

École doctorale Homme Environnement Santé

ANNÉE 2007 - N° 25.10.10

THÈSE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'université Franche Comté

**Facteurs de risques environnementaux et
maladies inflammatoires chroniques intestinales**

Docteur Prévost JANTCHOU MBAKOP

Thèse codirigée par le Pr Franck CARBONNEL et le Dr Élisabeth MONNET

Soutenance le 23 novembre 2010

Membres du Jury :

Professeur Antoine	CORTOT	Rapporteur
Professeur Jean-Charles	DALPHIN	Examineur
Professeur Jean-Pierre	HUGOT	Rapporteur
Docteur Élisabeth	MONNET	Directrice de thèse
Professeur Franck	CARBONNEL	Directeur de thèse

Remerciements

Mes premiers remerciements vont avant tout au Dr Françoise Clavel qui a mis en place la cohorte E3N en 1990. Cette unité Inserm qui a fêté les 20 ans de la cohorte E3N cette année a vu défiler de nombreux étudiants, doctorants et post-doctorants pendant toutes ces années.

J'ai eu l'honneur de faire partie de cette cohorte d'étudiants et j'en suis très fier. Merci Françoise de m'avoir accueilli dans ton laboratoire pendant ces quatre années de thèse.

Je remercie vivement le professeur Franck Carbonnel qui m'a proposé ce sujet et a encadré cette thèse pendant ces quatre années. En 2006, lorsque ce travail de thèse a été initié nous nous sommes battus pour obtenir un financement pour les trajets et autres frais. J'avais été inquiet après ton départ du CHU de Besançon sur la continuité de ce travail mais fort heureusement ceci n'a pas été bouleversé. Nous avons poursuivi la collaboration et avons pu régulièrement faire des mises au point sur les différentes étapes du travail. Je te remercie pour tes conseils avisés et ton encadrement sans relâche. Je te remercie également pour ta présence et ton soutien lors des différentes présentations orales de nos résultats que j'ai eu à faire lors des multiples congrès ci et là.

Je remercie le Docteur Elisabeth Monnet d'avoir accepté la fonction de codirectrice de thèse au sein de l'école doctorale de Besançon après le départ du professeur Carbonnel. Merci Elisabeth d'avoir accepté cet encadrement et merci de juger ce travail.

Je remercie le docteur Marie-Christine Boutron-Ruault qui, au sein de l'équipe E3N, a initié ce projet sur les MICI depuis 2001. Marie-Christine, je te remercie pour ta présence dans les différents moments de réflexion et de tous tes conseils sur la méthodologie, l'analyse des données, la rédaction des articles. Ton expertise en épidémiologie nutritionnelle et en méthodologie a été très enrichissante.

Je remercie le Professeur Jean pierre HUGOT d'avoir accepté de juger ce travail. Le professeur HUGOT est très investi dans la recherche autour des MICI tant au niveau génétique qu'environnemental. J'avais eu l'occasion de travailler avec toi en 2003 lors de ma première année de clinat en gastro-pédiatrie à l'hôpital Robert Debré. Mon intérêt pour les MICI est probablement né à cette période là. Jean-Pierre, je suis fier de t'avoir comme rapporteur pour ce travail.

Je remercie le Professeur Antoine CORTOT d'avoir accepté de juger ce travail. Le professeur CORTOT est reconnu au niveau national et international pour investissement dans les MICI et notamment au niveau épidémiologique au sein du registre EPIMAD. J'avais eu la chance de travailler brièvement sur les données d'EPIMAD en 2004 lors d'une année de clinat en gastropédiatrie à Lille. C'est une fierté pour moi de vous avoir comme rapporteur pour ce travail.

Je remercie le professeur Jean-Charles Dalphin d'avoir accepté de juger ce travail. Votre intérêt pour les facteurs environnementaux dans les maladies respiratoires seront pour nous précieux dans le regard posé sur ce travail.

Je remercie mes deux co-doctorantes de bureau à E3N: Sophie Morois et Marina Kvaskoff. Nos discussions rares mais enrichissantes m'ont été fort utiles; je vous remercie pour vos conseils avisés.

Je remercie mes autres collègues de E3N pour leur soutien et leurs conseils. Merci à ceux qui ont terminé leurs travaux ou thèses: Alban, Gaël, Marina, Agnès et merci (et bon courage) à ceux qui sont encore en chemin: Pierre, Guy

Je remercie Maryvonne, Lyan, Marie Fangon, Céline Kernaleguen pour leur soutien et leur précieuse aide dans la construction de la base des données et la récupération des informations ainsi que de tous leurs précieux conseils.

Je remercie le laboratoire UCB Pharma qui, grâce à son soutien financier, m'a donné la possibilité matérielle de réaliser ce travail.

Je remercie tous les médecins gastroentérologues et médecins généralistes qui nous ont aidé à valider les cas de MICI au sein de cette cohorte.

Je remercie le Pr Pierre Rörlich et le Dr Emmanuel Plouvier du CHU de Besançon pour leur soutien sans relâche dans cette démarche de thèse et leur soutien dans le processus universitaire que je poursuis actuellement.

Je remercie mes autres collègues, praticiens hospitaliers et chefs de clinique en pédiatrie, du CHU de Besançon. J'ai apprécié votre collaboration pendant ces cinq années passées comme praticien hospitalier. Je vous remercie pour nos échanges et discussions fructueux sur des pathologies qui parfois étaient très complexes.

Un remerciement spécial est tourné vers le docteur Véronique Laithier mon ex-collègue de bureau au CHU de Besançon qui m'a soutenu et conseillé pendant les premiers mois de cette thèse. Ton expérience des trajets sur Paris m'ont bien servi et grâce à tes conseils, les aller/retours de Besançon à Paris: départ 06 heures, retour 23 heures m'ont semblé si faciles. J'ai apprécié nos discussions et échanges lors de ces rares moments où nous nous retrouvions en même temps dans le bureau.

Un remerciement à Lucie pour la relecture de la première version de ce travail. Je connaissais tes talents au volley-ball et j'ai découvert ton art de manier les virgules et les accents.

Je remercie mes amis, Gaston, Louis, Hugues, Line, Magloire, Régine, Patricia, Serkan ... d'avoir compris et accepté mon absence et ma distance pendant ces quatre années de thèse.

Je remercie mes frères (Cyrille, Poclair, William, Cedric) et sœurs (Christelle et Lyliane) pour leur soutien et leur amour. Merci Lyliane et Philippe, d'avoir accepté de relire la version finale de mon manuscrit en un temps record.

Plus important que tout, je remercie ma mère et mon père pour m'avoir donné la vie et pour m'avoir donné goût à la vie.

“I can only regret that the etiology of the condition remains in obscurity, but I trust that ere long further consideration will clear up the difficulty.”

*Thomas Kennedy Dalziel
Chronic intestinal enteritis. BMJ (1913).*

**"The important thing is not to stop questioning...
...Whoever undertakes to set himself up as a judge of truth
and Knowledge is shipwrecked by the laughter of the gods."**

Albert Einstein (1879 - 1955)

Résumé

Divers facteurs de risques ont été incriminés dans la genèse des maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI). Dans ce travail de thèse, nous avons étudié les facteurs qui pourraient contribuer à la survenue de maladie de Crohn (MC) ou de rectocolite hémorragique (RCH) au sein d'une cohorte prospective. La cohorte E3N est une cohorte de 98997 femmes âgées de 40 à 65 ans, affiliées à la Mutuelle Générale de l'Éducation Nationale suivies prospectivement depuis 1990. Des variables liées à l'environnement étaient recueillies à l'entrée dans l'étude incluant un interrogatoire alimentaire détaillé. Des questionnaires auto administrés tous les deux ans recueillaient les évènements de vie, les maladies chroniques et cancers. Les données concernant les MICI étaient recueillies tous les deux ans jusqu'au dernier questionnaire (juin 2005).

123 femmes ont déclaré un cas incident de MICI après l'inclusion dans la cohorte dont 77 après remplissage du questionnaire alimentaire. Un excès d'apport de protéines était statistiquement corrélé au risque de survenue de MICI (Hazard ratio (HR) pour le 3ème vs. le 1er tertile = 3,31 ; IC à 95% : 1,41-7,77 ; p trend = 0,007). Cette association était exclusivement liée aux protéines animales (HR pour le pour le 3ème vs. le 1er tertile = 3,03 ; IC à 95% : 1,45-6,34 ; p trend = 0,005). L'analyse des classes d'apports protéiques révélait que l'apport de viande et de poissons était corrélé à un risque élevé de survenue de MICI contrairement à l'apport d'œufs ou de produits laitiers.

Par ailleurs, sur l'ensemble de cette cohorte, une forte exposition solaire surtout en hiver, était associée à une diminution du risque de MC (HR pour le 3ème vs. le 1er tertile = 0,46 ; IC à 95% : 0,22 à 0,98 ; p de trend = 0,03) mais pas de RCH. L'ajustement sur l'activité physique, le tabagisme, la prise de traitements hormonaux, l'index de masse corporelle et le niveau socio-économique ne modifiaient pas notablement ces deux principaux résultats.

Une analyse multivariée (prenant en compte le niveau d'UV, la consommation de protéines, l'apport en vitamine D et l'apport calorique) incluant les patientes atteintes de MC ayant rempli le questionnaire alimentaire à l'inclusion (n = 35) et les non cas (n = 70987) était effectuée. Le risque de MC était diminué chez les femmes qui avaient un niveau élevé d'exposition solaire (HR = 0,32; IC à 95% : 0,13 à 0,81 ; p de trend = 0,01) et celles qui avaient un apport élevé en vitamine D (HR = 0,40; IC à 95% : 0,15 à 1,03 ; p de trend = 0,07).

Mots-clés:

Épidémiologie, facteur de risque, maladie inflammatoire chronique intestinale, maladie de Crohn, Rectocolite Hémorragique, protéines animales, exposition solaire, vitamine D.

Publications et communications issues du travail doctoral

*Communications orales :

- **Jantchou P**, Morois S, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC, Carbonnel F. *Animal protein intake and risk of inflammatory bowel disease: the E3N prospective study*. Congrès DDW. Mai 2010. New Orleans.
- **Jantchou P**, Morois S, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC, Carbonnel F. *Apport de protéines animales et risque de MICI: résultats de la cohorte prospective E3N*. Journées francophone d'hépatogastroentérologie et oncologie digestive. Mars 2010. Paris
- **Jantchou P**, Morois S, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC, Carbonnel F. *Animal protein intake and risk of inflammatory bowel disease: the E3N prospective study*. Congrès ECCO. Février 2010. Prague.
- **Jantchou P**, Morois S, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC, Carbonnel F. *Animal protein intake and risk of inflammatory bowel disease: the E3N prospective study*. Congrès UEGW. Novembre 2009. Londres.

* Articles publiés dans revues avec comité de lecture :

- **P. Jantchou**, S. Morois, F. Clavel-Chapelon, MC Boutron-Ruault, F. Carbonnel. *Animal protein intake and risk of inflammatory bowel disease: the E3N prospective study*. Am. J. of Gastroenterology. Mai 2010. (**Annexe 4**)
- Carbonnel F, **Jantchou P**, Monnet E, Cosnes J. *Environmental risk factors in Crohn's disease*. Gastroenterol clin biol 2009;33:S145-57. (**Annexe 3**)
- **P. Jantchou**, E. Monnet, F. Carbonnel. *Facteurs de risques environnementaux dans les maladies inflammatoires du tube digestif (tabac et appendicectomie exclus)*. Gastroenterol clin biol 2006;30:859-67. (**Annexe 2**)

* Article soumis :

V. Nerich, **P. Jantchou**, MC. Boutron-Ruault, E. Monnet, A. Weill, V. Vanbockstael, GR. Auleley, C. Balaire, P. Duboz, S. Rican, H. Allemand, F. Carbonnel. *Geographical distribution of inflammatory bowel disease in France and sun exposure*. Soumis. (**Annexe 5**)

* Article en cours de rédaction :

P. Jantchou, S. Morois, F. Clavel-Chapelon, MC Boutron-Ruault, F. Carbonnel. Sun exposure is a risk factor of Crohn's disease in the E3N cohort study.

* Autres travaux de recherche en lien avec la thématique de recherche :

Communication affichée : A. Comte, M. Taghian, N. Ursulescu, F. Carbonnel, **P. Jantchou**. *Incidence and presentation at diagnosis of inflammatory bowel diseases in children in eastern France 2000-2010*. Congrès ESPGHAN Juin 2010. Istanbul.

Table des matières

REMERCIEMENTS	3
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS ISSUES DU TRAVAIL DOCTORAL	5
TABLE DES MATIÈRES	6
Liste des abréviations et symboles	9
Liste des tableaux	10
Liste des figures	11
INTRODUCTION	12
CHAPITRE 1 : LES MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES INTESTINALES	13
DONNÉES ÉPIDÉMIOLOGIQUES	14
I. LES MICI : PHYSIOPATHOLOGIE	16
1. LA FLORE INTESTINALE	16
2. LA BARRIÈRE ÉPITHÉLIALE	16
3. LA CASCADE INFLAMMATOIRE DES MICI	17
4. LES MICI : MALADIES GÉNÉTIQUES ?	19
5. LES MICI : MALADIES ENVIRONNEMENTALES ?	20
II. FACTEURS DE RISQUES ASSOCIÉS AUX MICI	21
CHAPITRE 2 : LA COHORTE E3N	24
I. PRÉSENTATION DE L'ÉTUDE E3N	25
II. RECUEIL DES DONNÉES	25
III. LA COHORTE E3N : DONNÉES ALIMENTAIRES	28
1. LE QUESTIONNAIRE ALIMENTAIRE	28
2. CALCUL DES APPORTS QUOTIDIENS EN ALIMENTS ET NUTRIMENTS	28
3. POPULATION RETENUE DANS LES ANALYSES DES FACTEURS ALIMENTAIRES	29
IV. LA COHORTE E3N : DONNÉES NON ALIMENTAIRES	29
1. DONNÉES ANTHROPOMÉTRIQUES	30
2. VIE HORMONALE	30
3. INTOXICATION TABAGIQUE	30
4. ACTIVITÉ PHYSIQUE	30
5. NIVEAU D'ÉTUDE	30
6. ANTÉCÉDENTS PERSONNELS DE MALADIES CHRONIQUES	31
7. SURVENUE DE MALADIE DE CROHN OU DE RCH	31
8. DONNÉES BIOLOGIQUES	31
V. MICI AU SEIN DE LA COHORTE E3N:	32
1. LE QUESTIONNAIRE « MALADIE »	32
2. VALIDATION DES CAS DE MICI	32
3. LOCALISATION ET SÉVÉRITÉ DES CAS DE MICI DE LA COHORTE E3N	34
4. CARACTÉRISTIQUES CLINIQUES DES CAS DE MICI INCIDENTS À Q1	35

CHAPITRE 3 : MACRONUTRIMENTS ET RISQUE DE MICI AU SEIN DE LA COHORTE E3N	36
I. POSITION DU PROBLÈME	37
II. OBJECTIF DU TRAVAIL DOCTORAL	37
III. POPULATION ET MÉTHODES	38
1. POPULATION	38
2. ANALYSES STATISTIQUES	38
IV. RÉSULTATS	43
1. CARACTÉRISTIQUES GLOBALES DE LA POPULATION ANALYSÉE	43
2. ANALYSE DESCRIPTIVE DES APPORTS EN NUTRIMENTS	43
3. ANALYSE MULTIVARIÉE DE LA RELATION ENTRE NUTRIMENTS ET MICI	47
4. ANALYSE DE LA RELATION ENTRE APPORT PROTÉIQUE ET RISQUE DE MICI AJUSTÉE SUR FACTEURS POTENTIELS DE CONFUSION	48
5. ANALYSES DE SENSIBILITÉ	48
6. ANALYSES PAR SOUS GROUPE : MC ET RCH	49
7. MODALITÉS DE CUISSON DES VIANDES, POISSONS ET RISQUE DE MICI.	49
8. MICRONUTRIMENTS ET RISQUE DE MICI	50
V. DISCUSSION	51
1. PRINCIPAUX RÉSULTATS DE CETTE ÉTUDE	51
2. COMPARAISON DE NOS RÉSULTATS AUX DONNÉES DE LA LITTÉRATURE	51
3. FORCES ET FAIBLESSES DE L'ÉTUDE	52
4. CONCORDANCE DE NOS RÉSULTATS AVEC LES DONNÉES ÉPIDÉMIOLOGIQUES	52
5. HYPOTHÈSES PHYSIOPATHOLOGIQUES	53
6. PERSPECTIVES	54
CHAPITRE 4 : EXPOSITION SOLAIRE ET RISQUE DE MICI	55
I. POSITION DU PROBLÈME	56
II. OBJECTIF DU TRAVAIL DOCTORAL	56
III. POPULATION ET MÉTHODES	56
1. POPULATION D'ÉTUDE	56
2. DONNÉES D'EXPOSITION SOLAIRE	57
3. ANALYSES STATISTIQUES	57
IV. RÉSULTATS	58
1. NIVEAU D'ENSOLEILLEMENT ANNUEL	58
2. RELATION ENTRE NIVEAU D'EXPOSITION SOLAIRE ET RISQUE DE CROHN ET DE RCH	59
3. RELATION ENTRE EXPOSITION SOLAIRE ET RISQUE DE MC AJUSTÉ SUR APPORT ALIMENTAIRE DE VIT D	60
V. DISCUSSION	61
1. PRINCIPAUX RÉSULTATS DE NOTRE ÉTUDE	61
2. FORCES ET FAIBLESSES DE L'ÉTUDE	61
3. ENSOLEILLEMENT, VITAMINE D ET SANTÉ	61
4. VITAMINE D ET MICI DONNÉES DE LA LITTÉRATURE	63
5. VITAMINE D ET MICI : HYPOTHÈSES PHYSIOPATHOLOGIQUES	63
CHAPITRE 6 : EXPOSITION SOLAIRE ET RISQUE DE MICI AU SEIN DE LA BASE DE DONNÉES NATIONALE	65
I. POSITION DU PROBLÈME	66
II. OBJECTIF DU TRAVAIL DOCTORAL	66
III. POPULATION ET MÉTHODES	66
1. POPULATION	66
2. MÉTHODES	66
IV. RÉSULTATS	67

CHAPITRE 5 : FACTEURS DE RISQUE DE MICI AU SEIN DE LA COHORTE EPIC	70
I. OBJECTIF	71
II. POPULATION ET MÉTHODES	71
1. POPULATION	71
2. MALADIE DE CROHN	72
3. RECTOCOLITE HÉMORRAGIQUE	72
4. MÉTHODES	74
5. ANALYSES DE LA RELATION ENTRE APPORT PROTÉINES ET RISQUE DE MICI	74
6. ANALYSE DES PROFILS ALIMENTAIRES ET RISQUE DE MICI AU SEIN DE LA COHORTE EPIC	75
SYNTHÈSE	76
CONCLUSION	78
ANNEXES	79
BIBLIOGRAPHIE	131

Liste des abréviations et symboles

CCI	Colite Chronique Inclassée
CCPPRB	Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale
CO	Contraceptifs oraux
E3N	Étude Épidémiologique des femmes de l'Éducation Nationale
EPIC	European Prospective Investigation Into Cancer and nutrition
g	Gramme
HR	Hazard Ratio
IMC	Index de Masse Corporelle
Kcal	Kilocalories
MC	Maladie de Crohn
MET	Équivalent métabolique
MICI	Maladie inflammatoire Chronique Intestinale
N, n	Effectifs
OR	Odds Ratio
Q1, Q2, Q3, Q4, Q5, Q6, Q7, Q8	Questionnaires Q1 à Q8
RCH	Rectocolite Hémorragique
RR	Risque relatif
THS	Traitement hormonal substitutif de la ménopause
UV	Ultraviolet
Vit D	Vitamine D

Liste des tableaux

TABLEAU 1. PRINCIPAUX GÈNES DE SUSCEPTIBILITÉ DANS LA MALADIE DE CROHN	19
TABLEAU 2. FACTEURS DE RISQUE ASSOCIÉS AUX MICI DANS LA LITTÉRATURE	22
TABLEAU 4. SÉVÉRITÉ DES CAS DE MICI (DE LA NAISSANCE À Q8) AU SEIN DE LA COHORTE E3N	34
TABLEAU 3. CAS INCIDENTS DE MICI AU SEIN DE LA COHORTE E3N DE Q1 À Q8	35
TABLEAU 5. APPORTS QUOTIDIENS D'EAU, D'ALCOOL ET D'ÉNERGIE DANS LES TROIS GROUPES (MC, RCH ET NON MICI) AU SEIN DE LA COHORTE E3N	43
TABLEAU 6. APPORT PROTÉINES ENTRE LES TROIS GROUPES (MC, RCH ET NON MICI) AU SEIN DE LA COHORTE E3N :	44
TABLEAU 7. APPORTS QUOTIDIENS EN MATIÈRES GRASSES ENTRE LES TROIS GROUPES (MC, RCH ET NON MICI) AU SEIN DE LA COHORTE E3N	45
TABLEAU 8. APPORTS QUOTIDIENS EN HYDRATES DE CARBONE ENTRE LES TROIS GROUPES (MC, RCH ET NON MICI) AU SEIN DE LA COHORTE E3N	46
TABLEAU 9. TERTILES DE CONSOMMATION POUR LES MACRONUTRIMENTS AU SEIN DE LA COHORTE E3N 1993-2005	46
TABLEAU 10. HAZARD RATIO DE SURVENUE DE MICI EN FONCTION DES APPORTS JOURNALIERS EN MACRONUTRIMENTS	47
TABLEAU 11. HAZARD RATIO DE SURVENUE DE MICI EN FONCTION DES TYPES DE PROTÉINES	47
TABLEAU 12. HAZARD RATIO DE SURVENUE DE MICI SELON SOURCES DE PROTÉINES ANIMALES	48
TABLEAU 13. NIVEAU D'ENSOLEILLEMENT ENTRE LES CAS DE MC, RCH ET LES NON CAS	58
TABLEAU 14. HAZARD RATIO DE SURVENUE DE MICI EN FONCTION DE NIVEAU D'ENSOLEILLEMENT EN HIVER ET EN ÉTÉ	60
TABLEAU 15. HR DE SURVENUE DE MC EN FONCTION DU NIVEAU D'EXPOSITION SOLAIRE ET DE L'APPORT ALIMENTAIRE EN VITAMINE D.	60
TABLEAU 16. TAUX D'INCIDENCE DE MC EN RAPPORT AVEC NIVEAU D'EXPOSITION SOLAIRE.	68
TABLEAU 17. TAUX D'INCIDENCE DE RCH EN RAPPORT AVEC LE NIVEAU D'EXPOSITION SOLAIRE.	69
TABLEAU 18. DESCRIPTION DE LA POPULATION DE SUJETS (HOMMES ET FEMMES) INCLUS DANS LA COHORTE EPIC	73
TABLEAU 19. FACTEURS DE RISQUES ALIMENTAIRES EN RELATION AVEC LA SURVENUE DE MICI : DONNÉES DE LA LITTÉRATURE	81
TABLEAU 20. ANALYSE MULTIVARIÉE: RISQUE DE SURVENUE DE MALADIE DE CROHN EN LIEN AVEC CONSOMMATION DE PROTÉINES.	83
TABLEAU 22. ANALYSE RELATION ENTRE EXPOSITION SOLAIRE ET RISQUE DE MALADIE DE CROHN AJUSTÉ SUR APPORT ALIMENTAIRE ET AUTRES VARIABLES DE CONFUSION.	84
TABLEAU 23. TYPE DE CUISSON DES VIANDES ET POISSONS EN RELATION AVEC LE RISQUE DE SURVENUE DE MICI AU SEIN DE LA COHORTE E3N.	85

Liste des figures

FIGURE 1. DONNÉES D'INCIDENCE EUROPÉENNE DES MICI SELON LES TRANCHES D'ÂGES	14
FIGURE 2. DONNÉES CONCERNANT L'INCIDENCE ACTUELLE DES MICI DANS LE MONDE (D'APRÈS GISMERA ET ALADREN ¹)	15
FIGURE 3. LE SYSTÈME IMMUNITAIRE INTESTINAL EN SITUATION SAIN (A) ET PATHOLOGIQUE (B)	18
FIGURE 4. SCHÉMA DESCRIPTIF DE LA COHORTE E3N [1990 – 2008] : QUESTIONNAIRES Q0 À Q9	28
FIGURE 5. VALIDATION DES CAS ET NON CAS DE MICI AU SEIN DE LA COHORTE E3N 1990-2005.	33
FIGURE 6. LES CAS DE MICI INCIDENTS ET PRÉVALENTS AU SEIN DE LA COHORTE E3N : 1990-2005.	34
FIGURE 7. NIVEAU D'EXPOSITION SOLAIRE SELON LES DÉPARTEMENTS EN FRANCE POUR LA PÉRIODE 1984-1989.	58
FIGURE 8. SYNTHÈSE, RÉGULATION DE LA VITAMINE D ET MÉTABOLISME PHOSPHO-CALCIQUE .	62
FIGURE 9. VITAMINE D ET IMMUNITÉ INNÉE SELON ADAMS ET HEWISON.	64
FIGURE 10. VITAMINE D, PRÉSENTATION ANTIGÉNIQUE ET IMMUNITÉ ACQUISE SELON ADAMS ET HEWISON.	64
FIGURE 11. LISTE DES PAYS PARTICIPANTS À LA COHORTE EPIC.	71

INTRODUCTION

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) représentent une cause fréquente de consultation et d'hospitalisation en gastroentérologie adulte et pédiatrique. Ce sont des maladies multifactorielles qui font intervenir une susceptibilité génétique et des facteurs d'environnement. Depuis l'avènement des études pangénomiques, les gènes de prédisposition à la MC sont de mieux en mieux connus. En revanche, on connaît moins bien les facteurs d'environnement susceptibles de déclencher la maladie et ses poussées. Cette thèse vise à explorer certains des facteurs de risque d'environnement en lien avec les MICI sous deux angles :

* L'alimentation au sein de deux cohortes : la cohorte E3N (Étude Épidémiologique des femmes de l'Éducation Nationale) et la cohorte européenne EPIC (European Prospective Investigation Into Cancer and nutrition).

* L'ensoleillement au sein de deux populations différentes: la cohorte E3N et la base de données nationale des MICI des caisses nationales d'assurance maladie.

Ce travail se découpe ainsi en six parties :

- La première partie fait une mise au point synthétique sur les connaissances actuelles de la littérature concernant les facteurs environnementaux et génétiques en insistant sur les différentes études réalisées concernant les facteurs de risque environnementaux (alimentation et autres) ;
- La seconde partie présente les résultats de l'étude concernant le lien entre l'apport alimentaire et le risque de survenue de MC et de RCH au sein de la cohorte E3N ;
- La troisième partie présente les résultats de l'étude de la relation entre niveau d'ensoleillement et risque de maladie de Crohn au sein de la cohorte E3N ;
- La quatrième partie présente les données entre ensoleillement et risque de maladie de Crohn au sein de la base de données nationale des caisses d'assurance maladie ;
- La cinquième partie présente les données préliminaires de l'étude sur le lien entre alimentation et risque de MICI au sein de la cohorte EPIC ;
- La sixième et dernière partie présente la synthèse des différents résultats de ce travail.

CHAPITRE 1 : LES MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES INTESTINALES

DONNÉES ÉPIDÉMIOLOGIQUES

Les maladies inflammatoires chroniques ou cryptogénétiques de l'intestin (MICI) regroupent trois entités qui sont la maladie de Crohn (MC), la rectocolite hémorragique (RCH) et la colite inclassée (CCI), forme frontière entre les deux premières entités.

Ce sont des maladies ubiquitaires qui peuvent survenir à tout âge mais dont le pic d'incidence est de 15 à 25 ans pour la MC et de 25 à 35 ans pour la RCH (Figure 1).⁵

En France, les données du registre EPIMAD (registre en population générale couvrant 4 départements français: le Nord, le Pas-de-Calais, la Somme et la Seine-Maritime) montrent une incidence moyenne annuelle des MICI de 9,9/100.000 habitants, dont 6,4/100.000 pour la MC et 3,5/100.000 pour la RCH.⁶

Une autre source de données françaises des MICI provient de données obtenues par les caisses d'assurance maladie. Sur la période analysée de janvier 2000 à décembre 2002, on relève une incidence de 8,2/100000 pour la MC et de 7,2/100.000 pour la RCH. Dans cette étude, les auteurs montrent un net gradient Nord Sud d'incidence pour la MC et non pour la RCH.⁷

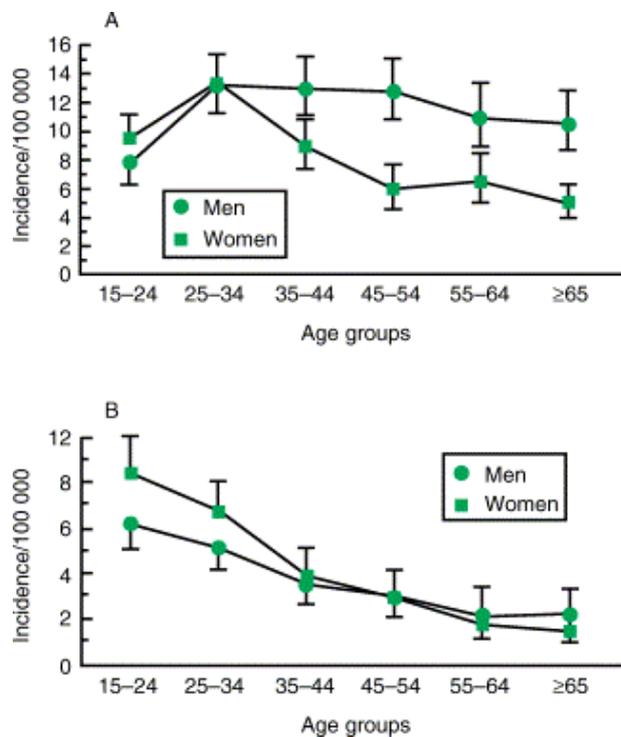


Figure 1. Données d'incidence européenne des MICI selon les tranches d'âges (d'après Shivananda et al.⁵) A= RCH ; B = MC

À l'échelle mondiale, les données épidémiologiques proviennent de différentes sources : études rétrospectives, cohortes prospectives, hospitalières ou en population générale. ⁸

Les principales caractéristiques épidémiologiques des MICI sont les suivantes :

- une disparité d'incidence à l'échelle mondiale^{9,10} avec des zones d'incidence élevée (15 à 25/100.000) dans les pays industrialisés, des zones géographiques de faible incidence (< 1/100.000), essentiellement dans les pays du Sud (notamment en Afrique noire) et des régions où l'incidence est faible mais en augmentation (1 à 3/100.000), particulièrement en Asie (Corée du Sud, Chine populaire, Japon, Inde...); ^{11,12}

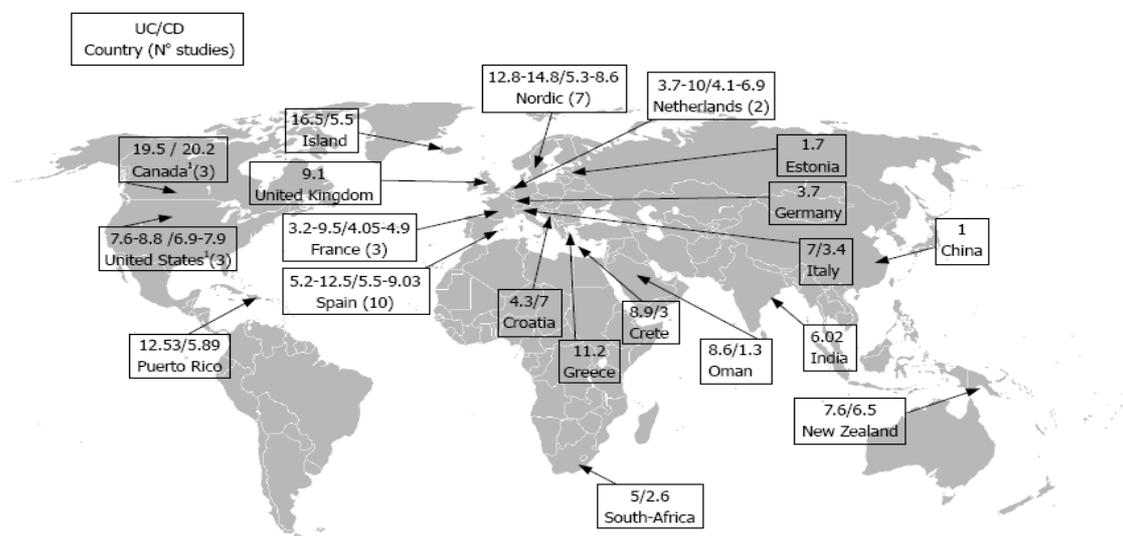
- une augmentation au fil des ans de l'incidence de la MC dans les pays industrialisés ayant, dans certains centres, atteint un plateau ;⁹

- une poursuite de l'augmentation de l'incidence dans d'autres pays, notamment chez le jeune enfant ; ¹³

- un gradient d'incidence Nord-Sud retrouvé en France, en Écosse, aux USA et à l'échelle européenne. La persistance du gradient européen est débattue ; ^{5,14}

- un gradient Est-Ouest en Europe avec une incidence plus forte des MICI à l'Ouest. Mais l'incidence des MICI augmente ces dernières années dans certains pays de l'Est ; ¹⁵

On manque de données sur l'incidence des MICI dans certaines régions du Sud comme en témoigne la figure 2.



Incidence pour 100.000 habitants; RCH/MC ; Nombre d'études entre parenthèses.

Figure 2. Données concernant l'incidence actuelle des MICI dans le monde (d'après Gismera et Aladren ¹)

I. LES MICI : PHYSIOPATHOLOGIE

1. La flore intestinale

La microflore intestinale humaine est composée de plus de 400 espèces bactériennes différentes. Tous les mammifères naissent avec un tube digestif stérile. Chez l'homme, une microflore dite «adulte» s'acquiert en 2 à 6 ans. L'implantation de cette microflore «adulte» dépend de facteurs d'hôte et de l'environnement. La microflore intestinale joue un rôle important dans la genèse des MICI. En effet, la présence d'une microflore intestinale est nécessaire à l'expression des modèles de colites expérimentales chez l'animal. Par ailleurs, les atteintes inflammatoires les plus fréquentes dans les MICI (iléon et côlon) sont les régions où les concentrations bactériennes sont les plus élevées (10^{11} à 10^{12} bactéries/g de selle). La microflore des patients atteints de MICI est différente de celle des sujets normaux.^{16,17} Plusieurs travaux ont montré que chez les patients atteints de MICI, il existait une proportion de la microflore composée de bactéries différentes de celles habituellement rencontrées chez l'homme notamment faible nombre de firmicutes, bactéroïdes, lachnospiracées et pourcentage élevé d'actinobactéries, d'alpha, de bêta et gammaprotéobactéries, d'entérocoques, de clostridies, et d'*Escherichia coli*.¹⁸⁻²⁰

2. La barrière épithéliale

L'épithélium intestinal se situe à l'interface entre le microbiote intestinal et le système lymphoïde gastro-intestinal. Les cellules épithéliales de la muqueuse intestinale agissent comme un filtre barrant l'entrée de bactéries et d'antigènes dans la circulation sanguine. L'intégrité de la barrière intestinale dépend de la nature des jonctions intercellulaires et des jonctions serrées, éléments clés dans la solidité muqueuse.

Dans les MICI, il existe une augmentation de la perméabilité de l'espace para cellulaire et un défaut de régulation des jonctions serrées.²¹ Ces anomalies peuvent représenter un défaut primaire ou secondaire à l'inflammation.²²⁻²⁴

D'autres mécanismes de défense sont représentés par les cellules de Paneth et les cellules caliciformes. Les cellules de Paneth sécrètent des peptides antimicrobiens tels les alpha-défensines et les cellules caliciformes régulent la production de mucus, facteur essentiel dans la réparation épithéliale et la régulation de l'inflammation. Le mucus intestinal en recouvrant l'épithélium, limite le contact entre les bactéries pathogènes et les cellules épithéliales.

3. La cascade inflammatoire des MICI

En situation saine, les cellules "T helper" (Th1, Th2 et Th17) et les cellules régulatrices Treg sécrètent des cytokines caractéristiques. La régulation entre les cellules T helper et les cellules Treg doit être continuellement ajustée afin de maintenir l'homéostasie du système immunitaire intestinal. En situation pathologique, l'augmentation de la perméabilité intestinale, les anomalies de la mucosécrétion, l'augmentation de l'adhérence bactérienne sur les cellules épithéliales intestinales induisent un passage intracellulaire de bactéries et d'antigènes. Il s'ensuit un ensemble de perturbations inflammatoires conduisant une augmentation du nombre de lymphocytes T CD4 et à la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF alpha, Interleukine-6, Interleukine-12, Interleukine-23).²(Figure 3)

- Dans la MC, il existe une augmentation de la production au sein de la muqueuse de l'interleukine-17 par les cellules Th17 et d'interferon- γ et du TNF- α par les cellules Th1.^{25,26}
- Dans la RCH à l'inverse, on note une hyperproduction d'interleukine-17, et des cytokines Th2 (interleukine-4, Interleukine-5, interleukine-13).²⁵⁻²⁷

La voie de l'interleukine-23 apparait comme essentiel dans cette cascade inflammatoire. Cette cytokine revêt une action fondamentale pour le fonctionnement des cellules Th17 (Figure 3).

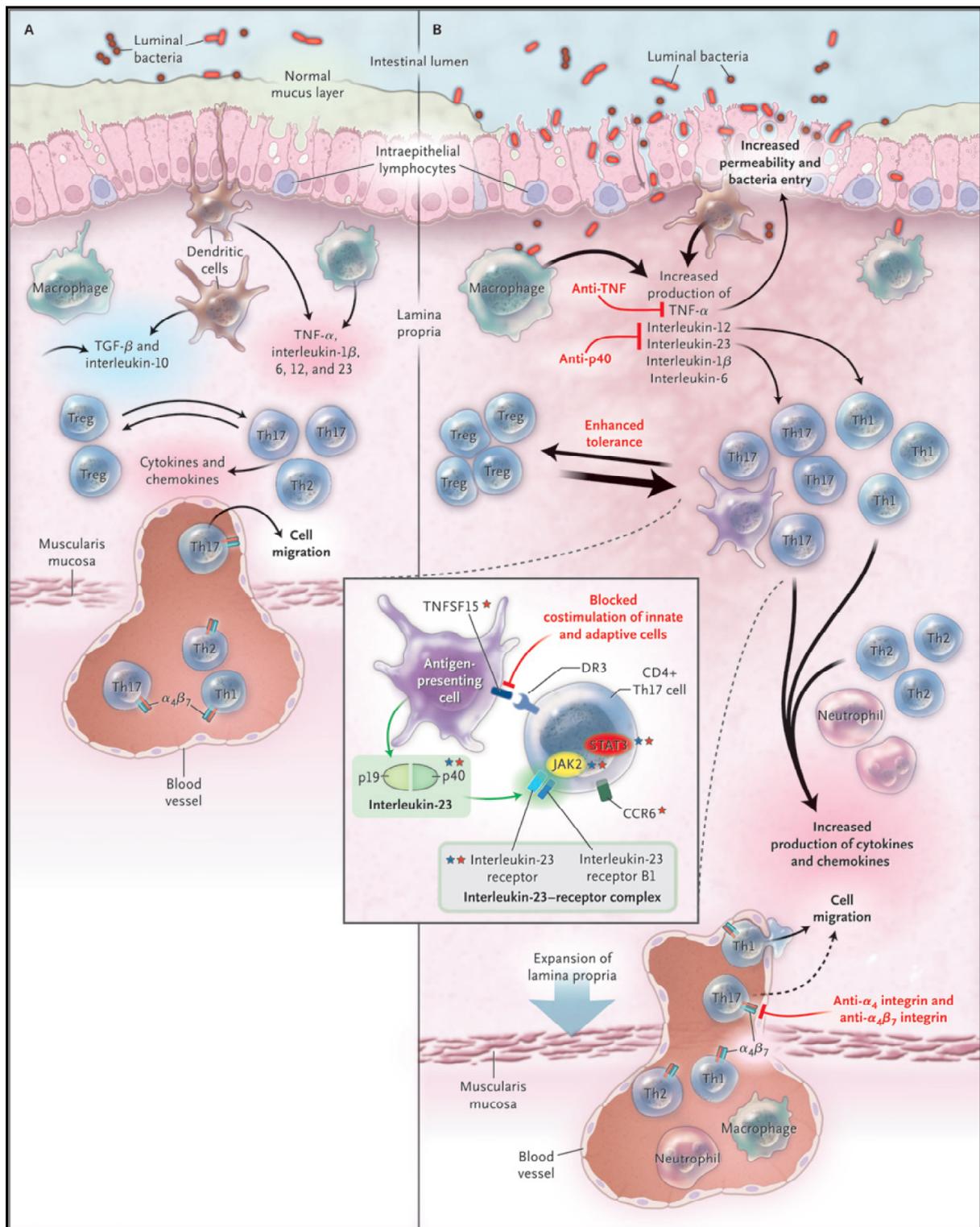


Figure 3. Le système immunitaire intestinal en situation saine (A) et pathologique (B) (d'après Abraham et Cho ²)

4. Les MICI : maladies génétiques ?

Plusieurs dizaines de gènes de susceptibilité ont été identifiés ces dernières années. Leur rôle semble plus important dans la MC que dans la RCH. Ces différents gènes ont des fonctions et des mécanismes d'actions très variés : rôle dans l'immunité innée, l'autophagie, l'intégrité de la barrière épithéliale, la différenciation des lymphocytes TH17, l'apoptose des cellules T, l'immunité adaptative etc.²⁸⁻³⁰ L'interaction de ces gènes entre eux ainsi qu'avec le milieu intestinal et les facteurs environnementaux est toujours en cours d'investigation. Le tableau 1 reprend les principaux gènes associés à la MC.

Tableau 1. Principaux gènes de susceptibilité dans la maladie de Crohn (selon Van Limbergen et al. ²⁹)

Gènes et mécanismes d'action	Chromosome
Immunité innée	
Nucléotide Oligomérisation Domain (<i>NOD2</i>)	16q12
Toll Like Receptor 4 (<i>TLR4</i>)	9q33
Caspase Recruitment Domain 9 (<i>CARD 9</i>)	9
Différenciation Lymphocytes Th17	
Récepteur Interleukine 23 (<i>IL23R</i>)	1p31
Janus Kinase (<i>JAK2</i>)	9p24
Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (<i>STAT3</i>)	17q21
Chemokine Receptor 6 (<i>CCR6</i>)	6q27
Inducible T-cell co-stimulator ligand (<i>ICOSLG</i>)	21q22
Autophagie	
Autophagy Related 16-Like 1 (<i>ATG16L1</i>)	2q37
Immunity-Related Gtpase Family, M (<i>IRGM</i>)	5q33
Leucine-Rich repeat kinase (<i>LRKK2</i>)	12q12
Intégrité de la barrière épithéliale	
Inflammatory Bowel Disease 5 (<i>IBD5</i>)	5q31
Discs, Large Homolog 5 (<i>DLG5</i>)	10
Prostaglandin E Receptor 4 (<i>PTGER4</i>)	5p13
Orosomucoide 1-like 3 (<i>ORMDL3</i>)	17q21
Interlectin (<i>ITLN1</i>)	1q23
Deleted in Malignant Brain Tumors 1 (<i>DMBT1</i>)	10q
Immunité acquise	
Tumor Necrosis Factorsuperfamily, Member 15 (<i>TNFSF15</i>)	9q32
Interferon Regulatory Factor 5 (<i>IRF5</i>)	
Natural Killer Transcription factor related, locus 3 (<i>NKX2-3</i>)	10q24
Interleukine (<i>IL-12B</i>)	5q33
Protein Tyrosine Phosphatase, Non-Receptor 2 (<i>PTPN2</i>)	18p11
Protein Tyrosine Phosphatase, Non-Receptor 22 (<i>PTPN22</i>)	1p13

5. Les MICI : maladies environnementales ?

Différents facteurs d'environnement ont été incriminés dans les MICI. ³¹ Ils peuvent s'intégrer dans trois théories qui ne sont pas mutuellement exclusives :

a. Hypothèse "excès d'hygiène "

Selon cette hypothèse, l'élévation du niveau d'hygiène et avec elle, la diminution du nombre d'infections, notamment parasitaires ³² entraînerait des modifications durables du microbiote intestinal et une dysrégulation immunitaire.^{33,34} Cette théorie est mise en avant pour expliquer l'augmentation de l'incidence des MICI, des maladies atopiques (allergies, asthme) et auto-immunes (diabète, etc.). ³⁵⁻³⁸ Elle s'appuie sur le fait que la mortalité infantile, liée aux maladies infectieuses et la survenue de maladies inflammatoires et auto-immunes évoluent en sens inverse. De multiples études ont tenté de vérifier cette hypothèse dans la genèse des MICI. ³⁹⁻⁴¹ Les résultats de ces études sont discordants.

b. Hypothèse infectieuse

Selon cette théorie, les MICI sont des maladies infectieuses dont le ou les germes ne sont pas identifiés.⁴² Plusieurs arguments microbiologiques et cliniques plaident dans ce sens.⁴³⁻⁴⁵ Deux mécanisme principaux sont évoqués: soit ces bactéries représentent une colonisation secondaire de la muqueuse inflammatoire, soit elles jouent le rôle de déclencheur des processus inflammatoire

Beaucoup de candidats potentiels ont été étudiés mais à l'heure actuelle, seuls *Escherichia coli* adhérent-invasif (ECAI) et *Mycobacterium avium* paratuberculosis (MAP) représentent deux pistes sérieuses pour lesquelles les données sont les plus étayées.^{46,47} Ces bactéries peuvent envahir, survivre et coloniser les cellules de l'hôte. En cas de défaut de régulation bactérienne, celles ci pourront se multiplier et déclencher une cascade inflammatoire chronique. Néanmoins, cette théorie n'est pas soutenue par les essais thérapeutiques qui démontrent une faible efficacité sur le maintien en rémission de la MC ou de la RCH après traitements antibiotiques. ⁴⁸

c. Hypothèse de la chaîne du froid

Selon cette théorie, émise par Hugot et al.⁴⁹, la mutation de NOD2 serait apparue au moment de l'épidémie de peste qui a sévi en Europe au XIVe siècle. Elle conférerait une résistance accrue à cette maladie. L'avènement du réfrigérateur au début des années 1940 aux États-

Unis et en Scandinavie, coïncide avec l'augmentation de l'incidence de la MC. Certaines bactéries dites psychrotrophes (*Listeria*, *Yersinia*, ...) survivent dans les réfrigérateurs. L'une d'elles, *Yersinia* a une protéine appelée Yop qui, dans les cellules qui ont un phénotype sauvage, inhibe l'activation de NFκB via une interaction avec NOD2. Il a été montré que les malades mutés pour NOD2 avaient une perte de fonction de cette molécule et ainsi une activation de NFκB.⁵⁰ Chez les sujets porteurs d'une mutation de NOD2, l'interaction entre Yop et NOD2 entraînerait une activation dérégulée de NFκB.

II. FACTEURS DE RISQUES ASSOCIÉS AUX MICI

De nombreuses études des facteurs d'environnement ont été réalisées dans les MICI à la fois chez l'adulte et chez l'enfant avec des populations et des méthodologies très différents.³¹ Plusieurs facteurs de risques ont été incriminés dans la genèse des MICI. Ces facteurs incluent les antécédents familiaux, l'alimentation (micro ou macronutriments), le tabac, les médicaments (contraceptifs oraux, aspirine et AINS), les métaux (fer et aluminium), les microparticules, la pollution atmosphérique etc.⁵¹⁻⁵³

Au final, on dispose de nombreuses données mais il y a peu d'études prospectives dans ce domaine. Les critères de causalité d'Austin Bradford Hill¹ ne sont pas souvent vérifiés pour tous ces facteurs.

Nous avons essayé de synthétiser les résultats de ces multiples études dans le tableau 2 et le tableau 19 en annexe (pour les facteurs alimentaires).

¹ Critères de causalité de Hill: Force de l'association, Consistance à travers différentes populations, Spécificité de l'association, Temporalité, Gradient biologique, Plausibilité, Cohérence, Preuve expérimentale et Analogie.⁵⁴

Tableau 2. Facteurs de risque associés aux MICI dans la littérature

Facteurs	MC	RCH	Références et types d'études
Antécédents familiaux de MICI	↑	↑	<i>Gilat et al.</i> ⁵⁵ : Cas-témoins <i>Baron et al.</i> ⁵⁶ : Cas-témoins <i>Bersnstein 2006</i> ⁵⁷ : Cas-témoins
Appendicectomie	↔	↓	<i>Gilat et al.</i> ⁵⁵ : Cas-témoins <i>Koutroubakis 2000</i> ⁵⁸ : Méta-analyse <i>Kaplan et al.</i> ⁵⁹ : Méta-analyse
Hygiène et mode de vie			
Tabagisme actif	↑	↓	<i>Calkins et al.</i> ⁶⁰ : Méta-analyse; <i>Persson et al.</i> ⁶¹ : Cas-témoins
Tabagisme passif	↔	↔	<i>Jones et al.</i> ⁶² : Méta-analyse
Mode de vie urbain	(↑)(↓)	(↑)	<i>Klement et al.</i> ⁶³ : Transversale en population <i>Radon et al.</i> ⁶⁴ : Cas-témoins <i>Green et al.</i> ⁴¹ : Écologique population <i>Declercq et al.</i> ⁶⁵ : Écologique <i>Bernstein et al.</i> ⁶⁶ : Écologique en population
Pollution atmosphérique	↑	↑	<i>Kaplan et al.</i> ⁵³ : Cas-témoins
Médicaments			
AINS	(↑)	(↑)	<i>Felder et al.</i> ⁶⁷ : Cas-témoins <i>Kefalakes et al.</i> ⁶⁸ : Revue littérature
Contraceptifs oraux	↑	↑	<i>Godet et al.</i> ⁶⁹ : Méta-analyse <i>Cornish et al.</i> ⁷⁰ : Méta-analyse
Antibiothérapie	(↑)	(↑)	<i>Gilat et al.</i> ⁵⁵ : Cas-témoins; <i>Card et al.</i> ⁷¹ : Cas-témoins <i>Hildebrand</i> ⁷² : Cas-témoins
Infections			
MAP	(↑)	↔	<i>Feller et al.</i> ⁷³ : Méta-analyse
Rougeole	↔	↔	<i>Ekbom et al.</i> ⁷⁴ : Transversale <i>Bernstein et al.</i> ⁷⁵ : Cas-témoins <i>Pardi et al.</i> ⁷⁶ : Transversale <i>Nielsen et al.</i> ⁷⁷ : Transversale
Bactéries psychrotropes (Yersinia, listeria)	(↑)	↔	<i>Forbes et al.</i> ⁷⁸ : Cas-témoins <i>Malekzadeh et al.</i> ⁷⁹ : Cas-témoins
E. coli entéroinvasif	(↑)	↔	<i>Darfeuille-Michaud et al.</i> ⁴³ , <i>Sasaki et al.</i> ⁸⁰ , <i>Baumgart</i> 2007
Infections perinatales	(↑)	(↑)	<i>Ekbom et al.</i> ⁸¹ : Cas-témoins

Hygiène

Taille fratrie	(↓)(↑)	(↓)(↑)	<i>Bernstein et al.</i> ⁵⁷ : Cas-témoins <i>Baron et al.</i> ⁵⁶ : Cas-témoins <i>Montgomery et al.</i> ⁸² Cas-témoins <i>Hampe et al.</i> ⁸³ Cas-témoins
Animaux domestiques	(↓)(↑)	(↓)	<i>Amre et al.</i> ³⁹ Cas-témoins <i>Bernstein et al.</i> ⁵⁷ Cas-témoins <i>Radon et al.</i> ⁶⁴ : Cas-témoins
Infection H. Pylori	(↓)	(↓)	<i>Luther et al.</i> ⁸⁴ : Méta-analyse
Helminthiase	(↓)	(↓)	<i>Summers et al.</i> ⁸⁵ : Essai thérapeutique <i>Summers et al.</i> ⁸⁶ <i>Hunter et al.</i> ⁸⁷ : Revue de la littérature

↑ : augmentation du risque

↓ : diminution du risque

⇔ : Absence d'effet démontré

(..) risque possible mais non complètement démontré.

CHAPITRE 2 : LA COHORTE E3N

I. PRÉSENTATION DE L'ÉTUDE E3N

La cohorte E3N a été établie en France en 1990 afin de rechercher les causes des maladies chroniques et des cancers chez les femmes. Cette cohorte incluait au départ 98997 femmes recrutées au sein du personnel de l'éducation nationale affiliées auprès de la Mutuelle Générale de l'éducation nationale (MGEN). Les participantes étaient recrutées sur le mode du volontariat avec un consentement éclairé et un suivi par auto-questionnaires régulièrement remplis et pour une durée indéterminée (à vie).⁸⁸

Une phase pilote, réalisée dans trois départements (le Nord, le Pas-de-Calais et le Tarn-et-Garonne) a été initiée en janvier 1989. Le questionnaire pilote (Q0) a été envoyé à toutes les femmes, affiliées à la M.G.E.N. âgées de 40 à 65 ans de ces trois départements. Parmi les femmes sollicitées, 2720 ont accepté de participer. Ce questionnaire pilote avait pour fonction de déterminer le taux de réponse, donc le nombre de personnes à contacter pour obtenir près de 100000 inclusions. De plus l'objectif était aussi de tester la qualité des questions posées.

II. RECUEIL DES DONNÉES

L'étude nationale a été lancée en juin 1990. Le **premier questionnaire (Q1)**, dérivé du questionnaire de la phase pilote (Q0), a été envoyé à **494 458 femmes**. Il incluait des questions sur les caractéristiques anthropométriques à différentes périodes de la vie, l'activité physique, le niveau d'études et l'activité professionnelle, la vie reproductive, la consommation de tabac et l'état de santé (antécédents personnels médicaux et chirurgicaux, prise de médicaments, antécédents familiaux de cancer).

Les participantes incluses dans l'étude E3N sont les femmes qui ont retourné le premier questionnaire (Q1 ou Q0) accompagné d'un accord de participation signé soit 98 997 femmes avant la fin de la période d'inclusion fixée arbitrairement à novembre 1991.

Le **deuxième questionnaire (Q2)**, envoyé en janvier 1992, portait sur l'historique détaillé des 12 premières grossesses, la stérilité et la prise de traitements hormonaux, de contraceptifs oraux ou de traitements hormonaux substitutifs de la ménopause (THS). Il a été adressé aux femmes ayant répondu au premier questionnaire.

La consommation alimentaire a été recueillie dans le **troisième questionnaire (Q3)** envoyé aux répondantes du questionnaire Q2 en juin 1993. Après un envoi (à 93 056 femmes) et deux relances, 76 172 questionnaires alimentaires ont été retournés.

Le quatrième questionnaire (Q4), a été envoyé en décembre 1994 aux répondantes du questionnaire Q3 et une relance unique a été effectuée. Il comportait des questions sur les mesures anthropométriques.

Le cinquième, le sixième et le septième questionnaire (Q5-Q7) ont été envoyés à toutes les femmes ayant répondu au premier questionnaire. Deux relances ont été envoyées pour les cinquième, sixième questionnaires et le septième questionnaire. Chacun de ces trois derniers questionnaires ont permis une mise à jour de données anthropométriques et sur l'hygiène de vie : poids, consommation de tabac, statut ménopausique, prise de traitements hormonaux, de cholestérol ainsi que la mise à jour des maladies chroniques et cancers.

Le huitième questionnaire (Q8) comportait un volet alimentaire et un volet sur les données concernant le mode de vie et la survenue de maladies chroniques ou cancers ; il a été envoyé en juillet 2005 à toutes les femmes ayant répondu au septième questionnaire.

Le neuvième questionnaire (Q9) est le dernier actuellement en cours de recueil et d'analyses. Il a été envoyé en juillet 2008

Le taux de réponse était satisfaisant pour tous les questionnaires : 86% à Q2, 82% à Q3, 92% à Q4, 89% à Q5, 86% à Q6, 86% à Q7 et 76% à Q8.

.

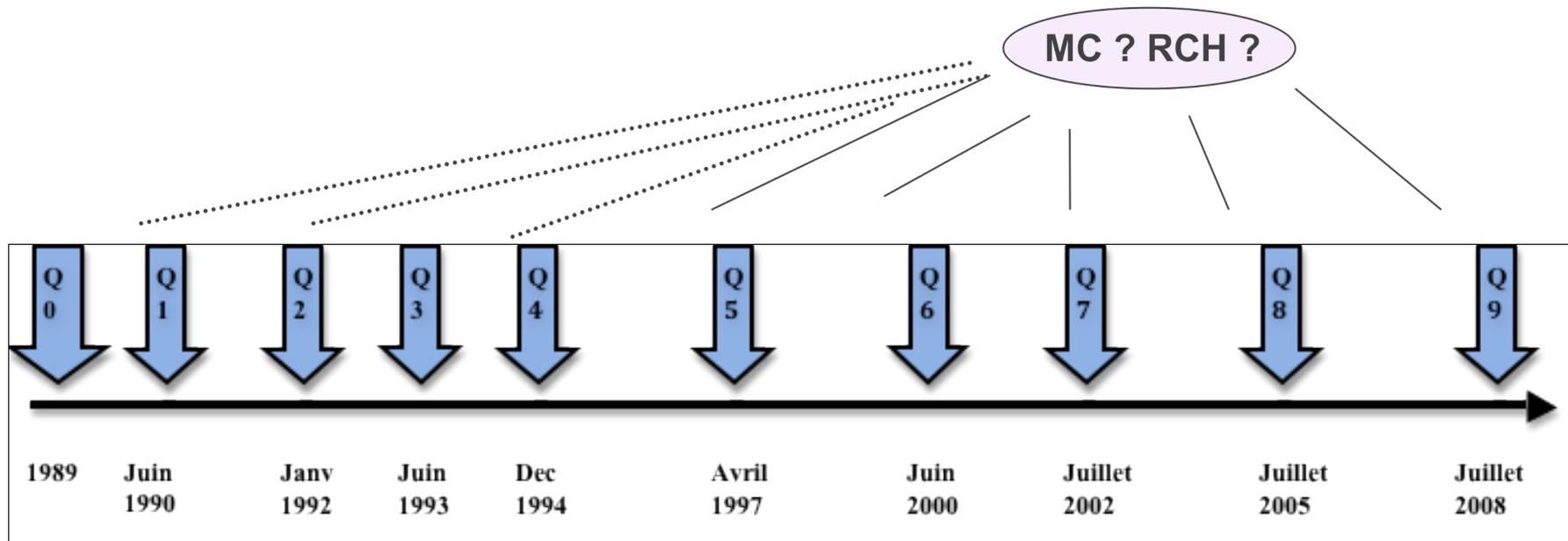


Figure 4. Schéma descriptif de la cohorte E3N [1990 – 2008] : questionnaires Q0 à Q9

Q1	Hygiène vie, anthropométrie, niveau étude, maladies chroniques	Q5	Hygiène vie, anthropométrie, maladies chroniques, Traitements
Q2	Hygiène vie, anthropométrie, maladies chroniques, Traitements	Q6	Hygiène vie, anthropométrie, maladies chroniques, Traitements
Q3v	Hygiène vie, anthropométrie, maladies chroniques, Traitements	Q7	Hygiène vie, anthropométrie, maladies chroniques, Traitements
Q3o	Alimentation	Q8	Hygiène vie, anthropométrie, maladies chroniques, Traitements + alimentation
Q4	Hygiène vie, anthropométrie, maladies chroniques, Traitements	Q9	Hygiène vie, anthropométrie, maladies chroniques, Traitements

III. LA COHORTE E3N : DONNÉES ALIMENTAIRES

1. Le questionnaire alimentaire

Les données alimentaires ont été recueillies lors du troisième questionnaire Q3 entre 1993 et 1995. L'interrogatoire alimentaire comportait deux parties : la première partie concernait des questions sur les catégories d'aliments (la fréquence de leur prise, et leur quantité). La seconde partie abordait les aspects qualitatifs détaillés pour chaque type d'aliment.

En l'occurrence :

- les boissons ;
- le petit déjeuner ;
- la collation dans la matinée ;
- l'apéritif avant le repas du midi ;
- le repas de midi ;
- la collation dans l'après midi ;
- le repas du soir.

Ainsi le questionnaire permettait d'explorer de manière détaillée la consommation de 238 aliments, boissons et également les recettes culinaires utilisées ainsi que les modes de cuisson.

Il était accompagné d'un livret avec des photos décrivant les portions d'aliments consommés.⁸⁹ Le questionnaire et le livret étaient tous deux validés dans une population de 119 adultes.⁹⁰

Dans cette étude de validation, 119 femmes recevaient le questionnaire à deux reprises espacées d'un an avec pendant l'intervalle un recueil mensuel téléphonique rétrospectif de l'alimentation de la veille. Une grande proportion de sujets (76% pour les aliments et 72% pour les nutriments) était classée dans le même quintile ou dans un quintile voisin entre le relevé initial et celui à 12 mois. **Le coefficient de reproductibilité du questionnaire était de 0,69 pour les protéines, 0,59 pour les hydrates de carbones et 0,73 pour les graisses.**

2. Calcul des apports quotidiens en aliments et nutriments

Les consommations alimentaires étaient converties en nutriments à l'aide d'une table de composition alimentaire adaptée de la table de composition alimentaire de la population

française.⁹¹ Chaque femme ayant rempli le questionnaire alimentaire avait ainsi un apport journalier en macronutriments (mg/j) et en micronutriments (mg/j ou µg/j). Les données concernant les consommations quotidiennes d'alcool étaient également recueillies dans ce questionnaire alimentaire. La consommation journalière de chaque aliment était ensuite multipliée par sa teneur nutritionnelle afin d'obtenir la contribution relative de l'aliment à l'apport nutritionnel, puis les contributions de tous les aliments étaient additionnées pour obtenir l'apport calorique total.

3. Population retenue dans les analyses des facteurs alimentaires

Le questionnaire alimentaire Q3 était adressé à 95.644 femmes puis deux relances effectuées auprès des non répondantes. Au total 77.613 questionnaires détaillés étaient reçus (81,1%). Après exclusion de 978 questionnaires de femmes qui se retiraient volontairement de la cohorte, 2.050 questionnaires pour anomalies de remplissage, huit questionnaires vierges et 46 doublons, 74.531 questionnaires étaient analysables.

Parmi elles, certaines présentaient des données alimentaires qui semblaient aberrantes. Afin de les exclure des analyses, une méthode a été utilisée: elle consistait à identifier les individus ayant un apport énergétique physiologiquement non plausible du fait qu'il semble trop faible ou trop élevé. L'apport énergétique (AE) journalier estimé grâce au questionnaire (en kcal/j) a été comparé aux besoins énergétiques (BE) journalier théorique, déduit du taux métabolique de base (TMB), c'est-à-dire du besoin calorique journalier minimum nécessaire à la survie d'un individu au repos, estimé selon sa taille (cm), son poids (kg) et son âge.⁹²

- $BE = 1,55 * TMB.$
- Pour une femme de 31 à 60 ans : $TMB = 8,7 * poids - (25 * taille / 100) + 865$
- Pour une femme à partir de 61 ans : $TMB = 9,2 * poids + (637 * taille / 100) - 302$

Le rapport AE/BE a alors été calculé. Ont été exclues les femmes appartenant aux 1% extrêmes supérieur ou inférieur (le premier et le dernier percentile, de la distribution du rapport AE/BE (n = 1 490)).

Au final, 73034 participantes de la cohorte E3N avaient des données alimentaires valides.

IV. LA COHORTE E3N : DONNÉES NON ALIMENTAIRES

Les paramètres recueillis à l'inclusion dans l'étude et mis à jour de manière séquentielle dans certains questionnaires ultérieurs comprenaient :

1. Données anthropométriques

Le poids et la taille étaient recueillis lors des questionnaires Q1, Q4 et Q7, ainsi que le morphotype (échelle visuelle analogique), la couleur de la peau et des cheveux.

L'indice de masse corporelle était calculé à partir du poids et la taille recueillis au questionnaire Q1 : $IMC = \text{poids} / \text{taille}^2$.

2. Vie hormonale

Des informations sur la survenue de grossesses, la prise de contraceptifs oraux ainsi que le statut ménopausique, étaient recueillies dans le premier questionnaire. Les données concernant le traitement hormonal substitutif de la ménopause étaient recueillies dans tous les questionnaires à partir de Q2.

3. Intoxication tabagique

L'intoxication tabagique passée ou présente était recueillie à chaque questionnaire. Les femmes étaient ainsi classées comme étant fumeuses actives, fumeuses passées ou non fumeuses.

4. Activité physique

Les données concernant l'activité physique étaient recueillies lors des questionnaires Q3, Q5, Q7 et Q8. Cette activité était définie comme le temps consacré aux différentes activités de la vie quotidienne en tenant compte du ménage, jardinage, marche, activité intense sportive etc. Les données étaient ensuite transformées en MET (équivalent métabolique).

Le MET s'interprète comme un ratio entre la dépense d'énergie (kilocalories) durant 1 heure d'activité et la dépense d'énergie durant une heure de repos (c'est-à-dire en position assise). Ainsi, par exemple une personne qui a marché pendant une heure dépensera trois fois plus d'énergie que si elle était restée assise durant une heure, l'activité «repos» correspondant à un coût énergétique de 1 MET/heure. ⁹³Cela implique donc qu'une heure de marche correspondrait à 3 MET, une heure de ménage intense à 4 MET et 9 MET pour une heure d'activité physique intense. La somme des MET correspondait ainsi au score d'activité physique total de la semaine.

5. Niveau d'étude

Le niveau de scolarisation maximal atteint était demandé dans le questionnaire Q1 à l'inclusion. On demandait également le niveau d'étude du conjoint le cas échéant.

6. Antécédents personnels de maladies chroniques

Les antécédents de maladies chroniques étaient recueillis lors du questionnaire initial. La survenue de nouvelles maladies entre les différents questionnaires ainsi que les hospitalisations et traitements étaient recueillis à chaque questionnaire.

7. Survenue de maladie de Crohn ou de RCH

La survenue de cas de maladie de Crohn ou de rectocolite hémorragique était recherchée par deux items spécifiques à chaque questionnaire. En revanche, il n'y avait pas d'information sur les antécédents familiaux de MICI.

8. Données biologiques

Une banque de matériel biologique était constituée dans la cohorte E3N entre 1995 et 1998. La création de la BMB était approuvée par le Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale (CCPPRB) du CHU de Bicêtre. Du fait de l'impossibilité matérielle d'ouvrir un centre de prélèvement par département, les femmes étaient sélectionnées dans des départements métropolitains choisis selon des critères d'importance de l'effectif initial (plus de 1000 participantes) et de facilité d'organisation. Au total, 68000 femmes réparties dans 39 départements ont été invitées à participer et environ 25000 prélèvements ont été réalisés, après signature d'un accord de participation par les femmes, ce qui correspond à un taux de participation de 37 %.⁹⁴

V. MICI AU SEIN DE LA COHORTE E3N:

1. Le questionnaire « MALADIE »

Nous avons développé un questionnaire en début de thèse afin de recueillir les éléments qui nous permettraient de valider les diagnostics de MICI. Il s'agissait d'un questionnaire comportant douze items (type de MICI, localisation, date de début des symptômes et de diagnostic, résultats des examens endoscopiques et radiologiques, traitements médicamenteux ou chirurgicaux, nombre de poussées.) **Annexe 6.**

Ce questionnaire était envoyé aux médecins traitants ou aux gastroentérologues afin de nous permettre de valider ou d'infirmer le diagnostic de MICI.

2. Validation des cas de MICI

Au sein de la cohorte, 500 femmes ont coché l'item "Crohn" ou "RCH" sur au moins un des questionnaires auto administrés entre Q1 et Q8. Nous n'avons pas inclus les données de Q9 dans la présente étude car le recueil auprès des femmes n'était pas encore achevé.

Entre 2007 et 2008, un questionnaire simplifié était adressé aux femmes de la cohorte qui avaient coché au moins un des items Crohn ou RCH sur au moins un des questionnaires afin qu'elle confirment leur réponse et fournissent les coordonnées de leurs médecins. Puis le questionnaire "maladie" était envoyé à leurs médecins (généralistes et/ou gastroentérologues). Les médecins n'ayant pas répondu après deux relances par courrier, étaient contactés par téléphone pour recueillir les informations sur l'exactitude du diagnostic, la localisation, les traitements administrés et l'évolution.

Les données obtenues par les questionnaires envoyés aux femmes et aux médecins, nous ont permis de valider les diagnostics de MICI et d'exclure les cas de non MICI qui étaient majoritairement des syndromes de l'intestin irritable et des diverticulites.

Après analyse détaillée des questionnaires remplis par les médecins ainsi que les compte rendus endoscopiques et histologiques, les cas de MICI étaient classés en certains ou probables. La MICI étaient considérée probable lorsqu'il existait des signes cliniques endoscopiques en rapport avec une RCH ou une maladie de Crohn et que la patiente présentait une seule poussée isolée ou lorsque les comptes rendus n'étaient pas fournis et le médecin précisait MC ou RCH sur le questionnaire. Le diagnostic de CCI était retenu quand il existait des signes cliniques et endoscopiques en faveur d'une MICI sans que l'on puisse

trancher entre MC et RCH. Tous les autres cas étaient considérés comme maladie de Crohn ou rectocolite certaine selon l'atteinte clinique endoscopique et histologique.

Au final, après investigations approfondies, nous avons confirmé le diagnostic de MICI chez **255 femmes : 86 MC, 155 RCH et 9 CCI**. Parmi ces cas de MICI, **138 étaient des MICI incidentes** (après le questionnaire Q1) et **117 des MICI prévalents à Q1**. (Figure 5 et 6)

Population MICI E3N

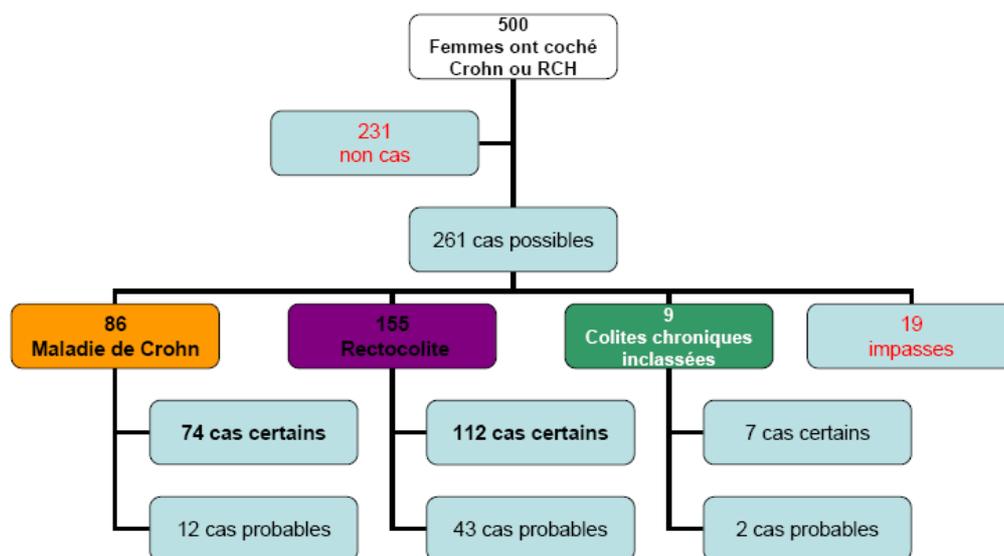


Figure 5. Validation des cas et non cas de MICI au sein de la cohorte E3N 1990-2005.

Après le remplissage du questionnaire alimentaire (Q3), on notait **77 cas de MICI incidentes: 43 RCH, 30 MC et 4 CCI**. Soixante et un cas étaient des MICI certaines et 16 cas de MICI probables. Les figures 2 et 3 décrivent les étapes de validation des données.

Les femmes qui ne déclaraient pas de MC ou RCH jusqu'au dernier questionnaire (Q8 : juillet 2005) étaient considérées comme « non cas ». Les cas de MICI survenant après un cancer étaient exclus des analyses ainsi que les cas non renseignés (échec de multiples approches auprès de différentes sources).

Population MICI E3N: Naissance à Q8

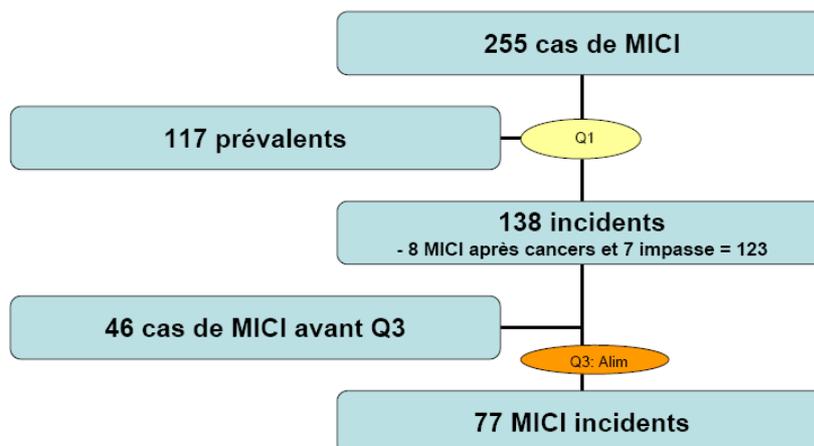


Figure 6. Les cas de MICI incidents et prévalents au sein de la cohorte E3N : 1990-2005.

3. Localisation et sévérité des cas de MICI de la cohorte E3N

La localisation retenue dans cette étude est celle à la date des dernières nouvelles. Nous avons relevé, sur l'ensemble des cas incidents et prévalents, pour la maladie de Crohn une atteinte majoritairement colique (44,2%) ou iléo-colique (31,2%) et pour la RCH une atteinte majoritairement gauche (25,8%) ou rectale (27,1%).

36 % des patientes atteintes de MC ont été opérées de l'intestin grêle ou du côlon au cours du suivi. 7% des malades atteintes de RCH ont eu une colectomie au cours du suivi.

Tableau 4. Sévérité des cas de MICI (de la naissance à Q8) au sein de la cohorte E3N

	MC : N=86	RCH : N=155
Nombre de poussées (N, %)		
une seule poussée	14 (16,3)	12 (7,7)
moins de 5 poussées	30 (34,8)	38 (24,5)
5 à 10 poussées	13 (15,1)	27 (17,4)
plus de 10 poussées	11 (12,8)	22 (14,2)
Non renseigné [£]	18 (20,9)	56 (36,1)
Opération (N, %)		
Chirurgie grêle	16 (18,6)	-
Chirurgie côlon	15 (17,4)	11 (7,1)

£. Le nombre de poussées n'était pas disponible pour 20% des MC et 36% des RCH.

4. Caractéristiques cliniques des cas de MICI incidents à Q1

Le tableau 3 décrit les caractéristiques des cas de MICI incidents. On note une proportion de fumeuses actives identique dans les trois groupes, un niveau d'étude supérieur à bac + 2 pour la majorité des femmes, et une grande proportion de femmes ménopausées (plus de 2/3). Le niveau d'activité physique est identique pour les deux groupes Crohn et RCH ainsi que les paramètres anthropométriques (poids, taille, BMI).

Tableau 3. Cas incidents de MICI au sein de la cohorte E3N de Q1 à Q8

Caractéristiques à l'inclusion	RCH (n=71)	CROHN (n=45)	CCI (N=7)
Age au diagnostic Moy (ds)	47,4 (6,2)	46,9 (6,0)	49,4 (6,3)
Durée du suivi avant le diagnostic médiante (1er-3è quartile)	7,0 (3,34-10,63)	6,90 (4,38-9,80)	7,02 (2,47 - 11,38)
Statut tabagique (%)			
Jamais	51,3	54,3	57,1
Ancienne	30,3	26,1	14,4
Actuelle	28,6	19,6	28,5
Niveau d'études (%)			
Inférieur au bac	5,2	10,9	28,6
Bac à Bac+2	55,3	47,8	57,1
Supérieur ou égal à Bac+3	39,5	41,3	14,3
Traitement hormonal (%)			
THS	68,4	73,9	42,9
Pilule	60,5	63,0	71,4
Activité Physique (%)			
Inactive	38,2	34,8	57,1
Modérément active	39,5	26,1	14,3
Active	22,3	39,1	28,6

**CHAPITRE 3 :
MACRONUTRIMENTS ET RISQUE
DE MICI AU SEIN DE LA COHORTE
E3N**

I. POSITION DU PROBLÈME

De nombreux arguments plaident en faveur du rôle de l'alimentation dans la genèse des MICI :

- Interaction entre l'alimentation, la muqueuse intestinale et la flore dans le tube digestif. ⁹⁵
- Efficacité des traitements nutritionnels dans la maladie de Crohn chez l'enfant. ^{96,97}
- Modification de l'alimentation au fil du temps dans la même zone géographique parallèle à l'augmentation de l'incidence des MICI. ⁹⁸
- Changement du mode de vie et d'hygiène alimentaire notamment chez les migrants qui acquièrent le même risque de MICI que les autochtones. ^{99,100}

Les mécanismes physiopathologiques par lesquels l'alimentation pourrait jouer un rôle dans les MICI sont variés : ingestion d'aliments vecteurs de bactéries pathogènes pour le tube digestif, production de substances toxiques lors de la digestion de certains aliments, action prébiotique de certains aliments qui favoriseraient la production d'une flore bénéfique, ingestion de quantités importantes de produits toxiques (glycoalcoïdes, nitrates) liés ou non au mode de cuisson des aliments etc.

De nombreuses études de la composition alimentaire chez des malades atteints de MICI et les témoins ont été conduites. Ces études, sont, pour la plupart rétrospectives et peuvent être associées à un biais de remémoration. ¹⁰¹⁻¹⁰³ De plus, en interrogeant un individu qui est déjà malade, on court le risque d'observer des modifications de l'alimentation qui sont la conséquence et non la cause de la maladie.

Un autre constat est lié aux analyses statistiques réalisées. Certaines études n'ont pas effectué d'ajustement adéquat sur l'apport énergétique, d'autres présentent uniquement les résultats bruts pour chaque aliment ou nutriment sans ajustements mutuels.

Le tableau 19 en annexe résume les principaux éléments méthodologiques et les résultats de chaque étude publiée.

II. OBJECTIF DU TRAVAIL DOCTORAL

L'objectif de notre travail était d'explorer le rôle des facteurs alimentaires dans la genèse des MICI au sein d'une cohorte prospective en considérant les cas incidents de RCH et de MC. Ce travail visait à répondre à la question du rôle des macronutriments comme possible facteur étiologique.

III. POPULATION ET MÉTHODES

1. Population

Au sein de la cohorte E3N, toutes les femmes n'ont pas rempli le questionnaire alimentaire. En effet le questionnaire alimentaire avait été envoyé à une population initiale de 95644 femmes (un envoi initial suivi de deux relances) parmi lesquelles seules 74531 ont retourné un questionnaire correctement rempli.

Nous avons comparé les caractéristiques de celles qui avaient rempli le questionnaire alimentaire à celles qui n'ont pas répondu. On note que les répondantes étaient en moyenne plus jeunes (46 ans versus 52 ans), avaient un BMI légèrement plus faible (22,5 versus 22,6) et avaient plus souvent eu un traitement hormonal substitutif de la ménopause (70% versus 65%) ainsi qu'une prise antérieure de contraceptif oraux (61% versus 60%). Il n'y avait pas de différence d'activité physique ni de niveau d'étude entre les répondantes et les non répondantes.

Sur les 74531 femmes ayant renvoyé un questionnaire alimentaire complet, nous avons exclu des analyses 4654 femmes ayant un cancer prévalent, 810 perdues de vue après le remplissage du questionnaire alimentaire et 1364 femmes qui avaient des valeurs extrêmes d'apport énergétique.

Au total, **67581 femmes** ont été incluses dans l'analyse des facteurs alimentaires; parmi celles-ci, **77 avaient une MICI (61 certaines et 16 probables) et 67504 étaient** indemnes de MICI aux dernières nouvelles.

2. Analyses statistiques

a. Analyses descriptives

L'analyse descriptive des données alimentaires a été réalisée à l'aide de statistiques usuelles : moyenne, médiane, écart-type, percentiles et calcul de corrélations entre les consommations (coefficient de corrélation de Pearson).

L'analyse des données non alimentaires a été réalisée en établissant les pourcentages pour les variables catégorielles (tabac, hormones) et les moyennes ou médianes pour les variables numériques (poids, taille, BMI etc.).

b. Le modèle de Cox

Nous avons utilisé le modèle semi-paramétrique de Cox.¹⁰⁴ Il permet de mesurer la relation entre le risque (ou incidence) instantané associé à la survenue d'un événement, noté $h(t)$, et des variables J_i qui sont des facteurs de risque (données anthropométriques) ou d'ajustement. L'événement considéré est ici l'apparition d'une maladie inflammatoire chronique intestinale (MC ou RCH).

La probabilité d'être indemne de maladie (probabilité de survie) à l'instant (t) est notée $S(t)$;

elle est liée à l'incidence instantanée par la relation : $S(t) = \exp \left\{ - \int_0^t h(u) du \right\}$.

Le risque instantané de survenue d'un événement chez un sujet caractérisé par p variables explicatives J_1, J_2, \dots, J_p qualitatives ou quantitatives peut s'écrire sous la forme :

$$h(t; J_1, J_2, \dots, J_p) = h_0(t) \cdot \exp \{ a_1 J_1 + a_2 J_2 + \dots + a_p J_p \}, \text{ où :}$$

a_1, a_2, \dots, a_p sont des constantes. Pour une variable binaire, le risque relatif à l'exposition J_i est égal à $\exp(a_i)$. $h_0(t)$ est non-paramétré, i.e. jamais estimé, et représente le risque de base des sujets non-exposés.

L'hypothèse de log-linéarité impose que $\ln \{ h(t; J_1, J_2, \dots, J_p) \}$ soit une fonction linéaire des J_i et l'hypothèse des risques proportionnels impose que le rapport des risques de deux groupes de sujets soit indépendant du temps. Nous noterons les modèles sous la forme :

$$\text{pathologie} = \left\{ \sum_{i=1}^p a_i J_i \right\}. \text{ Ainsi, tester l'effet de la variable } J_i, \text{ avec ajustement sur les } J_k \text{ (où } k \neq i),$$

sur la survie revient à tester la nullité des a_i . Ces paramètres sont testés au moyen du test de Wald.

Hypothèse des risques proportionnels

L'hypothèse des risques proportionnels peut être vérifiée de deux façons : graphiquement ou statistiquement.

Dans le premier cas, la variable d'intérêt est découpée en classes et les courbes de la fonction (fonction de survie de Kaplan-Meier), sont représentées pour chacune des classes d'exposition. Le test du Log-rank permet de tester si les courbes sont identiques pour toutes les classes. L'hypothèse des risques proportionnels est vérifiée graphiquement si les courbes sont parallèles ou tout du moins si elles ne se croisent pas. Le test du Log-Rank permet de tester si les courbes entre les classes d'expositions sont identiques.

Une autre façon de vérifier l'hypothèse des risques proportionnels peut être effectuée par le calcul en testant l'interaction de la variable d'intérêt avec le temps, qui en cas de significativité amène à conclure à la non-proportionnalité des risques.

En cas de non-proportionnalité des risques, il convient de mettre en œuvre des modèles stratifiés (le risque de base est alors différent pour chaque strate et l'effet des variables d'intérêt est de même estimé dans chaque strate).

Choix de l'âge comme échelle de temps

Initialement, le modèle de Cox a été mis au point afin de modéliser le délai entre l'administration d'un traitement et le temps de rechute ou de décès dans le cadre d'essais cliniques. L'origine est alors l'entrée dans l'essai. Lorsque la durée de suivi est prise comme échelle de temps dans les études épidémiologiques, l'âge est introduit comme facteur d'ajustement (en continu ou en classes) et il est intégré dans la partie paramétrique du modèle : $\exp \{ a_1 J_1 + a_2 J_2 + \dots + a_p J_p \}$. La variable âge doit donc vérifier l'hypothèse des risques proportionnels.

En épidémiologie, il est intéressant de modéliser la survenue d'une pathologie en utilisant la date de naissance comme origine. En effet, cela induit que le risque est modélisé pour un âge donné. L'âge est intégré dans la partie non-paramétrique $h_0(t)$ du modèle de Cox et l'hypothèse des risques proportionnels pour la variable « âge » n'est donc plus requise.^{105,106}

L'association entre facteurs alimentaires et MICI était estimée en utilisant le modèle de Cox avec l'âge comme échelle de temps. L'âge au diagnostic de MICI ou à la date de censure était retenu comme la date de point.

c. Répartition des apports alimentaires en classes

Afin de pouvoir mettre en évidence des associations non linéaires, les apports alimentaires qui sont des variables continues ont été transformés en variables qualitatives à trois modalités : apport faible, apport moyen, apport élevé. Cette catégorisation reposait sur la répartition des apports en tertiles de consommation. Les seuils retenus déterminaient ainsi trois groupes d'effectifs similaires selon un apport alimentaire croissant. Les valeurs des tertiles ont été déterminées dans la population totale de femmes ayant un questionnaire alimentaire valide (n = 73034). Le premier groupe (consommation faible par rapport à la consommation moyenne) était choisi comme référence afin d'étudier le risque associé à un apport moyen (second tertile) ou élevé (troisième tertile). La tendance linéaire entre les

risques associés aux groupes d'apports croissants a ensuite été testée en considérant l'apport alimentaire sous forme d'une variable ordinale prenant les valeurs 1, 2 et 3 : *p de tendance*.

Les facteurs alimentaires étaient analysés en considérant les macronutriments (hydrates de carbone, lipides, protéines) mais aussi les sources de protéines : viandes (rouge et blanche), poissons (poissons et fruits de mer), œufs, produits laitiers.

d. Ajustement sur l'apport énergétique

Les apports bruts en nutriments étaient ajustés sur l'apport énergétique provenant des aliments, c'est-à-dire l'apport énergétique total sans l'énergie apportée par l'alcool. En effet, comme la plupart des apports en nutriments sont fortement corrélés à l'apport énergétique qui peut lui-même être associé au risque de maladie, il est indispensable d'ajuster sur ce facteur pour déterminer l'effet d'un nutriment. Afin d'éviter des problèmes d'estimation et d'interprétation liés à l'utilisation de la méthode standard qui ajuste directement sur l'apport énergétique, plusieurs autres méthodes ont été proposées :

- **la méthode des partitions** qui ajuste l'énergie apportée par le nutriment sur l'énergie apportée par les autres sources ;¹⁰⁷
- **la méthode des résidus** qui repose sur les résidus de la régression de l'apport en nutriment sur l'apport énergétique total ;¹⁰⁸
- **la méthode des densités** qui utilise le quotient de l'apport en nutriment sur l'apport énergétique total ;¹⁰⁸

Ces trois méthodes conduisent à l'estimation d'effets différents. Nous avons utilisé dans cette étude pour l'analyse des macronutriments un ajustement sur l'apport énergétique hors alcool par la méthode de partition en considérant séparément l'énergie des hydrates de carbone, des lipides et des protéines.¹⁰⁷ L'analyse des sources de protéines était effectuée avec ajustement sur l'apport énergétique global (hors protéines et hors alcool).

Nous avons privilégié la méthode des partitions pour l'analyse des macronutriments en considérant que cette méthode était la plus pertinente pour évaluer l'effet propre d'un macronutriment. De plus, elle peut conduire à des recommandations de diminution ou d'augmentation de la proportion d'un type de macronutriment sans substitution calorique.

e. Ajustements additionnels

L'effet d'éventuels facteurs de confusion était recherché en rajoutant dans le modèle de base les variables suivantes : alcool (tertiles de consommation), activité physique (dépense

énergétique hebdomadaire), prise de contraceptifs oraux (oui/non), traitement hormonal substitutif de la ménopause (oui/non), niveau socioéconomique (extrapolation faite à partir du niveau éducatif: inférieur au bac/bac à bac+2/supérieur à bac+2) et statut tabagique (ancienne fumeuse, fumeuse actuelle, non fumeuse).

Les analyses étaient réalisées pour l'ensemble des cas de MICI puis une analyse de sensibilité était effectuée pour les cas de MICI certains seulement.

Des analyses en sous groupe étaient réalisées en considérant séparément les cas de MC et de RCH. Un test d'hétérogénéité était effectué afin de vérifier la concordance des résultats entre les deux sous groupes (MC et RCH).¹⁰⁹

f. Gestion des données manquantes

Moins de 5% des valeurs étaient manquantes pour la plupart des variables dans l'étude E3N. La stratégie adoptée était d'imputer à ces femmes la modalité la plus fréquente. Concernant les modes de cuisson alimentaires, près de 20% de valeurs étaient manquantes ; celles-ci étaient regroupées en une classe à part entière dans les analyses.

IV. RÉSULTATS

1. Caractéristiques globales de la population analysée

67.581 femmes (705.445 personnes années) étaient incluses dans l'analyse finale. Le suivi médian après l'inclusion était de 54,5 mois (1-3^e quartiles : 26,5-95,5).

Parmi les 77 cas de MICI (30 MC, 43 RCH et 4 CCI) on ne notait pas de différence entre la consommation tabagique, la prise de THS ou de CO, le niveau d'étude et les paramètres anthropométriques (poids, taille, BMI) entre les deux groupes. La proportion de femmes ayant une activité physique importante était plus faible dans le groupe des MC que dans le groupe des RCH. Cette proportion était statistiquement inférieure à la proportion d'activité physique dans le groupe de femmes saines. La proportion de femmes ménopausée au sein de la cohorte entière était de 57 % lors du remplissage du questionnaire alimentaire. Ce pourcentage était identique chez les MICI et les non cas.

2. Analyse descriptive des apports en nutriments

a. Apport énergétique et apports quotidiens en alcool et boissons

Le tableau 5 présente les différents apports quotidiens en eau, alcool, calories et calories sans alcool, pour chaque groupe. On note quelques différences entre les trois groupes : les patients avec MC avaient un apport calorique global quotidien avec ou sans alcool le plus élevé. Cette différence était statistiquement significative en analyse bivariée. L'apport d'alcool n'était pas différent entre les trois groupes alors que l'apport quotidien d'eau (eau alimentaire et boissons hors alcool) était plus élevé dans le groupe RCH que dans le groupe MC et chez les non cas.

Tableau 5. Apports quotidiens d'eau, d'alcool et d'énergie dans les trois groupes (MC, RCH et non MICI) au sein de la cohorte E3N : 1993-2005

Apport quotidien moy (ds)	MC (N=30)	RCH (N=43)	Non Cas
Eau (ml/j) [#]	2542 (737)	2973 (789) [§]	2635 (785)
Alcool (g/j) [§]	8,3 (3,9 - 15,0)	11,9 (2,3 - 19,9)	6,17 (1,4 - 15,6)
Kcal	2330 (358) [£]	2295 (607)	2168 (575)
Kcal sans alcool	2237 (368) [*]	2204 (608)	2090 (559)

: eau= eau alimentaire + eau des boissons hors alcool. § : P=0.005; £ : P= 0,02; * P= 0,04

§ : valeur donnée en médiane (1er quartile, 3^e quartile)

b. Apports quotidiens en protéines

L'analyse de la relation entre protéines et MICI était réalisée en considérant non seulement l'apport en protéines totales mais également l'apport en protéines animales, végétales et les sources alimentaires de protéines animales.

L'apport protéique quotidien par kilogramme de poids corporel était en moyenne de 1,08 g/kg (0,30-1,33); 1,52 g/kg (1,34-1,71) ; et 2,07 g/kg (1,72-4,46) pour le premier, deuxième et troisième tertile respectivement.

En analyse bivariée, on notait un apport plus élevé en protéines, surtout animales, chez les patientes atteintes de MC ou de RCH, comparativement aux témoins. Cette différence était statistiquement significative. Les apports quotidiens en viande étaient plus élevés chez les malades avec MC ou RCH comparativement aux non cas. Par ailleurs, on notait une consommation plus importante de poissons et produits marins (fruits de mer, crustacés) dans le groupe RCH alors qu'il n'y avait pas de différence pour les MC.

Lorsqu'on analysait le type de poisson concerné, on notait que cette différence portait essentiellement sur les poissons maigres avec un risque augmenté de RCH alors que l'apport en poissons gras n'était pas différent dans les trois groupes.

Le tableau 6 présente les moyennes d'apports quotidiens entre les trois groupes.

Tableau 6. Apport protéines entre les trois groupes (MC, RCH et non MICI) au sein de la cohorte E3N : 1993-2005

Apport quotidien moy g/j	MC	RCH	Non Cas
Protéines totales	104,8 [§] (22,8)	101,3 [£] (26,8)	92,1 (26,2)
Protéines animales	71,8 [£] (22,5)	69,4 [£] (20,7)	61,9 (21,7)
Protéines végétales	32,9 (9,2)	31,9 (13,2)	30,2 (10,3)
Viande	114,9 [*] (57,6)	106,0 [#] (57,1)	86,4 (51,9)
Poisson et produits marins	34,3 (27,1)	48,3 [£] (29,4)	37,4 (21,1)
Poissons gras [@]	6,3 (8,5)	7,8 (8,4)	6,6 (8,5)
Poissons maigres	26,0 (15,1)	33,8 [£] (20,1)	26,9 (20,1)

[@] Poissons gras inclus dans le calcul des apports quotidiens : **le saumon, le hareng, le maquereau, les anchois et les sardines.**

Les différences statistiquement significatives entre les cas de RCH ou MC et les non cas sont notées par symboles : § : $P=0.006$; # $P= 0,03$. £ : $P= 0,02$; * $P= 0,01$

c. Apports quotidiens en lipides et matières grasses

L'analyse de la relation entre les différents apports de graisses et risque de MICI a été effectuée en considérant l'apport en graisses totales, en graisses saturées, en acides gras polyinsaturés, en acides gras monoinsaturés et en cholestérol total.

Le tableau 7 décrit les moyennes de consommation pour les différents groupes. On ne notait pas de différence de consommation pour les apports lipidiques totaux entre les trois groupes.

En analyse bivariée on note un apport plus important en oméga 6 dans le groupe des Crohn comparativement aux témoins. A l'inverse, chez les malades atteintes de RCH, l'apport en oméga 3 était plus élevé que chez les témoins. Il est notable que dans cette population de femmes adultes, l'apport en oméga 3 était bien en dessous des seuils recommandés de 3 g par jour. De même, le ratio oméga 6/oméga 3 se situait au dessus du ratio recommandé (inférieur à 5).

Tableau 7. Apports quotidiens en matières grasses entre les trois groupes (MC, RCH et Non MICI) au sein de la cohorte E3N : 1993-2005

Apport quotidien moy en g/j	MC	RCH	Non Cas
Lipides totaux (g/j)	94,5 (19,6)	94,0 (28,1)	88,9 (27)
Acides gras saturés (g/j)	37,8 (7,5)	36,8 (13,1)	35,3 (12,9)
Acides gras monoinsaturés (g/j)	32,1 (7,3)	34,8 (12,1) #	31,5 (10,5)
Acides gras polyinsaturés (g/j)	17,3 (9,0)	15,2 (5,6)	15,2 (6,2)
Cholestérol (mg/j)	406,3 (145,2)	404,1 (145,7)	370,2 (146,8)
Acides gras polyinsaturés ω 3 (g/j)	1,52 (0,5)	1,7 (0,6) £	1,5 (0,6)
Acides gras polyinsaturés ω 6 (g/j)	15,7 (8,8) \$	13,5 (5,3)	13,7 (5,9)
Ratio ω 6/ ω 3	10,7 (5,1)	8,4 (3,9) *	9,6 (4,1)

Les différences statistiquement significatives entre les cas de RCH ou MC et les non cas sont notées par symboles : \$: $P=0.056$; # $P= 0,07$. £ : $P= 0,04$; * $P=0,06$

d. Apports quotidiens en hydrates de Carbone

Plusieurs sources d'hydrates de carbone ont été considérées: les glucides, les sucres constitutionnels, les sucres ajoutés, le lactose, l'amidon et les fibres. Le tableau 8 décrit les moyennes de consommation pour les différents groupes. On ne retrouvait pas de différence de consommation pour tous les types de sucres considérés entre les trois groupes.

Tableau 8. Apports quotidiens en hydrates de carbone entre les trois groupes (MC, RCH et Non MICI) au sein de la cohorte E3N : 1993-2005

Apport quotidien en g/j	MC	RCH	Non Cas
Glucides (g/j)	241,8 (58,3)	238,2 (85,3)	230,4 (74,2)
Sucres ajoutés (g/j)	36,1 (23,3)	39,2 (24,7)	36,8 (22)
Lactose (g/j)	14,6 (23,3)	12,2 (9,3)	12,5 (10,8)
Sucres constitutionnels (g/j)	70,2 (21,9)	70,2 (23,9)	69,3 (25,9)
Amidon (g/j)	135,3 (41,7)	128,7 (64,7)	124,1 (52,1)
Fibres (g/j)	25,1 (9,1)	23,2 (8,6)	24,1 (7,8)

Le tableau 9 décrit les seuils de tertiles de consommation pour chaque macronutriment. On notait une dispersion des moyennes de consommation entre les tertiles pour tous les macronutriments.

Tableau 9. Tertiles de consommation pour les macronutriments au sein de la cohorte E3N 1993-2005

Nutriments apport moyen (g/jour)	Tertile1	Tertile 2	Tertile 3
Protéines totales	< 79,3	79,3-101,4	> 101,4
Protéines animales	< 51,3	51,3-69,2	> 69,2
Protéines végétales	< 24,9	24,9-33,4	> 33,4
Hydrate de carbone	< 193,4	193,4-255,7	> 255,7
Lipides	< 74,8	74,8-97,7	> 97,7

3. Analyse multivariée de la relation entre nutriments et MICI

Dans un modèle d'analyse mutuellement ajusté (protides, glucides et lipides introduits dans le modèle), on note qu'un excès d'apport de protéines était statistiquement corrélé au risque de survenue de MICI (**HR pour le troisième vs. premier tertile = 3,31; IC à 95% : 1,41 à 7,77; p de trend =0,007**). Tableau 11. L'apport élevé de protéines rapporté au poids corporel était également associé au risque de survenue de MICI (**HR pour le troisième vs. premier tertile = 2,63; IC à 95% : 1,23 à 5,59; p de trend =0,008**).

Cette association entre excès d'apport protéique et risque de MICI était exclusivement liée à l'apport alimentaire de protéines animales contrairement aux protéines végétales (tableau 11). L'analyse des classes d'apports protéiques révélait que l'apport de viande et de poissons était corrélé à un risque élevé de survenue de MICI contrairement à l'apport d'œufs ou de produits laitiers (tableau 12).

Tableau 10. Hazard ratio de survenue de MICI en fonction des apports journaliers en macronutriments#

	Nutriments	Tertile1	Tertile 2	Tertile 3	P trend
MICI	Protéines	1 (-)	2,46 (1,15-5,28)	3,31 (1,41-7,77)	0,007
	Glucides	1 (-)	0,76 (0,43-1,37)	0,68 (0,37-1,27)	0,26
	Lipides	1 (-)	1,41 (0,70-2,84)	1,24 (0,57-2,72)	0,77
RCH	Protéines	1 (-)	2,83 (1,07-7,48)	3,24 (1,06-9,84)	0,06
	Glucides	1 (-)	0,42 (0,19-0,94)	0,51 (0,24-1,07)	0,12
	Lipides	1 (-)	1,01 (0,41-2,47)	1,47 (0,56-3,84)	0,34
MC	Protéines	1 (-)	1,95 (0,57-6,68)	3,33 (0,89-12,4)	0,04
	Glucides	1 (-)	2,01 (0,70-5,72)	1,31 (0,42-4,13)	0,46
	Lipides	1 (-)	2,27 (0,69-7,45)	0,98 (0,25-3,88)	0,88

Analyses mutuellement ajustées

Tableau 11. Hazard ratio de survenue de MICI en fonction des types de protéines#

	Nutriments	Tertile1	Tertile 2	Tertile 3	p trend
MICI	Protéines animales	1 (-)	2,62 (1,29-5,30)	3,03 (1,45-6,34)	0,005
	Protéines végétales	1 (-)	0,91 (0,47-1,77)	1,31 (0,59-2,88)	0,44
RCH	Protéines animales	1 (-)	1,82 (0,75-4,41)	3,36 (1,40-8,11)	0,005
	Protéines végétales	1 (-)	0,77 (0,32-1,83)	1,57 (0,57-4,26)	0,33
MC	Protéines animales	1 (-)	4,51 (1,28-15,83)	2,70 (0,69-10,52)	0,33
	Protéines végétales	1 (-)	1,15 (0,39-3,35)	1,04 (0,28-3,80)	0,98

Ajustement sur apport énergétique non protidique hors alcool

Tableau 12. Hazard ratio de survenue de MICI selon sources de protéines animales#

	Tertile 1	Tertile 1	Tertile3	p trend
Viandes (g/jour)	31,8	83,2	144,4	
Nombre de MICI	15	25	37	
HR ajusté sur énergie*	1 (-)	1,48 (0,78-2,83)	1,94 (1,05-3,62)	0,03
Poissons (g/jour)	10,7	26,4	59,1	
Nombre de MICI	16	29	32	
HR ajusté sur énergie*	1 (-)	1,69 (0,92-3,12)	1,84 (1,00-3,37)	0,06
Œufs (g/jour)	6,9	19,5	46,1	
Nombre de MICI	19	33	25	
HR ajusté sur énergie*	1 (-)	1,37 (0,77-2,41)	1,01 (0,55-1,86)	0,95
Produits laitiers (g/jour)	131,3	264,6	511,4	
Nombre de MICI	24	27	26	
HR ajusté sur énergie*	1 (-)	1,01 (0,58-1,76)	0,96 (0,51-1,60)	0,72

* Ajustement sur apport énergétique non protidique hors alcool

4. Analyse de la relation entre apport protéique et risque de MICI ajustée sur facteurs potentiels de confusion

L'ajustement ultérieur sur l'activité physique, le BMI, le tabagisme, le traitement hormonal (pilule ou traitement hormonal substitutif de la ménopause), l'activité physique ainsi que le niveau socio économique ne modifiait pas de manière substantielle la relation entre apport protéique et le risque de survenue de MICI. Annexe 3 et 4

Un point particulier à souligner dans cette population : la proportion de fumeuses est identique dans les trois groupes. En analyse bivariée, le tabagisme actif ou passé ne représente pas un risque de survenue de Crohn ($p=0,67$) et n'est pas non plus facteur protecteur de RCH ($p= 0,33$).

5. Analyses de sensibilité

Une analyse de sensibilité était réalisée en considérant uniquement les 61 cas de MICI certains. Les résultats obtenus étaient similaires (**HR pour le troisième vs. premier tertile= 3,63; IC à 95% : 1,32 à 10,01; p trend=0,01; et 3,13 IC à 95% 1,34 à 7,31; p trend=0,006**) pour protéines totales et animales respectivement.

Afin de s'affranchir d'un éventuel biais lié à l'inclusion de cas survenant immédiatement après le questionnaire alimentaire (biais liés à des modifications du mode alimentaire en lien

avec des symptômes avant que le diagnostic soit établi), nous avons réalisé une autre analyse de sensibilité en incluant uniquement les cas survenant au-delà de deux ans après le questionnaire alimentaire.

- 10 cas de MICI étaient diagnostiqués dans l'année après avoir rempli Q3 (6 cas de RCH, 3 MC, 1 CCI) ;
- 19 cas de MICI étaient diagnostiqués dans les 2 ans après avoir rempli Q3 (8 cas de RCH, 10 MC, 1 CCI).

Analyses de sensibilité excluant ces cas « précoces » :

- Analyse incluant uniquement cas survenant au-delà de un an après Q3 : **HR pour le troisième vs. premier tertile d'apport protéines animales = 2,74 (IC à 95% = 1,30-5,78) ;**
- Analyse incluant uniquement cas survenant au-delà de deux ans après Q3 : **HR pour le troisième vs. premier tertile d'apport protéines animales = 2,29 (IC à 95% = 1,05-5,01).**

6. Analyses par sous groupe : MC et RCH

Comme présenté dans les tableaux 11 et 12, le risque de survenue de MICI en lien avec un excès d'apport protéique était similaire pour les cas de MC et la RCH même si l'amplitude de signification était différente (p d'hétérogénéité : 0,99 pour protéines totales et 0,09 pour protéines animales).

7. Modalités de cuisson des viandes, poissons et risque de MICI.

Considérant que le type de cuisson pourrait jouer un rôle dans la cascade inflammatoire par le biais de l'ingestion de nitrites, carcinogène et autres dérivés toxiques produits en grand nombre par certains modes de cuisson (friture, four, grillades), nous avons étudié au sein de la cohorte la relation entre les différents types de cuissons régulièrement utilisés et le risque de MICI.

Aucune association n'était retrouvée entre les différentes méthodes de cuisson des viandes et poissons et le risque de MICI. Tableau 23 en annexe.

Dans un modèle multivarié prenant en compte l'apport quantitatif de viande (ou poisson) et les modes de cuisson des viandes (ou poissons), nous n'avons pas mis en évidence de différence par rapport au modèle de base. Le risque de survenue de MICI reste élevé pour une forte consommation de viande et/ou poisson : **HR d'un apport élevé de viande pour le troisième vs. premier tertile = 2,1 (IC à 95% : 1,07-4,07; p trend = 0,04)** et pour un **apport quotidien important en poisson un HR de 2,05 (IC à 95% : 1,08-3,88; p trend = 0,04).**

8. Micronutriments et risque de MICI

Nous avons également inclus dans un modèle d'analyse multivarié le seul micronutriment dont l'apport quotidien était légèrement différent entre cas et non cas en analyse bivariée : le fer. L'apport moyen en fer était de 15,1 g/j dans le groupe des MICI et de 13,9 g/j chez les non cas ($p=0,06$). En incluant dans les modèles précédents ce micronutriment, la force de l'association entre protéines animales et MICI persistait alors l'excès d'apport en fer perdait sa significativité.

L'apport moyen quotidien pour les autres minéraux, oligoéléments et vitamines (calcium, magnésium, vitamine A, B, C, D, E, B12) n'étaient pas, en analyse bivariée, statistiquement différents chez les cas et les non cas.

V. DISCUSSION

1. Principaux résultats de cette étude

Cette étude prospective montre un lien entre l'apport protéique alimentaire et le risque de survenue de MICI. Cette association est exclusivement due aux protéines animales (en particulier l'apport élevé en viandes et poissons). Le risque est multiplié par 3 chez les gros consommateurs de protéines animales ce qui en fait un facteur de risque majeur de survenue de MICI. Le mode de cuisson de viandes et poissons ne modifie pas la relation entre risque de MICI et protéines animales. Dans cette étude, nous n'avons pas mis en évidence entre les apports en graisses (totales ou saturés) et le risque de MC ou de RCH, ni entre les apports en hydrates de carbones et le risque de MICI.

2. Comparaison de nos résultats aux données de la littérature

Plusieurs études antérieures ont essayé d'établir une corrélation entre MICI et alimentation. Ce sont, pour la plupart, des études cas témoins. Les données ont été recueillies rétrospectivement, après la survenue de la maladie, ce qui rend possible des biais de remémoration (tableau 19 en annexe). De plus, les malades peuvent modifier leur alimentation à cause de leurs symptômes digestifs (douleurs abdominales, diarrhées), ce qui peut être à l'origine de biais différentiels entre les cas et les témoins.

Quelques études rétrospectives cas-témoins ont retrouvé un lien entre apport élevé en viandes ¹¹⁰ ou poissons ¹¹¹ et la maladie de Crohn. Par ailleurs, une étude prospective effectuée chez 191 patients atteints de RCH a montré que le risque de poussées ultérieures était directement corrélé à l'apport excessif de viandes.¹¹²

Une étude européenne (menée au sein de la cohorte EPIC) incluant 8 centres (139 cas incidents de RCH ; 71 femmes et 68 hommes ; âge médian : 58,8 ans) a été publiée en 2008. ¹¹³ Dans cette étude, les auteurs ne retrouvaient pas de modification de risque de survenue de RCH en lien avec les différents macronutriments analysés. L'apport de protéines totales dans cette étude était calculé en pourcentage d'apport énergétique. Il n'y avait pas dans cette étude d'analyse sur le type de protéines consommées (animales ou végétale).

Les auteurs ont poursuivi les analyses au sein de la même cohorte en étudiant la composition de l'apport en graisses. 126 malades atteints de RCH (60 femmes), ont été suivis pendant une médiane de 4 ans (1,7-11,3). Les auteurs ont observé qu'un apport élevé en acide linoléique était un facteur de risque de RCH : OR 4^e vs 1^{er} quartile : 2,49 (1,23 - 5,07) p trend 0,02. ¹¹⁴

Nous n'avons pas retrouvé de relation entre le risque de RCH et l'apport en graisses ni en oméga 3 ou oméga 6 contrairement à cette étude européenne. Nous avons également exploré de manière plus précise les résultats concernant l'apport en poisson et le risque de MICI. L'augmentation de risque lié à la consommation de poissons est lié à une forte consommation de poissons maigres et non de poissons gras, uniquement dans la RCH. Il n'y avait pas de différence en ce qui concerne la maladie de Crohn.

3. Forces et faiblesses de l'étude

Notre étude comporte plusieurs avantages : le recueil prospectif des données alimentaires longtemps avant la survenue des premiers symptômes de la maladie à l'aide d'un questionnaire validé,⁹⁰ la durée prolongée de suivi des femmes, l'analyse avec ajustement sur l'apport énergétique par la méthode de partition.¹⁰⁷

Une des limites de cette étude concerne l'extrapolation de nos résultats. En effet la population de l'étude est exclusivement de sexe féminin, d'un âge moyen de 50 ans, plus élevé que l'âge moyen au diagnostic de MICI.

Une autre limite est la longue durée du recueil entre le questionnaire alimentaire et la survenue de la maladie chez certaines femmes, parfois plus de 8 ans après le questionnaire. Toutefois, les apports alimentaires sont assez stables dans cette tranche d'âge.¹¹⁵ Les données du questionnaire alimentaire Q8 administré près de 10 ans après le questionnaire initial, permettront de confirmer cette stabilité des ingestats dans notre population. De plus, nous avons vérifié la robustesse de nos résultats en effectuant une analyse de sensibilité dans laquelle on excluait les cas dont le diagnostic de MICI était posé au-delà de 8 ans après le questionnaire alimentaire : les résultats sont inchangés.

4. Concordance de nos résultats avec les données épidémiologiques

Nos résultats sont concordants avec l'hypothèse de Shoda et al. qui trouvent une relation temporelle entre la hausse de l'incidence de la MC au Japon et l'augmentation de l'apport alimentaire en protéines animales ($r=0.908$).⁹⁸ Depuis la seconde guerre mondiale, l'apport en protéines animales a augmenté de manière significative dans quasiment tous les pays industrialisés. À titre d'exemple, en Belgique on retrouvait une augmentation de 50% entre les années 1950 et 1978 ce qui représente une modification de la consommation de protéines animales par habitant de 60,8 kg/an à 98 kg/an.¹¹⁶ Cet accroissement de la consommation protéique animale peut en partie expliquer l'augmentation de l'incidence des MICI qui prévaut depuis la deuxième guerre mondiale dans plusieurs parties du globe.

La relation entre apport protéique élevé et risque de MICI est également concordante avec l'augmentation de l'incidence des MICI chez l'enfant.¹³ Plusieurs études ont démontré un effet protecteur de l'allaitement maternel prolongé sur le risque de MC ainsi que de RCH. Ces résultats ont été confirmés dans une méta-analyse publiée en 2004.¹¹⁷ Ainsi, le risque de MICI est augmenté chez les enfants qui ont reçu un lait artificiel. La différence de composition en protéines entre le lait maternel et les préparations infantiles est importante allant de 9 grammes par litre pour le lait maternel à 30 grammes par litre pour certains laits infantiles. Entre 1985 et 1994, les besoins protéiques du nouveau né et du nourrissons ont été réévalués et de nouvelles recommandations émises par plusieurs sociétés savantes entraînant une diminution de près de 25% de la composition en protéines des laits infantiles.¹¹⁸⁻¹²¹ Les seuils actuels recommandés de composition protéiques se situent entre 12 et 19 g/L en Europe¹²² alors qu'aux États Unis la fourchette reste plus large : 12 à 30 g/L .

5. Hypothèses physiopathologiques

Il existe des éléments biologiques permettant d'expliquer le mécanisme de la relation entre protéines animales et MICI. Une proportion variable d'acides aminés contenus dans les protéines animales ne sont pas absorbés par l'intestin grêle et atteignent la lumière colique où ils sont métabolisés par le microbiote en plusieurs dérivés dont certains sont toxiques pour la muqueuse colique (notamment les dérivés phénoliques et l'ammoniaque).^{123,124} Il a ainsi été suggéré que les sulfites mis au contact du monoxyde d'azote produit par les bactéries anaérobies pouvaient altérer la membrane cellulaire des colonocytes.¹²⁵ Ceci entraînerait une perte de la fonction de barrière intestinale et la cascade immunitaire rencontrée dans la RCH. Par ailleurs, il a été récemment démontré, dans un modèle de porcelet, qu'une alimentation très riche en protéines en période néonatale, induisait une modification durable de la flore (augmentation du pourcentage de clostridium et bactéroïdes) et une perméabilité intestinale augmentée, surtout chez les femelles.¹²⁶

Au total, le risque de MICI lié à l'apport excessif en protéines animales serait dû au métabolisme exagéré des produits de dégradation alimentaire au contact de la flore colique entraînant un phénomène de putréfaction.

D'autres mécanismes peuvent également être envisagés :

- Effet direct sur la flore (dysbiose)¹²⁷;
- Production exagérée de résidus de dégradation de la glycation des protéines lors de la cuisson.¹²⁸ Certains aliments d'origine animale (protéines et graisses) sont plus à risque

de production de ces dérivés que les aliments végétaux. Ces dérivés toxiques, produits en grand nombre, induisent un stress oxydatif conduisant à l'inflammation ;

- Protéines animales agissant comme vecteur de bactéries résistantes aux différents modes de cuisson.

6. Perspectives

On peut espérer que, si un lien de causalité entre l'apport excessif de protéines animales et risque de MICI est établi et reproduit dans les études notamment chez l'enfant, on notera dans quelques années avec la diminution de la charge protéique des lait infantiles (sous réserve que l'apport protéines alimentaire hors lait ne soit pas également augmenté), un déclin de l'incidence des MICI chez l'enfant dans nos populations.

CHAPITRE 4 : EXPOSITION SOLAIRE ET RISQUE DE MICI

I. POSITION DU PROBLÈME

Depuis plusieurs décennies, le niveau d'exposition solaire a beaucoup diminué en lien avec la baisse des activités extérieures au profit des loisirs sédentaires (télévision, jeu vidéo, Internet, chat, réseaux sociaux etc.).¹²⁹ La carence en vitamine D chez les sujets jeunes et les adolescents est fréquente dans différentes parties du globe.¹³⁰⁻¹³² Cette carence est également fréquente chez l'adulte mais certainement non diagnostiquée.¹³³⁻¹³⁵ Les seuils étudiés pour définir la carence varient selon les études ainsi que l'ethnie considérée. Récemment une étude nationale Nord américaine a rapporté qu'à un seuil de 11 ng/ml, près de 2% des adolescents étaient carencés alors qu'à un seuil de 20 ng/ml ce pourcentage s'élevait à 14%¹³⁶.

Le principal effet biologique de la vitamine D, est l'augmentation de la minéralisation osseuse. Mais la vitamine D a aussi d'autres actions anti-inflammatoires notamment action suppressive de la vitamine D et des radiations UV sur la réponse immunitaire T.¹³⁷ Des arguments plaident également en faveur du rôle de la vitamine D dans des pathologies auto-immunes comme la sclérose en plaques multiple ou le diabète de type 1.¹³⁸

Un lien possible entre la carence en vitamine D et les MICI a été récemment évoqué.^{139,140} Toutefois, aucune étude prospective n'a été réalisée concernant la relation entre exposition solaire et MICI. De surcroît, il n'existe à ce jour pas de recommandations concernant les indications de surveillance, de supplémentation et de prévention des carences en vitamine D chez les patients atteints de MICI.¹⁴¹ Un gradient Nord/Sud d'incidence décroissante de la maladie de Crohn a été reproduit dans différentes parties du globe : en Écosse¹⁴², aux États-Unis¹⁴³, en France⁷. Les variations de niveau d'exposition solaire pourraient rendre compte de ce gradient.

II. OBJECTIF DU TRAVAIL DOCTORAL

Étudier la relation entre le niveau d'exposition solaire et le risque de survenue de MICI incidentes au sein de la cohorte prospective E3N.

III. POPULATION ET MÉTHODES

1. Population d'étude

Afin d'étudier la relation entre exposition solaire et risque de MICI nous avons considéré toutes les femmes de la cohorte ayant rempli un questionnaire Q1 complet et n'ayant pas déménagé jusqu'à la déclaration d'un cas de Crohn ou RCH ou la date de point.

Nous souhaitons également analyser la relation entre risque de MICI et exposition solaire depuis l'enfance mais ceci n'a pu être réalisé car plus de 2/3 de la population ont changé de lieu de vie (département ou région) entre la naissance et Q1.

Un total de 91870 femmes dont **123 cas incidents de MICI** (45 MC, 71 RCH et 7 CCI) et **91747 non cas** étaient incluses dans les analyses de la relation entre ensoleillement et risque de MICI.

2. Données d'exposition solaire

Les données concernant le niveau de radiation et d'ensoleillement au sol (UV), exprimées en kJ/m², étaient obtenues par le biais de mesures par satellite (base européenne Météosat). Les données (latitude, niveau d'UV) étaient disponibles pour chaque département français et pour chaque mois de janvier 1984 à août 2003. ¹⁴⁴

Le niveau moyen d'exposition solaire pour chaque femme était calculé en faisant la moyenne d'ensoleillement de son département de vie entre 1984 et 1989 c'est à dire avant l'inclusion des femmes dans l'étude. Deux variables étaient ensuite créées concernant le niveau moyen d'exposition pour la période hivernale (octobre à mars) : *UV-hiver* ainsi que pour la période estivale (avril à septembre) : *UV-été*.

3. Analyses statistiques

Tous les cas de MICI survenant après le questionnaire Q1 et n'ayant pas changé de département entre le questionnaire Q1 et la survenue de la maladie étaient ainsi considérés comme des cas incidents de MICI et inclus dans les analyses.

Toutes les autres femmes n'ayant pas changé de département entre le questionnaire Q1 et ne déclarant aucun cas de MICI incident à la date des dernières nouvelles (juin 2005) étaient considérées comme non cas et incluses dans les analyses.

Nous avons exclu des analyses les femmes résidant dans les DOM TOM (n=39) pour manque de données concernant l'exposition aux UV dans cette région.

Les variables *UV-été* et *UV-hiver* étaient analysées sous forme de tertiles d'exposition. La relation entre exposition solaire en été ou en hiver et risque ultérieur de maladie de Crohn ou de RCH était analysée en utilisant le modèle de Cox. ¹⁰⁴

Nous avons effectué un modèle non ajusté puis un modèle ajusté en considérant l'activité physique comme variable principale d'ajustement sous forme de classe d'activité physique.

Nous avons ensuite réalisé des ajustements ultérieurs en incluant dans le modèle de base, la consommation tabagique, les traitements hormonaux, le niveau socio-économique.

Une analyse multivariée était réalisée en incluant dans un modèle, les facteurs alimentaires notamment l'apport en protéines animales et l'apport en vitamine D. Pour cette analyse, nous avons considéré tous les cas de MICI diagnostiqués après le premier questionnaire (Q1) et ayant rempli un questionnaire alimentaire exploitable (Q3).

IV. RÉSULTATS

1. Niveau d'ensoleillement annuel

La figure 7 décrit les niveaux moyens d'ensoleillement en France pour la période 1984 à 1989. On constate que certains départements ont des niveaux d'ensoleillement élevés alors que d'autres sont moins ensoleillés, quelle que soit la saison considérée.

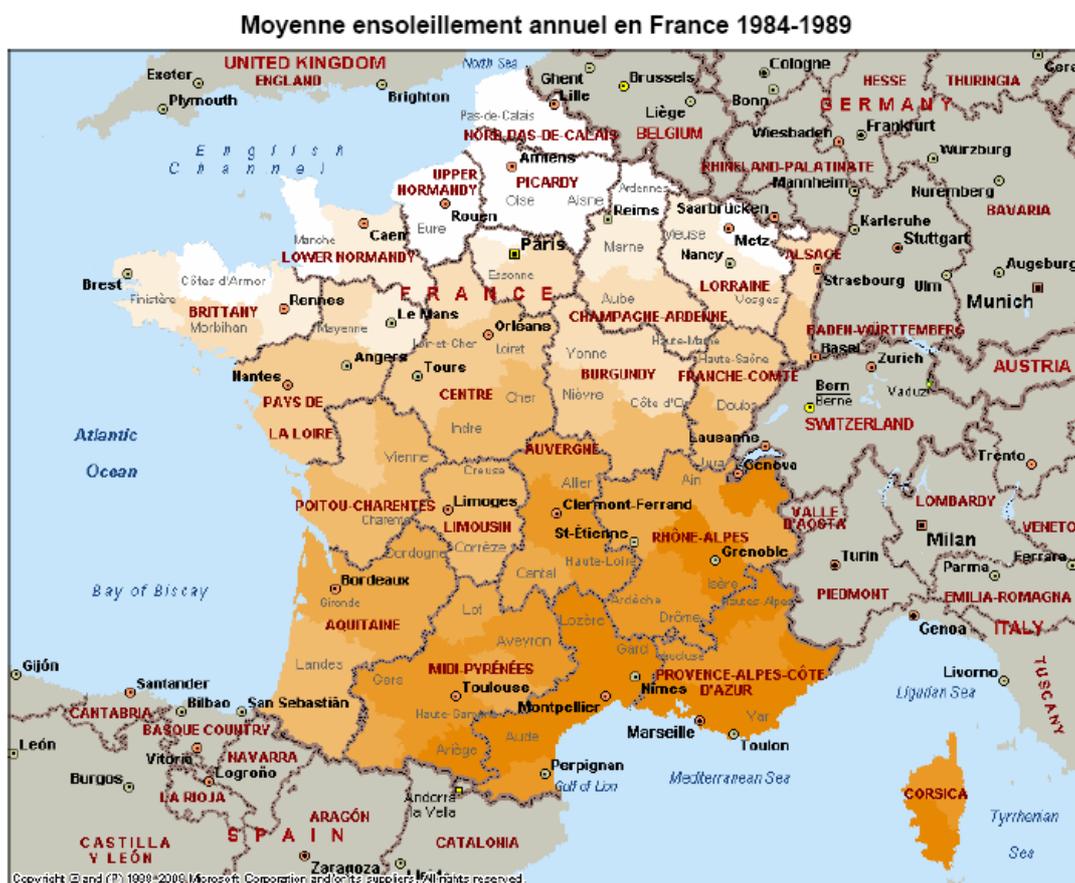


Figure 7. Niveau d'exposition solaire selon les départements en France pour la période 1984-1989.

L'exposition quotidienne moyenne en UV était de 2,55 kJ/m² l'été et de 0,75 kJ/m² l'hiver pour les non cas et de 2,50 kJ/m² l'été et 0,72 kJ/m² l'hiver pour les cas de MICI. On notait une différence significative de niveau d'exposition entre les cas de MC (mais pas la RCH) et les non cas. (Tableau 13)

Tableau 13. Niveau d'ensoleillement entre les cas de MC, RCH et les Non cas

variable moyenne (ds)	Crohn (N=45)	RCH (N=71)	Non cas (N=91742)
UV été (kJ /m ²)	2,45 (0,19) ^{\$}	2,56 (0,26)	2,55 (0,25)
UV hiver (kJ/m ²)	0,70 (0,11) [#]	0,75 (0,14)	0,75 (0,13)

Différences statistiquement significatives entre les cas et les non cas : \$: P=0,002; # P= 0,009.

2. Relation entre niveau d'exposition solaire et risque de Crohn et de RCH

L'analyse du niveau d'exposition solaire en été montrait qu'une forte exposition était associée à un effet protecteur contre le risque de survenue de maladie de Crohn (**HR pour le troisième vs. premier tertile = 0,49; IC à 95% : 0,23 à 1,05; p de trend =0,06**) mais pas pour la RCH. (Tableau 14)

Cet effet protecteur de l'ensoleillement sur le risque de survenue de MICI était encore plus marqué concernant le niveau d'exposition solaire pendant les périodes d'hiver (**HR pour le troisième vs. premier tertile = 0,46; IC à 95% : 0,22 à 0,98; p de trend =0,03**).

Tableau 14. Hazard ratio de survenue de MICI en fonction de niveau d'ensoleillement en hiver et en été#

	Variable	Tertile 1	Tertile 2	Tertile 3	p trend
MICI	UV-été	1 (-)	0,78 (0,51-1,19)	0,74 (0,48-1,13)	0,15
	UV-hiver	1 (-)	0,81 (0,53-1,23)	0,71 (0,46-1,10)	0,44
RCH	UV-été	1 (-)	0,88 (0,49-1,57)	1,02(0,59-1,78)	0,93
	UV-hiver	1 (-)	1,03 (0,58-1,81)	1,00 (0,56-1,79)	1,00
MC	UV-été	1 (-)	0,70 (0,36-1,37)	0,49 (0,23-1,05)	0,06
	UV-hiver	1 (-)	0,56 (0,28-1,11)	0,46 (0,22-0,98)	0,03

Modèle non ajusté

Une analyse ajustée sur l'activité physique ne modifiait pas la relation entre exposition solaire et risque de maladie de Crohn : **HR 0,45 - IC à 95% : 0,21 à 0,96; p de trend 0,04**. Des ajustements ultérieurs sur la consommation tabagique, la prise de traitements hormonaux, le niveau socio-économique ne modifiaient pas non plus l'effet protecteur du fort niveau d'ensoleillement sur le risque de survenue de maladie de Crohn. (Tableau 22 en annexe)

3. Relation entre exposition solaire et risque de MC ajusté sur apport alimentaire de vitamine D

Cette analyse incluait les cas de Crohn survenus après Q1 et ayant rempli le questionnaire alimentaire (n=35) ainsi que les non cas (n=70987). L'apport alimentaire moyen (ds) de vitamine D dans la cohorte était de 2,28 µg /j (1,01) dans le groupe Crohn et de 2,63 (1,34) µg/j dans le groupe non MICI ; (p<0.0001).

Dans un modèle d'analyse multivariée (incluant niveau d'UV, apport en vitamine D et apport calorique quotidien en tendance), on notait que le risque de survenue de MC était plus faible chez les femmes qui avaient un niveau élevé d'exposition solaire ainsi qu'un apport en vitamine D alimentaire élevé. Tableau 15.

Tableau 15. HR de survenue de MC en fonction du niveau d'exposition solaire et de l'apport alimentaire en vitamine D.

Variable	Tertile 1	Tertile 2	Tertile 3	p trend
UV-hiver	1 (-)	0,55 (0,26-1,17)	0,32 (0,13-0,81)	0,01
Vitamine D	1 (-)	1,00 (0,48-2,07)	0,40 (0,15-1,03)	0,07

V. DISCUSSION

1. Principaux résultats de notre étude

Cette étude montre un effet protecteur d'un fort niveau d'ensoleillement sur le risque de MC. Cet effet persiste après ajustement sur l'apport alimentaire en vitamine D. Soulignons un point essentiel : l'effet protecteur est encore plus fort pendant la période hivernale témoignant d'un mécanisme de carence prolongée qui pourrait, en atteignant un certain seuil, participer au processus de déclenchement de la cascade inflammatoire.

2. Forces et faiblesses de l'étude

Il est difficile d'évaluer le niveau individuel d'ensoleillement chez l'adulte comme chez l'enfant. Les capteurs d'ensoleillement terrestres sont peu répandus en France. Nous avons utilisé des données fournies par recueil satellitaire qui ont été démontrées comme fiables concernant le niveau d'ensoleillement au sol. Plusieurs études se sont penchées sur la question du meilleur outil pour évaluer le niveau d'exposition solaire individuel. Divers systèmes de recueil existent et ont tous leurs avantages et inconvénients : questionnaires prospectifs ou rétrospectifs, capteurs cutanés d'exposition solaire, etc. ¹⁴⁵⁻¹⁴⁷

L'extrapolation des données d'ensoleillement départementales à l'échelon individuel est la principale limite de l'étude. Deux femmes résidant dans un département pourraient en effet avoir des niveaux d'exposition très différents selon leur activité quotidienne et surtout selon le type d'activité physique de plein air. Nous avons systématiquement ajusté nos analyses sur l'activité physique afin de minimiser un biais qui serait dû à une différence du temps passé en extérieur (marche, promenade, jogging, etc.).

Les points forts de notre étude sont le recueil prospectif des données et le suivi prolongé de la cohorte.

3. Ensoleillement, vitamine D et santé

Deux sources de vitamine D sont disponibles pour l'organisme : l'alimentation qui apporte la vitamine D véhiculée par les chylomicrons et la peau à travers les rayons ultraviolets B (UVB) Figure 8. Les sources alimentaires de vitamine D sont peu nombreuses essentiellement représentées par les poissons gras, les œufs et le foie. En France, peu d'aliments sont enrichis en vitamine D sauf par exemple les préparations lactées infantiles chez le nourrisson.

Ainsi l'alimentation, à elle seule, ne peut pas prévenir et compenser les carences. La deuxième source de vitamine D est donc primordiale. Sous l'action des rayons ultraviolets, la

peau synthétise la provitamine D3 précurseur de la vitamine D3. (Figure 8) Le niveau d'absorption cutanée des ultraviolets est directement corrélé à la surface exposée. L'absorption de la vitamine D dépend de la couleur de la peau. Ainsi les carences semblent plus sévères chez les sujets à peau noire vivant dans des régions de haute latitude faiblement exposées. Les recommandations concernant le risque de cancer de la peau émises par les sociétés de dermatologie ont conduit à intensifier les mesures de protection solaire avec comme corollaire une nette diminution du temps passé au soleil ainsi que de la surface cutanée exposée. De plus, la nette diminution des loisirs en extérieur au profit des activités en intérieur évoluant parallèlement avec l'âge majore le risque de carence.¹⁴⁸

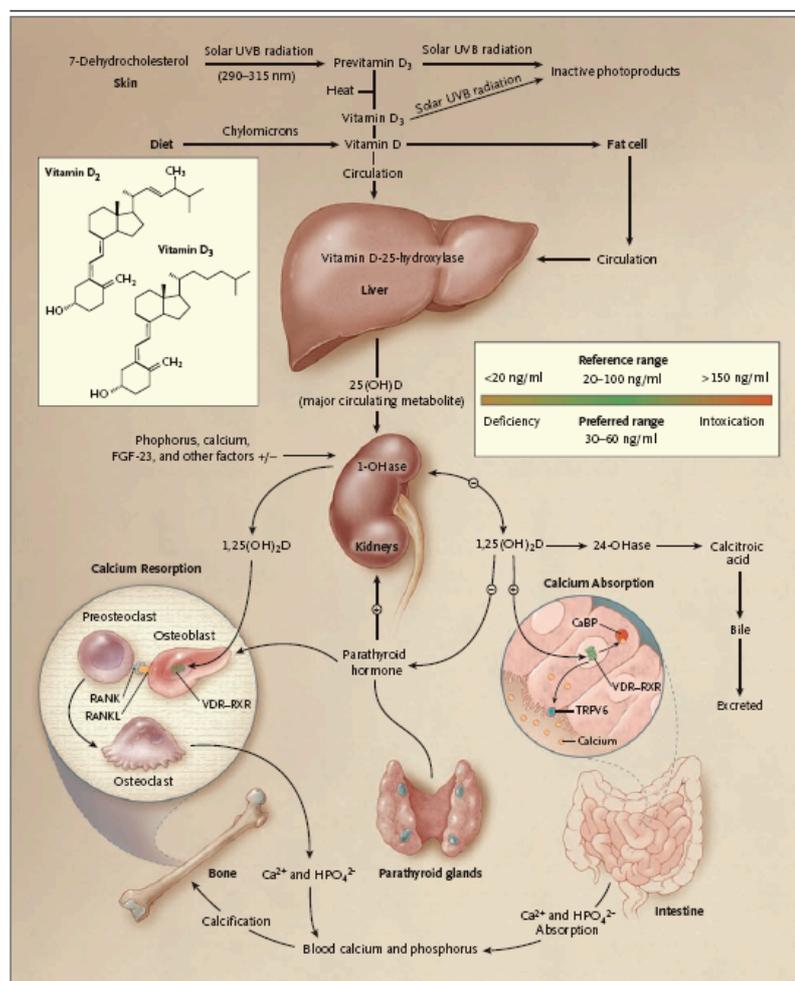


Figure 8. Synthèse, régulation de la vitamine D et métabolisme phospho-calcique (d'après Holick³).

4. Vitamine D et MICI données de la littérature

Plusieurs études ont montré que les patients atteints de MICI avaient, au moment du diagnostic, des taux sériques abaissés de vitamine D. Ce résultat était interprété comme une conséquence de la maladie (malabsorption, malnutrition) ^{149,150} plutôt que comme un facteur de risque. Plusieurs études récentes ont montré que les enfants et les adultes jeunes, atteints de MC avaient un apport alimentaire faible en vitamine D au diagnostic. ¹⁵¹⁻¹⁵³

Les variations saisonnières dans la poussée initiale de survenue de la MC ainsi que la survenue des poussées ont été rapportées dans diverses études; La prévalence plus élevée en période hivernale que en période estivale plaide en faveur du rôle de la vitamine D et de l'ensoleillement. ¹⁵⁴⁻¹⁵⁶

5. Vitamine D et MICI : hypothèses physiopathologiques

Les mécanismes en causes dans la relation entre vitamine D, ensoleillement et inflammation sont rapportés dans les figures 9 et 10. ⁴ Ainsi la vitamine D agirait à la fois sur l'immunité innée et l'immunité acquise.

L'effet métabolique de la vitamine D passe par le biais du récepteur de la vitamine D dont le gène est situé sur le chromosome 12 (région q13-26) et pour lequel de nombreux variants ont été identifiés. Par ailleurs il a été récemment montré que la vitamine D stimulerait l'expression de NOD2/CARD15 au niveau des monocytes et des cellules épithéliales. ¹⁵⁷ Cet effet a été démontré in vivo sur des modèles animaux ¹⁵⁸. Une étude récente montre que trois variants de gènes impliqués dans la synthèse du cholestérol, l'hydroxylation et le transport de la vitamine D présents chez le même sujet, sont associés à un risque de déficit marqué en vitamine D dans la population caucasienne. ¹⁵⁹

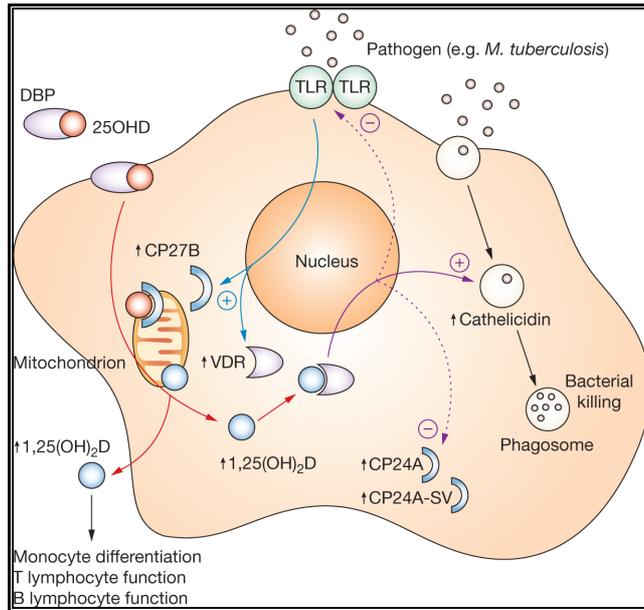


Figure 9. Vitamine D et immunité innée selon Adams et Hewison ⁴

Abréviations : 1,25(OH)₂D, 1,25-dihydroxyvitamin D; 25OHD, 25- hydroxyvitamin D; CP24A, 1,25(OH)₂D 24-hydroxylase; CP24A-SV, 1,25(OH)₂D 24- hydroxylase splice variant; CP27B, 25OHD-1 α hydroxylase; DBP, vitamin-D-binding protein; TLR, Toll-like receptor 2; VDR, vitamin D receptor.

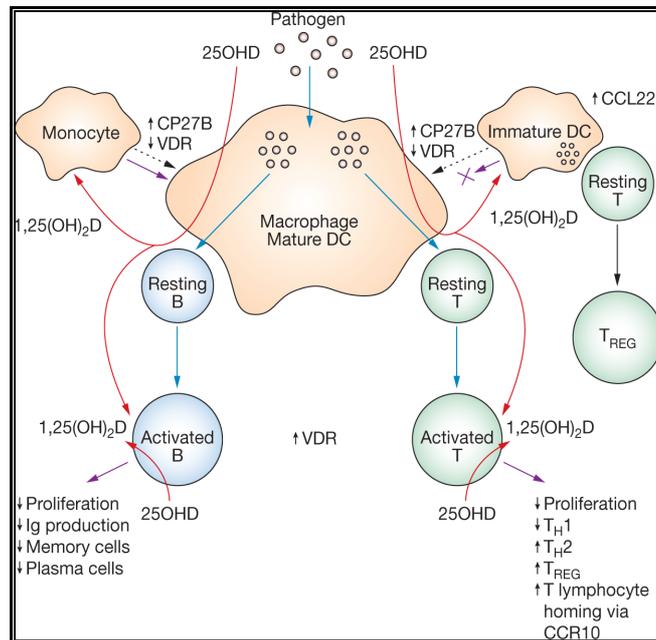


Figure 10. Vitamine D, présentation antigénique et immunité acquise selon Adams et Hewison ⁴

Abréviations : 1,25(OH)₂D, 1,25-dihydroxyvitamin D; 25OHD, 25-hydroxyvitamin D; CCL22, CC-chemokine ligand 22; CCR10, CC-chemokine receptor 10; CP27B, 25OHD-1 α hydroxylase; DC, dendritic cell; Ig, immunoglobulin; TH1, type 1 T-helper lymphocyte; TH2, type 2 T-helper lymphocyte; TREG, T-regulatory lymphocyte; VDR, vitamin D receptor

**CHAPITRE 6 : EXPOSITION
SOLAIRE ET RISQUE DE MICI AU
SEIN DE LA BASE DE DONNÉES
NATIONALE**

I. POSITION DU PROBLÈME

Afin de vérifier l'hypothèse ensoleillement et risque de MICI, une autre approche méthodologique a été réalisée. Elle consistait à étudier la corrélation géographique entre la répartition des cas de MICI et le niveau d'exposition solaire à l'échelon départemental ceci en faisant abstraction des données individuelles d'ensoleillement.

II. OBJECTIF DU TRAVAIL DOCTORAL

Vérifier l'existence d'une association entre la MC ou la RCH et le niveau d'exposition solaire du département des sujets.

III. POPULATION ET MÉTHODES

1. Population

Entre le premier janvier 2000 et le 31 décembre 2002, tous les patients présentant un nouveau cas incident de MICI, résidant en France métropolitaine et affiliés à l'une des caisses d'assurance maladie étaient inclus dans une base de donnée prospective. Les trois caisses d'assurance maladie retenues couvrent près de 96% de la population française:

- CNAMTS : Caisse Nationale d'Assurance Maladie Des Travailleurs Salariés ;
- CCMSA : Caisse Centrale de la Mutualité Sociale Agricole ;
- CANAM : Caisse Nationale d'Assurance Maladie des non-salariés ;

Cette base de données était constituée en 2004 afin d'étudier l'incidence nationale des MICI selon les tranches d'âge et le sexe. ⁷ Les données, non nominatives comportaient outre le diagnostic de l'affection (MC ou RCH), le lieu de résidence, l'âge et le sexe.

2. Méthodes

Nous avons utilisé cette base de MICI nationale et les données concernant le niveau de radiation et d'ensoleillement au sol (UV), obtenues par le biais de mesures par satellite (base européenne Météosat pour chaque département français et pour chaque mois de janvier 1984 à décembre 1999. ¹⁴⁴

a. Calcul des taux d'incidence

Les données d'incidence étaient calculées par sexe et séparément pour les cas de MC et de RCH. Les nouveaux cas de MICI étaient rapportés sur le nombre total de personnes assurées pendant la période de l'étude.

b. Relation entre exposition solaire et taux d'incidence

Nous avons calculé un taux moyen annuel de dose d'UV par département. Ces doses d'UV étaient ensuite classifiées en quintiles d'exposition. La relation entre quintiles d'exposition solaire et taux d'incidence de MICI était analysée par départements. Les taux d'incidence ajustés sur l'âge et le sexe étaient estimés par la méthode de régression de Poisson. Toutes les variables statistiquement significatives ($p \leq 0,05$) étaient retenues pour l'analyse spatiale.

c. Analyse spatiale

Une analyse spatiale était réalisée par la méthode Bayésienne. Ce modèle tient compte à la fois de l'hétérogénéité de la population et des auto-corrélations spatiales. L'exposition solaire était introduite dans le modèle comme covariable et la robustesse du modèle était testée. Le modèle fournissait ainsi des risques relatifs lissés plus précis que les taux d'incidence standardisés.

Chacun des 93 départements était affecté à l'une des trois classes selon les RR lissés: RR lissé statistiquement supérieur à 1, RR lissé non statistiquement différent de 1 et RR lissé statistiquement inférieur à 1.

IV. RÉSULTATS

Entre le 01 janvier 2000 et le 31 décembre 2002, 14.113 cas incidents de MC (8.138 femmes et 5.975 hommes) et 12.339 cas incidents de RCH (5.959 femmes et 6.380 hommes) ont été identifiés par les caisses d'assurance maladie. La population globale française d'individus assurés pendant cette période était de 57.098.525 habitants.

a. Relation entre exposition solaire et risque MC

Le taux d'incidence de MC dans toute la population française était de 8,2/100.000 habitants (IC à 95% : 8,1-8,4). Ce taux était de 7,1 (IC à 95% : 6,9-7,2) chez les hommes et de 9,4 (IC à 95% : 9,2-9,6) chez les femmes. Il n'y avait pas de variation significative de taux pendant les trois années de l'étude. Le tableau 16 présente les résultats des taux d'incidence ajustés sur l'âge et le sexe en lien avec les quintiles d'exposition solaire.

On constate qu'un fort niveau d'exposition solaire est associé de façon significative à un moindre risque de maladie de Crohn et à l'inverse le groupe ayant le plus faible niveau d'exposition solaire présente un RR augmenté de survenue de MC: RR=1,42 (IC à 95%=1,27-1,52).

Tableau 16. Taux d'incidence de MC en rapport avec niveau d'exposition solaire.

	RR ajusté	IC à 95%	p
Sexe			< 10 ⁻⁴
Femme	référence		
Homme	0,76	0,70-0,81	
Age (années)			< 10 ⁻⁴
15-29	référence		
0-14	0,26	0,22-0,30	
30-44	0,69	0,62-0,77	
≥ 60	0,46	0,37-0,57	
Dose moyenne UV (kj/m2)			< 10 ⁻⁴
1,73-1,93	référence		
1,61-1,73	0,85	0,74-0,98	
1,48-1,61	0,90	0,78-1,04	
1,40-1,48	1,12	0,75-1,26	
1,27-1,40	1,42	1,27-1,58	

b. Relation entre exposition solaire et risque de RCH

Le taux d'incidence de RCH dans toute la population française était de 7,2/100.000 habitants (IC à 95%: 7,1-7,3). Ce taux était de 7,7 (IC à 95%: 7,5-7,9) chez les hommes et de 6,8 (IC à 95%: 6,6-7,0) chez les femmes.

Le tableau 17 présente les résultats des taux d'incidence ajustés sur l'âge et le sexe selon les quintiles d'exposition solaire. On ne note pas de relation entre le niveau d'exposition solaire et l'incidence de la RCH au sein de cette population.

Tableau 17. Taux d'incidence de RCH en rapport avec le niveau d'exposition solaire.

	RR ajusté	IC à 95%	p
Sexe			0,01
Femme	référence		
Homme	1,13	1,03-1,25	
Age (années)			< 10 ⁻⁴
25-49	référence		
0-24	0,26	0,22-0,30	
50-74	0,69	0,62-0,77	
>=75	0,46	0,37-0,57	
Dose moyenne UV (kj/m2)			0,25
1,73-1,93	référence		
1,61-1,73	0,86	0,73-1,01	
1,48-1,61	0,85	0,71-1,01	
1,40-1,48	0,87	0,75-1,01	
1,27-1,40	0,93	0,81-1,07	

CHAPITRE 5 : FACTEURS DE RISQUE DE MICI AU SEIN DE LA COHORTE EPIC

I. OBJECTIF

L'objectif principal de cette partie de la thèse était de confirmer les résultats de la cohorte E3N concernant la relation entre apport de protéines animales et risque de MICI au sein d'une population différente. L'objectif secondaire était d'étudier les profils alimentaires les plus à risque de survenue de MICI et éventuellement les profils alimentaires protecteurs au sein d'une cohorte prospective européenne.

II. POPULATION ET MÉTHODES

1. Population

La cohorte EPIC (European Prospective Investigation Into Cancer and nutrition) est une cohorte européenne incluant un total de 519.978 hommes et femmes volontaires dans 10 pays (23 centres).¹⁶⁰ (Figure 11 et Tableau 18)

Les participants étaient inclus dans l'étude de manière prospective entre 1991 et 1998 et sont suivis jusqu'à ce jour.

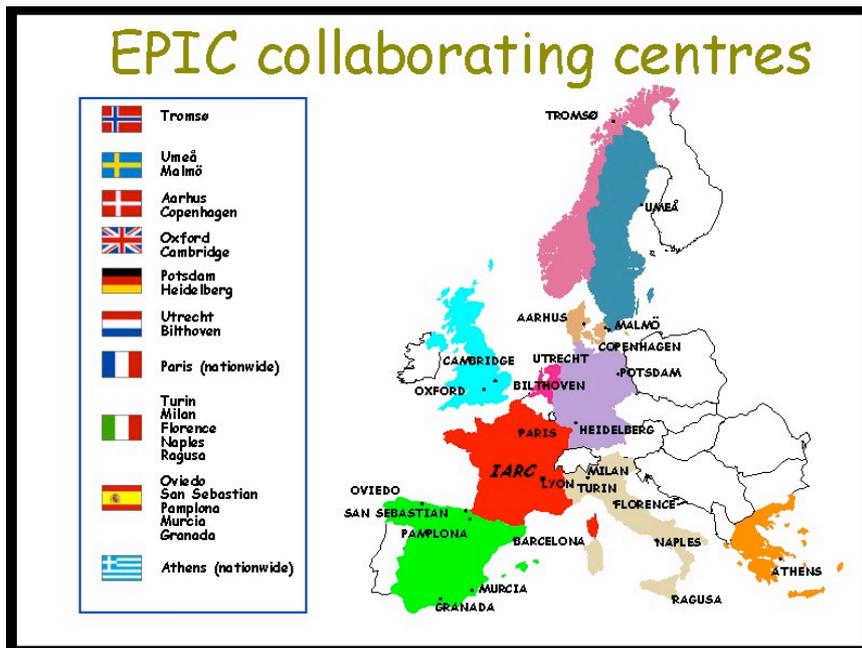


Figure 11. Liste des pays participants à la cohorte EPIC.

Les données concernant le diagnostic de MICI étaient obtenues soit par des questionnaires auto-administrés, soit par les registres nationaux de maladies chroniques. Dans tous les cas, le diagnostic final était validé dans chaque centre grâce aux données obtenues par le biais des médecins traitants et/ou gastroentérologues.

Les données obtenues jusqu'à la date du dernier recueil (décembre 2009) ont permis d'identifier un total de **221 RCH et de 102 MC incidents**.

Le tableau 17 décrit les particularités de chaque cohorte : population source, échantillon, durée du suivi, nombre de cas de MC et de RCH.

Les participants à l'étude EPIC - MICI étaient répartis en deux groupes :

Malades (Cas)

Ce sont les participants inclus dans la cohorte EPIC, qui ont répondu au questionnaire alimentaire à l'inclusion dans l'étude et chez qui le diagnostic de MC ou de RCH a été posé ultérieurement : cas incidents de MICI.

Non malades (non Cas)

Ce sont les participants de la cohorte EPIC qui ont répondu au questionnaire alimentaire à l'inclusion dans l'étude et qui ont été considéré comme indemnes de toute affection à la date des dernières nouvelles (questionnaire ou données du registre). Au sein de cette population, un échantillon de quatre témoins pour chaque cas de MICI a été sélectionné.

2. Maladie de Crohn

Cent deux sujets (71 femmes) ont développé une maladie de Crohn après l'inclusion dans la cohorte. Chaque cas de MICI était apparié avec 4 témoins sur le centre d'inclusion, l'âge et le sexe. La répartition du nombre de cas par pays est présentée sur le tableau 18. L'âge au recrutement dans la cohorte EPIC était de 51 ans identique dans le groupe des cas et des témoins.

3. Rectocolite hémorragique

Deux cent vingt et un sujets (128 femmes) étaient atteints de RCH après l'inclusion dans l'étude et 884 témoins ont été sélectionnés par appariement. La répartition du nombre de cas par pays est présentée sur le tableau 18.

Tableau 18. Description de la population de sujets (hommes et femmes) inclus dans la cohorte EPIC- MICI :

Centre	Numéro EPIC	Numéro Hart	Taille de la cohorte	Description de la cohorte	MC	RCH
Norfolk (UK)	-	1	25639	Population générale hommes et femmes âgés de 45-74 ans. Cas identifiés par questionnaires et données d'admission hospitalière.	12	31
Oxford (UK)	42	4	57493	- Membres de la société végétarienne et lecteurs de magazines végétariens 20-80 ans (50070) - Participants recrutés en population générale : 20-80 ans ; 73% femmes (7423).Cas identifiés par questionnaires.	6	25
Umeå (Suède)	82	5	25732	Population générale; Hommes et femmes âgés de 30 à 60 ans. Cas identifiés par base de données nationale de MICI.	12	24
Malmö (Suède)	81	6	28098	Population générale ; Hommes et femmes âgés de 45 à 69 ans. Cas identifiés par base de données nationale de MICI.	11	26
Florence (Italie)	2	9	13583	Population générale ; Hommes et femmes âgés de 34 à 64 ans.	4	9
Aarhus, Copenhague (Danemark)	9	10	57054	Population générale ; Hommes et femmes âgés de 50 à 64 ans. Cas identifiés par base de données nationale de MICI.	16	50
France	1	3	74524	Femmes âgées de 40 à 65 ans affiliées à la MGEN. Cas identifiés par questionnaires.	25	33
Potsdam (Allemagne)	72	2	27548	Population générale ; Hommes et femmes âgés de 35 à 64 ans. Cas identifiés par questionnaires.	5	17
Heidelberg (Allemagne)	71	7	25540	Population générale ; Hommes et femmes âgés de 45 à 65 ans. Cas identifiés par questionnaires.	11	6
Total			335211		102	221

4. Méthodes

a. Données alimentaires

Les données alimentaires ont été recueillies à l'inclusion dans l'étude par des questionnaires adaptés à chaque pays (entretiens individuels ou questionnaires auto administrés).¹⁶¹ L'interrogatoire alimentaire comportait des données sur les catégories d'aliments (la fréquence de leur prise, et leur quantité) ainsi que les aspects qualitatifs détaillés pour chaque type d'aliment.

Une étude de calibration a été effectuée auprès d'un échantillon de 36994 participants : hommes et femmes (environ 8 % de la cohorte). Ces sujets recevaient un questionnaire alimentaire en face à face (enquête rétrospective sur l'alimentation des 24 heures). Le rationnel de cette étude de calibration était de corriger d'éventuelles erreurs de mesures liées aux particularités des questionnaires pour chaque pays afin d'atténuer les biais dans l'estimation des risques relatifs.¹⁶²

Les données comparées de consommations alimentaires au sein de cette vaste cohorte montrent une disparité dans les apports en macronutriments entre les pays. Par ailleurs, les profils de consommation alimentaires et de nutriments varient largement selon de la situation géographique et des habitudes alimentaires de chaque pays¹⁶³⁻¹⁶⁶

b. Données non alimentaires

D'autres paramètres recueillies à l'inclusion seront inclus dans les analyses comme variables d'ajustement : données anthropométrique (BMI), intoxication tabagique : passée ou présente, activité physique, niveau éducatif.

5. Analyses de la relation entre apport protéines et risque de MICI

Les données alimentaires de l'étude EPIC étant encore en cours de validation, nous envisageons réaliser les analyses selon les modalités suivantes:

L'association entre facteurs alimentaires et MICI sera analysée en utilisant un modèle de régression logistique conditionnelle. L'analyse de la relation entre apport protidique et risque de MICI sera effectué en considérant l'apport protidique global mais aussi l'apport en protéines animales, végétales et les sources de protéines : viandes (rouge et blanche), poissons (poissons et fruits de mer), œufs, produits laitiers. Les apports quotidiens seront

analysés sous forme de tertiles de consommation. Un test de trend sera effectué pour estimer l'effet de la variation du paramètre à travers les tertiles.

Un ajustement par la méthode de partition sur l'apport énergétique hors alcool sera réalisé. L'effet d'éventuels facteurs de confusion sera recherché en rajoutant dans le modèle de base les variables suivantes : alcool (tertiles de consommation), activité physique (dépense énergétique hebdomadaire), niveau socioéconomique et statut tabagique (ancienne fumeuse, fumeuse actuelle, jamais fumé). Les analyses seront réalisées séparément pour les cas de RCH et MC avec une stratification sur le sexe.

6. Analyse des Profils alimentaires et risque de MICI au sein de la cohorte EPIC

Pour identifier les profils alimentaires, les aliments tirés du questionnaire seront regroupés en un nombre réduit de groupes. La procédure d'analyse en composantes principales (matrice de corrélation) sera appliquée aux groupes alimentaires constitués. Une rotation varimax sera appliquée. Comme dans la plupart des études, les facteurs ayant une valeur propre supérieure à 1 seront retenues. Au sein de chaque facteur, seules les saturations supérieures à 0,20 ou inférieures à -0,20 seront retenues. Plus la saturation d'un aliment ou d'un groupe d'aliments est élevée dans un facteur, plus sa contribution dans celui-ci est importante. On peut ainsi donner un « nom » au facteur en fonction des saturations les plus élevées. Une saturation négative indique que l'aliment ou le groupe d'aliments est inversement associé au facteur. Pour chaque facteur ou profil, un score de consommation sera calculé pour chaque individu en utilisant la méthode de régression.

Pour chaque profil étudié, les sujets seront regroupés en tertiles selon leur score et le risque relatif de survenue de MICI sera calculé. Les analyses seront réalisées séparément pour les cas de MC et de RCH.

SYNTHÈSE

Plus de 75 ans après la description de la maladie de Crohn, on ne connaît toujours pas avec précision, les facteurs d'environnement impliqués dans les MICI.

L'une des incertitudes concerne la durée nécessaire entre l'exposition à un facteur de risque et l'initiation des processus inflammatoires puis la survenue de la maladie. Qu'il s'agisse de bactéries ou de facteurs alimentaires, il est évident que de nombreux mois voire années sont nécessaires avant le déclenchement de la cascade inflammatoire. Ainsi les changements dans les facteurs socio-économiques ou alimentaires précéderont de près de 5 à 10 ans les modifications de l'incidence des MICI à l'échelle d'une population. ¹⁰

Les deux facteurs de risque retrouvés dans ce travail de thèse méritent une validation externe afin de pouvoir mettre en place des recommandations nutritionnelles attendues par les patients et les sujets à risque.

L'apport excessif de protéines animales identifié comme facteur de risque de MICI dans notre étude rejoint les travaux d'autres équipes qui ont établi un lien entre l'excès de protéines animales et le risque d'obésité, ¹⁶⁷ de diabète insulino-dépendant, ¹⁶⁸ de fractures, ¹⁶⁹ d'hypertension artérielle chez le sujet âgé, ¹⁷⁰ ou de puberté précoce chez l'adolescente. ¹⁷¹

La relation entre l'excès d'apport en protéines animales ou l'apport élevé de viande rouge et le risque de cancer colorectal reste controversée. Une méta-analyse conduite en 2009 concluait que les données de la littérature disponibles ne permettaient pas de tirer une conclusion définitive. ¹⁷² Dans cette synthèse bibliographique incluant six études de cohorte (1070 cas de cancer colorectal), le risque relatif estimé moyen était de 1,04 (IC à 95%: 0,83 à 1,31; P d'hétérogénéité = 0.221)

L'analyse de la relation entre facteurs alimentaires et risque de maladies chroniques est difficile à cause de l'interaction entre les nutriments. L'exemple du lien entre calcium et vitamine D est typique de ce type d'interaction. Les nutriments ou aliments peuvent déclencher les maladies mais il n'est pas impossible que certains facteurs non identifiés, associés à tel ou tel nutriment, soient réellement à l'origine de la maladie. En l'occurrence, les modes de cuissons peuvent intervenir dans les processus de métabolisme et de dégradation des aliments avant leur ingestion.

Dans ce travail de thèse nous avons identifié comme autre facteur de risque de MC **le faible niveau d'exposition solaire**. Des données écologiques suggèrent que la mortalité due à diverses maladies chroniques et cancers suit un gradient Nord Sud parallèle au degré

d'ensoleillement. ¹⁷³⁻¹⁷⁵ En outre, il a été démontré dans une méta-analyse publiée en 2007 que la supplémentation en vitamine D réduisait significativement le taux de mortalité globale. ¹⁷⁶ La vitamine D représente un facteur pour lequel des actions préventives simples peuvent être mises en place. Les interactions entre la génétique, l'exposition solaire et l'alimentation méritent une attention particulière ce d'autant plus qu'il a été constaté une large variabilité interindividuelle de la réponse biologique aux traitements par vitamine D. ¹⁷⁷

Nous envisageons dans les perspectives futures de ce travail de thèse :

- 1 Vérifier et valider les résultats de la cohorte E3N notamment le lien entre protéines animales et risque de MC et de RCH au sein de la cohorte EPIC ;
- 2 Analyser la relation entre vitamine D et survenue de maladie de Crohn par les dosages sanguins de 25OHD3 sur les prélèvements faits avant la survenue de la maladie au sein de l'ensemble des participants à EPIC. 354000 sujets ont des prélèvements sanguins disponibles ;
- 3 étudier les interactions entre génétique, ensoleillement, alimentation et risque de maladie de Crohn chez l'enfant. Travail qui sera mené au sein de l'équipe de recherche de Sainte Justine (Montréal, CANADA) dans le cadre d'un séjour postdoctoral.

L'une des retombées de ces travaux serait de pouvoir répondre à la question suivante : *Comment moduler la réponse diététique chez les sujets atteints de MICI en fonction de leur statut génétique et de leur microbiote ?*

CONCLUSION

L'alimentation joue probablement un rôle dans la genèse des MICI. Un apport excessif en protéines alimentaires (essentiellement animales) pourrait être un facteur favorisant.

Nos résultats s'ils sont confirmés dans d'autres populations incluant les sujets jeunes, permettraient de mettre en place des stratégies de prévention primaire dans les familles à fort risque de MICI ou de prévention secondaire chez les patients déjà atteints afin de diminuer la fréquence des poussées.

L'implication de la vitamine D dans la genèse de la maladie de Crohn est également un élément pour lequel des actions préventives simples pourraient être mise en place. Une supplémentation annuelle ou biannuelle systématique en vitamine D orale chez tous les individus vivant dans des régions faiblement ensoleillées pourrait être bénéfique et dénuée d'effet secondaire significatif.

ANNEXES

ANNEXE 1. TABLEAUX COMPLÉMENTAIRES

Tableau 19. Facteurs de risques alimentaires en relation avec la survenue de MICI : données de la littérature.

Tableau 20. Analyse multivariée : risque de survenue de maladie de Crohn en lien avec consommation de protéines.

Tableau 21. Analyse multivariée : risque de survenue de Rectocolite hémorragique en lien avec consommation de protéines.

Tableau 22. Analyse relation entre exposition solaire et risque de maladie de Crohn ajusté sur apport alimentaire et autres variables de confusion.

Tableau 23. Type de cuisson des viandes et poissons en relation avec le risque de survenue de MICI au sein de la cohorte E3N 1993-2005

Tableau 19. Facteurs de risques alimentaires en relation avec la survenue de MICI : Données de la littérature

Auteur	Pays	Année	Sujets	Population	Méthodologie	Résultats MC	Résultats RCH
Martini & Brandes	Allemagne	1976	A H/F	63 MC - 63 T	Rétrospective Cas témoin apparié	consommation sucre ajouté augmenté	***
Brandes et al.	Allemagne	1976	A H/F	114 RCH 114 T	Rétrospective Cas témoin appariés	***	consommation augmentée de céréales et patates et faible de fruits et légumes
Mayberry et al.	Angleterre	1980	A	100 RCH 120 MC	Rétrospective Cas témoin appariés	consommation sucre ajouté augmenté	
Jarnerot et al.	Suède	1983	A	30 MC 30RCH 60 T	Rétrospective Cas témoin	consommation sucre ajouté augmenté	
Gilat et al.	9 pays #	1987	A/E <25 ans	197 RCH et 302 MC 998 T	Multicentrique. Rétrospective Cas témoin appariés	fruits et légumes : OR 0.67 (0,45-1,35)	fruits et légumes OR 0,58 (0,37-0,91)
Sonnenberg	plusieurs pays	1988	A	population générale	étude écologique comparative	pas de corrélation Margarine et sucre	***
Persson et al.	Suède	1992	A	147 RCH 152 MC 305 T	Rétrospective Cas témoin	Sucres 2,6 (1,4-5,0) Fast food 3,9 (1,4-10,6)	Fast food OR 3,4 (1,3- 9,3)
Kurata et al.	Japon	1994		101 RCH 143 T	Rétrospective Cas témoin	***	Margarine et « Western food » augmentent le risque
Tragnone et al.	Italie	1995	A	104 patients	Rétrospective Cas témoin	Glucides et sucres augmentent risque	Protéines augmente risque
Shoda et al .	Japon	1996	A/E	population générale	étude écologique comparative	Augmentation consommation protéines animales, graisses animales et lait	
Reif et al.	Israël	1997	A H/F	54 RCH 33 MC 144 T	Rétrospective Cas témoin	Sucres : 1,93 (0,54-6,86)	Sucres : OR 4,22(1,3-13,6) Graisses animales : OR 4,09 (1,2-13,9) Cholestérol : OR 4,57 (1,2-16,3)

suite...

Auteur	Pays	Année	Sujets	Population	Méthodologie	Résultats MC	Résultats RCH
Geerling et al.	Pays-bas	2000	A H/F	43 RCH 43 T	Rétrospective Cas témoin	***	AGMI 33,9 (2,6-443,1) AGPI 5,1 (1,0-26,7), Vitamin B6 6,9 (1,6-30,7)
Klement et al.	Plusieurs pays	2004	A/E H/F	2577 RCH 3190 MC 7577 T	Meta-analyse 17 études	Allaitement maternel OR poolée : 0,67(0,52-0,86)	Allaitement maternel OR poolée : 0,77 (0,61-0,96)
Baron et al.	France	2005	E	222 CD 60 RCH 282	Rétrospective Cas témoin appariés population générale	Allaitement maternel 2,1(1,3-3,4)	sucreries 2,25(1-5,2)
Sakamoto et al.	Japon	2005	A/E	111 RCH 128 MC 219 T	Multicentrique. Rétrospective Cas témoin	Sucres 2,12 (1,08-4,17) Graisses 2,64 (1,29-5,39) omega3 : 3,24 (1,52-6,88) omega6 : 2,57 (1,24-5,32)	Sucreries 2,86(1,24-6,57)
Amre et al.	Canada	2007	E H/F	130 MC 202 T	Multicentrique. Rétrospective Cas témoin appariés	Légume 0,69(0,33-1,44). Fruits 0,49(0,25-0,96) Poisson 0,46(0,20-1,06) Fibres 0,12 (0,04-0,37) omega3/omega6 : 0,32 (0,14-0,71)	****
Hart et al. §	Europe	2008	A H/F	139 RCH 260686 T	Prospective multicentrique	***	AGPI 1,19 (0,99-1,43)
Tjonneland et al. §	Europe	2009	A H/F	126 RCH 203193 T	Prospective multicentrique	***	oméga6 2,49 (1,23-5,07)

A : Adulte ; E : enfants ; T : témoins; Seuls sont présentés les résultats positifs pour les principales variables alimentaires étudiés

Etats Unis, France, Suède, Israël, Italie, Angleterre, Canada Danemark, Pays-Bas.

§ Les patients de ces deux études représentent la même population de cas et non cas

Tableau 20. Analyse multivariée: risque de survenue de maladie de Crohn en lien avec consommation de protéines.

	Tertile1	Tertile 2	Tertile 3
Non ajusté	1 (-)	4.51 (1.28-15.83)	2.70 (0.69-10.52)
Ajustement sur alcool	1 (-)	4.47 (1.27-15.71)	2.72 (0.70-10.63)
Ajustement sur BMI	1 (-)	4.52 (1.28-15.88)	2.72 (0.70-10.70)
Ajustement sur THS	1 (-)	4.47 (1.27-15.71)	2.68 (0.69-10.44)
Ajustement sur activité physique	1 (-)	4.53 (1.29-15.90)	2.72 (0.69-10.47)
Ajustement sur tabac	1 (-)	4.52 (1.29-15.89)	2.72 (0.69-10.50)
Ajustement sur niveau d'étude	1 (-)	4.51 (1.28-15.83)	2.70 (0.69-10.54)

#analyse ajustée sur alcool, activité physique, BMI, tabac, niveau d'étude, traitement hormonal ménopause.

Tableau 21. Analyse multivariée: risque de survenue de Rectocolite hémorragique en lien avec consommation de protéines.

	Tertile1	Tertile 2	Tertile 3
Non ajusté	1 (-)	1.62 (0.65-4.02)	3.29 (1.34-8.04)
Ajustement sur alcool	1 (-)	1.56 (0.63-3.89)	3.06(1.25-7.50)
Ajustement sur BMI	1 (-)	1.63 (0.65-4.06)	3.36 (1.36-8.29)
Ajustement sur THS	1 (-)	1.61 (0.65-4.00)	3.27 (1.34-8.00)
Ajustement sur activité physique	1 (-)	1.61 (0.65-4.00)	3.29 (1.35-8.07)
Ajustement sur tabac	1 (-)	1.62 (0.65-4.03)	3.26 (1.33-7.98)
Ajustement sur niveau d'étude	1 (-)	1.62 (0.65-4.04)	3.31(1.35-8.10)

#analyse ajustée sur alcool, activité physique, BMI, tabac, niveau d'étude, traitement hormonal ménopause.

Tableau 22. Analyse relation entre exposition solaire et risque de maladie de Crohn ajusté sur apport alimentaire et autres variables de confusion.

	Tertile1	Tertile 2	Tertile 3
Modèle de base UV-hiver seul	1 (-)	0,56 (0,26-1,19)	0,33 (0,13-0,84)
Analyse multivariée (UV-hiver avec prot, vit d , ca et kcal en tendance)	1 (-)	0,55 (0,26 -1,16)	0,32 (0,13-0,81)
Modèle 1 + Alcool	1 (-)	0,54 (0,26-1,15)	0,32(0,12-0,80)
Modèle 1 + IMC	1 (-)	0,55 (0,26 -1,16)	0,32 (0,13-0,81)
Modèle 1 + THS	1 (-)	0,55 (0,26-1,16)	0,32 (0,13-0,81)
Modèle 1 + Tabac	1 (-)	0,55 (0,26-1,16)	0,32 (0,13-0,80)
Modèle 1 + activité physique	1 (-)	0,54 (0,25-1,14)	0,31 (0,12-0,79)
Modèle + Niveau d'étude	1 (-)	0,55 (0,26-1,17)	0,32(0,13-0,80)

#analyse ajustée sur alcool, activité physique, BMI, tabac, niveau d'étude, traitement hormonal ménopause.

Tableau 23. Type de cuisson des viandes et poissons en relation avec le risque de survenue de MICI au sein de la cohorte E3N 1993-2005.

	Rarement	Fréquemment	Mode non spécifié
Viande poêle			
Effectifs (cas, non cas)	(14 , 12372)	(45 , 36000)	(18 , 19125)
HR	1(Référence)	1,05	0,89
IC à 95%		0,58 - 1,92	0,44 - 1,80
Viande four			
Effectifs (cas, non cas)	(19 , 14579)	(39 , 32788)	(19 , 20130)
HR	1(Référence)	0,89	0,79
IC à 95%	-	0,52 - 1,54	0,42 - 1,50
Viandes cocotte			
Effectifs (cas, non cas)	(23 , 19516)	(35 , 27155)	(19 , 20826)
HR	1(Référence)	1,09	0,86
IC à 95%	-	0,64 - 1,84	0,46 - 1,57
Viandes grill			
Effectifs (cas, non cas)	(31 , 22532)	(32 , 25790)	(14 , 19175)
HR	1(Référence)	0,92	0,59
IC à 95%	-	0,56 - 1,51	0,31 - 1,11
Poissons court bouillon			
Effectifs (cas, non cas)	(17 , 16404)	(46 , 31505)	(14 , 19588)
HR	1(Référence)	1,45	0,76
IC à 95%		0,83 - 2,54	0,38 - 1,57
Poissons four			
Effectifs (cas, non cas)	(34 , 22170)	(30 , 23661)	(13 , 21666)
HR	1(Référence)	0,83	0,42
IC à 95%		0,51 - 1,36	0,22 - 0,81
Poissons grillé			
Effectifs (cas, non cas)	(31 , 28983)	(22 , 15390)	(24 , 23124)
HR	1(Référence)	1,35	1,04
IC à 95%		0,78 - 2,33	0,61 - 1,77
Poissons pané ou frit			
Effectifs (cas, non cas)	(41 , 33235)	(17 , 12316)	(19 , 21946)
HR	1(Référence)	1,08	0,75
IC à 95%		0,61 - 1,90	0,43 - 1,29
Poissons (microondes ...)			
Effectifs (cas, non cas)	(17 , 12660)	(30 , 23355)	(30 , 31482)
HR	1(Référence)	0,92	0,74
IC à 95%		0,51 - 1,67	0,41 - 1,34

ANNEXE 2 : LES FACTEURS D'ENVIRONNEMENT DANS LA MALADIE DE CROHN ET LA RECTOCOLITE HÉMORRAGIQUE. (TABAC ET APPENDICECTOMIE EXCLUS). GASTROENTÉROLOGIE CLINIQUE ET BIOLOGIE 2005.

© Masson, Paris, 2006.



Gastroenterol Clin Biol 2006;30:859-867

MISE
AU POINT

Les facteurs d'environnement dans la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique (tabac et appendicectomie exclus)

Prévost JANTCHOU (1), Elisabeth MONNET (2, 3), Franck CARBONNEL (2)

(1) Service de Pédiatrie, CHU Saint Jacques, Besançon ; (2) Service de Gastroentérologie, (3) Département de Santé Publique, CHU Jean Minjoz, Besançon.

RÉSUMÉ

L'augmentation rapide de l'incidence de la maladie de Crohn et de la recto-colite hémorragique dans les pays développés, l'absence de concordance totale chez les jumeaux monozygotes, les formes conjugales de maladie de Crohn sont autant d'éléments en faveur de l'intervention de facteurs d'environnement dans la genèse de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). La recherche de facteurs d'environnement dans les MICI est fondée sur des études épidémiologiques (géographiques ou cas-témoin), cliniques et expérimentales. Deux facteurs d'environnement ont un rôle établi : le tabac (protecteur dans la RCH, facteur de risque dans la MC) et l'appendicectomie (protecteur dans la RCH). De nombreux autres facteurs d'environnement font l'objet de recherches. Il s'agit d'agents infectieux, alimentaires, médicamenteux, du stress et de facteurs socio-économiques. Ils sont détaillés dans la présente mise au point. Parmi ces nouveaux facteurs, les mycobactéries atypiques, la contraception orale et l'antibiothérapie pourraient jouer un rôle dans la maladie de Crohn. A ce jour, trois hypothèses permettent d'intégrer les facteurs d'environnement aux données connues de la physiopathologie des MICI (perte de la symbiose entre la flore commensale et l'immunité muqueuse intestinale) : celle de l'hygiène, celle de l'infection et celle de la chaîne du froid. Beaucoup reste à faire pour identifier les facteurs d'environnement qui interviennent dans les MICI. Cette recherche est utile car elle peut mener à une prévention de la maladie chez les sujets prédisposés et à une amélioration de son cours évolutif chez les malades.

SUMMARY

Environmental risk factors in Crohn's disease and ulcerative colitis (excluding tobacco and appendectomy)

Prévost JANTCHOU, Elisabeth MONNET, Franck CARBONNEL
(Gastroenterol Clin Biol 2006;30:859-867)

A rapid increase in the incidence of Crohn's disease and ulcerative colitis in developed countries, the occurrence of Crohn's disease in spouses, and a lack of complete concordance in monozygotic twins are strong arguments for the role of environmental factors in inflammatory bowel disease (IBD). Research in the field of environmental factors in IBD is based upon epidemiological (geographical and case-control), clinical and experimental studies. The role of two environmental factors has clearly been established in IBD. Smoking is a risk factor for Crohn's disease and a protective factor for ulcerative colitis; appendectomy is a protective factor for ulcerative colitis. Many other environmental factors for IBD have been investigated, including infectious agents, diet, drugs, stress and social status. They are detailed in the present review. Among them, atypical Mycobacteria, oral contraceptives and antibiotics could play a role in Crohn's disease. To date, three hypotheses associate environmental factors with the pathophysiology of IBD (loss of tolerance of intestinal immune system towards commensal bacterial flora) : the hygiene, infection and cold chain hypotheses. Much work remains to be done to identify risk factors for IBD. Research identifying environmental factors that might cause a predisposition to IBD is useful. It may lead to disease prevention in subjects who are genetically predisposed and disease improvement in patients.

Introduction

Il est communément admis que les maladies inflammatoires cryptogénétiques de l'intestin (MICI) sont caractérisées par une perte de tolérance vis-à-vis des antigènes de la flore commensale et une activation anormale de l'immunité cellulaire de l'intestin. Les mécanismes de la perte de l'homéostasie de l'immunité muqueuse intestinale sont de mieux en mieux connus : libération excessive de cytokines pro-inflammatoires, modification de la composition de la flore intestinale, inactivation de cellules T régulatrices, perte de la fonction de barrière épithéliale, etc... [1].

La description des mécanismes des MICI ne se confond pas avec la recherche des causes et des facteurs déclenchant. Les MICI naissent de la rencontre de facteurs génétiques et de facteurs d'environnement. Beaucoup d'efforts ont été consacrés à la recherche de facteurs génétiques de prédisposition aux MICI ; ils ont été couronnés de succès. En 2001, le premier gène de prédisposition à la maladie de Crohn, baptisé NOD2 puis renommé CARD15, a été découvert [2, 3]. En mai 2004, deux nouveaux

gènes de prédisposition à la maladie de Crohn (MC) ont été décrits, le premier nommé OCTN, situé dans le locus IBD5, est un transporteur de cations organiques (notamment de carnitine) exprimé dans les lymphocytes T, les macrophages et les cellules épithéliales. Le second, nommé DLG5, joue un rôle dans le maintien de l'intégrité épithéliale [4, 5]. L'association entre OCTN, DLG5 et MICI doit encore être confirmée dans des cohortes indépendantes. La recherche de gènes de prédisposition aux MICI est loin d'être achevée et il est probable que dans les toutes prochaines années, d'autres associations seront décrites. Comme nous le verrons, les facteurs d'environnement interviennent massivement dans la survenue des MICI et leur rôle est attesté par de nombreuses observations, mais beaucoup reste à faire pour les identifier.

Quels sont les éléments en faveur de l'intervention de facteurs d'environnement dans la genèse des MICI ?

Evolution de l'incidence des MICI en fonction du temps et de l'espace

Plusieurs registres de MICI ont vu le jour dans le monde. Selon les régions du monde, l'incidence annuelle moyenne de la

Tirés à part : F. CARBONNEL, Service de Gastroentérologie, CHU Jean Minjoz, 25000 Besançon.
E-mail : fcarbonnel@chu-besancon.fr

MC varie entre 0,7 et 14,6 pour 100 000 habitants et celle de la RCH entre 1,5 et 24,5 pour 100 000 habitants [6, 7]. Tous les registres ont observé une augmentation de l'incidence de la MC et de la RCH. Elle a été constatée dès les années 40 dans les pays développés du Nord et dès les années 60 dans les pays du Sud [6-17]. L'augmentation de l'incidence des MICI peut être attribuée à leur meilleure reconnaissance par les médecins et les malades. Mais ce facteur n'explique pas, à lui seul, une telle augmentation. Dans la moitié des études, l'augmentation d'incidence des MICI est suivie d'une stabilisation tandis que dans l'autre moitié, elle se poursuit. L'allure des courbes d'incidence : une première vague d'augmentation suivie de stabilisation dans les pays du nord, et d'une seconde vague, de même allure dans les pays du sud, suggère l'intervention d'un facteur d'environnement lié au mode de vie occidental, qui s'est peu à peu généralisé à l'ensemble de la population et a rencontré en quelques décennies la totalité des sujets à risque. Ce modèle n'explique pas l'augmentation de l'incidence de la MC constatée en Suède [16] et dans le nord de la France au cours des années 1990 [14]. Ces deux résultats suggèrent au contraire que des facteurs d'environnement œuvrent encore à l'augmentation d'incidence des MICI dans les pays occidentaux. La consommation de tabac n'explique pas l'augmentation d'incidence de la MC dans les pays développés. En effet, le tabagisme diminue alors que l'incidence augmente chez les jeunes (18-25 ans) [13].

Un gradient nord-sud de l'incidence des MICI a été décrit en Europe, aux États-Unis et en Écosse [15, 18, 19]. En France, l'incidence de la MC est significativement plus élevée que la moyenne nationale dans les régions du nord-est (Nord-Pas de Calais, Picardie, Champagne-Ardenne et Lorraine) et plus faible dans les régions du sud et de l'ouest (Bretagne, Aquitaine, Midi-Pyrénées, Rhône-Alpes, Limousin et Bourgogne) [20]. Toutes les études réalisées constatent un gradient nord-sud pour la MC. Deux d'entre elles ne retrouvent pas ce gradient pour la RCH [19, 20] et une 3^e étude constate qu'il est moins marqué pour la RCH que pour la MC [15]. On n'a pas trouvé la raison de cette dissociation. Le gradient nord-sud constaté dans différentes régions du monde pour la MC peut s'expliquer par des facteurs génétiques ou d'environnement. On ne peut exclure que des individus génétiquement à risque de MC résident plus fréquemment dans le nord de l'Europe, de la France, de l'Écosse, et des USA. Mais l'intervention de facteurs d'environnement, notamment, une meilleure hygiène dans les régions du nord est souvent évoquée pour expliquer ce gradient. Le développement économique des régions du sud entraînant une uniformisation des conditions de vie devrait l'abolir alors qu'en réalité il demeure. Dans la MC, l'activation anormale de l'immunité cellulaire intestinale est sous la dépendance des lymphocytes TH1. Dans une autre maladie liée à un excès d'activité TH1, la sclérose en plaques, un gradient sud-nord a été mis en évidence. En Australie, les régions les plus australes comme la Tasmanie ont une incidence plus élevée que les régions septentrionales comme le Queensland [21]. *In vitro*, le rayonnement ultraviolet induit l'apparition de lymphocytes T régulateurs [22, 23]. Les auteurs ont émis l'hypothèse que l'ensoleillement protégeait de la sclérose en plaques, et l'ont confirmé par une étude cas-témoin [24]. Ce facteur n'a pas été étudié spécifiquement dans la MC et pourrait expliquer le gradient nord-sud.

Agrégation familiale dans les MICI

Chez les jumeaux monozygotes, le taux de concordance n'est que de 50 % dans la MC et de 19 % dans la RCH [25]. Dans les familles avec MC, les enfants atteints sont plus souvent consécutifs que ne le voudrait le hasard. Hugot et al., en étudiant 102 apparentés appartenant à des familles avec 3 enfants ou plus, ayant au moins deux enfants atteints, ont observé 58 malades consécutifs alors que le hasard en attendait 46

($P = 0,005$) [26]. Cette différence ne paraissait pas liée à un effet cohorte ni à une mutation *de novo* des cellules germinales survenant après la naissance du premier enfant mais plutôt à un partage de certains facteurs d'environnement au sein de la fratrie.

Les formes conjugales de MICI (un des deux conjoints n'est pas malade mais le devient dans les années qui suivent le mariage) sont significativement plus fréquentes que ne le voudrait le hasard. La MC chez le conjoint indemne au moment du mariage survient après une médiane de 8,5 ans (3,5-14) de vie commune [27]. Ces formes conjugales, suggèrent que le partage de facteurs d'environnement (agent infectieux transmissible ?) au sein du foyer familial favorise le développement de la MC.

Foyers de maladie de Crohn

Sept observations de MC ont été rapportées chez des adolescents non apparentés ayant fréquenté le collège de Mankato (Minnesota-USA) entre 1976 et 1991. Un tel agrégat dans une si petite communauté donne une prévalence de 2400 pour 100 000 habitants. Une enquête détaillée a mis en évidence que les malades avaient eu en commun le fait de se baigner dans un bassin pollué par des coliformes [28]. L'interprétation de ces données doit être prudente. En effet, la survenue d'un agrégat spatio-temporel peut être le simple fait du hasard, c'est-à-dire de la distribution aléatoire d'événements dont on ignore les déterminants : taille de la population source, durée et nombre d'observations.

Il y a donc un faisceau de résultats qui suggèrent que les facteurs d'environnement jouent un rôle important dans la survenue de la MC et de la RCH.

Quels sont les facteurs d'environnement incriminés dans la genèse des MICI ?

De nombreux travaux ont eu pour objectif de rechercher les facteurs d'environnement dans les MICI. Cette recherche est ardue, car les facteurs « apparus dans le mode de vie occidental depuis la seconde guerre mondiale » sont très nombreux et, sans doute, incomplètement répertoriés. Elle fait appel principalement à l'épidémiologie : études cas-témoin principalement, corrélations géographiques, plus rarement études de cohorte. Les facteurs d'environnement peuvent aussi être étudiés au laboratoire : recherche de microorganismes sur tissu par immunohistochimie ou amplification génique, étude de l'effet d'un facteur d'environnement sur la réponse immunitaire ou la muqueuse intestinale de malades ou d'animaux. Pour un même facteur, on dispose parfois de données épidémiologiques et biologiques voire expérimentales. Quelques études cas-témoin se sont attelées à la recherche systématique de facteurs d'environnement ; d'autres, plus nombreuses, ont été ciblées sur un seul facteur. Parmi les nombreux facteurs incriminés, deux seulement ont un rôle établi : le tabac (protecteur dans la RCH, facteur de risque dans la MC) et l'appendicectomie (protecteur dans de la RCH). Ils ont fait l'objet de revues générales récentes et ne seront pas abordés ici [29, 30].

Études cas-témoins systématiques

La première étude de ce type a porté sur 14 centres répartis dans 9 pays (Amérique de Nord, Europe du nord et Méditerranée) [31]. Cent quatre vingt dix sept malades atteints de RCH et 302 malades atteints de MC ont été comparés à deux témoins par malade, appariés pour l'âge et le sexe, avec ou sans maladie gastro-intestinale. Les antécédents familiaux augmentaient le

risque de RCH et de MC. Un eczéma chez le malade ou ses parents, des infections respiratoires, la prescription d'antibiotiques et le fait d'être le dernier dans la fratrie, augmentaient le risque de MC. En revanche, la prise de vitamines et de minéraux chez la mère pendant la grossesse, la vaccination contre la varicelle et l'appartenance à un niveau socio-économique élevé diminuaient ce risque. Les infections respiratoires et la possession d'un rongeur à domicile augmentaient le risque de RCH. Par contre, l'appendicectomie, la prise de vitamines et de minéraux par la mère pendant la grossesse ainsi que la varicelle protégeaient de la RCH. Cette étude, a été la première à montrer le rôle protecteur de l'appendicectomie dans la RCH. L'association avec l'allergie, mise en évidence dans cette étude, sera souvent reproduite dans les études ultérieures.

L'étude de Feeney et al. a été réalisée dans une population d'adultes et visait à identifier les facteurs présents dans l'enfance à l'origine de la survenue d'une MICI [32]. Un total de 139 malades atteints de RCH et 137 avec MC ont été inclus. Les auteurs confirmaient le rôle protecteur de l'appendicectomie dans la RCH et ne retrouvaient aucun autre facteur de risque pour cette maladie. Dans la MC, la sérologie *Helicobacter pylori* était moins souvent positive tandis que l'eczéma et la fréquentation d'une piscine étaient plus fréquents chez les malades comparativement aux témoins [32]. L'absence d'infection à *Helicobacter pylori* est un marqueur d'une meilleure hygiène alors que la fréquentation des piscines suggère la transmission d'un agent infectieux (ou toxique) par l'eau.

Une troisième étude systématique des facteurs d'environnement a été récemment publiée par le registre Epimad [33]. Deux cent quatre vingt deux enfants âgés de moins de 18 ans (222 MC et 60 RCH) ont été comparés à autant de témoins appariés. L'histoire familiale de MICI, l'allaitement maternel, la vaccination par le BCG, l'eczéma, augmentaient le risque de MC. En revanche, la consommation régulière d'eau du robinet diminuait ce risque. Une explication possible est que l'eau du robinet pourrait contenir des microorganismes, notamment des mycobactéries non pathogènes qui joueraient un rôle immunorégulateur. Une histoire familiale de MICI, une menace d'accouchement prématuré, et le partage de la chambre à coucher avec un autre membre de la famille (suggérant la responsabilité d'un agent infectieux transmissible) conféraient un risque accru de RCH alors que l'appendicectomie protégeait.

Une 4^e étude systématique des facteurs d'environnement a été publiée récemment [34]. Elle a été conduite auprès de 21 familles du nord de la Belgique ayant au moins trois apparentés au premier degré atteints de MC. Ces 21 familles ont été comparées à dix familles témoins par un questionnaire de 176 items portant sur l'enfance et l'adolescence pour les enfants et sur les dix ans précédant la survenue de la maladie pour les adultes. Cette étude a mis en évidence plusieurs facteurs de risque de MC chez les malades et/ou leur famille. Les facteurs favorisant la MC étaient : l'existence d'une périodontite, la consommation de porc cru, de laitages non pasteurisés, d'eau de puit et le tabac. A l'inverse, des antécédents d'oreillons, la consommation d'avoine, de son, de seigle, d'eau du robinet et un contact domestique avec un oiseau, un chien ou un chat étaient protecteurs vis-à-vis de la MC. L'augmentation du risque de MC conférée par la consommation de porc cru, de laitages non pasteurisés et d'eau de puit est en faveur d'un agent infectieux transmissible.

Études ciblées sur des facteurs spécifiques

Agents infectieux

Plusieurs agents infectieux ont été incriminés dans la genèse des MICI. Le virus de la rougeole, le CMV, *Listeria monocytogenes*, *Chlamydia trachomatis*, *Escherichia Coli*, *Helicobacter pylori*,

Mycobacterium paratuberculosis, *Saccharomyces cerevisiae* et d'autres micro organismes ont été proposés comme agents candidats.

VIROS DE LA ROUGEOLE

Le virus de la rougeole a été mis en évidence en immunohistochimie et en hybridation in situ dans les cellules endothéliales de l'intestin de malades atteints de MC [35]. Ces résultats initiaux, n'ont par la suite, pas été confirmés [36-37]. Parallèlement, plusieurs travaux épidémiologiques ont étudié les liens entre, d'une part la survenue d'une MICI et, d'autre part, la vaccination antirougeole, une infection par le virus de la rougeole pendant la grossesse ou la petite enfance.

VACCIN ANTIROUGEOLE

Une étude épidémiologique portant sur une cohorte historique de 3545 malades vaccinés en 1964 contre la rougeole a retrouvé un odds ratio (OR) 3 fois plus élevé de développer la MC (IC à 95 % [1,45-6,23]) et de 2,53 (IC à 95 % [1,15-5,58]) de développer la RCH dans le groupe vacciné comparativement à un groupe témoin de 11407 sujets non vaccinés [38]. Une autre étude, émanant du même groupe concernant 7616 sujets nés en 1970 n'a pas retrouvé d'association entre la vaccination par le virus de la rougeole avant l'âge de 5 ans et la survenue de la MC (OR = 0,67 ; IC [0,27-1,63]) ni de la RCH (OR = 0,57 ; IC [0,20-1,61]). En revanche, une tendance à développer la MC a été observée chez les sujets vaccinés après l'âge de 2 ans ; (OR = 1,05 ; IC [1-1,10]) [39]. Deux autres études cas-témoins portant sur des effectifs d'environ 150 malades appariés à 2 témoins ou plus par malade, ne retrouvent pas non plus de lien entre la vaccination contre la rougeole et les MICI [40, 41]. Une étude de cohorte hospitalière (1959 MC et 2018 RCH) portant sur une durée de 20 ans ne retrouve pas non plus d'association entre la vaccination, la MC et la RCH [42]. Ces données ne sont pas en faveur d'un lien entre le vaccin contre la rougeole et la survenue d'une MICI.

ROUGEOLE PENDANT LA GROSSESSE ET MICI CHEZ L'ENFANT

Une étude s'est intéressée à la survenue d'une MICI chez les enfants nés de mère infectée par le virus de la rougeole pendant la grossesse. En analysant les données de 25000 accouchements en 10 ans, les auteurs retrouvent quatre cas de rougeole survenus pendant la grossesse ; trois de ces enfants ont développé une MC [43]. Ils suggèrent ainsi que cette exposition virale représente un facteur de risque majeur de survenue de MC. Une étude ultérieure n'a pas reproduit une telle association [44].

INFECTION PRÉCOCE PAR LE VIRUS DE LA ROUGEOLE

Deux études de population ont montré un risque accru de MICI chez les enfants ayant eu la rougeole avant l'âge de 5 ans [45, 46]. Ces résultats n'ont pas été confirmés par une étude sérologique [47]. De plus, l'incidence des MICI augmente alors que celle de la rougeole diminue sous l'effet de la vaccination.

Au total la responsabilité de la rougeole dans la genèse des MICI peut être raisonnablement écartée.

LISTERIA MONOCYTOGENES

Une étude immunohistochimique de 16 pièces de résection intestinale pour MC a montré la présence de *Listeria monocytogenes* dans les macrophages et les cellules géantes 12 fois sur 16. La présence d'antigène de *E. Coli* et de streptocoque était également détectée dans 57 et 44 % des pièces de résection respectivement [48]. D'autres études de *Listeria monocytogenes*

dans le tissu intestinal, par amplification génique ou par immunohistochimie n'ont pas retrouvé de différence entre les MC et les témoins [49-51].

MYCOBACTÉRIES ATYPIQUES

L'hypothèse selon laquelle *Mycobacterium paratuberculosis* pourrait être à l'origine de la MC est le sujet d'une vieille controverse. Selon ses partisans, les postulats de Koch sont réunis pour incriminer cette bactérie dans la survenue de la MC [52]. Pour leurs adversaires, *Mycobacterium paratuberculosis* viendrait se fixer sur les zones ulcérées de l'intestin mais n'aurait pas de rôle spécifique dans la MC. *Mycobacterium paratuberculosis* est présent dans le lait non pasteurisé et l'eau potable [53]. L'identification de *Mycobacterium paratuberculosis* dans les tissus requiert la culture ou la détection de DNA ou de RNA. La recherche de *Mycobacterium paratuberculosis* dans les tissus intestinaux de malades ayant la MC et les témoins a donné des résultats divergents. Cependant, l'hypothèse des mycobactéries a été relancée par 3 études récentes. Dans la première, les auteurs ont mis en évidence du DNA de *Mycobacterium paratuberculosis* dans les granulomes tuberculoïdes micro disséqués de tissus de sujets atteints de MC [54]. Le même groupe a retrouvé par la même technique, de l'ADN d'*E. Coli* au sein de ces granulomes, ce qui remet en question la spécificité de l'association entre MC tuberculoïde et *Mycobacterium paratuberculosis* [55]. Une autre étude a mis en évidence, par amplification génique, la présence de *Mycobacterium paratuberculosis* dans le sang de 40 % de malades atteints de MC ou de RCH et de 20 % de témoins [56]. De plus, le germe était retrouvé en culture après 12 semaines d'incubation, exclusivement chez les malades atteints de MICI. Enfin, un troisième groupe a étudié la présence d'un fragment d'ADN spécifique de *Mycobacterium paratuberculosis* (IS900) dans le tissu intestinal de malades atteints de MC, de RCH et indemnes de MICI [57]. Les études antérieures d'IS 900 dans la MC avaient donné des résultats contradictoires. Cette fois, les auteurs ont employé une méthode optimisée d'extraction du DNA chez un nombre important de malades (100 malades atteints de MC, 100 avec RCH et 100 témoins). Ils observent que la présence d'IS 900 est plus élevée dans la MC que dans la RCH ou chez les témoins (52 % vs. 2 % et 5 % respectivement), aussi bien dans l'intestin grêle que dans le côlon. Plusieurs éléments cliniques ne sont pas en faveur du rôle de *Mycobacterium paratuberculosis* dans la MC. Tout d'abord, les tentatives de traitement par antibiotiques dirigés contre *Mycobacterium paratuberculosis* ont, jusqu'à présent, donné des résultats négatifs dans la MC, mais les résultats d'une grande étude contrôlée australienne sont attendus prochainement. De plus, si la MC était due à *Mycobacterium paratuberculosis*, on devrait observer un grand nombre d'infections sévères déclenchées par l'Infliximab, ce qui n'est pas le cas.

A ce stade il n'y a pas de preuve qu'un facteur infectieux spécifique intervienne dans la genèse des MICI. Le rôle de *Mycobacterium paratuberculosis* est loin d'être écarté. La découverte de NOD2 est à l'origine d'un regain de vigueur de la piste des bactéries intracellulaires. Il semble, en effet, que les mutations de NOD2 observées dans la maladie de Crohn entraînent un déficit de l'immunité innée [58]. Ce défaut de fonction macrophagique pourrait empêcher la clairance de bactéries intracellulaires qui persisteraient dans la muqueuse intestinale et provoqueraient une stimulation chronique de l'immunité cellulaire. L'association entre la détection d'une bactérie (*Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium paratuberculosis*,...) ne serait, dans cette hypothèse, que le témoin d'une faillite de l'immunité innée.

Facteurs alimentaires

De nombreuses études se sont penchées sur le rôle des facteurs alimentaires dans la genèse des MICI.

CONSOMMATION DE SUCRE

La plupart des études cas-témoins ont trouvé une association significative entre la consommation de sucres rapides et la MC [59]. Ce résultat peut être interprété de 2 manières différentes. La première est que la consommation de sucres rapides favorise la MC, la seconde est que les malades atteints de MC consomment davantage de sucres d'absorption rapide pour soulager leurs symptômes. Un facteur confondant est que la consommation de sucres rapides est associée à celle de tabac [60]. Au total, une revue de la littérature datant de 1998 a conclu que les problèmes méthodologiques empêchaient toute conclusion quant au rôle des sucres rapides dans les MICI [59].

AUTRES ALIMENTS

D'autres facteurs alimentaires : protéines, graisse, margarine, fruits et légumes, produits laitiers, café, coca cola, « fast food » ont été étudiés dans des études cas-témoins ou par des séries de cohorte rétrospective [61-69]. Comme pour les sucres d'absorption rapides, les problèmes méthodologiques empêchent de tirer une conclusion [69].

LES MICROPARTICULES ALIMENTAIRES

L'alimentation des pays développés contient une quantité croissante de microparticules comme l'oxyde de Titane et le silicate d'aluminium. Selon une hypothèse récente, les microparticules se comportent comme des transporteurs d'antigène de la lumière vers la muqueuse intestinale. *In vitro*, les complexes formés par les antigènes et les microparticules sont de puissants stimuli des lymphocytes T et des macrophages [70]. Une étude n'a pas montré de différence entre les malades atteints de MC et les témoins quant à la quantité de microparticules alimentaires dans le régime alimentaire [71]. Mais le rôle des microparticules est très difficile à étudier par un questionnaire. Un essai portant sur 18 malades corticodépendants tirés au sort pour recevoir un régime normal ou appauvri en microparticules a conclu à l'efficacité du régime appauvri en microparticules [72]. Un essai contrôlé portant sur un nombre suffisant de malades est nécessaire pour clarifier le rôle des microparticules dans la MC.

MODALITÉS DE L'ALLAITEMENT MATERNEL

Plusieurs études ont mis en évidence que l'allaitement artificiel exclusif (par opposition à l'allaitement maternel, exclusif ou non) favorisait les MICI [73-78] tandis que d'autres n'ont pas montré d'association [24, 73-74]. Ces données ont fait l'objet d'une méta analyse [79]. Les données de 17 études réalisées chez 2577 malades et 3551 témoins pour la RCH ainsi que 3190 malades et 4026 témoins pour la MC ont été rassemblées. Malgré le petit nombre d'études de haute qualité méthodologique (4 concernant la RCH et 4 concernant la MC), les auteurs retrouvaient un OR en faveur d'un rôle protecteur de l'allaitement maternel sur la survenue des MICI : OR = 0,56 [0,38-0,81] pour la RCH et 0,45 [0,26-0,79] pour la MC. Cet effet favorable demeure en analysant la totalité des études. Cette méta analyse n'a toutefois pas inclus l'étude du registre EPIMAD qui est en faveur d'un rôle délétère de l'allaitement maternel pour la MC : (OR = 2,1 [1,3-3,4], P = 0,003) [33]. Comme nous l'avons vu, l'allergie est plus fréquente chez les malades atteints de MC. Les résultats des travaux qui ont étudié les liens entre allaitement maternel et allergie sont superposables à ceux effectués dans la MC. Il était communément admis que l'allaitement protégeait de l'allergie, mais une étude longitudinale récente a montré qu'à long terme, l'allaitement maternel augmentait le risque d'allergie [80]. Cet effet délétère pourrait être lié à la présence de toxiques dans le lait maternel ou à un retard à l'acquisition d'infections pendant la petite enfance lié à l'immunité conférée par l'allaitement.

ment maternel. Ce retard conduirait à un défaut d'immunorégulation et, conséquemment, à la perte de l'homéostasie de l'immunité muqueuse intestinale.

Au total, les biais méthodologiques et les résultats contradictoires ne permettent pas de porter de conclusion sur le rôle des facteurs alimentaires dans les MICI.

Contraception orale (CO)

On s'est intéressé au rôle de la CO dans la genèse des MICI car c'est un facteur introduit récemment dans le mode de vie occidental. De plus, si la maladie est plus fréquente avant la puberté chez le garçon, elle est plus fréquente à l'âge adulte chez les femmes. Le mécanisme suspecté est la formation de micro thrombi et d'infarctus focaux au niveau de la microvascularisation intestinale [81]. Plusieurs études ont retrouvé une association entre l'utilisation des CO et la MC mais pas la RCH [82-84]. Une méta analyse réalisée en 1995 retrouve ainsi un Odds Ratio de 1,44 : IC à 95 % [1,12-1,16] pour la MC et de 1,29 : IC à 95 % [0,94-1,77] pour la RCH [85]. L'évolution de la maladie ne semble pas modifiée par la poursuite ou non des contraceptifs oraux [86].

Vaccinations

BCG

La vaccination par le BCG entraîne une stimulation TH1 dont l'activité excessive est un des mécanismes essentiels de la MC. L'étude du registre Epimad retrouve un OR de développer une maladie de Crohn chez les sujets exposés au vaccin de 3,6 [IC à 95 % : 1,1-11,9] avec un effet dose [33]. Cette étude est la première à montrer un tel effet, dont la reproductibilité doit être testée dans les études à venir.

VACCINS COMBINÉS ROUGEOLE OREILLONS RUBÉOLE (ROR)

Une vaste étude épidémiologique américaine effectuée à partir des statistiques des « Health Maintenance Organizations » a montré que la vaccination combinée ROR n'augmentait pas le risque de MICI. Au contraire, la vaccination avant l'âge de 18 mois diminuait ce risque [41].

Modification de la composition de la flore intestinale

ESCHERICHIA COLI ADHÉRENT INVASIF

La présence d'*E. Coli* adhérent invasif a été constatée dans la muqueuse iléale de 20-30 % de malades (vs. 5 % de témoins) atteints de MC chronique (pièces de résection intestinale) ou sur les biopsies prélevées dans l'iléon terminal sain ou malade de malades ayant été opérés de résection intestinale [87, 88]. Ces bactéries ne possèdent pas les facteurs de virulence retrouvés dans les souches responsables de diarrhées aiguës infectieuses. Les *E. Coli* adhérents invasifs sont phagocytés par les macrophages et persistent à l'intérieur de leur cytoplasme au lieu d'y être détruit. On ignore leur écologie et leur mode de transmission. La présence d'*E. Coli* adhérent invasif au sein de la muqueuse intestinale des malades atteints de MC pourrait être un marqueur d'une perméabilité intestinale anormalement élevée et/ou d'une défaillance de la fonction macrophagique qui laisserait persister ces bactéries au sein de la muqueuse intestinale.

L'ANTIBIOTHÉRAPIE

Son rôle a été récemment étudié au sein d'une cohorte prospective de malades (regroupant 5 % de la population du Royaume-Uni) suivis par des médecins généralistes britanniques

[89]. A chaque visite, les omnipraticiens ont noté leurs observations, les diagnostics retenus et les traitements prescrits. Au total, 587 malades atteints de MC ont été identifiés au sein de cette base de donnée et comparés à 1460 témoins appariés. Il s'avère que les sujets atteints de MC étaient plus souvent fumeurs (28 % des cas vs. 20 % des témoins) et avaient, plus souvent que les témoins, reçus des antibiotiques dans les 2 à 5 ans qui ont précédé le diagnostic de MC (71 % des cas vs. 58 % des témoins). Une telle association n'est pas forcément causale et l'on peut penser que les antibiotiques ont été prescrits pour des symptômes interprétés à tort comme des infections intestinales alors qu'il s'agissait de signes révélateurs de MC. Si l'on restreint l'analyse aux malades qui n'avaient pas de symptômes gastro-intestinaux ni de médicaments à visée gastro-intestinale dans les trois à cinq ans avant le diagnostic, l'excès de risque conféré par l'antibiothérapie se maintient au même niveau. Une autre explication serait que les malades atteints de MC sont de gros demandeurs de soins et obtiennent plus souvent que les témoins une prescription d'antibiotiques pour une infection banale. Cette hypothèse ne peut être écartée, mais elle n'est pas plus probable qu'une relation de causalité entre l'antibiothérapie et le déclenchement de MICI. Tout récemment, le rôle délétère de l'antibiothérapie a été mis en évidence dans un modèle de colite inflammatoire au sodium dextran sulphate chez la souris invalidée pour le gène *Myd88* (protéine activée par la reconnaissance de TLR4 avec son ligand) [90]. TLR4 est une protéine localisée à la surface des macrophages et des monocytes ; elle se lie à des glycoprotéines bactériennes comme le lipopolysaccharide et transmet un signal d'activation à NFκB. Dans ce modèle, les lésions coliques étaient plus sévères chez les souris traitées par les antibiotiques. Cette étude dévoile une fonction jusqu'alors méconnue de la flore intestinale : le maintien de l'intégrité épithéliale. Cette fonction, qui est abolie par l'antibiothérapie, est sous la dépendance de la liaison entre les bactéries et le récepteur TLR4.

INFECTIONS PÉRINATALES

Une étude a montré un risque plus élevé de MICI chez les malades ayant eu une gastroentérite aiguë dans les jours qui ont suivi la naissance [91]. D'autre part l'équipe d'Ekbom a montré que les MICI étaient plus fréquentes chez les enfants qui ont présenté une infection périnatale toutes localisations confondues [92] ; dans cette étude cas-témoins incluant 257 cas de MC, autant de RCH et 514 témoins appariés pour l'âge, le sexe et l'âge maternel ou la parité, ils retrouvaient un OR de 3,8 [IC : 2,6 à 5,8] de présenter une maladie de Crohn chez les malades ayant présenté un événement périnatal infectieux consigné dans le dossier médical. Ce risque était plus élevé pour les infections virales que pour les infections bactériennes.

Stress

Le rôle du stress est souvent évoqué par les malades et fait partie des idées reçues sur les MICI. Le stress joue un rôle important dans certains modèles animaux de colites inflammatoires [93]. En 2000, une revue des études cliniques effectuées chez l'homme montrait que les biais méthodologiques ne permettaient pas de tirer de conclusion quant aux liens entre stress et déclenchement de MICI [94]. Deux études récentes se sont penchées sur cette question. Dans la première, la prévalence des MICI a été évaluée chez 21 062 parents ayant perdu un enfant âgé de moins de 18 ans et 293 745 parents appariés [95]. La prévalence des MICI n'était pas différente dans les deux groupes (Odds Ratio = 0.97 [IC 95 % [0,76-1,34]] [88]. A l'inverse, une étude cas témoin a retrouvé un excès d'événements de vie dans les 6 mois précédant les symptômes de la MC [96].

Les données actuellement disponibles sont donc contradictoires. Elles le sont aussi en ce qui concerne le rôle du stress dans le

déclenchement des poussées de MICI [94]. Une des difficultés inhérente à cette recherche est que les mêmes événements de vie (deuil, séparation, maladie d'un proche...) ne sont pas vécus de la même façon selon les individus. L'entourage familial et amical, les capacités d'adaptation modulent le vécu d'un événement de vie. Ces facteurs devraient être intégrés dans les études à venir sur l'impact des événements de vie dans la survenue des MICI ou de leurs poussées.

Facteurs socio-économiques et niveau d'exercice physique

Les études concernant le statut socioprofessionnel des malades atteints de MICI ont donné des résultats assez variés. La majorité des auteurs a retrouvé un excès de représentation des couches socio-économiques favorisées, et une diminution de fréquence chez les agriculteurs [19, 97]. Par exemple, Sonnenberg et al. ont montré par une étude des statistiques de sécurité sociale allemande, une fréquence de MICI plus élevée chez les cols blancs comparativement aux cols bleus [98]. Une étude prospective danoise a retrouvé que les professions sédentaires étaient exposées à un excès de risque de MICI [99]. Ces résultats n'excluent pas une interaction entre l'activité physique et d'autres paramètres tels le niveau socio-économique et l'environnement domestique.

Synthèse : hypothèses physiopathologiques

Hypothèse « meilleure hygiène »

L'hypothèse meilleure hygiène est souvent mise en avant pour expliquer le gradient nord-sud de MC et l'augmentation de fréquence des MICI depuis la dernière guerre. Elle repose sur les résultats suivants :

— deux études cas-témoins ont décelé un équipement en eau chaude plus fréquent chez les malades atteints de MC comparativement aux témoins [100, 101]. Dans l'une d'elle, un équipement en salles de bains séparées était plus fréquent chez les malades atteints de MC comparativement aux témoins. En revanche, aucune différence entre malades atteints de RCH et témoins n'a été mise en évidence. A présent, tous les foyers des pays développés, ou presque, sont équipés de l'eau chaude, si bien que ce facteur ne peut plus être significatif dans les études cas-témoins, mais cela n'exclut pas qu'il a pu favoriser l'augmentation d'incidence de la MC dans les décennies précédentes.

— Trois études ont trouvé une fréquence plus faible d'IgG anti-*Helicobacter pylori* chez les malades atteints de MC comparativement aux témoins [32, 102-103] mais une étude n'a pas reproduit ce résultat [101].

— L'allergie est plus fréquente chez les malades atteints de MC que chez les témoins, et l'on peut inférer que les 2 maladies, dont la fréquence a augmenté parallèlement, ont en commun des facteurs d'environnement. Or, il a été montré que le contact avec les étables et la consommation de lait cru avant l'âge de 1 an protégeaient de la survenue d'allergie [104] tandis que le niveau d'endotoxine dans l'environnement est inversement corrélé à la survenue d'allergie chez l'enfant [105].

— Les MICI sont rares et les helminthiases fréquentes dans les pays en voie de développement [106]. Une étude ouverte suggère que les œufs d'helminthes pourraient avoir un effet thérapeutique dans la MC [107]. Une étude contrôlée de phase 2 suggère que les œufs d'helminthes sont efficaces dans la RCH [108].

L'hypothèse « meilleure hygiène » a été récemment formalisée par le groupe de Rook [109]. Selon ces auteurs, l'hygiène a fait baisser la mortalité et la morbidité infectieuse mais a éloigné l'homme de micro-organismes qui jouaient un rôle régulateur

dans le fonctionnement du système immunitaire (« old friends ») : *Lactobacillus* (présents en abondance dans les produits laitiers fermentés), mycobactéries saprophytes de l'environnement (qui vivent dans l'eau non traitée mais sont absentes de l'eau traitée par chloration), helminthes. La contrepartie de la diminution de la mortalité infectieuse serait l'augmentation des maladies allergiques et des MICI.

La RCH est, plus encore que la MC, une maladie liée à l'environnement, comme le montrent les études de concordance chez les jumeaux monozygotes. L'hypothèse « meilleure hygiène » s'applique moins bien à la RCH qu'à la MC, en effet :

— Le gradient nord-sud est moins marqué pour la RCH que pour la MC [19, 20].

— A notre connaissance, aucune étude cas-témoins n'a apporté d'éléments en faveur d'une meilleure hygiène dans la RCH,

— les enfants atteints de RCH partagent plus souvent leur lit avec les autres membres de la famille que les témoins [33]. Il faut noter cependant que ce résultat n'a pas été retrouvé dans une autre étude [101].

Hypothèse infectieuse

C'est une théorie ancienne, souvent évoquée, jamais confirmée. Les arguments actuels en sa faveur sont les suivants :

— les formes conjugales de MICI sont plus fréquentes que ne le voudrait le hasard ;

— ni l'étude de Gilat ni celle du registre EPIMAD n'apportent d'élément en faveur de l'hypothèse « meilleure hygiène » dans la MC et aucune étude dans la RCH [31, 33]. L'étude d'EPIMAD montre au contraire une augmentation du risque de RCH chez les enfants qui ont partagé leur chambre à coucher avec leurs frères et sœurs.

— plusieurs études cas-témoins ont mis en évidence une augmentation de la fréquence des infections respiratoires, intestinales ou périmatales chez les malades comparativement aux témoins [91, 92] ;

— une étude a mis en évidence un lien avec la consommation de porc cru, de laitages non pasteurisés et d'eau de puit [34] ;

— l'hypothèse des mycobactéries a été récemment relancée.

Hypothèse de la chaîne du froid

L'hypothèse de la chaîne du froid réunit la théorie de la « meilleure hygiène » et la piste infectieuse [110]. Nous en proposons le résumé suivant : « La mutation de *CARD15* serait apparue au moment de l'épidémie de peste qui a sévi en Europe au XIV^e siècle. Elle conférerait une résistance accrue à cette maladie. L'avènement du réfrigérateur au début des années 1940 aux Etats-Unis et en Scandinavie, coïncide avec l'augmentation de l'incidence de la maladie de Crohn. Certaines bactéries dites psychotrophes (*Listeria*, *Yersinia*, ...) survivent dans les réfrigérateurs. L'une d'elles, *Yersinia* a une protéine appelée Yop qui, en temps normal, inhiberait l'activation de NFκB via une interaction avec *CARD 15* (phénotype sauvage). Or, il a été montré que les malades mutés pour *CARD15* avaient une perte de fonction de cette molécule. En d'autres termes, chez les individus mutés pour *CARD15*, Yop entraînerait une perte d'inhibition, c'est-à-dire une activation de NFκB. »

Conclusion

Les MICI naissent d'une rencontre entre des gènes de prédisposition et des facteurs d'environnement. L'ensemble des résultats présentés suggère que l'augmentation d'incidence des MICI est



liée à une modification introduite dans l'environnement au cours des décennies écoulées depuis la 2^e guerre mondiale. Il pourrait s'agir d'une modification de la composition de la flore fécale (provoqué par une antibiothérapie) ou de l'implantation d'un agent faiblement pathogène véhiculé par un vecteur (eau de puits ou de source, lait cru, réfrigérateur...) qui provoquerait la MC chez les individus génétiquement à risque. Ce schéma à trois partenaires (terrain génétique, bactérie faiblement pathogène, vecteur d'environnement) n'exclut pas le rôle de cofacteurs comme le tabac (qui diminue l'activité bactéricide des macrophages vis-à-vis des bactéries intracellulaires) ou la contraception orale. Beaucoup de facteurs ont été étudiés et il n'est pas difficile de trouver des études positives, presque pour chacun d'eux. Néanmoins les résultats d'une étude sont souvent démentis par une autre, si bien qu'à ce jour, seuls le tabac et l'appendicectomie ont un rôle établi, retrouvé de façon concordante et reproductible. La recherche de facteurs de prédisposition liés à l'environnement est difficile. Elle est utile car elle peut mener à une prévention de la maladie chez les sujets prédisposés et à une amélioration de son cours évolutif chez les malades [111].

RÉFÉRENCES

1. Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 2003;3:521-33.
2. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:599-603.
3. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:603-6.
4. Peltekova VD, Wintle RF, Rubin LA, Amos CI, Huang Q, Gu X, et al. Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. *Nat Genet* 2004;36:471-5.
5. Stoll M, Corneliusen B, Costello CM, Waetzig GH, Mellgard B, Koch WA, et al. Genetic variation in DLG5 is associated with inflammatory bowel disease. *Nat Genet* 2004;36:476-80.
6. Farokhyar F, Swarbrick ET, Irvine EJ. A critical review of epidemiological studies in inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2001;36:2-15.
7. Binder V. Epidemiology of IBD during the twentieth century: an integrated view. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004;18:463-79.
8. Evans JG, Acheson ED. An epidemiological study of ulcerative colitis and regional enteritis in the Oxford area. *Gut* 1965;6:311-24.
9. Binder V, Both H, Hansen PK, Hendriksen C, Kreiner S, Torp-Pedersen K. Incidence and prevalence of ulcerative colitis and Crohn's disease in the County of Copenhagen, 1962 to 1978. *Gastroenterology* 1982;83:563-8.
10. Rose JD, Roberts GM, Williams G, Mayberry JF, Rhodes J. Cardiff Crohn's disease jubilee: the incidence over 50 years. *Gut* 1988;29:346-51.
11. Ekblom A, Helmick C, Zack M, Adami HO. The epidemiology of inflammatory bowel disease: a large, population-based study in Sweden. *Gastroenterology* 1991;100:350-8.
12. Munkholm P, Langholz E, Nielsen OH, Kreiner S, Binder V. Incidence and prevalence of Crohn's disease in the county of Copenhagen, 1962-87: a sixfold increase in incidence. *Scand J Gastroenterol* 1992;27:609-14.
13. Gower-Rousseau C, Salomez JL, Dupas JL, Marti R, Nuttens MC, Votte A, et al. Incidence of inflammatory bowel disease in northern France (1988-1990). *Gut* 1994;35:1433-8.
14. Molinier F, Gower-Rousseau C, Yzet T, Merle V, Grandbastien B, Marti R, et al. Opposite evolution in incidence of Crohn's disease and ulcerative colitis in Northern France (1988-1999). *Gut* 2004;53:843-8.
15. Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R, Fear N, Price A, Carpenter L, et al. Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut* 1996;39:690-7.
16. Lapidus A, Bemell O, Hellers G, Persson PG, Lofberg R. Incidence of Crohn's disease in Stockholm County 1955-1989. *Gut* 1997;41:480-6.
17. Yapp TR, Stenson R, Thomas GA, Lawrie BW, Williams GT, Hawthorne AB. Crohn's disease incidence in Cardiff from 1930: an update for 1991-1995. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000;12:907-11.
18. Sonnenberg A, McCarty DJ, Jacobsen SJ. Geographic variation of inflammatory bowel disease within the United States. *Gastroenterology* 1991;100:143-9.
19. Armitage EL, Aldhous MC, Anderson N, Drummond HE, Riemersma RA, Ghosh S, et al. Incidence of juvenile-onset Crohn's disease in Scotland: association with northern latitude and affluence. *Gastroenterology* 2004;127:1051-7.
20. Nerich V, Mourret E, Etienne A, Louafi S, Raurce C, Ricau S et al. Geographical variations of inflammatory bowel disease in France: a study based on national Health insurance data. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:218-26.
21. van der Mei IA, Ponsonby AL, Blizzard L, Dwyer T. Regional variation in multiple sclerosis prevalence in Australia and its association with ambient ultraviolet radiation. *Neuroepidemiology* 2001;20:168-74.
22. Aubin F. Mechanisms involved in ultraviolet light-induced immunosuppression. *Eur J Dermatol* 2003;13:515-23.
23. Schwarz T. Regulatory T cells induced by ultraviolet radiation. *Int Arch Allergy Immunol* 2005;137:187-93.
24. van der Mei IA, Ponsonby AL, Dwyer T, Blizzard L, Simmons R, Taylor BV, et al. Past exposure to sun, skin phenotype, and risk of multiple sclerosis: case-control study. *BMJ* 2003;327:316.
25. Halfvarson J, Bodin L, Tysk C, Lindberg E, Jamerot G. Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: a long-term follow-up of concordance and clinical characteristics. *Gastroenterology* 2003;124:1767-73.
26. Hugot JP, Cezard JP, Colombel JF, Belaiche J, Almer S, Tysk C, et al. Clustering of Crohn's disease within affected sibships. *Eur J Hum Genet* 2003;11:179-84.
27. Laharie D, Debeugny S, Peeters M, Van Gossum A, Gower-Rousseau C, Belaiche J, et al. Inflammatory bowel disease in spouses and their offspring. *Gastroenterology* 2001;120:816-9.
28. Van Kruiningen HJ, Freda BJ. A clustering of Crohn's disease in Mankato, Minnesota. *Inflamm Bowel Dis* 2001;7:27-33.
29. Cosnes J. Tobacco and IBD: relevance in the understanding of disease mechanisms and clinical practice. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004;18:481-96.
30. Koutroubakis IE, Vlachonikolis IG, Kouroumalis EA. Role of appendicitis and appendectomy in the pathogenesis of ulcerative colitis: a critical review. *Inflamm Bowel Dis* 2002;8:277-86.
31. Gilat T, Hacoheh D, Litos P, Langman MJ. Childhood factors in ulcerative colitis and Crohn's disease. An international cooperative study. *Scand J Gastroenterol* 1987;22:1009-24.
32. Feeney MA, Murphy F, Clegg AJ, Trebble TM, Sharer NM, Snook JA. A case-control study of childhood environmental risk factors for the development of inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002;14:529-34.
33. Baron S, Turck D, Leplat C, Merle V, Gower-Rousseau C, Marti R, et al. Environmental risk factors in paediatric inflammatory bowel diseases: a population based case control study. *Gut* 2005;54:357-63.
34. Van Kruiningen HJ, Joossens M, Vermeire S, Joossens S, Debeugny S, Gower-Rousseau C, et al. Environmental factors in familial Crohn's disease in Belgium. *Inflamm Bowel Dis* 2005;11:360-5.
35. Wakefield AJ, Pittilo RM, Sim R, Cosby SL, Stephenson JR, Dhillon AP, et al. Evidence of persistent measles virus infection in Crohn's disease. *J Med Virol* 1993;39:345-53.
36. Afzal MA, Minor PD, Begley J, Bentley ML, Armitage E, Ghosh S, et al. Absence of measles-virus genome in inflammatory bowel disease. *Lancet* 1998;351:646-7.

37. Haga Y, Funakoshi O, Kuroe K, Kanazawa K, Nakajima H, Saito H, et al. Absence of measles viral genomic sequence in intestinal tissues from Crohn's disease by nested polymerase chain reaction. *Gut* 1996; 38:211-5.
38. Thompson NP, Montgomery SM, Pounder RE, Wakefield AJ. Is measles vaccination a risk factor for inflammatory bowel disease? *Lancet* 1995;345:1071-4.
39. Morris DL, Montgomery SM, Thompson NP, Ebrahim S, Pounder RE, Wakefield AJ. Measles vaccination and inflammatory bowel disease: a national British Cohort Study. *Am J Gastroenterol* 2000;95:3507-12.
40. Feeney M, Clegg A, Winwood P, Snook J. A case-control study of measles vaccination and inflammatory bowel disease. The East Dorset Gastroenterology Group. *Lancet* 1997;350:764-6.
41. Davis RL, Kramarz P, Bohlke K, Benson P, Thompson RS, Mullooly J, et al. Measles-mumps-rubella and other measles-containing vaccines do not increase the risk for inflammatory bowel disease: a case-control study from the Vaccine Safety Datalink project. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2001;155:354-9.
42. Seagroatt V, Goldacre MJ. Crohn's disease, ulcerative colitis, and measles vaccine in an English population, 1979-1998. *J Epidemiol Community Health* 2003;57:883-7.
43. Ekblom A, Daszak P, Kraaz W, Wakefield AJ. Crohn's disease after in-utero measles virus exposure. *Lancet* 1996;348:515-7.
44. Jones P, Fine P, Piracha S. Crohn's disease and measles. *Lancet* 1997;349:473.
45. Pardi DS, Tremaine WJ, Sandborn WJ, Loftus EV, Jr., Poland GA, Harnsen WS, et al. Early measles virus infection is associated with the development of inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2000;95:1480-5.
46. Ekblom A, Wakefield AJ, Zack M, Adami HO. Perinatal measles infection and subsequent Crohn's disease. *Lancet* 1994;344:508-10.
47. Fisher NC, Yee L, Nightingale P, McEwan R, Gibson JA. Measles virus serology in Crohn's disease. *Gut* 1997;41:66-9.
48. Liu Y, Van Kruiningen HJ, West AB, Cartun RW, Cortot A, Colombel JF. Immunocytochemical evidence of *Listeria*, *Escherichia coli*, and *Streptococcus* antigens in Crohn's disease. *Gastroenterology* 1995;108:1396-404.
49. Chen W, Li D, Paulus B, Wilson I, Chadwick VS. Detection of *Listeria monocytogenes* by polymerase chain reaction in intestinal mucosal biopsies from patients with inflammatory bowel disease and controls. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:1145-50.
50. Walmsley RS, Anthony A, Sim R, Pounder RE, Wakefield AJ. Absence of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Klebsiella pneumoniae* antigens within inflammatory bowel disease tissues. *J Clin Pathol* 1998;51:657-61.
51. Chiba M, Fukushima T, Inoue S, Horie Y, Iizuka M, Masamune O. *Listeria monocytogenes* in Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* 1998;33:430-4.
52. Greenstein RJ. Is Crohn's disease caused by a mycobacterium? Comparisons with leprosy, tuberculosis, and Johne's disease. *Lancet Infect Dis* 2003;3:507-14.
53. Grant IR, Ball HJ, Rowe MT. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from milk by immunomagnetic separation. *Appl Environ Microbiol* 1998;64:3153-8.
54. Ryan P, Bennett MW, Aarons S, Lee G, Collins JK, O'Sullivan GC, et al. PCR detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in Crohn's disease granulomas isolated by laser capture microdissection. *Gut* 2002;51:665-70.
55. Ryan P, Kelly RG, Lee G, Collins JK, O'Sullivan GC, O'Connell J, et al. Bacterial DNA within granulomas of patients with Crohn's disease — detection by laser capture microdissection and PCR. *Am J Gastroenterol* 2004;99:1539-43.
56. Naser SA, Ghobrial G, Romero C, Valentine JF. Culture of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from the blood of patients with Crohn's disease. *Lancet* 2004;364:1039-44.
57. Autschbach F, Eisold S, Hinz U, Zinser S, Linnebacher M, Giese T, et al. High prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* IS900 DNA in gut tissues from individuals with Crohn's disease. *Gut* 2005;54:944-9.
58. van Heel DA, Ghosh S, Butler M, Hunt KA, Lundberg AM, Ahmad T, et al. Muramyl dipeptide and toll-like receptor sensitivity in NOD2-associated Crohn's disease. *Lancet* 2005;365:1794-6.
59. Riordan AM, Ruxton CH, Hunter JO. A review of associations between Crohn's disease and consumption of sugars. *Eur J Clin Nutr* 1998;52:229-38.
60. Katschinski B, Logan RF, Edmond M, Langman MJ. Smoking and sugar intake are separate but interactive risk factors in Crohn's disease. *Gut* 1988;29:1202-6.
61. Russel MG, Engels LG, Muris JW, Limonard CB, Volovics A, Brummer RJ, et al. Modern life' in the epidemiology of inflammatory bowel disease: a case-control study with special emphasis on nutritional factors. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1998;10:243-9.
62. Reif S, Klein I, Lubin F, Farbstein M, Hallak A, Gilat T. Pre-illness dietary factors in inflammatory bowel disease. *Gut* 1997;40:754-60.
63. Brauer PM, Gee MI, Grace M, Thomson AB. Diet of women with Crohn's and other gastrointestinal diseases. *J Am Diet Assoc* 1983; 82:659-64.
64. Geerling BJ, Dagnelie PC, Badart-Smook A, Russel MG, Stockbrugger RW, Brummer RJ. Diet as a risk factor for the development of ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2000;95:1008-13.
65. Sonnenberg A. Geographic and temporal variations of sugar and margarine consumption in relation to Crohn's disease. *Digestion* 1988; 41:161-71.
66. Shoda R, Matsueda K, Yamato S, Umeda N. Epidemiologic analysis of Crohn disease in Japan: increased dietary intake of n-6 polyunsaturated fatty acids and animal protein relates to the increased incidence of Crohn disease in Japan. *Am J Clin Nutr* 1996;63:741-5.
67. Persson PG, Ahlbom A, Hellers G. Diet and inflammatory bowel disease: a case-control study. *Epidemiology* 1992;3:47-52.
68. Boyko EJ, Perera DR, Koepsell TD, Keane EM, Inui TS. Coffee and alcohol use and the risk of ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 1989; 84:530-4.
69. Ekblom A, Montgomery SM. Environmental risk factors (excluding tobacco and microorganisms): critical analysis of old and new hypotheses. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004;18:497-508.
70. Lomer MC, Thompson RP, Powell JJ. Fine and ultrafine particles of the diet: influence on the mucosal immune response and association with Crohn's disease. *Proc Nutr Soc* 2002;61:123-30.
71. Lomer MC, Hutchinson C, Volkert S, Greenfield SM, Catterall A, Thompson RP, et al. Dietary sources of inorganic microparticles and their intake in healthy subjects and patients with Crohn's disease. *Br J Nutr* 2004;92:947-55.
72. Lomer MC, Harvey RS, Evans SM, Thompson RP, Powell JJ. Efficacy and tolerability of a low microparticle diet in a double blind, randomized, pilot study in Crohn's disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001;13:101-6.
73. Corrao G, Tragnone A, Caprilli R, Trallori G, Papi C, Andreoli A, et al. Risk of inflammatory bowel disease attributable to smoking, oral contraception and breastfeeding in Italy: a nationwide case-control study. Cooperative Investigators of the Italian Group for the Study of the Colon and the Rectum (GISC). *Int J Epidemiol* 1998;27:397-404.
74. Rigas A, Rigas B, Glassman M, Yen YY, Lan SJ, Petridou E, et al. Breast-feeding and maternal smoking in the etiology of Crohn's disease and ulcerative colitis in childhood. *Ann Epidemiol* 1993;3: 387-92.
75. Bergstrand O, Hellers G. Breast-feeding during infancy in patients who later develop Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* 1983;18: 903-6.
76. Koletzko S, Sherman P, Corey M, Griffiths A, Smith C. Role of infant feeding practices in development of Crohn's disease in childhood. *BMJ* 1989;298:1617-8.
77. Thompson NP, Pounder RE, Wakefield AJ. Perinatal and childhood risk factors for inflammatory bowel disease: a case-control study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995;7:385-90.
78. Gruber M, Marshall JR, Zielezny M, Lance P. A case-control study to examine the influence of maternal perinatal behaviors on the incidence of Crohn's disease. *Gastroenterol Nurs* 1996;19:53-9.

79. Klement E, Cohen RV, Boxman J, Joseph A, Reif S. Breastfeeding and risk of inflammatory bowel disease: a systematic review with meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 2004;80:1342-52.
80. Sears MR, Greene JM, Willan AR, Taylor DR, Flannery EM, Cowan JO, et al. Long-term relation between breastfeeding and development of atopy and asthma in children and young adults: a longitudinal study. *Lancet* 2002;360:901-7.
81. Wakefield AJ, Sawyer AM, Hudson M, Dhillon AP, Pounder RE. Smoking, the oral contraceptive pill, and Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 1991;36:1147-50.
82. Rhodes JM, Cockel R, Allan RN, Hawker PC, Dawson J, Elias E. Colonic Crohn's disease and use of oral contraception. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1984;288:595-6.
83. Lesko SM, Kaufman DW, Rosenberg L, Helmrich SP, Miller DR, Stolley PD, et al. Evidence for an increased risk of Crohn's disease in oral contraceptive users. *Gastroenterology* 1985;89:1046-9.
84. Boyko EJ, Theis MK, Vaughan TL, Nicol-Blades B. Increased risk of inflammatory bowel disease associated with oral contraceptive use. *Am J Epidemiol* 1994;140:268-78.
85. Godet PG, May GR, Sutherland LR. Meta-analysis of the role of oral contraceptive agents in inflammatory bowel disease. *Gut* 1995;37:668-73.
86. Cosnes J, Carbonnel F, Carrat F, Beaugerie L, Gendre JP. Oral contraceptive use and the clinical course of Crohn's disease: a prospective cohort study. *Gut* 1999;45:218-22.
87. Darfeuille-Michaud A, Neut C, Barnich N, Lederman E, Di Martino P, Desreumaux P, et al. Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 1998;115:1405-13.
88. Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P, Neut C, Glasser AL, Barnich N, et al. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2004;127:412-21.
89. Card T, Logan RF, Rodrigues LC, Wheeler JG. Antibiotic use and the development of Crohn's disease. *Gut* 2004;53:246-50.
90. Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 2004;118:229-41.
91. Whorwell PJ, Holdstock G, Whorwell GM, Wright R. Bottle feeding, early gastroenteritis, and inflammatory bowel disease. *Br Med J* 1979;1:382.
92. Ekholm A, Adami HO, Helmick CG, Jonzon A, Zack MM. Perinatal risk factors for inflammatory bowel disease: a case-control study. *Am J Epidemiol* 1990;132:1111-9.
93. Qiu BS, Vallance BA, Blennerhassett PA, Collins SM. The role of CD4+ lymphocytes in the susceptibility of mice to stress-induced reactivation of experimental colitis. *Nat Med* 1999;5:1178-82.
94. Drossmann DA. Psychosocial factors in ulcerative colitis and Crohn's disease in Kirsner JB ed. *Inflammatory bowel disease*. 5th Ed. Philadelphia: WB Saunders 2000:342-57.
95. Li J, Norgard B, Precht DH, Olsen J. Psychological stress and inflammatory bowel disease: a follow-up study in parents who lost a child in Denmark. *Am J Gastroenterol* 2004;99:1129-33.
96. Lerebours E, Gower-Rousseau C, Hellot MF, Merlet V, Brazier F, Debeugny S, et al. Première poussée de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et stress : résultats d'une étude cas-témoins (abstract). *Gastroenterol Clin Biol* 2002;26:A72.
97. Sandler RS, Eisen GM. Epidemiology of inflammatory bowel disease in Kirsner JB ed. *Inflammatory bowel disease*. 5th Edition. Philadelphia: WB Saunders 2000:89-112.
98. Sonnenberg A. Disability from inflammatory bowel disease among employees in West Germany. *Gut* 1989;30:367-70.
99. Boggild H, Tuchsén F, Orhede E. Occupation, employment status and chronic inflammatory bowel disease in Denmark. *Int J Epidemiol* 1996;25:630-7.
100. Gent AE, Hellier MD, Grace RH, Swarbrick ET, Coggon D. Inflammatory bowel disease and domestic hygiene in infancy. *Lancet* 1994;343:766-7.
101. Duggan AE, Usmani I, Neal KR, Logan RF. Appendectomy, childhood hygiene, *Helicobacter pylori* status, and risk of inflammatory bowel disease: a case control study. *Gut* 1998;43:494-8.
102. el Omar E, Penman I, Cruikshank G, Dover S, Banerjee S, Williams C, et al. Low prevalence of *Helicobacter pylori* in inflammatory bowel disease: association with sulphasalazine. *Gut* 1994;35:1385-8.
103. Halme L, Rautelin H, Leidenius M, Kostinen TU. Inverse correlation between *Helicobacter pylori* infection and inflammatory bowel disease. *J Clin Pathol* 1996;49:65-7.
104. Riedler J, Braun-Fahrlander C, Eder W, Schreuer M, Waser M, Maisch S, et al. Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet* 2001;358:1129-33.
105. Braun-Fahrlander C, Riedler J, Herz U, Eder W, Waser M, Grize L, et al. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N Engl J Med* 2002;347:869-77.
106. Elliott DE, Urban JF, Jr., Argo CK, Weinstock JV. Does the failure to acquire helminthic parasites predispose to Crohn's disease? *FASEB J* 2000;14:1848-55.
107. Summers RW, Elliott DE, Urban JF, Jr., Thompson R, Weinstock JV. *Trichuris suis* therapy in Crohn's disease. *Gut* 2005;54:87-90.
108. Summers RW, Elliott DE, Urban JF, Jr., Thompson RA, Weinstock JV. *Trichuris suis* therapy for active ulcerative colitis: a randomized controlled trial. *Gastroenterology* 2005;128:825-32.
109. Rook GA, Adams V, Hunt J, Palmer R, Martinelli R, Brunet LR. Mycobacteria and other environmental organisms as immunomodulators for immunoregulatory disorders. *Springer Semin Immunopathol* 2004;25:237-55.
110. Hugot JP, Alberti C, Berrebi D, Bingen E, Cezard JP. Crohn's disease: the cold chain hypothesis. *Lancet* 2003;362:2012-5.
111. Cosnes J, Beaugerie L, Carbonnel F, Gendre JP. Smoking cessation and the course of Crohn's disease: an intervention study. *Gastroenterology* 2001;120:1093-9.

ANNEXE 3 : ENVIRONMENTAL RISK FACTORS IN CROHN'S DISEASE AND ULCERATIVE COLITIS: AN UPDATE. GASTROENTÉROLOGIE CLINIQUE ET BIOLOGIE 2009

Gastroentérologie Clinique et Biologique (2009) 33, Suppl. 3, S145–S157



Disponible en ligne sur
 ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
 EM|consulte
www.em-consulte.com



Environmental risk factors in Crohn's disease and ulcerative colitis: an update

Place des facteurs environnementaux dans la physiopathologie des maladies inflammatoires chroniques intestinales

F. Carbonnel^{a,*}, P. Jantchou^b, E. Monnet^c, J. Cosnes^d

^a Service de Gastroentérologie et Nutrition, CHU Jean Minjoz, 25000 Besançon, France

^b Service de Pédiatrie, CHU Saint-Jacques, 25000 Besançon, France

^c Département de santé publique, CHU Jean Minjoz, 25000 Besançon, France

^d Service de Gastroentérologie et Nutrition, Hôpital Saint-Antoine, 75571 Paris, France

Summary

Rapid increase in Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) incidence in developed countries, occurrence of CD in spouses and lack of complete concordance in monozygotic twins are strong arguments for the role of environmental factors in inflammatory bowel disease (IBD). Only two environmental factors have an established role in IBD. Smoking is a risk factor for CD and a protective factor for UC; appendectomy is a protective factor for UC. Many other environmental factors for IBD have been investigated. These are infectious agents, diet, drugs, stress and socio-economic factors. They are detailed in this paper. Among them, adherent invasive *E. coli*, infectious gastroenteritis, oral contraceptives and antibiotics could play a role in CD. To date, three theories integrate environmental factors to pathogenesis of IBD: hygiene, infection and cold chain. Much work remains to be done to identify risk factors for IBD. As exemplified by smoking, research of environmental risk factors of IBD is useful since it may lead to an improved disease course among patients and perhaps, to appropriate prevention among predisposed subjects. Further studies in this field are eagerly awaited.

© 2009 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Résumé

L'augmentation rapide de l'incidence de la maladie de Crohn (MC) et de la rectocolite hémorragique (RCH) dans les pays développés, l'absence de concordance totale chez les

* Corresponding author:

E-mail address: fcarbonnel@chu-besancon.fr (F. Carbonnel).

© 2009 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

jumeaux monozygotes, les formes conjugales de MC sont autant d'éléments en faveur du rôle des facteurs d'environnement dans la genèse des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). Deux facteurs d'environnement ont un rôle établi : le tabac (protecteur dans la RCH, facteur de risque dans la MC) et l'appendicectomie (protecteur dans la RCH). De nombreux autres facteurs d'environnement font l'objet de recherches. Il s'agit d'agents infectieux, alimentaires, médicamenteux, du stress et de facteurs socio-économiques. Ils sont détaillés dans cet article. Parmi ces facteurs, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, *E. coli* adhérent invasif, la contraception orale et l'antibiothérapie pourraient jouer un rôle dans la MC. À ce jour, trois théories permettent d'intégrer les facteurs d'environnement aux données connues de la physiopathologie des MICI : l'hygiène, l'infection et la chaîne du froid. Beaucoup reste à faire pour identifier les facteurs d'environnement qui jouent un rôle dans les MICI. Cette recherche est utile car elle peut mener à une prévention de la maladie chez les sujets prédisposés et à une amélioration de son cours évolutif chez les patients.

© 2009 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Introduction

Inflammatory bowel diseases (IBD) are characterised by a decreased tolerance to intestinal bacteria and an abnormal activation of intestinal cellular immunity. Several mechanisms involved in the loss of homeostasis of intestinal mucosal immunity have been described in animal models of IBD and in clinical settings: increased production of proinflammatory cytokines, dysbiosis of intestinal flora, inactivation of regulatory T cells, loss of the epithelial barrier function, etc. [1, 2].

The description of IBD mechanisms is distinct from the research for its causes or triggering factors. IBD is the result of the combination of both genetic and environmental factors. Major research efforts, have concentrated on genes predisposing to IBD. At the present time, nine genes predisposing to Crohn's disease (CD) have been found [3]. NOD2-CARD15 is one of them. It is a key component of the innate immune response against bacteria [4]. Two genes IRGM and ATG16L1 play a role in autophagy of intracellular bacteria [5, 6]. Several other genes are involved in the regulation of innate and adaptive immune response (IL23R, PTPN2, TNF AIP3, etc.). Research of genes predisposing to IBD is far from complete and further associations are likely to be described in the coming years.

However, as we will see as we read on, environmental factors are involved in the occurrence of IBD, and their role has been confirmed in a number of observations.

Do environmental factors play a role in IBD?

Time trends in IBD incidence

Several IBD registries have been set up across the globe. Depending on regions, the mean annual incidence rate of CD varies from 0.7 to 14.6 for 100,000 inhabitants and that of ulcerative colitis (UC) from 1.5 to 24.5 per 100,000 inhabitants [7-13]. All registries have noted an increased incidence of both CD and UC. This increase was first noted in the 1940's in Northern developed countries and in the 1960's in Southern countries [7-13]. In half of studies, the increased incidence of IBD (either UC or CD) is followed by a plateau

[6]. It suggests that environmental factors have progressively spread throughout the entire population, reaching, within a few decades, all individuals at risk. In several registries, incidence of CD is still rising, particularly in children from Sweden [13], Northern France [11] and Denmark [15] during the 1990's and 2000's, suggesting that some environmental factors still act to increase the incidence of CD in Western nations. However, one cannot exclude that the increased incidence of IBD is due to its better recognition by patients and physicians.

North-South gradient of IBD incidence

A North-South IBD incidence gradient has been described in Europe, the USA, Scotland and France [12, 16, 17, 18]. All studies conducted have observed a North-South gradient for CD. Two of these studies did not observe a similar gradient for UC [17, 18] and a third study observed a less marked gradient for UC than for CD [12]. In France, the incidence of CD is significantly higher in the north of (Nord-Pas-de-Calais, Picardie, Champagne-Ardenne and Lorraine) and lower in Southern and Western regions (Brittany, Aquitaine, Midi-Pyrénées, Rhône-Alpes, Limousin and Burgundy) [18]. The North-South gradient observed for CD in different regions throughout the world can be explained by genetic or environmental factors. Subjects who have a genetic predisposition to CD may reside more frequently in Northern regions. The higher incidence observed in the north-east of France is consistent with the first (and most important) component which corresponds to the spread of farming from the Levant to the north and west of Europe at the Neolithic age [19]. It is said to account for 28% of the genetic variation in Europe. Environmental factors, in particular improved hygiene in Northern regions, may also explain this gradient. The economic development of Southern regions resulting in the standardisation of way of life should reduce the North-South gradient. In CD, the abnormal activation of intestinal cellular immunity is dependent upon TH1 lymphocytes. In multiple sclerosis, another disease associated with excessive TH1 activity, a South-North gradient has been observed. In Australia, the most Southern regions such as Tasmania have a higher incidence than Northern regions such as Queensland

[20]. It has been hypothesized that sunlight protects subjects from multiple sclerosis; a theory confirmed by a case-control study [21]. A recent study has shown that distribution of multiple sclerosis in farmers was higher in the north and north-east of France, a distribution similar to that of CD [22]. Previous study performed in Manitoba, Canada has shown that both diseases had a similar geographic distribution [23]. This suggests that both diseases share similar environmental factors, including sunlight exposure.

Family aggregation in IBD

In monozygotic twins, the concordance level is only 50% for CD and 19% for UC [24]. In families with CD, affected children are more often consecutive than may be expected by chance alone. Hugot et al. studied 102 relatives who belonged to families with three or more children, with at least two affected with CD. They observed 58 consecutive cases, whereas chance predicted only 46 ($P = 0.005$) [25]. This difference could be attributed neither to a cohort effect, nor to a *de novo* mutation of germinal cells after the birth of the first child. The shared exposure by siblings to common environmental factors was the preferred explanation.

Moreover, IBD in spouses are significantly more frequent than chance would predict [26]. CD among disease-free spouses at time of marriage occurs after a median of 8.5 years (3.5-14) of conjugal life [26]. These conjugal forms of CD suggest that shared exposure to environmental factors within the same family household favours the development of CD.

Clusters of CD

Seven observations of CD have been reported among non-related adolescents having studied at the Mankato College (Minnesota-USA) from 1976 to 1991 [27]. Such an aggregate of CD within this small community would result in the extremely high prevalence of 2,400/100,000 inhabitants. A detailed investigation showed that patients had commonly bathed in a pool polluted with Coliform bacteria [27]. However, caution is needed in interpreting these results. Indeed, the occurrence of a spatio-temporal aggregate could be the result of pure chance.

The abovementioned studies suggest that environmental factors play a role in IBD pathogenesis. Many studies have attempted to identify these environmental factors. Numerous epidemiological studies, either ecological studies, case-control studies, or more recently, cohort studies have been performed. Such research is painstaking, since factors "having emerged in Western living conditions since the Second World War" are numerous and probably, incompletely recorded. Several systematic case-control studies have attempted to identify them. Others have targeted a single factor. Environmental factors may also be studied in the laboratory: detection of microorganisms on human tissue using immunohistochemistry or PCR, effect of an environmental factor on the immune response. Based upon the philosophy of David Hume (1711-1776), the British epidemiologist Austin Bradford Hill has defined a list of criteria required to identify a factor as causative. These criteria appear in box 1. Among all the suspected causative factors of IBD only tobacco and appendectomy satisfy these criteria.

Box 1. Criteria for causal associations between environment and medicine (according to Austin Bradford Hill, Environment and causation, Proc Royal Society Medicine 1965;58:295-300). *Critères utilisés pour étudier les liens de causalité entre environnement et pathologie (d'après Austin Bradford Hill, Environment and causation, Proc Royal Society Medicine 1965;58:295-300).*

- The association is strong.
- The association is constant and reproducible.
- Cause must precede the effect.
- There is a dose effect relationship.
- Cause is biologically plausible.
- Cause is in line with present knowledge about natural history of the disease.
- A conclusive randomized controlled trial is a strong argument.

Systematic case-control studies

The first study of this type focused on 14 centres throughout 9 different countries (Northern America, Northern Europe and the Mediterranean) [28]. One hundred and ninety-seven patients presenting with UC and 302 patients with CD were compared with two controls per patient, matched for both age and sex, with or without gastrointestinal disease. Family history increased the risk of UC and of CD. Eczema in a patient or his/her parents, respiratory infections, antibiotic prescription and being the youngest sibling, all increased the risk of CD. On the contrary, consumption of vitamins and minerals during pregnancy by the mother, small pox vaccination and belonging to a high-level socio-economic group, all diminished the risk. Respiratory infections and the presence of pet rodents at home increased the risk of UC. On the contrary, appendectomy, consumption of vitamins and minerals during pregnancy by the mother, together with measles all protected against UC. This study was the first to demonstrate the protective role of appendectomy against UC. The association with allergy demonstrated in this study was frequently observed in subsequent studies.

The study by Feeney et al. was conducted in adults and was aimed to identify risk factors present during childhood and potentially responsible for the onset of IBD [29]. One hundred and thirty-nine patients presenting with UC and 137 with CD were included in the study. The authors confirmed the protective role of appendectomy against UC and found no other risk factor for this disease. In CD, *Helicobacter pylori* serology was less frequently positive, whilst eczema and regular visits to the swimming pool were more frequent among patients than among controls. The absence of *Helicobacter pylori* infection is a marker of better hygiene, whilst swimming pool attendance is suggestive of the transmission by water of an infectious (or toxic) agent.

A systematic environmental factor study was recently published by the EPIMAD registry [30]. Two hundred and eighty-two patients aged under 18 years (222 CD and 60 UC) were compared to as many matched controls. Family history of IBD, maternal breast feeding, BCG vaccination and eczema increased the risk of CD. The regular consumption of tap

water decreased this risk. A possible explanation is that tap water may contain bacteria, in particular non-pathogenic mycobacteria, which may play an immunoregulatory role. Family history of IBD, preterm birth and sharing a bedroom with another family member (suggesting the involvement of a transmissible infectious agent) all increased the risk of UC, whereas appendectomy played a protective role.

A systematic environmental factor study was conducted among 21 families from Northern Belgium with at least three first degree relatives presenting with CD [31]. These 21 families were compared with 10 control families via a questionnaire including 176 items concerning childhood and adolescence for children and concerning the ten-year period immediately prior to the onset of disease for adults. This study evidenced several CD risk factors among patients and/or their families. Factors favouring CD were: periodontitis, consumption of raw pork, of non-pasteurised dairy products, of well water and of tobacco. On the contrary, history of mumps, consumption of oats, bran, rye and tap water, together with domestic contact with a bird, dog or cat all played a protective role against CD. The increased risk of CD induced by the consumption of raw pork, non-pasteurised dairy products and well water is in support of a transmissible infectious agent.

A case-control study of newly-diagnosed cases of CD ($n = 194$), less than 20 yr of age has been reported recently [32]. In multivariate conditional logistic regression, family history of IBD, age, and owning a pet were associated with risk for CD, whereas regular use of a personal towel and lesser crowding in homes were protective. Day-care attendance during the first 6 months of life and "physician-diagnosed infections" between 5 and 10 yr of age were associated with increased risks for CD. This study concluded that "infection-related exposures seem to enhance risk for CD in children".

Conversely, a multicenter case control study performed in children with CD ($n = 444$) and UC ($n = 304$) has shown that regular contact with farm animals during the first year of life was inversely associated with CD and UC [33]. Regular contact with cats during infancy was also associated with CD but not UC. Allergic rhinitis was correlated significantly with CD but not UC.

Targeted studies on specific risk factors

Smoking

Smoking and UC

The role of smoking is crucial in CD and UC [34]. It is clearly established that smoking has a strong protective effect against UC. One meta-analysis has calculated a pooled odds ratio of 0.41 (95% confidence intervals 0.34-0.48) for current smokers compared with non-smokers [35]. The protective effect of

smoking is abolished in those who stop smoking. Ulcerative colitis is also less severe in smokers than in non-smokers: flare-up and hospitalization rates, the need for oral steroids and, colectomy rates, are lower in smokers than non-smokers [36]. Stopping smoking increases the risk of developing UC when compared to neversmokers. This increased risk, about 1.64 (1.36-1.98) persists during the 2 to 3 years following smoking cessation [35]. Likewise, smokers with UC who quit experience an increase in disease activity, hospital admissions and the need for oral steroids, and immunosuppressants (but seemingly not colectomy), within the first years following the cessation of smoking [37].

Smoking and CD

It is clearly established that smoking increases the risk of having CD. One meta-analysis has calculated a pooled odds ratio of 2.0 (1.65-2.47) in current smokers compared to non-smokers [35]. CD is also more severe in smokers than in non-smokers: flare-up, penetrating complications, surgery and postoperative recurrences are higher in smokers than non-smokers [34]. The detrimental effect of smoking is dose dependent, however a light consumption remains harmful. Smoking increases the risk of having ileal CD and increases its severity in patients affected with CD but has little effect upon colonic CD [34]. CD activity in ex-smokers is not different to that of non-smokers, and less marked than in current smokers. One prospective study performed in a selected group of 59 patients who stopped smoking following a smoking cessation intervention examined the disease course from one year after the quit date [38]. Regarding the flare-up rate and therapeutic needs, disease severity was similar in patients who had never smoked and in those who stopped smoking, and both had a better course than continuing smokers. Quitters had a 65% decreased risk of flare-up compared with paired continuing smokers. They were less likely to require corticosteroids, start immunosuppressive therapy, or require an increased dose of immunosuppressants (Figure 1). Additional intervention studies of smoking cessation in smokers with CD are required.

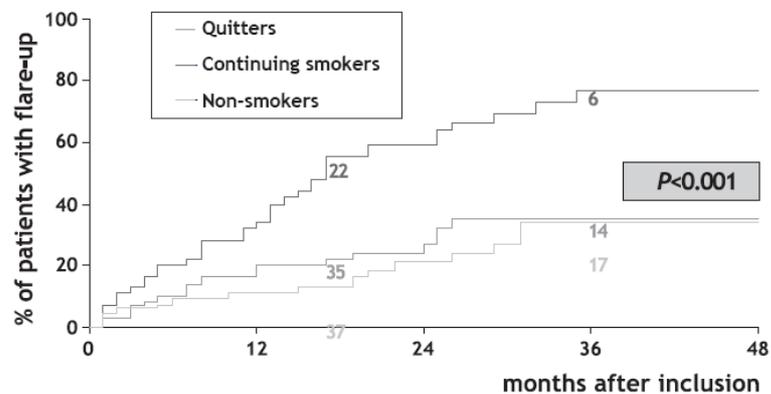


Figure 1 Risk of flare up of Crohn's disease in active smokers, ex-smokers and in non-smokers (according to Cosnes et al. [41]).

Risque de poussée de maladie de Crohn chez des malades fumeurs actifs, anciens fumeurs, ou non-fumeurs (d'après Cosnes et al. [41]).

Mechanisms of the effects of smoking in IBD

The reasons why smoking has an opposite effect in CD and UC remain obscure. Tobacco contains hundreds of different substances including nicotine, free radicals and carbon monoxide. The targets of smoking are plentiful: mucus layer, macrophage function, adaptive immunity, cytokine production, vascular effects, motility and intestinal permeability to macromolecules... In CD the mucus layer is thicker whereas it is thinner in UC; nicotine increases mucin synthesis in UC patients. Smokers with IBD have a significant reduction in mucosal cytokine levels, specifically, IL-1b and IL-8 for patients with UC and IL-8 for patients with CD [39]. Smoking also targets macrophage function. Macrophages from smokers express a selective functional deficiency in their ability to kill intracellular bacteria [40] and carbon monoxide at low concentrations inhibits the lipopolysaccharide-induced expression of proinflammatory cytokines (TNF α , IL-1b and macrophage inflammatory protein-1b) and increases that of IL-10 [41]. Smoking increases the risk of ileal CD and decreases macrophage ability to kill intracellular bacteria. Likewise, some of the CD-predisposing genes are involved in autophagy (ATG and IRGM) and innate immune response against bacteria (NOD2); these genes increase the risk of ileal CD but not colonic CD. Therefore, it can be suggested that ileal CD results from innate immune deficiency against intracellular bacteria, either inherited or due to environmental factors (including smoking) or both.

Therapeutic implications

The effects of smoking upon IBD course have important therapeutic implications. Smokers with UC who plan to stop should be informed about the potential risk of increase in disease activity. Smoking cessation has become a major therapeutic goal in the management of CD, particularly in young women and in patients with ileal involvement. However, the proportion of CD patients who stop smoking remains low—about 10%—and relapse rate is high. Smoking cessation programs should be developed in IBD centers.

Appendectomy

Several case control and cohort studies have found that appendectomy reduces the risk of having UC. In 2002, a meta-analysis pooled the results of 17 case control studies. The overall pooled OR was 0.312 (0.261-0.373) for having UC in appendectomized patients vs non appendectomized patients [42]. However, the methodological quality of some of these studies has been questioned [43]. There have been two national cohort studies on this subject. The Swedish study has followed 212,963 people who had undergone an appendectomy and the same number of matched controls [44]. It concluded that the incidence of UC was 26% lower in appendectomized patients (relative risk 0.42; 0.31-0.57). The Danish study included 154,434 appendectomized patients and found that the incidence of UC was 13% lower (relative risk 0.87; 0.69-1.07) in appendectomized patients [45]. In both studies, the risk of UC was lower for patients who had been operated on before the age of 20 and for a confirmed appendicitis. There is thus good evidence to support the association between appendectomy and UC. UC is also less severe in appendectomized patients, the disease course is less active and colectomy rate is lower [46].

However, in view of the abovementioned results, it seems likely that the protective effect is due to appendicitis not appendectomy. Appendectomy is often inflamed in UC, even in patients with distal disease [47]. Immunohistochemical studies have shown that in UC, there is an accumulation of activated macrophages closely linked to epithelial cells which harbor HLA class II antigens on their surface [48]. TcR α knock out mice develop a spontaneous inflammatory colitis between 24 and 31 weeks of life [49]. Neonatal appendectomy prevents these mice from having a subsequent inflammatory colitis [50]. It has been suggested that, in this model, autoreactive T cells which cross react with bacterial antigens are activated within the appendix.

The role of appendectomy in CD onset is less well defined than for UC. A recent population-based study in Sweden and Denmark has shown an increase in CD frequency in the first 6 months after appendectomy but this excess risk disappears thereafter, suggesting that the association is due to a diagnostic bias [51]. Appendectomy does not seem to affect severity in patients with CD [52].

Infectious agents

Several infectious agents have been suspected to have a causative role in IBD.

Perinatal infections

One study demonstrated a higher risk of IBD among patients having suffered acute gastroenteritis in the days following their birth [53]. Furthermore, it has been demonstrated that IBD was more frequent among children presenting with perinatal infection, all localisations combined [54]. In this case-control study including 257 cases of CD, 257 UC and 514 controls matched for age, sex and maternal age or parity, the authors found an OR of 3.8 [CI: 2.6 to 5.8] to develop CD among patients who had had a perinatal infection noted in their medical file. This risk was higher for viral than for bacterial infections.

The measles virus

The measles virus has been evidenced in immunohistochemistry and in *in situ* hybridisation in endothelial intestinal cells among patients presenting with CD [55]. These initial results were not subsequently confirmed [56, 57]. Simultaneously, several epidemiological studies have looked into the association between, on one hand the occurrence of IBD and, on the other hand, anti-measles vaccination, measles infection during pregnancy or infancy. An epidemiological study of a historical cohort of 3,545 patients vaccinated against measles in 1964, found an odds ratio (OR) of 3 for CD (1.45-6.23) and 2.53 (1.15-5.58) for UC in the vaccinated group compared with a control group of 11,407 non-vaccinated individuals [58]. A further study concerning 7,616 individuals born in 1970 found no significant association between anti-measles vaccination before the age of 5 years and the occurrence of CD (OR = 0.67[0.27-1.63]) or the occurrence of UC (OR = 0.57 [0.20-1.61]). On the contrary, a trend to develop CD was observed among individuals vaccinated after the age of 2 years (OR = 1.05; CI [1-1.10]) [59]. Two other case-control studies on approximately 150 patients matched with 2 or more controls per patient, found no association between

anti-measles vaccination and IBD [60, 61]. A hospital cohort study (1,959 CD and 2,018 UC) over a period of 20 years also failed to identify an association between vaccination, CD and UC [62]. These data do not support the role of measles vaccination in IBD. One study focused on the occurrence of IBD among children whose mothers had been infected with measles during pregnancy. By analysing data from 25,000 births over a period of 10 years, the authors found four cases of measles occurring during pregnancy; three of the four infants involved developed CD [63]. They suggest that measles exposure during pregnancy represents a major risk factor for CD. A further study, however, failed to reproduce this association [64]. Two population-based studies revealed an increased risk of IBD among children having suffered from measles before the age of five [65, 66]. These results were not confirmed by a serological study [67]. Furthermore, the incidence of IBD continues to rise in children, whereas measles is on the decline, thanks to vaccination.

From these studies, the role of measles virus or vaccine in the pathogenesis of IBD can be reasonably dismissed.

Listeria monocytogenes

An immunohistochemical study of 16 intestinal resection samples for CD revealed the presence of *Listeria monocytogenes* in macrophages and in giant cells in 12 cases out of 16. The presence of *E. coli* and of *Streptococcus* was also observed in, respectively, 57 and 44% of resection samples [68]. Other studies looking to identify *Listeria monocytogenes* in intestinal tissue, by PCR or immunohistochemistry, observed no difference between CD and controls [69-71].

Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis (MAP)

The role of MAP in CD is controversial [72]. Several recent studies have shown a significant association between MAP and CD. A PCR study evidenced the presence of MAP in the blood of 40% of CD or UC patients and 20% of controls [73]. Furthermore, the bacteria was found in culture following a 12-week incubation period, exclusively among IBD patients [73]. Another study has shown that a specific DNA fragment of MAP called IS900 was more frequently found in the small intestinal or colonic tissue of CD patients, than UC patients or controls (52% versus 2% and 5% respectively) [74]. A recent meta-analysis analysed 28 case-control studies comparing MAP in patients with CD, UC or controls. The pooled OR comparing CD patients and controls was 7.01 (95% CI 3.95-12.4) in studies using PCR in tissue samples and 1.72 (1.02-2.90) in studies using ELISA in serum. ORs were similar for comparisons between CD and UC patients [75]. The specificity of this association can be questioned however. Shanahan's group has evidenced MAP DNA in micro-dissected tubercloid granulomas in intestinal tissue taken from CD patients [76]. Using the same technique, the same group also observed *E. coli* DNA within granulomas [77].

Recently a multicenter randomized placebo controlled trial has compared the efficacy of triple anti-MAP therapy (clarithromycin, clofazimine, rifabutin) to that of placebo [78]. Primary end points were the proportion of patients experiencing at least 1 relapse at 12, 24, and 36 months. The combination antibiotic therapy for up to two years failed to induce a sustained benefit. Although the results of this study do not support the role of MAP in CD, the hypothesis cannot

be totally refuted however. Firstly, in this study, MAP status (either culture, ELISA or PCR in blood or intestines) was not assessed. Therefore, it cannot be excluded that antibiotics were active in the subset of MAP-positive patients; the study may have lacked adequate power to detect a difference in the patients infected with MAP. Furthermore, dose of antibiotics may have been insufficient. The controversy concerning the role of MAP is not ended yet.

Adherent-invasive Escherichia coli

Adherent-invasive *E. coli* (AIEC) can be found in the ileal mucosa of 20-30% of CD patients versus 5% of controls [79, 80]. These bacteria do not possess the virulence factors of species responsible for acute infectious diarrhoea but adhere to and invade intestinal epithelial cells. Moreover, AIEC are phagocytosed by macrophages and persist within their cytoplasm rather than being destroyed [81]. Their ecology and transmission mode are, as yet, unknown. The receptor of adherent-invasive *E. coli* upon the enterocyte mucosal surface has been found recently. It is a member of the CEA family protein called CEACAM6 [82]. It is abnormally expressed by ileal enterocytes in CD patients. In addition, interferon- γ or tumor necrosis factor- α stimulation and infection with AIEC bacteria increase CEACAM6 expression in cultured intestinal epithelial cells, indicating that AIEC can promote its own colonization in CD patients.

The presence of MAP or AIEC within the intestinal mucosa of CD patients could be the result of abnormally high intestinal permeability and/or a defect in bacterial clearance. Indeed, NOD2 mutations observed in CD lead to a loss of function and therefore, to an inborn innate immune deficiency [83]; this could prevent the clearance of intracellular bacteria which, consequently persist in intestinal mucosa, inducing chronic stimulation of adaptive immunity. Moreover, it has been showed recently that NOD2 mutations lead to increased intestinal permeability to *E. coli* in Peyer's patches [84]. Finally, IRGM a gene predisposing to CD encodes a GTP-binding protein which induces autophagy and is involved in elimination of intracellular bacteria, including *Mycobacterium tuberculosis* [5]. Interactions between NOD2 mutations, MAP and AIEC presence in CD patients should be looked for.

Infectious gastroenteritis

Two large-scale case control studies have shown that the risk if IBD, and particularly CD, is higher in patients with a prior episode of infectious gastroenteritis [85, 86].

Dietary factors

Several studies have considered the role of dietary factors in the genesis of IBD.

Sugar consumption

Most case-control studies have observed a significant association between simple sugar consumption and CD [87]. This result could be interpreted in two different ways. The first interpretation is that simple sugars favour the onset of CD, the second is that patients presenting with CD consume higher quantities of rapidly absorbed sugars to alleviate their symptoms. A possible confounding factor is

that simple sugar consumption is associated with tobacco consumption [88]. A review of the literature conducted in 1998 concluded that methodological problems prevented any conclusion concerning the role of simple sugars in the onset of IBD [87].

Other foods

Other dietary factors: proteins, fat, margarine, fruit and vegetables, dairy products, coffee, coca cola and "fast food" have all been studied in case-control studies or retrospective cohort series [89-98]. As for rapidly absorbed sugars, methodological problems prevent any conclusion from being drawn [97].

Several longitudinal cohort studies of middle aged women are ongoing in USA, Europe and France. These women have had a dietary and lifestyle questionnaire at baseline and at regular visits. Some of these women have developed UC or CD during their follow up. It is hoped that the pre-illness dietary and lifestyle risk factors for CD or UC will be determined.

Food microparticles

Foodstuffs in developed countries contain increasing quantities of microparticles such as titanium dioxide and aluminium silicate. According to a recent theory, microparticles act like antigen transporters from the lumen to the intestinal mucosa. *In vitro*, complexes formed by antigens and microparticles are powerful stimuli of T lymphocytes and macrophages [98]. One study failed to observe any difference between CD patients and controls with regard to the quantity of food microparticles contained in diet [99]. However, the role of microparticles is extremely difficult to analyse *via* a dietary questionnaire. A therapeutic trial including 18 corticosteroid dependant patients, randomized to receive a normal and a microparticle-reduced diet concluded to the efficacy of the latter [100]. This was not confirmed in a subsequent multicentric trial [101].

Maternal breastfeeding

Several studies have shown that exclusive artificial feeding (as opposed to maternal breastfeeding, exclusive or not) favours the occurrence of IBD [102-105] whereas others have failed to demonstrate this association [106, 107]. Data from 17 studies conducted on 2,577 patients and 3,551 controls for UC, together with 3,190 patients and 4,026 controls for CD were pooled in a meta-analysis [108]. Despite the small number of studies involving high methodological quality (4 for UC and 4 for CD), authors observed an OR in favour of the protective role of maternal breastfeeding towards IBD: OR = 0.56 [0.38-0.81] for UC and 0.45 [0.26-0.79] for CD. This protective effect remains when analysing all studies. Nevertheless, this meta-analysis did not include the EPIMAD study, in which maternal breastfeeding was found to increase the risk of CD [30]. As already seen, allergy is more frequent among IBD patients. It has been commonly acknowledged that breastfeeding protects against allergy. However, a recent longitudinal study demonstrated that, when administered on a long-term basis, maternal breastfeeding increased the risk of allergy [109]. This detrimental effect could be due to toxic substances in maternal milk or to a hindered acquisition of infection during infancy due

to the immunity provided by maternal breastfeeding. Such hindrance could lead to an immunoregulatory deficiency and, consequently, to the loss of homeostasis of intestinal mucosal immunity.

Oral contraceptives

Oral contraceptives have been recently introduced into Western lifestyle. Furthermore, whilst disease is more frequent before puberty among boys, it is more frequent at adult age among women. A meta-analysis has been published on this subject in 1995 [110]. It combined the results of nine studies. The pooled relative risk (adjusted for smoking) associated with oral contraceptive use was 1.44 (1.12-1.86) for CD and 1.29 (0.94-1.77) for UC. Since this paper two case control studies have found a significant association between oral contraceptives and CD [111, 112] and UC [112]. These results suggest modest associations between the use of oral contraceptives and the development of CD and UC. We have assessed the effect of oral contraceptive use on the clinical course of CD and found no effect [113]. The results of this study are discordant with those of Timmer et al. [114] who reported an increased risk of relapse in patients receiving or having received oral contraceptives (both groups were pooled). In our study, the absence of a significant effect of current use of oral contraceptives was probably linked to the low oestrogen dosage of most of the pills used. Although smoking did increase the flare up rate, the use of oral contraceptives did not potentiate the effect of smoking and there was no interaction between the two exposures. Other studies also failed to show any significant impact of oral contraceptives on the course of CD [115, 116].

Vaccinations

BCG

BCG vaccination induces TH1 stimulation, whose excessive activity is one of the essential mechanisms involved in CD. The EPIMAD registry study observed an OR of 3.6 to develop Crohn's disease among individuals exposed to the vaccine [CI at 95%: 1.1-11.9] with a dose effect [30]. This is the first study to demonstrate such an effect and it needs to be confirmed in further studies.

Combined Measles Mumps Rubella vaccines (MMR)

A major North American epidemiological study conducted based on statistics from "Health Maintenance Organizations" demonstrated that the combined MMR vaccine does not increase the risk of IBD. On the contrary, a reduction in the risk of IBD was observed in patients vaccinated before the age of 18 months [117].

Dysbiosis

Disturbed equilibrium between protective and harmful species, so called dysbiosis, has been suspected to play a role in IBD [118]. The recently developed metagenomic approach allows to investigate the composition of bacterial intestinal flora. It has shown a reduced proportion (particularly *Clostridium leptum*) and diversity of *Firmicutes*

bacteria as well as the presence of new bacterial species in patients with CD [119]. Composition of bacterial flora is genetically determined but environmental factors such as mode of childbirth, weaning practices, and local environmental variables (hospital bacteria, level of hygiene, etc.) may influence it. Also, antibiotics may intervene, as it has been showed recently by a study based upon a prospective cohort of patients (representing 5% of the United Kingdom population) monitored by British general practitioners, the General Practice Research Database [120]. At each visit, the physicians noted their observations, diagnoses and prescribed treatment. Within this database, 587 patients were identified as suffering from CD and were compared with 1,460 matched controls. CD patients were more frequently smokers (28% of cases *versus* 20% of controls) and had more often received antibiotic treatment in the 2 to 5 year period prior to CD diagnosis (71% of cases *versus* 58% of controls). Such an association is not necessarily causal and it can be hypothesized that antibiotics were prescribed for symptoms erroneously interpreted as intestinal infections, whilst they were in fact revealing the onset of CD. However, if the analysis was restricted to patients with neither gastrointestinal symptoms nor gastrointestinal targeted treatment in the 3 to 5 year period immediately prior to diagnosis, the excessive risk induced by antibiotics was unaltered. The detrimental role of antibiotics was recently evidenced in a model of sodium dextran sulphate-induced inflammatory colitis in Myd88 gene invalidated mice (Myd88 is a protein activated by the binding of TLR4 with its bacterial ligands such as LPS) [121]. Colonic lesions were more severe among mice treated with antibiotics, suggesting the role of the intestinal flora in the maintenance of epithelial integrity.

Psychological stress

It is clearly established that patients with IBD have more often anxiety and depression disorders than matched controls [122]. While it is likely that IBD leads to anxiety and depression, the reverse is controversial. The role of stress in IBD onset or relapse is frequently evoked by patients. Stress plays a role in certain animal models of inflammatory colitis [123]. It has been shown that stress may disturb gut permeability in patients with IBD [124]. Furthermore, two prospective longitudinal studies have shown that life events and/or perceived stress may increase the risk of relapse in IBD patients in remission [125, 126]. One recent study performed in a larger cohort of patients failed to reproduce these results [127]. A recently published case-control study observed an excess of life events in the 6-month period immediately prior to the onset of CD and UC symptoms [128]. However this result was no longer significant in the multivariate analysis. The anxiety and depression scores were higher in CD and UC patients and probably accounted for the perceived increase of life events prior to the diagnosis of IBD. This study did not support an independent association between stress and onset of IBD [128]. Finally, the prevalence of IBD was assessed among 21,062 parents having lost a child aged under 18 years and 293,745 matched parents [129]. No difference in the prevalence of IBD was observed between the two groups: OR = 0.97 (CI 95% [0.76-1.34]).

These studies do not support the role of life events and/or perceived stress in the onset or relapses of either CD or UC.

Socio-economic factors

The majority of studies have showed that IBD is more common among the most socially advantaged groups [16, 130]. For example, Sonnenberg et al. demonstrated, *via* analysis of German social security figures, that the incidence of IBD was higher among white-collar workers than among blue-collar workers [131]. A Danish prospective study observed that sedentary professions were exposed to an excess risk of IBD [132]. Most epidemiologic studies have also found that CD incidence was higher in urban than in rural areas [131, 133].

The higher frequency of IBD among more sedentary, urban and upper class subjects may be secondary to other factors such as physical exercise, sunlight exposure, domestic hygiene and environment.

Environmental factors and theories of IBD

The hygiene hypothesis

The hygiene hypothesis is the leading theory of IBD. Originally raised for allergic diseases, this hypothesis has also been advocated in IBD. It theorizes that a lack of exposures to enteric pathogens makes one susceptible to CD. Childhood infections and poor hygiene may protect one from developing CD by allowing the host to develop tolerance or immunity to agents that could trigger CD later in life. There are numerous results consistent with the hygiene hypothesis in IBD. Firstly, two case-control studies revealed a more frequent hot water supply among patients presenting with CD than among controls [134, 135]. In one study, separate bathrooms were more frequent among CD patients than among controls. However, no difference between patients presenting with UC and controls was evidenced. Nowadays, all, or almost all, households in developed countries have a hot water supply; this factor can consequently no longer provide significant results in case-control studies, but it may well have encouraged the increased incidence of CD in previous decades. Secondly, three studies have demonstrated a lower frequency of anti *Helicobacter pylori* IgG among patients presenting with CD compared to controls [29, 136, 137]; however a further study failed to reproduce this result [135]. Thirdly, allergy is more frequently observed among CD patients than among controls, and it is reasonable to conclude that both diseases, whose incidence has simultaneously increased, commonly involve environmental factors. Yet, it has been demonstrated that contact with stables and consumption of non-pasteurised milk before the age of 1 year protects against the onset of allergy and IBD [138], whilst the level of endotoxins in the environment is inversely correlated to the incidence of allergy among children [137]. Fourthly, IBD is rare and helminthiasis frequent in developing countries [140]. An open trial suggests that helminth eggs could have a therapeutic effect in CD [141]. A controlled phase II study also suggests that helminth eggs have a beneficial effect in UC [142].

The hygiene hypothesis has been theorized by Rook et al. [143]. According to these authors, hygiene has led to decreased infectious mortality and morbidity, but has distanced man from the micro-organisms which, hitherto, played a regulatory role in the immune system function ("old friends"): *Lactobacillus* (abundantly present in fermented dairy products), environmental saprophytic mycobacteria (which thrive in untreated water, but are absent from chlorinated water), helminths. The price to pay for decreased infectious mortality would appear to be the increase in allergic disease and inflammatory diseases such as IBD.

Infectious theory

Several studies suggest that infection plays a prominent role in IBD. Firstly, IBD in spouses is more frequent than chance would predict. Secondly, neither the Gilat study nor the EPIMAD registry study have provided data in favour of the hygiene hypothesis in CD and UC [28, 30]. On the contrary, the EPIMAD study concludes an increased risk of UC among children having shared their bedroom with their brothers and sisters. Thirdly, several case-control studies have evidenced an increased incidence of respiratory, intestinal or perinatal infections among patients compared to controls [53, 54]. Fourthly, two case control studies have showed that having a pet was associated with an increased risk of IBD [28, 32].

Both hygiene and infectious hypotheses are not mutually exclusive. It can be hypothesized that disturbed mucosal and/or systemic immunoregulation induced by a high level of hygiene in early infancy may be a risk factor for IBD triggered by an infectious agent in adolescence or early adulthood.

The cold chain hypothesis

The cold chain theory unifies both the hygiene and the infectious hypotheses [144]. It can be summarized as follows: "The NOD2 mutation are thought to have occurred during the plague epidemic which struck Europe in the 14th Century. It provided increased resistance to this disease. The arrival of the refrigerator in the early 1940s in the United States and in Scandinavia coincides with an increase in the incidence of Crohn's disease. Some bacteria referred to as psychotropic (*Listeria*, *Yersinia*) survive in refrigerators. One of them, *Yersinia* contains a protein named Yop which normally inhibits the activation of NFκB via an interaction with NOD2 (wild phenotype). Yet, it has been demonstrated that NOD2 mutations leading to an increased risk of CD have a loss of function of this protein. In other words, in individuals with NOD2 mutations, Yop could induce a loss of inhibition, i.e. an activation of NFκB".

Conclusion

IBD is the result of the combination of predisposing genes and environmental factors. All of the results presented herewith suggest that the increased incidence of IBD is related to a change introduced within our living environment during the decades following World War II. It could be an altered composition of faecal flora or the involvement of a

low pathogenic agent transported by a vector (water from a well, natural source or a swimming pool, non-pasteurised milk, refrigerator) and which may trigger CD among genetically vulnerable individuals. Studies showing an association between MAP, AIEC and IBD are accumulating. Furthermore, the recent discovery that genes that control autophagy (IRGM and ATG16L1) are predisposing factors for CD support the idea that subgroups of patients may harbour genetic mutations which lead to the persistence of specific microorganisms within the intestinal mucosa and may contribute to the chronic inflammation of the intestinal mucosa. However, criteria of causality have not been reached for any of these infectious agents. This three partner scenario (genetic predisposition, low pathogenic bacteria, environmental vector) does not exclude the role of cofactors such as tobacco (which reduces the bactericidal activity of macrophages towards intracellular bacteria), oral contraception or food composition. Many factors have been studied. Nevertheless, the results of one study are often contradicted by another and, consequently, to date, only the role of tobacco and appendectomy has been firmly established and reproduced by many studies. Smoking modifies the risk of developing IBD, increasing the risk of CD and decreasing that of UC. In addition, smoking exerts a considerable effect on the course of the disease, improving UC and worsening CD, and smoking cessation is followed rapidly by reversal of the effect. In CD, smoking is harmful and persuading patients to stop smoking is probably the most cost-effective strategy for controlling disease activity. As exemplified by smoking, research of environmental risk factors of IBD is useful since it may lead an improved disease course among patients and perhaps, to appropriate prevention among predisposed subjects. Further studies in this field are eagerly awaited.

Conflict of interest:

Franck Carbonnel did expert reports for UCB. He attended conferences organised by Ferring, Schering and UCB. UCB, Abbott, Ferring and Schering offered travels to congresses. Prévost Jantchou has no conflict of interest. Elisabeth Monnet has no conflict of interest. Jacques Cosnes has no conflict of interest.

References

- [1] Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 2003;3: 521-33.
- [2] Sartor RB. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2006;3:390-407.
- [3] Wellcome trust case control consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 2007;447:661-78.
- [4] Hisamatsu T, Suzuki M, Reinecker HC, Hadeau WJ, McCormick BA, Podolsky DK. CARD15/NOD2 functions as an anti-bacterial factor in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2003;124:993-1000.
- [5] Singh SB, Davis AS, Taylor GA, Deretic V. Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria. *Science* 2006;313,1438-41.
- [6] Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, Till A, Teuber M, Huse K, et

- al. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet* 2007;39:207-11.
- [7] Binder V. Epidemiology of IBD during the twentieth century: an integrated view. *Best Pract Res Gastroenterol* 2004;18:463-79.
- [8] Evans JG, Acheson ED. An epidemiological study of ulcerative colitis and regional enteritis in the Oxford area. *Gut* 1965;6:311-24.
- [9] Binder V, Both H, Hansen PK, Hendriksen C, Kreiner S, Torp-Pedersen K. Incidence and prevalence of ulcerative colitis and Crohn's disease in the County of Copenhagen, 1962 to 1978. *Gastroenterology* 1982;83:563-8.
- [10] Rose JD, Roberts GM, Williams G, Mayberry JF, Rhodes J. Cardiff Crohn's disease jubilee: the incidence over 50 years. *Gut* 1988;29:346-51.
- [11] Ekblom A, Helmick C, Zack M, Adami HO. The epidemiology of inflammatory bowel disease: a large, population-based study in Sweden. *Gastroenterology* 1991;100:350-8.
- [12] Munkholm P, Langholz E, Nielsen OH, Kreiner S, Binder V. Incidence and prevalence of Crohn's disease in the county of Copenhagen, 1962-87: a six-fold increase in incidence. *Scand J Gastroenterol* 1992;27:609-14.
- [13] Gower-Rousseau C, Salomez JL, Dupas JL, Marti R, Nuttens MC, Votte A, et al. Incidence of inflammatory bowel disease in Northern France (1988-1990). *Gut* 1994;35:1433-8.
- [14] Molinié F, Gower-Rousseau C, Yset T, Merle V, Grandbastien B, Marti R, et al. Opposite evolution in incidence of Crohn's disease and ulcerative colitis in Northern France (1988-1999). *Gut* 2004;53:843-8.
- [15] Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R, Fear H, Price A, Carpenter L, et al. Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between North and South? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut* 1996;39:690-7.
- [16] Lapidus A, Bernell O, Hellers G, Persson PG, Lofberg R. Incidence of Crohn's disease in Stockholm County 1955-1989. *Gut* 1997;41:480-6.
- [17] Yapp TR, Stenson R, Thomas GAO, Lawrie BW, Williams GT, Hawthorne AB. Crohn's disease incidence in Cardiff from 1930: an update for 1991-1995. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000;12:907-11.
- [18] Jacobsen BA, Fallingborg J, Rasmussen HH, Nielsen KR, Drewes AM, Puho E, et al. Increase in incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in Northern Denmark: a population-based study, 1978-2002. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006;18:601-6.
- [19] Sonnenberg A, McCarty D. Geographic variation of inflammatory bowel disease within the United States. *Gastroenterology* 1991;100:143-9.
- [20] Armitage E, Aldhous MC, Anderson H, Drummond HE, Riemersma RA, Ghosh S, et al. Incidence of juvenile-onset Crohn's disease in Scotland: association with Northern latitude and affluence. *Gastroenterology* 2004;127:1051-7.
- [21] Herich V, Monnet E, Etienne A, Louafi S, Ramee C, Rican S, et al. Geographical variations of inflammatory bowel disease in France: a study based on national health insurance data. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:218-26.
- [22] Cavalli Sforza L. Genes, peoples and languages. *Proc Natl Acad Sci* 1997;94:7719-24.
- [23] Van der Mei IA, Ponsonby AL, Blizzard L, Dwyer T. Regional variation in multiple sclerosis prevalence in Australia and its association with ambient ultraviolet radiation. *Neuroepidemiology* 2001;20:168-74.
- [24] Van der Mei IAF, Ponsonby AF, Dwyer T, Blizzard L, Simmons R, Taylor BV, et al. Past exposure to sun, skin phenotype and risk of multiple sclerosis: case control study. *Br Med J* 2003;327:42:334-6.
- [25] Vukusic S, Van Bockstael V, Gosselin S, Confavreux C. Regional variations in the prevalence of multiple sclerosis in French farmers. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007;78:707-9.
- [26] Green C, Elliott L, Beaudoin C, Bernstein CN. A population-based ecologic study of inflammatory bowel disease: searching for etiologic clues. *Am J Epidemiol* 2006;164:615-23.
- [27] Halfvarson J, Bodin L, Tysk C, Lindberg E, Jarnerot G. Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: a long-term follow-up of concordance and clinical characteristics. *Gastroenterology* 2003;124:1767-73.
- [28] Hugot JP, Cézard JP, Colombel JF, Belaiche J, Almer S, Tysk C, et al. Clustering of Crohn's disease within affected sibships. *Eur J Hum Genet* 2003;11:179-84.
- [29] Laharie D, Debeugny S, Peeters M, Van Gossum A, Gower-Rousseau C, Bélaiche J, et al. Inflammatory bowel disease in spouses and their offspring. *Gastroenterology* 2001;120:816-9.
- [30] Van Kruiningen HJ, Freda BJ. A clustering of Crohn's disease in Mankato, Minnesota. *Inflamm Bowel Dis* 2001;7:27-33.
- [31] Gilat T, Hachoen D, Litos P, Langman MJS. Childhood factors in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* 1987;22:1009-24.
- [32] Feeney MA, Murphy F, Clegg AJ, Trebble TM, Sharer NM, Snook JA. A case-control study of childhood environmental risk factors for the development of inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002;14:529-34.
- [33] Baron S, Turck D, Leplat C, Merle V, Gower-Rousseau C, Marti T, et al. Environmental risk factors in paediatric inflammatory bowel diseases: a population based case control study. *Gut* 2005;54:357-63.
- [34] Van Kruiningen HJ, Joosens M, Vermeire S, Joosens S, Debeugny S, Gower-Rousseau C, et al. Environmental factors in familial Crohn's disease in Belgium. *Inflamm Bowel Dis* 2005;11:360-5.
- [35] Amre DK, Lambrette P, Law L, Krupoves A, Chotard V, Costea F, et al. Investigating the hygiene hypothesis as a risk factor in pediatric onset Crohn's disease: a case-control study. *Am J Gastroenterol* 2006;101:1005-11.
- [36] Radon K, Windstetter D, Poluda AL, Mueller B, von Mutius E, Koletzko S. Contact with farm animals in early life and juvenile inflammatory bowel disease: a case-control study. *Pediatrics* 2007;120:354-61.
- [37] Cosnes J. Tobacco and IBD: relevance in the understanding of disease mechanisms and clinical practice. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004;18:481-96.
- [38] Calkins BM. A meta-analysis of the role of smoking in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 1989;34:1841-54.
- [39] Mokbel M, Carbonnel F, Beaugerie L, Gendre JP, Cosnes J. Effet du tabac sur l'évolution à long terme de la rectocolite hémorragique. *Gastroenterol Clin Biol* 1998;22:858-62.
- [40] Beaugerie L, Massot H, Carbonnel F, Cattani S, Gendre JP, Cosnes J. Impact of cessation of smoking on the course of ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2001;96:2113-6.
- [41] Cosnes J, Beaugerie L, Carbonnel F, Gendre JP. Smoking cessation and the course of Crohn's disease: an intervention study. *Gastroenterology* 2001;120:1093-9.
- [42] Sher ME, Bank S, Greenberg R, Sardinha TC, Weissman S, Bailey B, et al. The influence of cigarette smoking on cytokine levels in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 1999;5:73-8.
- [43] King Jr TE, Savici D, Campbell PA. Phagocytosis and killing of *Listeria monocytogenes* by alveolar macrophages: smokers versus nonsmokers. *J Infect Dis* 1988;158:1309-16.
- [44] Otterbein LE, Bach FH, Alam J, Soares M, Tao Lu H, Wysk M, et al. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med* 2000;6:422-8.
- [45] Koutroubakis IE, Vlachonikolis IG, Kouroumalis EA. Role of appendicitis and appendectomy in the pathogenesis of ulce-

- rative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2002;8:77-86.
- [46] Frisch M. Inverse association between appendectomy and ulcerative colitis. *Br Med J* 2006;332:561-2.
- [47] Andersson RE, Olaison G, Tysk C, Ekblom A. Appendectomy and protection against ulcerative colitis. *II Engl J Med* 2001;344:808-14.
- [48] Frisch M, Johansen C, Møllmark L, Engels EA, Gridley G, Biggar RJ, et al. Appendectomy and subsequent risk of inflammatory bowel diseases. *Surgery* 2001;130:36-43.
- [49] Cosnes J, Carbonnel F, Beaugerie L, Blain A, Rejjasse D, Gendre JP. Effects of appendectomy on the course of ulcerative colitis. *Gut* 2002;51:803-7.
- [50] D'Haens G, Geboes K, Peeters M, Baert F, Ectors H, Rutgeerts P. Patchy cecal inflammation associated with distal ulcerative colitis: a prospective endoscopic study. *Am J Gastroenterol* 1997;92:1275-9.
- [51] Waraich T, Sarsfield P, Wright DH. The accessory cell populations in ulcerative colitis: a comparison between the colon and appendix in colitis and acute appendicitis. *Hum Pathol* 1997;28:297-303.
- [52] Mombaerts P, Mizoguchi E, Grusby MJ, Glimcher LH, Bhan AK, Tonegawa S. Spontaneous development of inflammatory bowel disease in T cell receptor mutant mice. *Cell* 1993;75:275-82.
- [53] Mizoguchi A, Mizoguchi E, Chiba C, Bhan AK. Role of appendix in the development of inflammatory bowel disease in TCR- α mutant mice. *J Exp Med* 1996;184:707-15.
- [54] Kaplan GG, Pedersen BV, Andersson RE, Sands BE, Korzenik J, Frisch M. The risk of developing Crohn's disease after an appendectomy: a population-based cohort study in Sweden and Denmark. *Gut* 2007;56:1387-92.
- [55] Cosnes J, Seksik P, Nion-Larmurier I, Beaugerie L, Gendre JP. Prior appendectomy and the phenotype and course of Crohn's disease. *World J Gastroenterol* 2006;12:1234-42.
- [56] Whorwell PJ, Holdstock G, Whorwell GM, Wright R. Bottle feeding, early gastroenteritis, and inflammatory bowel disease. *Br Med J* 1979;1:382.
- [57] Ekblom A, Adami HO, Helmick CG, Jonzon A, Zack MM. Perinatal risk factors for inflammatory bowel disease: a case-control study. *Am J Epidemiol* 1990;132:1111-9.
- [58] Wakefield AJ, Pittillo RM, Sim R, Cosby SL, Stephenson JR, Dhillon AP, et al. Evidence of persistent measles virus infection in Crohn's disease. *J Med Virol* 1993;39:345-53.
- [59] Afzal MA, Minor PD, Begley J, Bentley ML, Armitage E, Ghosh S, et al. Absence of measles-virus genome in inflammatory bowel disease. *Lancet* 1998;351:646-7.
- [60] Haga Y, Funakoshi O, Kuroe K, Kanazawa K, Nakajima H, Saito H, et al. Absence of measles viral genomic sequence in intestinal tissues from Crohn's disease by nested polymerase chain reaction. *Gut* 1996;38:211-5.
- [61] Thompson HP, Montgomery SM, Pounder RE, Wakefield AJ. Is measles vaccination a risk factor for inflammatory bowel disease? *Lancet* 1995;345:1071-4.
- [62] Morris DL, Montgomery SM, Thompson HP, Ebrahim S, Pounder RE, Wakefield AJ. Measles vaccination and inflammatory bowel disease: a national British cohort study. *Am J Gastroenterol* 2000;95:3507-12.
- [63] Feeney M, Clegg A, Winwood P, Snook J. A case-control study of measles vaccination and inflammatory bowel disease. *Lancet* 1997;350:764-6.
- [64] Davis RL, Kramarz P, Bohlke K, Benson P, Thompson RS, Mullooly J, et al. Measles-mumps-rubella and other measles-containing vaccines do not increase the risk for inflammatory bowel disease: a case-control study from the Vaccine Safety Datalink project. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2001;155:354-9.
- [65] Seagroatt V, Goldacre MJ. Crohn's disease, ulcerative colitis, and measles vaccine in an English population, 1979-1998. *J Epidemiol Community Health* 2003;57:883-7.
- [66] Ekblom A, Daszak P, Kraaz W, Wakefield AJ. Crohn's disease after *in utero* measles virus exposure. *Lancet* 1996;348:515-17.
- [67] Jones P, Fine P, Piracha S. Crohn's disease and measles. *Lancet* 1997;349:473.
- [68] Pardi DS, Tremaine WJ, Sandborn WJ, Loftus EV, Poland GA, Harmsen WS, et al. Early measles virus infection is associated with the development of inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2000;95:1480-5.
- [69] Ekblom A, Wakefield AJ, Zack M, Adami HO. Perinatal measles infection and subsequent Crohn's disease. *Lancet* 1994;344:508-10.
- [70] Fisher HC, Yee L, Hightingale P, McEwan R, Gibson JA. Measles virus serology in Crohn's disease. *Gut* 1997;41:66-9.
- [71] Liu Y, van Kruiningen HJ, West AB, Cartun RW, Cortot A, Colombel JF. Immunocytochemical evidence of *Listeria*, *Escherichia coli*, and *Streptococcus* antigens in Crohn's disease. *Gastroenterology* 1995;108:1396-404.
- [72] Chen W, Li D, Paulus B, Wilson I, Chadwick VS. Detection of *Listeria monocytogenes* by polymerase chain reaction in intestinal mucosal biopsies from patients with inflammatory bowel disease and controls. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:1145-50.
- [73] Walmsley RS, Anthony A, Sim R, Pounder RE, Wakefield AJ. Absence of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Klebsiella pneumoniae* antigens within inflammatory bowel disease tissues. *J Clin Pathol* 1998;51:657-61.
- [74] Chiba M, Fukushima T, Inoue S, Horie Y, Iizuka M, Masamune O. *Listeria monocytogenes* in Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* 1998;33:430-4.
- [75] Shanahan F, O'Mahony J. The mycobacteria story in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2005;100:1537-8.
- [76] Haser SA, Ghobrial G, Romero C, Valentine JF. Culture of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from the blood of patients with Crohn's disease. *Lancet* 2004;364:1039-44.
- [77] Autschbach F, Eissold S, Hinz U, Zinser S, Linnebacher M, Giese T, et al. High prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* IS900 DNA in gut tissues from individuals with Crohn's disease. *Gut* 2005;54:944-9.
- [78] Feller M, Huwiler K, Stephan R, Altpeter E, Shang A, Furrer H, et al. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2007;7:607-13.
- [79] Ryan P, Bennett MW, Aarons S, Lee G, Collins JK, O'Sullivan GC, et al. PCR detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in Crohn's disease granulomas isolated by laser capture microdissection. *Gut* 2002;51:665-70.
- [80] Ryan P, Kelly RG, Lee G, Collins JK, O'Sullivan GC, O'Connell J, et al. Bacterial DNA within granulomas of patients with Crohn's disease-detection by laser capture microdissection and PCR. *Am J Gastroenterol* 2004;99:1539-43.
- [81] Selby W, Pavli P, Crotty B, Florin T, Radford-Smith G, Gibson P, et al. Two-year combination antibiotic therapy with clarithromycin, rifabutin, and clofazimine for Crohn's disease. *Gastroenterology* 2007;132:2313-9.
- [82] Darfeuille-Michaud A, Heut C, Barnich N, Lederman E, Di Martino P, Desreumaux P, et al. Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 1998;115:1405-13.
- [83] Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P, Heut C, Glasser AL, Barnich N, et al. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2004;127:412-21.
- [84] Glasser AL, Boudeau J, Barnich N, Perruchot MH, Colombel JF, Darfeuille-Michaud A. Adherent Invasive *Escherichia coli* strains from patients with Crohn's disease survive and replicate within macrophages without inducing host cell death. *Infect Immun* 2001;69:5529-37.
- [85] Barnich N, Carvalho FA, Glasser AL, Darcha C, Jantschkeff P,

- Allez M, et al. CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive *E. coli*, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease. *J Clin Invest* 2007;117:1566-74.
- [86] van Heel DA, Ghosh S, Butler M, Hunt KA, Lundberg AM, Ahmad T, et al. Muramyl dipeptide and toll-like receptor sensitivity in I10D2-associated Crohn's disease. *Lancet* 2005;365:1794-6.
- [87] Barreau F, Meizner U, Chareyre F, Berrebi D, Iliwa-Kawakita M, Dussaillant M, et al. CARD15/I10D2 is required for Peyer's patches homeostasis in mice. *PLoS ONE* 2007;2:e523.
- [88] Riordan AM, Ruxton CH Hunter JO. A review of associations between Crohn's disease and consumption of sugars. *Eur J Clin Nutr* 1998;52:229-38.
- [89] Katschinski B, Logan RF, Edmond M, Langman MJ. Smoking and sugar intake are separate but interactive risk factors in Crohn's disease. *Gut* 1988;29:1202-6.
- [90] Russel MG, Engels LG, Muris JW, Limonard CB, Volovics A, Brummer RJ, et al. Modern life in the epidemiology of inflammatory bowel disease: a case-control study with special emphasis on nutritional factors. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1998;10:243-9.
- [91] Reif S, Klein I, Lubin F, Farbstein M, Hallak A, Gilat T. Pre-illness dietary factors in inflammatory bowel disease. *Gut* 1997;40:754-60.
- [92] Brauer PM, Gee MI, Grace M, Thomson AB. Diet of women with Crohn's and other gastrointestinal diseases. *J Am Diet Assoc* 1983;82:659-64.
- [93] Geerling BJ, Dagnelie PC, Badart-Smook A, Russel MG, Stockbrugger RW, Brummer RJ. Diet as a risk factor for the development of ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2000;95:1008-13.
- [94] Sonnenberg A. Geographic and temporal variations of sugar and margarine consumption in relation to Crohn's disease. *Digestion* 1988;41:161-71.
- [95] Shoda R, Matsueda K, Yamato S, Umeda H. Epidemiologic analysis of Crohn's disease in Japan: increased dietary intake of n-6 polyunsaturated fatty acids and animal protein relates to the increased incidence of Crohn's disease in Japan. *Am J Clin Nutr* 1996;63:741-5.
- [96] Persson PG, Ahlbom A, Hellers G. Diet and inflammatory bowel disease: a case-control study. *Epidemiology* 1992;3:47-52.
- [97] Boyko EJ, Perera DR, Koepsell TD, Keane EM, Inui TS. Coffee and alcohol use and the risk of ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 1989;84:530-4.
- [98] Ekblom A. Environmental risk factors (excluding tobacco and microorganisms): a critical analysis of old and new hypotheses. *Best Res Clin Gastroenterol* 2004;18:497-508.
- [99] Lomer MCE, Thompson RPH and Powell JJ. Fine and ultrafine particles of the diet: influence on the mucosal immune response and association with Crohn's disease. *Proc Nutr Soc* 2002;61:123-30.
- [100] Lomer MC, Hutchinson C, Volkert S, Greenfield SM, Catterall A, Thompson RP, et al. Dietary sources of inorganic microparticles and their intake in healthy subjects and patients with Crohn's disease. *Br J Nutr* 2004;92:947-55.
- [101] Lomer MC, Harvey RS, Evans SM, Thompson RP, Powell JJ. Efficacy and tolerability of a low microparticle diet in a double blind, randomized, pilot study in Crohn's disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001;13:101-6.
- [102] Lomer MC, Grainger SL, Ede R, Catterall AP, Greenfield SM, Cowan RE, et al. Lack of efficacy of a reduced microparticle diet in a multi-centred trial of patients with active Crohn's disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005;17:377-84.
- [103] Corrao G, Tragnone A, Caprilli R, Trallori G, Papi C, Andreoli A, et al. Risk of inflammatory bowel disease attributable to smoking, oral contraception and breastfeeding in Italy: a nationwide case-control study. Cooperative Investigators of the Italian Group for the Study of the Colon and the Rectum (GISC). *Int J Epidemiol* 1998;27:397-404.
- [104] Rigas A, Rigas B, Glassman M, Yen YY, Lan SJ, Petridou E, et al. Breast-feeding and maternal smoking in the etiology of Crohn's disease and ulcerative colitis in childhood. *Ann Epidemiol* 1993;3:387-92.
- [105] Bergstrand O, Hellers G. Breast-feeding during infancy in patients who later develop Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* 1983;18:903-6.
- [106] Koletzko S, Sherman P, Corey M, Griffiths A, Smith C. Role of infant feeding practices in development of Crohn's disease in childhood. *Br Med J* 1989;298:1617-8.
- [107] Thompson HP, Pounder RE, Wakefield AJ. Perinatal and childhood risk factors for inflammatory bowel disease: a case-control study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995;7:385-90.
- [108] Gruber M, Marshall JR, Zielezny M, Lance P. A case-control study to examine the influence of maternal perinatal behaviours on the incidence of Crohn's disease. *Gastroenterol Nurs* 1996;19:53-9.
- [109] Klement E, Cohen RV, Boxman J, Joseph A, Reif S. Breastfeeding and risk of inflammatory bowel disease: a systematic review with meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 2004;80:1342-52.
- [110] Sears MR, Greene JM, Willan AR, Taylor DR, Flannery EM, Cowan JO, et al. Long-term relation between breastfeeding and development of atopy and asthma in children and young adults: a longitudinal study. *Lancet* 2002;360:901-7.
- [111] Godet PG, May GR, Sutherland LR. Meta-analysis of the role of oral contraceptive agents in inflammatory bowel disease. *Gut* 1995;37:668-73.
- [112] García Rodríguez LA, González-Pérez A, Johansson S, Wallander MA. Risk factors for inflammatory bowel disease in the general population. *Aliment Pharmacol Ther* 2005;22:309-15.
- [113] Cosnes J, Carbonnel F, Carrat F, Beaugierie L, Gendre JP. Oral contraceptive use and the clinical course of Crohn's disease: a prospective cohort study. *Gut* 1999;45:218-22.
- [114] Timmer A, Sutherland LR, Martin F. Oral contraceptive use and smoking are risk factors for relapse in Crohn's disease. *Gastroenterology* 1998;114:1143-50.
- [115] Wright JP. Factors influencing first relapse in patients with Crohn's disease. *J Clin Gastroenterol* 1992;15:12-6.
- [116] Sutherland LR, Ramcharan S, Bryant H, et al. Effect of oral contraceptive use on reoperation following surgery for Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 1992;37:1377-82.
- [117] Davis RL, Kramarz P, Bohlke K, Benson P, Thompson RS, Mullooly J, et al. Measles-mumps-rubella and other measles-containing vaccines do not increase the risk for inflammatory bowel disease: a case-control study from the Vaccine Safety Datalink project. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2001;155:354-9.
- [118] Tamboli CP, Heut C, Desreumaux P, Colombel JF. Dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut* 2004;53:1-4.
- [119] Seksik P, Rigottier-Gois L, Gramet G, Sutren M, Pochart P, Marteau P, et al. Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut* 2003;52:237-42.
- [120] Card T, Logan RF, Rodrigues LC, Wheeler JG. Antibiotic use and the development of Crohn's disease. *Gut* 2004;53:246-50.
- [121] Rakoff-Hahoum S, Paglino J, Eslami-Varzanzh F, Edberg S, Medzithov R. Recognition of commensal microflora by Toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 2004;118:229-41.
- [122] Drossmann DA. Psychosocial factors in ulcerative colitis and Crohn's disease in Kirsner JB ed. *Inflammatory bowel disease*. 5th Edition. Philadelphia: WB Saunders, 2000:342-57.
- [123] Qiu BS, Vallance BA, Blennerhassett PA, Collins SM. The role of CD4+ lymphocytes in the susceptibility of mice to stress-induced reactivation of experimental colitis. *Nat Med* 1999;5:1178-82.
- [124] Mawdsley JE, Macey MG, Feakins RM, Langmead L, Rampton DS. The effect of acute psychological stress on systemic and rectal mucosal measures of inflammation in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2006;131:410-9.

- [125] Levenstein S, Prantera C, Varvo V, Scribano ML, Andreoli A, Luzi C, et al. Stress and exacerbation in ulcerative colitis: a prospective study of patients enrolled in remission. *Am J Gastroenterol* 2000;95:1213-20.
- [126] Bitton A, Sewitch MJ, Peppercorn MA, deB Edwardes M, Shah S, Ransil B, et al. Psychosocial determinants of relapse in ulcerative colitis: a longitudinal study. *Am J Gastroenterol* 2003;98:2203-8.
- [127] Vidal A, Gomez-Gil E, Sans M, Portella MJ, Salameo M, Pique JM, et al. Life events and inflammatory bowel disease relapse: a prospective study of patients enrolled in remission. *Am J Gastroenterol* 2006;101:775-81.
- [128] Lerebours E, Gower-Rousseau C, Merle V, Brazier F, Debeugny S, Marti R, et al. Stressful life events as a risk factor for inflammatory bowel disease onset: a population-based case-control study. *Am J Gastroenterol* 2007;102:122-31.
- [129] Li J, Nørgård B, Precht DH, Olsen J. Psychological stress and inflammatory bowel disease: a follow-up study in parents who lost a child in Denmark. *Am J Gastroenterol* 2004;99: 1129-33.
- [130] Sandler RS, Eisen GM. Epidemiology of inflammatory bowel disease in Kirsner JB ed. *Inflammatory bowel disease*. 5th Edition. Philadelphia: WB Saunders, 2000:89-112.
- [131] Sonnenberg A. Disability from inflammatory bowel disease among employees in West Germany. *Gut* 1989;30:367-70.
- [132] Boggild H, Orhede E, Tuchsén F. Occupation, employment status and chronic inflammatory bowel disease in Denmark. *Int J Epidemiol* 1996;25:630-7.
- [133] Blanchard JF, Bernstein CN, Wajda A, Rawsthorne P. Small-area variations and sociodemographic correlates for the incidence of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Am J Epidemiol* 2001; 154:328-35.
- [134] Gent AE, Hellier MD, Grace RH, Swarbrick ET, Coggon D. Inflammatory bowel disease and domestic hygiene in infancy. *Lancet* 1994;343:766-7.
- [135] Duggan AE, Usmani I, Neal KR, Logan RFA. Appendectomy, childhood hygiene, *Helicobacter pylori* status, and risk of inflammatory bowel disease: a case control study. *Gut* 1998; 43:494-8.
- [136] El-Omar E, Penman I, Cruikshank G, Dover S, Banerjee S, Williams C, et al. Low prevalence of *Helicobacter pylori* in inflammatory bowel disease: association with sulphasalazine. *Gut* 1994;36:1385-8.
- [137] Halme I, Rautelin H, Leidenius M, Kosunen TU. Inverse correlation between *Helicobacter pylori* infection and inflammatory bowel disease. *J Clin Pathol* 1996;49:65-7.
- [138] Riedler J, Braun-Fahrlander C, Eder W, Schreuer M, Waser M, Maisch S, et al. Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross sectional survey. *Lancet* 2001;358:1129-33.
- [139] Braun-Fahrlander C, Riedler J, Herz U, Eder W, Waser M, Grize L, et al. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N Engl J Med* 2002;347: 869-77.
- [140] Elliott DE, Urban JF JR, Argo CK, Weinstock JV. Does the failure to acquire helminthic parasites predispose to Crohn's disease? *FASEB J*. 2000 ;14:1848-55.
- [141] Summers RW, Elliott DE, Urban JF, Thompson R, Weinstock JV. *Trichuris suis* therapy in Crohn's disease. *Gut* 2005;54: 87-90.
- [142] Summers RW, Elliott DE, Urban JF Jr, Thompson RA, Weinstock JV. *Trichuris suis* therapy for active ulcerative colitis: a randomized controlled trial. *Gastroenterology* 2005;128:825-32.
- [143] Rook GA, Adams V, Hunt J, Palmer R, Martinelli R, Brunet LR. Mycobacteria and other environmental organisms as immunomodulators for immunoregulatory disorders. *Springer Semin Immunopathol* 2004;25:237-55.
- [144] Hugot JP, Alberti C, Berrebi D, Bingen E, Cezard JP. Crohn's disease: the cold chain hypothesis. *Lancet* 2003;362:2012-5.

Animal Protein Intake and Risk of Inflammatory Bowel Disease: The E3N Prospective Study

Prévost Jantchou, MD¹, Sophie Morois, MSc¹, Françoise Clavel-Chapelon, PhD¹, Marie-Christine Boutron-Ruault, MD, PhD¹ and Franck Carbonnel, MD, PhD^{1,2}

OBJECTIVES: Diet composition has long been suspected to contribute to inflammatory bowel disease (IBD), but has not been thoroughly assessed, and has been assessed only in retrospective studies that are prone to recall bias. The aim of the present study was to evaluate the role of dietary macronutrients in the etiology of IBD in a large prospective cohort.

METHODS: The Etude Épidémiologique des femmes de la Mutuelle Générale de l'Éducation Nationale cohort consists of women living in France, aged 40–65 years, and free of major diseases at inclusion. A self-administered questionnaire was used to record dietary habits at baseline. Questionnaires on disease occurrence and lifestyle factors were completed every 24 months. IBDs were assessed in each questionnaire until June 2005, and subsequently validated using clinical and pathological criteria. We estimated the association between nutrients or foods and IBD using Cox proportional hazards models adjusted for energy intake.

RESULTS: Among 67,581 participants (705,445 person-years, mean follow-up since completion of the baseline dietary questionnaire 10.4 years), we validated 77 incident IBD cases. High total protein intake, specifically animal protein, was associated with a significantly increased risk of IBD, (hazards ratio for the third vs. first tertile and 95% confidence interval being 3.31 and 1.41–7.77 (P trend=0.007), and 3.03 and 1.45–6.34 (P trend=0.005) for total and animal protein, respectively). Among sources of animal protein, high consumption of meat or fish but not of eggs or dairy products was associated with IBD risk.

CONCLUSIONS: High protein intake is associated with an increased risk of incident IBD in French middle-aged women.

Am J Gastroenterol advance online publication, 11 May 2010; doi:10.1038/ajg.2010.192

INTRODUCTION

Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) are chronic inflammatory disorders of the gastrointestinal tract. The pathogenic mechanisms involve epithelial cell barrier dysfunction, defects in the innate immune system that affect its interaction with commensal bacteria, abnormal composition of the bowel microbiota, and dysregulated T-cell function promoting chronic intestinal inflammation (1,2). Genetic predisposition is well documented, particularly in CD, in which several susceptibility genes affecting bacterial clearance, the IL23 pathway, and T-cell function have been identified (3,4). There is also some evidence that environmental factors may have a role in the pathogenesis of inflammatory bowel disease (IBD). First, the incidence of IBD has increased dramatically since World War II, which is inconsistent

with a purely genetic disease (5). Second, migrants who move from a low-incidence area to a high-incidence area have a high risk of IBD (6,7). Few environmental factors have been linked reproducibly with susceptibility in IBD (8). Among them, smoking is the best documented; quitting smoking is a risk factor for UC, whereas continuing smoking is a risk factor for CD (9). Diet composition has long been suspected to contribute to IBD and has been assessed in many studies. With respect to macronutrients, several retrospective case-control studies have found that high intakes of sucrose and fat were associated with CD and/or UC (10–12). However, these associations were prone to recall bias, because of the retrospective design of the studies (13).

In the present prospective study, we tested the hypothesis that the composition of the macronutrient content of the diet is

¹INSERM, UMRS 1018, Team 9, Centre for Research in Epidemiology and Population Health, Institut Gustave Roussy, Université Paris Sud, Villejuif Cedex, France;

²Service d'Hépatogastroentérologie, Centre Hospitalier Universitaire de Bicêtre, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Université Paris Sud, Le Kremlin Bicêtre, France.

Correspondence: Franck Carbonnel, MD, PhD, Service d'Hépatogastroentérologie, Centre Hospitalier Universitaire de Bicêtre, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Université Paris Sud, 78 Rue du Général Leclerc, 94275 Le Kremlin Bicêtre, France. E-mail: franck.carbonnel@bct.aphp.fr

Received 4 January 2010; accepted 6 April 2010

associated with IBD risk. Thus, we investigated the relationship between pre-illness diet composition and risk of incident IBD in a large prospective cohort of women who were free of major diseases at enrollment.

METHODS

The Etude Épidémiologique des femmes de la Mutuelle Générale de l'Éducation Nationale (E3N) is a prospective cohort study conducted in France to study hormonal and dietary risk factors for the most common diseases, especially cancer, in women. The cohort was established in 1990 and consisted of 98,995 women living in France, aged 40–65 years at baseline and insured with the Mutuelle Générale de l'Éducation Nationale, which is a national health insurance scheme for teachers and co-workers (14). E3N is also the French counterpart of the EPIC (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition) study.

Physical activity, reproductive factors, use of hormonal treatments, tobacco consumption, anthropometric measurements, personal history of disease, family history of cancer, and other factors were recorded in self-administered questionnaires that were completed approximately every 24 months. Each questionnaire inquired about the occurrence of personal medical events, and there were specific questions about CD and UC occurrence in each questionnaire until July 2005. All study subjects signed an informed consent form, in compliance with the rules of the French National Commission for Computed Data and Individual Freedom (Commission Nationale Informatique et Libertés), from which we obtained approval.

Dietary data collection

Dietary data were collected once, between June 1993 and July 1995, using a two-part questionnaire. The first part contained questions on the usual amounts and frequency of consumption of foods from the various food groups, while the second included qualitative questions specifying individual foods within the food groups. The questionnaire was used to assess the consumption of 208 food items, beverages, and the recipes used to prepare them. It was accompanied by a booklet of photographs illustrating portion sizes. Both the questionnaire and the booklet were validated (15). A high proportion of subjects (76% for foods and 72% for nutrients) were classified in the same or adjacent quintile for the dietary questionnaire and the mean of 12-monthly 24-h recalls. The reproducibility of the dietary questionnaire was tested after 1 year. The Spearman correlation coefficient for reproducibility was 0.69 for dietary protein, 0.59 for carbohydrates, and 0.73 for fat. The diet history questionnaire was sent to 95,644 women, with two reminders to non-responders. In all, 77,613 completed questionnaires (81.1%) were received. After exclusion of 978 questionnaires because of absence of consent to external health follow-up by the health insurer in case of dropout, 2,050 questionnaires because of miscoded answers, 8 blank questionnaires, and 46 duplicates, 74,531 questionnaires were available for analysis.

Women with extreme values (in the top or bottom 1%) for the energy intake/energy requirement ratio (calculated by taking age,

weight, and height into account) were excluded. The mean daily intake of nutrients was assessed using a food composition table derived from the French national database.

Validation of cases and non-cases

Cases were first identified through the questionnaires, in which the women checked the item "Crohn's disease" or "ulcerative colitis." After exclusion of miscoded answers, a letter was sent to the potential cases in order to confirm their answers and to obtain the names of their physicians. Then a brief questionnaire was sent to the gastroenterologist or general practitioner, requesting for information about diagnostic procedures, final IBD diagnosis after follow-up, location, number of flares, and medical and surgical treatments.

All cases of IBD were reviewed by two of the authors (P.J. and F.C.), in order to confirm or rule out the diagnosis. Definition of IBD was based on clinical, radiological, endoscopic, and histological criteria. We classified cases as certain or possible. Possible IBD cases were those of women, which were considered and treated as IBD, but did not meet all inclusion criteria after a careful review. IBD cases for which radiological or endoscopic data did not enable us to classify them as CD or UC were considered as indeterminate colitis (IC). As IBD presentation, and thus classification, may vary with time, we retained the diagnosis at the latest follow-up.

Non-cases were defined as subjects who never reported a personal history of IBD and were free of cancer at baseline. Because of potential major changes, especially in diet, subjects with incident cancer were censored at the date of cancer diagnosis. Thus, subjects contributed person-time up to the date of IBD diagnosis, date of cancer at any site (other than basal cell skin carcinoma or *in situ* colorectal cancer), date of last completed questionnaire, or July 2005, whichever occurred first.

Among the 74,531 women with available dietary questionnaires, we excluded 4,654 women because of prevalent cancer, 810 who were lost to follow-up after replying to the dietary questionnaire, 1,364 with extreme values of energy intake, and 5 with no information available.

Statistical analysis

The association between dietary factors and IBD was estimated using Cox proportional hazards models with age as the time scale. Age at diagnosis of IBD or at censoring date was used as the end-of-study time variable. Dietary factors that were considered included the macronutrients (carbohydrates, proteins, animal and vegetal proteins, and lipids) and food sources of animal protein: meat (red and white meat), eggs, dairy products (milk and cheese), and fish (fish and seafood). Dietary intake was analyzed in tertiles. To calculate *P* values for trends across tertiles, participants were assigned a score ranging from 1 to 3 according to their tertile of intake and this variable was entered as a continuous term in the Cox regression models. Power calculations indicated that for a bilateral test and alpha risk set at the 5% level, we had a 78%, 93%, and 98% power to detect a hazards ratio (HR) of 2.5, 3.0, or 3.5, respectively, in our main sample using tertiles for

the exposure variable; the corresponding figures were 38%, 54%, and 69%, respectively, for the CD group, and 59%, 78%, and 90%, respectively, for the UC group.

When analyzing macronutrients, adjustment for energy intake was made with the energy partition method, considering energy from carbohydrates, from lipids, and from proteins as three separate mutually adjusted variables (16). Else, when considering subtype of protein intake (vegetable or animal) or food sources of protein intake, covariates were mutually adjusted while adjustment on other sources of energy intake was carried out by adding energy intake from lipids and carbohydrates (non-protein energy) as a covariate in the Cox model. In order to assess the potential impact of dietary changes due to undiagnosed IBD, we carried out sensitivity analyses excluding cases diagnosed within 6 or 12 months after dietary assessment. We

further investigated the effect of additional adjustment for body mass index at baseline, total daily alcohol intake (all as continuous variables), physical activity (tertiles of weekly energy expenditure), oral contraceptive intake, menopause hormonal treatment, smoking status at baseline (former/never/current), and the level of education as proxy for the socio-economic status. Analyses were carried out for all IBD cases, as well as separately for CD and UC. A heterogeneity test was performed to compare the HRs associated with CD and UC risk using the Wald statistics (17). Sensitivity analyses were carried out after exclusion of 16 patients for whom IBD diagnosis was considered only possible (5 CD, 10 UC, and 1 IC cases). All analyses were performed using SAS software, version 9 (SAS Institute, Cary, NC); all statistical tests were two-sided. For all analyses, *P* values <0.05 were considered statistically significant.

Table 1. Baseline characteristics of IBD cases and non-cases in the E3N cohort study

Baseline demographics and lifestyle characteristics	Total incident IBD cases (n=77) ^a	Crohn's disease (n=30)	Ulcerative colitis (n=43)	Non-cases (n=67,504)
<i>Age at dietary questionnaire (year)</i>				
Mean	51.2	50.9	51.4	52.8
Range	43.5–67.6	43.5–67.6	44.1–63.6	41.8–72.0
<i>Age at IBD diagnosis</i>				
Mean	56.3	55.6	56.7	—
Range	46.0–72.5	43.5–67.5	46.0–71.0	—
<i>Time to diagnostic (years)</i>				
Median	4.5	3.7	5.1	—
Interquartile range	2.2–7.9	1.5–8.1	2.5–7.9	—
<i>Anthropometric factors, mean (s.d.)</i>				
Height (cm)	162 (5.4)	163.8 (5.0)	160.6 (5.2)	161 (5.7)
Weight (kg)	60.3 (8.8)	61.2 (9.2)	59.1 (8.4)	60.0 (9.4)
Body mass index (kg/m ²) ^b	23.0 (3.5)	22.8 (3.6)	22.9 (3.5)	23.0 (3.3)
<i>Smoking status, n (%)</i>				
Never smoker	39 (50.7)	16 (53.3)	22 (51.2)	37,911 (56.2)
Former smoker	21 (27.3)	8 (26.7)	12 (27.9)	20,325 (30.1)
Current smoker	17 (22.1)	6 (20.0)	9 (20.9)	9,268 (13.7)
<i>Exogenous hormone use, n (%)</i>				
Ever used HRT ^c	59 (76.6)	23 (76.7)	33 (76.7)	47,848 (70.9)
Ever used oral contraceptive	49 (63.6)	19 (63.3)	27 (62.7)	41,177 (61.0)
<i>Total physical activity^d, n (%)</i>				
Weakly active	28 (36.4)	14 (46.7)	12 (27.9)	22,313 (33.3)
Moderately active	22 (28.6)	9 (30.0)	12 (27.9)	22,384 (33.4)
Active	27 (35.1)	7 (23.3)	19 (44.2)	22,345 (33.4)
HRT, hormone replacement therapy; IBD, inflammatory bowel disease.				
^a Total IBD cases: 30 CD cases, 43 UC cases, and 4 indeterminate colitis.				
^b Weight (kg)/height (m) ² .				
^c HRT: among postmenopausal women only.				
^d Continuous variables are presented as mean (standard deviation). Categorical variables are presented as n (%). Unknown values were excluded from the calculations: physical activity, 0.6%.				

RESULTS

A total of 67,581 participants contributed 705,445 person-years in a mean follow-up of 10.4 years since completion of the dietary questionnaire. Among the entire cohort, 458 women checked the item “Crohn’s disease” or “ulcerative colitis” on the self-administered questionnaire. After investigation, we validated the diagnosis of IBD in 194 women. Among them, 77 women were diagnosed as having IBD after inclusion in the study (incident cases) with a median of 54.5 months follow-up (interquartile range: 26.5–95.5). The 77 women with incident IBD were compared with the 67,504 non-cases. On the basis of available data, 43 cases were classified as UC, 30 cases as CD, and 4 cases as IC. In all, 16 cases were considered as possible and 61 cases were classified as certain (including 33 UC cases, 25 CD cases and 3 cases with IC). The baseline characteristics of cases and non-cases are reported in Table 1.

HRs of IBD according to the dietary intake of macronutrients (expressed as the absolute amount of energy provided by each macronutrient) are presented in Table 2. In a mutually adjusted model, total protein intake, but neither carbohydrates nor lipids, was statistically positively associated with IBD risk (Table 2). When protein intake was expressed per kilogram body weight, mean intakes per tertile were 1.08 g/kg (range: 0.30–1.33), 1.52 g/kg (range: 1.34–1.71), and 2.07 g/kg (range: 1.72–4.46). High intake of protein per kilogram body weight was also significantly associated with IBD risk (HR for the third vs. first tertile of intake = 2.63; 95% CI, 1.23–5.59; *P* for linear trend across tertiles = 0.008). The positive association between high protein intake and IBD risk was restricted to animal protein intake, as there was no significant association with vegetable protein (Table 3). Although no heterogeneity test was statistically significant when comparing UC

Table 2. Mutually adjusted HR estimates and 95% confidence intervals for IBD in relation to macronutrient intake in the E3N cohort (*n*=67,581), 1993–2005

Nutrient	Tertile 1	Tertile 2	Tertile 3	<i>P</i> trend
<i>IBD</i>				
Protein	1 (—)	2.46 (1.15–5.28)	3.31 (1.41–7.77)	0.007
Carbohydrate	1 (—)	0.76 (0.43–1.37)	0.68 (0.37–1.27)	0.26
Fat	1 (—)	1.41 (0.70–2.84)	1.24 (0.57–2.72)	0.77
<i>UC</i>				
Protein	1 (—)	2.83 (1.07–7.48)	3.24 (1.07–9.84)	0.06
Carbohydrate	1 (—)	0.42 (0.19–0.94)	0.51 (0.24–1.08)	0.12
Fat	1 (—)	1.01 (0.41–2.47)	1.47 (0.56–3.84)	0.34
<i>CD</i>				
Protein	1 (—)	1.96 (0.58–6.68)	3.34 (0.90–12.4)	0.04
Carbohydrate	1 (—)	2.01 (0.70–5.72)	1.31 (0.42–4.14)	0.46
Fat	1 (—)	2.27 (0.69–7.45)	0.98 (0.25–3.88)	0.88

CD, Crohn’s disease; IBD, inflammatory bowel disease; HR, hazard ratio; UC, ulcerative colitis.
All nutrient tertiles were calculated from daily intake expressed in absolute amount of energy provided by the nutrient (Kcal/day).

Table 3. HR estimates and 95% confidence intervals for IBD in relation to type of protein in the E3N cohort (*n*=67,581), 1993–2005

Nutrient	Tertile 1	Tertile 2	Tertile 3	<i>P</i> trend
<i>IBD</i>				
Animal protein	1 (—)	2.62 (1.29–5.30)	3.03 (1.45–6.34)	0.005
Vegetable protein	1 (—)	0.91 (0.47–1.77)	1.31 (0.59–2.88)	0.44
<i>UC</i>				
Animal protein	1 (—)	1.62 (0.65–4.02)	3.29 (1.34–8.04)	0.005
Vegetable protein	1 (—)	0.59 (0.23–1.54)	1.70 (0.59–4.81)	0.33
<i>CD</i>				
Animal protein	1 (—)	4.51 (1.28–15.83)	2.70 (0.69–10.52)	0.33
Vegetable protein	1 (—)	1.15 (0.39–3.35)	1.04 (0.28–3.80)	0.98

CD, Crohn’s disease; IBD, inflammatory bowel disease; HR, hazard ratio; UC, ulcerative colitis.
Model including energy from animal protein, energy from vegetable protein, and non-protein energy (i.e., energy from carbohydrates and lipids as ordered tertiles).

Table 4. HR estimates and 95% confidence intervals for IBD in relation to different groups of food protein intake in the E3N cohort (n=67,581), 1993–2005

	Tertile 1	Tertile 2	Tertile 3	P trend
<i>Meat (g/day)^b</i>	31.8	83.2	144.4	
Number of IBD	15	25	37	
Energy-adjusted HR ^a	1 (—)	1.45 (0.76–2.75)	1.87 (1.00–3.49)	0.02
<i>Fish/sea products (g/day)^b</i>	10.7	26.4	59.1	
Number of IBD	16	29	32	
Energy-adjusted HR ^a	1 (—)	1.63 (0.88–3.01)	1.83 (1.00–3.36)	0.05
<i>Eggs (g/day)^b</i>	6.9	19.5	46.1	
Number of IBD	19	33	25	
Energy-adjusted HR ^a	1 (—)	1.31 (0.74–2.31)	0.97 (0.52–1.78)	0.91
<i>Dairy products (g/day)^b</i>	131.3	264.6	511.4	
Number of IBD	24	27	26	
Energy-adjusted HR ^a	1 (—)	1.02 (0.58–1.77)	0.94 (0.53–1.67)	0.93

HR, hazard ratio; IBD, inflammatory bowel disease.

^aMutually adjusted and adjusted on alcohol-free energy intake.^bMean value of daily consumption for each tertile.

and CD, the shapes of associations between total and animal protein and risk of IBD tended to differ slightly between UC and CD (Tables 2 and 3). Regarding CD, a dose–effect relationship was observed for total protein ($P=0.04$) but not for animal protein ($P=0.33$). Regarding UC, a strong dose–effect relationship was observed with animal protein ($P=0.005$), whereas there was only a borderline statistically significant association with total protein ($P=0.06$).

Analyses of food sources of animal protein showed that high consumptions of meat or fish, but not of eggs or dairy products, were positively associated with IBD risk (Table 4).

Further adjustment on daily alcohol intake, physical activity, body mass index, tobacco smoking, menopause hormone therapy, or socio-economic status did not substantially modify the association between protein intake and IBD (Appendix 1 and 2).

When excluding the eight cases that occurred within 6 months (four UC, three CD, and one IC), the HR for the third vs. first tertile of animal protein intake was 2.77 (95% CI, 1.15–6.68); when excluding the 10 cases that occurred within 1 year (six UC, three CD, and one IC), the corresponding HR became 2.74 (95% CI, 1.30–5.78). Another sensitivity analysis was performed on the 61 certain cases of IBD and provided similar results (HR for the third vs. first tertile of intake, 3.63; 95% CI, 1.32–10.01 (P trend=0.01); and 3.13; 95% CI, 1.34–7.31 (P trend=0.01) for total and animal protein, respectively).

DISCUSSION

The main finding of this prospective cohort study is that high protein intake was associated with an increased risk of IBD. The positive association between high protein intake and IBD risk was restricted to animal protein intake. Among animal protein sources, both fish and meat were associated with risk, whereas

egg and dairy products were not, potentially because of insufficient power. In this study of women with moderate-to-high consumption of protein, and especially animal protein (99% of women consumed more than the mean nutritional requirement of 0.66 g/kg/day and 90% more than the recommended daily amount of 0.83 g/kg/day) (18), high protein intake was associated with a 3.3-fold increased risk of IBD. This would make high-protein diet a major risk factor of IBD. The observed incidence of CD and UC in this cohort lies within the expected range in this age class: 4.2 per 100,000 for CD and 6.1 per 100,000 for UC (19,20). HRs were similar for UC and CD regarding total protein, although a dose–effect relationship with animal protein was only observed for UC. The lack of statistical significance for animal protein in CD could be due to a lack of power. Future studies should confirm this potential association between CD and protein intake, and investigate whether ileal and colonic CD are equally associated with dietary protein intake.

Our dietary survey has several strengths. Dietary questionnaires were completed several years before the diagnosis of IBD. The questionnaire has been validated and found to be reproducible (15). We adjusted the models for energy intake using the energy partition method, which has been largely used and advocated for the study of macronutrients (16). Using this method, we did not find any significant association between lipid or carbohydrate intakes and the risk of CD or UC. A recent prospective study from EPIC showed a significant positive association between the dietary content in linoleic acid and UC incidence, and a negative one with docosahexaenoic acid intake, but not with total lipid intake, in agreement with our findings (21).

Our study has some limitations. First, it can be argued that the potential interval between the acquisition of the dietary data and the onset of disease is long enough for substantial changes to occur in dietary habits. However, it has been shown that dietary

habits change very little over time in middle-aged adults (22); in addition, changes in dietary habits would result in non-differential misclassification of dietary exposure, and thus in diluting the effect rather than increasing it. Some misclassification of dietary exposure is a constant feature of dietary surveys, and our moderately high correlation coefficients for reproducibility after 1 year are in favor of some degree of errors in assessing the diet. Again, this would rather dilute the true association. Second, this study included women aged 40–65 years, whereas IBD typically peaks between 20–35 years; further prospective studies should determine whether the results of this study could be reproduced in younger and male subjects. Third, the restricted sample size had limited power to detect effects below a relative risk of 2.5, especially when considering separately CD and UC. Finally, because of the limited number of cases, we could not perform analyses based on quartiles or quintiles, which would have better captured a true dose–effect relationship.

Our results are consistent with the hypothesis formulated by Shoda *et al.* (23), who found a temporal relationship between the rising incidence of CD in Japan and increasing dietary intake of animal protein ($r=0.908$). Since World War II, animal protein intake has increased not only in Japan but also in all developed countries (24); as an example, a 50% increase has been reported in Belgium between the mid-1950s to 1978, with a per capita meat consumption from 60.8 to 98.0 kg/year (25). The increase in animal protein consumption may therefore explain some of the increased incidence of IBD since World War II. Some (but not all) retrospective case–control studies have described a higher consumption of meat (26) and fish (12) in CD patients as compared with controls. Moreover, a follow-up study in 191 UC patients showed a significant association between high meat intake and risk of relapse of UC (27). On the contrary, a prospective study that included some centers from the EPIC study failed to find any association between any type of macronutrient and UC risk (28). However, there were several differences between that study and ours, including a nested case–control design, intake of protein considered as a percentage of total energy including alcohol, heterogeneity between centers and dietary questionnaires, and the inclusion of both men and women. It needs to be further investigated as to what extent these features would explain the different findings. From our results and those of other studies, it may be speculated that reducing protein intake to the first tertile (<67 g/day) could decrease both the incidence and activity of IBD. A prospective randomized study should be undertaken to test this hypothesis.

There is biological plausibility for a positive association between animal protein intake and IBD. A variable proportion of heme and amino acids, contained in animal proteins, are not absorbed by the small bowel and reach the colonic lumen, where they are metabolized by the microflora (29). This results in a number of end products, which include hydrogen sulfide, phenolic compounds, and amines and ammonia, some of which are potentially toxic to the colon (29). For instance, it has been suggested that sulfide, in the presence of nitric oxide produced by anaerobic bacteria, may alter the cell membrane of the colonocyte, and lead to the loss of barrier function and the immune cascade as observed in UC (30). It has

been shown that, in healthy volunteers, an increase in dietary protein leads to changes in the colonic metabolism of proteins, which is mainly reflected by an increase in fecal ammonia, fecal volatile sulfur substances, and urinary *p*-cresol (31). Thus, high animal protein consumption might increase IBD risk through accrued formation of end products by the colonic microflora, such as hydrogen sulfide, which are toxic for the colon. Additional mechanisms, such as the impact of animal protein intake upon dysbiosis or inflammatory response, can also be suspected (32).

In summary, our results may help better understand the role of diet in IBD risk. If confirmed, they can lead to protective strategies, especially in families at risk of IBD, and possibly to advice for preventing relapse.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are indebted to all the women of the cohort for providing the data. They are grateful to the physicians and gastroenterologists for providing the clinical, endoscopy, and pathology reports, and also to Lyan Hoang, Marie Fangon, Maryvonne Niravong, and Celine Kernaleguen for their technical assistance and Ms Pamela Albert for English assistance.

CONFLICT OF INTEREST

Guarantor of the article: Franck Carbonnel, MD, PhD.

Specific author contributions: Prévost Jantchou contributed to study design and implementation, data collection, design and implementation of the statistical analysis, interpretation of results, and drafting and review of the manuscript. Sophie Morois contributed to design and implementation of the statistical analysis, interpretation of results, and drafting and review of the manuscript. Marie-Christine Boutron-Ruault and Franck Carbonnel contributed to design and implementation of the study, data collection, design and implementation of the statistical analysis, interpretation of results, and drafting and review of the manuscript. Françoise Clavel-Chapelon contributed to enrollment and follow-up of patients, design and implementation of the study, and review of the manuscript. All authors have seen the final submitted manuscript and agree with its contents.

Financial support: P.J. has received an institutional research grant from UCB Pharma. S.M. is supported by a doctoral grant from the French Ministry of Research.

Potential competing interests: None.

Study Highlights

WHAT IS CURRENT KNOWLEDGE

- ✓ Diet composition has long been suspected to contribute to inflammatory bowel disease (IBD), but has been assessed in retrospective studies.
- ✓ The associations described are prone to recall bias.

WHAT IS NEW HERE

- ✓ High protein intake is associated with an increased risk of incident IBD in middle-aged women.
- ✓ Limiting animal protein intake to the recommended daily amount might reduce the risk of IBD, and possibly, the risk of relapse.

REFERENCES

- Sartor B. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2006;3:390–407.
- Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* 2007;369:1627–40.
- Cho JH. The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 2008;8:458–66.
- Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 2007;447:661–78.
- Binder V. Epidemiology of IBD during the twentieth century: an integrated view. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004;18:463–79.
- Carr I, Mayberry JF. The effects of migration on ulcerative colitis: a three-year prospective study among Europeans and first- and second-generation South Asians in Leicester (1991–1994). *Am J Gastroenterol* 1999;94:2918–22.
- Tsironi E, Feakins RM, Probert CS *et al*. Incidence of inflammatory bowel disease is rising and abdominal tuberculosis is falling in Bangladesh in East London, United Kingdom. *Am J Gastroenterol* 2004;99:1749–55.
- Jantchou P, Monnet E, Carbonnel F. Environmental risk factors in Crohn's disease and ulcerative colitis (excluding tobacco and appendectomy). *Gastroenterol Clin Biol* 2006;30:859–67.
- Cosnes J. Tobacco and IBD: relevance in the understanding of disease mechanisms and clinical practice. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004;18:481–96.
- Persson PG, Ahlborn A, Hellers G. Diet and inflammatory bowel disease: a case-control study. *Epidemiology* 1992;3:47–52.
- Reif S, Klein I, Lubin F *et al*. Pre-illness dietary factors in inflammatory bowel disease. *Gut* 1997;40:754–60.
- Sakamoto N, Kono S, Wakai K *et al*. Dietary risk factors for inflammatory bowel disease: a multicenter case-control study in Japan. *Inflamm Bowel Dis* 2005;11:154–63.
- Ekobom A. Environmental risk factors (excluding tobacco and microorganisms): a critical analysis of old and new hypotheses. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004;18:497–508.
- Clavel-Chapelon F, van Liere MJ, Giubout C *et al*. E3N, a French cohort study on cancer risk factors. *Eur J Cancer Prev* 1997;6:473–8.
- van Liere MJ, Lucas F, Clavel F *et al*. Relative validity and reproducibility of a French dietary history questionnaire. *Int J Epidemiol* 1997;26 (Suppl 1): S128–36.
- Howe GR, Miller AB, Jain M. Re: "Total energy intake: implications for epidemiologic analyses". *Am J Epidemiol* 1986;124:157–9.
- Greenland S, Rothman KJ. Introduction to stratified analysis. In: Rothman KJ, Greenland S (eds). *Modern Epidemiology*, 2nd edn. Lippincott-Raven: Philadelphia, PA, 1998, pp. 53–79.
- AFSSA. Guidelines on protein: quality, intake, nutritional need and recommendations (accessed October 25, 2009, at <http://www.afssa.fr/Documents/NUT-Ra-Proteines.pdf>).
- Nerich V, Monnet E, Etienne A *et al*. Geographical variations of inflammatory bowel disease in France: a study based on national health insurance data. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:218–26.
- Gower-Rousseau C, Salomez JL, Dupas JL *et al*. Incidence of inflammatory bowel disease in northern France (1988–1990). *Gut* 1994;35:1433–8.
- Hart A *et al*. Linoleic Acid, a dietary N-6 polyunsaturated fatty acid, and the aetiology of ulcerative colitis—a European prospective cohort study. *Gut* 2009;58:1606–11.
- Goldbom RA, van t' Veer P, van den Brandt PA *et al*. Reproducibility of a food-frequency questionnaire and stability of dietary habits determined from five annually repeated measurements. *Eur J Clin Nutr* 1995;49:420–9.
- Shoda R, Matsueda K, Yamato S *et al*. Epidemiologic analysis of Crohn disease in Japan: increased dietary intake of n-6 polyunsaturated fatty acids and animal protein relates to the increased incidence of Crohn disease in Japan. *Am J Clin Nutr* 1996;63:741–5.
- Sans P. Protein consumption: which place for beef (Accessed October 25, 2009, at www2.clermont.inra.fr/commission-bovine/textes/sans.pdf).
- Larsen CS. Animal source foods and human health during evolution. *J Nutr* 2003;133:3893S–7S.
- Abubakar I, Myhill DJ, Hart AR *et al*. A case-control study of drinking water and dairy products in Crohn's Disease; further investigation of the possible role of *Mycobacterium avium* paratuberculosis. *Am J Epidemiol* 2007;165:776–83.
- Jowett SL, Seal CJ, Pearce MS *et al*. Influence of dietary factors on the clinical course of ulcerative colitis: a prospective cohort study. *Gut* 2004;53:1479–84.
- Hart AR, Luben R, Olsen A *et al*. Diet in the aetiology of ulcerative colitis: a European prospective cohort study. *Digestion* 2008;77:57–64.
- Hughes R, Magee EA, Bingham S. Protein degradation in the large intestine: relevance to colorectal cancer. *Curr Issues Intest Microbiol* 2000;1:51–8.
- Roediger WEW. Review article: nitric oxide from dysbiotic bacterial respiration of nitrate in the pathogenesis and as a target for therapy of ulcerative colitis. *Alim Pharmacol Ther* 2008;27:531–41.
- Geypens B, Claus D, Evenepoel P *et al*. Influence of dietary protein supplements on the formation of bacterial metabolites in the colon. *Gut* 1997;41:70–6.
- Lopez-Garcia E, Schulze MB, Fung TT *et al*. Major dietary patterns are related to plasma concentrations of markers of inflammation and endothelial dysfunction. *Am J Clin Nutr* 2004;80:1029–35.

APPENDIX 1

Multivariate HR estimates and 95% confidence intervals for CD by tertile of energy-adjusted protein intake, further adjusted for daily alcohol intake, physical activity, body mass index, tobacco smoking, menopause hormone therapy, or socio-economic status in the E3N cohort ($n = 67,581$), 1993–2005.

	Tertile 1	Tertile 2	Tertile 3
Multivariate model (model 1)	1 (—)	4.51 (1.28–15.83)	2.70 (0.69–10.52)
Model 1+alcohol intake	1 (—)	4.47 (1.27–15.71)	2.72 (0.70–10.63)
Model 1+body mass index	1 (—)	4.52 (1.28–15.88)	2.72 (0.70–10.70)
Model 1+menopausal hormone therapy	1 (—)	4.47 (1.27–15.71)	2.68 (0.69–10.44)
Model 1+physical activity	1 (—)	4.53 (1.29–15.90)	2.72 (0.69–10.47)
Model 1+tobacco consumption	1 (—)	4.52 (1.29–15.89)	2.72 (0.69–10.50)
Model 1+socioeconomic status	1 (—)	4.51 (1.28–15.83)	2.70 (0.69–10.54)

APPENDIX 2

Multivariate HR estimates and 95% confidence intervals for UC by tertile of energy-adjusted protein intake, further adjusted for daily alcohol intake, physical activity, body mass index, tobacco smoking, menopause hormone therapy, or socio-economic status in the E3N cohort ($n = 67,581$), 1993–2005.

	Tertile 1	Tertile 2	Tertile 3
Multivariate model (model 1)	1 (—)	1.62 (0.65–4.02)	3.29 (1.34–8.04)
Model 1 + alcohol intake	1 (—)	1.56 (0.63–3.89)	3.06 (1.25–7.50)
Model 1 + body mass index	1 (—)	1.63 (0.65–4.06)	3.36 (1.36–8.29)
Model 1 + menopausal hormone therapy	1 (—)	1.61 (0.65–4.00)	3.27 (1.34–8.00)
Model 1 + physical activity	1 (—)	1.61 (0.65–4.00)	3.29 (1.35–8.07)
Model 1 + tobacco consumption	1 (—)	1.62 (0.65–4.03)	3.26 (1.33–7.98)
Model 1 + socioeconomic status	1 (—)	1.62 (0.65–4.04)	3.31 (1.35–8.10)

ANNEXE 5 : GEOGRAPHIC DISTRIBUTION OF INFLAMMATORY BOWEL DISEASE
IN FRANCE AND SUN EXPOSURE - SOUMIS

1

2 Title: GEOGRAPHIC DISTRIBUTION OF INFLAMMATORY BOWEL DISEASE IN FRANCE
3
4 AND SUN EXPOSURE

5
6 Short title: CROHN'S DISEASE AND SUN EXPOSURE
7

8
9
10
11 Authors: Virginie Nerich, Pharm D, PhD (1,2), Prevost Jantchou, MD (3,4), Marie-Christine
12
13 Boutron-Ruault, MD, PhD (4), Elisabeth Monnet, MD, Ph D (5, 6), Alain Weill, MD (7), Vincent
14
15 Vanbockstael, MD (8), Guy-Robert Auleley, MD (9), Corinne Balaire, MD (10), Patrick Duboz,
16
17 MD (11), Stéphane Rican, PhD (12), Hubert Allemand, MD (7), Franck Carbonnel, MD PhD (4,
18
19 13)
20
21

22
23
24
25 (1) Pôle pharmaceutique, University Hospital, Besançon, France
26

27
28 (2) INSERM U645 EA-2284 IFR-133, School of Medicine and Pharmacy, Besançon, France
29

30
31 (3) Service de Pédiatrie, University Hospital, Besançon, France
32

33
34 (4) INSERM, UMRS 1018, Team 9, Centre for Research in Epidemiology and Population
35

36
37 Health, Université Paris Sud, Institut Gustave Roussy, 94805. Villejuif, France
38

39
40 (5) Département de Santé Publique, University Hospital, Besançon, France
41

42
43 (6) UPRES EA 3186 Agents Pathogènes et Inflammation, Université de Franche Comté, Besançon,
44

45
46 France
47

48
49 (7) Caisse Nationale d'Assurance Maladie des Travailleurs salariés (CNAMTS), Paris, France
50

51
52 (8) Caisse Centrale de la Mutualité Sociale Agricole (CCMSA), Bagnolet, France
53

54
55 (9) Caisse Nationale d'Assurance Maladie des Professions indépendantes (CANAM), Saint Denis
56

57
58 (10) Caisse Nationale Militaire de Sécurité Sociale (CNMSS), Paris, France
59

60
61 (11) Etablissement National des Invalides de la Marine (ENIM), Paris, France
62

63
64 (12) Laboratoire Espace Santé et Territoire, Université Paris X, Paris, France
65

66
67 (13) Service d'Hépatogastroentérologie, University Hospital of Bicêtre, Assistance Publique
68

69
70 Hôpitaux de Paris, Université Paris Sud, Le Kremlin Bicêtre, France
71

Abstract

Background and aim: Low sunshine exposure and/or vitamin D deficiency might contribute to IBD pathogenesis. We assessed the geographic distribution of CD and UC incidence in relation with the sunshine exposure in France, in order to test the hypothesis that higher sun exposure is associated with lower IBD risk.

Methods: Using the national health insurance databases, incidence rates of CD and UC were estimated for each of 93 French administrative areas (“départements”), in 2000-2002. The surface UV radiation intensity was obtained by combining modeling and satellite data from Meteosat[®], the European meteorological satellite. Relationships between incidence rates and sun exposure were tested for significance by using a Poisson regression. Mapping of smoothed relative risks (sRR) for CD and UC, using a Bayesian approach and adjusting for sun exposure, was carried out in order to search for geographical variations.

Results: Areas with a smoothed RR of CD incidence significantly above 1 corresponded to areas with low sunshine exposure, whereas those with high or medium sunlight exposure had smoothed RR either lower than 1 or not significantly different from 1. There was no association between sun exposure and UC incidence.

Conclusion: These results suggest that low sunlight exposure is a risk factor for CD.

Key words: Crohn’s disease; ulcerative colitis; geographical variation; France; sun exposure.

INTRODUCTION

Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) are chronic inflammatory disorders of the gastrointestinal tract. Genetic predisposition of inflammatory bowel disease (IBD) is established, particularly in CD, in which several susceptibility genes that affect bacterial clearance (including autophagy), the IL23 pathway, and T cell homeostasis have been identified [1]. Environmental factors also contribute to IBD pathogenesis [2]. Smoking, appendectomy and intestinal infections have been linked reproducibly with susceptibility in IBD [2]. It is likely that other environmental factors increase IBD risk [2]. These environmental factors could possibly be found through the association between IBD and other diseases for which environmental factors are already known.

An association between multiple sclerosis (MS) and IBD has been reproducibly reported and could occur more often than by chance alone [3-4]. Geographical, case-control and prospective studies have suggested that sun exposure may protect from MS [5-8]. Therefore, we hypothesized that the association between MS and IBD is due to shared environmental factors, especially sun exposure, and thus we assessed the geographic distribution of CD and UC in relation with the sunshine exposure.

MATERIALS AND METHODS

Setting

This study was conducted in metropolitan France (excluding Corsica and the overseas French territories) totalling 59,368,981 inhabitants on January 1, 2003. Its surface area is 535 280 km², with an average of 111 people per square kilometre. There are considerable variations, however, as half the population lives on just over 10% of the territory, and large areas remain sparsely populated.

Geographical units

This study was performed at the scale of "départements", i.e. the 93 administrative areas (subsequently called departments), as described previously [9].

IBD Data

In France, patients with IBD, whatever their place of residence, are fully reimbursed for their health care expenses by the national health insurance (NHI) system. The IBD data used for this study were obtained from the French statutory NHI system, which is based on professional status. Three main subsystems included in the NHI, cover 96% of the French population. The general fund insures salaried workers and their families in private secondary and tertiary industries and in the public sector (i.e. 84% of the population). The agricultural fund insures farmers and agricultural employees and their families (i.e. 7% of the population). The third fund provides medical coverage to self-employed professionals and their families (i.e. 5% of the population).

CD and UC are two of the 30 specified long-term illnesses which provide patients with a 100% reimbursement rate, thus covering the total cost of necessary health care. Thus, French IBD patients have equal access to free medical care. This full coverage by statutory health insurance is subject to prior NHI approval, after examination of an official form that certifies that the patient has CD or UC and has been signed by the patient's physician (either a general practitioner or a gastroenterologist). Each health insurance fund records individual data on an annual basis for all patients who have obtained 100 percent coverage for each of the 30 specified long-term illnesses. We contacted doctors in charge of national patient data files in the three insurance funds to request anonymous information concerning all new beneficiaries of 100 percent coverage for IBD granted between January 1, 2000 and December 31, 2002. We obtained centralized files covering the whole French territory. They contained the following individual information: age, sex, postcode of the place of residence, diagnosis that conferred the 100 percent coverage, coded either CD (ICD code K50) or UC (ICD code K51) with the tenth revision of the International Classification of Diagnoses (ICD). This study was approved by the "Commission Nationale de l'Informatique et Libertés" (CNIL, Paris, France), a national commission which provides legal protection of computerized personal data.

Sun exposure data

Ground radiometers are the most accurate method to measure sun exposure, but they are too few in number to offer a comprehensive geographical coverage. The surface UV radiation intensity can be obtained by combining modeling and satellite data from Meteosat[®], the European meteorological satellite. This method provides a comprehensive map of sunlight exposure with a precision of 5 km. Correlation between measured and modelled erythemal daily doses was found to be highly significant [10].

Statistical analysis

Incidence rates

The analysis was conducted separately for CD and UC. IBD patients were tabulated by sex, 5-year age classes and administrative area. The number of insured people in each area on January 1, 2003 was obtained from the health insurance funds and totalled to obtain the overall number of people affiliated with these funds within each area. For the population as a whole, incidence rates were calculated by sex for CD and UC, based on the number of all new beneficiaries of 100 percent coverage for CD or UC granted during the study period, with the person-years denominator being the sum of the insured population estimates for the 3 years in the three subsystems described above.

Influence of sun exposure on incidence rates

Ground UV dose from sunshine was expressed in kJ/m² and was provided by month and by administrative area for the years 1984 to 2002. We calculated a mean annual UV dose for the studied period, which was classified into quintiles, and linked with incidence data tabulated by area. Age- and sex- adjusted incidence rate ratios (IRR), with their 95% confidence intervals (CI), were estimated using the Poisson regression, for CD and UC. We used the likelihood ratio statistics to calculate P-values for each variable. All variables with a P-value less than or equal to 0.05 were regarded as significant and were then retained for spatial analysis.

Spatial analysis and disease mapping

A spatial analysis with a Bayesian approach was then performed, as described previously [9]. Sun exposure was introduced as a covariate into this model and tested for improvement of the model fit. The model provides smoothed Relative Ratios (RR) which are more accurate and steady than the traditional standardized incidence ratios.

We mapped the 93 administrative areas grouped into 3 classes according to the value and significance of smoothed RR: administrative areas with smoothed RR significantly lower than 1, administrative areas with smoothed RR not significantly different from 1, and administrative areas with smoothed RRs significantly higher than 1.

RESULTS

From January 1, 2000 to December 31, 2002, 14,113 new patients with CD (including 8,138 women and 5,975 men) and 12,339 new patients with UC (including 5,959 women and 6,380 men) were registered by the three health insurance funds, among the overall French insured population of 57,098,525.

The map of France showing the average annually erythemal daily dose (kJ/m²) by administrative area is displayed in figure 1.

Crohn's disease

In the population as a whole, the incidence rate was 8.2 for 100,000 inhabitants (95% CI: 8.1-8.4) for the whole population, 7.1 (95% CI: 6.9-7.2) for men, and 9.4 (95% CI: 9.2-9.6) for women with no important variation between the three studied years. Table 1 shows the age and sex adjusted incidence rate ratios and 95% confidence intervals derived from the Poisson regression analysis for CD, according to quintiles of sun exposure, and taking as the reference the quintile of highest sun exposure. The two quintiles with the lowest sun exposure were associated with an increased IRR of CD. The intermediate quintile had an IRR not significantly different from 1. The second quintile with the highest sun exposure was associated with a decreased IRR of CD.

1
2 Local UV dose improved the Bayesian model of geographic distribution of CD, and the effect of
3 local UV dose was stronger than the effect of local spatial autocorrelation. Variations of smoothed
4 RR of CD in both sexes according to sunlight exposure are displayed in Figure 2. Areas with a
5 smoothed RR significantly higher than 1 corresponded to areas with low sunlight exposure, whereas
6 those with high or medium sunlight exposure had smoothed RRs either lower than 1 or not
7 significantly different from 1 (figure 2).
8

9 10 11 12 13 14 15 **Ulcerative colitis**

16
17 In the population as a whole, the incidence rate was 7.2 for 100,000 inhabitants (95% CI: 7.1-7.3), it
18 was 7.7 (95% CI: 7.5-7.9) in men and 6.8 (95% CI: 6.6-7.0) in women. Table 2 shows the age and
19 sex adjusted incidence rate ratios and 95% confidence intervals derived from the Poisson regression
20 analysis for UC, according to quintiles of sun exposure. There was no statistically significant
21 association between sun exposure and UC incidence.
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31

32 33 **DISCUSSION**

34
35 The present study assessed the geographic distribution of IBD in relation with sun exposure. It
36 appears that CD incidence is higher in geographical areas with a low sunshine exposure than in
37 areas with high or medium sunshine exposure, where CD incidence is either lower than or not
38 significantly different from the mean national incidence rate. Thus, there seems to be a threshold of
39 sun exposure under which CD incidence increases. By contrast, no association between UC
40 incidence and sun exposure was found.
41
42
43
44
45
46
47
48

49 Our study is based on data derived from administrative health care records and relies on ecological
50 data. These limitations have already been discussed in our previous papers [9, 11]. Moreover, in a
51 recent paper concerning geographic mapping of IBD, Green and Bernstein suggest to use small
52 geographic areas in order to minimize the misclassification of populations by risk categories [12].
53 However, the sun exposure data are available at the scale of “departments” and not at a smaller
54 scale. Additionally, the association between sun exposure and CD is not necessarily causal. It can
55
56
57
58
59
60

1
2 be due to an underlying genetic or environmental factor which has a geographical distribution
3 similar to that of sun exposure, such as diet, chemicals, water or soil microbial ecology. In a recent
4 prospective study, we found that high total protein intake, specifically animal protein, was
5 associated with a significantly increased risk of IBD in middle-aged French women [13]. A study
6 concerning a potential interaction between diet and sun exposure is underway.
7
8

9
10
11 On the other hand, the association between CD and sun exposure could also be causal, as suggested
12 by several epidemiological and biological data. Firstly, there is a reproducible North-South gradient
13 of CD incidence which has been found in the USA, Scotland and France [9, 14, 15]. Sun exposure
14 might well explain the North-South gradient found in these countries. Secondly, the geographic
15 distribution of multiple sclerosis (MS) appears to be similar to that of CD in France and several
16 lines of evidence suggest that sun exposure protects from MS [16]. A strong inverse correlation
17 between UV radiation and MS prevalence has been found in a geographical study performed in
18 Australia [5]. A case-control study has shown that exposure to the sun in early infancy may protect
19 against multiple sclerosis [6]. It has also been shown that people with the highest blood levels of
20 vitamin D had the lowest risks of MS [7]. Furthermore, results from a cohort study of 187,500
21 nurses showed that women who consumed at least the current daily recommended dose of vitamin
22 D have a lower risk of developing MS [8]. Exposure to the sun may explain the French North-South
23 gradient of MS and CD. Thirdly, there is a biological plausibility for our findings [17]. Sun and
24 vitamin D have been found to act as immune regulators. UV radiation and vitamin D have been
25 shown to induce regulatory T cell function [18]. UV radiation induces immune suppression via
26 induction of IL-4 and IL-10 and suppression of IL-12 production [19]. 1,25-dihydroxyvitamin D
27 inhibits dendritic cell differentiation and maturation, which induces a shift in T cell differentiation
28 from Th1 and Th17 to a Th2 phenotype [20]. Recent studies have found that vitamin D is also a key
29 regulatory factor of innate immunity. Vitamin D, produced in response to UV radiation, stimulates
30 the production of cathelicidin, which can kill various viruses and bacteria, including the
31 mycobacteria [21]. More recently, a study performed in primary cultures and lines of human
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

monocytic and epithelial intestinal cells has found that 1,25-dihydroxyvitamin D stimulates the expression of NOD2 in the presence of its agonist muramyl dipeptide [22]. Taken together, these results suggest that low sunshine exposure and vitamin D deficiency impair innate immunity and induce a shift in T cell differentiation towards TH1/TH17 phenotype, which are both characteristic of CD.

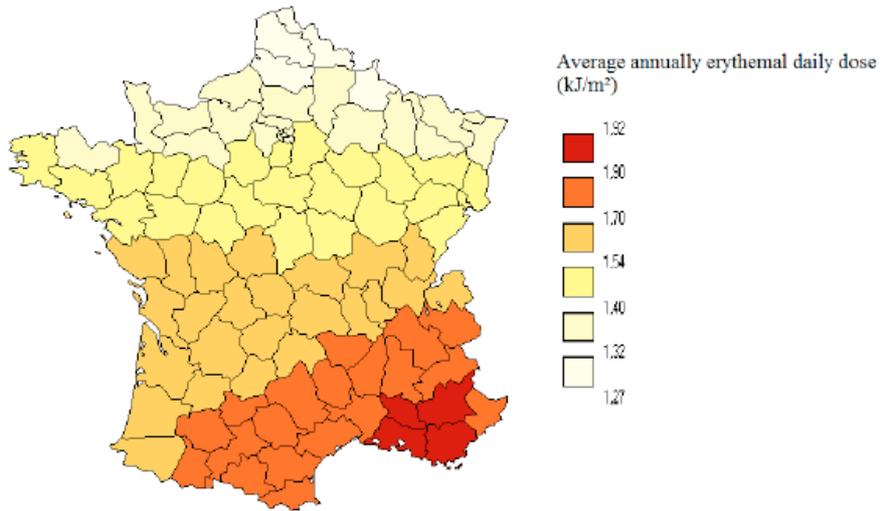
Our study suggests that low sunlight exposure is associated with higher CD risk. This potential association should be further investigated within case-control and cohort studies. If a protective role of sun exposure on CD risk is confirmed, prevention of CD through vitamin D supplementation should be tested in high-risk subjects.

1
2 **REFERENCES**
3

- 4 [1] Abraham C, Cho JH. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*. 2009;361:2066-2078.
5
6 [2] Carbonnel F, Jantchou P, Monnet E, et al. Environmental risk factors in Crohn's disease and
7 ulcerative colitis, excluding tobacco and appendectomy: an update. *Gastroenterol Clin Biol*.
8 2009;33:S145-157.
9
10 [3] Bernstein CN, Wajda A, Blanchard JF. The Clustering of Other Chronic Inflammatory Diseases
11 in Inflammatory Bowel Disease: A Population-Based Study. *Gastroenterology*. 2005;129:827-836.
12
13 [4] Gupta G, Gelfand JM, Lewis JD. Increased risk of demyelinating diseases in patients with
14 inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2005;129:819-826.
15
16 [5] Van der Mei IAF, Ponsonby AL, Blizzard L, et al. Regional variation in multiple sclerosis
17 prevalence in Australia and its association with ambient ultraviolet radiation. *Neuroepidemiology*.
18 2001;20:168-174.
19
20 [6] Van der Mei IAF, Ponsonby AF, Dwyer T, et al. Past exposure to sun, skin phenotype and risk
21 of multiple sclerosis: case control study. *Br Med J*. 2003;327(42):334-336.
22
23 [7] Munger KL, Levin LI, Hollis BW, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple
24 sclerosis. *JAMA*. 2006; 296: 2832-2838.
25
26 [8] Munger KL, Zhang SM, O'Reilly E, et al. Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis.
27 *Neurology*. 2004;13:60-65.
28
29 [9] Nerich V, Monnet E, Etienne A, et al. Geographical variations of inflammatory bowel disease in
30 France: a study based on national health insurance data. *Inflamm Bowel Dis*. 2006;12:218-226.
31
32 [10] Verdebout J. A European satellite-derived UV climatology available for impact studies.
33 *Radiation protection dosimetry*. 2004;111:407-411.
34
35 [11] Nerich V, Monnet E, Weill A, et al. Fine-scale geographic variations of inflammatory bowel
36 disease in France: correlation with socioeconomic and house equipment variables. *Inflamm Bowel*
37 *Dis*. 2010;16:813-821.
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2 [12] Green C, Bernstein CN. Lessons from geographic mapping in France. *Inflamm Bowel Dis.*
3
4 2010;16:804-805.
5
6 [13] Jantchou P, Morois S, Clavel-Chapelon F, et al. Animal protein intake and risk of
7
8 inflammatory bowel disease: the E3N prospective study. *Am J Gastroenterol* 2010;[epub ahead of
9
10 print].
11
12 [14] Sonnenberg A, McCarty D. Geographic variation of inflammatory bowel disease within the
13
14 United States. *Gastroenterology.* 1991;100:143-149.
15
16 [15] Armitage E, Aldhous MC, Anderson N, et al. Incidence of juvenile-onset Crohn's disease in
17
18 Scotland: association with Northern latitude and affluence. *Gastroenterology.* 2004;127:1051-1057.
19
20 [16] Vukusic S, Van Bockstael V, Gosselin S, et al. Regional variations in the prevalence of
21
22 multiple sclerosis in French farmers. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2007;78:707-709.
23
24 [17] Peyrin-Biroulet L, Oussalah A, Bigard MA. Crohn's disease: the hot hypothesis. *J Med*
25
26 *Hypotheses.* 2009;73:94-96.
27
28 [18] Maeda A, Beissert S, Schwarz T, et al. Phenotypic and functional characterization of
29
30 ultraviolet radiation-induced regulatory T cells. *J Immunol.* 2008;180:3065-3071.
31
32 [19] Ullrich SE. Sunlight and skin cancer: lessons from the immune system. *Mol Carcinog.*
33
34 2007;46:629-633.
35
36 [20] Baeke F, Etten E, Gysemans C, et al. Vitamin D signaling in immune-mediated disorders:
37
38 evolving insights and therapeutic opportunities. *Mol Aspects Med.* 2008;29:376-387.
39
40 [21] Liu PT, Stenger S, Li H, et al. Toll-Like Receptor Triggering of a Vitamin D-Mediated Human
41
42 Antimicrobial Response. *Science.* 2006;311:1770-1773.
43
44 [22] Wang TT, Dabbas B, Laperriere D, et al. Direct and indirect induction by 1,25-
45
46 dihydroxyvitamin D3 of the NOD2/CARD15-defensin beta2 innate immune pathway defective in
47
48 Crohn disease. *J Biol Chem.* 2010;22;285:2227-2231.
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure 1: Map of France showing the average annually erythemal daily dose (kJ/m²) according to “departments”.

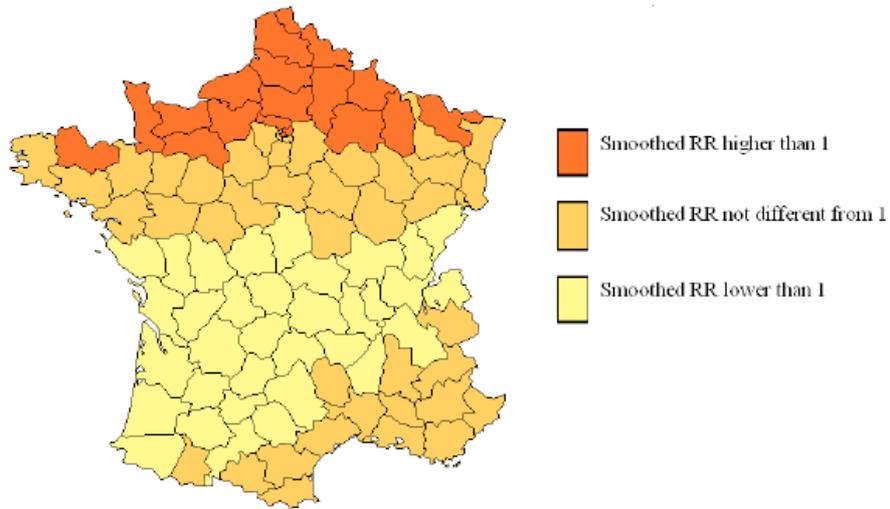


Polcato - <http://perso.club-internet.fr/philgo>

review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure 2: Map of France showing age and sex adjusted CD smoothed Relative Risk (RR) obtained with the Bayesian model, taking into account the average annually erythemal daily dose



Pivato - <http://perso.cub.uninet.it/pivato>

view

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

ANNEXE 6 : QUESTIONNAIRE MÉDECINS

«ident»/«Nummed»

1. Type de MICI : cocher les cases correspondantes

- Maladie de Crohn :
- Rectocolite hémorragique :
- Colite Indéterminée

2. Localisation cumulée (Depuis le diagnostic; possibilité d'atteinte de plusieurs territoires)

- Périnée
- Rectum
- Colon Gauche
- Colon total
- Iléo-colique
- Iléon seul
- Autre localisation : spécifier

3. Association avec maladies auto-immunes : OUI NON

si OUI, spécifier

4. Date de début des symptômes : |_|_| / |_|_|_|_|

Mois Année

5. Date du diagnostic : |_|_| / |_|_|_|_|

Mois Année

6. Le diagnostic vous paraît-il

Improbable

Douteux

Certain

7. Chirurgie (résection intestinale) :

	OUI	NON	Nombre	Date [Mois /Année(s)]
Résection grêle				
Résection colon				
Stomie				

8. Présence de granulomes sur les biopsies et/ou sur les pièces de résection :

OUI NON

9. Traitements cumulés depuis le diagnostic (*plusieurs réponses possibles*)

- 5 ASA ou Salazopyrine
- Corticothérapie (incluant l'entocort)
- Imurel
- Méthotrexate
- Remicade ou Humira
- Autre :

10. Nombre de poussées depuis le diagnostic: |__|__|

11. Nombre de poussées si nombre précis non disponible :

- 1
- 2 à 4
- 5 à 10
- >10

12. Compte rendu des examens ci-joint :

Endoscopie : OUI NON

Radiologie : OUI NON «ident»

Anatomopathologie : OUI NON

13. Coordonnées le cas échéant du laboratoire d'anatomopathologie ou du correspondant médical qui assure le suivi actuel :

BIBLIOGRAPHIE

1. Gismera, C. S. & Aladren, B. S. Inflammatory bowel diseases: a disease (s) of modern times? Is incidence still increasing? *World J Gastroenterol* **14**, 5491-5498 (2008).
2. Abraham, C. & Cho, J. H. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* **361**, 2066-2078 (2009).
3. Holick, M. F. Vitamin D deficiency. *New England Journal of Medicine* **357**, 266 (2007).
4. Adams, J. S. & Hewison, M. Unexpected actions of vitamin D: new perspectives on the regulation of innate and adaptive immunity. *Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism* **4**, 80-90 (2008).
5. Shivananda, S. et al. Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut* **39**, 690-697 (1996).
6. Molinie, F. et al. Opposite evolution in incidence of Crohn's disease and ulcerative colitis in Northern France (1988-1999). *Gut* **53**, 843-848 (2004).
7. Nerich, V. et al. Geographical variations of inflammatory bowel disease in France: a study based on national health insurance data. *Inflamm Bowel Dis* **12**, 218-226 (2006).
8. Baumgart, D. C. et al. IBD Around the world: Comparing the epidemiology, diagnosis, and treatment: Proceedings of the World Digestive Health Day 2010 - Inflammatory bowel disease task force meeting. *Inflamm Bowel Dis* (2010).
9. Binder, V. Epidemiology of IBD during the twentieth century: an integrated view. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **18**, 463-479 (2004).
10. Economou, M. & Pappas, G. New global map of Crohn's disease: Genetic, environmental, and socioeconomic correlations. *Inflamm Bowel Dis* **14**, 709-720 (2008).
11. Leong, R. W., Lau, J. Y. & Sung, J. J. The epidemiology and phenotype of Crohn's disease in the Chinese population. *Inflamm Bowel Dis* **10**, 646-651 (2004).
12. Wang, Y. F., Ouyang, Q. & Hu, R. W. Progression of inflammatory bowel disease in China. *J Dig Dis* **11**, 76-82 (2010).
13. Benchimol, E. I. et al. Epidemiology of pediatric inflammatory bowel disease: A systematic review of international trends. *Inflamm Bowel Dis* (2010).
14. Frangos, C. C. & Frangos, C. C. Inflammatory bowel disease: reviewing an old study under a new perspective. *Gut* **56**, 1638-1639 (2007).
15. Vucelic, B. et al. Epidemiology of Crohn's disease in Zagreb, Yugoslavia: a ten-year prospective study. *Int J Epidemiol* **20**, 216-220 (1991).
16. Sokol, H. & Seksik, P. The intestinal microbiota in inflammatory bowel diseases: time to connect with the host. *Curr Opin Gastroenterol* **26**, 327-331 (2010).
17. Tamboli, C. P., Neut, C., Desreumaux, P. & Colombel, J. F. Dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut* **53**, 1-4 (2004).
18. Frank, D. N. et al. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 13780-13785 (2007).

19. Bibiloni, R., Mangold, M., Madsen, K. L., Fedorak, R. N. & Tannock, G. W. The bacteriology of biopsies differs between newly diagnosed, untreated, Crohn's disease and ulcerative colitis patients. *J Med Microbiol* **55**, 1141-1149 (2006).
20. Manichanh, C. et al. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut* **55**, 205-211 (2006).
21. Turner, J. R. Molecular basis of epithelial barrier regulation: from basic mechanisms to clinical application. *Am J Pathol* **169**, 1901-1909 (2006).
22. Musch, M. W. et al. T cell activation causes diarrhea by increasing intestinal permeability and inhibiting epithelial Na⁺/K⁺-ATPase. *J Clin Invest* **110**, 1739-1747 (2002).
23. Dahan, S. et al. Epithelial: lamina propria lymphocyte interactions promote epithelial cell differentiation. *Gastroenterology* **134**, 192-203 (2008).
24. Bruewer, M. et al. Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms. *J Immunol* **171**, 6164-6172 (2003).
25. Fujino, S. et al. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* **52**, 65-70 (2003).
26. Kobayashi, T. et al. IL23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* **57**, 1682-1689 (2008).
27. Fuss, I. J. et al. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest* **113**, 1490-1497 (2004).
28. Lees, C. W. & Satsangi, J. Genetics of inflammatory bowel disease: implications for disease pathogenesis and natural history. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* **3**, 513-534 (2009).
29. Van Limbergen, J., Wilson, D. C. & Satsangi, J. The genetics of Crohn's disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **10**, 89-116 (2009).
30. Noomen, C. G., Hommes, D. W. & Fidder, H. H. Update on genetics in inflammatory disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **23**, 233-243 (2009).
31. Carbonnel, F., Jantchou, P., Monnet, E. & Cosnes, J. Environmental risk factors in Crohn's disease and ulcerative colitis: an update. *clinique et biologique* **33**, Suppl 3:S145-57 (2009).
32. Weinstock, J. V. & Elliott, D. E. Helminths and the IBD hygiene hypothesis. *Inflamm Bowel Dis* **15**, 128-133 (2009).
33. Guarner, F. et al. Mechanisms of disease: the hygiene hypothesis revisited. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* **3**, 275-284 (2006).
34. Koloski, N. A., Bret, L. & Radford-Smith, G. Hygiene hypothesis in inflammatory bowel disease: a critical review of the literature. *World J Gastroenterol* **14**, 165-173 (2008).
35. Bufford, J. D. & Gern, J. E. The hygiene hypothesis revisited. *Immunol Allergy Clin North Am* **25**, 247-62, v-vi (2005).
36. Chatenoud, L. et al. 99th Dahlem conference on infection, inflammation and chronic inflammatory disorders: immune therapies of type 1 diabetes: new opportunities based on the hygiene hypothesis. *Clin Exp Immunol* **160**, 106-112 (2010).
37. Tse, K. & Horner, A. A. Allergen tolerance versus the allergic march: the hygiene hypothesis revisited. *Curr Allergy Asthma Rep* **8**, 475-483 (2008).
38. Okada, H., Kuhn, C., Feillet, H. & Bach, J. F. The 'hygiene hypothesis' for autoimmune and allergic diseases: an update. *Clin Exp Immunol* **160**, 1-9 (2010).

39. Amre, D. K. et al. Investigating the hygiene hypothesis as a risk factor in pediatric onset Crohn's disease: a case-control study. *Am J Gastroenterol* **101**, 1005-1011 (2006).
40. Gent, A. E., Hellier, M. D., Grace, R. H., Swarbrick, E. T. & Coggon, D. Inflammatory bowel disease and domestic hygiene in infancy. *Lancet* **343**, 766-767 (1994).
41. Green, C., Elliott, L., Beaudoin, C. & Bernstein, C. N. A population-based ecologic study of inflammatory bowel disease: searching for etiologic clues. *Am J Epidemiol* **164**, 615-23; discussion 624-8 (2006).
42. Hansen, R., Thomson, J. M., El-Omar, E. M. & Hold, G. L. The role of infection in the aetiology of inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* **45**, 266-276 (2010).
43. Darfeuille-Michaud, A. et al. High prevalence of adherent-invasive Escherichia coli associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* **127**, 412-421 (2004).
44. Gradel, K. O. et al. Increased short- and long-term risk of inflammatory bowel disease after salmonella or campylobacter gastroenteritis. *Gastroenterology* **137**, 495-501 (2009).
45. Garcia Rodriguez, L. A., Ruigomez, A. & Panes, J. Acute gastroenteritis is followed by an increased risk of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **130**, 1588-1594 (2006).
46. Pineton de Chambrun, G., Colombel, J. F., Poulain, D. & Darfeuille-Michaud, A. Pathogenic agents in inflammatory bowel diseases. *Curr Opin Gastroenterol* **24**, 440-447 (2008).
47. Sartor, R. B. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* **134**, 577-594 (2008).
48. Selby, W. et al. Two-year combination antibiotic therapy with clarithromycin, rifabutin, and clofazimine for Crohn's disease. *Gastroenterology* **132**, 2313-2319 (2007).
49. Hugot, J. P., Alberti, C., Berrebi, D., Bingen, E. & Cezard, J. P. Crohn's disease: the cold chain hypothesis. *Lancet* **362**, 2012-2015 (2003).
50. Chamaillard, M. et al. Gene-environment interaction modulated by allelic heterogeneity in inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 3455-3460 (2003).
51. Lerner, A. Aluminum is a potential environmental factor for Crohn's disease induction: extended hypothesis. *Ann N Y Acad Sci* **1107**, 329-345 (2007).
52. Powell, J. J., Thoree, V. & Pele, L. C. Dietary microparticles and their impact on tolerance and immune responsiveness of the gastrointestinal tract. *Br J Nutr* **98 Suppl 1**, S59-63 (2007).
53. Kaplan, G. G. et al. The Inflammatory Bowel Diseases and Ambient Air Pollution: A Novel Association. *Am J Gastroenterol* (2010).
54. Hill, B. The environment or disease: association or causation? *Proc Roy Soc Med May* **58**, 295-300 (1965).
55. Gilat, T., Hachohen, D., Lilos, P. & Langman, M. J. Childhood factors in ulcerative colitis and Crohn's disease. An international cooperative study. *Scand J Gastroenterol* **22**, 1009-1024 (1987).
56. Baron, S. et al. Environmental risk factors in paediatric inflammatory bowel diseases: a population based case control study. *Gut* **54**, 357-363 (2005).
57. Bernstein, C. N., Rawsthorne, P., Cheang, M. & Blanchard, J. F. A population-based case control study of potential risk factors for IBD. *Am J Gastroenterol* **101**, 993-1002 (2006).

58. Koutroubakis, I. E. & Vlachonikolis, I. G. Appendectomy and the development of ulcerative colitis: results of a metaanalysis of published case-control studies. *Am J Gastroenterol* **95**, 171-176 (2000).
59. Kaplan, G. G. et al. The risk of developing Crohn's disease after an appendectomy: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol* **103**, 2925-2931 (2008).
60. Calkins, B. M. A meta-analysis of the role of smoking in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* **34**, 1841-1854 (1989).
61. Persson, P. G., Ahlbom, A. & Hellers, G. Inflammatory bowel disease and tobacco smoke--a case-control study. *Gut* **31**, 1377-1381 (1990).
62. Jones, D. T., Osterman, M. T., Bewtra, M. & Lewis, J. D. Passive smoking and inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol* **103**, 2382-2393 (2008).
63. Klement, E. et al. Childhood hygiene is associated with the risk for inflammatory bowel disease: a population-based study. *Am J Gastroenterol* **103**, 1775-1782 (2008).
64. Radon, K. et al. Contact with farm animals in early life and juvenile inflammatory bowel disease: a case-control study. *Pediatrics* **120**, 354-361 (2007).
65. Declercq, C. et al. Mapping of inflammatory bowel disease in northern France: spatial variations and relation to affluence. *Inflamm Bowel Dis* **16**, 807-812 (2010).
66. Bernstein, C. N., Blanchard, J. F., Rawsthorne, P. & Wajda, A. Epidemiology of Crohn's disease and ulcerative colitis in a central Canadian province: a population-based study. *Am J Epidemiol* **149**, 916-924 (1999).
67. Felder, J. B. et al. Effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs on inflammatory bowel disease: a case-control study. *Am J Gastroenterol* **95**, 1949-1954 (2000).
68. Kefalakes, H., Stylianides, T. J., Amanakis, G. & Koliou, G. Exacerbation of inflammatory bowel diseases associated with the use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: myth or reality? *Eur J Clin Pharmacol* **65**, 963-970 (2009).
69. Godet, P. G., May, G. R. & Sutherland, L. R. Meta-analysis of the role of oral contraceptive agents in inflammatory bowel disease. *Gut* **37**, 668-673 (1995).
70. Cornish, J. A. et al. The risk of oral contraceptives in the etiology of inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol* **103**, 2394-2400 (2008).
71. Card, T., Logan, R. F., Rodrigues, L. C. & Wheeler, J. G. Antibiotic use and the development of Crohn's disease. *Gut* **53**, 246-250 (2004).
72. Hildebrand, H., Malmborg, P., Askling, J., Ekbom, A. & Montgomery, S. M. Early-life exposures associated with antibiotic use and risk of subsequent Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* **43**, 961-966 (2008).
73. Feller, M. et al. Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis and Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* **7**, 607-613 (2007).
74. Ekbom, A., Wakefield, A. J., Zack, M. & Adami, H. O. Perinatal measles infection and subsequent Crohn's disease. *Lancet* **344**, 508-510 (1994).
75. Bernstein, C. N., Rawsthorne, P. & Blanchard, J. F. Population-based case-control study of measles, mumps, and rubella and inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* **13**, 759-762 (2007).
76. Pardi, D. S. et al. Perinatal exposure to measles virus is not associated with the development of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* **5**, 104-106 (1999).
77. Nielsen, L. L. et al. Exposure to measles in utero and Crohn's disease: Danish register study. *BMJ* **316**, 196-197 (1998).

78. Forbes, A. & Kalantzis, T. Crohn's disease: the cold chain hypothesis. *Int J Colorectal Dis* **21**, 399-401 (2006).
79. Malekzadeh, F. et al. Crohn's disease and early exposure to domestic refrigeration. *PLoS One* **4**, e4288 (2009).
80. Sasaki, M. et al. Invasive *Escherichia coli* are a feature of Crohn's disease. *Lab Invest* **87**, 1042-1054 (2007).
81. Ekblom, A., Adami, H. O., Helmick, C. G., Jonzon, A. & Zack, M. M. Perinatal risk factors for inflammatory bowel disease: a case-control study. *Am J Epidemiol* **132**, 1111-1119 (1990).
82. Montgomery, S. M., Lambe, M., Wakefield, A. J., Pounder, R. E. & Ekblom, A. Siblings and the risk of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* **37**, 1301-1308 (2002).
83. Hampe, J., Heymann, K., Krawczak, M. & Schreiber, S. Association of inflammatory bowel disease with indicators for childhood antigen and infection exposure. *Int J Colorectal Dis* **18**, 413-417 (2003).
84. Luther, J., Dave, M., Higgins, P. D. & Kao, J. Y. Association between *Helicobacter pylori* infection and inflammatory bowel disease: a meta-analysis and systematic review of the literature. *Inflamm Bowel Dis* **16**, 1077-1084 (2010).
85. Summers, R. W., Elliott, D. E., Urban, J. F. J., Thompson, R. & Weinstock, J. V. *Trichuris suis* therapy in Crohn's disease. *Gut* **54**, 87-90 (2005).
86. Summers, R. W., Elliott, D. E., Urban, J. F. J., Thompson, R. A. & Weinstock, J. V. *Trichuris suis* therapy for active ulcerative colitis: a randomized controlled trial. *Gastroenterology* **128**, 825-832 (2005).
87. Hunter, M. M. & McKay, D. M. Review article: helminths as therapeutic agents for inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* **19**, 167-177 (2004).
88. Clavel-Chapelon, F. et al. E3N, a French cohort study on cancer risk factors. E3N Group. Etude Epidemiologique aupres de femmes de l'Education Nationale. *Eur J Cancer Prev* **6**, 473-478 (1997).
89. Lucas, F., Niravong, M., Villemint, S., Kaaks, R. & Clavel-Chapelon, F. Estimation of food portion size using photographs: validity, strengths, weaknesses and recommendations. *Journal of Human Nutrition and Dietetics* **8**, 65-74 (1995).
90. van Liere, M. J., Lucas, F., Clavel, F., Slimani, N. & Villemint, S. Relative validity and reproducibility of a French dietary history questionnaire. *Int J Epidemiol* **26 Suppl 1**, S128-36 (1997).
91. Lavoisier. (ed) *Répertoire général des aliments*. 1991).
92. Schofield, W. N. Predicting basal metabolic rate, new standards and review of previous work. *Hum Nutr Clin Nutr* **39 Suppl 1**, 5-41 (1985).
93. Ainsworth, B. E. et al. Compendium of physical activities: an update of activity codes and MET intensities. *Med Sci Sports Exerc* **32**, S498-504 (2000).
94. Guibout, C., Prisse, N. & Clavel-Chapelon, F. [Development of a bio-library in the cohort survey: E3N-EPIC]. *Rev Epidemiol Sante Publique* **51**, 137-141 (2003).
95. Mai, V. Dietary modification of the intestinal microbiota. *Nutrition reviews* **62**, 235-242 (2004).
96. Heuschkel, R. B., Menache, C. C., Megerian, J. T. & Baird, A. E. Enteral nutrition and corticosteroids in the treatment of acute Crohn's disease in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **31**, 8-15 (2000).
97. Zachos, M., Tondeur, M. & Griffiths, A. M. Enteral nutritional therapy for induction of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev* CD000542 (2007).

98. Shoda, R., Matsueda, K., Yamato, S. & Umeda, N. Epidemiologic analysis of Crohn disease in Japan: increased dietary intake of n-6 polyunsaturated fatty acids and animal protein relates to the increased incidence of Crohn disease in Japan. *American Journal of Clinical Nutrition* **63**, 741 (1996).
99. Probert, C. S., Jayanthi, V., Pinder, D., Wicks, A. C. & Mayberry, J. F. Epidemiological study of ulcerative proctocolitis in Indian migrants and the indigenous population of Leicestershire. *Gut* **33**, 687-693 (1992).
100. Carr, I. & Mayberry, J. F. The effects of migration on ulcerative colitis: a three-year prospective study among Europeans and first- and second- generation South Asians in Leicester (1991-1994). *Am J Gastroenterol* **94**, 2918-2922 (1999).
101. Cashman, K. D. & Shanahan, F. Is nutrition an aetiological factor for inflammatory bowel disease? *Eur J Gastroenterol Hepatol* **15**, 607-613 (2003).
102. Ekbom, A. & Montgomery, S. M. Environmental risk factors (excluding tobacco and microorganisms): critical analysis of old and new hypotheses. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **18**, 497-508 (2004).
103. Yamamoto, T., Nakahigashi, M. & Saniabadi, A. R. Review article: diet and inflammatory bowel disease--epidemiology and treatment. *Aliment Pharmacol Ther* **30**, 99-112 (2009).
104. Cox, D. R. Regression models and life table. *J. Roy. Statistical Society* **34**, 187-220 (1972).
105. Korn, E. L., Graubard, B. I. & Midthune, D. Time-to-event analysis of longitudinal follow-up of a survey: choice of the time-scale. *Am J Epidemiol* **145**, 72-80 (1997).
106. Thiebaut, A. C. & Benichou, J. Choice of time-scale in Cox's model analysis of epidemiologic cohort data: a simulation study. *Stat Med* **23**, 3803-3820 (2004).
107. Howe, G. R., Miller, A. B. & Jain, M. Re: "Total energy intake: implications for epidemiologic analyses". *Am J Epidemiol* **124(1)**, 157-159 (1986).
108. Willett, W. C., Howe, G. R. & Kushi, L. H. Adjustment for total energy intake in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr* **65**, 1220S-1228S; discussion 1229S-1231S (1997).
109. Hosmer, D. W. & Lemeshow, S. *Applied logistic regression (Wiley Series in probability and statistics)* (Wiley-Interscience Publication, 2000).
110. Abubakar, I. et al. A case-control study of drinking water and dairy products in Crohn's Disease--further investigation of the possible role of Mycobacterium avium paratuberculosis. *American journal of epidemiology* **165**, 776 (2007).
111. Sakamoto, N. et al. Dietary risk factors for inflammatory bowel disease: a multicenter case-control study in Japan. *Inflamm Bowel Dis* **11**, 154-163 (2005).
112. Jowett, S. L. et al. Influence of dietary factors on the clinical course of ulcerative colitis: a prospective cohort study. *Gut* **53**, 1479-1484 (2004).
113. Hart, A. R. et al. Diet in the aetiology of ulcerative colitis: a European prospective cohort study. *Digestion* **77**, 57-64 (2008).
114. Tjonneland, A. et al. Linoleic acid, a dietary n-6 polyunsaturated fatty acid, and the aetiology of ulcerative colitis: a nested case-control study within a European prospective cohort study. *Gut* **58**, 1606-1611 (2009).
115. Goldbohm, R. A. et al. Reproducibility of a food frequency questionnaire and stability of dietary habits determined from five annually repeated measurements. *Eur J Clin Nutr* **49**, 420-429 (1995).
116. Larsen, C. S. Animal source foods and human health during evolution. *J Nutr* **133**, 3893S-3897S (2003).

117. Klement, E., Cohen, R. V., Boxman, J., Joseph, A. & Reif, S. Breastfeeding and risk of inflammatory bowel disease: a systematic review with meta-analysis. *Am J Clin Nutr* **80**, 1342-1352 (2004).
118. Anonymous. protein requirements. Report of a Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation. *WHO technical report series* **724**, (1985).
119. Dewey, K. G., Beaton, G., Fjeld, C., Lonnerdal, B. & Reeds, P. Protein requirements of infants and children. *Eur J Clin Nutr* **50 Suppl 1**, S119-47; discussion S147-50 (1996).
120. Dupont, C. Protein requirements during the first year of life. *American Journal of Clinical Nutrition* **77**, 1544S (2003).
121. Koletzko, B. Innovations in Infant Milk Feeding: From the Past to the Future. *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program* **66**, 1-17 (2010).
122. Koletzko, B. et al. Global standard for the composition of infant formula: recommendations of an ESPGHAN coordinated international expert group. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **41**, 584-599 (2005).
123. Hughes, R., Magee, E. A. & Bingham, S. Protein degradation in the large intestine: relevance to colorectal cancer. *Curr Issues Intest Microbiol* **1**, 51-58 (2000).
124. Wu, G. Intestinal mucosal amino acid catabolism. *J Nutr* **128**, 1249-1252 (1998).
125. Geypens, B. et al. Influence of dietary protein supplements on the formation of bacterial metabolites in the colon. *Gut* **41**, 70-76 (1997).
126. Boudry, G., Morise, A., Seve, B. & Le Huerou-Luron, I. Effect of milk formula protein content in a porcine model of low birth weight neonates. *Pediatr Res* (2010).
127. Roediger, W. E. Review article: nitric oxide from dysbiotic bacterial respiration of nitrate in the pathogenesis and as a target for therapy of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* **27**, 531-541 (2008).
128. Uribarri, J. et al. Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet. *J Am Diet Assoc* **110**, 911-16.e12 (2010).
129. Mathers, M. et al. Electronic media use and adolescent health and well-being: cross-sectional community study. *Acad Pediatr* **9**, 307-314 (2009).
130. Zeghoud, F. et al. [Vitamin D and pubertal maturation. Value and tolerance of vitamin D supplementation during the winter season]. *Arch Pediatr* **2**, 221-226 (1995).
131. Stoffman, N. & Gordon, C. M. Vitamin D and adolescents: what do we know? *Curr Opin Pediatr* **21**, 465-471 (2009).
132. Huh, S. Y. & Gordon, C. M. Vitamin D deficiency in children and adolescents: epidemiology, impact and treatment. *Rev Endocr Metab Disord* **9**, 161-170 (2008).
133. Chapuy, M. C. et al. Prevalence of vitamin D insufficiency in an adult normal population. *Osteoporos Int* **7**, 439-443 (1997).
134. Kull, M. J., Kallikorm, R., Tamm, A. & Lember, M. Seasonal variance of 25-(OH) vitamin D in the general population of Estonia, a Northern European country. *BMC Public Health* **9**, 22 (2009).
135. Rucker, D., Allan, J. A., Fick, G. H. & Hanley, D. A. Vitamin D insufficiency in a population of healthy western Canadians. *CMAJ* **166**, 1517-1524 (2002).
136. Saintonge, S., Bang, H. & Gerber, L. M. Implications of a new definition of vitamin D deficiency in a multiracial us adolescent population: the National Health and Nutrition Examination Survey III. *Pediatrics* **123**, 797-803 (2009).
137. Garssen, J. & van Loveren, H. Effects of ultraviolet exposure on the immune system. *Crit Rev Immunol* **21**, 359-397 (2001).

138. van der Mei, I. A. et al. Past exposure to sun, skin phenotype, and risk of multiple sclerosis: case-control study. *BMJ* **327**, 316 (2003).
139. Lim, W. C., Hanauer, S. B. & Li, Y. C. Mechanisms of disease: vitamin D and inflammatory bowel disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* **2**, 308-315 (2005).
140. Peyrin-Biroulet, L., Oussalah, A. & Bigard, M. A. Crohn's disease: the hot hypothesis. *Med Hypotheses* **73**, 94-96 (2009).
141. Pappa, H. M., Grand, R. J. & Gordon, C. M. Report on the vitamin D status of adult and pediatric patients with inflammatory bowel disease and its significance for bone health and disease. *Inflammatory bowel diseases* **12**, 1162-1174 (2006).
142. Armitage, E. L. et al. Incidence of juvenile-onset Crohn's disease in Scotland: association with northern latitude and affluence. *Gastroenterology* **127**, 1051-1057 (2004).
143. Sonnenberg, A., McCarty, D. J. & Jacobsen, S. J. Geographic variation of inflammatory bowel disease within the United States. *Gastroenterology* **100**, 143-149 (1991).
144. Verdebout, J. A European satellite-derived UV climatology available for impact studies. *Radiat Prot Dosimetry* **111**, 407-411 (2004).
145. Yu, C. L. et al. Assessment of lifetime cumulative sun exposure using a self-administered questionnaire: Reliability of two approaches. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* **18**, 464 (2009).
146. Thieden, E., Philipsen, P. A., Heydenreich, J. & Wulf, H. C. UV radiation exposure related to age, sex, occupation, and sun behavior based on time-stamped personal dosimeter readings. *Archives of dermatology* **140**, 197 (2004).
147. McCarty, C. A. Sunlight exposure assessment: can we accurately assess vitamin D exposure from sunlight questionnaires? *American Journal of Clinical Nutrition* **87**, 1097S (2008).
148. Orsini, N., BELLOCCO, R., BOTTAI, M., Pagano, M. & Wolk, A. Age and temporal trends of total physical activity among Swedish women. *Medicine & Science in Sports & Exercise* **38**, 240 (2006).
149. Driscoll, R. H. J., Meredith, S. C., Sitrin, M. & Rosenberg, I. H. Vitamin D deficiency and bone disease in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* **83**, 1252-1258 (1982).
150. Harries, A. D. et al. Vitamin D status in Crohn's disease: association with nutrition and disease activity. *Gut* **26**, 1197-1203 (1985).
151. Gilman, J., Shanahan, F. & Cashman, K. D. Determinants of vitamin D status in adult Crohn's disease patients, with particular emphasis on supplemental vitamin D use. *European journal of clinical nutrition* **60**, 889-896 (2006).
152. Pappa, H. M. et al. Vitamin D status in children and young adults with inflammatory bowel disease. *Pediatrics* **118**, 1950 (2006).
153. Sentongo, T. A. et al. Vitamin D status in children, adolescents, and young adults with Crohn disease. *American Journal of Clinical Nutrition* **76**, 1077 (2002).
154. McCarthy, D. et al. Seasonality of vitamin D status and bone turnover in patients with Crohn's disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics* **21**, 1073-1083 (2005).
155. Zeng, L. & Anderson, F. H. Seasonal change in the exacerbations of Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* **31**, 79-82 (1996).
156. Vogelsang, H. et al. Bone disease in vitamin D-deficient patients with Crohn's disease. *Dig Dis Sci* **34**, 1094-1099 (1989).

157. Wang, T. T. et al. Direct and indirect induction by 1,25-dihydroxyvitamin D3 of the NOD2/CARD15-defensin beta2 innate immune pathway defective in Crohn disease. *J Biol Chem* **285**, 2227-2231 (2010).
158. Smolders, J. et al. Vitamin D status is positively correlated with regulatory T cell function in patients with multiple sclerosis. *PLoS One* **4**, e6635 (2009).
159. Wang, T. J., Zhang, F., Richards, J. B., Kestenbaum, B. & van Meurs, J. B. Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: a genome-wide association study. *The Lancet* (2010).
160. Riboli, E. & Kaaks, R. The EPIC Project: rationale and study design. European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Int J Epidemiol* **26 Suppl 1**, S6-14 (1997).
161. Kaaks, R., Slimani, N. & Riboli, E. Pilot phase studies on the accuracy of dietary intake measurements in the EPIC project: overall evaluation of results. European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Int J Epidemiol* **26 Suppl 1**, S26-36 (1997).
162. Kaaks, R. & Riboli, E. Validation and calibration of dietary intake measurements in the EPIC project: methodological considerations. European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Int J Epidemiol* **26 Suppl 1**, S15-25 (1997).
163. Halkjaer, J. et al. Intake of total, animal and plant proteins, and their food sources in 10 countries in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Eur J Clin Nutr* **63 Suppl 4**, S16-36 (2009).
164. Cust, A. E. et al. Total dietary carbohydrate, sugar, starch and fibre intakes in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Eur J Clin Nutr* **63 Suppl 4**, S37-60 (2009).
165. Freisling, H. et al. Region-specific nutrient intake patterns exhibit a geographical gradient within and between European countries. *J Nutr* **140**, 1280-1286 (2010).
166. Linseisen, J. et al. Dietary fat intake in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition: results from the 24-h dietary recalls. *Eur J Clin Nutr* **63 Suppl 4**, S61-80 (2009).
167. Vergnaud, A. C. et al. Meat consumption and prospective weight change in participants of the EPIC-PANACEA study. *Am J Clin Nutr* **92**, 398-407 (2010).
168. Sluijs, I. et al. Dietary intake of total, animal, and vegetable protein and risk of type 2 diabetes in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-NL study. *Diabetes Care* **33**, 43-48 (2010).
169. Dargent-Molina, P. et al. Proteins, dietary acid load, and calcium and risk of postmenopausal fractures in the E3N French women prospective study. *J Bone Miner Res* **23**, 1915-1922 (2008).
170. Altorf-van der Kuil, W. et al. Dietary protein and risk of hypertension in a Dutch older population: the Rotterdam study. *J Hypertens* (2010).
171. Remer, T. et al. Prepubertal adrenarchal androgens and animal protein intake independently and differentially influence pubertal timing. *J Clin Endocrinol Metab* **95**, 3002-3009 (2010).
172. Alexander, D. D., Cushing, C. A., Lowe, K. A., Scurman, B. & Roberts, M. A. Meta-analysis of animal fat or animal protein intake and colorectal cancer. *Am J Clin Nutr* **89**, 1402-1409 (2009).
173. Grant, W. B. Ecologic studies of solar UV-B radiation and cancer mortality rates. *Recent Results Cancer Res* **164**, 371-377 (2003).

174. Grant, W. B. & Garland, C. F. The association of solar ultraviolet B (UVB) with reducing risk of cancer: multifactorial ecologic analysis of geographic variation in age-adjusted cancer mortality rates. *Anticancer Res* **26**, 2687-2699 (2006).
175. Zittermann, A., Schleithoff, S. S. & Koerfer, R. Putting cardiovascular disease and vitamin D insufficiency into perspective. *Br J Nutr* **94**, 483-492 (2005).
176. Autier, P. & Gandini, S. Vitamin D supplementation and total mortality: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Intern Med* **167**, 1730-1737 (2007).
177. Ilahi, M., Armas, L. A. & Heaney, R. P. Pharmacokinetics of a single, large dose of cholecalciferol. *Am J Clin Nutr* **87**, 688-691 (2008).