérimentation pour reproduire l'effet de ces alcénals. Le groupe « HNE » recevrait du HNE par gavage ; et le groupe « HEM » (pour fer héminique) recevrait un régime riche en hémine et ne contenant pas (ou très peu) de lipides insaturés, il n'y aurait pas de peroxydation lipidique et cela permettrait donc de « bloquer » la formation d'alcénals. Une huile très pauvre en acides gras mono- et polyinsaturés, et riche en acides gras saturés, qui pourrait être utilisée dans ce régime, est l'huile de coco. Un groupe supplémentaire « CON+ » recevant un régime riche en fer héminique et en lipides **insaturés** servirait de contrôle positif, permettant de vérifier que le gavage au HNE cumulé au régime riche en fer héminique sans lipides insaturés reproduit les effets retrouvés avec un régime riche en fer héminique et lipides insaturés. Ce protocole pourrait être appliqué pendant 2 à 3 semaines et le prélèvement de l'intestin grêle et du colon ainsi que du contenu colique permettrait d'explorer les effets sur les muqueuses intestinale et colique de ces trois régimes.

Une fois le poids relatif de chaque facteur déterminé, si le fer héminique et le HNE ont tous les deux un impact sur les marqueurs précoces du CCR, et si des effets similaires sont observés

Discussion et perspectives

entre les groupes « HNE-HEM » et « CON+ », il serait intéressant de faire une expérimentation avec des groupes similaires, mais sans le « CON+ », en ajoutant 4 groupes supplémentaires qui seraient soumis à un stress (chronique aléatoire par exemple) et qui auraient les mêmes régimes et gavages que les non stressés. Cela permettrait de **comparer l'impact du stress sur les effets du fer héminique et du HNE séparément**, et donc de mieux comprendre les mécanismes par lesquels le stress peut impacter la cancérogénicité de la viande rouge et de la charcuterie.

Il est également possible d'explorer les effets du fer héminique et des alcénals séparément *in vitro*. Nous avons déjà montré qu'il n'y avait pas de modification de la cytotoxicité et de la génotoxicité du HNE en situation de barrière saine ou altérée *in vitro*. Il serait intéressant d'explorer également la cyto- et génotoxicité du fer héminique dans ces situations de barrière saine ou altérée. Comparer la toxicité des alcénals et du fer héminique sur ces 2 modèles de barrière *in vitro* permettrait de mieux comprendre les effets du fer héminique sur la muqueuse intestinale.

2.4.2. Bloquer l'activation des mastocytes pour prévenir les effets du stress

Une étude menée chez l'Homme a montré que des étudiants qui devaient passer un oral devant un jury avaient une perméabilité augmentée par rapport à des témoins, et que cette augmentation de perméabilité était inhibée par un stabilisateur mastocytaire (Vanuytsel *et al.*, 2014). De plus, il a été montré chez le rat que l'utilisation d'un stabilisateur mastocytaire annulait l'augmentation de perméabilité intestinale induite par un SSM néonatal (Barreau *et al.*, 2004b). Il serait donc intéressant d'explorer les effets d'un stabilisateur mastocytaire en situation de SSM associé à un régime riche en fer héminique à l'âge adulte. Cela permettrait de voir si l'utilisation du stabilisateur mastocytaire peut prévenir l'effet amplificateur du SSM sur les effets délétères du fer héminique.

Dans un deuxième temps, si le stabilisateur mastocytaire s'avère être efficace pour prévenir l'amplification des effets délétères du fer héminique par le SSM chez la souris, il serait intéressant d'explorer son effet chez l'Homme. Plus précisément, nous pourrions explorer l'effet de la consommation de viande rouge et de lipides insaturés (mayonnaise à base d'huile de pépin de raisin par exemple) et de la prise d'un stabilisateur mastocytaire chez des volontaires soumis à un stress (des étudiants passant un oral devant un jury comme dans

Discussion et perspectives

l'étude de Vanuytsel *et al.* par exemple), sur le DHN-MA urinaire. Le stabilisateur mastocytaire serait pris avant la consommation de viande rouge/mayonnaise, et l'oral aurait lieu deux heures après la prise alimentaire, pour que le bol alimentaire soit au niveau de l'intestin grêle lors du stress. Une augmentation du DHN-MA urinaire chez les étudiants stressés par rapport aux non stressés indiquerait que le stress a augmenté le passage des alcénals de la lumière intestinale vers l'intérieur de l'organisme, et une absence d'augmentation du DHN-MA urinaire chez les étudiants stressés ayant pris un stabilisateur de mastocytes indiquerait que celui-ci a permis de prévenir l'augmentation du passage des alcénals induite par le stress. Et éventuellement à plus long terme, cela permettrait d'envisager l'utilisation de ces stabilisateurs de mastocytes chez les personnes les plus à risque de CCR par exemple, au moment de la consommation de viande rouge ou de charcuterie.

3. ENJEUX SOCIETAUX ET IMPACT DE LA THESE

Dans cette partie, nous nous intéressons aux questions sociétales associées à ce sujet de thèse et à l'impact de nos résultats sur ces questions. Nous discutons tout d'abord de l'intérêt de continuer à prévenir les effets cancérigènes de la viande rouge et de la charcuterie malgré la réduction de la consommation de viande qui se dessine pour répondre aux objectifs de développement durable. Ensuite, nous discutons de l'intérêt de prévenir les effets du stress psychologique pour diminuer le risque de cancer.

3.1. Diminuer l'impact santé de la viande rouge ou arrêter d'en consommer ?

Le rapport 2019 du GIEC (Groupe d'Experts Intergouvernemental sur l'Evolution du Climat) a souligné que la consommation de viande rouge avait un impact important sur l'environnement en raison des émissions de gaz à effet de serre liées à sa production ainsi que des grandes surfaces agricoles et de quantités importantes d'eau douce que cette production nécessite. Ces aspects environnementaux ont conduit le GIEC à recommander une réduction de la consommation de viande rouge. Compte tenu de l'influence du GIEC et de la volonté politique des pays à revenu élevé d'accélérer leurs efforts pour parvenir à la neutralité carbone, on peut s'attendre à ce que des actions en ce sens soient prises dans les années à venir. En l'absence de telles actions, selon les projections de l'OAA (Organisation des Nations

Discussion et perspectives

Unies pour l'alimentation et l'agriculture), la production de viande pourrait augmenter de 200 millions de tonnes d'ici 2050, en raison de sa consommation croissante dans les pays émergents (Ritchie and Roser, 2017).

3.1.1. *Quelques chiffres*

La production mondiale de viande a plus que quadruplé au cours des 50 dernières années, principalement en raison de l'augmentation de la consommation de viande dans les pays émergents (figure 33). La viande de porc est la viande la plus populaire au monde. Mais, bien que la production de tous les types de viande ait augmentée, c'est la production de volaille qui augmente le plus rapidement (Ritchie and Roser, 2017) (figure 34).

3.1.2. *Rapport de la commission EAT-Lancet*

La commission EAT-Lancet regroupe plusieurs experts en alimentation, santé publique et environnement et a proposé un ensemble d'objectifs pour parvenir à un système alimentaire sain et durable (Willett *et al.*, 2019). Les changements de régime alimentaire proposés par l'EAT-Lancet passent par plus d'un doublement de la consommation d'aliments sains tels que les fruits, les légumes, les légumineuses et les noix, et une réduction de plus de 50% de la consommation d'aliments moins sains, tels que les sucres ajoutés et la viande rouge (Willett *et al.*, 2019). Elle estime que l'alimentation est le levier le plus puissant pour optimiser la santé humaine et la durabilité de notre environnement, et qu'il est urgent de transformer radicalement le système alimentaire mondial pour atteindre les objectifs de développement durable (ODD) et l'Accord de Paris pour le Climat.

3.1.3. *Nécessité de diminuer l'impact santé de la viande rouge*

Il est donc important de poursuivre les **campagnes de santé publique** visant à **limiter la consommation de viande rouge** afin de **limiter son impact** sur la **santé** et sur **l'environnement**. Cependant, même si les campagnes de santé publique qui visent à diminuer la consommation de viande rouge peuvent permettre une diminution de la consommation au niveau national, l'adhésion aux recommandations nutritionnelles est inégale et les consommateurs appartenant aux catégories socio-professionnelles inférieures sont moins enclins à modifier leur régime (Darmon and Drewnowski, 2008; Smith *et al.*, 2010). De plus, selon les projections de la FAO jusqu'en 2050, même dans le scénario le plus optimiste du

Discussion et perspectives

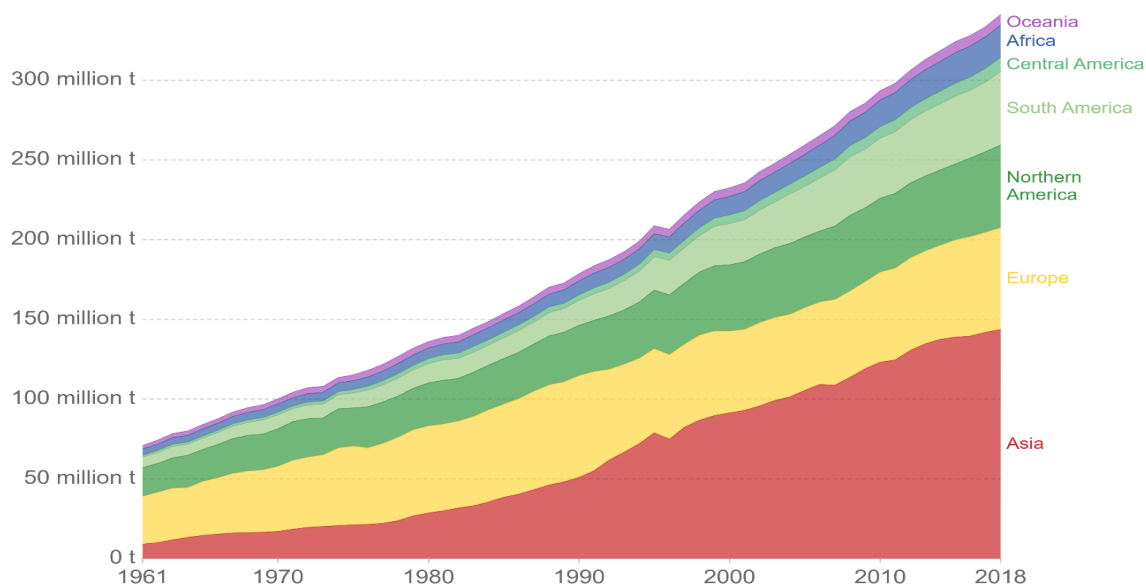


Figure 33 : Production mondiale de viande par continent, de 1961 à 2018 (UN Food and Agriculture Organization).

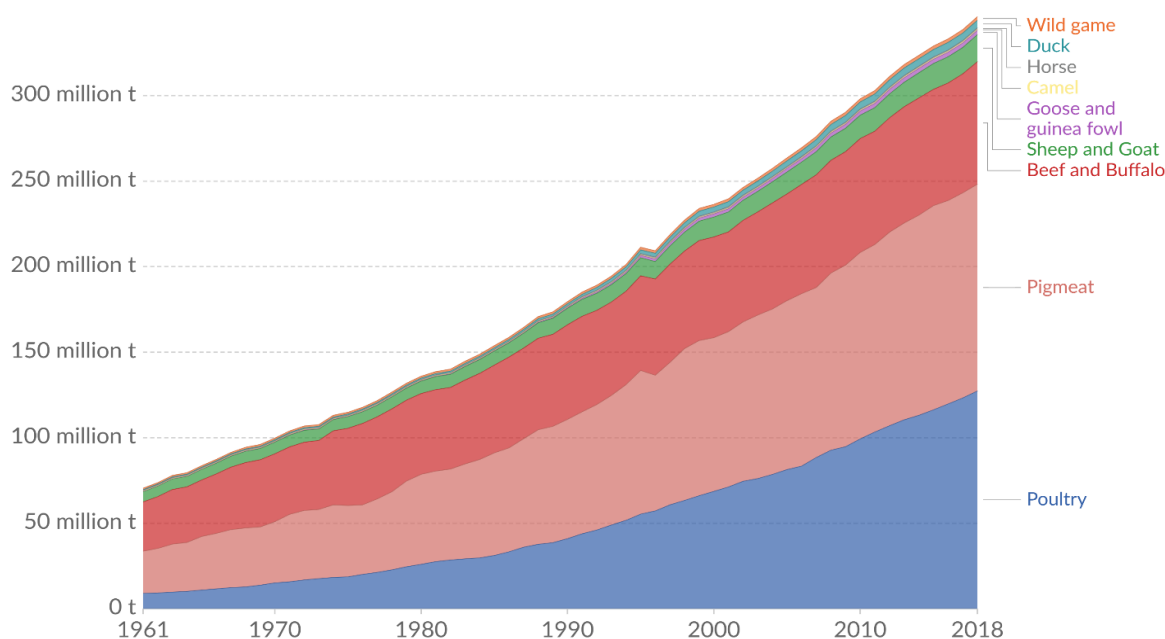


Figure 34 : Production mondiale de viande par animal, de 1961 à 2018 (UN Food and Agriculture Organization).

point de vue de la durabilité (« Towards sustainability »), la production de viande **stagne** dans les **pays occidentaux**, mais **augmente** dans les **pays émergents**, et donc également au **niveau mondial** (Figure 35, FAO, 2018).

Ainsi, la consommation de viande rouge devrait rester tout à fait significative au niveau mondial. Il faut donc s'attendre à ce que perdurent les problèmes de santé liés à la

Discussion et perspectives

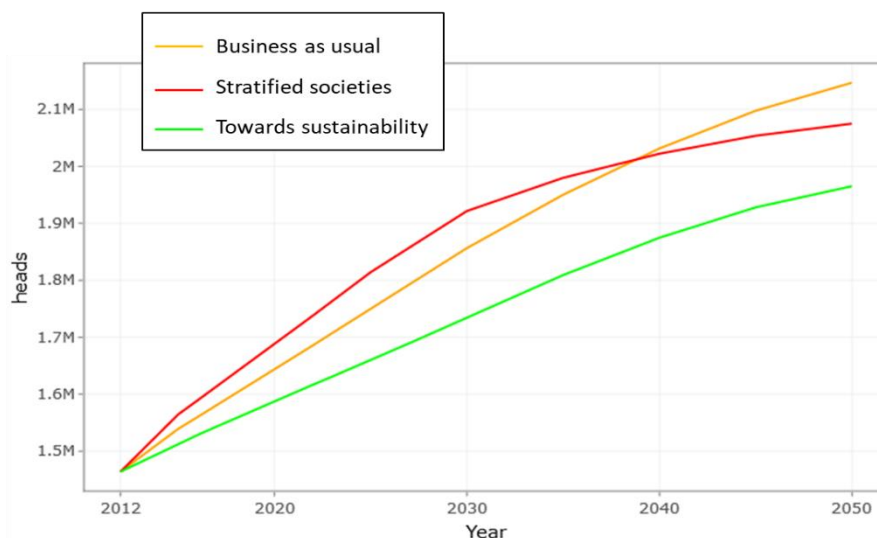


Figure 35 : Evolution de la taille des troupeaux (en nombre d'animaux) dans le monde jusqu'en 2050, selon les projections de la FAO, en fonction des différents scénarios de durabilité (FAO, 2018)

consommation de viande rouge, même si leur ampleur pourrait se réduire dans les pays occidentaux. Il restera donc nécessaire de poursuivre les recherches sur les mécanismes impliqués dans la cancérogénicité de la viande rouge, d'identifier les facteurs impactant cette association positive et sur cette base définir des stratégies de prévention efficaces pour limiter le risque dans les pays occidentaux mais aussi dans les pays développés où la consommation de viande rouge risque de continuer d'augmenter.

3.2. Intégrer les messages sur l'anxiété dans les recommandations alimentation-cancer ?

Alors que les mesures de santé publique visant à prévenir le risque de cancer incluent des recommandations nutritionnelles incitant à limiter la consommation de viande rouge et charcuterie, les résultats de cette thèse interrogent sur la place de la lutte contre l'anxiété pour prévenir le risque de cancer.

Ce qui suit est une réflexion prospective personnelle qui a pour but de réfléchir à l'impact de ce type de données si elles étaient confirmées dans d'autres cohortes et par une méta-analyse : dans notre étude épidémiologique, une augmentation de la consommation de viande rouge et charcuterie de 50g/jour était associée à une augmentation de risque de CCR de 12% (HR=1.12(0.94-1.33), $p=0.20$) chez les non anxieux, et de 42% (HR=1.42(1.03-1.94), $p=0.03$) chez les anxieux. L'association n'était pas significative chez les non-anxieux, soulevant la question de la **cancérogénicité de la viande rouge et de la charcuterie chez les non-anxieux**.

Discussion et perspectives

Dans les prochaines études explorant le lien entre consommation de viande rouge et charcuterie et risque de CCR, il serait intéressant d'intégrer une mesure de l'anxiété afin de voir si l'absence d'association significative chez les non-anxieux retrouvée dans la cohorte Nutrinet-Santé est également retrouvée dans d'autres cohortes. Si la viande rouge et la charcuterie n'étaient cancérigènes que chez les personnes anxieuses, **l'impact santé de la viande rouge et de la charcuterie pourrait être diminué en adaptant le message de recommandation ou en luttant contre l'anxiété.**

La traduction en recommandation de santé publique serait alors : « Si vous êtes anxieux, limitez la consommation de viande rouge et de charcuterie ». Une telle recommandation semble cependant impossible et non souhaitable : i) parce qu'il serait dangereux de porter un message de non limitation de la consommation de viande rouge aux personnes non anxieuses, en raison de l'impact environnemental et des autres impacts de la viande rouge sur la santé, ii) et parce qu'il est difficile pour la population de s'autoévaluer anxieux ou non anxieux de manière suffisamment précise. En revanche, à l'image de la recommandation actuelle sur l'activité physique qui vise à prévenir le surpoids, l'obésité et les pathologies associées, il pourrait être utile d'établir des recommandations d'adoption de comportements pour lutter contre le stress, et de mettre en place des politiques de santé au travail pour limiter les stimuli stressant. Par exemple, les recommandations pourraient inciter à diminuer l'utilisation des technologies de l'information et de la communication (TIC), qui constituent des sources de stress importantes (Dupuich, 2009).

En conclusion, cette thèse apporte des éléments suggérant que l'anxiété pourrait amplifier l'effet cancérigène de la viande rouge et de la charcuterie. Une diminution de la consommation de viande rouge et de charcuterie est nécessaire pour réduire le risque de cancer et pour réduire l'impact environnemental lié à la production de viande, mais il est également nécessaire de continuer à réduire l'impact de la consommation de viande rouge et de charcuterie sur la santé. Si les résultats obtenus dans cette thèse s'avéraient être confirmés, prévenir les effets de l'anxiété pourrait aussi contribuer à réduire l'effet cancérigène de la viande rouge et de la charcuterie.

ANNEXES

Annexe 1 : Données supplémentaires relatives à l'article 1 «Anxiety is a potential effect modifier of the association between red and processed meat consumption and cancer risk: findings from the NutriNet-Santé cohort»

Supplementary methods, Figures S1 and S2 and Table S1 to S11

Anxiety is a potential effect modifier of the association between red and processed meat consumption and cancer risk: findings from the NutriNet-Santé cohort

Marie Beslay¹, Bernard Srour², Mélanie Deschasaux², Edwin Fouché¹, Nathalie Naud¹, Valerie Bacquie¹, Françoise Guéraud¹, Valentina A. Andreeva², Sandrine Péneau², Eloi Chazelas², Charlotte Debras², Serge Hercberg^{2,3}, Paule Latino-Martel², Vassilia Theodorou¹, Fabrice Pierre^{1*}, Mathilde Touvier^{2*}

*FP and MT contributed equally to this work

¹ Toxalim (Research Centre in Food Toxicology), Université de Toulouse, INRAE, ENVT, INP-Purpan, UPS, Toulouse, France.

² Sorbonne Paris Nord University, Inserm U1153, Inrae U1125, Cnam, Nutritional Epidemiology Research Team (EREN), Epidemiology and Statistics Research Center – University of Paris (CRESS), Bobigny, France

³ Public Health Department, Avicenne Hospital, AP-HP, Bobigny, France

Corresponding author

Bernard Srour, PharmD, PhD, MPH
EREN - Equipe de Recherche en Epidémiologie Nutritionnelle
UMR U1153 Inserm / U1125 Inra / Cnam / Université Paris 13
CRESS - Centre de Recherche en Epidémiologie et StatistiqueS - Université de Paris
UFR SMBH - 74, rue Marcel Cachin 93017 Bobigny - FRANCE
e-mail: b.srou@eren.smbh.univ-paris13.fr

Supplementary Materials and methods

Anxiety assessment

Anxious participants were selected in three steps:

- Upon entry into the study, participants filled a baseline questionnaire in which they had to say if they had already been treated for anxiety or anxiety disorders before entering the study, but it was not asked to specify the treatment. Participants who responded having been treated for anxiety or anxiety disorders before entering the study were considered anxious.
- Every six months, participants had to say if they have been treated for anxiety or anxiety disorders since the last questionnaire they filled, and it was again not asked to specify the treatment. Participants who responded at least once having been treated for anxiety or anxiety disorders during the first two years of follow-up (and before a diagnostic of cancer) were considered anxious.
- In another annual questionnaire, participants had to report all medication they had taken since the last questionnaire they filled. Participants who reported taking treatment for anxiety (anxiolytics or plant-based self-medication) during the first two years of follow-up (and before a diagnostic of cancer) were considered anxious."

Statistical analyses

For all covariates except physical activity, $\leq 5\%$ of values were missing and were imputed to the modal value. For physical activity (14% of missing values), a "missing class" was introduced into the models. Multiple Imputation by Chained Equations (MICE) method [1] was also tested.

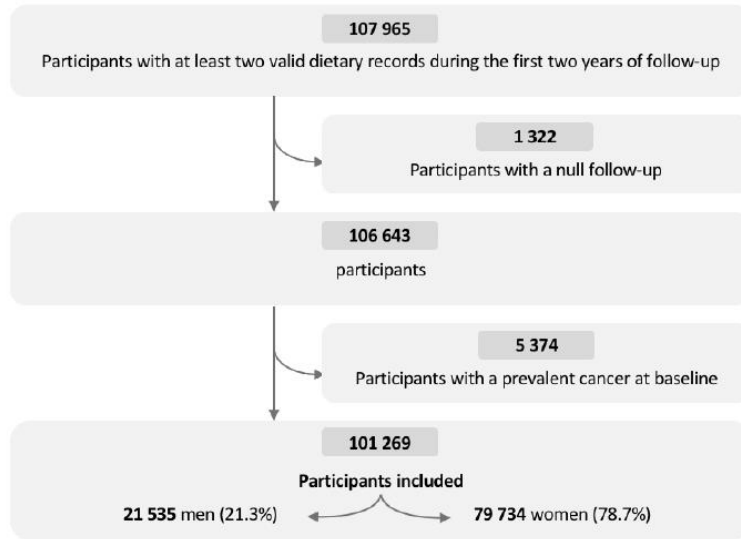
Analyses including ham in the processed meat group were tested.

We performed sensitivity analyses on the main models by adjusting for calcium instead of dairy products or fibres instead of wholegrain products, and by additionally adjusting for the average number of packs of cigarettes smoked during a year.

Annexes

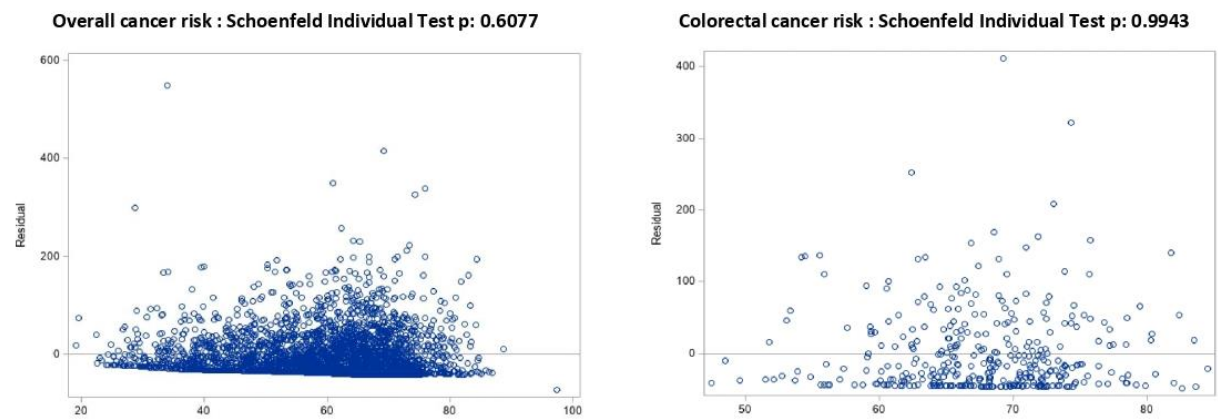
Supplementary Figure S1

Flowchart for the selection of the study population, NutriNet-Santé cohort, 2009-2019



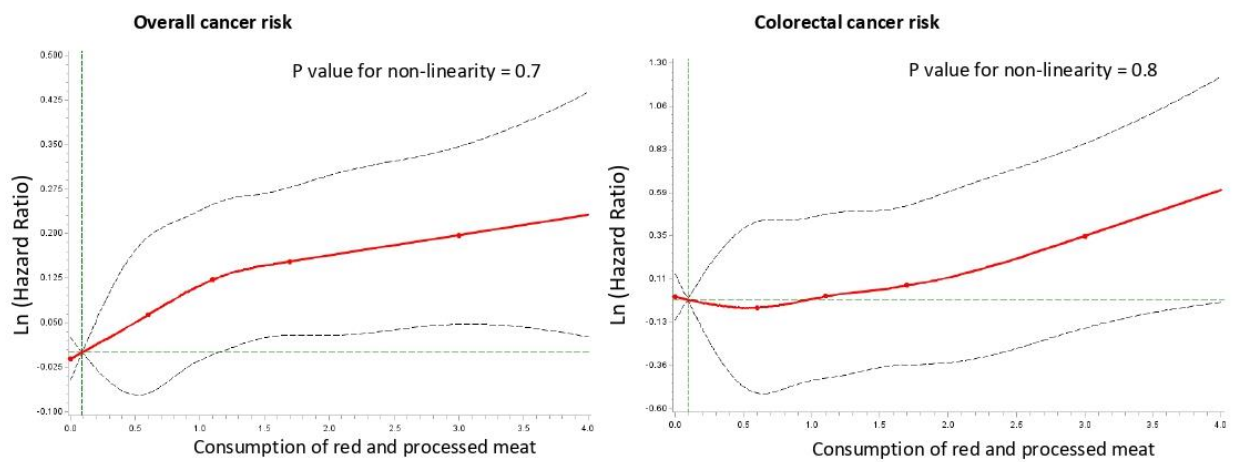
Supplementary Figure S2

Cox model proportional risk assumption testing (Schoenfeld residuals):



Supplementary Figure S3

Spline plot for linearity assumption of association between red and processed meat consumption and overall and colorectal cancer risks. Restricted cubic spline SAS macro developed by Desquilbet and Mariotti [2].



Annexes

Supplementary results

Supplementary Table S1

Baseline characteristics of study population according to sex-specific quartiles¹ of red and processed meat consumption (n=101,269), NutriNet-Santé cohort, France, 2009-19.

	All participants (n=101,269)	Quartile 1 (n=25,262)	Quartile 2 (n=25,313)	Quartile 3 (n=25,377)	Quartile 4 (n=25,317)	p-value ²
Age, years	51.2 (14.5)	50.3 (14.6)	52.0 (14.8)	51.9 (14.6)	50.4 (13.8)	<.0001
Sex, n (%)						
Female	79,734 (79)	19,879 (79)	19,929 (79)	19,993 (79)	19,933 (79)	0.996
Male	21,535 (21)	5,383 (21)	5,384 (21)	5,384 (21)	5,384 (21)	
Height, cm	166.7 (8)	166.8 (8.0)	166.5 (8.0)	166.6 (8.1)	167.1 (8.1)	<.0001
Body mass index	23.7 (5)	22.8 (4.1)	23.4 (4.0)	23.8 (4.4)	24.7 (5.0)	<.0001
Family history of cancer, n (%) ³						
No	63,722 (63)	16,176 (64)	15,767 (62)	15,742 (62)	16,037 (63)	<.0001
Yes	37,547 (37)	9,086 (36)	9,546 (38)	9,635 (38)	9,280 (37)	
Higher education, n (%)						
No	17,279 (17)	3,674 (15)	4,036 (16)	4,453 (18)	5,116 (20)	<.0001
Yes, <2 years	17,312 (17)	4,198 (17)	4,134 (16)	4,330 (17)	4,650 (18)	
Yes, ≥2 years	66,678 (66)	17,390 (69)	17,143 (68)	16,594 (65)	15,551 (61)	
Smoking status, n (%)						
Current	17513 (17)	4,125 (16)	3,883 (15)	4,230 (17)	5,275 (21)	<.0001
Former	32813 (32)	8,102 (32)	8,200 (32)	8,217 (32)	8,294 (33)	
Never	50943 (50)	13,035 (52)	13,230 (52)	12,930 (51)	11,748 (46)	
IPAQ physical activity level, n (%) ⁴						
High	28,151 (28)	7,577 (30)	7,137 (28)	6,825 (27)	6,612 (26)	<.0001
Moderate	37,580 (37)	9,850 (39)	9,770 (39)	9,439 (37)	8,521 (34)	
Low	21,420 (21)	4,586 (18)	5,104 (20)	5,563 (22)	6,167 (24)	
Missing	14,118 (14)	3,249 (13)	3,302 (13)	3,550 (14)	4,017 (16)	
Energy intake without alcohol, kcal/d	1,851 (452)	1,746 (442)	1,804 (414)	1,868 (427)	1,983 (488)	<.0001
Red meat consumption, g/d	41 (38)	6 (9)	27 (15)	47 (20)	86 (42)	<.0001
Processed meat consumption, g/d	19 (23)	5 (7)	14 (13)	22 (19)	37 (34)	<.0001
Ham consumption, g/d	12 (17)	11 (19)	12 (17)	12 (16)	12 (18)	<.0001
Alcohol intake, g/d	8 (12)	6 (10)	7 (10)	8 (12)	10 (14)	<.0001
Vegetable consumption, g/d	217 (117)	239 (140)	216 (109)	210 (105)	203 (110)	<.0001
Fruit consumption, g/d	189 (149)	216 (180)	195 (139)	183 (134)	164 (134)	<.0001
Dairy products consumption, g/d	235 (156)	221 (164)	240 (152)	240 (149)	238 (156)	<.0001
Heme iron intake, mg/d	1.2 (1.2)	0.6 (1.1)	1.0 (1.0)	1.3 (1.0)	2.0 (1.2)	<.0001
Saturated fatty acids intake, mg/d	33 (12)	29 (12)	32 (11)	34 (11)	38 (13)	<.0001
Calcium intake, mg/d	922 (299)	916 (317)	925 (286)	925 (285)	921 (305)	0.0006
Fibres intake, mg/d	19 (71)	22 (9)	19 (7)	19 (6)	18 (6)	<.0001

IPAQ=International Physical Activity Questionnaire.

Values are means (SDs) or n (%)

¹Sex specific cut-offs for quarters of ultra-processed proportions were 41, 74, and 111 g/day in men and 25, 50, and 79 in women.

²P value for comparison between non-anxious and anxious participants, by Fisher test or χ^2 test where appropriate.

³Among first-degree relatives.

⁴Available for 87,151 participants; participants were categorized into "high," "moderate," and "low" categories according to IPAQ guidelines

Annexes

Supplementary Table S2

Associations between the use of benzodiazepines and colorectal, breast, prostate and overall cancer risk from multivariable Cox proportional hazard models^a, NutriNet-Santé cohort, France, 2009–2019 (n=101 269)

	Cases / Non cases	HR50g/d (IC95%)	p
Overall cancer	3 126 / 98,143	1.09 (0.92-1.27)	0.32
Colorectal cancer	250 / 101,019	0.63 (0.31-1.28)	0.20
Breast cancer ^b	910 / 78,824	1.20 (0.91-1.57)	0.19
Prostate cancer	369 / 21,166	0.68 (0.34-1.36)	0.27

^aCox proportional hazard models were adjusted for age (time-scale), sex, body mass index (continuous, kg/m²), height (continuous, cm), physical activity (categorical IPAQ variable: high, moderate, low, missing value), smoking status (categorical: never, former, current smokers), educational level (categorical: less than high school degree, less than two years after high school degree, two and more years after high school degree), number of 24-hour dietary records (continuous), family history of cancer (categorical: yes, no), energy intake without alcohol (continuous variable: kcal/d), alcohol (continuous, g/d), fruits intake (g/d, continuous), vegetables intake (g/d, continuous), total saturated fatty acid intake (g/d, continuous), dairy products intake (g/d, continuous), wholegrain products intake (g/d, continuous) and red and processed meat consumption (g/d, continuous).

^bBreast cancer models were additionally adjusted for: age at menarche (categorical: < 12 years old, > 12 years old), age at first child (categorical: no child, before 30 years, 30 years and older), number of biological children (continuous), baseline menopausal status (categorical: menopausal, non-menopausal), oral contraceptive use at baseline (categorical: yes, no) and hormonal treatment for menopause at baseline (categorical: yes, no).

Supplementary Table S3

Associations between the consumption of red and processed meat and the risk of breast cancer, pre- and post-menopausal, among all women, non-anxious and anxious women from multivariable Cox proportional hazard models^a, NutriNet-Santé cohort, France, 2009–2019 (n=79 734)

	Cases / Non cases	HR _{1mg/d} (IC 95%)	p
All participants (n=79 734)			
Breast cancer	910 / 78 824	1.09 (0.99-1.19)	0.07
Pre-menopausal breast cancer	408 / 56 882	1.10 (0.96-1.26)	0.17
Post-menopausal breast cancer	502 / 21 942	1.08 (0.96-1.22)	0.21
Non-anxious participants (n=63 174)			
Breast cancer	710 / 62 464	1.10 (1.00-1.22)	0.06
Pre-menopausal breast cancer	310 / 45 499	1.08 (0.92-1.27)	0.33
Post-menopausal breast cancer	400 / 16 965	1.13 (0.99-1.29)	0.08
Anxious participants (n=16 560)			
Breast cancer	200 / 16 360	1.02 (0.84-1.23)	0.88
Pre-menopausal breast cancer	98 / 11 383	1.16 (0.88-1.52)	0.30
Post-menopausal breast cancer	102 / 4 977	0.91 (0.69-1.19)	0.48

^aCox proportional hazard models were adjusted for age (time-scale), sex, body mass index (continuous, kg/m²), height (continuous, cm), physical activity (categorical IPAQ variable: high, moderate, low, missing value), smoking status (categorical: never, former, current smokers), educational level (categorical: less than high school degree, less than two years after high school degree, two and more years after high school degree), number of 24-hour dietary records (continuous), family history of cancer (categorical: yes, no), energy intake without alcohol (continuous variable: kcal/d), alcohol (continuous, g/d), fruits intake (g/d, continuous), vegetables intake (g/d, continuous), total saturated fatty acid intake (g/d, continuous), dairy products intake (g/d, continuous), wholegrain products intake (g/d, continuous), age at menarche (categorical: < 12 years old, > 12 years old), age at first child (categorical: no child, before 30 years, 30 years and older), number of biological children (continuous), oral contraceptive use at baseline (categorical: yes, no) and hormonal treatment for menopause at baseline (categorical: yes, no)

Annexes

Supplementary Table S4

Associations between an increase in the intake of heme iron (from red and processed meat) and the risk of breast cancer, pre- and post-menopausal, among all women, non-anxious and anxious women from multivariable Cox proportional hazard models^a, NutriNet-Santé cohort, France, 2009–2019 (n=79 734)

	Cases / Non cases	HR _{1mg/d} (IC 95%)	p
All participants (n=79 734)			
Breast cancer	910 / 78 824	1.16 (1.05-1.29)	0.005
Pre-menopausal breast cancer	408 / 56 882	1.19 (1.01-1.41)	0.04
Post-menopausal breast cancer	502 / 21 942	1.15 (1.00-1.32)	0.06
Non-anxious participants(n=63 174)			
Breast cancer	710 / 62 464	1.18 (1.04-1.33)	0.008
Pre-menopausal breast cancer	310 / 45 499	1.15 (0.95-1.40)	0.15
Post-menopausal breast cancer	400 / 16 965	1.20 (1.03-1.41)	0.02
Anxious participants(n=16 560)			
Breast cancer	200 / 16 360	1.11 (0.89-1.39)	0.36
Pre-menopausal breast cancer	98 / 11 383	1.31 (0.94-1.81)	0.11
Post-menopausal breast cancer	102 / 4 977	0.97 (0.71-1.34)	0.86

^aCox proportional hazard models were adjusted for age (time-scale), sex, body mass index (continuous, kg/m²), height (continuous, cm), physical activity (categorical IPAQ variable: high, moderate, low, missing value), smoking status (categorical: never, former, current smokers), educational level (categorical: less than high school degree, less than two years after high school degree, two and more years after high school degree), number of 24-hour dietary records (continuous), family history of cancer (categorical: yes, no), energy intake without alcohol (continuous variable: kcal/d), alcohol (continuous, g/d), fruits intake (g/d, continuous), vegetables intake (g/d, continuous), total saturated fatty acid intake (g/d, continuous), dairy products intake (g/d, continuous), wholegrain products intake (g/d, continuous), age at menarche (categorical: < 12 years old, > 12 years old), age at first child (categorical: no child, before 30 years, 30 years and older), number of biological children (continuous), oral contraceptive use at baseline (categorical: yes, no) and hormonal treatment for menopause at baseline (categorical: yes, no)

Annexes

Supplementary Table S5

Associations between the consumption of red and processed meat and the risk of overall, colorectal, breast and prostate cancer in the whole population and in non-anxious and anxious participants from multivariable Cox proportional hazard models^a, adjusted for calcium instead of dairy products or adjusted for dietary fibres instead of wholegrain foods^b, NutriNet-Santé cohort, France, 2009–2019 (n=101 269)

	Cases / Non cases	HR _{1mg/d} (IC 95%)	p
Multivariable Cox proportional hazard models adjusted for calcium instead of dairy products			
All participants (n=101 269)			
Cancer (all locations)	3 126 / 98 143	1.07 (1.02-1.12)	0.01
Colorectal cancer	250 / 101 019	1.18 (1.016-1.38)	0.03
Breast cancer ^c	910 / 78 824	1.09 (0.99-1.19)	0.07
Prostate cancer	369 / 21 166	1.03 (0.91-1.18)	0.61
Non-anxious participants(n=82 041)			
Cancer (all locations)	2 541 / 79 500	1.05 (1.00-1.10)	0.06
Colorectal cancer	206 / 81 835	1.13 (0.95-1.34)	0.18
Breast cancer ^c	710 / 62 464	1.10 (0.99-1.22)	0.07
Prostate cancer	332 / 18 535	1.02 (0.89-1.17)	0.74
Anxious participants(n=19 228)			
Cancer (all locations)	585 / 18 643	1.14 (1.03-1.26)	0.01
Colorectal cancer	44 / 19 184	1.40 (1.02-1.93)	0.04
Breast cancer ^c	200 / 16 360	1.03 (0.85-1.25)	0.79
Prostate cancer	37 / 2 631	1.11 (0.74-1.65)	0.62
Multivariable Cox proportional hazard models adjusted for fibres instead of wholegrain foods			
All participants (n=101 269)			
Cancer (all locations)	3 126 / 98 143	1.06 (1.02-1.11)	0.01
Colorectal cancer	250 / 101 019	1.18 (1.01-1.38)	0.03
Breast cancer ^c	910 / 78 824	1.08 (0.98-1.18)	0.11
Prostate cancer	369 / 21 166	1.01 (0.89-1.15)	0.92
Non-anxious participants(n=82 041)			
Cancer (all locations)	2 541 / 79 500	1.05 (1.00-1.11)	0.06
Colorectal cancer	206 / 81 835	1.13 (0.95-1.34)	0.18
Breast cancer ^c	710 / 62 464	1.10 (0.99-1.21)	0.08
Prostate cancer	332 / 18 535	0.99 (0.86-1.14)	0.89
Anxious participants(n=19 228)			
Cancer (all locations)	585 / 18 643	1.12 (1.01-1.24)	0.03
Colorectal cancer	44 / 19 184	1.39 (1.01-1.91)	0.04
Breast cancer ^c	200 / 16 360	1.00 (0.82-1.21)	0.96
Prostate cancer	37 / 2 631	1.09 (0.73-1.61)	0.68

^aCox proportional hazard models were adjusted for age (time-scale), sex, body mass index (continuous, kg/m²), height (continuous, cm), physical activity (categorical IPAQ variable: high, moderate, low, missing value), smoking status (categorical: never, former, current smokers), educational level (categorical: less than high school degree, less than two years after high school degree, two and more years after high school degree), number of 24-hour dietary records (continuous), family history of cancer (categorical: yes, no), energy intake without alcohol (continuous variable: kcal/d), alcohol (continuous, g/d), fruits intake (g/d, continuous), vegetables intake (g/d, continuous), total saturated fatty acid intake (g/d, continuous).

^bAdditionally adjusted on calcium (mg/d, continuous) and wholegrain products intake (g/d, continuous) in the first model and on dairy products intake (g/d, continuous) and fibres (g/d, continuous) in the second model.

^cBreast cancer models were additionally adjusted for: age at menarche (categorical: < 12 years old, > 12 years old), age at first child (categorical: no child, before 30 years, 30 years and older), number of biological children (continuous), baseline menopausal status (categorical: menopausal, non-menopausal), oral contraceptive use at baseline (categorical: yes, no) and hormonal treatment for menopause at baseline (categorical: yes, no).

Annexes

Supplementary Table S6

Associations between the consumption of red and processed meat and the risk of overall, colorectal, breast and prostate cancer, excluding cases that occurred during the first two years of follow-up, in the whole population and in non-anxious and anxious participants from multivariable Cox proportional hazard models^a, NutriNet-Santé cohort, France, 2009–2019 (n=100,449)

	Cases / Non cases	HR _{1mg/d} (IC 95%)	p
All participants (n=100 449)			
Cancer (all locations)	2306 / 98143	1.09 (1.04-1.15)	0.001
Colorectal cancer	185 / 100264	1.29 (1.08-1.53)	0.004
Breast cancer ^b	653 / 78520	1.12 (1.01-1.24)	0.034
Prostate cancer	264 / 21012	1.05 (0.90-1.22)	0.559
Non-anxious participants (n=81 358)			
Cancer (all locations)	1858 / 79500	1.07 (1.01-1.13)	0.029
Colorectal cancer	151 / 81207	1.22 (1.00-1.48)	0.049
Breast cancer ^b	503 / 62218	1.14 (1.01-1.28)	0.032
Prostate cancer	234 / 18403	1.03 (0.88-1.21)	0.712
Anxious participants (n=19 091)			
Cancer (all locations)	448 / 18643	1.19 (1.06-1.33)	0.002
Colorectal cancer	34 / 19057	1.54 (1.10-2.17)	0.013
Breast cancer ^b	150 / 16302	1.05 (0.85-1.31)	0.650
Prostate cancer	30 / 2609	1.08 (0.71-1.66)	0.715

^aCox proportional hazard models were adjusted for age (time-scale), sex, body mass index (continuous, kg/m²), height (continuous, cm), physical activity (categorical IPAQ variable: high, moderate, low, missing value), smoking status (categorical: never, former, current smokers), educational level (categorical: less than high school degree, less than two years after high school degree, two and more years after high school degree), number of 24-hour dietary records (continuous), family history of cancer (categorical: yes, no), energy intake without alcohol (continuous variable: kcal/d), alcohol (continuous, g/d), fruits intake (g/d, continuous), vegetables intake (g/d, continuous), total saturated fatty acid intake (g/d, continuous), dairy products intake (g/d, continuous) and wholegrain products intake (g/d, continuous).

^bBreast cancer models were additionally adjusted for: age at menarche (categorical: < 12 years old, > 12 years old), age at first child (categorical: no child, before 30 years, 30 years and older), number of biological children (continuous), baseline menopausal status (categorical: menopausal, non-menopausal), oral contraceptive use at baseline (categorical: yes, no) and hormonal treatment for menopause at baseline (categorical: yes, no).

Supplementary Table S7

Associations between the consumption of red and processed meat and the risk of overall and colorectal cancer, in the global population and in non-anxious and anxious participants from multivariable Cox proportional hazard models^a, additionally adjusted for the average number of packs of cigarettes smoked during a year, NutriNet-Santé cohort, France, 2009–2019 (n=50,943)

	Cases / Non cases	HR _{50g/d} (IC 95%)	p
All participants (n=101 269)			
Cancer (all locations)	3 126 / 98 143	1,05 (1,01-1,10)	0,03
Colorectal cancer	250 / 101 019	1,20 (1,03-1,40)	0,02
Non-anxious participants (n=82 041)			
Cancer (all locations)	2 541 / 79 500	1,04 (0,99-1,09)	0,16
Colorectal cancer	206 / 81 835	1,15 (0,96-1,37)	0,12
Anxious participants (n=19 228)			
Cancer (all locations)	585 / 18 643	1,12 (1,01-1,24)	0,03
Colorectal cancer	44 / 19 184	1,39 (1,02-1,90)	0,04

^aCox proportional hazard models were adjusted for age (time-scale), sex, body mass index (continuous, kg/m²), height (continuous, cm), physical activity (categorical IPAQ variable: high, moderate, low, missing value), smoking status (categorical: never, former, current smokers), packs of cigarettes smoked per year (continuous), educational level (categorical: less than high school degree, less than two years after high school degree, two and more years after high school degree), number of 24-hour dietary records (continuous), family history of cancer (categorical: yes, no), energy intake without alcohol (continuous variable: kcal/d), alcohol (continuous, g/d), fruits intake (g/d, continuous), vegetables intake (g/d, continuous), total saturated fatty acid intake (g/d, continuous), dairy products intake (g/d, continuous) and wholegrain products intake (g/d, continuous).

Annexes

Supplementary Table S8

Multiple imputation for handling missing data performed using the MICE method [1], on the associations between the consumption of red and processed meat and the risks of overall and colorectal cancer in the whole population from multivariable Cox proportional hazard models^a, NutriNet-Santé cohort, France, 2009–2019 (n=101 269)

	Number of imputations	Cases / Non cases	HR _{50g/d} (IC 95%)	p
Cancer (all locations)	10	3 401 / 97 868	1.08 (1.03-1.13)	0.002
Colorectal cancer	10	270 / 100 099	1.20(1.03-1.40)	0.02

^aCox proportional hazard models were adjusted for age (time-scale), sex, body mass index (continuous, kg/m²), height (continuous, cm), physical activity (categorical IPAQ variable: high, moderate, low, missing value), smoking status (categorical: never, former, current smokers), educational level (categorical: less than high school degree, less than two years after high school degree, two and more years after high school degree), number of 24-hour dietary records (continuous), family history of cancer (categorical: yes, no), energy intake without alcohol (continuous variable: kcal/d), alcohol (continuous, g/d), fruits intake (g/d, continuous), vegetables intake (g/d, continuous), total saturated fatty acid intake (g/d, continuous), dairy products intake (g/d, continuous) and wholegrain products intake (g/d, continuous).

Supplementary Table S9

Associations between the consumption of red and processed meat and the risk of overall, colorectal, breast and prostate cancer, excluding current and former smokers, in the global population and in non-anxious and anxious participants from multivariable Cox proportional hazard models^a, NutriNet-Santé cohort, France, 2009–2019 (n=50,943)

	Cases / Non cases	HR _{1mg/d} (IC 95%)	p
All participants (n=50 943)			
Cancer (all locations)	1317 / 49626	1.09 (1.01-1.17)	0.02
Colorectal cancer	91 / 50852	1.36 (1.08-1.73)	0.01
Breast cancer ^b	466 / 41062	1.03 (0.91-1.18)	0.62
Prostate cancer	117 / 9298	0.88 (0.69-1.11)	0.28
Non-anxious participants (n=42 175)			
Cancer (all locations)	1055 / 41120	1.06 (0.98-1.15)	0.14
Colorectal cancer	76 / 42099	1.23 (0.93-1.63)	0.15
Breast cancer ^b	361 / 33341	1.08 (0.93-1.26)	0.29
Prostate cancer	106 / 8367	0.88 (0.68-1.12)	0.29
Anxious participants (n=8 768)			
Cancer (all locations)	262 / 8506	1.20 (1.03-1.39)	0.02
Colorectal cancer	15 / 8753	1.48 (0.95-2.29)	0.08
Breast cancer ^b	105 / 7721	0.88 (0.66-1.17)	0.36
Prostate cancer	11 / 931	1.61 (0.58-4.47)	0.36

^aCox proportional hazard models were adjusted for age (time-scale), sex, body mass index (continuous, kg/m²), height (continuous, cm), physical activity (categorical IPAQ variable: high, moderate, low, missing value), educational level (categorical: less than high school degree, less than two years after high school degree, two and more years after high school degree), number of 24-hour dietary records (continuous), family history of cancer (categorical: yes, no), energy intake without alcohol (continuous variable: kcal/d), alcohol (continuous, g/d), fruits intake (g/d, continuous), vegetables intake (g/d, continuous), total saturated fatty acid intake (g/d, continuous), dairy products intake (g/d, continuous) and wholegrain products intake (g/d, continuous).

^bBreast cancer models were additionally adjusted for: age at menarche (categorical: < 12 years old, > 12 years old), age at first child (categorical: no child, before 30 years, 30 years and older), number of biological children (continuous), baseline menopausal status (categorical: menopausal, non-menopausal), oral contraceptive use at baseline (categorical: yes, no) and hormonal treatment for menopause at baseline (categorical: yes, no).

Annexes

Supplementary Table S10

Associations between the consumption of red and processed meat including ham and the risk of overall, colorectal, breast and prostate cancer in the whole population and in non-anxious and anxious participants from multivariable Cox proportional hazard models^a, NutriNet-Santé cohort, France, 2009–2019 (n=101 269)

	Cases / Non cases	HR _{50g/d} (IC 95%)	p
All participants (n=101 269)			
Cancer (all locations)	3 126 / 98 143	1.05(1.01-1.10)	0.02
Colorectal cancer	250 / 101 019	1.16(1.01-1.34)	0.04
Breast cancer ^b	910 / 78 824	1.06(0.98-1.16)	0.16
Prostate cancer	369 / 21 166	1.06(0.94-1.20)	0.33
Non-anxious participants(n=82 041)			
Cancer (all locations)	2 541 / 79 500	1.049(1.00-1.10)	0.05
Colorectal cancer	206 / 81 835	1.13(0.96-1.32)	0.15
Breast cancer ^b	710 / 62 464	1.09(0.99-1.20)	0.08
Prostate cancer	332 / 18 535	1.06(0.93-1.20)	0.38
Anxious participants(n=19 228)			
Cancer (all locations)	585 / 18 643	1.07(0.97-1.18)	0.17
Colorectal cancer	44 / 19 184	1.31(0.96-1.81)	0.09
Breast cancer ^b	200 / 16 360	0.97(0.81-1.16)	0.73
Prostate cancer	37 / 2 631	1.06(0.73-1.54)	0.77

^aCox proportional hazard models were adjusted for age (time-scale), sex, body mass index (continuous, kg/m²), height (continuous, cm), physical activity (categorical IPAQ variable: high, moderate, low, missing value), smoking status (categorical: never, former, current smokers), educational level (categorical: less than high school degree, less than two years after high school degree, two and more years after high school degree), number of 24-hour dietary records (continuous), family history of cancer (categorical: yes, no), energy intake without alcohol (continuous variable: kcal/d), alcohol (continuous, g/d), fruits intake (g/d, continuous), vegetables intake (g/d, continuous), total saturated fatty acid intake (g/d, continuous), dairy products intake (g/d, continuous) and wholegrain products intake (g/d, continuous).

^bBreast cancer models were additionally adjusted for: age at menarche (categorical: < 12 years old, > 12 years old), age at first child (categorical: no child, before 30 years, 30 years and older), number of biological children (continuous), baseline menopausal status (categorical: menopausal, non-menopausal), oral contraceptive use at baseline (categorical: yes, no) and hormonal treatment for menopause at baseline (categorical: yes, no).

Note: P for interaction between anxiety and consumption of red and processed meat including ham is 0.78 for overall cancer, 0.08 for colorectal cancer, 0.23 for breast cancer and 0.69 for prostate cancer.

Annexes

Supplementary Table S11

Associations between the consumption of the intake of heme iron (from red meat, processed meat including ham) and the risk of overall, colorectal, breast and prostate cancer in the whole population and in non-anxious and anxious participants from multivariable Cox proportional hazard models^a, NutriNet-Santé cohort, France, 2009–2019 (n=101 269)

	Cases / Non cases	HR _{1mg/d} (IC 95%)	p
All participants (n=101 269)			
Cancer (all locations)	3 126 / 98 143	1.09 (1.03-1.15)	0.002
Colorectal cancer	250 / 101 019	1.23 (1.02-1.47)	0.03
Breast cancer ^b	910 / 78 824	1.15 (1.04-1.28)	0.009
Prostate cancer	369 / 21 166	0.99 (0.84-1.16)	0.88
Non-anxious participants (n=82 041)			
Cancer (all locations)	2 541 / 79 500	1.07 (1.01-1.14)	0.04
Colorectal cancer	206 / 81 835	1.16 (0.94-1.42)	0.18
Breast cancer ^b	710 / 62 464	1.17 (1.04-1.32)	0.01
Prostate cancer	332 / 18 535	0.98 (0.82-1.16)	0.78
Anxious participants (n=19 228)			
Cancer (all locations)	585 / 18 643	1.18 (1.05-1.33)	0.006
Colorectal cancer	44 / 19 184	1.50 (1.03-2.19)	0.03
Breast cancer ^b	200 / 16 360	1.10 (0.87-1.37)	0.42
Prostate cancer	37 / 2 631	1.06 (0.63-1.78)	0.82

^aCox proportional hazard models were adjusted for age (time-scale), sex, body mass index (continuous, kg/m²), height (continuous, cm), physical activity (categorical IPAQ variable: high, moderate, low, missing value), smoking status (categorical: never, former, current smokers), educational level (categorical: less than high school degree, less than two years after high school degree, two and more years after high school degree), number of 24-hour dietary records (continuous), family history of cancer (categorical: yes, no), energy intake without alcohol (continuous variable: kcal/d), alcohol (continuous, g/d), fruits intake (g/d, continuous), vegetables intake (g/d, continuous), total saturated fatty acid intake (g/d, continuous), dairy products intake (g/d, continuous) and wholegrain products intake (g/d, continuous).

^bBreast cancer models were additionally adjusted for: age at menarche (categorical: < 12 years old, > 12 years old), age at first child (categorical: no child, before 30 years, 30 years and older), number of biological children (continuous), baseline menopausal status (categorical: menopausal, non-menopausal), oral contraceptive use at baseline (categorical: yes, no) and hormonal treatment for menopause at baseline (categorical: yes, no).

Note: P for interaction between anxiety and intake of heme iron (from red meat, processed meat including ham) is 0.21 for overall cancer, 0.08 for colorectal cancer, 0.53 for breast cancer and 0.95 for prostate cancer.

References

1. Sterne JAC, White IR, Carlin JB, et al (2009) Multiple imputation for missing data in epidemiological and clinical research: potential and pitfalls. *BMJ* 338:b2393. <https://doi.org/10.1136/bmj.b2393>
2. Desquilbet L, Mariotti F (2010) Dose-response analyses using restricted cubic spline functions in public health research. *Stat Med* 29:1037–1057. <https://doi.org/10.1002/sim.3841>

Annexes

Annexe 2 : Données supplémentaires relatives à l'article 2 «Early life stress reinforces genotoxic and hyperproliferative effects of heme iron diet on colonic epithelium of adult mice»

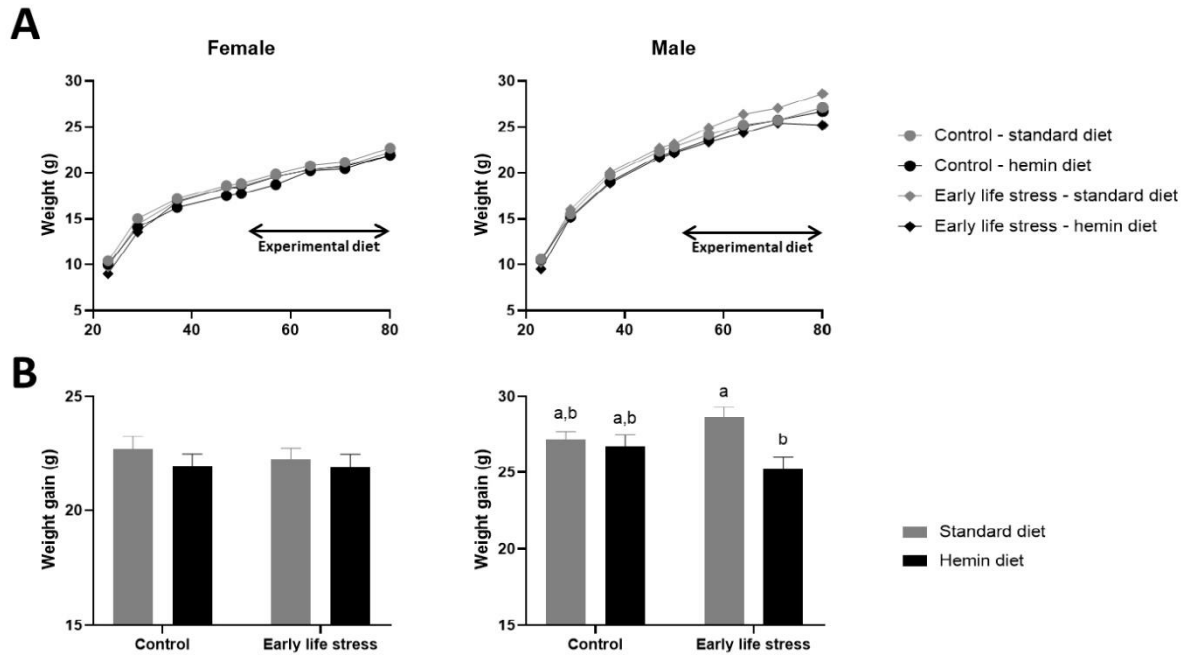


Fig. S1 Body weight gain of mice in response to diet after weaning. **A**, weight gain of the mice along the experiment. **B**, weight gain of the mice at the end of the experiment (PND 80). A 2-factor ANOVA was used in both sexes. Same letters indicate no significant difference between the groups.

RÉFÉRENCES

- Adak, A. and Khan, M.R. 2019. An insight into gut microbiota and its functionalities. *Cellular and Molecular Life Sciences* 76: 473–493.
- Ait-Belgnaoui, A., Bradesi, S., Fioramonti, J., Theodorou, V. and Bueno, L. 2005. Acute stress-induced hypersensitivity to colonic distension depends upon increase in paracellular permeability: role of myosin light chain kinase. *PAIN* 113: 141–147.
- Ait-Belgnaoui, A., Colom, A., Braniste, V., Ramalho, L., Marrot, A., Cartier, C., Houdeau, E., Theodorou, V. and Tompkins, T. 2014. Probiotic gut effect prevents the chronic psychological stress-induced brain activity abnormality in mice. *Neurogastroenterology & Motility* 26: 510–520.
- Ait-Belgnaoui, A., Durand, H., Cartier, C., Chaumaz, G., Eutamene, H., Ferrier, L., Houdeau, E., Fioramonti, J., Bueno, L. and Theodorou, V. 2012. Prevention of gut leakiness by a probiotic treatment leads to attenuated HPA response to an acute psychological stress in rats. *Psychoneuroendocrinology* 37: 1885–1895.
- Albert-Bayo, M., Paracuellos, I., González-Castro, A.M., Rodríguez-Urrutia, A., Rodríguez-Lagunas, M.J., Alonso-Cotoner, C., Santos, J. and Vicario, M. 2019. Intestinal Mucosal Mast Cells: Key Modulators of Barrier Function and Homeostasis. *Cells* 8.
- Allam, O., Bahuaud, D., Taché, S., Naud, N., Corpet, D.E. and Pierre, F.H.F. 2011. Calcium carbonate suppresses haem toxicity markers without calcium phosphate side effects on colon carcinogenesis. *The British Journal of Nutrition* 105: 384–392.
- Alonso, J., Angermeyer, M.C., Bernert, S., Bruffaerts, R., Brugha, T.S., Bryson, H., Girolamo, G. de, Graaf, R. de, Demyttenaere, K., Gasquet, I., Haro, J.M., Katz, S.J., Kessler, R.C., Kovess, V., Lépine, J.P., Ormel, J., Polidori, G., Russo, L.J., Vilagut, G., Almansa, J., Arbabzadeh-Bouchez, S., Autonell, J., Bernal, M., Buist-Bouwman, M.A., Codony, M., Domingo-Salvany, A., Ferrer, M., Joo, S.S., Martínez-Alonso, M., Matschinger, H., Mazzi, F., Morgan, Z., Morosini, P., Palacín, C., Romera, B., Taub, N. and Vollebergh, W. a. M. 2004. Prevalence of mental disorders in Europe: results from the European Study of the Epidemiology of Mental Disorders (ESEMeD) project. *Acta Psychiatrica Scandinavica* 109: 21–27.
- Ancellin, R., Cottet, V., Druésne-Pecollo, N., Pierre, F., Touillaud, M., Deschasaux, M., Touvier, M., Vasson, M.-P. and Latino-Martel, P. 2017. Rapport INCa 2015 « Nutrition et prévention primaire des cancers : actualisation des données scientifiques ». *Nutrition Clinique et Métabolisme* 31: 71–72.
- ANSES 2016. *Actualisation des repères du PNNS: révision des repères de consommation alimentaire : avis de l'ANSES, rapport d'expertise collective*. Anses éditions, Maisons-Alfort, .
- ANSES 2017. *Enquête INCA 3*. ANSES, Agence nationale de sécurité sanitaire, alimentation,

Références

environnement, travail, Maisons-Alfort, .

- ANSM 2017. Available at <https://ansm.sante.fr/S-informer/Points-d-information-Points-d-information/Etat-des-lieux-de-la-consommation-des-benzodiazepines-Point-d-Information>. Accessed January 7, 2021.
- Araki, Y., Katoh, T., Ogawa, A., Bamba, S., Andoh, A., Koyama, S., Fujiyama, Y. and Bamba, T. 2005. Bile acid modulates transepithelial permeability via the generation of reactive oxygen species in the Caco-2 cell line. *Free Radical Biology & Medicine* 39: 769–780.
- Artursson, P. and Karlsson, J. 1991. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 175: 880–885.
- Ayyadurai, S., Gibson, A.J., D’Costa, S., Overman, E.L., Sommerville, L.J., Poopal, A.C., Mackey, E., Li, Y. and Moeser, A.J. 2017. Frontline Science: Corticotropin-releasing factor receptor subtype 1 is a critical modulator of mast cell degranulation and stress-induced pathophysiology. *Journal of Leukocyte Biology* 102: 1299–1312.
- Aznar, N., Patel, A., Rohena, C.C., Dunkel, Y., Joosen, L.P., Taupin, V., Kufareva, I., Farquhar, M.G. and Ghosh, P. 2016. AMP-activated protein kinase fortifies epithelial tight junctions during energetic stress via its effector GIV/Girdin. *ELife* 5.
- Bahri, N., Fathi Najafi, T., Homaei Shandiz, F., Tohidinik, H.R. and Khajavi, A. 2019. The relation between stressful life events and breast cancer: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Breast Cancer Research and Treatment* 176: 53–61.
- Banasr, M., Lepack, A., Fee, C., Duric, V., Maldonado-Aviles, J., DiLeone, R., Sibille, E., Duman, R.S. and Sanacora, G. 2017. Characterization of GABAergic marker expression in the chronic unpredictable stress model of depression. *Chronic Stress (Thousand Oaks, Calif.)* 1.
- Bansidhar, B.J. and Silinsky, J. 2012. History and Pathogenesis of Lynch Syndrome. *Clinics in Colon and Rectal Surgery* 25: 63–66.
- Baradat, M., Jouanin, I., Dalleau, S., Taché, S., Gieules, M., Debrauwer, L., Canlet, C., Huc, L., Dupuy, J., Pierre, F.H.F. and Guéraud, F. 2011. 4-Hydroxy-2(E)-nonenal Metabolism Differs in Apc+/+ Cells and in ApcMin/+ Cells: It May Explain Colon Cancer Promotion by Heme Iron. *Chemical Research in Toxicology* 24: 1984–1993.
- Barreau, F., Ferrier, L., Fioramonti, J. and Bueno, L. 2004a. Neonatal maternal deprivation triggers long term alterations in colonic epithelial barrier and mucosal immunity in rats. *Gut* 53: 501–506.
- Barreau, F., Cartier, C., Ferrier, L., Fioramonti, J. and Bueno, L. 2004b. Nerve growth factor mediates alterations of colonic sensitivity and mucosal barrier induced by neonatal stress in rats. *Gastroenterology* 127: 524–534.
- Bastide, N.M., Pierre, F.H.F. and Corpet, D.E. 2011. Heme Iron from Meat and Risk of Colorectal Cancer: A Meta-analysis and a Review of the Mechanisms Involved. *Cancer Prevention*

Références

Research 4: 177–184.

- Bastide, N.M., Morois, S., Cadeau, C., Kangas, S., Serafini, M., Gusto, G., Dossus, L., Pierre, F.H., Clavel-Chapelon, F. and Boutron-Ruault, M.-C. 2016. Heme Iron Intake, Dietary Antioxidant Capacity, and Risk of Colorectal Adenomas in a Large Cohort Study of French Women. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 25: 640–647.
- Bastide, N.M., Chenni, F., Audebert, M., Santarelli, R.L., Taché, S., Naud, N., Baradat, M., Jouanin, I., Surya, R., Hobbs, D.A., Kuhnle, G.G., Raymond-Letron, I., Gueraud, F., Corpet, D.E. and Pierre, F.H.F. 2015. A central role for heme iron in colon carcinogenesis associated with red meat intake. *Cancer Research* 75: 870–879.
- Bénétiér, C., Bertin, M., Calamassi-Tran, G., Dubuisson, C., Dufour, A., Gauchard, F., Lafay, L., Lioret, S., Touvier, M. and Volatier, J.-L. 2006. *Enquête INCA 2*.
- Bevins, C.L. and Salzman, N.H. 2011. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nature Reviews. Microbiology* 9: 356–368.
- Bondar, N.P., Lepeshko, A.A. and Reshetnikov, V.V. 2018. Effects of Early-Life Stress on Social and Anxiety-Like Behaviors in Adult Mice: Sex-Specific Effects. *Behavioural Neurology* 2018: 1538931.
- Bondi, C.O., Rodriguez, G., Gould, G.G., Frazer, A. and Morilak, D.A. 2008. Chronic Unpredictable Stress Induces a Cognitive Deficit and Anxiety-Like Behavior in Rats that is Prevented by Chronic Antidepressant Drug Treatment. *Neuropsychopharmacology* 33: 320–331.
- Borre, Y.E., O’Keeffe, G.W., Clarke, G., Stanton, C., Dinan, T.G. and Cryan, J.F. 2014. Microbiota and neurodevelopmental windows: implications for brain disorders. *Trends in Molecular Medicine* 20: 509–518.
- Boudry, G., Jury, J., Yang, P.C. and Perdue, M.H. 2007. Chronic psychological stress alters epithelial cell turn-over in rat ileum. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 292: G1228-1232.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A. and Jemal, A. 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 68: 394–424.
- Brenner, H., Kloor, M. and Pox, C.P. 2014. Colorectal cancer. *The Lancet* 383: 1490–1502.
- Briske-Anderson, M.J., Finley, J.W. and Newman, S.M. 1997. The influence of culture time and passage number on the morphological and physiological development of Caco-2 cells. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 214: 248–257.
- Buckley, A. and Turner, J.R. 2018. Cell Biology of Tight Junction Barrier Regulation and Mucosal Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 10.
- Bürtin, F., Mullins, C.S. and Linnebacher, M. 2020. Mouse models of colorectal cancer: Past,

Références

- present and future perspectives. *World Journal of Gastroenterology* 26: 1394–1426.
- Cani, P.D., Possemiers, S., Van de Wiele, T., Guiot, Y., Everard, A., Rottier, O., Geurts, L., Naslain, D., Neyrinck, A., Lambert, D.M., Muccioli, G.G. and Delzenne, N.M. 2009. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut* 58: 1091–1103.
- Cani, P.D., Amar, J., Iglesias, M.A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., Neyrinck, A.M., Fava, F., Tuohy, K.M., Chabo, C., Waget, A., Delmée, E., Cousin, B., Sulpice, T., Chamontin, B., Ferrières, J., Tanti, J.-F., Gibson, G.R., Casteilla, L., Delzenne, N.M., Alessi, M.C. and Burcelin, R. 2007. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56: 1761–1772.
- Cao, M., Wang, P., Sun, C., He, W. and Wang, F. 2013. Amelioration of IFN- γ and TNF- α -Induced Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction by Berberine via Suppression of MLCK-MLC Phosphorylation Signaling Pathway. *PLoS ONE* 8.
- Capaldo, C.T. and Nusrat, A. 2009. Cytokine regulation of tight junctions. *Biochimica et Biophysica Acta* 1788: 864–871.
- Capaldo, C.T., Farkas, A.E., Hilgarth, R.S., Krug, S.M., Wolf, M.F., Benedik, J.K., Fromm, M., Koval, M., Parkos, C. and Nusrat, A. 2014. Proinflammatory cytokine-induced tight junction remodeling through dynamic self-assembly of claudins. *Molecular Biology of the Cell* 25: 2710–2719.
- Charles, M.-A. 2013. Importance de la théorie des origines développementales de la santé (DOHaD) pour les inégalités sociales de santé. *Revue d'Épidémiologie et de Santé Publique* 61: S133–S138.
- Chelakkot, C., Ghim, J. and Ryu, S.H. 2018. Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications. *Experimental & Molecular Medicine* 50: 1–9.
- Cho, Y.A., Lee, J., Oh, J.H., Chang, H.J., Sohn, D.K., Shin, A. and Kim, J. 2019. Genetic Risk Score, Combined Lifestyle Factors and Risk of Colorectal Cancer. *Cancer Research and Treatment: Official Journal of Korean Cancer Association* 51: 1033–1040.
- Cifarelli, V., Ivanov, S., Xie, Y., Son, N.-H., Saunders, B.T., Pietka, T.A., Shew, T.M., Yoshino, J., Sundaresan, S., Davidson, N.O., Goldberg, I.J., Gelman, A.E., Zinselmeyer, B.H., Randolph, G.J. and Abumrad, N.A. 2016. CD36 Deficiency Impairs the Small Intestinal Barrier and Induces Subclinical Inflammation in Mice. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 3: 82–98.
- Cillard, J. and Cillard, P. 2006. Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *Oléagineux, Corps gras, Lipides* 13: 24–29.
- Clayburgh, D.R., Barrett, T.A., Tang, Y., Meddings, J.B., Van Eldik, L.J., Watterson, D.M., Clarke, L.L., Mrsny, R.J. and Turner, J.R. 2005. Epithelial myosin light chain kinase-dependent barrier dysfunction mediates T cell activation-induced diarrhea in vivo. *The Journal of Clinical Investigation* 115: 2702–2715.

Références

- Cogliano, V.J., Baan, R.A., Straif, K., Grosse, Y., Secretan, B. and El Ghissassi, F. 2008. Use of mechanistic data in IARC evaluations. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 49: 100–109.
- Cohidon 2007. *Prévalence des troubles de santé mentale et conséquences sur l'activité professionnelle en France dans l'enquête 'Santé mentale en population générale : images et réalités'*.
- Collins, S.M. 2001. Stress and the Gastrointestinal Tract IV. Modulation of intestinal inflammation by stress: basic mechanisms and clinical relevance. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 280: G315-318.
- Corpet, D.E. and Pierre, F. 2005. How good are rodent models of carcinogenesis in predicting efficacy in humans? A systematic review and meta-analysis of colon chemoprevention in rats, mice and men. *European Journal of Cancer* 41: 1911–1922.
- Cryan, J.F., O'Riordan, K.J., Cowan, C.S.M., Sandhu, K.V., Bastiaanssen, T.F.S., Boehme, M., Codagnone, M.G., Cusotto, S., Fulling, C., Golubeva, A.V., Guzzetta, K.E., Jaggar, M., Long-Smith, C.M., Lyte, J.M., Martin, J.A., Molinero-Perez, A., Moloney, G., Morelli, E., Morillas, E., O'Connor, R., Cruz-Pereira, J.S., Peterson, V.L., Rea, K., Ritz, N.L., Sherwin, E., Spichak, S., Teichman, E.M., van de Wouw, M., Ventura-Silva, A.P., Wallace-Fitzsimons, S.E., Hyland, N., Clarke, G. and Dinan, T.G. 2019. The Microbiota-Gut-Brain Axis. *Physiological Reviews* 99: 1877–2013.
- Cui, W., Li, L.X., Sun, C.M., Wen, Y., Zhou, Y., Dong, Y.L. and Liu, P. 2010. Tumor necrosis factor alpha increases epithelial barrier permeability by disrupting tight junctions in Caco-2 cells. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Medicas E Biologicas* 43: 330–337.
- Dallman, M.F., Akana, S.F., Jacobson, L., Levin, N., Cascio, C.S. and Shinsako, J. 1987. Characterization of corticosterone feedback regulation of ACTH secretion. *Annals of the New York Academy of Sciences* 512: 402–414.
- Damms-Machado, A., Louis, S., Schnitzer, A., Volynets, V., Rings, A., Basrai, M. and Bischoff, S.C. 2017. Gut permeability is related to body weight, fatty liver disease, and insulin resistance in obese individuals undergoing weight reduction. *The American Journal of Clinical Nutrition* 105: 127–135.
- Darmon, N. and Drewnowski, A. 2008. Does social class predict diet quality? *The American Journal of Clinical Nutrition* 87: 1107–1117.
- De Palma, G., Blennerhassett, P., Lu, J., Deng, Y., Park, A.J., Green, W., Denou, E., Silva, M.A., Santacruz, A., Sanz, Y., Surette, M.G., Verdu, E.F., Collins, S.M. and Bercik, P. 2015. Microbiota and host determinants of behavioural phenotype in maternally separated mice. *Nature Communications* 6: 7735.
- De Robertis, M., Massi, E., Poeta, M.L., Carotti, S., Morini, S., Cecchetelli, L., Signori, E. and Fazio, V.M. 2011. The AOM/DSS murine model for the study of colon carcinogenesis: From pathways

Références

- to diagnosis and therapy studies. *Journal of Carcinogenesis* 10: 9.
- Defossez, G., Le Guyader-Peyrou, S., Uhry, Z., Grosclaude, P., Colonna, M., Dantony, E. and et al. 2019. *Estimations Nationales de l'incidence et de La Mortalité Par Cancer En France Métropolitaine Entre 1990 et 2018*. Santé publique France, Saint-Maurice, .
- Dekker, E., Tanis, P.J., Vleugels, J.L.A., Kasi, P.M. and Wallace, M.B. 2019. Colorectal cancer. *The Lancet* 394: 1467–1480.
- Dennis, M.J., Massey, R.C., McWeeny, D.J., Knowles, M.E. and Watson, D. 1983. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in UK total diets. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 21: 569–574.
- Dethlefsen, L., McFall-Ngai, M. and Relman, D.A. 2007. An ecological and evolutionary perspective on human–microbe mutualism and disease. *Nature* 449: 811–818.
- Diallo, A., Deschasaux, M., Latino-Martel, P., Hercberg, S., Galan, P., Fassier, P., Allès, B., Guéraud, F., Pierre, F.H. and Touvier, M. 2018. Red and processed meat intake and cancer risk: Results from the prospective NutriNet-Santé cohort study. *International Journal of Cancer* 142: 230–237.
- Dimitrios, T. 2017. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Anal. Biochem.* Available at <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27789233/>. Accessed December 2, 2020.
- Dinarvand, P., Davaro, E.P., Doan, J.V., Ising, M.E., Evans, N.R., Phillips, N.J., Lai, J. and Guzman, M.A. 2019. Familial Adenomatous Polyposis Syndrome: An Update and Review of Extraintestinal Manifestations. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 143: 1382–1398.
- Dupuich, F. 2009. Impact des Technologies de l'Information et de la Communication (TIC) sur la Gestion des Ressources Humaines (GRH) dans les firmes « high-tech ». *Management Avenir* n° 21: 221–243.
- Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E. and Relman, D.A. 2005. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science* 308: 1635–1638.
- Elinav, E., Nowarski, R., Thaiss, C.A., Hu, B., Jin, C. and Flavell, R.A. 2013. Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. *Nature Reviews Cancer* 13: 759–771.
- Evans, J.P., Sutton, P.A., Winiarski, B.K., Fenwick, S.W., Malik, H.Z., Vimalachandran, D., Tweedle, E.M., Costello, E., Palmer, D.H., Park, B.K. and Kitteringham, N.R. 2016. From mice to men: Murine models of colorectal cancer for use in translational research. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 98: 94–105.
- Everard, A., Belzer, C., Geurts, L., Ouwerkerk, J.P., Druart, C., Bindels, L.B., Guiot, Y., Derrien, M., Muccioli, G.G., Delzenne, N.M., de Vos, W.M. and Cani, P.D. 2013. Cross-talk between

Références

- Akkermansia muciniphila and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110: 9066–9071.
- FAO 2018. *The Future of Food and Agriculture – Alternative Pathways to 2050*. Rome, .
- Farshori, P. and Kachar, B. 1999. Redistribution and phosphorylation of occludin during opening and resealing of tight junctions in cultured epithelial cells. *The Journal of Membrane Biology* 170: 147–156.
- Fearon, E.R. and Vogelstein, B. 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61: 759–767.
- Ferrier, L., Mazelin, L., Cenac, N., Desreumaux, P., Janin, A., Emilie, D., Colombel, J.-F., Garcia-Villar, R., Fioramonti, J. and Bueno, L. 2003. Stress-induced disruption of colonic epithelial barrier: role of interferon- γ and myosin light chain kinase in mice. *Gastroenterology* 125: 795–804.
- Filippo, C.D., Cavalieri, D., Paola, M.D., Ramazzotti, M., Poulet, J.B., Massart, S., Collini, S., Pieraccini, G. and Lionetti, P. 2010. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 14691–14696.
- Fink, G. 2016. Chapter 1 - Stress, Definitions, Mechanisms, and Effects Outlined: Lessons from Anxiety. In: Fink, G. (Ed.) , *Stress: Concepts, Cognition, Emotion, and Behavior*, Academic Press, San Diego, pp. 3–11.
- Fujibe, M., Chiba, H., Kojima, T., Soma, T., Wada, T., Yamashita, T. and Sawada, N. 2004. Thr203 of claudin-1, a putative phosphorylation site for MAP kinase, is required to promote the barrier function of tight junctions. *Experimental Cell Research* 295.
- Gallo, R.L. and Hooper, L.V. 2012. Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nature Reviews. Immunology* 12: 503–516.
- Gamage, S.M.K., Dissabandara, L., Lam, A.K.-Y. and Gopalan, V. 2018. The role of heme iron molecules derived from red and processed meat in the pathogenesis of colorectal carcinoma. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 126: 121–128.
- Gjerstad, J.K., Lightman, S.L. and Spiga, F. 2018. Role of glucocorticoid negative feedback in the regulation of HPA axis pulsatility. *Stress (Amsterdam, Netherlands)* 21: 403–416.
- Glei, M., Klenow, S., Sauer, J., Wegewitz, U., Richter, K. and Pool-Zobel, B.L. 2006. Hemoglobin and heme induce DNA damage in human colon tumor cells HT29 clone 19A and in primary human colonocytes. *Mutation Research* 594: 162–171.
- Groschwitz, K.R. and Hogan, S.P. 2009. Intestinal Barrier Function: Molecular Regulation and Disease Pathogenesis. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 124: 3–22.
- Guéraud, F., Atalay, M., Bresgen, N., Cipak, A., Eckl, P.M., Huc, L., Jouanin, I., Siems, W. and Uchida, K. 2010. Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. *Free Radical Research* 44: 1098–1124.

Références

- Guéraud, F., Taché, S., Steghens, J.-P., Milkovic, L., Borovic-Sunjic, S., Zarkovic, N., Gaultier, E., Naud, N., Héliès-Toussaint, C., Pierre, F. and Priymenko, N. 2015. Dietary polyunsaturated fatty acids and heme iron induce oxidative stress biomarkers and a cancer promoting environment in the colon of rats. *Free Radical Biology & Medicine* 83: 192–200.
- Hamidi, E.N., Hajeb, P., Selamat, J. and Abdull Razis, A.F. 2016. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and their Bioaccessibility in Meat: a Tool for Assessing Human Cancer Risk. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP* 17: 15–23.
- Hattay, P., Prusator, D.K., Tran, L. and Greenwood-Van Meerveld, B. 2017. Psychological stress-induced colonic barrier dysfunction: Role of immune-mediated mechanisms. *Neurogastroenterology and Motility: The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 29.
- He, W.-Q., Wang, J., Sheng, J.-Y., Zha, J.-M., Graham, W.V. and Turner, J.R. 2020. Contributions of Myosin Light Chain Kinase to Regulation of Epithelial Paracellular Permeability and Mucosal Homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences* 21.
- Heikkilä, K., Nyberg, S.T., Theorell, T., Fransson, E.I., Alfredsson, L., Bjorner, J.B., Bonenfant, S., Borritz, M., Bouillon, K., Burr, H., Dragano, N., Geuskens, G.A., Goldberg, M., Hamer, M., Hooftman, W.E., Houtman, I.L., Joensuu, M., Knutsson, A., Koskenvuo, M., Koskinen, A., Kouvonen, A., Madsen, I.E.H., Magnusson Hanson, L.L., Marmot, M.G., Nielsen, M.L., Nordin, M., Oksanen, T., Pentti, J., Salo, P., Rugulies, R., Steptoe, A., Suominen, S., Vahtera, J., Virtanen, M., Väänänen, A., Westerholm, P., Westerlund, H., Zins, M., Ferrie, J.E., Singh-Manoux, A., Batty, G.D., Kivimäki, M., and IPD-Work Consortium 2013. Work stress and risk of cancer: meta-analysis of 5700 incident cancer events in 116,000 European men and women. *BMJ (Clinical Research Ed.)* 346: f165.
- Helander, H.F. and Fändriks, L. 2014. Surface area of the digestive tract - revisited. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 49: 681–689.
- Hercberg, S., Castetbon, K., Czernichow, S., Malon, A., Mejean, C., Kesse, E., Touvier, M. and Galan, P. 2010. The Nutrinet-Santé Study: a web-based prospective study on the relationship between nutrition and health and determinants of dietary patterns and nutritional status. *BMC Public Health* 10: 242.
- Hermiston, M.L. and Gordon, J.I. 1995. In vivo analysis of cadherin function in the mouse intestinal epithelium: essential roles in adhesion, maintenance of differentiation, and regulation of programmed cell death. *The Journal of Cell Biology* 129: 489–506.
- Hooda, J., Shah, A. and Zhang, L. 2014. Heme, an Essential Nutrient from Dietary Proteins, Critically Impacts Diverse Physiological and Pathological Processes. *Nutrients* 6: 1080–1102.
- Huo, R., Zeng, B., Zeng, L., Cheng, K., Li, B., Luo, Y., Wang, H., Zhou, C., Fang, L., Li, W., Niu, R., Wei, H. and Xie, P. 2017. Microbiota Modulate Anxiety-Like Behavior and Endocrine Abnormalities in Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7.

Références

- IARC 2010. *Ingested Nitrate and Nitrite, and Cyanobacterial Peptide Toxins*. International Agency for Research on Cancer, .
- Ijssennagger, N., Rijnierse, A., de Wit, N.J.W., Boekschoten, M.V., Dekker, J., Schonewille, A., Müller, M. and van der Meer, R. 2013. Dietary heme induces acute oxidative stress, but delayed cytotoxicity and compensatory hyperproliferation in mouse colon. *Carcinogenesis* 34: 1628–1635.
- Ijssennagger, N., Belzer, C., Hooiveld, G.J., Dekker, J., Mil, S.W.C. van, Müller, M., Kleerebezem, M. and Meer, R. van der 2015. Gut microbiota facilitates dietary heme-induced epithelial hyperproliferation by opening the mucus barrier in colon. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112: 10038–10043.
- Irving, M.H. and Catchpole, B. 1992. ABC of colorectal diseases. Anatomy and physiology of the colon, rectum, and anus. *BMJ : British Medical Journal* 304: 1106–1108.
- Ishikawa, S., Tamaki, S., Ohata, M., Arihara, K. and Itoh, M. 2010. Heme induces DNA damage and hyperproliferation of colonic epithelial cells via hydrogen peroxide produced by heme oxygenase: a possible mechanism of heme-induced colon cancer. *Molecular Nutrition & Food Research* 54: 1182–1191.
- Jain, S., Suzuki, T., Seth, A., Samak, G. and Rao, R. 2011. Protein kinase C ζ phosphorylates occludin and promotes assembly of epithelial tight junctions. *The Biochemical Journal* 437: 289–299.
- Jean-Luc Volatier 2000. *Enquête INCA*.
- Johansson, M.E.V., Phillipson, M., Petersson, J., Velcich, A., Holm, L. and Hansson, G.C. 2008. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 15064–15069.
- Joosen, A.M.C.P., Kuhnle, G.G.C., Aspinall, S.M., Barrow, T.M., Lecommandeur, E., Azqueta, A., Collins, A.R. and Bingham, S.A. 2009. Effect of processed and red meat on endogenous nitrosation and DNA damage. *Carcinogenesis* 30: 1402–1407.
- Juruena, M.F., Eror, F., Cleare, A.J. and Young, A.H. 2020. The Role of Early Life Stress in HPA Axis and Anxiety. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1191: 141–153.
- Kahn, B.B., Alquier, T., Carling, D. and Hardie, D.G. 2005. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metabolism* 1: 15–25.
- Kelly, J.R., Kennedy, P.J., Cryan, J.F., Dinan, T.G., Clarke, G. and Hyland, N.P. 2015. Breaking down the barriers: the gut microbiome, intestinal permeability and stress-related psychiatric disorders. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 9.
- Kikuchi, N., Nishiyama, T., Sawada, T., Wang, C., Lin, Y., Watanabe, Y., Tamakoshi, A. and Kikuchi, S. 2017. Perceived Stress and Colorectal Cancer Incidence: The Japan Collaborative Cohort Study. *Scientific Reports* 7: 40363.

Références

- Kim, Y.S. and Ho, S.B. 2010. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Current Gastroenterology Reports* 12: 319–330.
- Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. 1996. Lessons from Hereditary Colorectal Cancer. *Cell* 87: 159–170.
- Kirpich, I.A., Feng, W., Wang, Y., Liu, Y., Barker, D.F., Barve, S.S. and McClain, C.J. 2012. The type of dietary fat modulates intestinal tight junction integrity, gut permeability, and hepatic toll-like receptor expression in a mouse model of alcoholic liver disease. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research* 36: 835–846.
- Konturek, P.C., Brzozowski, T. and Konturek, S.J. 2011. Stress and the gut: pathophysiology, clinical consequences, diagnostic approach and treatment options. *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society* 62: 591–599.
- Kunzelmann, K. and Mall, M. 2002. Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease. *Physiological Reviews* 82: 245–289.
- Landgraf, M., McGovern, J.A., Friedl, P. and Hutmacher, D.W. 2018. Rational Design of Mouse Models for Cancer Research. *Trends in Biotechnology* 36: 242–251.
- Lavalette, C., Adjibade, M., Srour, B., Sellem, L., Fiolet, T., Hercberg, S., Latino-Martel, P., Fassier, P., Deschasaux, M., Kesse-Guyot, E. and Touvier, M. 2018. Cancer-Specific and General Nutritional Scores and Cancer Risk: Results from the Prospective NutriNet-Santé Cohort. *Cancer Research* 78: 4427–4435.
- Lea, T. 2015. Caco-2 Cell Line. In: Verhoeckx, K., P. Cotter, I. López-Expósito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, T. Requena, D. Swiatecka and H. Wichers (Eds.) , *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*, Springer, Cham (CH), .
- Lennon, E.M., Maharshak, N., Elloumi, H., Borst, L., Plevy, S.E. and Moeser, A.J. 2013. Early life stress triggers persistent colonic barrier dysfunction and exacerbates colitis in adult IL-10^{-/-} mice. *Inflammatory Bowel Diseases* 19: 712–719.
- Leoz, M.L., Carballal, S., Moreira, L., Ocaña, T. and Balaguer, F. 2015. The genetic basis of familial adenomatous polyposis and its implications for clinical practice and risk management. *The Application of Clinical Genetics* 8: 95–107.
- Liu, H., Li, M., Wang, P. and Wang, F. 2011. Blockade of hypoxia-inducible factor-1 α by YC-1 attenuates interferon- γ and tumor necrosis factor- α -induced intestinal epithelial barrier dysfunction. *Cytokine* 56: 581–588.
- Liu, H., Wang, P., Cao, M., Li, M. and Wang, F. 2012. Protective role of oligomycin against intestinal epithelial barrier dysfunction caused by IFN- γ and TNF- α . *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology* 29: 799–808.
- Lung, M.S., Trainer, A.H., Campbell, I. and Lipton, L. 2015. Familial colorectal cancer. *Internal Medicine Journal* 45: 482–491.

Références

- Luo, B., Xiang, D., Nieman, D.C. and Chen, P. 2014. The effects of moderate exercise on chronic stress-induced intestinal barrier dysfunction and antimicrobial defense. *Brain, Behavior, and Immunity* 39: 99–106.
- Ma, T.Y. 1997. Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction in Crohn's Disease. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 214: 318–327.
- Mabbott, N.A., Donaldson, D.S., Ohno, H., Williams, I.R. and Mahajan, A. 2013. Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. *Mucosal Immunology* 6: 666–677.
- MacArthur Clark, J. 2018. The 3Rs in research: a contemporary approach to replacement, reduction and refinement. *The British Journal of Nutrition* 120: S1–S7.
- Maeda, H., Ishida, N., Kawauchi, H. and Tsujimura, K. 1969. Reaction of fluorescein-isothiocyanate with proteins and amino acids. I. Covalent and non-covalent binding of fluorescein-isothiocyanate and fluorescein to proteins. *Journal of Biochemistry* 65: 777–783.
- Magnavita, N. and Fileni, A. 2014. Association of work-related stress with depression and anxiety in radiologists. *La Radiologia Medica* 119: 359–366.
- Marnett, L.J., Riggins, J.N. and West, J.D. 2003. Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein. *Journal of Clinical Investigation* 111: 583–593.
- Marques, T.M., Wall, R., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Ryan, C.A. and Stanton, C. 2010. Programming infant gut microbiota: influence of dietary and environmental factors. *Current Opinion in Biotechnology* 21: 149–156.
- Martin, O., Lin, C., Naud, N., Tache, S., Raymond-Letron, I., Corpet, D.E. and Pierre, F.H. 2015. Antibiotic suppression of intestinal microbiota reduces heme-induced lipoperoxidation associated with colon carcinogenesis in rats. *Nutrition and Cancer* 67: 119–125.
- Martin, O., Naud, N., Taché, S., Debrauwer, L., Chevolleau, S., Dupuy, J., Chantelauze, C., Durand, D., Pujos-Guillot, E., Blas-Y-Estrada, F., Urbano, C., Kuhnle, G.G.C., Santé-Lhoutellier, V., Sayd, T., Viala, D., Blot, A., Meunier, N., Schlich, P., Attaix, D., Guéraud, F., Scislawski, V., Corpet, D.E. and Pierre, F.H.F. 2018. Targeting Colon Luminal Lipid Peroxidation Limits Colon Carcinogenesis Associated with Red Meat Consumption. *Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)* 11: 569–580.
- Martin, O., Olier, M., Ellero-Simatos, S., Naud, N., Dupuy, J., Huc, L., Taché, S., Graillot, V., Levêque, M., Bézirard, V., Héliès-Toussaint, C., Estrada, F.B.Y., Tondereau, V., Lippi, Y., Naylies, C., Peyriga, L., Canlet, C., Davila, A.M., Blachier, F., Ferrier, L., Boutet-Robinet, E., Guéraud, F., Théodorou, V. and Pierre, F.H.F. 2019. Haem iron reshapes colonic luminal environment: impact on mucosal homeostasis and microbiome through aldehyde formation. *Microbiome* 7.
- McDaniel, J.T., Nuhu, K., Ruiz, J. and Alorbi, G. 2019. Social determinants of cancer incidence and mortality around the world: an ecological study. *Global Health Promotion* 26: 41–49.

Références

- Mehranfard, N., Yazdi, A., Rafiei, A., Shakerin, Z. and Ghasemi, M. 2020. Honey protects against chronic unpredictable mild stress induced- intestinal barrier disintegration and hepatic inflammation. *Molecular Biology Reports* 47: 8475–8484.
- Menegaux, F., Anger, A., Randrianasolo, H., Mulot, C., Laurent-Puig, P., Iborra, F., Bringer, J.-P., Leizour, B., Thuret, R., Lamy, P.-J., Rébillard, X., Trétarre, B., and EPICAP Study Group 2014. Epidemiological study of prostate cancer (EPICAP): a population-based case-control study in France. *BMC Cancer* 14: 106.
- Mesrine, S., Gusto, G., Clavel-Chapelon, F., Boutron-Ruault, M.-C. and Fournier, A. 2018. Use of benzodiazepines and cardiovascular mortality in a cohort of women aged over 50 years. *European Journal of Clinical Pharmacology* 74: 1475–1484.
- de Moura, N.A., Caetano, B.F.R., Bidinotto, L.T., Rodrigues, M.A.M. and Barbisan, L.F. 2019. Dietary hemin promotes colonic preneoplastic lesions and DNA damage but not tumor development in a medium-term model of colon carcinogenesis in rats. *Mutation Research* 846: 403076.
- Murakami, Y., Tanabe, S. and Suzuki, T. 2016. High-fat Diet-induced Intestinal Hyperpermeability is Associated with Increased Bile Acids in the Large Intestine of Mice. *Journal of Food Science* 81: H216–H222.
- Narayan, S. and Roy, D. 2003. Role of APC and DNA mismatch repair genes in the development of colorectal cancers. *Molecular Cancer* 2: 41.
- Nguyen, L.H., Goel, A. and Chung, D.C. 2020. Pathways of Colorectal Carcinogenesis. *Gastroenterology* 158: 291–302.
- Norat, T., Bingham, S., Ferrari, P., Slimani, N., Jenab, M., Mazuir, M., Overvad, K., Olsen, A., Tjønneland, A., Clavel, F., Boutron-Ruault, M.-C., Kesse, E., Boeing, H., Bergmann, M.M., Nieters, A., Linseisen, J., Trichopoulou, A., Trichopoulos, D., Tountas, Y., Berrino, F., Palli, D., Panico, S., Tumino, R., Vineis, P., Bueno-de-Mesquita, H.B., Peeters, P.H.M., Engeset, D., Lund, E., Skeie, G., Ardanaz, E., González, C., Navarro, C., Quirós, J.R., Sanchez, M.-J., Berglund, G., Mattisson, I., Hallmans, G., Palmqvist, R., Day, N.E., Khaw, K.-T., Key, T.J., San Joaquin, M., Hémon, B., Saracci, R., Kaaks, R. and Riboli, E. 2005. Meat, Fish, and Colorectal Cancer Risk: The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 97: 906–916.
- Novellademunt, L., Antas, P. and Li, V.S.W. 2015. Targeting Wnt signaling in colorectal cancer. A Review in the Theme: Cell Signaling: Proteins, Pathways and Mechanisms. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 309: C511–C521.
- Oertel, S., Scholich, K., Weigert, A., Thomas, D., Schmetzer, J., Trautmann, S., Wegner, M.-S., Radeke, H.H., Filmann, N., Brüne, B., Geisslinger, G., Tegeder, I. and Grösch, S. 2017. Ceramide synthase 2 deficiency aggravates AOM-DSS-induced colitis in mice: role of colon barrier integrity. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 74: 3039–3055.
- O'Mahony, S.M., Hyland, N.P., Dinan, T.G. and Cryan, J.F. 2011. Maternal separation as a model

Références

- of brain-gut axis dysfunction. *Psychopharmacology* 214: 71–88.
- Otte, J.-M., Cario, E. and Podolsky, D.K. 2004. Mechanisms of cross hyporesponsiveness to Toll-like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 126: 1054–1070.
- Overman, E.L., Rivier, J.E. and Moeser, A.J. 2012. CRF Induces Intestinal Epithelial Barrier Injury via the Release of Mast Cell Proteases and TNF- α . *PLoS ONE* 7.
- Patel, R.M., Myers, L.S., Kurundkar, A.R., Maheshwari, A., Nusrat, A. and Lin, P.W. 2012. Probiotic Bacteria Induce Maturation of Intestinal Claudin 3 Expression and Barrier Function. *The American Journal of Pathology* 180: 626–635.
- Paul, M. and Leibovici, L. 2014. Systematic review or meta-analysis? Their place in the evidence hierarchy. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 20: 97–100.
- Pellat, A., Netter, J., Perkins, G., Cohen, R., Coulet, F., Parc, Y., Svrcek, M., Duval, A. and André, T. 2019. [Lynch syndrome: What is new?]. *Bulletin Du Cancer* 106: 647–655.
- Perego, M., Tyurin, V.A., Tyurina, Y.Y., Yellets, J., Nacarelli, T., Lin, C., Nefedova, Y., Kossenkov, A., Liu, Q., Sreedhar, S., Pass, H., Roth, J., Vogl, T., Feldser, D., Zhang, R., Kagan, V.E. and Gabrilovich, D.I. 2020. Reactivation of dormant tumor cells by modified lipids derived from stress-activated neutrophils. *Science Translational Medicine* 12.
- Perkins, S., Clarke, A.R., Steward, W. and Gescher, A. 2003. Age-related difference in susceptibility of Apc(Min/+) mice towards the chemopreventive efficacy of dietary aspirin and curcumin. *British Journal of Cancer* 88: 1480–1483.
- Peterson, L.W. and Artis, D. 2014. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nature Reviews. Immunology* 14: 141–153.
- Petimar, J., Smith-Warner, S.A., Rosner, B., Chan, A.T., Giovannucci, E.L. and Tabung, F.K. 2019. Adherence to the World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research 2018 Recommendations for Cancer Prevention and Risk of Colorectal Cancer. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers* 28: 1469–1479.
- Phillips, D.H. 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 443: 139–147.
- Pierre, F., Taché, S., Petit, C.R., Van der Meer, R. and Corpet, D.E. 2003. Meat and cancer: haemoglobin and haemin in a low-calcium diet promote colorectal carcinogenesis at the aberrant crypt stage in rats. *Carcinogenesis* 24: 1683–1690.
- Pierre, F., Freeman, A., Taché, S., Van der Meer, R. and Corpet, D.E. 2004. Beef meat and blood sausage promote the formation of azoxymethane-induced mucin-depleted foci and aberrant crypt foci in rat colons. *The Journal of Nutrition* 134: 2711–2716.
- Pierre, F., Santarelli, R., Taché, S., Guéraud, F. and Corpet, D.E. 2008. Beef meat promotion of dimethylhydrazine-induced colorectal carcinogenesis biomarkers is suppressed by dietary calcium. *The British Journal of Nutrition* 99: 1000–1006.

Références

- Pierre, F., Tache, S., Guéraud, F., Rerole, A.L., Jourdan, M.-L. and Petit, C. 2007. Apc mutation induces resistance of colonic cells to lipoperoxide-triggered apoptosis induced by faecal water from haem-fed rats. *Carcinogenesis* 28: 321–327.
- Pierre, F., Peiro, G., Taché, S., Cross, A.J., Bingham, S.A., Gasc, N., Gottardi, G., Corpet, D.E. and Guéraud, F. 2006. New marker of colon cancer risk associated with heme intake: 1,4-dihydroxynonane mercapturic acid. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 15: 2274–2279.
- Pierre, F.H.F., Martin, O.C.B., Santarelli, R.L., Taché, S., Naud, N., Guéraud, F., Audebert, M., Dupuy, J., Meunier, N., Attaix, D., Vendeuvre, J.-L., Mirvish, S.S., Kuhnle, G.C.G., Cano, N. and Corpet, D.E. 2013. Calcium and α -tocopherol suppress cured-meat promotion of chemically induced colon carcinogenesis in rats and reduce associated biomarkers in human volunteers. *The American Journal of Clinical Nutrition* 98: 1255–1262.
- Plaza-Bolaños, P., Frenich, A. and Vidal, J. 2010. Polycyclic aromatic hydrocarbons in food and beverages. Analytical methods and trends. *Journal of Chromatography. A* 1217: 6303–26.
- Plovier, H., Everard, A., Druart, C., Depommier, C., Van Hul, M., Geurts, L., Chilloux, J., Ottman, N., Duparc, T., Lichtenstein, L., Myridakis, A., Delzenne, N.M., Klievink, J., Bhattacharjee, A., van der Ark, K.C.H., Aalvink, S., Martinez, L.O., Dumas, M.-E., Maiter, D., Loumaye, A., Hermans, M.P., Thissen, J.-P., Belzer, C., de Vos, W.M. and Cani, P.D. 2017. A purified membrane protein from Akkermansia muciniphila or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. *Nature Medicine* 23: 107–113.
- Pokutta, S. and Weis, W.I. 2002. The cytoplasmic face of cell contact sites. *Current Opinion in Structural Biology* 12: 255–262.
- Pokutta, S. and Weis, W.I. 2007. Structure and mechanism of cadherins and catenins in cell-cell contacts. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 23: 237–261.
- Powell, S.M., Zilz, N., Beazer-Barclay, Y., Bryan, T.M., Hamilton, S.R., Thibodeau, S.N., Vogelstein, B. and Kinzler, K.W. 1992. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 359: 235–237.
- Rao, R. 2009. Occludin phosphorylation in regulation of epithelial tight junctions. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1165: 62–68.
- Reeves, P.G. 1997. Components of the AIN-93 Diets as Improvements in the AIN-76A Diet. *The Journal of Nutrition* 127: 838S-841S.
- Reeves, P.G., Nielsen, F.H. and Fahey, G.C. 1993. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *The Journal of Nutrition* 123: 1939–1951.
- Reul, J.M.H.M. and Kloet, E.R.D. 1985. Two Receptor Systems for Corticosterone in Rat Brain: Microdistribution and Differential Occupation. *Endocrinology* 117: 2505–2511.

Références

- Revollo, H.-W., Qureshi, A., Collazos, F., Valero, S. and Casas, M. 2011. Acculturative stress as a risk factor of depression and anxiety in the Latin American immigrant population. *International Review of Psychiatry (Abingdon, England)* 23: 84–92.
- Ritchie, H. and Roser, M. 2017. Meat and Dairy Production. *Our World in Data*.
- Rohr, M.W., Narasimhulu, C.A., Rudeski-Rohr, T.A. and Parthasarathy, S. 2020. Negative Effects of a High-Fat Diet on Intestinal Permeability: A Review. *Advances in Nutrition* 11: 77–91.
- Romeo, R.D., Mueller, A., Sisti, H.M., Ogawa, S., McEwen, B.S. and Brake, W.G. 2003. Anxiety and fear behaviors in adult male and female C57BL/6 mice are modulated by maternal separation. *Hormones and Behavior* 43: 561–567.
- Rook, G. a. W., Raison, C.L. and Lowry, C.A. 2014. Microbial ‘old friends’, immunoregulation and socioeconomic status. *Clinical and Experimental Immunology* 177: 1–12.
- Sakakibara, A., Furuse, M., Saitou, M., Ando-Akatsuka, Y. and Tsukita, S. 1997. Possible involvement of phosphorylation of occludin in tight junction formation. *The Journal of Cell Biology* 137: 1393–1401.
- Santé Publique France 2019. *Adéquation aux nouvelles recommandations alimentaires des adultes âgés de 18 à 54 ans vivant en France : Étude Esteban 2014-2016*.
- Sawa, T., Akaike, T., Kida, K., Fukushima, Y., Takagi, K. and Maeda, H. 1998. Lipid peroxy radicals from oxidized oils and heme-iron: implication of a high-fat diet in colon carcinogenesis. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 7: 1007–1012.
- Seiwert, N., Heylmann, D., Hasselwander, S. and Fahrner, J. 2019. Mechanism of colorectal carcinogenesis triggered by heme iron from red meat. *Biochimica Et Biophysica Acta. Reviews on Cancer* 1873: 188334.
- Sesink, A.L., Termont, D.S., Kleibeuker, J.H. and Van der Meer, R. 1999. Red meat and colon cancer: the cytotoxic and hyperproliferative effects of dietary heme. *Cancer Research* 59: 5704–5709.
- Sesink, A.L., Termont, D.S., Kleibeuker, J.H. and Van Der Meer, R. 2000. Red meat and colon cancer: dietary haem, but not fat, has cytotoxic and hyperproliferative effects on rat colonic epithelium. *Carcinogenesis* 21: 1909–1915.
- Sesink, A.L., Termont, D.S., Kleibeuker, J.H. and Van der Meer, R. 2001. Red meat and colon cancer: dietary haem-induced colonic cytotoxicity and epithelial hyperproliferation are inhibited by calcium. *Carcinogenesis* 22: 1653–1659.
- Shen, L., Weber, C.R., Raleigh, D.R., Yu, D. and Turner, J.R. 2011. Tight junction pore and leak pathways: a dynamic duo. *Annual Review of Physiology* 73: 283–309.
- Shibahara, S. 2003. The heme oxygenase dilemma in cellular homeostasis: new insights for the feedback regulation of heme catabolism. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* 200: 167–186.

Références

- Simon, K. 2016. Colorectal cancer development and advances in screening. *Clinical Interventions in Aging* 11: 967–976.
- Singh, R.K., Chang, H.-W., Yan, D., Lee, K.M., Ucmak, D., Wong, K., Abrouk, M., Farahnik, B., Nakamura, M., Zhu, T.H., Bhutani, T. and Liao, W. 2017. Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. *Journal of Translational Medicine* 15.
- Smith, M.P., Olatunde, O. and White, C. 2010. Inequalities in disability-free life expectancy by area deprivation: England, 2001-04 and 2005-08. *Health Statistics Quarterly* 36–57.
- Snider, A.J., Bialkowska, A.B., Ghaleb, A.M., Yang, V.W., Obeid, L.M. and Hannun, Y.A. 2016. Murine Model for Colitis-Associated Cancer of the Colon. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1438: 245–254.
- Soderholm, A.T. and Pedicord, V.A. 2019. Intestinal epithelial cells: at the interface of the microbiota and mucosal immunity. *Immunology* 158: 267–280.
- Soerjomataram, I., Shield, K., Marant-Micallef, C., Vignat, J., Hill, C., Rogel, A., Menvielle, G., Dossus, L., Ormsby, J.-N., Rehm, J., Rushton, L., Vineis, P., Parkin, M. and Bray, F. 2018. Cancers related to lifestyle and environmental factors in France in 2015. *European Journal of Cancer* 105: 103–113.
- Srinivasan, B., Kolli, A.R., Esch, M.B., Abaci, H.E., Shuler, M.L. and Hickman, J.J. 2015. TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. *Journal of Laboratory Automation* 20: 107–126.
- Steinberg, G.R. and Kemp, B.E. 2009. AMPK in Health and Disease. *Physiological Reviews* 89: 1025–1078.
- Stoffel, E.M. and Yurgelun, M.B. 2016. Genetic predisposition to colorectal cancer: Implications for treatment and prevention. *Seminars in Oncology* 43: 536–542.
- Su, L., Shen, L., Clayburgh, D.R., Nalle, S.C., Sullivan, E.A., Meddings, J.B., Abraham, C. and Turner, J.R. 2009. Targeted Epithelial Tight Junction Dysfunction Causes Immune Activation and Contributes to Development of Experimental Colitis. *Gastroenterology* 136: 551–563.
- Sudo, N., Chida, Y., Aiba, Y., Sonoda, J., Oyama, N., Yu, X.-N., Kubo, C. and Koga, Y. 2004. Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic–pituitary–adrenal system for stress response in mice. *The Journal of Physiology* 558: 263–275.
- Sumiyoshi, M., Sakanaka, M. and Kimura, Y. 2006. Chronic intake of high-fat and high-sucrose diets differentially affects glucose intolerance in mice. *The Journal of Nutrition* 136: 582–587.
- Surtees, P.G., Wainwright, N.W.J., Pooley, K.A., Luben, R.N., Khaw, K.-T., Easton, D.F. and Dunning, A.M. 2011. Life Stress, Emotional Health, and Mean Telomere Length in the European Prospective Investigation into Cancer (EPIC)-Norfolk Population Study. *The Journals of Gerontology: Series A* 66A: 1152–1162.
- Surya, R., Héliès-Toussaint, C., Martin, O.C., Gauthier, T., Guéraud, F., Taché, S., Naud, N., Jouanin, I., Chantelauze, C., Durand, D., Joly, C., Pujos-Guillot, E., Pierre, F.H. and Huc, L. 2016.

Références

- Red meat and colorectal cancer: Nrf2-dependent antioxidant response contributes to the resistance of preneoplastic colon cells to fecal water of hemoglobin- and beef-fed rats. *Carcinogenesis* 37: 635–645.
- Suzuki, T. and Hara, H. 2010. Dietary fat and bile juice, but not obesity, are responsible for the increase in small intestinal permeability induced through the suppression of tight junction protein expression in LETO and OLETF rats. *Nutrition & Metabolism* 7: 19.
- Tan, J., McKenzie, C., Potamitis, M., Thorburn, A.N., Mackay, C.R. and Macia, L. 2014. Chapter Three - The Role of Short-Chain Fatty Acids in Health and Disease. In: Alt, F.W. (Ed.) , *Advances in Immunology*, Academic Press, vol. 121. pp. 91–119.
- Tractenberg, S.G., Levandowski, M.L., de Azeredo, L.A., Orso, R., Roithmann, L.G., Hoffmann, E.S., Brenhouse, H. and Grassi-Oliveira, R. 2016. An overview of maternal separation effects on behavioural outcomes in mice: Evidence from a four-stage methodological systematic review. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 68: 489–503.
- Turner, J.R., Rill, B.K., Carlson, S.L., Carnes, D., Kerner, R., Mrsny, R.J. and Madara, J.L. 1997. Physiological regulation of epithelial tight junctions is associated with myosin light-chain phosphorylation. *The American Journal of Physiology* 273: C1378-1385.
- Van der Sluis, M., De Koning, B.A.E., De Bruijn, A.C.J.M., Velcich, A., Meijerink, J.P.P., Van Goudoever, J.B., Büller, H.A., Dekker, J., Van Seuningen, I., Renes, I.B. and Einerhand, A.W.C. 2006. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology* 131: 117–129.
- Van Itallie, C.M. and Anderson, J.M. 2006. Claudins and epithelial paracellular transport. *Annual Review of Physiology* 68: 403–429.
- Vancamelbeke, M. and Vermeire, S. 2017. The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology* 11: 821–834.
- Vanuytsel, T., van Wanrooy, S., Vanheel, H., Vanormelingen, C., Verschuere, S., Houben, E., Salim Rasoel, S., Tóth, J., Holvoet, L., Farré, R., Van Oudenhove, L., Boeckxstaens, G., Verbeke, K. and Tack, J. 2014. Psychological stress and corticotropin-releasing hormone increase intestinal permeability in humans by a mast cell-dependent mechanism. *Gut* 63: 1293–1299.
- Varghese, A.K., Verdú, E.F., Bercik, P., Khan, W.I., Blennerhassett, P.A., Szechtman, H. and Collins, S.M. 2006. Antidepressants attenuate increased susceptibility to colitis in a murine model of depression. *Gastroenterology* 130: 1743–1753.
- Velcich, A., Yang, W., Heyer, J., Fragale, A., Nicholas, C., Viani, S., Kucherlapati, R., Lipkin, M., Yang, K. and Augenlicht, L. 2002. Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin Muc2. *Science (New York, N.Y.)* 295: 1726–1729.
- Veyrand, B., Sirot, V., Durand, S., Pollono, C., Marchand, P., Dervilly-Pinel, G., Tard, A., Leblanc, J.-C. and Le Bizec, B. 2013. Human dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: results of the second French Total Diet Study. *Environment International* 54: 11–17.

Références

- de Vogel, J., Jonker-Termont, D.S.M.L., van Lieshout, E.M.M., Katan, M.B. and van der Meer, R. 2005. Green vegetables, red meat and colon cancer: chlorophyll prevents the cytotoxic and hyperproliferative effects of haem in rat colon. *Carcinogenesis* 26: 387–393.
- Walther, A., Johnstone, E., Swanton, C., Midgley, R., Tomlinson, I. and Kerr, D. 2009. Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nature Reviews. Cancer* 9: 489–499.
- Wang, F., Vallen Graham, W., Wang, Y., Witkowski, E.D., Schwarz, B.T. and Turner, J.R. 2005. Interferon- γ and Tumor Necrosis Factor- α Synergize to Induce Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction by Up-Regulating Myosin Light Chain Kinase Expression. *The American Journal of Pathology* 166: 409–419.
- Wang, K., Jin, X., Chen, Y., Song, Z., Jiang, X., Hu, F., Conlon, M.A. and Topping, D.L. 2016. Polyphenol-Rich Propolis Extracts Strengthen Intestinal Barrier Function by Activating AMPK and ERK Signaling. *Nutrients* 8: 272.
- Watari, A., Sakamoto, Y., Hisaie, K., Iwamoto, K., Fueta, M., Yagi, K. and Kondoh, M. 2017. Rebecamycin Attenuates TNF- α -Induced Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction by Inhibiting Myosin Light Chain Kinase Production. *Cellular Physiology and Biochemistry* 41: 1924–1934.
- Watts, A.G., Tanimura, S. and Sanchez-Watts, G. 2004. Corticotropin-releasing hormone and arginine vasopressin gene transcription in the hypothalamic paraventricular nucleus of unstressed rats: daily rhythms and their interactions with corticosterone. *Endocrinology* 145: 529–540.
- WCRF a. 2018. *Diet, Nutrition, Physical Activity and Cancer: A Global Perspective. Continuous Update Project Expert Report*. World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research, .
- WCRF b. 2018. *Diet, Nutrition, Physical Activity and Colorectal Cancer. Continuous Update Project Expert Report*. World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research, .
- WCRF c. 2018. *Judging the Evidence. Continuous Update Project Expert Report 2018*. World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research, .
- WCRF d. 2018. *Meat, Fish and Dairy Products and the Risk of Cancer. Continuous Update Project Expert Report*. World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research, .
- West, A.R. and Oates, P.S. 2008. Mechanisms of heme iron absorption: Current questions and controversies. *World Journal of Gastroenterology : WJG* 14: 4101–4110.
- Willett, W., Rockström, J., Loken, B., Springmann, M., Lang, T., Vermeulen, S., Garnett, T., Tilman, D., DeClerck, F., Wood, A., Jonell, M., Clark, M., Gordon, L.J., Fanzo, J., Hawkes, C., Zurayk, R., Rivera, J.A., Vries, W.D., Sibanda, L.M., Afshin, A., Chaudhary, A., Herrero, M., Agustina, R., Branca, F., Lartey, A., Fan, S., Crona, B., Fox, E., Bignet, V., Troell, M., Lindahl, T., Singh, S., Cornell, S.E., Reddy, K.S., Narain, S., Nishtar, S. and Murray, C.J.L. 2019. Food in the Anthropocene: the EAT–Lancet Commission on healthy diets from sustainable food systems. *The Lancet* 393: 447–492.

Références

- Wiseman, M. 2008. The second World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research expert report. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. *The Proceedings of the Nutrition Society* 67: 253–256.
- Working Group on the Evaluation of the Carcinogenic Risks to Humans and International Agency for Research on Cancer 2018. *Red Meat and Processed Meat*.
- Woting, A. and Blaut, M. 2018. Small Intestinal Permeability and Gut-Transit Time Determined with Low and High Molecular Weight Fluorescein Isothiocyanate-Dextrans in C3H Mice. *Nutrients* 10.
- Wu, S., Fisher-Hoch, S.P., Reininger, B., Lee, M. and McCormick, J.B. 2019. Fruit and Vegetable Intake Is Inversely Associated with Cancer Risk in Mexican-Americans. *Nutrition and Cancer* 71: 1254–1262.
- Yano, T., Matsui, T., Tamura, A., Uji, M. and Tsukita, S. 2013. The association of microtubules with tight junctions is promoted by cingulin phosphorylation by AMPK. *The Journal of Cell Biology* 203: 605–614.
- Yuhan, R., Koutsouris, A., Savkovic, S.D. and Hecht, G. 1997. Enteropathogenic Escherichia coli-induced myosin light chain phosphorylation alters intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* 113: 1873–1882.
- Zeisel, M.B., Dhawan, P. and Baumert, T.F. 2019. Tight junction proteins in gastrointestinal and liver disease. *Gut* 68: 547–561.
- Zhang, L. and Shay, J.W. 2017. Multiple Roles of APC and its Therapeutic Implications in Colorectal Cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 109.
- Zhao, M., Mishra, L. and Deng, C.-X. 2018. The role of TGF- β /SMAD4 signaling in cancer. *International Journal of Biological Sciences* 14: 111–123.
- Zhu, M.-J., Sun, X. and Du, M. 2018. AMPK in regulation of apical junctions and barrier function of intestinal epithelium. *Tissue Barriers* 6: 1–13.
- Zolotarevsky, Y., Hecht, G., Koutsouris, A., Gonzalez, D.E., Quan, C., Tom, J., Mrsny, R.J. and Turner, J.R. 2002. A membrane-permeant peptide that inhibits MLC kinase restores barrier function in in vitro models of intestinal disease. *Gastroenterology* 123: 163–172.
- Zsido, A.N., Teleki, S.A., Csokasi, K., Rozsa, S. and Bandi, S.A. 2020. Development of the short version of the spielberger state-trait anxiety inventory. *Psychiatry Research* 291: 113223.