

Université de Montréal

Association entre la maladie parodontale et le cancer colorectal sporadique

Par

Amal Idrissi Janati

Faculté de médecine

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de doctorat
en sciences biomédicales, option sciences buccodentaires

Avril 2022

© Amal Idrissi Janati, 2022

Université de Montréal

Faculté de médecine

Cette thèse intitulée

Association entre la maladie parodontale et le cancer colorectal sporadique

Présentée par

Amal Idrissi Janati

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

Dr Pierre Blanchet

Président-rapporteur

Dr Stéphane Roy

Représentant du Doyen

Dre Elham Emami

Directrice de recherche

Dr Igor Karp

Codirecteur

Dre Marie-Claude Rousseau

Membre du jury

Dr Christian Caron

Examineur externe

Résumé

CONTEXTE : Le cancer colorectal (CCR) reste l'un des cancers les plus diagnostiqués au Canada et dans le monde. Malgré les efforts en matière de dépistage, la moitié des cancers colorectaux sont encore diagnostiqués à des stades avancés de la maladie, réduisant ainsi les chances de survie à ce cancer. La prévention du CCR reste encore primordiale et les efforts doivent être maintenus pour l'identification de ses facteurs de risque modifiables. Durant cette dernière décennie, on a assisté à un cumul d'évidence sur l'association entre l'enrichissement colorectal en une bactérie spécifique, *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*), et le CCR. Ce qui a ressuscité le débat sur l'association même entre la maladie parodontale (MP) et le CCR, puisque *F. nucleatum* est non seulement une bactérie commensale de la bouche, mais surtout l'une des principaux agents pathogènes de la MP. Des études épidémiologiques antérieures avaient en effet déjà suggéré que la MP serait associée au risque de CCR, mais leurs résultats sont restés non concluants à cause de leurs défaillances méthodologiques. La diffusion des bactéries parodontopathogènes, comme *F. nucleatum*, et de leurs produits de virulence de la bouche vers le côlon et la libération des médiateurs d'inflammation chronique dans la circulation générale sont les mécanismes incriminés dans l'association entre la MP et le CCR.

OBJECTIFS: 1) Vérifier l'association entre la MP et le CCR; 2) Synthétiser la littérature sur l'association entre la détection de la bactérie *F. nucleatum* dans le côlon et le CCR et; 3) Vérifier la faisabilité d'investiguer l'expression concomitante de *F. nucleatum*, dans les deux milieux buccal et colorectal, en présence de lésions néoplasiques colorectales. Ces deux derniers objectifs sont un préambule à l'investigation du rôle des bactéries causales de la MP, précisément *F. nucleatum*, comme mécanisme d'association entre la MP et le CCR.

MÉTHODES: Nous avons entrepris trois projets de recherche distincts qui répondent aux trois objectifs respectifs de recherche cités ci-dessus: 1) Une étude cas-témoins à base populationnelle (Projet COLDENT) a inclut 348 cas incidents de CCR et 310 témoins qui lui sont appariés dans des catégories d'âge et de sexe. Des données ont été collectées sur l'exposition à la MP et aux principaux facteurs de risque du CCR; 2) Une revue systématique avec méta-analyse d'études observationnelles ayant investigué la bactérie, *F. nucleatum*, dans des échantillons colorectaux, chez des cas de CCR et des témoins exempts de lésions cancéreuses ou précancéreuses colorectales;

et 3) Une étude pilote cas-témoins à base hospitalière, auprès de 22 cas de néoplasies colorectales et 21 témoins, examinés par coloscopie. Des échantillons de salive et des biopsies de muqueuse colorectale, ainsi que des données sur l'exposition à la MP et aux principaux facteurs de risque du CCR ont été collectées.

RÉSULTATS: Les résultats de notre étude cas-témoins populationnelle suggèrent que le taux d'incidence de CCR était augmenté chez les personnes avec un historique positif de MP comparé aux personnes sans historique de MP, en ajustant pour la majorité des facteurs de confusion potentiels (Rapport des taux ajusté = 1,45 ; Intervalle de confiance (IC) à 95 % : 1,04-2,01). Les résultats de notre revue systématique incluant 24 études observationnelles ont montré que dans la majorité des études où la charge de *F. nucleatum* dans les échantillons colorectaux était quantifiée, celle-ci était significativement plus élevée chez les cas de CCR que chez les témoins. Les résultats de la méta-analyse de 12 études observationnelles qui ont rapporté le pourcentage des échantillons colorectaux où *F. nucleatum* était détecté montrent une association significativement positive entre la détection de la bactérie *F. nucleatum* dans le côlon et le CCR (Rapport de cotes combiné = 8,3; IC à 95 % = 5,2-13; Indice d'hétérogénéité $I_2 = 26,3$ %; p pour hétérogénéité = 0,18). Enfin, les résultats préliminaires de l'étude de faisabilité appuient la faisabilité et l'utilité de mener une étude subséquente pour investiguer *F. nucleatum* dans la salive et le côlon en présence de néoplasies colorectales afin de vérifier son rôle dans l'association entre la MP et le CCR, mais des ajustements doivent être apportés à la méthodologie initiale.

CONCLUSION: Nos résultats suggèrent que l'exposition à la MP peut augmenter le risque de CCR, bien qu'on ne puisse encore confirmer de lien causal. On espère que ce travail sensibilise les cliniciens, décideurs en santé et public à l'importance de prévenir et de contrôler les maladies buccodentaires, notamment la MP, pour la prévention même de maladies systémiques encore plus fatales, tels que le CCR.

Mots-clés : Maladie parodontale, santé orale, cancer colorectal, adénome, bactérie orale, microbiome, *Fusobacterium nucleatum*, salive, muqueuse colorectale.

Abstract

BACKGROUND: Colorectal cancer (CRC) remains one of the most diagnosed cancers in Canada and around the world. Despite screening efforts, half of colorectal cancers are still diagnosed at advanced stages of the disease, thus reducing the chances of survival from this cancer. Prevention of CRC still remains essential, and efforts must be maintained to identify its modifiable risk factors. Over the past decade, there has been an accumulation of evidence on the association between colorectal enrichment in a specific bacterium, *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*), and CRC. This has sparked debate on the association between periodontal disease (PD) and CRC, since *F. nucleatum* is not only a commensal bacterium of the mouth, but above all one of the main pathogens of PD. Previous epidemiological studies had indeed already suggested that PD would be associated with the risk of CRC, but their results remained inconclusive because of their methodological flaws. Dissemination of periodontal pathogen bacteria such as *F. nucleatum*, and of their virulence products, from the mouth to the colon and the release of chronic inflammatory mediators into the bloodstream are suggested as the mechanisms involved in the association between PD and CRC.

OBJECTIVES: 1) To verify the association between PD and CRC; 2) To synthesize the literature on the association between the detection of the bacterium *F. nucleatum* in the colon and CRC; and 3) To verify the feasibility of investigating the concomitant expression of *F. nucleatum*, in both oral and colorectal environments, in the presence of colorectal neoplasms. These last two objectives are a preamble to the investigation of the role of the causative bacteria of PD, specifically *F. nucleatum*, as a mechanism of association between PD and CRC.

METHODS: We undertook three separate research projects that address the three respective research objectives listed above: 1) A population-based case-control study (COLDENT Project) included 348 incident cases of CRC and 310 age and sex frequency-matched controls. Data were collected on PD and on major risk factors for CRC; 2) A systematic review with meta-analysis of observational studies that have investigated the bacterium *F. nucleatum* in colorectal samples, in CRC cases and colorectal cancerous or precancerous-free controls; and 3) A pilot hospital-based case-control study, with 22 cases of colorectal neoplasms and 21 controls, examined by colonoscopy. Saliva samples and colorectal mucosal biopsies as well as data on exposure to PD and major risk factors for CRC were collected.

RESULTS: The results of our population-based case-control study suggest that the rate of CRC was increased in people with a positive history of PD compared to people without a history of PD, adjusting for the majority of potential confounders (adjusted rate ratio = 1.45; 95% Confidence interval (CI): 1.04-2.01). The results of our systematic review including 24 observational studies showed that in most studies where the load of *F. nucleatum* in colorectal samples was quantified, it was significantly higher in CRC cases than in controls. The results of the meta-analysis of 12 observational studies that reported the percentage of colorectal samples where *F. nucleatum* was detected show a significantly positive association between the detection of the bacterium *F. nucleatum* in the colon and CRC (pooled odds ratio = 8.3; 95% CI = 5.2-13; heterogeneity index $I^2 = 26.3%$; p for heterogeneity = 0.18). Finally, the preliminary results of the feasibility study support the feasibility and utility of conducting a subsequent study to investigate *F. nucleatum* in saliva and colon in the presence of colorectal neoplasms to verify its role in the association between PD and CCR, but adjustments need to be made to the original methodology.

CONCLUSION: Our results suggest that exposure to PD may increase the risk of CRC, although a causal relationship cannot yet be confirmed. It is hoped that this work will sensitize clinicians, health policy makers and the public to the importance of preventing and controlling oral diseases, including PD, for the prevention of even more fatal systemic diseases, such as CRC.

Keywords: Periodontal disease, oral health, colorectal cancer, adenoma, oral bacteria, microbiome, *Fusobacterium nucleatum*, saliva, colorectal mucosa.

Table des matières

Résumé	5
Abstract	7
Table des matières	9
Liste des tableaux	17
Liste des figures	19
Liste des sigles et abréviations	21
Remerciements	27
1. INTRODUCTION	29
2. REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	32
2.1 Cancer colorectal.....	32
2.1.1 Données épidémiologiques	32
2.1.1.1 Au niveau mondial	32
2.1.1.2 Au niveau national	33
2.1.2 Classification étiologique des cancers colorectaux et facteurs de risque.....	34
2.2 Dysbiose intestinale et cancer colorectal	39
2.2.1 Généralités sur le microbiote intestinal.....	39
2.2.2 Constats en faveur du rôle de la dysbiose intestinale dans le développement du cancer colorectal	40
2.2.3 Mécanismes d'association entre la dysbiose intestinale et le cancer colorectal	41
2.2.3.1 Modèle bactérien du rôle de la dysbiose intestinale dans la carcinogénèse colorectale	41
2.2.3.2 Sens de la relation entre la dysbiose intestinale et le cancer colorectal	42
2.3 <i>Fusobacterium nucleatum</i> , dysbiose intestinale et cancer colorectal	42
2.3.1 Généralités sur le <i>Fusobacterium nucleatum</i>	42

2.3.2	Dysbiose intestinale par enrichissement du milieu en <i>Fusobacterium nucleatum</i> et cancer colorectal.....	43
2.3.3	Mécanismes d'action de <i>Fusobacterium nucleatum</i> dans le développement tumoral colorectal	44
2.3.4	Origine orale de l'enrichissement du microbiote intestinal en <i>Fusobacterium nucleatum</i>	45
2.4	Maladie parodontale	49
2.4.1	Données épidémiologiques	49
2.4.2	Généralités sur la gingivite et la parodontite.....	50
2.4.2.1	La gingivite	50
2.4.2.2	La parodontite	51
2.4.3	Rôle de <i>Fusobacterium nucleatum</i> dans la maladie parodontale	53
2.5	Maladie parodontale et cancer colorectal.....	54
2.5.1	État des connaissances sur le lien entre la maladie parodontale et le cancer colorectal.....	54
2.5.1.1	Définition de cas de maladie parodontale dans les études épidémiologiques.....	54
2.5.1.2	Description et critique des études épidémiologiques sur l'association entre la maladie parodontale et le cancer colorectal	57
2.5.2	Mécanismes d'association suggérés entre la maladie parodontale et le cancer colorectal	67
3.	PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS DE RECHERCHE.....	69
4.	MÉTHODOLOGIE.....	71
4.1	Étude de l'association entre la maladie parodontale et le cancer colorectal sporadique: Étude COLDENT	71
4.1.1	Devis.....	71
4.1.2	Participants	71
4.1.3	Collecte des données	72

4.1.4 Variable d'historique positif de maladie parodontale	74
4.1.5 Covariables d'ajustement	75
4.1.5.1 Choix des covariables et analyse de biais de collision par graphique orienté acyclique.....	75
4.1.5.2 Codage ou calcul des covariables.....	78
4.1.6 Analyses statistiques	83
4.1.6.1 Analyses descriptives	83
4.1.6.2 Analyses d'association entre la maladie parodontale et le cancer colorectal.....	84
4.1.6.3 Analyses de sensibilité	85
4.1.6.4 Analyse de biais de sélection par participation différentielle	85
4.1.7 Contribution de l'étudiante au projet COLDENT	86
4.2 Étude de l'association entre la détection de la bactérie <i>F. nucleatum</i> dans le côlon et le cancer colorectal	87
4.2.1 Devis.....	87
4.2.2 Recherche documentaire	88
4.2.3 Sélection des études	88
4.2.4 Évaluation de la qualité des études	88
4.2.5 Extraction des données.....	89
4.2.6 Analyse des données	90
4.2.7 Contribution de l'étudiante à la revue systématique avec méta-analyse.....	90
4.3 Étude de faisabilité d'investigation du <i>Fusobacterium nucleatum</i> dans la salive et la muqueuse colorectale	91
4.3.1. Devis.....	91
4.3.2 Participants.....	91
4.3.3 Collecte des données	92
4.3.3.1 Données collectées par questionnaire	92

4.3.3.2 Échantillons de muqueuse colorectale	92
4.3.3.3 Échantillons de salive.....	93
4.3.4 Analyse microbiologique	93
4.3.5 Variables.....	94
4.3.6 Analyse des données	95
4.3.7 Contribution de l'étudiante à l'étude de faisabilité	95
5. RÉSULTATS	96
5.1 Article 1- Periodontal Disease as a Risk Factor for Sporadic Colorectal Cancer: Results from COLDENT Study.....	96
5.1.1 Contributions des auteurs	96
5.1.2 Manuscrit.....	97
LIST OF ABBREVIATIONS	97
ABSTRACT	97
BACKGROUND.....	98
OBJECTIVE.....	99
METHODS.....	99
RESULTS.....	104
DISCUSSION	108
5.1.3 Résultats complémentaires	116
5.1.3.1 Exposition à la maladie parodontale	116
5.1.3.2 Résultats des analyses de sensibilité	118
5.1.3.3 Résultats de l'analyse de biais de sélection.....	119
5.2 Article 2- Is a Fusobacterium nucleatum infection in the colon a risk factor for colorectal cancer? A systematic review and meta-analysis protocol.....	122
5.2.1 Contributions des auteurs.....	122
5.2.2 Manuscrit.....	122

LIST OF ABBREVIATIONS	122
ABSTRACT	123
BACKGROUND.....	124
OBJECTIVES	125
METHODS.....	126
DATA SYNTHESIS	128
DISCUSSION	129
 5.3 Article 3- Detection of <i>Fusobacterium nucleatum</i> in feces and colorectal mucosa as a risk factor for colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis.	 134
5.3.1 Contribution des auteurs.....	134
5.3.2 Manuscrit.....	134
LIST OF ABBREVIATIONS	134
ABSTRACT	135
BACKGROUND.....	136
METHODS.....	137
RESULTS.....	141
DISCUSSION	153
CONCLUSION	156
 5.4 Article 4- Investigation of <i>Fusobacterium Nucleatum</i> in Saliva and Colorectal Mucosa: A Pilot Study	 163
5.4.1. Contribution des auteurs.....	163
5.4.2 Manuscrit.....	164
LIST OF ABBREVIATIONS	164
ABSTRACT	164
BACKGROUND.....	165
OBJECTIVES	168

METHODOLOGY	168
RESULTS.....	171
DISCUSSION	175
6. DISCUSSION	182
6.1 Étude de l'association entre la maladie parodontale et le cancer colorectal	182
6.1.1 Apport de l'étude de faisabilité du Projet COLDENT	182
6.1.2 Résultats sur l'association entre la maladie parodontale et le cancer colorectal.....	184
6.1.3 Forces de l'étude COLDENT.....	186
6.1.3.1 Définition de la maladie parodontale	186
6.1.3.2 Contrôle des facteurs de confusion	194
6.1.4 Limites de l'étude COLDENT	194
6.2 Étude des mécanismes d'association entre la maladie parodontale et le cancer colorectal	197
6.2.1 Association entre la détection de <i>F. nucleatum</i> dans le côlon et cancer colorectal	197
6.2.2 Faisabilité d'une étude principale sur l'investigation de <i>F. nucleatum</i> dans la salive et le côlon en lien avec le cancer colorectal.....	199
6.2.2.1 Source d'identification et de recrutement des participants	199
6.2.2.2 Collecte des échantillons biologiques et administration des questionnaires.....	200
6.2.2.3 Résultats préliminaires	201
7. RECOMMANDATIONS POUR LES ÉTUDES FUTURES.....	204
8. IMPLICATIONS ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE	208
9. CONCLUSION	211
Références	212
Annexes.....	231
Annexe 1. Questionnaires de l'étude COLDENT	231
Annexe 2. Newcastle Ottawa Scale pour l'évaluation de la qualité des études cas-témoins ...	253

Annexe 3. Article 1254
Annexe 4. Article 2264
Annexe 5. Article 3270
Annexe 6. Article 4285

Liste des tableaux

Tableau 1. – Études ayant exploré l’expression de <i>Fusobacterium nucleatum</i> au niveau buccal chez des patients avec tumeurs colorectales	47
Tableau 2. – Études observationnelles sur l’association entre la maladie parodontale et le cancer colorectal : définition de cas de maladie parodontale par mesures cliniques.....	58
Tableau 3. – Études observationnelles sur l’association entre la maladie parodontale et le cancer colorectale: définition de cas de maladie parodontale par mesures auto-rapportées	61
Tableau 4. – Questions on self-reported periodontal disease	101
Tableau 5. – Missing data in variables included in the association model.....	104
Tableau 6. – Sociodemographic characteristics and colorectal cancer risk factors in COLDENT study participants.....	107
Tableau 7. – Rate ratio for association between periodontal disease and colorectal cancer ...	108
Tableau 8. – Distribution des cas et témoins de COLDENT par mesures auto-rapportées de la maladie parodontale	116
Tableau 9. – Résultats des analyses de sensibilité pour la mesure d’association entre la maladie parodontale et le cancer colorectal	118
Tableau 10. – Caractéristiques sociodémographiques et statut du tabagisme chez les répondants et non-répondants à l’étude COLDENT	120
Tableau 11. – Initial search strategy.....	138
Tableau 12. – Characteristics of studies included in the systematic review	144
Tableau 13. – Studies comparing <i>Fusobacterium nucleatum</i> load in colorectal specimens of colorectal cancer cases and controls.....	147
Tableau 14. – Frequency of presence of <i>Fusobacterium nucleatum</i> in colorectal cancer and controls’ specimens; and odds ratio for the association between <i>Fusobacterium nucleatum</i> and colorectal cancer	149
Tableau 15. – Summary of studies that investigated <i>F. nucleatum</i> in saliva and / or colorectal mucosa or stool in colorectal cancer cases and controls	167
Tableau 16. – Sociodemographic characteristics and potential colorectal neoplasms risk factors in study participants.....	172
Tableau 17. – Characteristics of colorectal neoplasms in case group	174

Tableau 18. – Detection rate of <i>Fusobacterium nucleatum</i> by specimen type and participant group	175
Tableau 19. – Réalisations de l'étude de faisabilité et de l'étude principale COLDENT	184
Tableau 20. – Usage des mesures parodontales auto-rapportées dans les études observationnelles sur l'association entre la maladie parodontale et les maladies, ou indicateurs de maladies	188

Liste des figures

Figure 1. –	Présentation graphique d'un biais de collision par Hernán et al. (2004)	76
Figure 2. –	Graphique orienté acyclique de l'association entre la maladie parodontale et le cancer colorectal	77
Figure 3. –	Flow chart of COLDENT study recruitment.....	105
Figure 4. –	Distribution des cas et des témoins de l'étude COLDENT par périodes d'âge de début de la maladie parodontale, dans les strates d'âge des participants.....	117
Figure 6. –	Forest plot of the association between <i>Fusobacterium nucleatum</i> in colorectal specimens and colorectal cancer: Results of a random-effects meta-analysis of 12 observational studies	151
Figure 7. –	Funnel plot of the natural logarithm-transformed odds ratio estimates, by the corresponding standard error.....	151
Figure 8. –	Forest plots for subgroup meta-analysis.....	152
Figure 9. –	Relative quantification of <i>Fusobacterium nucleatum</i> level in saliva, in case and control groups	175

Liste des sigles et abréviations

AAP: Académie américaine de parodontologie / *American Academy of Periodontology*

AHRQ: *Agency for Healthcare Research and Quality*

AINS: Anti-inflammatoires non stéroïdiens

ARIC: *Atherosclerosis Risk in Communities*

BMI: *Body mass index*

CA: *Conventional adenoma*

CCR: Cancer colorectal

CDC: *Centers for Disease Control and Prevention*

CDSR: *Cochrane Database of Systematic Reviews*

CHUM: Centre hospitalier et universitaire de Montréal

CI: *Confidence interval*

CRC: *Colorectal cancer*

CRN: *Colorectal neoplasm*

CRP : Protéine C-réactive

DAG: *Directed acyclic graph* / Graphique orienté acyclique

F. nucleatum: *Fusobacterium nucleatum*

FFQ: *Food Frequency Questionnaire*

FISH: *Fluorescence in situ hybridization* / Hybridation in situ en fluorescence

GRADE: *Grading of Recommendations Assessment, Development, and Evaluation.*

HPFS: *Health Professionals Follow-Up Study*

HR: *Hazard ratio* /Rapport des risques instantanés

IBD: *Inflammatory bowel disease*

IC: Intervalle de confiance

IL: Interleukine

LTPAQ: *Lifetime Total Physical Activity Questionnaire*

MP: Maladie parodontale

MET: *Metabolic equivalent of task* / Équivalent métabolique

MOOSE: *Meta-Analysis of Observational Studies in Epidemiology*

MSI: *Microsatellites instables* / *Microsatellite Instability*

NA-NSAID: *Non-aspirin non-steroidal anti-inflammatory drugs*

NF-Kb: *Nuclear factor kB*

NHANES III: *National Health and Nutrition Examination Survey III*

NHEFS: *NHANES I Epidemiologic Follow-up Study*

NHS: *Nurses' Health Study*

NOS: *Newcastle Ottawa scale*

NSAID: *Non-steroidal anti-inflammatory drug*

OMS: *Organisation mondiale de la santé*

PAC: *Perte d'attache clinique*

PCR: *Polymerase chain reaction / Réaction de polymérisation en chaîne*

PD: *Periodontal disease*

PGE2: *Prostaglandine E2*

PRISMA: *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses*

PRISMA-P: *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses protocols*

PROSPERO: *Prospective Register of Systematic Reviews*

qPCR: *Quantitative polymerase chain reaction/Réaction de polymérisation en chaîne quantitative*

RA: *Relative abundance*

RC : *Rapport de cotes / Odds ratio*

RCD : *Rapport de cotes diagnostique*

RQ: *Relative quantification*

RR: *Rate ratio / Rapport de taux*

RRa: *Rapport de taux ajusté / Adjusted rate ratio*

RRI : *Rapport des risques instantanés / Hazard ratio*

RSOS: *Recherche du sang occulte dans les selles*

Sb: *Sensibilité*

Sp: *Spécificité*

SSA: *Serrated sessile adenoma*

STAT3: *Signal transducer and activator of transcription 3*

Subsp.: *Sous-espèce*

TNF: *Facteur de nécrose tumorale*

TNF- α : *Facteur de nécrose tumorale alpha*

sTNFR-II: Récepteur soluble du facteur de nécrose tumorale type II

WHI-OS: *Women's Health Initiative Observational Cohort*

À la mémoire de mon père, qui s'est éteint avant de pouvoir partager avec moi ce nouvel accomplissement.

À la mémoire du Dr Philip Gordon, qui a généreusement soutenu le projet COLDENT à l'Hôpital Général Juif.

À la mémoire de tous les participants de ce projet, qui ont succombé à leur cancer.

Remerciements

Ce projet est le fruit de plusieurs collaborations qui ont impliqué des chercheurs, des cliniciens, du personnel médical, des techniciens de laboratoire, des assistants de recherche et, surtout, des patients généreux.

Mes premiers remerciements vont à mes superviseurs, Dre Elham Emami et Dr Igor Karp, qui m'ont encouragé à poursuivre ce doctorat et m'ont soutenu tout au long de mon cheminement. Je puisais ma force dans votre confiance et votre estime pour moi, autant que je voyais l'avenir de la recherche à travers vos accomplissements. Merci pour votre supervision et votre disponibilité.

Je remercie aussi tous les médecins et chercheurs qui ont collaboré aux projets de recherche de ce doctorat, ainsi que les secrétaires médicales et infirmières qui nous ont facilité énormément le recrutement des participants.

Un remerciement particulier est dédié aux participants des projets de recherche, qui bien que leurs conditions n'étaient pas toujours favorables, ils ont accepté de m'aider dans le seul but d'avancer les connaissances sur le cancer colorectal. Je garde encore en mémoire l'histoire de plusieurs d'entre vous.

Je remercie aussi les chers professeurs qui ont siégé à mes deux comités de parrainage et d'examen de synthèse, dont Dre Belinda Nicolau, Dr Simon D. Tran, Dr Pierre Rainville et Dre Fatiha Chandad. Merci d'avoir jugé mon avancement dans le projet doctoral et de m'avoir encouragé et guidé à prendre les bonnes décisions.

Je remercie l'assistante de recherche Nancy Faraj pour sa contribution au projet COLDENT, sans son aide, ce projet ne serait jamais terminé. Je remercie aussi Younan Liu pour le temps qu'il a passé à l'analyse microbiologique des échantillons biologiques, Natalie Clairoux, Claudie Laprise et Hisham Sabri pour leur aide à la revue systématique, et à Miguel Chagnon pour ses conseils statistiques.

Je suis très reconnaissante aux chers membres du jury de cette thèse d'avoir accepté de consacrer leur temps et leurs efforts pour réviser ce travail. Merci pour vos précieux commentaires.

Enfin, je remercie mon conjoint qui m'a beaucoup soutenu et encouragé tout le long de mon parcours, et mes enfants Reda, Sara et Lilia, qui ont été patients et compréhensifs.

1. INTRODUCTION

Chaque année, plus d'un million et demi d'humains dans le monde sont diagnostiqués avec un cancer colorectal (CCR) et presque un million en décèdent¹. L'incidence du CCR varie à travers le monde avec une prépondérance dans les pays développés ou en voie de développement². Dans les pays les plus aisés, comme le Canada et les États-Unis, les efforts en matière de dépistage préventif du CCR ont contribué à freiner la courbe de croissance de nouveaux cas de CCR durant ces dernières années³. Cependant, l'incidence et la mortalité par CCR restent encore parmi les plus élevées de tous les cancers qui touchent les Canadiens. Aussi et malheureusement, la moitié des cancers colorectaux sont encore diagnostiqués à des stades avancés (III et IV) de la maladie, avec un plus faible taux de survie^{2, 4}. L'investigation de facteurs de risque modifiables du CCR est, par conséquent, primordiale à la prévention de nouveaux cas de CCR.

Durant les dernières décennies, le développement de techniques de recherche moléculaire ont mis en lumière le rôle de la dysbiose intestinale dans la carcinogénèse du côlon^{5, 6}, avec un intérêt plus marqué pour une bactérie spécifique, *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*). Son enrichissement lors du processus tumoral colorectal est fréquemment rapporté par des études consécutives et ses facteurs de virulence sont identifiés⁷⁻¹⁷. La perspective d'identifier un agent bactérien responsable du CCR, à l'exemple des autres cancers attribuables à des agents infectieux, est prometteuse pour le développement futur des moyens de prévention, diagnostic et de traitement du CCR¹⁸.

Or, *F. nucleatum* est une bactérie commensale de la bouche et surtout l'un des principaux agents pathogènes de la « maladie parodontale » (MP). Cette maladie inflammatoire chronique, causée par une dysbiose du biofilm dentaire, est caractérisée par la destruction progressive des tissus de soutien des dents (gencive, cément, ligament parodontal et os alvéolaire). À des stades avancés de la maladie, la destruction tissulaire entraîne une grande mobilité dentaire et la perte des dents affectées¹⁹. La MP serait ainsi la deuxième cause d'extractions dentaires après la carie^{20, 21}. En plus d'affecter l'état de santé buccodentaire, la MP est associée à des maladies systémiques majeures (maladies cardiovasculaires, respiratoires, rénales chroniques et métaboliques, obstétriques, polyarthrite rhumatoïde et cancers)²²⁻²⁸, et ce, par la propagation d'agents pathogènes parodontaux

vers des sites extra-buccaux, la dissémination des endotoxines bactériennes et la libération de produits d'inflammation directement dans la circulation sanguine^{29, 30}. Des études épidémiologiques antérieures ont suggéré que la MP serait associée au risque de CCR³¹⁻³⁹. Mais, aucune de ces études n'était initialement conçue pour vérifier l'association entre la MP et le CCR. Il s'agissait essentiellement d'analyses secondaires de données collectées à d'autres fins de recherche. Ainsi, des défaillances méthodologiques constatées dans ces études, en l'occurrence une définition inadéquate de la MP, ou un contrôle insuffisant des facteurs de confusion potentiels, ou encore une taille échantillonnale relativement faible, ne permettaient pas de conclure à une association entre la MP et le CCR. S'ajoute à cela que les mécanismes d'association suggérés étaient, à l'époque, sans processus physiologique retenu.

Or, à la lumière des nouvelles données accumulées durant cette dernière décennie, sur le rôle potentiel de la bactérie parodontopathogène, *F. nucleatum*, dans le développement tumoral colorectal, l'hypothèse d'une association entre la MP et le CCR devient d'autant plus plausible et aurait, non seulement le mérite, mais aussi la priorité, d'être étudiée. La nature de la MP en tant que maladie évitable et qui peut être traitée une fois diagnostiquée, ferait d'elle un facteur de risque modifiable, qu'on pourrait cibler pour la prévention du CCR.

Dans la perspective globale de vérifier l'association entre la MP et le CCR et de rechercher les mécanismes d'association sous-jacents, nous avons entrepris, trois projets de recherche avec des objectifs complémentaires. Tout d'abord, nous avons mené une étude cas-témoins populationnelle, connue sous l'acronyme « COLDENT », qui est la première étude à être spécifiquement conçue pour vérifier l'association entre la santé buccodentaire compromise et le CCR (2013–2019). Grâce aux données de l'étude COLDENT, nous avons pu vérifier l'association entre la MP et le CCR. Devant l'accumulation des données d'études observationnelles sur l'investigation de la bactérie parodontopathogène, *F. nucleatum*, dans les tumeurs colorectales, nous avons entamé notre deuxième projet, qui est une revue systématique avec méta-analyse sur l'association entre la détection de *F. nucleatum* dans le côlon et le CCR. Le protocole de l'étude est d'abord enregistré dans le répertoire international des revues systématiques, *International Prospective Register of Systematic Reviews*, en juillet 2018 et publié en mai 2019. Quant aux résultats de l'étude, ils ont été publiés en décembre 2020. Dans le but de continuer à explorer les mécanismes d'association entre la MP et le CCR, précisément une possible translocation de la bactérie *F. nucleatum*, de la

bouche vers le côlon, nous avons pensé à une étude cas-témoins à base hospitalière, sur l'investigation de *F. nucleatum* dans la salive et la muqueuse colorectale, de patients diagnostiqués avec des néoplasies colorectales et de témoins sans néoplasies. La méthodologie de cette étude, ainsi que sa faisabilité, ont été testées par une étude pilote, qui est alors le troisième projet de recherche de ce projet doctoral. Les données préliminaires de cette étude pilote viennent ainsi enrichir les résultats des deux premiers projets.

Le but ultime de notre projet doctoral est de générer de nouvelles données qui pourraient sensibiliser les cliniciens, chercheurs et décideurs de santé publique à l'importance de maintenir un bon état de santé buccodentaire dans la prévention de maladies générales plus graves, tel que le CCR. De plus, l'investigation du rôle de bactéries parodontopathogènes dans le développement du CCR peut avancer la recherche dans le domaine de dépistage, prévention et traitement du CCR.

Ce projet doctoral fait suite à mon travail de maîtrise, qui portait sur l'étude de faisabilité de l'étude COLDENT^{40,41}. Les résultats préliminaires du projet de maîtrise ont permis à l'équipe de recherche de faire des choix méthodologiques importants pour mener à terme et avec succès l'étude principale. Ils ont aussi permis de suivre l'évolution de l'état des connaissances émergentes sur le lien entre la bactérie *F. nucleatum* et le CCR, de concevoir l'étude pilote hospitalière et, enfin, mieux cerner les objectifs de recherche de ce présent projet de thèse.

Cette thèse est ainsi organisée en huit chapitres. Après ce premier chapitre d'introduction, nous entamerons le deuxième chapitre de la revue de littérature, lequel est suivi par le chapitre sur les objectifs de la thèse. Dans le chapitre 4, nous décrirons les méthodologies des trois projets de recherche, lesquelles sont aussi mentionnées dans les articles présentés dans le chapitre 5 avec les résultats. Le chapitre 6 se composera d'une discussion des résultats des trois projets, en les mettant en contexte avec les données actuelles de la littérature. Ainsi, nous en tirons des recommandations pour les études futures dans le chapitre 7 et concluons avec les implications de ce projet doctoral et perspectives de recherche, développées dans le dernier chapitre.

2. REVUE DE LA LITTÉRATURE

Nous avons organisé ce chapitre en cinq sections principales. La première section sera dédiée à l'épidémiologie du CCR et l'état des connaissances actuelles sur ses facteurs de risque établis. Nous enchaînerons ensuite avec une section consacrée au rôle émergent de la dysbiose intestinale dans la carcinogénèse colorectale. Par la suite, la troisième section portera sur le rôle particulier de l'enrichissement de la flore intestinale en *F. nucleatum*, principal agent pathogène de la MP. Puis la section suivante traitera de la MP. Enfin, l'état des connaissances sur l'association suggérée entre la MP et le CCR et l'explication des mécanismes suggérés seront présentés dans la cinquième section.

2.1 Cancer colorectal

2.1.1 Données épidémiologiques

2.1.1.1 Au niveau mondial

Le CCR représente actuellement le troisième cancer le plus diagnostiqué et la deuxième cause de mortalité par cancer dans le monde. Selon les données de l'Observatoire mondial du cancer (GLOBOCAN), le nombre de nouveaux cas de CCR dans le monde en 2020 dépassent les 1 900 000 et le nombre de décès par CCR dépasse les 900 000 morts. Le CCR se classe comme le troisième cancer le plus diagnostiqué chez les hommes, après le cancer des poumons et de celui de la prostate et le deuxième chez les femmes, après le cancer du sein¹.

Son incidence est connue pour ses grandes variations mondiales avec des records enregistrés dans les pays économiquement plus développés (selon l'indice de développement humain)⁴². En 2020, le plus haut taux d'incidence du CCR standardisé par l'âge est enregistré en Europe (surtout les pays de l'Europe de l'Est), suivi par l'Amérique du Nord, l'Océanie, l'Asie (Japon en première place), l'Amérique latine-Caraïbes, et l'Afrique⁴³. L'Europe enregistre aussi le plus haut taux de mortalité du CCR standardisé par l'âge, suivie par l'Océanie, l'Asie, l'Amérique latine-Caraïbes, l'Amérique du Nord et l'Afrique⁴³. La tendance à travers le temps montre que l'incidence du CCR continue à augmenter dans les pays en voie de développement, alors qu'elle stagne ou diminue légèrement dans les pays économiquement plus avancés². Ces différences de tendance s'expliquent

probablement par des différences de pratique en matière de dépistage préventif du CCR et des changements des distributions des facteurs de risque dans les différentes populations². La même tendance temporelle se constate pour la mortalité mondiale par CCR : certains pays développés voient une diminution de la mortalité durant ces dernières années, alors que les pays en voie de développement enregistrent une croissance tant de l'incidence du CCR que de la mortalité par CCR².

2.1.1.2 Au niveau national

Selon les statistiques canadiennes du cancer de 2021, le CCR représente 10,8 % des nouveaux cas de cancer et est responsable de 11,3 % des décès par cancer. Il se classe ainsi comme le 3^{ème} cancer le plus diagnostiqué et la deuxième cause de mortalité par cancer au Canada⁴⁴. Par sexe, il est à ce jour le 2^{ème} cancer le plus diagnostiqué chez les hommes et le 3^{ème} chez les femmes: presque 14 000 hommes et 11 000 femmes ont reçu un diagnostic de CCR en 2021⁴⁵.

Les taux d'incidence ont été stables de 1996 à 2000, puis ont diminué très légèrement de 2000 à 2011 (-0,5 %) et d'une façon plus marquée depuis 2011 (-2,2 % chez les hommes et -1,9 % chez les femmes)³. Ceci est probablement attribué à l'augmentation du dépistage préventif de CCR à travers le pays, ce qui permet de détecter plus de polypes précancéreux et donc réduire l'incidence du CCR³. Cependant, cette baisse est limitée aux adultes âgés de plus de 50 ans, vu que l'incidence du CCR chez les sujets plus jeunes, surtout ceux entre 20 et 40 ans, est en nette augmentation dans le pays^{46, 47}. Le taux de mortalité par CCR a aussi diminué chez les deux sexes (-2,3 % et -1,7 % par année chez les hommes et les femmes respectivement, de 2004 à 2015)³. Cette baisse serait due en partie à la diminution de l'incidence du CCR, mais en plus grande partie, à l'amélioration des traitements³. On rappelle que le dépistage du CCR est préconisé à partir de l'âge de 50 ans et recommande le test de recherche du sang occulte dans les selles (RSOS) tous les deux ans, ou d'une sigmoïdoscopie à sonde souple (coloscopie courte) tous les 10 ans, pour les adultes de 50 à 74 ans qui ne sont pas à risque élevé ou moyen de CCR⁴⁸. Lorsque le test RSOS est positif, les patients sont orientés vers un examen par coloscopie, qui va permettre de déceler les polypes précancéreux. Par conséquent, le dépistage a contribué à réduire l'incidence du CCR et sa mortalité ainsi qu'à améliorer son taux de survie⁴⁹. Cependant, la survie au CCR reste étroitement liée au stade du cancer au moment du diagnostic. La survie relative à 5 ans peut passer de 92 % pour un CCR diagnostiqué au stade I à 11 % pour un CCR diagnostiqué au stade IV⁴. Malheureusement, environ

50 % des cancers colorectaux au Canada sont encore diagnostiqués à un stade avancé, incluant 20 % au stade IV⁴. Alors, même si le taux de survie au CCR a connu une amélioration au cours des dernières années, il reste tout de même modéré: au Canada, la survie relative au CCR à cinq ans est de 64 % seulement⁴⁵. Aussi, malgré les efforts fournis par les provinces au niveau du dépistage préventif du CCR, aucun programme n'atteint encore la cible de 60 %⁵⁰. Par ailleurs, le vieillissement de la population canadienne contribuera certainement à une augmentation de nouveaux cas de CCR et de décès par CCR, celle-ci est prévue à 60 % d'ici l'année 2030⁵¹.

2.1.2 Classification étiologique des cancers colorectaux et facteurs de risque

Selon l'étiologie du CCR, on distingue trois formes de CCR^{52, 53}: i) une forme héréditaire (la polypose adénomateuse familiale et le syndrome de Lynch) causée par la mutation des gènes impliqués dans la suppression tumorale ou dans la réparation des erreurs de réplication de l'ADN, qui survient à un âge plus jeune que 50 ans et évoque souvent un antécédent familial de CCR survenu à un jeune âge⁵⁴; ii) une forme inflammatoire, qui se développe chez les personnes atteintes de certaines maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, précisément la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse. Le risque est plus élevé quand ces affections sont diagnostiquées à un plus jeune âge, durent plus longtemps et que les lésions sont plus étendues^{52, 55-57}; iii) et une forme sporadique, qui présente plus de 80 % des cas de CCR⁵⁸.

La grande majorité des cancers colorectaux se développent à partir de polypes adénomateux, «*les adénomes*» qui peuvent dégénérer, au bout de quelques années, en carcinomes invasifs, dépendamment de la taille du polype et de sa composante villeuse⁵⁹⁻⁶¹. Cette séquence '*adénome-carcinome*' est le résultat d'une accumulation de mutations génétiques, avec activation d'oncogènes et inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs. Enfin, une faible proportion des cancers colorectaux (~15 %) est liée au phénotype *Microsatellites instables* (MSI), résultant d'une déficience du système de réparation de l'ADN⁶². Ces derniers sont le plus souvent localisés au côlon droit et plus fréquents chez les femmes⁶².

Bien que le CCR implique une composante génétique où l'ADN endommagé et l'instabilité génétique initient une transformation maligne, les facteurs environnementaux semblent jouer un rôle important dans la carcinogénèse colorectale, tout comme l'exposition constante de la muqueuse du côlon au microbiote et /ou à ses métabolites⁶³.

Les facteurs de risque établis du CCR, en l'occurrence les facteurs dont la force d'évidence est plus cohérente entre les études, incluent:

1. L'âge : Le risque de CCR augmente avec l'âge, et plus fortement à partir de 50 ans⁶⁴. Les statistiques mondiales montrent que la majorité des cas de CCR sont diagnostiqués après l'âge de 50 ans². Cependant, une tendance à la hausse chez les personnes plus jeunes, est constatée depuis quelques années⁶⁵.

2. Le sexe : Les hommes sont plus à risque de CCR que les femmes. L'incidence du CCR, ajustée selon l'âge, est 1,4 fois plus grande chez les hommes que chez les femmes². La mortalité par CCR est aussi plus élevée chez les hommes (1,5 fois plus élevée)².

3. L'histoire familiale de CCR : Un antécédent de diagnostic de CCR chez un parent au premier degré (parents, frères et sœurs) serait un facteur de risque établi du CCR⁶⁶. Ce risque est de plus en plus grand si le diagnostic de CCR a touché plus qu'un parent, ou si le parent était jeune au moment du diagnostic⁶⁶.

4. L'ethnicité : L'incidence et la mortalité par CCR varient également par race et ethnicité. Par exemple, aux États Unis, le CCR touche beaucoup plus les afro-américains que les autres groupes ethniques⁶⁷. Cependant, des différences d'accès aux soins, de dépistage du cancer et d'autres facteurs socio-économiques contribuent partiellement à cette différence⁶⁸. Au Canada, l'origine ethnique des individus semble affecter les taux d'incidence et de mortalité par CCR. Selon Statistiques Canada de 2016⁶⁹, l'origine européenne présentait le taux d'incidence de CCR normalisé par âge le plus élevé, suivie de l'origine nord-américaine non autochtone. Cette dernière enregistre désormais le taux de mortalité attribuable au CCR le plus élevé, suivie de l'origine européenne⁶⁹.

5. Un faible niveau socioéconomique : Le désavantage social est associé à une incidence plus élevée de CCR⁷⁰⁻⁷². Mais, la contribution des facteurs de risque comportementaux (inactivité physique, mauvaise alimentation, tabagisme) et de l'obésité aux différences socioéconomiques expliquerait plus de 30 % de cette association⁷¹.

6. Le tabagisme : L'association entre le tabagisme et le CCR a été largement étudiée et plusieurs méta-analyses la confirmant ont été publiées⁷³⁻⁷⁶. Citons les résultats de la plus récente d'entre elles, regroupant les résultats de 188 études épidémiologiques sur l'association entre le CCR et le tabagisme⁷⁵. Le risque relatif combiné du CCR était de 1,14 (intervalle de confiance (IC) à 95 % = 1,10-1,18) pour les fumeurs actuels et de 1,17 (IC à 95 % = 1,15-1,20) pour les anciens

fumeurs, comparés aux personnes n'ayant jamais fumé⁷⁵. On a aussi constaté que le risque de CCR augmentait linéairement avec l'intensité et la durée du tabagisme⁷⁵. Aussi, les anciens fumeurs qui avaient arrêté de fumer depuis plus de 25 ans présentaient un risque significativement réduit de CCR par rapport aux fumeurs actuels⁷⁵. Dans une méta-analyse précédente⁷⁴, l'association entre le tabagisme et le CCR n'était statistiquement significative qu'après 30 ans de tabagisme⁷⁴.

7. La consommation d'alcool : La consommation excessive d'alcool augmente le risque de CCR avec une relation de dose-effet suivant une courbe en forme de J (connue aussi sous le nom de '*J-shaped association*')^{77, 78}. Concrètement, cela signifie que la consommation d'alcool n'a pas d'effet, ou a même un effet protecteur pour de petites doses. Mais, à partir d'un certain seuil de consommation d'alcool, le risque de CCR augmente avec l'augmentation de la consommation d'alcool. Cai et al.⁷⁹, dans leur méta-analyse de 9 études de cohortes prospectives, déclarent qu'une consommation de l'équivalent de 50 mg et plus d'éthanol par jour augmente de 20 % le risque de mortalité par CCR (Risque relatif combiné de 1,21; IC à 95 % = 1,01-1,46), le risque étant plus élevé chez les hommes que chez les femmes. De même, McNabb et al.⁷⁸, dans une plus récente méta-analyse de 16 études cas-témoins et cohortes, mentionnent qu'une consommation de plus de 3 boissons alcoolisées par jour était significativement associée au risque de CCR (Rapport de cotes (RC) combiné = 1,25; IC à 95 % = 1,11-1,40)⁷⁸.

8. Viandes rouges et transformées : Selon la méta-analyse de Chan et al.⁸⁰, en combinant les résultats de 24 études prospectives, le risque relatif combiné de CCR pour l'apport le plus élevé de viandes rouges et transformées par rapport à l'apport le plus faible est de 1,22 (IC à 95 % = 1,11-1,34). Le risque relatif combiné pour chaque augmentation de 100 g/jour était de 1,14 (IC à 95 % = 1,04-1,24). L'étude montre aussi que le risque de CCR augmente de manière approximativement linéaire avec l'augmentation de la consommation de viandes rouges et transformées jusqu'à environ 140 g/jour, où la courbe approche son plateau⁸⁰. Cependant, dans une plus récente méta-analyse de 29 études de cohortes prospectives sur l'association entre la consommation de viandes transformées et le CCR⁸¹, la consommation des viandes transformées est modérément associée au risque de CCR (Risque relatif combiné pour un apport élevé versus faible de 1,13; IC à 95 % = 1,01-1,26). Toutefois, l'évaluation du risque de biais dans les études soulevait un risque de biais élevé dans 24 des 26 études incluses dans la méta-analyse, dû en majorité à un contrôle inapproprié des facteurs de confusion⁸¹. Aussi, en 2018, le Centre international de recherche sur le cancer (Organisation mondiale de la santé (OMS)), a publié un rapport sur la cancérogénicité des viandes rouges et

transformées⁸². Le rapport souligne en effet l'hétérogénéité entre les études, surtout pour ce qui est du choix des instruments de mesure de la consommation des viandes. Les résultats du rapport montrent aussi qu'une forte consommation de viandes rouges était positivement associée au CCR, dans 7/14 études de larges cohortes prospectives. Cependant, l'association était plus rarement significative dans les études cas-témoins, qui ont plutôt révélé un risque de CCR lié au mode de cuisson. Quant aux viandes transformées, une association positive entre leur consommation et l'incidence du CCR était rapportée dans 12/18 études de larges cohortes et dans 6/9 études cas-témoins retenues pour évaluation par le groupe de travail⁸².

9. L'obésité : L'association entre l'obésité et le risque de CCR est rapportée par plusieurs méta-analyses de cohortes prospectives⁸³⁻⁸⁵. Selon deux méta-analyses, par Dong et al.⁸⁴ et Ma et al.⁸⁵, l'obésité abdominale, mesurée par tour de taille, est associée à une augmentation du risque de CCR d'autour de 45 %^{84, 85}. Ma et al.⁸⁵ ont aussi mesuré le risque relatif combiné de CCR lié à un indice de masse corporelle (IMC) de catégorie obèse, comparé à un IMC de catégorie normal. Le risque de CCR est plus élevé de 33 % (Risque relatif combiné = 1,33; IC à 95 % = 1,25-1,42). D'après une autre méta-analyse par Dai et al.⁸³, le risque de CCR lié à l'obésité serait plus important chez les hommes que chez les femmes et différent entre le cancer du côlon et celui du rectum.

10. La sédentarité : Un niveau d'activité physique élevé protégerait contre le CCR comparé à un état sédentaire. Ce constat est rapporté par Xie et al.⁸⁶, qui ont combiné les mesures de risque de CCR associé à l'activité physique de 23 études observationnelles. Leurs résultats montrent qu'un niveau d'activité physique élevé protège contre le risque de CCR comparé à un niveau bas : risque relatif combiné = 0,77; IC à 95 % = 0,69-0,85)⁸⁶. Dans une autre méta-analyse d'études de cohortes prospectives⁸⁷, l'activité physique était inversement associée au risque du cancer du côlon, mais pas celui du rectum (Risque relatif combiné = 0,98; IC à 95 % = 0,88–1,08)⁸⁷.

11. Le diabète: Le diabète est considéré comme un facteur de risque indépendant du CCR⁸⁸⁻⁹⁰ et même d'adénomes colorectaux⁹¹. Selon une méta-analyse de 24 études cas-témoins et cohortes sur le diabète et le CCR, les diabétiques sont 26 % plus à risque de développer un CCR que les non diabétiques (Risque relatif combiné = 1,26; IC à 95 % = 1,20-1,31)⁹⁰. Des résultats similaires sont rapportés par une autre méta-analyse incluant 39 études observationnelles⁹². Le risque ne semble pas être différent entre les hommes et les femmes, ou la localisation du cancer, ni selon l'ancienneté du diabète⁹². De même que pour Yuhara et al.⁸⁹ qui, dans leur méta-analyse d'études observationnelles sur l'association entre le diabète et le CCR, ont évalué l'effet de certains facteurs

de confusion sur cette association. Leur mesure d'association combinée n'a pas diminué par la restriction de l'analyse aux études qui ont contrôlé pour le tabagisme, l'IMC et l'activité physique. Le même constat a été rapporté dans la méta-analyse de Deng et al.⁹⁰, suggérant encore une fois que le diabète est un facteur de risque indépendant du CCR.

12. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens : Tomić et al.⁹³ ont récemment analysé l'association du CCR avec un usage régulier d'anti-inflammatoires non stéroïdiens, autres que l'aspirine, chez la population de 40 ans et plus⁹³. Leur méta-analyse inclut 23 études cas-témoins et de cohortes et montre une diminution de risque de CCR de 26 % chez les usagers réguliers d'anti-inflammatoires non stéroïdiens, comparés à des non-usagers (RC combiné = 0,74; IC à 95 % = 0,67-0,81). Cependant, ils remarquent une hétérogénéité élevée entre les études ($I_2 = 75,9\%$, $p < 0,001$), principalement due à des définitions différentes de l'usage régulier d'anti-inflammatoires non stéroïdiens⁹³. Dans leurs analyses de sensibilité, l'effet protecteur de l'usage régulier des anti-inflammatoires non stéroïdiens persistait seulement chez les femmes, les non afro-américains, avec des doses élevées d'anti-inflammatoires non stéroïdiens, l'usage prolongé (de 5 ans et plus) et le cancer du côlon distal⁹³. Quant à l'aspirine, une méta-analyse récente a quantifié la réduction du risque associée à son usage régulier en combinant les résultats de 45 études cas-témoins et de cohortes⁹⁴. Le risque relatif combiné était de 0,73 (IC à 95 % = 0,69-0,78) avec une hétérogénéité très élevée entre les études ($I_2 = 86\%$). L'effet protecteur de l'aspirine ne différait pas entre les hommes et les femmes⁹⁴. L'analyse de dose-réponse a montré une réduction de risque de CCR de 10 % pour une faible dose d'aspirine (75 à 100 mg/jour), de 35 % pour une dose moyenne (325 mg/jour) et de 50 % pour une dose élevée (500 mg/jour)⁹⁴.

En dehors de ces facteurs de risque énumérés ci-dessus, plusieurs expositions nutritionnelles ont été associées au risque de CCR. Seules les expositions dont les preuves sont classées comme « convaincantes » (*Strong evidence*), par le rapport du Fonds mondial de la recherche sur le cancer et l'Institut américain pour la recherche contre le cancer⁹⁵, ont été énumérées auparavant. Selon le même rapport, les preuves sont « probables » pour le rôle protecteur de la consommation de grains entiers, d'aliments à teneur en fibres, de produits laitiers, de suppléments en calcium⁹⁶. Les preuves sont « suggestives » pour : 1) le rôle protecteur de la consommation des aliments à teneur en vitamine C, de la vitamine D, des suppléments multi vitaminiques, du poisson, des légumes pauvres

en amidon et des fruits, et 2) le rôle d'aliments à teneur en fer dans l'augmentation du risque du CCR⁹⁷⁻¹⁰¹.

Enfin, en plus de ces facteurs de risque énumérés, la muqueuse intestinale reste aussi exposée en permanence à la flore intestinale, dont le déséquilibre, communément appelé **dysbiose intestinale**, est actuellement incriminé dans le processus de transformation maligne colorectale⁶³.

2.2 Dysbiose intestinale et cancer colorectal

2.2.1 Généralités sur le microbiote intestinal

Le microbiote intestinal représente l'ensemble des micro-organismes qui évoluent le long du système digestif. Il ne compte pas moins de 10^{14} micro-organismes, répartis selon un gradient de concentration qui atteint sa densité maximale au niveau du côlon. La densité augmente aussi considérablement du côlon ascendant vers le côlon descendant. Parmi les embranchements bactériens (phyla) identifiés dans le microbiome intestinal humain, les Firmicutes (60-75 %) et les Bacteroidetes (30-40 %) dominent, alors que les Actinobacteria (3 %), Proteobacteria, Fusobacteria and Verrucomicrobia sont présentes en très faible proportion¹⁰². Cette représentation bactérienne présente un état d'équilibre avec l'hôte (symbiose) essentiel au microbiote intestinal pour remplir ses fonctions essentielles : homéostasique, immunitaire et métaboliques¹⁰³.

La rupture de cet état d'équilibre, appelée « dysbiose intestinale », se rapporte à une altération de la composition du microbiote intestinal qui est associée à des changements fonctionnels dans le transcriptome, le protéome ou le métabolome microbiens¹⁰⁴. La dysbiose correspond ainsi à tout changement dans la composition des communautés commensales par rapport à celles trouvées chez les individus en bonne santé¹⁰⁵. La dysbiose, est actuellement incriminée dans plusieurs troubles intestinaux et extra-intestinaux, à savoir des maladies inflammatoires de l'intestin, des infections, des allergies alimentaires, l'asthme, le diabète, l'obésité, la sclérose en plaques, l'autisme, l'anxiété, la dépression et le CCR^{104, 106, 107}.

Il est à noter que malgré des progrès significatifs, les micro-organismes qui constituent ce que l'on pourrait considérer comme un « microbiote normal ou sain » n'ont pas été clairement définis¹⁰⁶. Cependant, des modèles apparaissent lorsque des communautés microbiennes sont comparées à des niveaux taxonomiques supérieurs par le profilage moléculaire entre des groupes d'individus

sains et des cohortes de patients atteints de pathologies différentes, comme la maladie intestinale inflammatoire, le diabète sucré, l'obésité, les maladies cardiovasculaires et le cancer¹⁰⁸.

2.2.2 Constats en faveur du rôle de la dysbiose intestinale dans le développement du cancer colorectal

En 2011, Sears et Pardoll¹⁰⁹ proposent que les bactéries seraient les principaux moteurs de la réponse immunitaire de la muqueuse intestinale et des variations ultérieures de la fonction et de la génétique des cellules épithéliales, qui supportent la transformation oncogénique¹⁰⁹. Sachant que les recherches cliniques sont souvent limitées, les études animales ont été très bénéfiques dans ce domaine. En effet, les chercheurs ont pu manipuler le microbiote intestinal chez des modèles murins, ce qui a permis aussi bien de confirmer le rôle du microbiote et de son altération dans le développement tumoral, ainsi que de révéler les mécanismes sous-jacents à cette association. La dysbiose intestinale est incriminée dans la transformation maligne colorectale par l'induction d'altérations génétiques, la synthèse de métabolites ou de toxines qui perturbent le contrôle des cycles de multiplication cellulaire et stimulent la libération des médiateurs d'inflammation¹⁰³. Le transfert de microbiote fécal humain, provenant de patients atteints de CCR, à des souris sans germes, a induit un nombre plus élevé de gènes hyperméthylés, des niveaux plus élevés de certains médiateurs d'inflammation (interleukines IL6 et IL1 β) et des niveaux plus bas d'interféron gamma (cytokine impliquée dans les mécanismes antiprolifératifs, pro-apoptotiques et antitumoraux), comparés aux souris transplantées à partir de sujets sains¹¹⁰. Aussi, on avait constaté que des souris exemptes de tous germes présentaient moins de risque de développer un adénome dans l'intestin, comparées à des souris contrôles^{104, 111}. Dans un modèle murin du CCR, des souris mutantes qui sont génétiquement susceptibles au CCR développaient significativement moins de tumeurs quand elles étaient maintenues dans des conditions sans germes qu'en présence d'un microbiote conventionnel¹¹².

Toujours sur un modèle murin, Zackular et al.¹¹³ constatent dans leur étude que la manipulation du microbiome à l'aide d'antibiotiques a réduit la formation de tumeurs, ce qui a souligné l'importance de bactéries spécifiques dans la tumorigenèse. D'autres résultats intéressants de cette même étude montrent que ce sont les modifications de la structure de la communauté bactérienne, plutôt que le nombre total de bactéries, qui affectent la tumorigenèse¹¹³. Aussi, ces résultats suggèrent fortement que l'inflammation et la tumorigenèse favorisent de leur côté la dysbiose du microbiome intestinal,

comme l'attestent les changements majeurs dans les populations bactériennes d'un large éventail de groupes taxonomiques¹¹³.

Plusieurs études sur des êtres humaines vont ensuite comparer la composition du microbiote intestinal entre des sujets sains et des patients atteints de CCR et d'importantes différences dans les structures microbiennes sont alors constatées¹¹⁴⁻¹¹⁶. Des différences de composition des microbiotes sont également mises en évidence selon le stade évolutif de la néoplasie colorectale (entre absence de tumeur et adénome; et entre adénome et carcinome). Ce qui permet de suggérer que la dysbiose intestinale n'est pas la simple conséquence du processus tumoral colorectal, mais pourrait être un acteur actif dans le processus de la carcinogénèse¹⁰³.

2.2.3 Mécanismes d'association entre la dysbiose intestinale et le cancer colorectal

2.2.3.1 Modèle bactérien du rôle de la dysbiose intestinale dans la carcinogénèse colorectale

Selon certains scientifiques, les bactéries du microbiote intestinal pourraient être impliquées dans la carcinogénèse colorectale selon un modèle « *driver-passenger* »^{114, 117}. D'abord, des bactéries pathogènes dites « *drivers* », à potentiel pro-inflammatoire et pro-oncogène, colonisent l'intestin et initient la transformation tumorale. La progression tumorale entraînerait ensuite une modification dans le micro-environnement tumoral, permettant une colonisation par des bactéries opportunistes dites « *passengers* », qui favorisent le développement de la tumeur¹¹⁷.

Ainsi, les *drivers* bactériens, à l'exemple de certaines espèces d'*Enterobacteriaceae* et de *Bactéroïdes*, entraîneraient une inflammation persistante dans le côlon, par augmentation de la prolifération cellulaire et/ou production de composés qui endommagent l'ADN épithélial. Ce qui à son tour, va augmenter le taux de mutation des cellules infectées et initier le CCR. Par la suite, la carcinogénèse va entraîner une altération du milieu intestinal qui favorise la prolifération des bactéries opportunistes, *passengers*^{117, 118}. Ces *passengers* bactériens, à l'exemple d'espèces de *Fusobacterium*, vont peu coloniser un tractus intestinal sain. Mais, un microenvironnement tumoral est un avantage concurrentiel pour ces bactéries, leur permettant de concurrencer les *drivers* bactériens de CCR¹¹⁷. Les *drivers* et les *passengers* bactériens auraient ainsi des rôles temporels distincts dans la pathogénèse du CCR^{117, 118}. Ce modèle signifie que la composition taxonomique du microbiote intestinal continue à changer tout au long du processus tumoral, afin de permettre à

des bactéries spécifiques de jouer leur rôle ponctuel dans la transformation tumorale selon leurs propriétés et facteurs de virulence.

2.2.3.2 Sens de la relation entre la dysbiose intestinale et le cancer colorectal

La relation entre la dysbiose intestinale et le CCR semble être bidirectionnelle, autrement dit : le CCR est autant une conséquence des variations dans le microbiote intestinal, que l'altération du microbiote intestinal est le résultat de la progression tumorale.

D'une part, le milieu tumoral est un milieu favorable à la dysbiose vu que les cellules tumorales présentent des profils différentiels par rapport aux cellules non transformées, ce qui peut induire une adhérence sélective de certaines bactéries¹⁰⁸. De plus, la nature hypoxique de cet environnement et la disponibilité des nutriments dans les tumeurs solides va favoriser la multiplication des organismes qui nécessitent une faible tension d'oxygène¹⁰⁸.

D'autre part, certaines altérations du microbiome intestinal peuvent générer des modifications génétiques et influencer l'apoptose et l'inflammation, contribuant au développement du CCR¹⁰³. La dysbiose mènerait dans ce cas à l'enrichissement du microbiote en bactéries pro-oncogènes et l'appauvrissement en espèces bactériennes protectrices. Par exemple, certaines espèces bactériennes productrices de butyrate, telle que *Faecalibacterium prausnitzii*, vont avoir des effets antitumoraux en facilitant l'apoptose des cellules cancéreuses du côlon¹⁰³. Alors que d'autres bactéries, comme *Bacteroides fragilis*, *Escherichia coli* et *F. nucleatum*, sont directement pro-oncogènes car sont capables de remodeler la réponse immunitaire de la muqueuse intestinale et d'altérer la composition de la population bactérienne du côlon afin de promouvoir d'avantage le CCR^{103, 114}. De plus, ces bactéries vont promouvoir le processus tumorigène par la synthèse de métabolites ou de toxines qui perturbent le contrôle des cycles de multiplication cellulaire, ou encore stimuler la libération des médiateurs de l'inflammation¹⁰⁸.

2.3 *Fusobacterium nucleatum*, dysbiose intestinale et cancer colorectal

2.3.1 Généralités sur le *Fusobacterium nucleatum*

Le genre (*genus*) *Fusobacterium* recouvre un grand nombre d'espèces bactériennes Gram-positives, non sporulées, non mobiles, anaérobies, en forme de bâtonnets qui appartiennent à la famille des Fusobacteriaceae, de la classe des Fusobacteriia et l'embranchement (*phylum*) Fusobacteria. Actuellement, au moins 25 espèces et sous-espèces sont reconnues dans le genre

*Fusobacterium*¹¹⁹. *F. nucleatum* est une espèce très hétérogène et a été classée en cinq sous-espèces (subsp.) : *animalis*, *nucleatum*, *polymorphum*, *vincentii* et *fusiforme*¹³. Des études récentes basées sur l'analyse phylogénétique des séquences d'acide nucléique de l'ARNr 16S, de *rpoB*, de la protéase de zinc et de 22 gènes domestiques (en anglais : *housekeeping genes*) ont suggéré que *F. nucleatum* subsp. *Fusiforme* et *vincentii* peuvent être classées en une seule sous-espèce, *F. nucleatum* subsp. *fusiforme / vincentii*¹²⁰. Quelques sous-espèces sont associées à des pathologies différentes. *F. nucleatum*, subsp. *nucleatum*, est principalement isolée dans les sites pathologiques parodontaux, tandis que *F. nucleatum* subsp. *fusiforme / vincentii* est souvent isolée dans des sites sains en tant que flore normale. *F. nucleatum* subsp. *animalis* et *polymorphum* sont associées à des complications de la grossesse et *F. nucleatum* subsp. *animalis* est également associée à la maladie inflammatoire de l'intestin¹²⁰.

F. nucleatum est l'une des espèces dominantes des 500 organismes ou plus qui coexistent dans la cavité buccale¹²¹. Elle s'agrège souvent avec la plupart des bactéries buccales et joue un rôle essentiel dans la formation de la plaque dentaire, comme pont entre les bactéries colonisatrices précoces (bactéries Gram-positives) et les bactéries colonisatrices tardives (bactéries Gram-négatives)^{121, 122}. En emprisonnant l'oxygène et les radicaux libres oxydatifs de la plaque dentaire, *F. nucleatum* aide à maintenir et à soutenir les conditions des pathogènes parodontaux anaérobies majeurs. Parmi les espèces microbiennes qui sont statistiquement associées à la maladie parodontale, *F. nucleatum* est la bactérie la plus incriminée dans des infections touchant d'autres sites du corps¹²³. Elle a été isolée non seulement à partir d'échantillons de la cavité buccale, mais aussi des ulcères cutanés, des abcès péri-amygdaliens, de l'arthrite septique et l'endocardite¹²⁴. Récemment, *F. nucleatum* a aussi été identifiée dans les tumeurs colorectales²⁹.

2.3.2 Dysbiose intestinale par enrichissement du milieu en *Fusobacterium nucleatum* et cancer colorectal

Parmi les différentes formes de dysbiose enregistrées en présence de CCR, l'enrichissement anormal en *Fusobacterium* était le plus souvent rapporté¹²⁵. Durant les dix dernières années, plusieurs études successives confirment la sur-représentation du genre *Fusobacterium*, ou plus spécifiquement de l'espèce bactérienne *F. nucleatum*, dans des tumeurs colorectales par rapport à la muqueuse intestinale saine, ou dans les selles de patients atteints de CCR comparés à celles des sujets sains^{14, 15, 17, 91, 114, 126-136}. Une abondance de séquences d'ADN de la bactérie *F. nucleatum*

dans l'ADN de tumeurs colorectales et aussi dans l'ADN des métastases de tumeurs du côlon est rapportée¹³⁶. Cette haute concentration en *F. nucleatum* est également confirmée par l'analyse histologique du tissu tumoral colorectal^{10, 15}. De plus, les biopsies provenant de patients atteints de maladies inflammatoires de l'intestin présentent une prévalence plus élevée de *F. nucleatum* et des souches plus invasives que celles chez les sujets sains¹³⁷.

La bactérie est aussi identifiée dans les lésions précancéreuses (différents types histologiques d'adénomes)^{17, 127}, avec une abondance relative plus élevée dans les adénomes que dans les tissus sains¹³⁵ et moins élevée dans les adénomes que dans les carcinomes, reflétant une augmentation graduelle et parallèle à l'évolution du processus tumoral de la séquence adénome-carcinome¹²⁶. Le niveau de *F. nucleatum* semble aussi augmenter avec un stade plus évolué de dysplasie¹³⁴. Dans une étude de Flanagan et al.¹³⁴, les chercheurs ont analysé des adénomes colorectaux chez 52 patients irlandais. L'abondance de *F. nucleatum* n'est pas significativement excessive par rapport aux tissus normaux. Pourtant, pour les stades avancés de dysplasie elle est significativement plus élevée. Les chercheurs rapportent aussi des quantités plus élevées du *F. nucleatum* dans les échantillons de selles de patients avec CCR, comparativement aux patients avec tissus colorectaux normaux ou avec adénomes colorectaux¹³⁴. *F. nucleatum* est également associée à la résistance à la chimiothérapie et à un faible taux de survie chez les patients qui ont été traités pour CCR¹³⁸.

2.3.3 Mécanismes d'action de *Fusobacterium nucleatum* dans le développement tumoral colorectal

La bactérie *F. nucleatum* est considérée une bactérie pro-oncogène qui participe activement au processus tumoral colorectal. Elle présente deux facteurs de virulence qui facilitent le développement du CCR : une adhésine FadA et une protéine auto-transporteuse Fap2¹³⁹. FadA permet à *F. nucleatum* d'envahir les cellules épithéliales humaines, d'activer la signalisation β -caténine et d'induire l'expression du gène oncogène, stimulant ainsi la croissance de cellules tumorales colorectales^{10, 16, 17, 126, 139-141}. Tandis que la protéine Fap2 inhibe l'activité des cellules immunitaires et potentialise ainsi la progression du CCR^{141, 142}. En effet, dans un modèle murin de CCR, l'introduction du *F. nucleatum* augmentait la multiplicité tumorale et le recrutement sélectif des cellules myéloïdes infiltrant les tumeurs, favorisant ainsi la progression tumorale¹⁰. *F. nucleatum* stimule également le recrutement des cellules immunitaires d'infiltration tumorale, ce qui génère un microenvironnement inflammatoire propice à la progression de la néoplasie colorectale¹⁰. D'ailleurs, les tumeurs de souris (APC +/-) exposées à *F. nucleatum* présentent une

expression pro-inflammatoire, similaire à celle observée dans les tumeurs colorectales humaines positives au *F. nucleatum*¹⁰.

Certains chercheurs, à l'exemple de Flynn et al.¹⁴³, pensent que les bactéries orales auraient un rôle dans le développement du CCR, mais plus sous forme de communauté bactérienne ou de biofilm, que sous forme de bactéries individuelles. Cette pensée s'appuie surtout sur les résultats de Warren et al.¹⁴, qui ont analysé la composition bactérienne de 130 tumeurs colorectales et de leurs tissus sains avoisinants. Les résultats de leur étude confirment la sur-représentation de *Fusobacterium* dans les tumeurs, mais en présence simultanée de deux autres bactéries orales commensales : *Leptotrichia* and *Campylobacter*¹⁴. Ainsi, *F. nucleatum* est considérée au début comme une bactérie *passenger* par Tjalsma et al en 2012¹¹⁷, mais les découvertes ultérieures sur ses moyens de virulence la classent désormais comme *driver* bactérien, selon Flynn et al.¹⁴³.

2.3.4 Origine orale de l'enrichissement du microbiote intestinal en *Fusobacterium nucleatum*

L'enrichissement anormal du microbiote intestinal en *F. nucleatum*, en présence de lésions cancéreuses et précancéreuses colorectales, serait-il originaire de la cavité buccale? Ou autrement dit, la prolifération de *F. nucleatum* dans le côlon, est-elle précédée, ou du moins concomitante, à un enrichissement de la bactérie dans la cavité buccale? Dans l'état actuel des connaissances, il est encore difficile de répondre à cette question, vu que très peu d'études cliniques ont analysé *F. nucleatum*, dans des prélèvements appariés, buccaux et colorectaux, de patients présentant toute forme de néoplasie colorectale.

L'un des mécanismes qui expliquent la détection de la bactérie orale *F. nucleatum* dans des infections d'autres sites corporels est le fait qu'elle soit dotée de l'adhésine FadA, qui lui confère des propriétés d'adhésion et d'invasion de cellules épithéliales et endothéliales humaines¹⁴⁴. En effet, cette adhésine est uniquement présente sur trois espèces orales du genre *Fusobacterium*, qui expriment le plus d'homologie génétique : *F. nucleatum*, *Fusobacterium periodonticum* et *Fusobacterium simiae* humaines^{123, 144}. À cette date, on recense huit études qui offrent des données sur la détection et /ou la quantification de *Fusobacterium* dans des prélèvements buccaux provenant de patients avec un CCR¹⁴⁵⁻¹⁵². Parmi ces études, quatre ont aussi recherché la bactérie dans des échantillons appariés colorectaux^{145, 147, 149, 152}, mais seulement deux études avaient un groupe contrôle^{145, 152}. Le tableau 1 présente le sommaire de ces études. En général, leurs résultats restent, pour la majorité, préliminaires à cause de plusieurs aspects: i) petit nombre de participants; ii) absence de groupe contrôle; iii) absence de résultats spécifique de l'espèce *F. nucleatum*, la

recherche étant effectuée à des niveaux taxonomiques supérieurs comme le phylum ou le genre; iv) doute concernant la validité des résultats car la collecte d'échantillons salivaires ou colorectaux était concomitante à l'administration d'antibiotiques, ou l'absence d'informations sur l'exclusion ou non de personnes ayant pris un antibiotique lors des derniers mois, et sur le temps exact de prélèvement d'échantillons salivaires pour certaines études. Nous citons à titre d'exemple, l'étude de Flemer et al.¹⁵², qui évoquent une plus faible abondance de *Fusobacterium* dans les écouvillons oraux prélevés chez des cas de CCR, que chez les témoins. Néanmoins, les auteurs confirment que les cas s'étaient fait administrer un antibiotique durant la chirurgie et qu'aucune information n'est fournie sur le moment exact de la collecte des échantillons salivaires¹⁵². Autrement dit, on ignore si les prélèvements salivaires chez les cas étaient affectés par l'antibiotique qui leur a été administré.

La seule étude qu'on peut qualifier de relativement bien conçue est celle de Guven et al.¹⁴⁶. Le but de cette étude est d'examiner la prévalence et le niveau de certaines bactéries orales, spécifiquement *F. nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* et *Streptococcus gallolyticus* dans la salive de 71 patients avec CCR et de 77 patients sans CCR. Pour être inclus dans l'étude, les patients atteints de CCR ne devaient pas avoir commencé de traitement de chimiothérapie ou de radiothérapie, ni avoir pris un antibiotique durant les 3 derniers mois, ni présenter une maladie inflammatoire des intestins ou de syndrome héréditaire colorectal. Des échantillons de salive non stimulée sont collectés auprès des participants, puis analysés par réaction de polymérisation en chaîne quantitative (qPCR) avec sonde TaqMan. Leurs résultats montrent que *F. nucleatum* est détecté chez 97 % de patients de CCR et 96% de témoins ($p > 0,99$) et avec des quantités plus élevées de *F. nucleatum* chez les cas que chez les témoins ($p = 0,001$). Malheureusement cette étude ne procure des données que sur l'expression de *F. nucleatum* dans des échantillons buccaux.

Tableau 1. – Études ayant exploré l'expression de *Fusobacterium nucleatum* au niveau buccal chez des patients avec tumeurs colorectales

Auteur (Année) Référence	Pays	N° de cas de CCR/T	Exclusion si usage antérieur d'ATB (quand)	Échantillon biologique				Résultats de détection et de quantification du <i>F. nucleatum</i>
				Type	Temps de collecte	Conditions de collecte et de conservation	Analyse bactériologique	
Russo et al. (2017) ¹⁴⁵	Italie	10/10	Oui (≤ 3mois)	Salive non stimulée Selles	1 jour avant chirurgie	Tube stérile, -80 °C	Séquençage de nouvelle génération & qPCR	<u>Quantification du <i>F. nucleatum</i>:</u> <ul style="list-style-type: none"> • Salive : pas de différence significative entre cas de CCR et T • Selles : pas de différence significative entre cas de CCR et T • Salive Vs Selle : abondance de <i>F. nucleatum</i> dans la salive > son abondance dans les selles, chez cas de CRC (p < 0,01) et chez T (p < 0,002)
Güven et al. (2019) ¹⁴⁶	Turquie	71/77	Oui (≤ 3mois)	Salive	Avant traitement de cancer	Tube de centrifugation, -20 °C	qPCR	<u>Détection de <i>F. nucleatum</i> :</u> Cas de CCR : 97,2 % Vs T: 96,1 %; p > 0,99 <u>Quantification de <i>F. nucleatum</i> :</u> (en Log10 copies/ml) Cas de CCR : 6,89 ± 1,07 Vs T: 6,35 ± 0,78; p = 0,001
Komiya et al. (2019) ¹⁴⁷	Japon	14/0	Oui (≤ 1 mois)	Salive Muqueuse tumorale colorectale	Avant ou après coloscopie Lors de coloscopie	Tubes stériles conditions d'anaérobiose	PCR (Conventionnelle)	<u>Détection de <i>F. nucleatum</i> :</u> <ul style="list-style-type: none"> • Salive : 100 % • Muqueuse tumorale : 57 % • Salive and muqueuse tumorale: 43% (Souches de <i>F. nucleatum</i> identiques entre salive et muqueuse chez 75 % de patients dont salive et tumeur sont positives à <i>F. nucleatum</i>)
Kato et al. (2016) ¹⁴⁸	USA	68 /122	---	Rinçage oral	---	Rince-bouche de commerce (à 15% d'alcool), -80 °C	Séquençage de gène 16SrRNA	<u>Phylum dominant :</u> Fusobacteria non dominant, seulement 3,7 % de toutes les séquences. Pas d'association entre <i>F. nucleatum</i> et CCR
Abed et al. (2020) ¹⁴⁹	Israël	7/0	Non: ATB pris juste	Salive	1 jour avant chirurgie, ou juste			<u>Détection de <i>F. nucleatum</i> :</u> <ul style="list-style-type: none"> • Salive : 100 %

Auteur (Année) Référence	Pays	N° de cas de CCR/T	Exclusion si usage antérieur d'ATB (quand)	Échantillon biologique			Résultats de détection et de quantification du <i>F. nucleatum</i>	
				Type	Temps de collecte	Conditions de collecte et de conservation	Analyse bactériologique	
			avant chirurgie	Muqueuse tumorale colorectale	après coloscopie 45 min après résection	Tubes stériles, conditions d'anaérobie	PCR (convention nelle)	• Muqueuse tumorale : 100 %
		3/0	Oui (avant chirurgie)	Salive Muqueuse tumorale colorectale	Même procédure		Séquençage de génome entier	Grande similitude entre souches de <i>F. nucleatum</i> dans la salive et tumeur provenant du même sujet
Kageyama et al. (2019) ¹⁵⁰	Japon	24/118	Oui (≤ 1 mois)	Salive stimulée	Avant traitement de cancer	Tube stérile, -80 °C	Séquençage de gène 16SrRNA	<u>OTUs abondantes :</u> OTUs correspondant à <i>F. nucleatum</i> ne sont pas les OTUs bactériennes les plus abondantes chez les cas de CCR
Yang et al. (2019) ¹⁵¹	USA	231/462	Oui (≤ 1 semaine)	Rinçage oral	---	Rince-bouche de commerce, -80 °C	Séquençage de gène 16SrRNA	<u>Détection de <i>F. nucleatum</i> :</u> Cas de CCR : 99,6 % Vs T: 99,6 % (p = 1)
Flemer et al. (2017) ¹⁵²	Irlande	99/103 (+ 32 patients avec polypes)	Oui (≤ 1mois) (ATB au cours de chirurgie)	Écouvillon buccal (45 CCR & 25 C) Selles (69 CCR & 62C) Muqueuse colorectale & tumorale	Avant coloscopie Lors de chirurgie ou de coloscopie	-80 °C -80 °C RNAlater à 4 °C pour 12 h, puis à -20 °C	Séquençage de gène 16SrRNA	<u>Abondance de <i>F. nucleatum</i> :</u> Fusobacterium moins abondant dans les écouvillons oraux des cas de CCR que les T

N : Nombre; CCR : Cancer colorectal; T : Témoins; *F. nucleatum* : *Fusobacterium nucleatum*; ATB : Antibiotique; PCR : Réaction de polymérisation en chaîne ; qPCR : PCR quantitative; OTU : Unité Taxonomique Opérationnelle (OTU pour l'appellation plus courante en anglais, Operational Taxonomic Unit), Vs : Versus.

F. nucleatum est une bactérie commensale de la bouche, un pathogène important de la MP qui devient abondante dans la salive de patients atteints de gingivite et de parodontite chronique^{153, 154}. Ceci nous porte à penser que son enrichissement dans les lésions cancéreuses et précancéreuses colorectales pourrait être lié à son enrichissement initial dans le milieu buccal. Ce dernier est probablement dû à la présence de sites de MP, tel que suggéré par d'autres chercheurs^{147, 149, 155}.

La section suivante sera entamée par une description de la MP, pour ensuite présenter l'état des connaissances actuelle sur l'association entre la MP et le CCR, avant de clarifier les mécanismes qui peuvent expliquer cette éventuelle association qui impliquerait le rôle de *F. nucleatum*.

2.4 Maladie parodontale

Les MPs regroupent un ensemble d'affections touchant les tissus de support dentaire : la gencive, le cément, le ligament parodontal et l'os alvéolaire. Selon la plus récente classification de l'Académie américaine de parodontologie (*American Academy of Periodontology* ou AAP) de 2017, les MPs regroupent les gingivites (induites par la plaque dentaire bactérienne), les affections gingivales à la suite de maladies systémiques, les parodontites, les maladies parodontales nécrosantes et les parodontites qui sont des manifestations de maladies systémiques¹⁵⁶. Les gingivites et parodontites sont de loin les MPs les plus fréquentes^{157, 158}.

2.4.1 Données épidémiologiques

Avant de présenter certaines statistiques sur la prévalence de la MP, il faudrait savoir que celle-ci varie selon la définition de cas de MP, la population concernée et le type de protocole d'examen parodontal¹⁵⁹.

Globalement, la MP toucherait plus de 50 % de la population adulte mondiale¹⁶⁰ et se classerait parmi les dix maladies les plus prévalentes dans le monde^{161, 162}. D'après les données sur la charge mondiale de morbidité de l'OMS, il y avait 1,1 milliard de cas de parodontite sévère dans le monde en 2019, dont le taux de prévalence normalisé selon l'âge était aux alentours de 13 000 pour 100 000 personnes. De 1990 à 2019, le taux de prévalence mondial normalisé selon l'âge a augmenté de 8,4 % (6,6 % à 10,6 %)¹⁶³. Par rapport à d'autres maladies courantes, elle est presque comparable à la prévalence des infections sexuellement transmissibles (16 %) et est plus fréquente que les maladies cardiovasculaires (prévalence de 6,6 %)^{164, 165}. Ces statistiques mondiales sont basées sur l'utilisation de l'Indice communautaire parodontal (*Community Periodontal Index*), un indice universel utilisé pour faciliter la surveillance mondiale et dont les scores sont : 0 = absence

de MP; 1 = saignements gingivaux; 2 = calculs et saignements; 3 = poches parodontales peu profondes (4 à 5 millimètres); et 4 = poches parodontales profondes (6 millimètres ou plus)¹⁶⁶.

Aux États-Unis, selon les dernières statistiques de la *National Health and Nutrition Examination Surveys* (2009–2014), la parodontite affectait 42 % des adultes américains dentés âgés de 30 à 79 ans, dont 8 % avaient une forme sévère de la maladie¹⁶⁷. Ces statistiques sont basées sur des indices cliniques plus spécifiques que le l'indice communautaire parodontal, qui sont la profondeur de poche parodontale et la perte d'attache clinique. Les mesures étaient prélevées par un protocole de sondage parodontal complet (sondage de toutes les dents présentes en bouche, sur les 6 sites par dent). Les deux mesures ont contribué à la définition de cas de MP, selon les directives des Centres pour le contrôle et la prévention des maladies (*Centers for Disease Control and Prevention* ou CDC) et de l'AAP¹⁶⁷.

Quant au Canada, les dernières statistiques nationales sur la prévalence de la MP proviennent de l'Enquête canadienne sur les mesures de la santé (2007–2009), où la perte d'attache clinique et la profondeur de poche parodontale étaient mesurées par sondage parodontal partiel de la bouche (2 quadrants randomisés et 3 sites par dent)¹⁶⁸. La MP sous ses formes modérée et sévère, semblait toucher au moins 21 % des Canadiens ayant encore des dents naturelles. Le rapport de cette enquête montre que la gingivite touchait 32 % des adultes canadiens (20 à 79 ans). Cette proportion était plus élevée chez les Canadiens qui n'ont pas visité un professionnel dentaire dans la dernière année (48 %) et chez ceux avec un faible revenu (48 %) comparés à ceux avec des hauts revenus (24 %). La parodontite modérée (profondeur de poche parodontale = 4 à 5 mm) était recensée chez 16% des adultes canadiens, et plus encore chez les fumeurs (22 %) et les personnes âgées de 60-79ans (24 %). Enfin, 6 % des adultes canadiens ont eu une parodontite sévère (perte d'attache clinique > 6 mm)¹⁶⁸.

2.4.2 Généralités sur la gingivite et la parodontite

2.4.2.1 La gingivite

La gingivite, appelée aussi gingivite induite par le biofilm de la plaque dentaire (pour la distinguer des affections gingivales liées à des maladies systémiques), est une lésion inflammatoire résultant des interactions entre le biofilm de la plaque dentaire et la réponse immunitaire-inflammatoire¹⁵⁷. L'inflammation reste localisée dans la gencive et ne s'étend pas au-delà de la jonction muco-

gingivale. Elle est réversible après réduction du niveau de plaque dentaire¹⁵⁸. Les changements initiaux d'une gencive saine à la gingivite peuvent ne pas être détectables cliniquement. Mais, à mesure que la gingivite évolue, les signes cliniques et les symptômes deviennent évidents¹⁵⁷. Les symptômes qu'un patient peut signaler comprennent des gencives rouges enflées et qui saignent, de la douleur, la mauvaise haleine, la difficulté à manger, et la réduction de la qualité de vie liée à la santé bucco-dentaire^{156, 169}.

Le seuil d'accumulation de plaque nécessaire pour induire l'inflammation gingivale varie d'une personne à l'autre selon des facteurs de risque locaux et des facteurs de risque systémiques¹⁵⁶. Les facteurs locaux regroupent les facteurs qui favorisent l'accumulation de la plaque dentaire ou qui empêchent son élimination adéquate, tels que les malpositions dentaires, les restaurations dentaires mal adaptées au niveau cervical, ou la sécheresse buccale. Les facteurs systémiques sont les caractéristiques individuelles qui influencent négativement la réponse immunitaire-inflammatoire à une charge donnée de biofilm de plaque dentaire, entraînant une inflammation exagérée. Ces facteurs peuvent être le tabagisme, l'hyperglycémie, une carence en vitamine C, l'augmentation d'hormones sexuelles stéroïdes (puberté, grossesse, contraception), ou des maladies hématologiques¹⁵⁶.

La gingivite est un facteur de risque majeur et un prérequis nécessaire pour la parodontite¹⁷⁰. Ainsi, son traitement permet la prévention de la parodontite^{156, 169}.

2.4.2.2 La parodontite

La parodontite est une maladie inflammatoire chronique et multifactorielle, associée à des biofilms de plaque dentaire dysbiotiques et caractérisée par une destruction progressive et **irréversible** des tissus de soutien dentaire¹⁹. Ses principales caractéristiques comprennent la perte d'attache clinique, la résorption de l'os alvéolaire visualisée par radiographie, la formation de poches parodontales, et le saignement gingival¹⁹.

La parodontite est provoquée par la colonisation des tissus de support de la dent par des pathogènes, principalement des bactéries anaérobies Gram-négatives et des spirochètes, qui cohabitent avec de nombreuses espèces bactériennes dans un biofilm complexe^{171, 172}. À la suite de la colonisation de la surface dentaire, les bactéries s'étendent apicalement le long de la surface radiculaire pour initier la formation de poche parodontale, la destruction de l'os alvéolaire et des fibres de collagène du ligament parodontal¹⁷³. Le mécanisme étiopathogénique des agents microbiens dans la destruction

parodontale est basé aussi bien sur la virulence de leurs produits que sur la réponse inflammatoire qu'ils entraînent¹⁷⁴. En effet, le corps réagit par inflammation locale pour faire face à l'afflux microbien au niveau des tissus parodontaux. Cette inflammation qui a pour but de détruire l'agent microbien et ses produits, s'accompagne de dommages tissulaires. Quand l'agression bactérienne n'est pas neutralisée, celle-ci fait perpétuer l'inflammation qui devient chronique sans être efficace. Le phénomène devient ensuite difficilement réversible et, avec la perte d'attache, l'invasion microbienne prend de l'expansion^{171, 175}. Considérant l'aspect moléculaire du processus de progression de la parodontite, ce sont les niveaux élevés de médiateurs d'inflammation tissulaire, tels que l'interleukine IL-1 et IL-6, le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α), la prostaglandine E2 (PGE2) et les métalloprotéases matricielles, qui provoquent la dégradation du collagène et de la matrice extracellulaire, menant ainsi à la résorption osseuse^{176, 177}. Les mécanismes sous-jacents à cette inflammation chronique ne sont pas entièrement expliqués, mais on invoque une altération des voies d'immunorégulation qui sont destinées à contenir l'inflammation dès que l'infection est contrôlée^{40, 178}.

Cliniquement, les parodontites peuvent être classées selon leur sévérité, complexité et extension^{179, 180}. La sévérité se manifeste par le niveau de perte d'attache clinique, de la résorption alvéolaire selon l'examen radiologique et la perte de dents consécutive à la maladie. Ainsi, la parodontite peut être classée en : Stade 1 = Parodontite au stade initial (perte d'attache clinique de 1 à 2 mm, pas de perte de dents, lyse osseuse < 15% de la racine) ; Stade 2 = Parodontite modérée (perte d'attache clinique de 3 à 4 mm, pas de perte dentaire, lyse alvéolaire sur 15 à 33 %) ; Stade 3 = Parodontite sévère (perte d'attache clinique \geq 5 mm, lyse osseuse au 2/3 de la racine et un maximum de 4 dents perdues); et Stade 4 = Parodontite avancée (perte d'attache clinique \geq 5mm, lyse osseuse \geq 2/3 de la racine, perte de \geq 5 dents et plus). Pour n'importe quel stade de la parodontite au moment de son diagnostic, la progression de la maladie et sa réponse au traitement varient entre les individus selon leurs expositions aux facteurs de risque, en particulier le tabagisme et le diabète non contrôlé¹⁸⁰.

Bien que la présence de micro-organismes spécifiques pathogènes soit nécessaire pour initier la MP et l'entretenir, leur virulence dépend grandement de la susceptibilité de l'hôte lui-même¹⁵⁸. Plusieurs facteurs de risque de maladies parodontales ont été associés à une augmentation de risque de MP. Ces facteurs incluent l'âge (la prévalence de la maladie augmente avec l'âge), le sexe (les hommes plus exposés que les femmes), le statut socioéconomique, le diabète, l'obésité, le

tabagisme, la consommation d'alcool, l'hygiène dentaire et l'utilisation des services de soins dentaires, le changement hormonal chez les femmes, les médicaments (ex. ceux qui causent la sécheresse buccale), le stress et l'hérédité^{22, 159, 181, 182}.

2.4.3 Rôle de *Fusobacterium nucleatum* dans la maladie parodontale

La MP est initiée par une communauté polymicrobienne dysbiotique, où le microbiome sous-gingival et la réponse inflammatoire de l'hôte forment une boucle de rétroaction : la dysbiose provoque les réponses inflammatoires délétères et l'inflammation perpétue la dysbiose¹⁸³.

Les présumées bactéries parodontopathogènes fréquemment identifiées dans les parodontites sont: 1) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, qui fait partie des premières espèces bactériennes à coloniser la surface dentaire et dont la croissance précède la multiplication des bactéries Gram-négatives prédominantes; 2) *Prevotella intermedia*, *F. nucleatum* et *Campylobacter rectus* qui appartiennent au 'complexe orange' et prédominent après la colonisation du *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; 3) *Tannerella forsythensis*, *Porphyromonas gingivalis* et *Treponema denticola* qui appartiennent au 'complexe rouge' et prolifèrent à des stades plus tardifs du développement du biofilm dentaire¹⁸⁴. On rappelle que les 'complexes bactériens' ont été définis par Socransky et al.¹⁸⁵, qui ont constaté, qu'au sein du biofilm dentaire, les bactéries ont plutôt tendance à être regroupées en 'complexes' (ou grappes, pour le terme anglais clusters) selon leurs besoins nutritionnels et atmosphériques¹⁸⁵. Les espèces du complexe orange semblent constituer un pont entre les espèces colonisatrices précoces comme l'*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* et les espèces tardives du complexe rouge¹⁸⁶.

Au sein de ces complexes microbiens, le *F. nucleatum* est doté de propriétés de co-agrégation qui lui permettent de transporter des bactéries parodontopathogènes¹⁷². La colonisation par le *Prevotella intermedia* serait stimulée par la présence du *F. nucleatum*. Le *F. nucleatum* faciliterait également l'invasion des cellules de l'hôte par le *Porphyromonas gingivalis*. L'augmentation du nombre de bactéries associées au *F. nucleatum* pourrait servir plus tard pour recruter et activer les cellules immunitaires locales, ce qui entraînerait la destruction des tissus et la progression de la MP¹⁸⁷. La combinaison de *F. nucleatum*, *Tannerella forsythensis* et *Campylobacter rectus* est observée dans les sites atteints de parodontite présentant une sévérité accrue, ainsi que dans des sites réfractaires au traitement parodontal¹⁸⁸.

D'après une analyse de données regroupées provenant de plusieurs études qui ont fait un séquençage de la plaque sous-gingivale en présence de parodonte sain, gingivite et parodontite¹⁸³, *F. nucleatum* subsp. *vincentii* était très abondant et enrichi dans les communautés bactériennes saines, *F. nucleatum* subsp. *polymorphum* et *Fusobacterium periodonticum* s'enrichissent dans la gingivite et toutes les sous-espèces de *F. nucleatum* étaient enrichies dans la parodontite¹⁸³.

2.5 Maladie parodontale et cancer colorectal

En tant que foyer microbien et inflammatoire chronique, la MP a été associée à des maladies systémiques majeures, notamment des maladies cardiovasculaires, respiratoires, rénales chroniques et métaboliques, des complications obstétricales, la polyarthrite rhumatoïde et même des cancers^{22, 27, 28}.

2.5.1 État des connaissances sur le lien entre la maladie parodontale et le cancer colorectal

2.5.1.1 Définition de cas de maladie parodontale dans les études épidémiologiques

La définition de l'exposition principale revêt toute l'importance en épidémiologie car elle peut être source de biais d'information et d'erreur de classement¹⁸⁹. Or, la définition de cas de MP dans les études épidémiologiques est loin d'être uniforme^{190, 191}. D'abord, la MP est soit définie sur la base de mesures cliniques enregistrées par des professionnels dentaires, ou sur la base de mesures auto-rapportées par les participants eux-mêmes. Les mesures cliniques sont des mesures issues d'examen intra-buccal et /ou d'examen radiologique dentaire. Les mesures portent en général sur des indicateurs cliniques ou radiologiques de la maladie, telles que la profondeur de la poche parodontale, la perte d'attache clinique, le saignement gingival, la mobilité dentaire, ou la résorption de l'os alvéolaire mesurée sur des radiographies dentaires. Les mesures cliniques pour la définition de cas de MP en épidémiologie doivent être plus standardisées, précises et relativement peu nombreuses¹⁹². Quant aux mesures auto-rapportées de la MP, elles font appel à l'usage de questionnaires qui portent en général sur des antécédents de diagnostic ou de traitement professionnel de MP, ou sur les symptômes ou complications cliniques de la maladie, tels que le saignement gingival, la mobilité dentaire, ou la perte dentaire à la suite de la maladie. Les questions peuvent aussi directement viser la perception individuelle de son état de santé parodontale¹⁹³.

En épidémiologie parodontale, chacun des deux modes de mesure, clinique ou auto-rapportée, a ses avantages et inconvénients. Les mesures cliniques permettent certainement une meilleure

classification des cas de MP que les mesures auto-rapportées, puisqu'elles sont objectives et transmettent directement l'état d'indicateurs cliniques de la maladie. Elles permettent aussi de distinguer entre les cas de gingivite et de parodontite, ainsi qu'entre les différents stades de parodontite selon leur sévérité. Toutefois, elles restent sensibles aux variations entre les examinateurs, dispendieuses et difficiles à implanter pour des études populationnelles. Aussi, la prévalence de la MP définie par des mesures cliniques peut varier selon le protocole de sondage parodontal choisi (sondage de la bouche complète ou sondage partiel de la bouche), le type d'indicateurs cliniques mesurés et des seuils de mesure considérés pour établir la définition de cas¹⁹⁴. Les indicateurs cliniques les plus spécifiques de la MP sont la profondeur de poche parodontale qui montre l'activité actuelle de la MP, et la perte d'attache clinique qui informe plutôt sur la destruction tissulaire cumulée (progression et sévérité) de la maladie¹⁹⁵. Ils ne peuvent être utilisés séparément au risque d'inclure faussement des cas de parodontite saine, car la perte d'attache clinique peut aussi résulter d'une récession gingivale consécutive à une hygiène buccodentaire traumatique. La parodontite est ainsi définie par rapport à des valeurs critiques, ou seuils de détection, de perte d'attache clinique et de profondeur de poche. C'est ainsi que plusieurs définitions de MP par mesures cliniques ont été utilisées dans les études épidémiologiques, ce qui complique la comparaison des résultats. Bien que pour y remédier, les CDC, en accord avec l'AAP, ont établi une définition précise de cas de parodontite, qu'ils recommandent de respecter dans les études populationnelles sur la parodontite¹⁵⁹. Selon cette définition, on distingue: 1) la parodontite légère quand deux sites interproximaux ou plus ont une perte d'attache clinique ≥ 3 mm et deux sites interproximaux ou plus ont une poche parodontale ≥ 4 mm (pas sur la même dent) ou un site avec poche parodontale ≥ 5 mm; 2) la parodontite modérée quand deux sites interproximaux ou plus avec perte d'attache clinique ≥ 4 mm (pas sur la même dent), ou deux sites interproximaux ou plus avec poche parodontale ≥ 5 mm (pas sur la même dent); 3) la parodontite sévère quand deux ou plusieurs sites interproximaux montrent une perte d'attache clinique ≥ 6 mm (pas sur la même dent) et un ou plusieurs sites interproximaux avec une poche parodontale ≥ 5 mm¹⁵⁹.

Les mesures auto-rapportées sont une alternative assez fiable aux mesures cliniques dans le cadre d'études populationnelles, moins dispendieuses et plus simples d'accès¹⁹⁶. Mais, là aussi, la validité de la définition de cas de MP sur la base de ces mesures auto-rapportées peut être affectée par le choix des questions utilisées, que ce soit en nombre ou en information visée par la question, ainsi que par leur validité dans la population où elles seront utilisées.

La capacité des mesures auto-rapportées à bien identifier les cas de MP a été évaluée dans plusieurs études antérieures, et auprès de différentes populations¹⁹⁷⁻²⁰². La classification de cas de MP par ces mesures auto-rapportées était alors comparée à une classification de cas basée sur une ‘définition clinique de référence’. Le choix de cette dernière est crucial pour la crédibilité des résultats de l’étude. Aussi, le manque d’uniformité de cette définition clinique de référence entre les études de validité des mesures parodontales auto-rapportées, rend leurs résultats difficilement comparables. En 2016, Abbood et al. ont publié les résultats de leur revue systématique et méta-analyse sur la validité des mesures parodontales auto-rapportées²⁰³. Parmi les 11 études incluses dans leur revue systématique, cinq ont choisi la définition de cas de MP des CDC-AAP comme définition de référence, trois ont choisi l’indice parodontal communautaire (voir description section 2.4.1. à la page 47-48), et trois autres ont choisi d’autres types de mesures cliniques (perte osseuse évaluée par examen radiographique, saignement au sondage, ou mobilité dentaire). Dans leur méta-analyse, les auteurs n’ont pu combiner que quatre études, qui toutes avaient la même définition de référence actuellement recommandée, celle des CDC-AAP. Les auteurs ont ainsi pu calculer les mesures combinées de sensibilité (Sb), spécificité (Sp) et les rapports de cotes diagnostiques (RCDs) pour plusieurs questions fréquemment utilisées, à la fois pour la parodontite modérée et la parodontite sévère (selon la classification des CDC-AAP). Pour la parodontite modérée par exemple, les mesures combinées de Sb, Sp et RCD sont de : 1) Sb = 35 % (30-42), Sp = 84 % (81-87) et RCD = 3,2 (2,2-4,56), $I_2 = 0,0$ (p=0,56), pour la question ‘*Do you think you have gum disease?*’; 2) Sb = 23 % (19-27), Sp = 88 % (86-90), RCD = 2,38 (1,4-4,2), $I_2 = 0,0$ (p=0,66) pour la question ‘*Have you received the following treatment: scaling and root planing? (deep cleaning)*’; 3) Sb = 28 % (23-34), Sp = 95 % (93-96), RCD = 7 (3,2-15,4); $I_2 = 62$ % (p=0,07) pour la question ‘*Have you ever had any teeth become loose on their own, without an injury?*’; 4) Sb = 16 % (14-18), Sp = 87 % (84-90); RCD = 1,4 (0,91-2,16), $I_2 = 40$ % (p=0,2) pour la question ‘*Have you had any of the following oral conditions? (Bleeding gums)*’; 5) Sb = 19 % (13-26), Sp = 88 % (83- 91), RCD = 1,8 (1-3,2), $I_2 = 0,0$ (p=0,68) pour la question ‘*Have you been told that you have bone lost around your tooth? (Bone loss)*’²⁰³. Ces données nous informent certes sur la performance individuelle de certaines questions à bien classer les cas de parodontite, mais pas ceux de la gingivite, qui ne font pas partie de la classification des CDC-AAP. La question sur le saignement gingival par exemple, peut à la fois renseigner sur la gingivite et la parodontite. Dans une revue systématique antérieure, par Blicher et al.¹⁹³, sur la validité des mesures parodontales auto-

rapportées, les auteurs ont séparé les questions sur la gingivite des questions sur la MP (peuvent identifier les cas de gingivite et de parodontite), en se basant sur la formulation des questions et sur le comparateur clinique de référence. Parmi les questions identifiées pour la gingivite, la question sur le saignement gingival régulier, '*Do your gums usually bleed?*', comparée au saignement au sondage dans l'étude de Buhlin et al.¹⁹⁹, montrait la meilleure combinaison des scores de Sb et Sp, comparée aux autres questions (Sb = 42%, Sp = 76%, valeurs prédictives positive de 53% et négative de 67%)¹⁹³. En résumé, il n'y a pas une seule question qui peut informer complètement sur le statut parodontal et la combinaison de plusieurs questions est fortement recommandée pour éviter les erreurs de classement¹⁹³, bien que malheureusement plusieurs études épidémiologiques définissent l'exposition à la MP sur la base d'une seule question^{35,37,38}.

2.5.1.2 Description et critique des études épidémiologiques sur l'association entre la maladie parodontale et le cancer colorectal

L'association entre la MP et le CCR a été explorée par dix études observationnelles^{31-39, 204}, auxquelles s'ajoutent trois études récentes sur l'association entre la MP et les adénomes colorectaux²⁰⁵⁻²⁰⁷, et dont les résultats méritent aussi d'être considérés, puisque les adénomes sont des lésions précancéreuses colorectales. Le sommaire de ces études est présenté sur deux tableaux, selon que la définition de cas de MP est basée sur des mesures cliniques (Tableau 2), ou sur des mesures auto-rapportées (Tableau 3). Pour chaque étude, nous avons précisé les indicateurs cliniques mesurés ou les questions administrées, la définition de la MP à partir de ces mesures, le pays et les caractéristiques de la population étudiée, les facteurs de confusion qui ont été pris en considération dans la mesure de l'association entre la MP et le CCR, ainsi que les résultats de ces études. Aussi, pour les études basées sur des analyses secondaires de données, nous avons recherché l'information à la source de ces données, en l'occurrence l'étude originale. Le but de cette présentation est de faciliter un examen critique de ces études, la lecture plus facile des résultats et leur comparaison.

Tableau 2. – Études observationnelles sur l'association entre la maladie parodontale et le cancer colorectal : définition de cas de maladie parodontale par mesures cliniques

Auteurs (Année) Référence	Devis (Période)	Pays	Échantillon : N, âge, durée de suivi de cohorte, source de l'échantillon	Définition de la MP : moyen, exposition, mesures, définition	Prévalence de la MP dans l'échantillon	Nombre des cas de CCR ou adénomes*	Mesure d'association ajustée (IC à 95%)	Facteurs de confusion contrôlés
Hu et al. (2018) ³¹	Cohorte rétrospective (2000–2002 à 2013)	Taiwan	<ul style="list-style-type: none"> • N: 106 487 • Âge moyen : 40 ans • Suivi ≈13 ans • Sous-échantillon de Taiwan's National Health Insurance Research Database 	<ul style="list-style-type: none"> • Moyen : diagnostic clinique • Exposition : MP incluant gingivite et parodontite • Mesures : pas d'information • Définition : codes administratifs attribués au diagnostic de gingivite et parodontite 	50 % (les exposés et non-exposés sont identifiés dans la base des données par appariement de 1-1, selon l'âge et le sexe)	2254	HRa = 1,64 (1,50-1,80)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Âge ▪ Sexe ▪ Comorbidités
Michaud et al. (2018) ³³	Cohorte prospective (1996–1998 à 2012)	USA	<ul style="list-style-type: none"> • N = 6056 • Âge moyen ≈ 62 ans • Suivi ≈15 ans • Sous-échantillon de Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) 	<ul style="list-style-type: none"> • Moyen : Sondage parodontal de bouche complète • Exposition : Parodontite, classée en légère, modérée, sévère, ou aucune • Mesures : PAC et PP • Définition: - Définition de l'ARIC¹ : basée sur PAC - Définition des CDC-AAP² : basée sur PAC et PP 	<ul style="list-style-type: none"> • Définition de l'ARIC¹ : - Aucune parodontite + parodontite légère : 42 % - Parodontite modérée : 35 % - Parodontite sévère : 23 % • Définition des CDC-AAP² : - Aucune : 28 % - Parodontite légère : 12 % - Parodontite modérée : 41% - Parodontite sévère : 19% 	116	<ul style="list-style-type: none"> • Définition de ARIC¹: - Parodontite modérée: RRIa = 0,87 (0,55 -1,37) - Parodontite sévère: RRIa = 1,51 (0,95 - 2,42) • Définition des CDC-AAP² : - Parodontite légère: RRIa = 0,58 (0,25-1,35) - Parodontite modérée: RRIa = 0,96 (0,60-1,54) - Parodontite sévère: RRIa = 1,51 (0,90-2,52) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Âge ▪ Sexe ▪ Centre d'affiliation ▪ Éducation ▪ Tabagisme (statut et durée) ▪ Alcool (statut) ▪ IMC ▪ Diabète ▪ Thérapie de substitution hormonale
Mai et al. (2016) ³²	Cohorte prospective (1997–2000 à 2014)	USA	<ul style="list-style-type: none"> • N = 1337 (Femmes post-ménopausées) • Âge : 53-85 ans au début 	<ul style="list-style-type: none"> • Moyen : Radiographies dentaires sur toutes les dents + Questionnaire 	MP : 76 %, inclut : - Légère à modérée : 50 % - Sévère : 26 %	19	<ul style="list-style-type: none"> • MP légère à modérée : RRIa = 2,09 (0,45-9,67) • MP sévère : RRIa = 1,94 (0,36-10,35) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Âge ▪ Tabagisme

Auteurs (Année) Référence	Devis (Période)	Pays	Échantillon : N, âge, durée de suivi de cohorte, source de l'échantillon	Définition de la MP : moyen, exposition, mesures, définition	Prévalence de la MP dans l'échantillon	Nombre des cas de CCR ou adénomes*	Mesure d'association ajustée (IC à 95%)	Facteurs de confusion contrôlés
			<ul style="list-style-type: none"> • Suivi moyen : 12 (± 4) ans • Sous-échantillon de Buffalo OsteoPerio Study : étude auxiliaire de la <i>Women's Health Initiative Observational Cohort (WHI-OS)</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Exposition : MP classée en sévère, légère à modérée, et aucune • Mesures : <ul style="list-style-type: none"> - Hauteur de l'os crestal en proximal de toutes les dents sauf canines et dents de sagesse - Question sur perte de dents causée par MP • Définition : basée sur <ul style="list-style-type: none"> - la moyenne et la plus basse des mesures de la hauteur de l'os crestal - l'absence de dents due à la MP 				
Ahn et al. (2012) ³⁶	Cohorte prospective (1988–1994 à 2006)	USA	<ul style="list-style-type: none"> • N = 12 605 • Âge moyen : 36 ans pour non exposés, et 52 ans pour exposés • Suivi : 12 à 14 ans • <i>National Health and Nutrition Examination Survey III (NHANES III)</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Moyen : Sondage parodontal de bouche complète • Exposition : Parodontite, classée sévère, et modérée • Mesures : PP et PAC • Définition : de CDC-AAP² 	<ul style="list-style-type: none"> Parodontite : 17 %, inclut : <ul style="list-style-type: none"> • Parodontite modérée : 14 % • Parodontite sévère : 3 % 	39 (décès par CCR)	Risque relatif ajusté = 3,58 (1,15-11,16)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Age ▪ Sexe ▪ Éducation, ▪ Ethnicité ▪ Tabagisme ▪ IMC
Hujoel et al. (2003) ³⁹	Cohorte prospective (1971–1974 à 1992)	USA	<ul style="list-style-type: none"> • N = 11 328 • Âge : 25 à 74 ans • Suivi : 20 ans • <i>NHANES I Epidemiologic</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Moyen : Examen parodontal de toutes les dents • Exposition : Gingivite et Parodontite séparément • Mesures : Scores attribués à l'étendue de l'inflammation 	<ul style="list-style-type: none"> • Gingivite : 23 % • Parodontite : 18 % 	219 (décès par CCR)	<ul style="list-style-type: none"> • Gingivite : RCa = 1,27 (0,69-2,34) • Parodontite : RCa = 0,91 (0,49-1,70) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Âge ▪ Sexe

Auteurs (Année) Référence	Devis (Période)	Pays	Échantillon : N, âge, durée de suivi de cohorte, source de l'échantillon	Définition de la MP : moyen, exposition, mesures, définition	Prévalence de la MP dans l'échantillon	Nombre des cas de CCR ou adénomes*	Mesure d'association ajustée (IC à 95%)	Facteurs de confusion contrôlés
			<i>Follow-up Study (NHEFS)</i>	gingivale, la présence de PP et la mobilité dentaire • Définition : Indice de Russel ^ϕ				
Kim et al. (2019) ²⁰⁵	Étude transversale (2016)	Corée du Sud	• N = 2633 • Âge moyen : 46 ans • Étude sur dossiers médicaux	• Moyen : Examen parodontal de bouche complète • Exposition : Parodontite • Mesure : PP • Définition : ≥ 1 dent avec PP ≥ 4mm	9 %	335* (adénomes proximaux)	RCa = 1,25 (1,07-2,17)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Âge ▪ Tour de taille ▪ Tabagisme ▪ Triglycérides

N: Nombre; **RC** : Rapport de cotes; **RRI** : Rapport des risques instantanés; **a** : Ajusté; **IC** : Intervalle de confiance; **MP** : Maladie parodontale; **CCR** : Cancer colorectal; **IMC** : Indice de masse corporelle; **ATCD** : Antécédent; **AINS** : Anti-inflammatoires non stéroïdiens; **PP** : Poche parodontale ou profondeur de sondage; **PAC** : Perte d'attache clinique; **CDC-AAP** : Centers for Disease Control and Prevention-American Academy of Periodontology; **ARIC** : Atherosclerosis Risk in Communities; **WHI-OS** : Women's Health Initiative Observational Cohort; **NHANES** : National Health and Nutrition Examination Survey; **NHEFS** : NHANES I Epidemiologic Follow-up Study.

¹ : Définition de la parodontite de l'ARIC : Aucune ou légère = < 10 % des sites examinés avec PAC ≥ 3 mm; Modérée = ≥ 10 % et < 30 % de sites examinés avec PAC ≥ 3 mm; Sévère = ≥ 30 % des sites examinés ont une PAC ≥ 3 mm;

² : Définition de la parodontite par les CDC-AAP : Légère= deux sites interproximaux ou plus avec PAC ≥ 3 mm, et deux sites interproximaux ou plus avec PP ≥ 4 mm (pas sur la même dent) ou un site avec PP ≥ 5 mm; Modérée = deux sites interproximaux ou plus avec PAC ≥ 4 mm (pas sur la même dent), ou deux sites interproximaux ou plus avec PP ≥ 5 mm (pas sur la même dent); Sévère = deux ou plusieurs sites interproximaux avec PAC ≥ 6 mm (pas sur la même dent) et un ou plusieurs sites interproximaux avec PP ≥ 5 mm; Aucune = pas de signes de légère, ni modérée, ni sévère.

ϕ : Indice parodontal où toutes les dents sont examinées sont notées à l'aide de cinq catégories bien distinctes (0, 1, 2, 6 et 8) représentant des degrés progressifs de sévérité de la maladie.

* : Adénomes

Tableau 3. – Études observationnelles sur l’association entre la maladie parodontale et le cancer colorectale: définition de cas de maladie parodontale par mesures auto-rapportées

Auteurs (Année) Référence	Devis (période)	Pays	Échantillon : N, âge, durée de suivi de cohorte, source de l'échantillon	Définition de la MP : moyen, exposition, mesures, définition	Prévalence de la MP dans l'échantillon	Nombre de cas de CCR ou adénomes*	Mesure d'association ajustée (IC à 95%)	Facteurs de confusion contrôlés
Momen-Heravi et al. (2017) ³⁴	Cohorte prospective (1998 à 2010)	USA	<ul style="list-style-type: none"> • N = 69 656 • Âge : 30 à 55 ans (femmes infirmières) • Suivi moyen : 12.2 (±4.2) ans • Sous-échantillon de Nurses' Health Study (NHS) 	<ul style="list-style-type: none"> • Moyen : Questionnaire • Exposition : MP classée en aucune, légère, modérée à sévère. • Mesures : “Have you had a history of periodontal bone loss? (No/Yes)” -Si oui: indiquer sévérité: légère, modérée, ou sévère : • Définition : - MP : présence/absence, selon réponse oui/non à la question. - MP par sévérité : selon appréciation du participant 	14 %	739	<ul style="list-style-type: none"> • MP : RR1a = 0,89 (0,72-1,10) • Par sévérité: MP légère: RR1a = 0,73 (0,55-0,98) MP modérée à sévère: RR1a = 1,22 (0,91-1,63) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Âge ▪ Ethnicité ▪ Tabagisme ▪ ATCDs familiaux de CCR ▪ ATCD de coloscopie ▪ Activité physique ▪ Usage d'aspirine, multivitamines, vitamine D, calcium, folate, hormones de remplacement ▪ Diabète ▪ Alcool ▪ IMC ▪ Viandes rouges et transformés
Nwizu et al. (2017) ³⁵	Cohorte prospective (1999–2003 à 2013)	USA	<ul style="list-style-type: none"> • N = 65 869 (femmes post ménopausées) • Âge : 50 à 79 ans • Suivi moyen : 8,32 (±3,95) ans • Sous-échantillon de la Women's Health Initiative Observational Cohort (WHI-OS) 	<ul style="list-style-type: none"> • Moyen : Questionnaire • Exposition : MP • Mesures : “Has a dentist or dental hygienist ever told you that you had periodontal or gum disease? (No/Yes)” • Définition : Réponse oui à la question 	26 %	635	<ul style="list-style-type: none"> • Cancer du côlon: RR1a = 1,05 (0,87-1,28) • Cancer du rectum : RR1a = 0,79 (0,46-1,36) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Âge ▪ Tabagisme ▪ IMC
Arora, et al. (2010) ³⁷	Cohorte prospective de jumeaux (1963 à 2004)	Suède	<ul style="list-style-type: none"> • N =15 333 jumeaux • Âge médian au début : 51 ans • Suivi médian : 27 ans 	<ul style="list-style-type: none"> • Moyen : Questionnaire • Exposition : MP • Mesures : “Have you noticed that some of your own teeth have come loose or 	<ul style="list-style-type: none"> • MP : 6 % • Mobilité mineure : 12 % 	200	RR1a = 1,62 (1,13-2,33)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Âge ▪ Sexe ▪ Diabète ▪ IMC ▪ Éducation ▪ Emploi

Auteurs (Année) Référence	Devis (période)	Pays	Échantillon : N, âge, durée de suivi de cohorte, source de l'échantillon	Définition de la MP : moyen, exposition, mesures, définition	Prévalence de la MP dans l'échantillon	Nombre de cas de CCR ou adénomes*	Mesure d'association ajustée (IC à 95%)	Facteurs de confusion contrôlés
				<p><i>fallen out on their own? (No/Yes) ”</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Définition: -MP (avancée) : La moitié des dents ou plus sont mobiles -Mobilité mineure : quelques dents mobiles 				<ul style="list-style-type: none"> ▪ Nombre de frères et sœurs ▪ Statut tabagique ▪ Statut tabagique du partenaire ▪ Alcool
Michaud, et al. (2008) ³⁸	• Cohorte prospective (1986 à 2004)	USA	<ul style="list-style-type: none"> • N = 48 375 (hommes professionnels de la santé) • Âge : 45 à 75 ans • Suivi : 18 ans • <i>Health Professionals Follow-Up Study (HPFS)</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Moyen : Questionnaire • Exposition : Parodontite • Mesures : “<i>Have you been professionally diagnosed with periodontitis with bone loss? (Non/Oui) ”</i> • Définition : Réponse oui à la question 	16 %	1043	RR1a = 1,05 (0,9-1,23)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Âge ▪ Ethnicité ▪ IMC ▪ Tabagisme ▪ Activité physique ▪ Diabète ▪ Alcool ▪ Localisation géographique ▪ Hauteur ▪ Consommation de calcium, calories totales, viandes rouges, légumes et fruits ▪ Score de vitamine D
Michaud et al. (2016) ²⁰⁴	Cohorte prospective (1986 à 2012)	USA	<ul style="list-style-type: none"> • N = 19 933 (hommes professionnels de la santé et non fumeurs) • Âgés 45 à 75 ans • Suivi : 26 ans • Sous-échantillon de la <i>Health Professionals Follow-Up Study (HPFS)</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Moyen : Questionnaire • Exposition : Parodontite • Mesures : “<i>Have you been professionally diagnosed with periodontitis with bone loss? (Non/Oui) ”</i> • Définition : Réponse oui à la question 	10 %	471	RR1a = 1,03 (0,75-1,39)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Âge ▪ Ethnicité ▪ IMC ▪ Activité physique ▪ Diabète ▪ Alcool ▪ Localisation géographique ▪ Hauteur ▪ Usage AINS
Lee et al. (2018) ²⁰⁶	Étude transversale	Corée du Sud	<ul style="list-style-type: none"> • N = 42 871 (70 % hommes) 	<ul style="list-style-type: none"> • Moyen : Questionnaire • Exposition : Parodontite 	14 %	5136 * (adénomes)	RCa = 1,29 (1,18-1,4)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Âge ▪ IMC

Auteurs (Année) Référence	Devis (période)	Pays	Échantillon : N, âge, durée de suivi de cohorte, source de l'échantillon	Définition de la MP : moyen, exposition, mesures, définition	Prévalence de la MP dans l'échantillon	Nombre de cas de CCR ou adénomes*	Mesure d'association ajustée (IC à 95%)	Facteurs de confusion contrôlés
	(2013 à 2015)		<ul style="list-style-type: none"> • Âge moyen: 39,3 ± 8,7 	<ul style="list-style-type: none"> • Mesures : 15 questions sur la santé orale • Définition: Pas d'information 				<ul style="list-style-type: none"> ▪ Tabagisme ▪ Alcool
Lo et al. ²⁰⁷ (2020)	Combinaison de 2 Cohortes prospectives	USA	<ul style="list-style-type: none"> • N = 42 486 (17 904 femmes infirmières + 24 582 hommes professionnels de la santé) • Âge : 30-55 pour femmes et 40-57 pour hommes. • Suivi médian : 10 ans pour femmes et 17,6 ans pour hommes • Sous-échantillon des 2 cohortes : <i>Nurses' Health Study (NHS)</i> + <i>Health Professionals Follow-Up Study (HPFS)</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Moyen: Questionnaire • Exposition : Parodontite • Mesures: <ul style="list-style-type: none"> - "Have you been professionally diagnosed with periodontitis with bone loss? (Non/Oui)" dans HPFS. - "Have you had a history of periodontal bone loss? (No/Yes)" dans NHS • Définition: Réponse oui à la question 	22 %	<ul style="list-style-type: none"> 2336 * (adénomes festonnés) 4102 * (adénomes conventionnels) 	<ul style="list-style-type: none"> Adénomes festonnés RCa = 1,17 (1,06-1,29) Adénomes conventionnels RCa = 1,11 (1,02-1,19) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Âge ▪ Ethnicité ▪ Sexe ▪ IMC ▪ Taille ▪ ATCDs familiaux de CCR ▪ Coloscopie antérieure ▪ Période d'endoscopie ▪ Diabète ▪ Tabagisme ▪ Activité physique ▪ Certaines consommations alimentaires ▪ Alcool ▪ Usage d'aspirine ▪ Examen physique (2 dernières années)
<p>RC : Rapport de cotes; RRI : Rapport des risques instantanés; a : Ajusté; IC : Intervalle de confiance; MP : Maladie parodontale; CCR : Cancer colorectal; IMC: Indice de masse corporelle; ATCD : Antécédent; AINS : Anti-inflammatoires non stéroïdiens; Nurses' Health Study (NHS); WHI-OS: Women's Health Initiative Observational Cohort; HPFS: Health Professionals Follow-Up Study.</p>								

Plusieurs constats émanent de la lecture de ces tableaux :

➤ **Concernant les études ayant procédé avec une définition de cas de MP sur la base de mesures cliniques**, nous en avons recensé cinq études concernant le risque de CCR^{31, 33, 36, 39, 204} et une étude sur le risque d'adénomes colorectaux²⁰⁵. Quatre études étaient menées aux États-Unis^{33, 36, 39, 204} auprès de sous-échantillons de larges études de cohortes et d'enquêtes nationales qui avaient eu lieu auparavant (ex. *Atherosclerosis Risk in Communities, Buffalo OsteoPerio Study, National Health and Nutrition Examination Survey*) et deux études en Asie (Taiwan et Corée du Sud) dont les données proviennent de bases de données de l'assurance santé^{31, 205}.

Pour les études menées aux États-unis^{33, 36, 39, 204}, bien qu'elles aient de grands échantillons de participants, le nombre de cas de CCR recensés à la fin des cohortes demeure néanmoins restreint. Celui-ci était aussi faible que 19 cas de CCR dans l'étude de Mai et al.²⁰⁴ et d'un maximum de 219 cas dans l'étude de Hujuel et al.³⁹. Ces études montrent une tendance à la hausse du risque de CCR pour la parodontite sévère, avec une association statistiquement significative entre la MP et le CCR dans l'étude d'Ahn et al.³⁶, mais avec des résultats imprécis (Risque relatif ajusté de 3,58; IC à 95 % : 1,15-11,16), dus au nombre insuffisant de cas de CCR (n=39).

Pour les deux autres études menées en Asie^{31, 205}, le nombre de cas était plus grand : 2254 cas de CCR pour l'étude de cohorte Taiwanaise de Hu et al.³¹ et 335 cas d'adénomes colorectaux pour l'étude transversale coréenne, de Kim et al.²⁰⁵. Ces deux études montrent une association significative de la MP avec le CCR (Rapport des risques instantanés (RRI), ajusté pour l'âge, le sexe et les comorbidités = 1,64; IC à 95 % : 1,50–1,80)³¹ et avec les adénomes colorectaux (RC ajusté pour âge, tour de taille, tabagisme et triglycérides = 1,25; IC à 95 % : 1,07-2,17). Mais, les deux études sont sujettes à un biais d'information majeur ainsi qu'un contrôle insuffisant et inadéquat des facteurs de confusion. Par exemple, pour la première étude de Hu et al.³¹, la classification de la MP est basée sur un code donné par l'organisme d'assurance, sans aucune information sur les critères cliniques qui ont servi à l'attribution des codes pour la gingivite et la parodontite. Le diagnostic de MP est certainement clinique, mais non destiné à des fins de recherche épidémiologique ou de surveillance, ce qui expose à un problème de standardisation de la définition de la maladie dans l'étude. Il y a aussi un risque non négligeable de classification erronée due à un surcodage délibéré de la part des prestataires pour éviter le refus de remboursement par l'assureur²⁰⁸. Quant à l'étude de Kim et al.²⁰⁵, la sélection des participants est basée uniquement sur la disponibilité des données, résultant d'un échantillon de participants

relativement peu âgés (moyenne 46 ans). Les auteurs ont défini la MP par la présence d'une seule poche parodontale, avec une profondeur de 4 mm et plus. Cette définition, basée sur un seul indicateur clinique, a été fortement critiquée car peut entraîner des faux positifs (prévalence plus élevée) par mauvaise interprétation de fausses poches parodontales¹⁹⁴. Par ailleurs, vu que les participants de l'étude sont des sujets relativement jeunes pour développer la MP (prévalence rapportée de 9 %), on ne peut écarter le risque de biais de mesure lié à une éventuelle exploration des données (*data-dredging*), préalable au choix de la définition de cas de MP par les auteurs.

Comme autre constat émanant du tableau 2, c'est la variabilité des indicateurs cliniques mesurés d'une étude à l'autre, ainsi que celle des définitions de la MP. La définition de la MP par les CDC-AAP (décrite précédemment à la section 2.5.1.1), qui est considérée la définition de référence de la MP, ne fut adoptée que par deux études^{33, 36}. Dans l'une des deux études, par Michaud et al.³³, les chercheurs ont même utilisé une deuxième définition basée uniquement sur la perte d'attache clinique et ont trouvé que la mesure d'association entre la MP et le CCR était différente entre les deux définitions cliniques de la MP. Ceci montre que, même avec des mesures cliniques, les résultats peuvent changer selon la définition adoptée sur la base de ces mesures.

➤ **Concernant les études ayant procédé avec une définition de cas de MP sur la base de mesures auto-rapportées**, cinq études évaluant le risque de CCR^{34, 35, 37, 38, 204} et deux études évaluant le risque d'adénomes colorectaux^{206, 207} sont recensées. En dehors d'une étude transversale menée en Corée du Sud (sur les adénomes)²⁰⁶, les autres études étaient des cohortes prospectives. Les participants de ces études provenaient de trois grandes cohortes américaines, la *Health Professionals Follow-Up Study*, la *Women's Health Initiative Observational Cohort*, la *Nurses' Health Study* et d'une cohorte de jumeaux suédois. Le nombre de cas de CCR était assez grand dans la majorité des études, le plus petit nombre de cas de CCR déclaré était celui de la cohorte suédoise, qui était de 200 cas³⁷.

Presque toutes les études ont défini la MP sur la base d'une question unique. Celle-ci renseigne sur un antécédent de diagnostic professionnel de MP dans la *Health Professionals Follow-Up Study* et la *Women's Health Initiative Observational Cohort*, un antécédent de perte d'os parodontal dans la *Nurses' Health Study* et sur la présence de dents mobiles ou de dents perdues spontanément, dans la cohorte suédoise³⁷. La prévalence de MP basée sur une seule question était généralement plus

basse que celle mesurée par des mesures cliniques. Les résultats des études montraient, pour quelques-unes, une tendance d'association positive entre la MP et le CCR, avec une association significative enregistrée dans l'étude suédoise: (Hazard ratio ajusté = 1,62; IC à 95 % : 1,13-2,33). Il faut souligner que la question utilisée dans l'étude suédoise détecte plus spécifiquement les cas de parodontite avancée (plusieurs dents mobiles et perte spontanée des dents). D'ailleurs, la prévalence de la MP dans leur échantillon n'était que de 6 %. La mesure d'association était ajustée pour plusieurs facteurs de confusion, mais pas pour l'activité physique, ni la consommation de viandes rouges et transformées.

Nous constatons aussi une association significative entre la MP et les adénomes colorectaux dans les deux études de Lee et al.²⁰⁶ et de Lo et al.²⁰⁷. La première est une étude transversale, avec 42 871 patients consécutifs qui ont reçu une coloscopie parmi d'autres examens médicaux à l'hôpital Kangbuk Samsung, en Corée du Sud. Les participants avaient une moyenne d'âge de 39 ans ($\pm 8,7$) et 70 % étaient des hommes. Les auteurs rapportent dans leur méthodologie qu'ils ont fait appel à un questionnaire de 15 questions sur la santé orale, mais aucune mention dans le manuscrit sur la définition de la MP à partir de leur questionnaire. Leurs résultats montrent un RC ajusté de 1,29 (IC à 95 % : 1,18-1,4), sachant que l'ajustement est fait uniquement pour l'IMC, l'âge, le tabagisme et la consommation d'alcool. Même le sexe n'était pas contrôlé, pourtant ils ont 70 % d'hommes dans leur échantillon. La deuxième étude, est une analyse de données combinée de participants issus de la *Health Professionals Follow-Up Study* et de la *Nurses' Health Study*, ayant subi une coloscopie²⁰⁷. L'association était significative pour les deux types d'adénomes, conventionnels et festonnées, après un contrôle de plusieurs facteurs de confusion potentiels.

Aussi, une récente méta-analyse par Xuan et al.²¹⁰, qui ont regroupé les résultats d'études observationnelles sur la MP et le CCR (incluant les adénomes colorectaux), révèle un risque relatif combiné de 1,21 (IC à 95 % = 1,06-1,38), mais avec une hétérogénéité très élevée entre les études ($I_2 = 83,9$; IC à 95 % = 72,7-90,5).

À la lumière des données disponibles, l'association entre la MP et le CCR est suggérée, mais elle reste encore mal investiguée. Des preuves épidémiologiques valides et reproductibles restent encore nécessaires et les nouvelles données sur l'association entre la MP et les adénomes colorectaux appuient ce besoin.

2.5.2 Mécanismes d'association suggérés entre la maladie parodontale et le cancer colorectal

La cavité buccale peut en effet servir de réservoir pour la dissémination systémique des bactéries pathogènes et de leurs toxines, conduisant à des infections et inflammations dans des sites corporels éloignés. Plusieurs espèces buccales étaient identifiées dans des infections sur des sites extra-buccaux²¹¹. D'après Scannapieco et al.²¹², quatre voies potentielles peuvent permettre aux bactéries buccales et l'inflammation gingivale d'influencer la santé générale : la bactériémie, la dissémination systémique de médiateurs inflammatoires produits localement, la provocation d'une réponse auto-immune et l'aspiration ou l'ingestion de contenu oral vers l'intestin ou les voies respiratoires²¹². Han et al.²¹¹ suggèrent aussi une propagation de l'infection orale due à une bactériémie transitoire entraînant une colonisation bactérienne dans des sites extra-buccaux, une lésion systémique par des toxines libres de pathogènes buccaux et une inflammation systémique provoquée par des antigènes solubles de pathogènes buccaux²¹¹. L'inflammation a longtemps été reconnue en lien avec le cancer et ce lien a été établi sur la base de plusieurs observations, telles que l'apparition de tumeurs sur des sites d'inflammation chronique²¹³ (plus de 20 % des cancers sont précédés d'une inflammation chronique²¹⁴), la présence de cellules inflammatoires et de médiateurs d'inflammation dans les tumeurs, le rôle de la surexpression de cytokines et de chimiokines dans l'induction de cancer, des cibles moléculaires et des voies similaires sont activées ou arrêtées dans l'inflammation, ainsi que dans le processus de cancérogenèse^{213, 215}. Aussi, les résultats des études épidémiologiques ont montré que les états inflammatoires augmentent le risque de nombreux de cancers et que les anti-inflammatoires non stéroïdiens réduisent l'incidence et la mortalité de plusieurs cancers^{30, 216}.

L'inflammation chronique favorise la carcinogénèse par l'induction de mutations génétiques, l'inhibition de l'apoptose, la stimulation de l'angiogénèse et la prolifération cellulaire²¹⁷. L'inflammation induit également des altérations épigénétiques qui sont associées au développement du cancer³⁰. Le rôle de l'inflammation ne se limite pas à l'initiation, mais est également pertinent pour la croissance tumorale²¹⁷. Les cellules myéloïdes infiltrant les tumeurs produisent des cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-6, qui induisent une signalisation par STAT3 (*Signal transducer and activator of transcription 3*) et NF-κB (*Nuclear factor κB*) pour augmenter la prolifération cellulaire et pour supprimer l'apoptose. STAT3 est couramment impliqué dans la tumorigénèse de plusieurs tissus et dans le processus inflammatoire des cancers du foie, du poumon, du pancréas et du côlon^{108, 217}.

Le développement de la dysplasie et du CCR est fortement influencé par l'état inflammatoire du côlon. Chez les patients atteints d'une maladie inflammatoire de l'intestin, telle que la colite ulcéreuse, l'inflammation chronique et sévère du côlon augmente le risque de développer un CCR^{57, 218}. Dans des tissus coliques sains, une inflammation plus légère joue également un rôle majeur dans la conversion d'un côlon sain en un côlon dysplasique. Lorsque les cryptes deviennent dysplasiques, il se produit une dégradation progressive de la barrière épithéliale, qui aide à séparer le microbiote des cellules immunitaires dans la lamina propria. Ceci facilite la translocation bactérienne et, finalement, l'exposition de composés microbiens immunogènes à la fois aux cellules épithéliales et aux cellules présentatrices d'antigène. L'activation des voies de signalisation immunitaire par des stimuli bactériens entraîne une perte d'homéostasie qui entraîne un environnement inflammatoire pro-tumoral²¹⁸.

3. PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS DE RECHERCHE

Avant d'annoncer nos objectifs de recherche, nous allons énumérer les constats saillants qui émanent de notre revue de la littérature et qui constituent les bases de notre problématique de recherche :

- Le CCR reste à ce jour l'un des cancers les plus répandus et une des premières causes de décès par cancer au Canada et dans le monde.
- Les facteurs de risque du CCR qui ont été identifiés à ce jour sont nombreux et dont la majorité restent difficilement modifiables par la prévention (ex. facteurs socio-démographiques et comportementaux).
- Avec le développement des techniques de microbiologie moléculaire de ces dernières années, la dysbiose intestinale est devenue un facteur de risque émergent du CCR.
- Durant la dernière décennie, plusieurs études ont rapporté la détection de plus en plus fréquente de la bactérie *F. nucleatum* dans les échantillons colorectaux de patients diagnostiqués avec des lésions cancéreuses et précancéreuses colorectales, comparés à des témoins.
- Les études en laboratoire ont mis en évidence deux facteurs de virulence de *F. nucleatum*, qui lui confèrent un rôle actif dans la transformation maligne colorectale. L'un de ces deux facteurs de virulence, est une adhésine uniquement présente sur des espèces orales du genre *Fusobacterium*¹⁴⁴, incluant *F. nucleatum*.
- *F. nucleatum* est une bactérie orale et un pathogène important de la MP, qui devient abondante dans la salive en présence de sites de MP. La bactérie est connue pour ses propriétés d'invasion et d'envahissement endothélial qui expliquent sa détection dans des infections de sites éloignés de la cavité buccale.
- L'invasion du côlon par *F. nucleatum* pourrait ainsi prendre son origine dans la cavité buccale en présence de la MP.
- La MP est associée au risque de maladies systémiques et cancers, incluant des cancers gastro-intestinaux. La diffusion des bactéries parodontopathogènes, comme *F. nucleatum*, et de leurs produits de virulence vers les sites extra-buccaux et la libération des médiateurs d'inflammation chronique dans la circulation générale sont les mécanismes incriminés.

- Des études épidémiologiques antérieures, dont la plupart sont des analyses secondaires, ont analysé l'association entre la MP et le CCR. Les résultats de certaines études ont suggéré une association positive entre la MP et le CCR, mais les problèmes méthodologiques des études rendent les résultats non concluants.
- Aucune revue systématique ni méta-analyse n'avait encore systématiquement évalué la qualité de l'évidence accumulée, ni mesuré l'amplitude d'association entre la détection de la bactérie *F. nucleatum* dans le côlon et le CCR.

Pour conclure, les données actuelles suggèrent et appuient l'hypothèse d'une association entre la MP et le CCR. Elle s'explique par une éventuelle translocation de la bouche vers le côlon des bactéries parodontopathogènes, particulièrement *F. nucleatum*, et la dissémination de leurs endotoxines. Aussi, ces données mettent la lumière sur l'inflammation chronique systémique induite par la dissémination des produits de l'inflammation directement dans la circulation sanguine²³.

À l'égard de l'état actuel des connaissances, nous avons voulu, par ce projet doctoral, produire de nouvelles données probantes sur le lien entre la MP et le CCR et certains des mécanismes sous-jacents. Dans ce sens, nous avons fixé trois objectifs, qui ont guidé la conception des trois projets de recherche de ce doctorat, dont les résultats sont présentés dans les articles de cette thèse.

Objectif 1 : Évaluer le lien causal entre la MP et le CCR sporadique.

Notre hypothèse 1 suggère que la MP joue un rôle étiologique dans le CCR sporadique.

Objectif 2: Synthétiser la littérature sur l'association entre la détection de la bactérie *F. nucleatum* dans le côlon et le CCR et estimer la mesure d'association.

*Notre hypothèse 2 suggère que la détection de la bactérie *F. nucleatum* dans les échantillons colorectaux serait associée au risque du CCR.*

Objectif 3 : Vérifier la faisabilité et tester la méthodologie d'une étude épidémiologique à grande échelle conçue pour investiguer la charge de la bactérie *F. nucleatum*, en bouche et dans le côlon, chez des patients diagnostiqués avec lésions néoplasiques colorectales et des témoins.

*Notre hypothèse 3 suggère qu'il est faisable de mener une étude cas-témoins à base hospitalière, analysant l'expression de la bactérie *F. nucleatum* dans la salive et dans la muqueuse colorectale, auprès de patients diagnostiqués avec des néoplasies colorectales et des témoins sans néoplasies colorectales.*

4. MÉTHODOLOGIE

Cette rubrique sera constituée d'une brève description de la méthodologie de recherche pour chacun des trois projets de ce doctorat, étant donné que les informations qui y seront présentées vont être reproduites de manière approfondie dans chacun des articles, dans la section des résultats.

4.1 Étude de l'association entre la maladie parodontale et le cancer colorectal sporadique: Étude COLDENT

4.1.1 Devis

L'étude COLDENT est une étude cas-témoins populationnelle conçue pour vérifier l'association entre la santé buccodentaire compromise et le CCR sporadique. L'étude s'est déroulée de 2013 à 2019, dans la région de l'île de Montréal et de la ville de Laval.

4.1.2 Participants

Les participants à l'étude forment un groupe de cas de CCR et un groupe de témoins. Les critères d'éligibilité de l'étude sont : 1) Statut de citoyen canadien; 2) Lieu de résidence sur l'île de Montréal ou Laval; 3) Âge entre 40 et 80 ans; 4) Langue parlée : français ou anglais; et 3) Absence d'antécédent de cancer; de maladie inflammatoire chronique des intestins (maladie de Crohn ou colite ulcéreuse), ou de maladie héréditaire des intestins (Syndrome de Lynch, CCR héréditaire sans polypose, polypose adénomateuse familiale et d'autres polyposes associées). De plus, les témoins ne doivent pas présenter de diagnostic de CCR au moment de leur participation et les cas doivent être diagnostiqués avec un CCR sporadique dans les 6 derniers mois précédant leur identification.

Les cas sont identifiés dans 5 hôpitaux de Montréal et Laval qui prodiguent des soins pour CCR. Les cas potentiellement éligibles sont approchés par le personnel hospitalier afin de demander leur autorisation d'être contactés par le personnel de recherche. Pour ceux qui acceptent, un membre de l'équipe de recherche les contactent, leur fournit l'information sur l'étude, vérifie leur éligibilité et demande leur consentement à participer.

Les témoins sont appariés aux cas dans des catégories d'âge de 10 ans et de sexe, pour un ratio de cas-témoins $\approx 1:1$. Ils sont sélectionnés par échantillonnage aléatoire dans la population générale, grâce à l'usage des listes électorales du Québec qui concernent des citoyens âgés de 40 à 80 ans et qui résident l'île de Montréal et Laval. L'échantillonnage aléatoire est fait par randomisation de ces listes dans des catégories d'âge (de 10 ans) et de sexe. Les témoins sont recrutés au fur et à mesure du recrutement des cas, selon le mode d'échantillonnage de densité d'incidence (connu en anglais sous les termes : *Incidence density sampling*, ou *Risk-set sampling*, ou *longitudinal sampling*). Ce dernier permet de tenir compte de la variable du temps et de la population dynamique d'où proviennent les cas incidents²¹⁹. Les témoins sont ainsi sélectionnés parmi la population à risque de CCR durant la période d'identification des cas incidents de CCR.

Les témoins identifiés, sur les listes électorales, reçoivent une lettre introduisant l'étude et les informant qu'ils recevraient un appel téléphonique de la part d'un membre de l'équipe de recherche dans la semaine suivante. Plusieurs appels sont émis avant de classer les personnes en tant que non-joignables. Ceux qui sont joignables ont reçu l'information sur l'étude, leur éligibilité et sont invités à participer.

Tous les sujets, cas ou témoins, ayant accepté de participer à l'étude, sont invités à signer un formulaire d'information et de consentement. Ce dernier a été approuvé par les comités d'éthique des établissements participants.

4.1.3 Collecte des données

Les participants sont invités à une entrevue d'une durée de 1h30 pour remplir le questionnaire de l'étude. Le questionnaire est préférentiellement administré par un intervieweur. Il est toutefois présenté avec des instructions et des réponses à choix multiples pour permettre son auto-administration si nécessaire. Ainsi, une entrevue en personne est menée au local de recherche, ou à un lieu de convenance du participant (par exemple à domicile ou à l'hôpital). Pour ceux qui ne pouvaient pas se présenter à la rencontre, une entrevue téléphonique est proposée, ou en dernier lieu l'auto-administration du questionnaire, après avoir reçu plus d'instructions pour le faire. Une compensation des frais de déplacement est octroyée aux participants afin de les encourager à participer à l'étude.

Le questionnaire de l'étude est une combinaison des sept questionnaires suivants, dont plusieurs sont des questionnaires validés ou utilisés précédemment par l'équipe de recherche : 1)

Questionnaire socio-démographique et histoire médicale; 2) Questionnaire sur l'historique du tabagisme; 3) Questionnaire sur la taille et le poids; 4) Questionnaire sur les médicaments anti-inflammatoires non-stéroïdiens; 5) Questionnaire sur la santé buccodentaire; 6) Questionnaire sur la diète et 7) Questionnaire sur l'activité physique totale de la vie (*Lifetime Total Physical Activity Questionnaire* (LTPAQ))²²⁰⁻²²³ (le questionnaire de l'étude COLDENT est joint en Annexe 1). Le but de ces questionnaires est de collecter des données sur l'historique de l'exposition à la MP, ainsi que sur l'exposition cumulée, à travers la vie de la personne à plusieurs facteurs de risque établis du CCR. De plus, nous avons collecté des données sur l'historique du tabagisme, y compris l'âge de début, l'âge de fin, les années d'arrêt pendant la période d'utilisation et l'intensité (nombre de cigarettes fumées par jour, par semaine ou par mois). Les participants sont aussi encouragés à déclarer toutes les activités professionnelles, domestiques et récréatives qu'ils avaient pratiquées au cours de leur vie. Le seuil minimum pour qu'une activité soit déclarée dans le LTPAQ est de 124 heures/an pour les activités professionnelles, de 112 heures/an pour les ménages et de 32 semaines/an pour les activités récréatives²²⁴. Chaque activité est décrite en termes de durée (âge de début et âge de fin), fréquence (nombre d'heures par semaine, semaines par mois et mois par année de pratique d'activité) et intensité : légère, modérée et vigoureuse. L'intensité faible n'est utilisée que pour les activités professionnelles pour décrire celles qui nécessitent de s'asseoir avec une marche minimale.

Des données sont aussi recueillies sur la consommation de différents types de viandes rouges, de viandes transformées et de différentes boissons alcoolisées depuis l'âge adulte. Plus précisément, la consommation des viandes rouges inclut celle des hamburgers, du bœuf, porc et agneau. La consommation des viandes transformées inclut celles du bacon, de hot-dogs et d'autres types de viandes transformées comme le salami, le bologne et les saucisses. Quant à la consommation des boissons alcoolisées, elle inclut celle de la bière, du vin et la liqueur. Le questionnaire sur la diète est administré pour quatre tranches d'âge : 20 à 34 ans, 35 à 49 ans, 50 à 64 ans et 65 à 80 ans. Les intervieweurs se sont appuyés sur la technique de la grille de durée de vie pour améliorer la précision du rappel²²⁵.

Les questions sur l'état de santé parodontale portent sur 3 catégories d'information: les antécédents de diagnostic ou de traitement de la MP; les symptômes ou complications de la MP (saignement gingival, mobilité dentaire spontanée, ou perte des dents due à la MP ou à la mobilité spontanée) ;

et la perception individuelle de son état de santé parodontale. Pour chaque catégorie d'information, les questions avec les indicateurs de performance diagnostique les plus élevés sont sélectionnées. Cette sélection est faite sur la base des résultats d'une revue systématique antérieure par Blicher et al.¹⁹³ qui porte sur la validité des mesures parodontales auto-rapportées et qui ont été confirmés par les résultats d'une méta-analyse plus récente, par Abbood et al.²⁰³.

Enfin, pour les personnes sollicitées à participer à l'étude et qui ont refusé de le faire, un court questionnaire renseignant sur le statut du tabagisme, le niveau d'éducation et le statut socioéconomique est brièvement administré aux personnes qui ont accepté d'y répondre.

Aussi, les données sont saisies directement sur une base de données informatique, Filemaker Pro, afin de réduire les erreurs commises lors d'une saisie au préalable des données sur un questionnaire en papier. Les données sont ensuite exportées en format Excel, puis sur fichiers SPSS où ont eu lieu le nettoyage, le codage et l'analyse des données.

4.1.4 Variable d'historique positif de maladie parodontale

La MP est définie sur la base de huit questions validées qui portent sur trois catégories d'informations sur l'état parodontal du sujet : les antécédents de diagnostic ou de traitement de la MP; les symptômes ou complications de la MP ; et la perception individuelle de son état de santé parodontale^{193, 203}. Les questions sont les suivantes :

Antécédents de diagnostic ou de traitement professionnel de MP:

1. *Est-ce qu'un dentiste ou un hygiéniste dentaire vous a déjà dit que vous aviez une maladie des gencives?* *Oui* *Non*
2. *Est-ce qu'un dentiste ou un hygiéniste dentaire vous a déjà dit que vous aviez une « poche parodontale profonde »?* *Oui* *Non*
3. *Vous a-t-on dit que vous aviez besoin d'un traitement parodontal ou gingival?*
 Oui *Non*
4. *Avez-vous déjà eu une chirurgie gingivale ou parodontale?*
 Curetage parodontal ? *Oui* *Non*

Symptômes ou complications de MP:

5. *Vos gencives saignent-elles habituellement?* *Oui* *Non*
6. *Est-ce que certaines de vos dents sont mobiles ou instables ?* *Oui* *Non*

7. Si vous avez des dents qui manquent, veuillez alors choisir l'une des raisons suivantes de leur absence : (vous pouvez cocher plus d'une case).

Parmi les causes de perte de dents proposées dans le questionnaire, seules les deux causes suivantes sont considérées dans la définition de cas de MP :

Maladie parodontale Oui Non

La ou les dents étaient très mobiles Oui Non

Perception individuelle de son état de santé parodontale:

8. Avez-vous eu une maladie parodontale avec perte d'os? Oui Non

Les sujets sont classés comme exposés à la MP (ou ayant un antécédent positif de MP) s'ils signalent un diagnostic ou un traitement professionnel antérieur de MP, et/ou s'ils rapportent des saignements gingivaux fréquents, ou une perte de dents causée par la mobilité dentaire ou la MP, et/ou s'ils sont eux-mêmes conscients d'avoir une MP avec perte d'os (question 8). Le statut parodontal des participants qui ont répondu 'Oui' uniquement à la seule question 6 sur la mobilité est considéré comme inconnu, vu que la mobilité dentaire pourrait également être causée par un traumatisme occlusal en présence d'un parodonte sain²²⁶. Les participants sont considérés comme « non exposés » à la MP si aucune des réponses aux 8 questions n'est positive.

4.1.5 Covariables d'ajustement

Les covariables considérées pour l'ajustement de la mesure d'association entre la MP et le CCR comprennent l'âge, le sexe, le niveau de scolarité, le revenu personnel annuel, l'IMC, un antécédent de diagnostic de diabète, un antécédent de CCR chez un parent de premier degré, un antécédent de consommation régulière d'anti-inflammatoires non stéroïdiens, la mesure cumulée du tabagisme au cours de la vie en paquets-années (*packs-years*), les mesures moyennes de la consommation cumulée depuis l'âge adulte de viandes rouges, de viandes transformées et d'alcool, ainsi que le score moyen d'activité physique cumulée au cours de la vie.

4.1.5.1 Choix des covariables et analyse de biais de collision par graphique orienté acyclique

Selon Cole et al.²²⁷, une forme de biais de sélection, appelé « biais de collision » peut survenir lorsqu'on « conditionne » pour une variable qui est un effet commun de l'exposition et de la maladie. Sachant que le terme de conditionnement (*conditioning*) réfère à la restriction par le devis ou l'analyse, à la stratification, ou l'ajustement en régression²²⁷.

Le biais de collision provient de l'utilisation des graphiques orientés acycliques (DAG : abréviation plus commune du terme en anglais *Directed acyclic graph*), qui sont des représentations graphiques des relations causales entre l'exposition, la maladie et toutes les autres covariables, mesurées et non mesurées, qui leur sont liées. Dans la terminologie des DAGs, une covariable (ou nœud, du terme anglais *node*) est appelée « collisionneur » (*Collider*) quand deux flèches dirigées entrent en collision au niveau de la covariable²²⁸, tel que nous le montre le schéma suivant extrait de l'article de Hernán et al.²²⁹ : le conditionnement pour la variable C (qui est un effet commun de l'exposition E et la maladie D) ou M (un effet de l'effet commun C) serait alors source de biais de sélection (Figure 1).

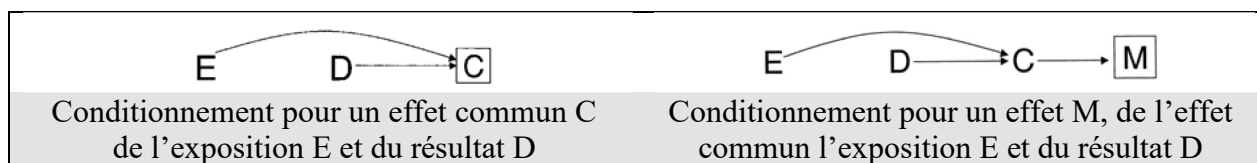


Figure 1. – Présentation graphique d'un biais de collision par Hernán et al. (2004)

Légende: Tel que schématisé par Hernan et al. (2004), le conditionnement pour un effet commun, ou un effet de l'effet commun de l'exposition et de la maladie peut générer un biais de sélection. Ce biais est aussi appelé 'biais de collision' dans la nomenclature des DAGs. L'image est extraite de : *Hernán MA, Hernández-Díaz S, Robins JM. A structural approach to selection bias. Epidemiology 2004;15(5):615-25.*

Dans le but de vérifier qu'aucune des covariables incluses dans notre modèle de régression multiple ne crée pas un biais de collision, nous avons élaboré un DAG pour notre modèle d'association que nous présentons dans la figure 2. Le DAG peut être aussi utilisé à priori pour aider dans le choix des covariables à mesurer et à considérer lors de l'analyse du rôle d'une variable (exposition principale) comme cause d'une autre variable résultat (*outcome* ou maladie).

Nous avons alors généré notre DAG, basé sur les connaissances scientifiques qui encadrent les relations entre la MP, le CCR et toutes les covariables mesurées et non mesurées. Le DAG est créé en utilisant le logiciel en ligne DAGitty V 3.0 (gitty.net/dags.html). En se basant sur les informations qu'on y apporte (variables et flèches pour le sens des relations), l'instrument utilise un code de couleur pour mettre en évidence le rôle des covariables et nous renseigne sur leur rôle dans la création ou non de biais systémique:

1) en rose : les variables confondantes. Selon la nomenclature des DAGs, une variable est considérée comme confondante si elle répond aux conditions suivantes: i) être une cause de la

maladie chez les non exposés (facteur de risque de la maladie); ii) être corrélée positivement ou négativement avec l'exposition dans la population à l'étude (le facteur a une distribution différente chez les exposés et les non exposés); ii) ne pas être une variable intermédiaire sur le chemin causal entre l'exposition et la maladie. Ce dernier critère a été dernièrement remplacé par le critère suivant : ne pas être affectée par l'exposition^{230, 231}. Ces variables doivent être contrôlées pour une mesure d'association non biaisée;

2) en gris foncé : les variables de collision. Ce sont les variables qui subissent les effets de l'exposition et/ou de la maladie et donc nécessitent une attention particulière, car le conditionnement pour ces variables crée un biais de sélection tel qu'expliqué auparavant;

3) en bleu : les variables intermédiaires sur le chemin causal entre l'exposition et la maladie, ou encore les facteurs de risque de l'exposition principale ou de la maladie, mais pas des deux. Le contrôle pour les facteurs de risque de la maladie, qui ne sont pas théoriquement liés à l'exposition, est toutefois recommandé pour contrôler les facteurs de confusion liée au hasard et améliorer la précision de la mesure de l'effet de l'exposition sur la maladie²³².

4) en gris clair : Les covariables non mesurées.

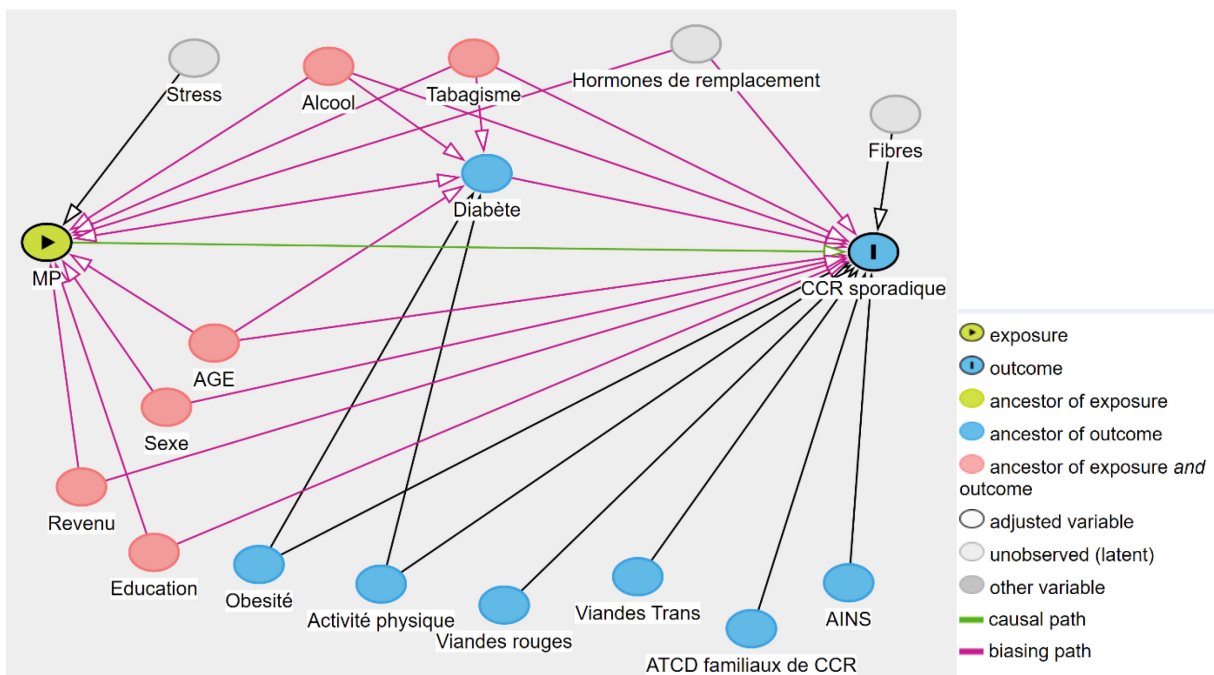


Figure 2. – Graphique orienté acyclique de l'association entre la maladie parodontale et le cancer colorectal (À droite, la légende de DAGitty V 3.0)

D'après le graphique présenté ci-dessus :

- L'ensemble des covariables que nous incluons dans notre modèle de régression multiple permet de : i) réduire le biais de confusion systémique en contrôlant pour les facteurs de risque communs à la MP et au CCR (âge, sexe, éducation, revenu, diabète, obésité, activité physique, tabagisme et consommation d'alcool); et ii) réduire le biais de confusion dû au hasard et d'améliorer la précision de la mesure d'association entre la MP et le CCR, en contrôlant pour les facteurs de risque du CCR seulement (antécédents familiaux de CCR, consommation de viandes rouges et transformées et prise régulière d'anti-inflammatoires non stéroïdiens)²³².

- Aucune des covariables du modèle n'est un collisionneur sur la trajectoire causale entre la MP et le CCR, puisqu'aucune covariable n'est simultanément affectée, directement ou indirectement, par la MP et le CCR.

- Notre modèle ajuste simultanément pour une covariable (le diabète) et pour des variables qui l'affectent (l'âge, l'obésité, la consommation d'alcool et le tabagisme). Ce que, selon la théorie des DAGs, n'expose à aucun biais de collision²³³.

4.1.5.2 Codage ou calcul des covariables

Nous présentons ci-dessous le codage des covariables simples et les procédures de calcul détaillé pour les covariables complexes :

1. **Âge:** Variable continue (en années)

2. **Sexe:** Variable dichotomique (0 = Femme, 1 = Homme)

3. **Niveau de scolarité atteint:** Les participants avaient plusieurs choix de réponses qui correspondent à tous les niveaux d'étude primaires, secondaires, collégiales et universitaires. Les choix de réponses sont catégorisés en variable catégorielle à trois modalités : 1 = niveau d'école primaire; 2 = niveau d'école secondaire; et 3 = niveau collégial ou plus.

4. Revenu personnel annuel :

Les choix de réponses à la question sur le revenu personnel sont en catégories d'intervalles de largeur égale de 10 000\$ et à valeurs croissantes; sauf pour le dernier intervalle qui est à limite supérieure ouverte. Les choix de réponse étaient les suivants : < 10 000 \$/an; 10 000 \$ à 19 999 \$/an; 20 000\$ à 29 999 \$/an; 30 000 \$ à 39 999 \$/an; 40 000 \$ à 49 999 \$/an; 50 000 \$ à 59 999 \$ /an ; 60 000 \$ à 69 999 \$ /an; ≥ 70 000 \$ /an.

Afin d'analyser la variable comme variable continue, exprimée en dollars canadiens par an, nous avons donné à chaque intervalle fermé la valeur du milieu (ex. 20 000 \$ à 29 999 \$ transformée en 25 000\$). Quant à la dernière catégorie ouverte ($\geq 70\ 000$ \$ /an) et qui comptait pour 20 % des données, nous lui avons attribué la valeur de 85 000 \$, sur la base du revenu moyen des québécois âgés de 40 ans et plus et qui ont un revenu de 70 000 \$ et plus. En effet, d'après les données disponibles de Revenu Québec (<https://www.revenuquebec.ca/fr/salle-de-presse/statistiques/le-revenu-total-des-particuliers/>), les individus 40 ans et plus, avec un revenu de $\geq 70\ 000$ \$ /an représentent 19,6% des individus tous revenus confondus. Au sein de cette catégorie, la répartition des individus par catégories de revenu est de 55% avec un revenu entre 70 000 \$ et 99 999 \$/an; 43 % entre avec un revenu de 100 000 \$ à 499 999 \$/an ; et 1,6 % avec un revenu dépassant les 500 000 \$/an. Une analyse de sensibilité est faite lors de l'analyse de régression en remplaçant cette valeur attribuée de 85 000 \$ par la valeur 100 000 \$, puis 120 000 \$. Les résultats de l'analyse de sensibilité sont présentés dans le chapitre de résultats.

5. IMC : variable continue en kg/m^2 . Afin de calculer l'IMC, les valeurs du poids qui étaient initialement collectées en livre étaient converties en kilogrammes selon la formule (Poids en kg = Poids en livre x 0,4536) et les mesures de taille fournies en pieds et pouce étaient converties en m selon la formule $\text{Taille en m} = \frac{(\text{Taille en pieds} \times 30,47) + (\text{Taille en pouces} \times 2,54)}{100}$

6. **Antécédent de diagnostic de diabète:**

Une variable dichotomique (0,1), qui prend la valeur 1 si le participant a confirmé avoir déjà été diagnostiqué avec un diabète, ou la valeur 0 sinon.

7. **Antécédent de CCR chez les parents au premier degré :**

Une variable dichotomique (0,1) qui prend la valeur 1 si le participant a confirmé un antécédent de diagnostic de CCR chez les parents, ou frères ou sœurs, ou la valeur 0 sinon.

8. **Antécédent de consommation régulière d'anti-inflammatoires non stéroïdiens:**

Une variable dichotomique (0,1) qui prend la valeur 1 si le participant a confirmé un antécédent de consommation régulière d'anti-inflammatoires non stéroïdiens, ou la valeur 0 sinon.

Cette variable est définie comme la consommation d'au moins un comprimé par mois, pendant six mois consécutifs, d'anti-inflammatoires non stéroïdiens. Par oubli, l'aspirine n'était pas incluse au début de l'étude dans le questionnaire sur les anti-inflammatoires non stéroïdiens, elle n'a été rajoutée que plusieurs mois après. Ainsi l'information pour l'aspirine était manquante pour plus de 100 participants. Pour cette raison, nous avons défini deux covariables distinctes : i) antécédent de

consommation régulière d'aspirine; et ii) antécédent de consommation régulière d'anti-inflammatoires non stéroïdiens autres que l'aspirine.

9. La mesure cumulée du tabagisme au cours de la vie :

Afin de tenir compte de la durée et de l'intensité du tabagisme, la variable d'exposition au tabagisme est exprimée en paquets-années, sachant que la formule de calcul des paquets-années est :

$$\frac{\text{Nombre de cigarettes fumées par jour}}{20} \times \text{nombre d'années où la personne a fumé}$$

Les données collectées renseignaient sur l'âge du début de tabagisme, l'âge de fin du tabagisme, les périodes d'interruption intermédiaire de tabagisme (âge début et âge de fin de chaque période) et la fréquence du tabagisme. Alors le calcul des paquets-années s'est fait suivant les étapes suivantes :

- Calculer le nombre d'années entre l'âge de fin du tabagisme (soit âge précisé, soit âge du participant s'il a répondu qu'il fume encore au moment de répondre au questionnaire) et l'âge de début du tabagisme (A)
- Calculer le nombre total des années d'interruption intermédiaires (B)
- Calculer le nombre total d'années où la personne a fumé : $C = A - B$
- Convertir la fréquence de tabagisme qui est fournie en semaine ou en mois vers fréquence par jour (D)
- Calculer le nombre de paquets-années = $(D/20) \times C$

10. Les mesures moyennes de la consommation cumulée, durant l'âge adulte, de viandes rouges, de viandes transformées et d'alcool: Les trois variables sont continues et exprimées en nombre de portions hebdomadaires pour les viandes et en nombre de boissons quotidiennes pour les boissons alcooliques.

Pour répondre au questionnaire de la diète, les participants devaient choisir, pour chaque aliment proposé, la fréquence de consommation parmi les 10 choix de réponse suivants : 1/jour ; 2-3 /jour; 4-6/jour; plus de 6/jour; 1 /semaine; 2-4/semaine; 5-6/semaine; 1-3/mois; presque jamais et jamais. (Voir questionnaire en Annexe 1)

En conséquence, la première étape du calcul des variables de consommation consistait à convertir les valeurs des données en une seule fréquence, par mois. Ensuite, il était plus simple d'obtenir des

consommations hebdomadaires et quotidiennes en divisant la fréquence mensuelle par 4,34 et par 30,47 respectivement. Ainsi, pour les fréquences en type d'intervalle, nous les avons remplacées par la valeur du milieu (ex: les fréquences de 5-6 et de 2-4/semaine sont transformées en 5,5 et 3/semaine respectivement). La fréquence de plus de 6/jour est transformée en 6 fois par jour et les fréquences de jamais ou presque jamais en 0.

Pour la consommation des boissons alcoolisées:

Notre questionnaire renseigne sur 3 fréquences de consommation : 1) Bière : une bouteille de 355 ml ou une canette ; 2) Vin : un verre de 180 ml; 3) Liqueur : un verre de 50 ml.

D'après l'indexation de la quantité d'alcool par boisson alcoolisée, fournie par le Centre international de recherche sur le cancer-OMS (lien : <http://cancer-code-europe.iarc.fr/index.php/fr/12-facons/alcool/1224-quelle-quantite-represente-un-verre-standard>), 10 à 12 grammes d'alcool pur sont contenus dans 280 à 330 ml de bière, 150 à 180 ml de champagne, 100 à 120 ml de vin rouge, 60 à 80 ml de liqueur , et 30 à 40 ml de whisky ou de spiritueux avec un degré d'alcool élevé.

Les 3 boissons alcooliques tel que présentées dans notre questionnaire (mesure en ml de chaque unité de boisson) sont ainsi considérées équivalentes en termes de teneur en alcool. De cette manière, il a été possible d'additionner le nombre de verres (ou canettes) de bière avec ceux du vin et ceux de la liqueur que la personne a consommés pour obtenir un nombre total de boissons alcooliques consommées, considérant qu'une unité de boisson alcoolisée contient ≈ 12 g d'alcool.

Pour la consommation des viandes rouges et des viandes transformées:

Trois questions dans le questionnaire portaient sur la consommation des viandes rouges : 1) Hamburger (1 unité); 2) Bœuf, porc ou agneau en sandwich ou plat mélangé (ragoût, lasagne, etc.) (180-240 g); 3) Bœuf, porc ou agneau comme plat principal (steak, rôti, jambon, etc.) (180-240 g). Un hamburger en général contient aux alentours de 150 g de viande rouge. Nous avons alors calculé la somme de consommation des 3 différents choix exprimés en portion équivalente à $\approx 180-240$ g de viande rouge.

Pour les viandes transformées, trois choix alimentaires sont proposés dans le questionnaire en vue de calculer la consommation totale des viandes transformées: 1) Hot dog (1 portion = 1 unité ≈ 55 g) ; 2) Bacon (1 portion = 2 tranches ≈ 55 g); 3) Charcuterie (1 portion = 1 tranche de saucisse, salami, bologne, etc. sachant que 2 tranches de bologne ≈ 55 g). Ainsi, le total des viandes

transformées consommées par le participant en portion de 55g, équivalente à un hot dog, ou deux tranches de bacon ou deux tranches de charcuterie est calculée par la somme : consommation de hot dog + consommation de bacon+ (consommation de charcuterie/2).

Les fréquences de consommations (hebdomadaires pour les viandes et quotidiennes pour l'alcool) sont calculées pour chaque période d'âge valide du participant (20-34, 35-49, 50-64, 65-80 ans). La moyenne de ces consommations est ensuite calculée pour donner la variable finale de consommation moyenne à vie. Le terme à vie ici réfère à la vie depuis l'âge adulte (20 ans et plus).

11. Le score moyen d'activité physique cumulée au cours de la vie: Une variable continue exprimée en équivalents métaboliques par heure/semaine/an.

Le calcul de cette variable a été laborieux vu la complexité de la présentation des données brutes. Dans chacune des trois sections du questionnaire LTPAQ (activités d'emplois, activités ménagères et activités sportives), chaque participant avait plusieurs données (lignes) dont chacune correspond à l'activité décrite. Pour chaque activité, nous avons les données sur l'âge de début et l'âge de fin, le nombre d'heures ou de minutes pour chaque pratique, le nombre de sem/mois et le nombre de mois/an de pratique de l'activité. Nous décrivons alors les étapes de calcul qui sont les mêmes pour les trois sections du questionnaire:

- ✓ D'abord calculer le nombre d'heures pour chaque pratique d'une activité en convertissant les données initiales (heures, minutes, ou combinaison) en une seule unité (heure). **(A)**
- ✓ Calculer le nombre total d'heures de pratique d'une activité sportive par année : $A \times (\text{nombre de jours/semaine de pratique}) \times (\text{nombre de semaines/mois de pratique}) \times (\text{nombre de mois/an de pratique})$. **(B)** .
- ✓ Exclure les activités dont B est inférieure à la limite minimale selon le questionnaire LTPAQ (minimum est de 124 heures/an pour un emploi, 112 heures/an pour les activités ménagères et 32 heures/an par activité sportive).
- ✓ Calculer le nombre d'année de pratique de l'activité (âge de début-âge de fin) **(C)**.
- ✓ Attribuer un score d'équivalent métabolique MET (abréviation plus utilisée et qui provient du terme anglais *metabolic-equivalent of task*) à l'activité selon son intensité. Cette dernière prend initialement 4 valeurs : 1 = Faible, pour les emplois seulement; 2 = Légère; 3 = Modérée ; et 4 = Vigoureuse. Le score MET prend les valeurs 1,5 ; 2,5 ; 4 ; et 8 pour les intensités 1; 2; 3 et 4 respectivement.
- ✓ Calculer le score cumulé à vie du MET heures-années pour chaque activité **(D)** :

$D = \text{score MET} \times C \times B$

✓ Agréger (en commandant la somme) les valeurs de D par identifiant (ID), pour obtenir le total du score MET à vie de toutes les activités pratiquées durant la vie dans la catégorie d'activités en question (ménage, emploi et sports). (E_{emplois} , $E_{\text{ménage}}$, E_{sports})

✓ Agréger (en commandant la somme) les données E1, E2 et E3 par ID pour obtenir le score total MET à vie de **toutes** les activités pratiquées durant la vie (**E**)

✓ Calculer la variable finale incluse dans le modèle de régression multiple: le score moyen à vie d'activité physique totale, en MET heure/semaine/an (*Lifetime average MET hour/week/year*) selon la formule: $\frac{E}{52 \text{ semaines} \times \text{âge en années}}$. Le calcul est aussi effectué pour chaque catégorie d'activité physique en remplaçant E dans la formule par E_{emplois} , $E_{\text{ménage}}$ et E_{sports} .

4.1.6 Analyses statistiques

4.1.6.1 Analyses descriptives

Des analyses descriptives des données sont faites pour décrire les variables socio-démographiques, l'exposition principale et les facteurs de confusion potentiels, chez les deux groupes de cas et témoins. Elles sont présentées en pourcentages pour les variables catégorielles et en moyennes (\pm écart type) ou médianes et intervalles interquartiles pour les variables continues, selon que la distribution de ces variables serait normale ou pas.

Des statistiques descriptives complémentaires ont aussi été menées pour mesurer la distribution des cas et témoins concernant les aspects individuels mesurés par les questions sur l'état de santé parodontale (antécédent de diagnostic et traitement professionnels; manifestations et complications cliniques; et auto-conscience de son état de santé parodontale).

Aussi, vu qu'on investigate rétrospectivement l'exposition à la MP, on voulait explorer la temporalité de cette exposition par rapport à l'âge des participants, qui est aussi l'âge de diagnostic du CCR chez les cas. Dans ce sens, on a mené d'autres analyses descriptives sur la distribution des cas et témoins par âge de début d'exposition à la MP, chez les participants classés comme exposés à la MP. D'ailleurs, dans le questionnaire sur l'état de santé parodontale, à chaque fois qu'un participant répondait 'oui' à l'une des questions, il est invité à situer l'âge de début de l'évènement en choisissant parmi les catégories d'âges suivantes: 1 = 20-34 ans; 2 = 35-49 ans; 3 = 50-64 ans ou 4 = 65 ans et plus.

4.1.6.2 Analyses d'association entre la maladie parodontale et le cancer colorectal

Nous avons adapté des modèles de régression logistique inconditionnelle multiple pour estimer la mesure d'association entre la MP et le CCR. Vu notre mode de sélection de témoins, par échantillonnage de densité d'incidence, l'estimation de la mesure d'association est exprimée par le rapport de taux d'incidence, connu également comme 'rapport des taux' (du terme en anglais : *Rate Ratio*, ou *Incidence Rate Ratio*)²³⁴⁻²³⁷.

Plus précisément, dans les modèles de régression multiple, le rapport des taux est ajusté pour les variables d'appariement (âge et sexe) et pour tous les autres facteurs de confusion potentiels, à savoir, le niveau d'éducation, le revenu personnel annuel, l'IMC, les antécédents de diagnostic de diabète, de CCR chez les parents de premier degré, et d'utilisation régulière d'aspirine et des autres anti-inflammatoires non stéroïdiens, la mesure du tabagisme au cours de la vie, les mesures de la consommation de viandes rouges et de viandes transformées et de boissons alcoolisées et le score d'activité physique totale de la vie.

Au préalable de l'analyse de régression, la linéarité dans le logit est évaluée pour toutes les variables indépendantes continues à l'aide du test de Box-Tidwell, qui consiste à ajouter simultanément les termes d'interaction de chaque variable continue et son logarithme népérien (X_i multiplié par $\ln(X_i)$) au modèle de régression multivariable²³⁸. Le test a révélé qu'aucun des termes d'interaction impliquant les covariables continues n'était statistiquement significatif au niveau alpha de 0,05.

Les pourcentages de données manquantes pour chaque variable étaient inférieurs à 10 %, à l'exception de l'utilisation régulière d'aspirine (23 %) qui était absente du questionnaire sur les anti-inflammatoires non stéroïdiens durant la première année de l'étude (voir tableau 5 de l'article 1). Les données manquantes sont remplacées par imputation multiple à l'aide de la méthode *Expectation-Maximization with Bootstrapping algorithm*²³⁹, qui génère 10 ensembles de données complets pour produire des estimations de rapports des taux finaux regroupés ainsi que leurs IC à 95 % correspondants. Pour améliorer les performances de l'algorithme d'imputation, des variables auxiliaires sont incluses en plus de toutes les variables incluses dans le modèle d'association multivarié. Les variables continues avec une distribution asymétrique, ou des valeurs extrêmes, comme pour la variable du tabagisme, des consommations de viandes rouges, et transformées et des boissons alcoolisées, sont transformées en log ($\text{Log}_{10}(X_i)$ ou $\text{Log}_{10}(X_i+1)$) avant imputation.

Les valeurs imputées des variables continues sont limitées aux valeurs minimales et maximales observées. L'imputation est effectuée avec à l'aide d'un biostatisticien, en respectant l'échelle de chaque variable (c'est-à-dire continue, ordinale ou nominale) avec le package Amelia II dans R, version 3.5.3²⁴⁰.

4.1.6.3 Analyses de sensibilité

Des analyses de sensibilité sont faites pour vérifier si certaines décisions prises lors du codage des variables ou de l'imputation des données manquantes, affectent ou non les résultats de l'analyse de régression multiple (Rapport des taux et IC à 95 %). On a alors effectué:

- ✓ Une analyse de régression multiple avec le modèle complet, n'incluant que les participants avec des données complètes (sans imputation de données manquantes)
- ✓ Une analyse de régression multiple avec le modèle complet, mais sans la variable d'antécédent de consommation régulière d'aspirine du modèle d'association, vu que cette variable comptait le plus haut pourcentage de données manquantes (11 % de cas et 38 % de témoins)
- ✓ Une analyse de régression multiple avec le modèle complet, mais en recodant pour la plus grande valeur de la variable du revenu personnel ($\geq 70\ 000$ \$) par les valeurs 100 000, 120 000 et 180 000, au lieu des 85 000 choisie initialement (expliquée dans la section précédente). On précise que 18 % des cas et 19 % des témoins étaient dans cette catégorie de réponse.

4.1.6.4 Analyse de biais de sélection par participation différentielle

En épidémiologie, le terme de biais de sélection peut référer à plusieurs types de biais selon le cadre de l'étude, mais qui ont tous la même conséquence : la relation observée entre l'exposition et la maladie est différente entre les individus retenus pour l'étude et les individus aptes à y participer mais qui n'ont pas été retenues^{229, 241}.

Les études ayant un faible taux de participation, comme c'est le cas des études cas-témoins à base populationnelle, sont plus vulnérables à un biais de sélection, parce qu'elles enregistrent souvent un plus faible taux de coopération chez les témoins en particulier²⁴². Le biais de sélection est alors appelé « biais de participation différentielle »²⁴³, quand la probabilité de participation diffère entre les strates définies par une ou plusieurs covariables, mesurées ou non mesurées²⁴³.

Dans le but d'analyser un éventuel biais de participation différentielle, on a prévu dès la conception de l'étude de collecter des données sur certains facteurs pertinents auprès des personnes qui refuseraient de participer. Ces facteurs sont choisis parmi ceux connus pour affecter la participation

aux études cas-témoins sur le cancer, puisqu'il fallait aussi anticiper un refus de réponse à ces questions de la part des personnes qui refuseraient de participer à l'étude²⁴³.

Dans cette perspective, un court questionnaire renseignant sur le statut du tabagisme, le niveau d'éducation et le revenu annuel est administré aux personnes qui ont accepté d'y répondre, parmi les personnes ayant refusé de participer à l'étude. Les données sur l'âge et le sexe de ces sujets étaient préalablement disponibles à travers les sources de sélection (listes électorales pour les témoins ou dossier médical pour les cas). Nous avons alors vérifié si les taux de participation étaient différents dans les diverses strates d'âge, de sexe, de niveau d'éducation atteint, de revenu personnel annuel et de statut tabagique, chez les deux groupes de cas et de témoins séparément.

4.1.7 Contribution de l'étudiante au projet COLDENT

Le protocole de recherche du projet COLDENT, étude cas-témoins populationnelle sur l'association entre la santé buccodentaire compromise et le CCR sporadique, a été élaboré par les chercheurs principaux, Dre Elham Emami et Dr Igor Karp. J'ai rejoint l'équipe de recherche en 2011, en tant qu'étudiante au programme de maîtrise en sciences buccodentaires de l'Université de Montréal. L'équipe se préparait alors à mener une étude de faisabilité du projet COLDENT, qui fût mon projet de recherche à la maîtrise. Dès mon arrivée, je me suis tout de suite impliquée dans la préparation et la traduction des documents utilisés dans l'étude et aidé aux demandes d'approbation éthique du projet. J'ai aussi assuré le recrutement et la collecte des données des participants à l'étude de faisabilité (n = 69), incluant des examens dentaires. Les résultats de l'étude de faisabilité de l'étude COLDENT ont appuyé les demandes de financement de l'étude principale et guidé les chercheurs principaux vers des décisions importantes dans leur planification méthodologique et opérationnelle, dont la plus importante était l'annulation des examens dentaires. Les résultats de l'étude de faisabilité ont été publiés dans mon mémoire de maîtrise et présentés dans plusieurs manifestations scientifiques^{40, 41, 244-246}.

En janvier 2013, la collecte des données de l'étude principale COLDENT est entamée, profitant d'un financement octroyé par la Société de Recherche sur le Cancer. J'y ai contribué comme personnel de recherche jusqu'à mon entrée au programme de doctorat en septembre 2016. Depuis, j'ai continué à recruter les participants et collecter les données avec l'aide d'une assistante de recherche jusqu'en mars 2019, où la collecte des données a pris fin. J'ai aussi assuré le suivi des renouvellements annuels des approbations éthiques du projet auprès de plusieurs hôpitaux

participants. Les données de l'étude étaient saisies sur une base de données informatique Filemaker Pro. Afin de procéder aux analyses des données, j'ai procédé au nettoyage des données exportées de Filemaker Pro vers Excel, puis vers SPSS, une étape qui fût longue et laborieuse.

Une fois le nettoyage des données terminé, j'ai procédé, en consultation avec les directeurs de recherche, à une définition de l'exposition à la MP fondée sur : les données de la littérature, les résultats de l'étude de faisabilité et la consultation d'experts en parodontologie. J'ai aussi procédé à la définition, le codage et le calcul des covariables d'ajustement et mené les analyses statistiques. J'ai ensuite rédigé et publié l'article de l'étude.

4.2 Étude de l'association entre la détection de la bactérie *F. nucleatum* dans le côlon et le cancer colorectal

4.2.1 Devis

Afin de vérifier l'association entre la détection de la bactérie *F. nucleatum* dans le côlon et le CCR et étant donné le nombre accumulé d'études publiées sur le sujet, nous avons mené une revue systématique avec méta-analyse d'études observationnelles ayant analysé la bactérie, *F. nucleatum*, dans les selles et/ou la muqueuse colorectale, chez des cas de CCR et des témoins exempts de lésions cancéreuses ou précancéreuses colorectales.

« *Y a-t-il a une association entre la détection de la bactérie *F. nucleatum* dans les selles ou la muqueuse colorectale et le cancer colorectal ?* » : Telle est notre question de recherche, formulée selon le cadre PECO (Population, Exposition, Comparaison, Outcome), qui guide la formulation des questions de recherche sur l'association entre les expositions et les résultats en santé²⁴⁷. Notre population est donc les humains adultes, l'exposition est la détection de la bactérie *F. nucleatum* dans les selles ou la muqueuse colorectale, la comparaison est la non-détection de *F. nucleatum* dans les selles ou la muqueuse colorectale, et le résultat (outcome) est le CCR.

Pour garantir la transparence de la recherche, le protocole de la revue systématique est enregistré sur le registre international des revues systématiques PROSPERO, le 10 juillet 2018 (numéro CRD42018095866) et publié dans la revue *Systematic Reviews*, le 10 mai 2019.

4.2.2 Recherche documentaire

Une stratégie de recherche systématique est établie avec l'aide d'une experte bibliothécaire, à la Bibliothèque de la santé de l'Université de Montréal, afin de repérer tous les articles publiés avant le 1^{er} janvier 2019. Les bases de données en santé qui ont été examinées sont : All Ovid MEDLINE, Embase, CINAHL Plus with Full Text, Web of Science Core Collection et EBM Reviews – Cochrane Database of Systematic Reviews (la stratégie finale de recherche documentaire est présentée dans le tableau 10 de l'article 3). La recherche est reconduite de nouveau en octobre 2020 pour une mise à jour. Aucune limite n'est appliquée à la stratégie de recherche documentaire, à l'exception de la langue de publication, ne retenant que les articles publiés en français et en anglais, en considérant la possibilité de traduction d'articles publiés en d'autres langues vers l'anglais si cela est possible (cas de manuscrit disponible en version Word ou PDF). La recherche électronique est complétée par une recherche manuelle dans la liste des références des revues pertinentes pour repérer les études qu'on aurait pu manquer préalablement. Afin de vérifier aussi la littérature grise, nous avons effectué une recherche par mots clés dans les bases de données TRIP et NICE Evidence.

4.2.3 Sélection des études

La liste des articles repérés est exportée vers l'outil de gestion bibliographique Endnote et vers le logiciel en ligne Rayyan (<http://rayyan.qcri.org/>). Ce dernier permet de faciliter le processus de sélection des études d'une façon indépendante entre les réviseurs et de régler les conflits à la fin de la procédure²⁴⁸. Ainsi, deux réviseurs indépendants ont procédé à une première sélection des articles sur la base de titres et résumés. Les discordances entre les réviseurs sont réglées par concertation et, si nécessaire, par consultation d'un troisième réviseur.

Les deux réviseurs ont ensuite procédé à une deuxième sélection indépendante basée sur la lecture du texte intégral, afin de vérifier l'éligibilité des études. Les études sont éligibles à la revue systématique si elles sont originales et si l'espèce *F. nucleatum* est recherchée dans des selles ou/et dans des échantillons de muqueuse colorectale, chez des cas de CCR et des témoins exempts de lésions cancéreuses et précancéreuses colorectales. Là aussi, les discordances entre les réviseurs sont réglées par discussion et, si nécessaire, par consultation d'un troisième réviseur.

4.2.4 Évaluation de la qualité des études

La qualité des études éligibles était ensuite évaluée par l'échelle/instrument d'évaluation de la qualité des études observationnelles, le *Newcastle-Ottawa Scale* (NOS). Ce dernier a été développé

par la méthode Delphi, puis testé sur des revues systématiques avant d'être de nouveau rectifié. Des variations de l'instrument existent pour s'adapter aux différents devis des études observationnelles. Le NOS pour études cas-témoins comprend huit items classés dans trois domaines: la sélection des participants (quatre items), la comparabilité entre les cas et témoins (un item) et l'exposition (trois items). Chaque item peut recevoir le maximum d'une étoile, sauf pour l'item de comparabilité qui peut recevoir deux^{249, 250} (l'instrument NOS est présenté en Annexe 2). Selon les scores cumulés dans chaque domaine du NOS, la qualité de l'étude est considérée « mauvaise », « passable » ou « bonne » selon les seuils de conversion des scores NOS définis par l'*Agency for Healthcare Research and Quality* (AHRQ) et décrits comme suit : i) bonne qualité = 3 ou 4 étoiles dans le domaine de sélection et 1 ou 2 étoiles dans le domaine de comparabilité et 2 ou 3 étoiles dans le domaine de l'exposition; ii) qualité passable = 2 étoiles dans le domaine de sélection et 1 ou 2 étoiles dans le domaine de comparabilité et 2 ou 3 étoiles dans domaine de l'exposition ; et iii) mauvaise qualité = 0 ou 1 étoile dans le domaine de sélection, ou 0 étoile dans le domaine de comparabilité, ou 0 ou 1 étoile dans le domaine de l'exposition²⁵¹⁻²⁵⁴.

Dans une revue systématique, Deeks et al.²⁴⁹ analysent les instruments d'évaluation des études incluses dans des revues systématiques. Parmi 182 instruments identifiés, seuls six étaient retenus comme les plus fiables, incluant le NOS²⁴⁹. Ce dernier est également approuvé par Cochrane Collaboration (2011) comme instrument d'évaluation de la qualité des études observationnelles²³⁴ et est considéré comme l'un des instruments les plus pratiques^{249, 255}.

4.2.5 Extraction des données

Les données des études sont extraites sur un document Excel conçu pour permettre la description des études et l'analyse des données. Les données extraites comprennent les noms des auteurs, le pays, l'année de publication, les objectifs de l'étude, le devis et la population de l'étude, la taille de l'échantillon (nombre de cas et nombre de témoins), les caractéristiques des participants à l'étude, les sources d'identification, les critères d'appariement s'il y en a, les critères d'inclusion et d'exclusion (y compris toute restriction concernant la consommation récente d'antibiotiques ou de maladie inflammatoire de l'intestin), la localisation de la tumeur (tumeurs du colon, rectale ou colorectale), le type d'échantillons prélevés (selles, biopsies de muqueuse colorectale ou les deux), la définition de l'exposition (fréquence de détection de *F. nucleatum* dans échantillons, abondance relative ou quantification relative de la charge bactérienne de *F. nucleatum* dans échantillons), la

technique utilisée pour détecter la bactérie et quantifier la charge bactérienne, et les principaux résultats.

4.2.6 Analyse des données

Nous avons procédé à 1) une analyse descriptive des données et des résultats des études retenues, en s'aidant de tableaux et de texte et 2) une analyse quantitative par méta-analyse pour estimer la mesure d'association regroupée (avec son intervalle de confiance) entre la détection de *F. nucleatum* dans le côlon et le CCR. Ainsi, seules les études qui présentaient une mesure d'association entre la détection de *F. nucleatum* dans les échantillons colorectaux et le CCR, ou au moins les fréquences nécessaires pour pouvoir calculer le RC et son IC à 95% étaient incluses dans la méta-analyse. Vu les variations entre les études, nous avons procédé dans une analyse secondaire, à une méta-analyse par sous-groupes pour vérifier l'effet de certains facteurs sur la mesure d'association estimée, à savoir la population, le type des échantillons analysés (selles ou biopsies de muqueuse), le type d'analyse microbiologique, ainsi que certaines caractéristiques liées aux participants. Le modèle à effet aléatoire (*Random effects model*) a été utilisé pour estimer les RCs combinés et leurs intervalles de confiance, en utilisant le logiciel Comprehensive Meta-analysis. L'hétérogénéité entre les études incluses dans la méta-analyse a été estimée par le calcul de l'indice d'hétérogénéité I_2 . Le biais de publication a été évalué visuellement grâce au graphique en entonnoir (*Funnel plot*) des logarithmes naturels des estimés des RCs par l'erreur type correspondante.

4.2.7 Contribution de l'étudiante à la revue systématique avec méta-analyse

A. Idrissi Janati a développé le protocole de la revue systématique, conçu la stratégie de recherche avec une bibliothécaire experte de la Bibliothèque de santé à l'Université de Montréal, procédé à toutes les étapes de la réalisation de la revue systématique et de la méta-analyse, à savoir la recherche documentaire, la sélection des études, l'extraction des données, l'évaluation de la qualité des études, enfin l'analyse des données et enfin la rédaction de l'article.

4.3 Étude de faisabilité d’investigation du *Fusobacterium nucleatum* dans la salive et la muqueuse colorectale

4.3.1. Devis

Nous avons mené une étude pilote cas-témoins en milieu hospitalier afin de vérifier la faisabilité d’une étude subséquente sur l’investigation de la bactérie *F. nucleatum*, dans les deux milieux oral et colorectal, en présence de néoplasies colorectales. L’étude s’est déroulée entre 2018 et 2019, au Centre hospitalier de l’Université de Montréal (CHUM), à Montréal, Québec, Canada

4.3.2 Participants

Les participants sont des patients qui ont eu un examen de coloscopie dans le département de gastro-entérologie du CHUM, entre février 2018 et novembre 2019. Ils forment deux groupes : un groupe de ‘cas’ de néoplasies colorectales, incluant les lésions cancéreuses et précancéreuses (adénomes avancés) colorectales et un groupe de témoins. Les participants sont identifiés parmi ceux qui devaient avoir une coloscopie pour un simple examen de dépistage du CCR, ou pour un examen diagnostique de CCR indiqué par un changement récent des habitudes intestinales, des saignements rectaux, anémie ferriprive inexplicquée ou un test immunochimique fécal positif. Les patients qui devaient avoir une coloscopie de surveillance après l’ablation antérieure d’un polype ne sont pas sollicités. Dans le groupe de cas, des patients sont également identifiés parmi ceux programmés pour une résection mucosale endoscopique. Ces patients ont reçu récemment un diagnostic positif par imagerie médicale ou coloscopie sans résection d’un ou plusieurs adénomes colorectaux avancé²⁵⁶.

Les critères d’inclusion de l’étude sont : 1) être âgé de 40 à 80 ans ; 2) résider dans la région métropolitaine de Montréal; 3) parler français ou anglais; 4) aucun diagnostic préalable de cancer ; 6) aucun antécédent de maladie intestinale héréditaire ; 7) aucun antécédent de maladie inflammatoire de l’intestin ; et 8) aucun antécédent de traitement antibiotique au cours des trois derniers mois.

Les patients présentant un adénome colorectal avancé (histologiquement confirmé), ou un CCR sont inclus dans le groupe de cas. L’adénome colorectal avancé fait référence aux adénomes à haut risque de transformation maligne, définis par un ou plusieurs des critères suivants : 3 à 10 adénomes ; dysplasie de haut grade; aspect tubulo-villeux ou vilieux; adénome de diamètre > 1 cm;

adénomes dentelés sessiles²⁵⁷. Les patients dont la coloscopie n'a pas abouti au diagnostic de CCR, ni d'adénome colorectal avancé, ni de maladie inflammatoire de l'intestin, sont inclus dans le groupe de témoins.

Les patients éligibles qui ont accepté de participer à l'étude sont invités à remplir un questionnaire de l'étude, à fournir un échantillon de salive et à donner leur consentement pour que le gastroentérologue collecte de biopsies de muqueuse colorectale lors de l'examen de coloscopie.

L'étude est approuvée par le comité d'éthique de la recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal, et tous les participants à l'étude ont signé le consentement à l'étude avant de passer leur coloscopie. L'éligibilité des participants n'est confirmée qu'après l'examen de coloscopie. Le statut de participant (cas ou contrôle) est établi par le résultat de l'analyse histologique des polypes excisés, ou des biopsies de tumeurs.

4.3.3 Collecte des données

Les données collectées incluent les données de questionnaires et les échantillons biologiques de salive et de muqueuse colorectale :

4.3.3.1 Données collectées par questionnaire

Les participants sont invités à une rencontre d'1h30 pour remplir le questionnaire de l'étude, soit à l'hôpital ou au domicile des participants. Lorsque la rencontre en personne n'est pas possible, une rencontre téléphonique est proposée, ou en dernier lieu, l'auto-administration du questionnaire, après avoir reçu des instructions pour le faire. Les participants sont indemnisés pour les frais de déplacement dans le but d'encourager leur participation.

Le questionnaire administré est celui utilisé dans l'étude COLDENT décrit dans la section précédente. Le questionnaire permet de collecter les données sur les caractéristiques socio-démographiques, l'état de santé parodontale et les facteurs de risque du CCR chez les participants.

4.3.3.2 Échantillons de muqueuse colorectale

Les échantillons de muqueuse colorectale comprennent: 1) des biopsies de tissu sain chez les cas et les témoins et 2) des biopsies du tissu tumoral chez les cas. Ainsi, des biopsies sont prélevées, par les gastroentérologues lors de l'examen de coloscopie, sur la muqueuse saine du côlon ascendant (droit) et du côlon descendant (gauche) chez les cas et les témoins et sur des polypes

fraîchement excisés (ou sur les lésions suspectes d'être malignes dont l'excision est reportée après la réception du résultat de l'analyse histopathologique) chez les cas. Toutes les biopsies sont recueillies dans une solution physiologique (NaCl 0,9 %) pour quelques minutes, puis immédiatement transférées dans des récipients stériles vides.

Pour les échantillons de lésions cancéreuses et précancéreuses chez les cas, des données sur la localisation de ces lésions, leur taille et leur type histologique sont collectées dans les rapports de coloscopie et d'analyse histologique.

4.3.3.3 Échantillons de salive

La salive non stimulée est collectée chez les participants le jour de la coloscopie, ou quelques jours plus tard au moment de l'entrevue, par l'usage d'un kit commercial avec liquide de stabilisation de l'ADN, conçu spécifiquement pour analyse de l'ADN bactérien : OMNIgene•ORAL | OM-501[®]. Les participants sont avertis de ne pas manger, boire, fumer ou mâcher de la gomme pendant les 30 minutes qui précède le prélèvement de salive.

Les échantillons de muqueuse et de salive sont immédiatement conservés à -80 °C dans le centre de recherche du CHUM, puis transférés vers le laboratoire d'analyse microbiologique.

4.3.4 Analyse microbiologique

Dans le but de détecter la bactérie *F. nucleatum* et de quantifier sa charge dans les échantillons où elle est détectée, nous avons mené une analyse qPCR, avec technologie TaqMan²⁵⁸. L'analyse effectuée par un expert, a eu lieu au Laboratoire de recherche sur le génie tissulaire et les cellules souches crâniofaciales, à l'Université McGill, à Montréal, Québec, Canada.

En bref, l'ADN génomique est isolé à partir d'échantillons de salive et de tissus du côlon à l'aide du kit QIAamp[®] DNA Mini Kit (cat. #51304, Qiagen, USA) et les procédures sont effectuées conformément aux instructions du fabricant. La teneur en ADN est quantifiée à l'aide du spectrophotomètre SmartSpec 3000 (BIO-RAD, 170-2501, USA). Les séquences d'ADN de l'amorce et de la sonde TaqMan utilisées pour détecter le gène d'ARN ribosomique 16S de *F. nucleatum* sont similaires à celles décrites par Mima et al.²⁵⁹ : Amorce directe de *F. nucleatum*, 5'-CAACCATTACTTTAACTCTACCATGTTCA-3' ; Amorce inverse de *F. nucleatum*, 5'-GTTGACTTTACAGAAGGAGATTATGTAAAATC-3'; Sonde FAM de *F. nucleatum*, 5'-GTTGACTTTACAGAAGGAGATTA-3'. Pour la muqueuse colorectale, SLCO2A1 est utilisé

comme gène de contrôle endogène (Hs01114926_m1, FisherThermo Scientific, USA). Pour la salive humaine, le gène MEFE (Ba042114926-s1, FisherThermo Scientific, USA) est utilisé comme gène de référence. Un total de 80 ng d'ADN est utilisé dans la réaction qPCR et le volume réactionnel total est de 10 ul.

L'amplification et la détection de l'ADN sont réalisées avec les systèmes de qPCR StepOnePlus (Applied Biosystems, USA), en utilisant les conditions de réaction suivantes : 10 min à 95°C, 40 cycles de 15 sec à 95°C et 1 min à 60°C. Pour le contrôle qualité, l'ADN de la souche ATCC 25586 de *F. nucleatum* est utilisé comme contrôle positif.

La positivité de détection de *F. nucleatum* est définie comme un niveau détectable d'ADN de *F. nucleatum* dans les 40 cycles de PCR. La négativité de détection de *F. nucleatum* est définie comme un niveau indétectable avec une amplification appropriée du gène de référence humain SLCO2A1.

La quantification relative du niveau de bactérie est automatiquement fournie par StepOnePlus en valeur $2^{-\Delta Cq}$, avec $\Delta Cq = \text{valeur } Cq \text{ moyenne de } F. nucleatum - \text{valeur } Cq \text{ moyenne des bactéries totales ou du gène de référence}$. La valeur Cq indique le nombre de cycles nécessaires pour détecter un signal réel à partir d'un échantillon. Plus la charge bactérienne est élevée, plus bas sera la valeur Cq , car moins de cycles seront nécessaires pour détecter un signal.

4.3.5 Variables

Les variables mesurées par le questionnaire de l'étude portent sur les caractéristiques socio-démographiques, l'exposition à la MP et aux facteurs de risque du CCR, tels que l'obésité, le diabète, les antécédents familiaux de CCR, le tabagisme, la consommation de viandes rouges, viandes transformées et d'alcool et l'activité physique. Le codage et le calcul de ces variables est décrit dans la méthodologie de l'étude COLDENT.

Deux variables sont mesurées pour investiguer le *F. nucleatum* dans la salive et le côlon:

- 1) La détection de la bactérie dans l'échantillon : variable dichotomique qui prend la valeur 1 = Oui, si la bactérie est détectée; et 0 = Non, sinon. La variable est calculée pour les échantillons de salive et de muqueuse colorectale.
- 2) L'estimation de la charge bactérienne dans l'échantillon analysé et qui est exprimée en valeur continue de $2^{-\Delta Cq}$, lorsque *F. nucleatum* est détectée dans l'échantillon. Elle est mesurée pour les échantillons de salive et de muqueuse colorectale.

4.3.6 Analyse des données

Puisqu'il s'agit d'une étude pilote, l'analyse statistique effectuée est purement exploratoire, afin d'aider les chercheurs à prendre des décisions de conception adéquates pour des études futures, y compris le calcul de taille d'échantillon.

Les caractéristiques pertinentes concernant les facteurs de risque de CCR dans les séries de cas et de témoins sont présentées pour les variables continues avec la moyenne et l'écart type, ou la médiane et l'intervalle interquartile (lorsque les données semblaient non distribuées normalement). Quant aux variables catégorielles, elles sont présentées en pourcentage.

Sur la base des données de l'analyse qPCR des échantillons de l'étude, nous avons calculé à la fois les fréquences de détection positive de *F. nucleatum* et les médianes de $2^{-\Delta Cq}$ avec leurs IC à 95 % correspondants, dans chaque groupe (cas et témoins) et chaque type d'échantillon (salive, muqueuse colorectale). Les coefficients de corrélation de Spearman entre les niveaux salivaires et colorectaux de *F. nucleatum*, ainsi qu'entre les niveaux de *F. nucleatum* dans la muqueuse saine du côlon ascendant et descendant sont présentés avec leurs IC à 95 % correspondants. IBM SPSS Statistics version 26 a été utilisé pour l'analyse statistique.

4.3.7 Contribution de l'étudiante à l'étude de faisabilité

J'ai contribué substantiellement au développement du protocole de recherche et à l'opérationnalisation du projet. J'ai préparé les documents de l'étude, procédé à la demande d'autorisation éthique et son suivi annuel, aux demandes d'accès à certaines plateformes du CHUM pour pouvoir recruter et collecter les données. J'ai recruté les participants, administré les questionnaires et collecté les échantillons de salive et assisté aux coloscopies pour la cueillette des biopsies collectées par les gastro-entérologues. J'ai procédé au nettoyage et analyse des données, puis à la rédaction de l'article publié.

5. RÉSULTATS

Nous présentons les résultats des trois projets de recherche à travers les quatre articles suivants. L'article 1 porte sur les résultats de l'étude COLDENT, les articles 2 et 3 portent sur le protocole et les résultats de la revue systématique avec méta-analyse et, enfin, l'article 4 présente les résultats de l'étude pilote. On précise que tous les articles présentés sont publiés dans des revues à comité de lecture.

5.1 Article 1- Periodontal Disease as a Risk Factor for Sporadic Colorectal Cancer: Results from COLDENT Study

Article publié dans *Cancer Causes Control* 33(3), 463-472 (2022).

Amal Idrissi Janati¹, Igor Karp², Jean-François Latulippe³, Patrick Charlebois⁴, Elham Emami^{5*}

¹ Faculté de médecine dentaire, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

² Département d'épidémiologie et de biostatistique de l'École de médecine et de médecine dentaire Schulich, Université Western Ontario, London, Ontario, Canada.

³ Département de Chirurgie, Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

⁴ Département de chirurgie du Centre universitaire de santé McGill, Montréal, Québec, Canada.

⁵ Faculté de médecine dentaire et des sciences de la santé orale, Université McGill, Montréal, Québec, Canada.

* Auteur correspondant

L'article tel qu'il est publié est présenté en Annexe 3.

5.1.1 Contributions des auteurs

A. Idrissi Janati a contribué au recrutement des participants, l'acquisition et l'interprétation des données. Elle a rédigé la totalité du manuscrit et apporté les corrections suggérées par les directeurs de recherche, puis des réviseurs au journal où il était soumis pour publication. I. Karp et E. Emami ont conçu et dirigé l'étude COLDENT, contribué à l'interprétation des données et révisé de manière

critique le manuscrit. J-F. Latulippe et P. Charlebois ont contribué à l'identification des participants et ont révisé de manière critique le manuscrit.

5.1.2 Manuscrit

LIST OF ABBREVIATIONS

BMI : Body mass index

CDC-AAP : Centers for Disease Control and Prevention and the American Academy of Periodontology

CI : Confidence interval

CRC : Colorectal cancer

FFQ : Food Frequency Questionnaire

LTPAQ : Lifetime Total Physical Activity Questionnaire

MET: Metabolic-equivalent of task

NA-NSAIDs : Non-aspirin non-steroidal anti-inflammatory drugs

NSAIDs : Non-steroidal anti-inflammatory drugs

PD : Periodontal disease

RR : Rate ratio

RRa : Adjusted rate ratio

ABSTRACT

Colorectal cancer remains the top leading cancer worldwide. Accumulating evidence suggests periodontal pathogens are involved in colorectal carcinogenesis, indicating the need for high-quality epidemiological evidence linking periodontal disease (PD) and colorectal cancer (CRC). Thus, we conducted the first population-based case-control study that was specifically designed to investigate the association between compromised oral health and sporadic CRC. A total of 348 incident cases of colon or rectal cancer, and 310 age and sex frequency-matched controls, from the Montreal Island and Laval population participated in the study. Data were collected on PD and on several CRC risk factors using validated questionnaires. A life-course approach was used to document long-term history regarding lifestyle factors. Multivariable unconditional logistic regression analysis was used to estimate the rate ratio (RR) quantifying the association between CRC and PD. Results showed that the rate of new diagnosis of CRC in persons with a positive

history of PD was 1.45 times higher than in those with a negative history of PD adjusting for age, sex, BMI, education, income, diabetes, family history of CRC, regular use of non-steroidal anti-inflammatory drugs, lifetime cumulative smoking, lifetime consumption of red meats, processed meats, and alcoholic drinks, and lifetime total physical activity score (adjusted RR = 1.45; 95% CI: 1.04 - 2.01; p=0.026). Our results support the hypothesis of an association between PD and sporadic CRC risk.

BACKGROUND

Colorectal cancer (CRC) is the third most commonly diagnosed cancer and the second cause of death from cancer worldwide, with over 1,900,000 new cases and over 900,000 deaths in 2020 (Global Cancer Observatory-World Health Organization) Organization).¹ While CRC can develop in inflammatory bowel diseases or hereditary syndromes, most CRC cases are sporadic.² Many factors are associated with sporadic CRC, including higher age, male sex, low socioeconomic status, diabetes mellitus, high adiposity, history of CRC in first-degree relatives, tobacco smoking, high consumption of red and processed meat, and heavy intake of alcohol.³⁻⁹ On the other hand, physical activity and use of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) decrease the risk of CRC.¹⁰⁻¹²

In recent years, studies have suggested that periodontal disease (PD) may increase the risk of CRC. PD is a chronic inflammatory disease, caused by dysbiosis in plaque biofilms, and characterized by progressive destruction of the tooth-supporting tissues.¹³ PDs include gingivitis, which refers to gingival inflammation caused by bacteria accumulating in the gingival margin, and periodontitis, where the breakdown of teeth-supporting tissues occurs.¹⁴ The disease manifests in gingival bleeding, clinical attachment loss and radiographically assessed alveolar bone loss, and presence of periodontal pockets. Severity and extent of clinical manifestations increase with disease progression and can reach a high level of tooth mobility and, ultimately, tooth loss in advanced stages.¹³ Beyond oral health, PD seems to also impact some extra-oral health outcomes and has been found to be associated with major systemic diseases, including cardiovascular, respiratory, chronic kidney, and metabolic diseases, adverse pregnancy outcomes, rheumatoid arthritis, and cancers.¹⁵ The putative mechanism of PD and cancer association involves the spread of periodontal pathogens to extra-oral sites, dissemination of bacteria endotoxins, and release of inflammation products directly into the bloodstream. Chronic inflammation, on the other hand, promotes carcinogenesis by induction of gene mutations, inhibition of apoptosis, stimulation of angiogenesis,

cell proliferation, and epigenetic alterations.^{16, 17} PD has been linked to gastrointestinal cancers, but the strength of evidence differs across cancer sites.¹⁸ To date, several papers have been published on the association of CRC and PD,¹⁹⁻²⁷ all of which relied on secondary analysis of data from studies that had been designed for other purposes. These papers suffer from various methodological limitations including, notably, misclassification of PD status and other relevant characteristics, residual confounding,²⁸ and the low number of documented CRC cases. As a result, the etiologic role of PD in the occurrence of CRC remains uncertain. Thus, to better assess the possible etiologic role of PD in the occurrence of CRC, valid and reproducible epidemiological evidence is needed.

OBJECTIVE

The objective of this study was to investigate whether PD increases the risk of sporadic CRC.

METHODS

Study design

COLDENT study is a “population-based” case-control study that was carried out in the Montreal metropolitan area (Montreal Island and Laval), Quebec, from January 2013 to December 2019. The CRC cases were instances of histologically confirmed colon or rectal cancer diagnosed in the six months preceding their identification. CRC case identification relied on the assistance of medical staff in surgery and oncology departments of five main hospitals providing CRC care to residents of Montreal Island and Laval. The control series was selected by random sampling of age- and sex-based strata of the population of Montreal Island and Laval by relying on the Quebec Electoral Office lists during 2013–2019. Specifically, a control-to-case ratio of approximately 1:1 was aimed at across the strata defined by age (within 10-year categories) and sex. The identified/selected subjects were sent the study introductory letter and received a phone call from research staff in the following week. Several call-backs were made for non-responding numbers. The inclusion criteria for both cases and controls were: 1) Aged 40–80 years old; 2) Resident of Montreal Island or Laval; 3) Canadian citizen; 4) Speak English and/or French; 5) No prior diagnosis of cancer; and 6) No prior diagnosis of an inflammatory or a hereditary bowel disease, including Lynch syndrome, Hereditary Non-polyposis Colorectal Cancer, Familial Adenomatous Polyposis, and related polyposis. Eligible respondents who agreed to participate in the study were

invited to complete a multi-item study questionnaire in either a face-to-face or phone interview. If an eligible responder was unable to attend the interview, the questionnaire was offered for self-administration. In that case, the participant was instructed on questionnaire completion and was called back by research staff upon receipt of the completed questionnaire. Face-to-face interviews were carried out in research units, at the participant's home, or in hospitals for CRC patients. The study was approved by the Research Ethics Committees of all participating institutions, and all study participants were given all the information needed before they signed the study consent form.

Data collection

Data on PD were collected using eight validated questions that address three categories of information on the subject's periodontal condition: history of diagnosis or treatment of PD; symptoms or complications of PD; and self-awareness of PD^{29, 30} (Table 4). For each category of information, questions with the highest diagnostic performance indicators were selected, based on results of a previous systematic review by Blicher et al. (2005)³⁰ on validity of self-reported periodontal disease measurements. In a more recent systematic review with meta-analysis, by Abbood et al. (2015)²⁹, on self-reported PD, the estimated pooled diagnostic odds ratios (95% CI) of moderate PD by the questions on previous treatment of PD (deep cleaning); tooth mobility without injury; gum bleeding; and self-awareness of having gum disease were: 2.38 (1.35 - 4.2), 6.99 (3.17 - 15.43), 1.40 (0.91 - 2.16), and 3.20 (2.23 - 4.57) respectively, and 11.72 (4.12 - 33.36), 2.24 (1.05 - 4.80), 1.95 (1.25 - 3.03), and 3.35 (2.17 - 5.18) respectively for severe PD²⁹. Moderate and severe PD were defined based on the gold standard PD case definition by the Centers for Disease Control and Prevention and the American Academy of Periodontology (CDC-AAP)³¹. Further, seven study-questionnaires were administered: Sociodemographic and Medical History, Smoking, Height and Weight, Anti-inflammatory Medications, Oral Health, Food Frequency (FFQ), and Lifetime Total Physical Activity (LTPAQ) questionnaires.³²⁻³⁶ Through administration of these questionnaires, we collected data on history of cigarette smoking, including age started, age ended, years quit during period of usage, and intensity (number of cigarettes smoked per day, per week, or per month). Participants were asked to report all occupational, household, and recreational activities they had done in their lifetime. The minimum threshold for an activity to be reported in the LTPAQ is 124 hours/year for occupational, 112 hours/year for household, and 32

weeks/year for recreational activities.³⁷ Each activity was described in terms of duration (age started and age ended), frequency (number of hours per week, weeks per month, and months per year of activity practice), and intensity: light, moderate, and vigorous. Weak intensity was only used for occupational activities to describe those that require sitting with minimal walking.

For dietary risk factors, data were collected on intake of different kinds of red meats and processed meats and of different alcoholic beverages since adulthood. Specifically, red meats referred to meat in hamburgers, beef, pork, and lamb; processed meats referred to bacon, hot dogs, or other kinds of processed meats as salami, bologna, and sausages; and alcoholic drinks referred to beer, wine, and liquor. The FFQ was then administered for four age periods: 20 to 34, 35 to 49, 50 to 64, and 65 to 80 years. Interviewers relied on the lifetime grid technique to enhance recall accuracy.³⁸

Tableau 4. – Questions on self-reported periodontal disease

<i>History of professional diagnosis of periodontal disease:</i>		
1. Has a dentist or dental hygienist ever told you that you had gum disease?	<input type="checkbox"/> Yes	<input type="checkbox"/> No
2. Has a dentist or dental hygienist ever told you that you had “deep pockets”?	<input type="checkbox"/> Yes	<input type="checkbox"/> No
3. Have you ever been told that you needed periodontal or gum treatments?	<input type="checkbox"/> Yes	<input type="checkbox"/> No
4. Have you ever had periodontal (gum) surgery?	<input type="checkbox"/> Yes	<input type="checkbox"/> No
<input type="checkbox"/> Surgical curettage <i>(Other answer choices were not considered in defining PD)</i>		
<i>Symptoms or complications of periodontal disease:</i>		
5. Do your gums usually bleed?	<input type="checkbox"/> Yes	<input type="checkbox"/> No
6. Are any of your teeth loose or wobbly?	<input type="checkbox"/> Yes	<input type="checkbox"/> No
7. If you have any missing teeth, please indicate the reasons for their loss (check all that apply):		
<input type="checkbox"/> Periodontal disease		
<input type="checkbox"/> The tooth or the teeth were very wobbly		
<i>(Other answer choices were not considered in defining PD)</i>		
<i>Self-awareness of periodontal disease:</i>		
8. Have you ever had periodontal disease with bone loss?	<input type="checkbox"/> Yes	<input type="checkbox"/> No

Coding of data on periodontal disease and covariates

Subjects were classified as having a positive history of PD if they reported previous professional diagnosis or treatment of PD, and/or if they had experienced either frequent gingival bleeding, or tooth loss caused by tooth mobility or PD, and/or if they were self-aware of having PD. Periodontal health status of participants who answered Yes to only question 6 about tooth mobility (see

questions in Table 1) was considered as unknown since tooth mobility could also be caused by an occlusal trauma in a healthy periodontium. Participants were considered as “unexposed” to PD if none of the responses they provided to the 8 questions was positive.

Covariates for adjustment included age, gender, education attainment (elementary school vs. high school and \geq college), annual personal income, body mass index (BMI), history of type II diabetes, history of CRC in first-degree relatives, history of regular use of NSAIDs (Yes/No), lifetime measure of cigarette smoking (as quantified by packs-years), lifetime measures of consumption of red meats, processed meats, and alcohol, as well as lifetime cumulative physical activity score.

Regular use of NSAIDs was defined as use of at least one tablet/capsule of NSAIDs per month for six continuous months or longer, of aspirin and non-aspirin NSAIDs (NA-NSAIDs). The number of packs-years was calculated as the product of the number of cigarettes smoked per day divided by 20 and the number of years smoked. Lifetime measures of consumption of red meats, processed meats, and alcoholic drinks were calculated as the average number of consumed weekly servings for red and processed meats, and of daily drinks for alcohol, since the participant was 20 years old.

Lifetime physical activity score was represented by the average amount of total energy expended during occupational, recreational, and household activities, expressed by metabolic-equivalent of task (MET) in MET-hour/week/year.^{37, 39-41} For this, we assigned MET values to the intensity of physical activities: weak as 1.5, light as 2.5, moderate as 4, and vigorous as 8. To consider both the effects of duration and intensity, each activity was converted into energy expended by multiplying its assigned MET value with the reported hours spent in the activity per year, and the number of years the activity lasted. All subject activities were then summed to derive subject lifetime cumulative energy expended in MET-hours-years. This cumulative measure was then divided by the individual’s age (in years) and by 52 (i.e., the number of weeks in a year) to derive physical activity scores in MET-hour/week/year.

Statistical analysis

The distributions of potential confounders in the case and control series were examined by calculating the median and inter-quartile range for continuous variables, and percentage for categorical variables.

We fitted multivariable unconditional logistic regression models to estimate the rate ratio (RR) quantifying the association between CRC and PD. Specifically, in the multivariable models, the RR was adjusted for the matching variables (age and sex) and for all the other potential confounders, namely, education attainment, annual personal income, BMI, history of type II diabetes, history of CRC in first-degree relatives, history of regular use of aspirin and NA-NSAIDs, lifetime measure of cigarette smoking, lifetime measure of consumption of red meats, lifetime measure of consumption of processed meats, lifetime measure of consumption of alcohol, and lifetime cumulative physical activity score. The linearity in the logit was assessed for all continuous independent variables, namely age, BMI, annual personal income, lifetime measure of consumption of red meats, processed meats, and alcoholic drinks, and lifetime physical activity score, using the Box-Tidwell test, which involves adding simultaneously interaction terms of each continuous variable and its natural logarithm (X_i multiplied by $\ln(X_i)$) to the multivariable regression model.⁴² The test revealed that none of the interaction terms involving the above-mentioned continuous covariates was statistically significant at the alpha level of 0.05.

The percentages for missing data for each variable were less than 10 %, except for regular use of aspirin (23 %), which was absent from the NSAID questionnaire during the first year of the study (Table 5). Missing data were addressed with the multiple imputation method using the Expectation-Maximization with Bootstrapping algorithm⁴³: 10 complete datasets were generated to produce pooled “final” RR estimates along with their corresponding 95% confidence intervals (CIs). To improve performance of the imputation algorithm, auxiliary variables were included for imputation, in addition to all the variables included in the “associational” models. Continuous variables with asymmetric distribution, or extreme values, as for cumulative cigarette smoking, lifetime measures of consumption of red meats, processed meats, and alcoholic drinks, were log-transformed ($\text{Log}_{10}(X_i)$ or $\text{Log}_{10}(X_i+1)$) before imputation. Imputed values of continuous variables were restricted to the observed minimum and maximum values. Imputation was done respecting the scale of each variable (i.e., continuous, ordinal, or categorical) with the Amelia II package in R, version 3.5.3.⁴⁴

Tableau 5. – Missing data in variables included in the association model

Variable	Participants with missing data		
	Total, n=658 n (%)	Cases, n=348 n (%)	Controls, n=310 n (%)
Periodontal disease	20 (3)	10 (3)	10 (3)
Education attainment	16 (2)	6 (2)	10 (3)
Personal income	63 (10)	36 (10)	27 (9)
BMI	1 (0.2)	1 (0.3)	-
Regular use of NA-NSAIDs	6 (1)	1 (0.3)	5 (2)
Regular use of aspirin	154 (23)	37 (11)	117 (38)
Cigarette smoking	2 (0.3)	1 (0.3)	1 (0.3)
Average weekly red meats intake	34 (5)	28 (8)	6 (2)
Average processed meats intake	38 (6)	30 (9)	8 (3)
Average daily total alcoholic drinks	32 (5)	27 (8)	5 (2)

RESULTS

A total of 1,040 potentially eligible cases of CRC were identified from the five participating hospitals. We approached 972 patients, of whom 483 did not meet the study eligibility criteria, mainly because of their residence area (n=109), previous diagnosis of cancer (n=105), long time since CRC diagnosis (n=93), age (n=89), and language criteria (n=56). Twenty-nine were not able to participate (16 were too ill or too busy because of their cancer treatments, eight had a cognitive or mental illness, five died between the time of their identification and the time when we attempted to reach them or meet for an interview), and 112 refused to participate. Thus, 348 CRC patients took part in the study. During the same period, 1,346 CRC-free controls were sent the introduction letter. We were unable to reach 450 subjects, including 119 subjects whose contact details (address and/or phone number) had changed, and five subjects who had died between the time of their selection and the time when we attempted to reach them. Among 896 subjects who were reached, 186 did not meet the study eligibility (mostly because of a previous cancer (n=79), and not speaking French or English (n=52), five subjects were unable to participate because of a cognitive condition, and 395 refused to participate. Thus, 310 control subjects took part in the study (see flow chart in Figure 3).

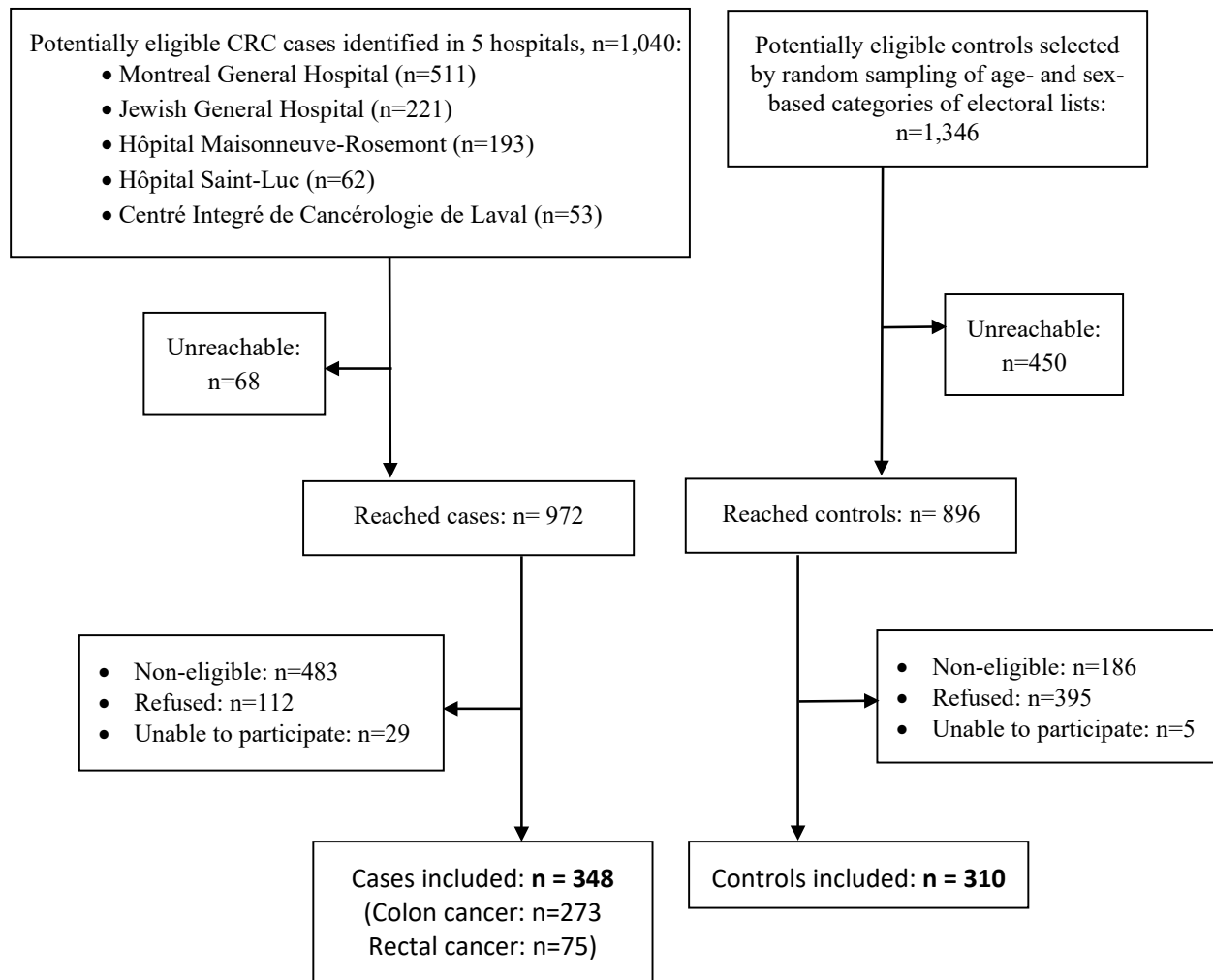


Figure 3. – Flow chart of COLDENT study recruitment

Table 6 presents the distributions of the CRC cases and controls (both overall and according to their PD-history status) according to sociodemographic and other relevant characteristics. Regarding sociodemographic and anthropometric characteristics, cases and controls showed similar mean age (63 years old) and BMI (26 kg/m²), and similar relative frequencies of lifestyle and family history of CRC in first relatives. However, the case series showed higher relative frequencies of male gender, elementary and high school education, and history of type II diabetes. Further, the median personal income in the cases was lower than in the controls. The relative frequency of regular use of aspirin was higher in the cases than in the controls, while the relative

frequency of regular use of NA-NSAIDs was lower in the cases than in the controls. Considering assessed behavioral CRC risk factors in lifetime, the cases showed a higher proportion of smokers, higher average number of packs-years, higher level of intake of processed meats, and higher average MET-hour/week/year scores in their occupational activities.

The prevalence of PD, including gingivitis and periodontitis, was higher in the case group (46%) than in the control group (38%). Overall, cases were more likely to report previous diagnosis or a symptom of PD, or to be aware of having PD with bone loss, than controls. The complication of advanced PD, tooth loss due to mobility or PD, was less frequent (8% in cases and 4.8% in controls).

Results from multiple logistic regression analysis showed that the rate of (new diagnosis of) CRC in persons with a positive history of PD was 1.4 times higher than in those with a negative history of PD, when adjusting only for age and gender (adjusted rate ratio (RR_a) = 1.4; 95% CI: 1.02 - 1.91; $p=0.037$), and 1.45 times higher than in those with a negative history of PD adjusting, in addition, for BMI, education, income, diabetes, family history of CRC, regular use of aspirin and NA-NSAIDs, lifetime cumulative smoking, lifetime consumption of red meats, processed meats, and alcoholic drinks, and lifetime total physical activity score ($RR_a = 1.45$; 95% CI: 1.04 - 2.01; $p=0.026$). The results are summarized in Table 7.

Tableau 6. – Sociodemographic characteristics and colorectal cancer risk factors in COLDENT study participants

Characteristic	Cases, n=348 n (%) <i>Total</i>	Controls, n=310 n (%)		
		<i>Total</i>	<i>Positive history of PD (n=117)</i>	<i>Negative history of PD (n=183)</i>
Age, years (mean (SD))	63.2 (9.8)	63.1 (9.8)	61.4 (9.6)	63.7 (9.8)
Gender				
Male	215 (62)	170 (55)	66 (56)	98 (54)
Canadian born				
Yes	216 (62)	210 (68)	77 (66)	126 (69)
Native tongue				
French	155 (46)	183 (59)	63 (55)	112 (64)
English	60 (18)	40 (13)	20 (17)	20 (12)
Other language	123 (36)	75 (24)	32 (28)	42 (24)
Education attainment				
Elementary school	29 (9)	9 (3)	4 (3)	5 (3)
High school	116 (34)	92 (30)	36 (31)	53 (30)
College or University	197 (58)	199 (64)	76 (65)	117 (67)
Living alone				
Yes	71 (21)	80 (26)	27 (23)	47 (26)
BMI, kg/m ² (mean (SD))	26.1 (5.7)	26.3 (6.2)	27 (5.7)	27.4 (4.7)
Family history of CRC				
Positive	43 (12)	38 (12)	13 (11)	24 (13)
History of diabetes				
Positive	69 (20)	39 (13)	14 (12)	23 (13)
History of regular use of NA-NSAIDs				
Positive	62 (18)	67 (22)	28 (25)	39 (21)
History of regular use of aspirin				
Positive	85 (27)	50 (26)	16 (21)	33 (30)
Personal income (CAD\$ per year)	35 000 (50 000)	45 000 (40 000)	45 000 (50 000)	45 000 (40 000)
History of cigarette smoking				
Positive	206 (59)	174 (56)	73 (62)	97 (53)
Cigarette smoking, packs-years (Median (IQR))	3.6 (24)	2 (22)	2.2 (17.5)	1.8 (23.5)
Lifetime average daily alcoholic drinks ^a (Median (IQR))	0.4 (1.1)	0.5 (1)	0.4 (0.9)	0.5 (1)
Lifetime average weekly servings ^b of:				
Red meats (Median (IQR))	4.3 (3.5)	4 (3.5)	4.4 (3.5)	3.9 (3.3)
Processed meats (Median (IQR))	2.6 (3.5)	1.8 (3.3)	1.8 (3.2)	1.8 (3.3)
Lifetime average MET hour/week/ ^c (Median (IQR))				
Occupational	60.3 (51.6)	48.7 (40.8)	50.5 (41.5)	46.9 (36.5)
Household	13.4 (27.6)	13.1 (25.1)	12.3 (26)	13.6 (23.7)
Recreational	8 (14)	7.7 (12.8)	8.4 (12.7)	6.5 (11.3)
Total physical activity	95.7 (78.2)	85 (53)	84.8 (44.9)	84.9 (53.6)

CRC: Colorectal cancer; BMI: Body mass index; NA-NSAIDs: Non-aspirin non-steroidal anti-inflammatory drugs; CAD\$: Canadian dollar, MET: Metabolic equivalent of task; SD: Standard deviation; IQR: Interquartile range. The frequencies presented in the table correspond to valid percentages. ^a: one drink includes beer (355 ml bottle or can), wine (180 ml), or liquor (150 ml);

^b: 1 serving of red meats=180-240g, 1 serving of processed meats=55g.

Tableau 7. – Rate ratio for association between periodontal disease and colorectal cancer

	RR (95% CI); p value
Adjusted for age and sex	1.4 (1.02 – 1.91); p=0.037
Adjusted for all covariates ^a	1.45 (1.04 – 2.01); p=0.026

RR: Rate ratio; ^a: age, sex, education attainment, annual personal income, BMI, history of type II diabetes, history of CRC in first-degree relatives, history of regular use of aspirin and non-aspirin non-steroidal anti-inflammatory drugs, lifetime measure of cigarette smoking, lifetime measure of consumption of red meats, lifetime measure of consumption of processed meats, lifetime measure of consumption of alcohol, and lifetime cumulative physical activity score.

DISCUSSION

In this case-control study, we investigated the association between PD and CRC, and relied on multiple self-reported measurements to ascertain the PD status. Our findings suggest that the CRC rate is increased in persons with a positive history of PD compared with persons with a negative history of PD, even upon adjustment for a number of potential confounders. Studies that previously examined the association between CRC and self-reported PD^{22,23,25,26} assessed PD status with only one question, which was about previous professional diagnosis of PD, among a cohort of American male health professionals and a cohort of elderly women;^{23,26} self-awareness of periodontal bone loss in American women nurses;²² or a clinical sign of PD (tooth mobility with consequent tooth loss) in a cohort of adult Sweden twins.²⁵ Unlike those studies, we ascertained self-reported PD exposure using a combination of questions that concerned the three types of information together. Using only one question can be expected to result in PD-status misclassification, especially in persons with lower education or socio-economic level.⁴⁵ For example, questions related to professional diagnosis will favor accurate answers in subjects who had more access to dental care.^{29,30} Thus, persons who have not visited a dentist in years may not report any previous diagnosis of PD and will be classified as unexposed, while in fact they could well have the disease, especially given their poorer access to, and lower levels of use of, dental care. According to the Canadian Health Measures Survey 2007–2009, 48% of Canadian adults who have not been to a dental professional in last year had gingivitis, and 48% of Canadian adults from the lower income group had gingivitis, compared with 25% of Canadians with higher incomes.⁴⁶ Questions about the most easily perceived clinical signs, such as tooth mobility, or tooth loss caused by mobility, and PD have greater informativeness in detecting PD but may result in failure to detect early stages of the disease, including gingivitis and mild periodontitis. This justifies questioning on gingival bleeding

as well. Self-awareness of one's own PD condition is more informative among educated people and dental or health care users. To conclude, combining different questions – as recommended by Blicher et al. (2008) and Abboud et al. (2016) in their systematic reviews' conclusions^{29, 30} – will enhance the ability of the questions to identify history of PD. Those authors also recommended using variations of the same question to stimulate the person's memory; thus, we used different questions to retrieve a previous diagnosis or treatment of PD.

According to our self-reported PD definition, we found that 38% of controls had either gingivitis or periodontitis, and if we refer to those who reported tooth loss because of mobility and PD, we can consider 5% of controls had advanced PD. These statistics seem to be in line with those from the Canadian Health Measures Survey (2007–2009), where partial-mouth periodontal examination was used, and which estimated that 32% of Canadian adults (20–79 years of age) had gingivitis, 21% of adults with natural teeth had, or had had, a moderate or a severe periodontal (gum) problem, and 4% of Canadian adults had severe periodontal disease.⁴⁶ According to complete-mouth examination in the National Health and Nutrition Examination Surveys (2009–2014), and the Centers for Disease Control and Prevention and the American Academy of Periodontology (CDC-AAP) case definition,³¹ the estimated prevalence of total periodontitis in dentate US adults aged 30–79 years was 42%, including 8% severe periodontitis.

We found a statistically significant association of CRC with PD ($RR_a = 1.45$; 95% CI: 1.04-2.01) ($p=0.026$), adjusting for a number of potential confounders. Similarly, two previous studies have reported a positive association of CRC with PD. The first is a large retrospective cohort study ($n=106,487$) based on administrative data from Taiwan's National Health Insurance Research Database.¹⁹ The estimated hazard ratio (95% CI) was 1.64 (1.50–1.80), adjusting only for age, gender, and comorbidity. PD classification in that study relied on established administrative codes given to clinical diagnosis of gingivitis and periodontitis, and no additional information was provided on any standardized clinical measures or definition of PD. In addition to this, and to the high risk of residual confounding due poor adjustment, using the Insurance Health database was criticized in another report for the significant risk of misclassification due to deliberate over-coding by health and dental care providers to avoid refusal of reimbursement by medical insurance.⁴⁷ The results of this study should thus be interpreted with great caution. In the second study, Arora et al. (2010)²⁵ analyzed data from a large Swedish prospective cohort study of homo- and heterozygous

twins, which had been originally designed to study the role of environmental and genetic factors in cardiovascular disease and cancer. Their analysis included 15,333 twins who answered the question on periodontal status: “*Have you noticed that some of your own teeth have come loose or fallen out on their own?*” Participants were then classified as having PD if at least half of their teeth were wobbly, indicating that PD is at an advanced stage. Participants who reported having a few loose teeth were separately classified as having minor mobility. Almost 6% of participants had advanced PD and an additional 12% of participants reported minor tooth mobility. Participants had a median age at study entry of 51 years and followed-up for a median period of 27 years, with a total of 200 CRC cases documented. Upon adjustment for gender, age, education, employment, number of siblings, smoking status (5 categories counting number of packs per day), smoking status of partner, alcohol status (current, former, never), body mass index (4 categories), and diabetes, the estimated hazard ratio (95% CI) was 1.62 (1.13 – 2.33) . Unfortunately, the list of potential confounders adjusted for did not include dietary risk factors and physical activity level. Furthermore, the PD measure in that study excluded gingivitis and early-stage periodontitis.

Different results were reported by Momen-Heravi et al. (2017),²² who analyzed data from the American Nurses’ Health Study. The analysis included a subsample of 69,656 participants who were asked if they had a history of periodontal bone loss (in study cycle of 1998). Where the answer was yes, participants indicated the severity of the bone loss (none, mild, moderate/severe). After 18 years of follow-up, a total of 739 CRC was documented for this analysis. Overall, the study results suggested no association between history of periodontal bone loss and CRC (hazard ratio =0.89; 95% CI: 0.72–1.10), although they were weakly suggestive of positive association for moderate/severe bone loss and CRC (hazard ratio =1.22; 95%CI: 0.91–1.63), adjusting for age, ethnicity, smoking, history of CRC in first-degree relatives, history of sigmoidoscopy / colonoscopy, current physical activity, regular aspirin use, multivitamin use, diabetes, alcohol consumption, BMI, energy-adjusted intake of total calcium, vitamin D, folate, red meat and processed meat, and hormonal replacement therapy). The study indeed has many strengths, such as its prospective design, large sample size, and adjustment for numerous potential confounders. Results from these epidemiological studies on the association between PD and CRC (or colorectal adenoma^{48, 49}) have been synthesized in a recent meta-analysis, by Xuan et al. (2020) ⁵⁰. Specifically, these authors reported that periodontal disease was statistically significantly

associated with colorectal tumor (pooled “relative risk” and 95% CI: 1.25 (1.06 - 1.38), although there was high heterogeneity across studies ($I_2=83.9\%$)⁵⁰.

The oral cavity can indeed serve as a reservoir for the systemic dissemination of pathogenic bacteria and their toxins, leading to infections and inflammations in distant bodily sites, and several oral species were identified in infections at extra-oral sites⁵¹. Scannapieco and Panagasos (2004)⁵² suggested four potential pathways that may allow oral bacteria and gingival inflammation to influence systemic health, including bacteremia, systemic spread of locally produced inflammatory mediators, eliciting an autoimmune response, and aspiration or ingestion of oral bacteria into the intestine or respiratory tract⁵². As for CRC, a periodontal pathogen, *Fusobacterium nucleatum*, has been particularly involved in CRC tumorigenesis, and its presence in colorectal mucosa and feces has been found to be associated with CRC⁵³. The development of CRC is, on the other hand, strongly influenced by the inflammatory condition of the colon, as shown in patients with inflammatory bowel disease, where chronic and severe inflammation of the colon increases their risk of developing CRC⁵⁴.

To our knowledge, the COLDENT project was the first epidemiological study specifically designed to assess the association between PD and CRC. In the study we used rigorous methods for documentation of the main exposure, study outcome, and the potential confounding factors. Moreover, we followed a life-course approach to document long-term history regarding lifestyle factors and other relevant characteristics. We also chose to assess PD based on self-reported measures, because they allow easier standardization of the exposure measurements and definition than dental examination, which is sensitive to inter- and intra-examiner variation.

Our results support the hypothesis of an association between PD and sporadic CRC risk. Further epidemiological studies aimed at production of high-quality evidence on the putatively causal relation between PD and CRC occurrence and on the possible mechanisms underlying that relation are recommended.

Acknowledgments

We thank all participants in the COLDENT study, Dr Carole Richard, Dr Nathalie Aucoin, Dr Marylise Boutros, and the late Dr Phillip Gordon, as well as all nurses and administrative staff who helped in study participant identification and recruitment in the participating hospitals: Montreal

General Hospital, Jewish General Hospital, Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Hôpital Côte Saint Luc du CHUM, and Centre Intégré de Cancérologie de Laval. We also thank research assistant Mrs Nancy Faraj, and statistician Mr Miguel Chagnon who helped with multiple imputation.

Funding

This project was supported by an operating grant from the Cancer Research Society. AIJ was supported by a doctoral scholarship from the Fonds de Recherche du Québec-Santé.

References

1. International Agency of Research on Cancer. World Health Organization-Global Cancer Observatory. Cancer Today. <https://gco.iarc.fr/>. Accessed 29 December 2020.
2. Ponz de Leon M, Percesepe A. Pathogenesis of colorectal cancer. *Dig Liver Dis* 2000;32(9):807-21.
3. Coughlin SS. Social determinants of colorectal cancer risk, stage, and survival: a systematic review. *Int J Colorectal Dis* 2020;35(6):985-95.
4. Deng L, Gui Z, Zhao L, Wang J, Shen L. Diabetes mellitus and the incidence of colorectal cancer: an updated systematic review and meta-analysis. *Dig Dis Sci* 2012;57(6):1576-85.
5. Ning Y, Wang L, Giovannucci EL. A quantitative analysis of body mass index and colorectal cancer: findings from 56 observational studies. *Obes Rev* 2010;11(1):19-30.
6. Botteri E, Iodice S, Bagnardi V, et al. Smoking and colorectal cancer: a meta-analysis. *Jama* 2008;300(23):2765-78.
7. Händel MN, Rohde JF, Jacobsen R, et al. Processed meat intake and incidence of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Eur J Clin Nutr* 2020;74(8):1132-48.
8. Smolińska K, Paluszkiewicz P. Risk of colorectal cancer in relation to frequency and total amount of red meat consumption. Systematic review and meta-analysis. *Arch Med Sci* 2010;6(4):605-10.
9. McNabb S, Harrison TA, Albanes D, et al. Meta-analysis of 16 studies of the association of alcohol with colorectal cancer. *Int J Cancer* 2020;146(3):861-73.
10. Robsahm TE, Aagnes B, Hjartåker A, et al. Body mass index, physical activity, and colorectal cancer by anatomical subsites: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Eur J Cancer Prev* 2013;22(6):492-505.
11. Bosetti C, Santucci C, Gallus S, Martinetti M, La Vecchia C. Aspirin and the risk of colorectal and other digestive tract cancers: an updated meta-analysis through 2019. *Ann Oncol* 2020;31(5):558-68.
12. Tomić T, Domínguez-López S, Barrios-Rodríguez R. Non-aspirin non-steroidal anti-inflammatory drugs in prevention of colorectal cancer in people aged 40 or older: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Epidemiol* 2019;58:52-62.
13. Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol* 2018;89 Suppl 1:S173-s82.
14. Petersen PE, Ogawa H. The global burden of periodontal disease: towards integration with chronic disease prevention and control. *Periodontol 2000* 2012;60(1):15-39.
15. Nazir MA. Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. *Int J Health Sci (Qassim)* 2017;11(2):72-80.
16. Kraus S, Arber N. Inflammation and colorectal cancer. *Curr Opin Pharmacol* 2009;9(4):405-10.
17. Kundu JK, Surh YJ. Inflammation: gearing the journey to cancer. *Mutat Res* 2008;659(1-2):15-30.
18. Zhang Y, Sun C, Song EJ, et al. Is periodontitis a risk indicator for gastrointestinal cancers? A meta-analysis of cohort studies. *J Clin Periodontol* 2020;47(2):134-47.

19. Hu JM, Shen CJ, Chou YC, et al. Risk of colorectal cancer in patients with periodontal disease severity: a nationwide, population-based cohort study. *Int J Colorectal Dis* 2018;33(3):349-52.
20. Mai X, LaMonte MJ, Hovey KM, et al. Periodontal disease severity and cancer risk in postmenopausal women: the Buffalo OsteoPerio Study. *Cancer Causes Control* 2016;27(2):217-28.
21. Michaud DS, Lu J, Peacock-Villada AY, et al. Periodontal Disease Assessed Using Clinical Dental Measurements and Cancer Risk in the ARIC Study. *J Natl Cancer Inst* 2018;110(8):843-54.
22. Momen-Heravi F, Babic A, Tworoger SS, et al. Periodontal disease, tooth loss and colorectal cancer risk: Results from the Nurses' Health Study. *Int J Cancer* 2017;140(3):646-52.
23. Nwizu NN, Marshall JR, Moysich K, et al. Periodontal Disease and Incident Cancer Risk among Postmenopausal Women: Results from the Women's Health Initiative Observational Cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2017;26(8):1255-65.
24. Ahn J, Segers S, Hayes RB. Periodontal disease, Porphyromonas gingivalis serum antibody levels and orodigestive cancer mortality. *Carcinogenesis* 2012;33(5):1055-8.
25. Arora M, Weuve J, Fall K, Pedersen NL, Mucci LA. An exploration of shared genetic risk factors between periodontal disease and cancers: a prospective co-twin study. *Am J Epidemiol* 2010;171(2):253-9.
26. Michaud DS, Liu Y, Meyer M, Giovannucci E, Joshipura K. Periodontal disease, tooth loss, and cancer risk in male health professionals: a prospective cohort study. *Lancet Oncol* 2008;9(6):550-8.
27. Hujoel PP, Drangsholt M, Spiekerman C, Weiss NS. An exploration of the periodontitis-cancer association. *Ann Epidemiol* 2003;13(5):312-6.
28. Becher H. The concept of residual confounding in regression models and some applications. *Stat Med* 1992;11(13):1747-58.
29. Abbood HM, Hinz J, Cherukara G, Macfarlane TV. Validity of Self-Reported Periodontal Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Periodontol* 2016;87(12):1474-83.
30. Blicher B, Joshipura K, Eke P. Validation of self-reported periodontal disease: a systematic review. *J Dent Res* 2005;84(10):881-90.
31. Eke PI, Borgnakke WS, Genco RJ. Recent epidemiologic trends in periodontitis in the USA. *Periodontol* 2000 2020;82(1):257-67.
32. Friedenreich CM, Courneya KS, Bryant HE. The lifetime total physical activity questionnaire: development and reliability. *Med Sci Sports Exerc* 1998;30(2):266-74.
33. Willett WC, Reynolds RD, Cottrell-Hoehner S, Sampson L, Browne ML. Validation of a semi-quantitative food frequency questionnaire: comparison with a 1-year diet record. *J Am Diet Assoc* 1987;87(1):43-7.
34. Cade J, Thompson R, Burley V, Warm D. Development, validation and utilisation of food-frequency questionnaires - a review. *Public Health Nutr* 2002;5(4):567-87.
35. Siemiatycki J, Krewski D, Franco E, Kaiserman M. Associations between cigarette smoking and each of 21 types of cancer: a multi-site case-control study. *Int J Epidemiol* 1995;24(3):504-14.
36. Janati AI. La santé orale compromise comme facteur de risque potentiel pour le cancer colorectal sporadique (COLDENT) : une étude de faisabilité. 2014 [Thèses et mémoires électroniques de l'Université de Montréal. <http://hdl.handle.net/1866/11339>.

37. Sarah MacLaughlin, Friedenreich C. Cancer epidemiology and prevention research, Alberta Health Services. Lifetime Total Physical Activity Questionnaire comprehensive users' guide. 2016. <https://www.cepr.ca/questionnaires/life-time-physical-activity-questionnaire-ltpaq/>. Accessed 3 January 2020. 2016.
38. Berney LR, Blane DB. Collecting retrospective data: accuracy of recall after 50 years judged against historical records. *Soc Sci Med* 1997;45(10):1519-25.
39. Tudor-Locke C, Ainsworth BE, Washington TL, Troiano R. Assigning metabolic equivalent values to the 2002 census occupational classification system. *J Phys Act Health* 2011;8(4):581-6.
40. Mansoubi M, Pearson N, Clemes SA, et al. Energy expenditure during common sitting and standing tasks: examining the 1.5 MET definition of sedentary behaviour. *BMC Public Health* 2015;15:516.
41. Shih IF, Liew Z, Krause N, Ritz B. Lifetime occupational and leisure time physical activity and risk of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2016;28:112-7.
42. Menard S. Applied logistic regression analysis (2nd ed.). SAGE Publications, Inc. <https://www.doi.org/10.4135/9781412983433;2002>.
43. Takahashi M. Statistical Inference in Missing Data by MCMC and Non-MCMC Multiple Imputation Algorithms: Assessing the Effects of Between-Imputation Iterations. *Data Science Journal* 2017;16(37):1-17. DOI: <https://doi.org/10.5334/dsj-2017-037>.
44. James Honaker, Gary King, Blackwell M. Amelia II: A Program for Missing Data. *Journal of Statistical Software* 2011;45(7):<http://www.jstatsoft.org/>.
45. Tomar S. Individual self-reported items are not accurate markers for a history of chronic periodontitis. *J Evid Based Dent Pract* 2005;5(4):219-21.
46. Santé Canada. Sommaire du rapport des résultats du module sur la santé buccodentaire de l'Enquête canadienne sur les mesures de la santé 2007-2009. <https://www.caphd.ca/sites/default/files/CHMS-F-summ.pdf> (Consulté janvier 2022).
47. Hsieh CY, Su CC, Shao SC, et al. Taiwan's National Health Insurance Research Database: past and future. *Clin Epidemiol* 2019;11:349-58.
48. Kim GW, Kim YS, Lee SH, et al. Periodontitis is associated with an increased risk for proximal colorectal neoplasms. *Sci Rep* 2019;9(1):7528.
49. Lee D, Jung KU, Kim HO, Kim H, Chun HK. Association between oral health and colorectal adenoma in a screening population. *Medicine (Baltimore)* 2018;97(37):e12244.
50. Xuan K, Jha AR, Zhao T, Uy JP, Sun C. Is periodontal disease associated with increased risk of colorectal cancer? A meta-analysis. *Int J Dent Hyg* 2020.
51. Han YW, Wang X. Mobile microbiome: oral bacteria in extra-oral infections and inflammation. *Journal of Dental Research* 2013;92(6):485-91.
52. Scannapieco FA, Panagakos FS. Periodontal inflammation: from gingivitis to systemic disease? In: InTech, editor. *Gingival Diseases: Their Aetiology, Prevention and Treatment*. Croatia; 2011. p. 149-72.
53. Idrissi Janati A, Karp I, Laprise C, Sabri H, Emami E. Detection of *Fusobacterium nucleatum* in feces and colorectal mucosa as a risk factor for colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Syst Rev* 2020;9(1):276.
54. Brennan CA, Garrett WS. Gut Microbiota, Inflammation, and Colorectal Cancer. *Annual Review of Microbiology* 2016;70:395-411.

5.1.3 Résultats complémentaires

5.1.3.1 Exposition à la maladie parodontale

En plus de la prévalence de l'exposition à la MP chez les cas (46%) et les témoins (38%) que nous avons rapportée dans l'article de l'étude, nous rapportons ici des statistiques descriptives additionnelles sur 1) la distribution des cas et témoins selon les trois catégories d'information collectées par les questions sur l'état de santé parodontale (Tableau 8); et 2) l'ancienneté de l'exposition à la MP chez les participants exposés (Figure 4).

Tableau 8. – Distribution des cas et témoins de COLDENT par mesures auto-rapportées de la maladie parodontale

Catégories de mesures de MP auto-rapportées	Cas, n=348	Témoins, n=310
	n (%)	n (%)
Antécédent de diagnostic et/ou de traitement professionnel de MP	114 (33)	82 (27)
Manifestations et/ou complications cliniques de MP		
Saignement gingival	78 (22)	44 (14)
Mobilité dentaire	45 (13)	34 (11)
Perte de dents par mobilité ou MP	28 (8)	15 (5)
Total	111 (32)	78 (25)
Perception individuelle d'avoir une MP avec perte d'os	41 (12)	22 (7)

Comme le montre le tableau 8 ci-dessus, c'est dans le groupe de cas où on recense le plus de sujets ayant reçu un diagnostic ou un traitement professionnel de la MP, ou ayant déjà eu un saignement gingival régulier, une mobilité dentaire, ou perdu des dents à la suite de mobilité ou de MP. Aussi, un nombre plus élevé de sujets parmi les cas par rapport au groupe des témoins, ont affirmé avoir eu une MP avec perte d'os.



Figure 4. – Distribution des cas et des témoins de l'étude COLDENT par périodes d'âge de début de la maladie parodontale, dans les strates d'âge des participants

Les diagrammes ci-dessus nous donnent une idée approximative sur l'ancienneté de l'historique de MP par rapport à l'âge des participants. L'information n'est malheureusement pas très précise. En effet, comme expliquée dans la section de méthodes, lorsqu'un sujet répondait par 'Oui' à l'une

des questions qui définissent la MP, il était invité à préciser ‘Quand?’ en choisissant une tranche d’âge parmi les 4 choix de réponses suivants : 20 à 34 ans, 35 à 49 ans, 50 à 64 ans et 65 et plus. Nous avons alors dû classer l’âge des participants (les cas et les témoins) d’après les mêmes catégories d’âge de ces réponses et calculer la distribution des sujets par tranche d’âge de début de la MP, selon les différentes strates d’âge des sujets. L’information était manquante pour 16% des cas et 18% des témoins. Pour ceux avec l’information disponible, on remarque que pour la majorité des participants, cas et témoins, l’historique de la MP se situait dans les tranches d’âge précédant la tranche d’âge actuel. Seulement 21% de cas et 23% de témoins ont rapporté un historique de MP plus ou moins récent (la même tranche d’âge actuel).

5.1.3.2 Résultats des analyses de sensibilité

Les résultats des analyses de sensibilité sont présentés dans le tableau 9 suivant :

Tableau 9. – Résultats des analyses de sensibilité pour la mesure d’association entre la maladie parodontale et le cancer colorectal

Modèle 1 : Modèle de régression multivarié complet	Rapport des taux ajusté (IC à 95%); valeur p
Modèle 1 avec imputation multiple des données manquantes	1,45 (1,04-2,01); p=0,026
Modèle 1 sans imputation des données manquantes (<i>Listwise deletion</i>)	1,75 (1,13-2,72); p=0,013
Modèle 1 avec imputation multiple des données manquantes, mais sans la covariable d’usage régulier d’aspirine qui a le plus grand pourcentage de données manquantes (11% chez les cas et 38% chez les témoins)	1,45 (1,04-2,01); p=0,027
Modèle 1 avec imputation multiple des données manquantes, en recodant la valeur maximale de la covariable revenu annuel personnel (dernière catégorie ouverte= $\geq 70\ 000\$$ par an) avec différentes valeurs:	
• 100 000\$	1,45 (1,05-2,01); p=0,026
• 120 000\$	1,45 (1,05-2,01); p=0,026
• 180 000\$	1,45 (1,05-2,01); p=0,026
Le modèle 1 inclut les variables suivantes: MP, âge, sexe, niveau d’éducation (primaire, secondaire, collège et plus), revenu personnel annuel, IMC, diabète, antécédents (ATCD) de CCR chez les parents premier degrés, ATCD d’usage régulier d’aspirine, ATCD d’usage régulier d’AINS, tabagisme (paquets-années), consommation moyenne à vie de viandes rouges, de viandes transformées (en nombre de portions/semaine) et de boissons alcoolisées (en nombre de breuvages/jour); et score moyen d’activité physique totale durant la vie (en MET heure/semaine/an).	

Nous pouvons remarquer que l'imputation multiple des données manquantes a permis d'avoir une mesure d'association moins élevée mais plus précise (intervalle de confiance plus réduit) que la non-imputation des données manquantes. La mesure d'association n'a presque pas changé entre un modèle avec la variable aspirine et celui sans aspirine. Enfin, le choix de la valeur du revenu personnel maximal n'a pas changé la mesure d'association entre la MP et le CCR.

5.1.3.3 Résultats de l'analyse de biais de sélection

Parmi les 507 personnes ayant refusé de participer (112 cas et 395 témoins), seulement 167 sujets ont accepté de répondre à une partie ou la totalité d'un court questionnaire sur le statut du tabagisme, du niveau d'éducation atteint et du revenu personnel annuel. D'ailleurs, les données sur le statut de tabagisme sont collectées auprès de 167 sujets (32 cas et 135 témoins), celles sur le niveau d'éducation atteint auprès de 160 sujets (30 cas et 130 témoins) et celles du revenu personnel pour 90 sujets (21 cas et 69 témoins). Les données sur l'âge et le sexe étaient disponibles pour tous les sujets via les listes électorales pour les témoins et le dossier médical pour les cas.

Le tableau 10 suivant présente la distribution des participants à l'étude COLDENT et des personnes ayant refusé d'y participer, en fonction de l'âge, le sexe, le niveau d'éducation, le revenu personnel annuel et le statut du tabagisme. Les fréquences sont présentées pour les deux groupes, de cas et des témoins, séparément.

Tableau 10. – Caractéristiques sociodémographiques et statut du tabagisme chez les répondants et non-répondants à l'étude COLDENT

	Témoins				Cas			
	Participation		Refus		Participation		Refus	
Âge, années (moy (SD))	n=310	63,1 (9,8)	n= 395	64,8 (10,3)	n=348	63,2 (9,8)	n=109	66 (9,6)
Âge en categories	n=310		n= 395		n=348		n=109	
40-49 ans		10%		9%		10%		5%
50-59 ans		25%		22%		30%		17%
60-69 ans		33%		28%		28%		35%
70-79 ans		32%		41%		32%		43%
Sexe	n=310		n= 395		n=348		n=112	
Hommes		55%		53%		62%		62%
Éducation	n=301		n=130		n=342		n=30	
Primaire		3%		13%		8%		13%
Secondaire		31%		37%		34%		57%
Collégiale/universitaire		66%		50%		58%		30%
Revenu annuel personnel, CAD\$ (médiane (plage interquartile))	n=287	45 000 (40 000)	n=69	35 000 (40 000)	n=312	35 000 (50 000)	n=21	25 000 (30 000)
Historique de tabagisme	n=310		n=135		n=347		n=32	
Positif		56%		53%		41%		41%

Dans les deux groupes de cas et de témoins, les participants à l'étude et ceux qui ont refusé d'y participer, montrent des distributions semblables pour ce qui est des variables de sexe et de statut tabagique. Quant à l'âge et le niveau d'éducation, on constate que la proportion de refus était la plus élevée dans le groupe d'âge de 71-80 ans (41% chez les témoins et 43% chez les cas), alors que cette catégorie ne représentait que 32% des sujets qui ont participé. Aussi, les cas qui ont atteint au moins des études collégiales représentaient 30 % des cas qui ont refusé et 59% des cas qui ont participé. Pour les témoins, les sujets les moins instruits (enseignement primaire) représentaient 3 % de ceux qui ont participé et 13 % de ceux qui ont refusé de participer. La plupart des témoins qui ont participé à l'étude ont obtenu des diplômes d'études secondaires, collégiales ou universitaires. Enfin, le revenu personnel annuel médian était moins élevé dans le groupe des sujets qui ont refusé, comparé à celui du groupe des participants.

Bien que certaines de ces caractéristiques puissent avoir un effet sur la volonté différentielle de participer dans les deux groupes de cas et de témoins, le biais de sélection conséquent serait réduit par le contrôle de ces variables dans l'analyse de l'association entre la MP et le CCR. En effet, l'âge, le sexe, le niveau d'éducation atteint, le revenu annuel personnel et la consommation

cumulée de cigarettes durant la vie, sont considérées des facteurs de confusion pour lesquels notre modèle de régression multiple est ajusté.

À titre d'analyse complémentaire, nous avons vérifié l'effet de l'ajustement du modèle de régression multiple, pour chacune de ces cinq variables, sur la mesure d'association entre la MP et CCR (RR et IC à 95%). La mesure d'association reste inchangée, sauf très légèrement entre le modèle de régression complet (1,45; IC à 95% : 1,04-2,01) et le même modèle excluant la variable d'éducation (1,43; IC à 95% : 1,03-1,98).

Enfin, on rappelle que le contrôle pour la variable d'éducation était d'emblée guidé par le DAG de l'association entre la MP et le CCR, puisqu'elle est définie comme variable confondante. Ce qui permet de réduire à la fois le biais de confusion et le biais de sélection qu'elle aurait possiblement engendrés.

5.2 Article 2- Is a *Fusobacterium nucleatum* infection in the colon a risk factor for colorectal cancer? A systematic review and meta-analysis protocol

Article publié à *Systematic Reviews* (2019) 8:114

Amal Idrissi Janati¹, Igor Karp^{2,3}, Hisham Sabri⁴ and Elham Emami^{5*}

¹ Faculté de médecine dentaire, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

² Département d'épidémiologie et de biostatistique de l'École de médecine et de médecine dentaire Schulich, Université Western Ontario, London, Ontario, Canada.

³ Département de médecine sociale et préventive, École de santé publique, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

⁴ Département de psychologie, Université de Concordia, Montréal, Québec, Canada.

⁵ Faculté de médecine dentaire et des sciences de la santé orale, Université McGill, Montréal, Québec, Canada.

* Auteur correspondant

L'article tel qu'il est publié est présenté en Annexe 4.

5.2.1 Contributions des auteurs

A. Idrissi Janati a développé ce protocole de revue et réalisé une revue de littérature préliminaire. Elle a conçu la stratégie de recherche avec un bibliothécaire experte de l'Université de Montréal. Elle a rédigé le manuscrit, soumis pour publication et suivi les révisions demandées. I. Karp et E. Emami ont participé à la conception et la méthodologie de l'étude, révisé et corrigé le manuscrit de l'étude. H. Sabri a participé à la rédaction du protocole.

5.2.2 Manuscrit

LIST OF ABBREVIATIONS

CRC: Colorectal cancer

CDSR: Cochrane Database of Systematic Reviews

FISH: Fluorescence in situ hybridization

F. nucleatum: *Fusobacterium nucleatum*

GRADE: Grading of Recommendations Assessment, Development, and Evaluation.

MOOSE: Meta-Analysis of Observational Studies in Epidemiology

NOS: Newcastle-Ottawa scale

PRISMA: Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses

PRISMA-P: Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses protocols

PROSPERO: Prospective Register of Systematic Reviews

qPCR: quantitative polymerase chain reaction

ABSTRACT

Background: Despite considerable amount of epidemiological research for identification of risk factors involved in the development of colorectal cancer, the current understanding of the etiology of this disease remains rather poor.

Accumulating evidence suggests a potentially important role of infection with *Fusobacterium nucleatum* in the colon in colorectal carcinogenesis. The objective of this systematic review is to synthesize the epidemiological evidence on the association between infection with *Fusobacterium nucleatum* in the colon and colorectal cancer.

Methods: This systematic review will include observational studies (cohort, case-control, cross-sectional) in humans in which the role of *Fusobacterium nucleatum* in the etiology of colorectal cancer was investigated. MEDLINE, EMBASE, Web of Science and Cochrane Database of Systematic Reviews will be searched using a comprehensive search strategy and manual screening of references. Two reviewers will independently identify eligible studies and extract the data from the included studies. The quality of studies will be assessed by using the Newcastle-Ottawa scale. Random-effects models will be used to estimate pooled measures of association (where feasible). Meta-regression and subgroup analyses will be conducted to explore the potential sources of heterogeneity. The Meta-Analysis of Observational Studies in Epidemiology (MOOSE) guidelines and the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) statement will be followed for reporting.

Discussion: Deepening knowledge regarding the etiology of colorectal cancer and the potential implications of *Fusobacterium nucleatum* in this disease is instrumental for prevention, diagnosis, and treatment of this often-fatal disease. This review will produce summarized current evidence on this topic.

Systematic review registration: This systematic review protocol is registered in the International Prospective Register of Systematic Reviews (PROSPERO) under the registration number CRD42018095866.

BACKGROUND

Rationale

In 2012, over a million new cases of colorectal cancer (CRC) and more than half a million deaths due to CRC were estimated to occur globally¹. Of cancers that affect both men and women, CRC is the third most commonly diagnosed malignancy and the fourth most fatal in the world². The numbers of new cases of CRC and CRC deaths are expected to increase to 60% by 2030².

The etiology of CRC is widely recognized as being multifactorial^{3, 4}, and previous research has suggested that modification of environmental and lifestyle factors can lead to important changes in cancer risk^{5, 6}. Still, according to comprehensive reviews of the available evidence conducted by expert panels from the American Institute for Cancer Research and the World Cancer Research Fund, the overall evidence for the causal nature of the association with CRC is considered convincing for only some of the previously suggested factors, namely excess body fat, consuming processed meats and red meat, physical inactivity, cigarette smoking, and alcohol consumption⁷. For the majority of the putative risk factors, the level of evidence is considered either fair or inadequate⁷⁻¹⁰. Thus, identification of modifiable risk factors that could serve as targets for preventive interventions is a current public-health priority.

In the past few years, advances in high-throughput sequencing technologies have led to important discoveries on the role of gut microbial dysbiosis and specifically, of *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) in colorectal carcinogenesis¹¹⁻²¹. *F. nucleatum* is a gram-negative, non-spore-forming anaerobic bacterium commonly found in saliva and oral biofilm^{18, 22, 23}. It is one of the dominant species of more than 500 organisms of the oral cavity and has five subspecies with different specific genome sequences²⁴⁻³¹. This invasive proinflammatory agent is involved in the pathogenesis of periodontal diseases³² as well as of other oral³³ and extra-oral infections^{34, 35}. *F. nucleatum* can independently invade host cells via surface adhesins and invasion molecules such as FadA^{21, 36}. Importantly, once disseminated outside the oral cavity, FadA activates proinflammatory and oncogenic signals and stimulates the growth of epithelial cells. Human studies have demonstrated that the FadA gene level in CRC tissue is higher than in normal tissue and is correlated with

expression of inflammatory genes²¹. Furthermore, a recent study found a strong correlation between *F. nucleatum* and proinflammatory markers such as COX-2, IL-8, IL-6, IL1 β and TNF- α in CRC¹⁵. This evidence suggests that colonization resistance of the healthy gut can be disrupted by bacterial species that trigger a systematic inflammatory response, such as seen in periodontal disease. In a study by Dejea *et al.*³⁷, the rate of CRC occurrence was more than five times as high in individuals with gut bacterial biofilms as in those without them³⁷. Interestingly, the gut bacterial biofilm composition and invasiveness were similar to those found in oral biofilm in periodontal disease, with *Fusobacteria* being a dominant species³⁷.

F. nucleatum is now considered to be a pathogenic bacterium of the gut that can invade the colorectal submucosa and epithelium. Various studies have shown an overabundance of *F. nucleatum* in tumors and fecal samples³⁸ of CRC patients^{15, 17, 19-21, 39}. Additionally, some studies have demonstrated that levels of *F. nucleatum* increased in parallel with the transition from healthy colorectal tissue to adenomas and finally to CRC⁴⁰⁻⁴². *F. nucleatum* levels in cancerous colorectal tissue have also been shown to serve as a prognostic indicator in CRC^{11, 40, 43}. *In vitro* and *in vivo* studies showed that *F. nucleatum* interrupts oncogene signaling and cell–cell adhesion and inhibits the anti-tumor activities of natural killer and cytotoxic T-cells as well as anti-tumor immunity^{39, 44}. Increased levels of *F. nucleatum* have been shown to be associated with microsatellite instability and molecular subsets of CRCs such as the CpG island methylator phenotype^{11, 45}. Decreased expression of MLH1, a primary cause of microsatellite instability, was found in samples abundant in *F. nucleatum*^{13, 43}. Other markers of poor prognosis such as KRAS and BRAF are also overexpressed in samples rich in *F. nucleatum*^{13, 46, 47}. Moreover, CRC patients have been found to have an increased level of serum anti-*F. nucleatum* antibodies⁴⁸.

The literature on the association between *F. nucleatum* and CRC is growing but has not yet been systematically reviewed to date. We aim to conduct a systematic review of observational studies on the association between *F. nucleatum* and CRC.

OBJECTIVES

The aim of this review is to systematically identify, review, and assess the quality of available literature on the association between *F. nucleatum* and CRC. The findings of this systematic review will help answer the following question: Does *F. nucleatum* play a role in the etiology of CRC? If feasible, a meta-analysis will be conducted to estimate pooled measures of association between *F. nucleatum* and CRC.

METHODS

The protocol has been developed in accordance with the preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols 2015 (PRISMA-P)^{49, 50}, which is available in Additional file 1. However, as at issue in this review is the topic of disease etiology (rather than intervention effects), the PICO format will be replaced by PECO (population, exposure, control, outcome), as detailed in the MOOSE (the Meta-analysis of Observational Studies in Epidemiology) guidelines⁵¹.

Eligibility criteria

Studies will be selected according to the following criteria:

Study design

Original observational research studies that address the association between *F. nucleatum* and CRC will be included in this review. This includes cohort studies, case-control studies, and cross-sectional studies. Case reports, position papers, and reviews will be excluded from the current review.

Participants/population

The population of interest will be unrestricted in terms of age, sex, ethnicity, socioeconomic status, occupation, or history of other diseases.

Exposure

The review will consider the exposure of interest, the *F. nucleatum* infection in the colon. Ascertainment of this infection should be based on tests such as quantitative polymerase chain reaction (qPCR), 16S rRNA gene sequencing, or Fluorescence in situ hybridization (FISH).

Comparator

The comparator category will be the absence of the *F. nucleatum* infection in the colon.

Outcomes

The outcome of interest will be the presence of CRC, based on clinically confirmed diagnosis (i.e., cancer registry, hospital or doctors' records).

Setting and language

There will be no restriction by study setting. English- and French-language publications will be considered for full-text analysis in this systematic review, and eligible articles in other languages will be translated using Google Translate.

Information sources

An electronic literature search will be conducted in the following databases: MEDLINE (OVID interface, 1946 onwards), EMBASE (OVID interface, 1974 onwards), Web of Science and Cochrane Database of Systematic Reviews (CDSR). Since most of the research conducted on this topic has been carried out in the past 10 years, the start date for the literature search will not be limited in order to maximize the number of publications considered. The electronic literature search will be complemented by hand searching the list of references in the identified publications or relevant reviews. NICE Evidence and TRIP database will be searched for grey literature using subject keywords. Ongoing studies (which have not resulted in publications on the topic at issue) will not be considered in the review.

Search strategy

Using medical subject headings (MeSH), EMTREEs and text words related to the field of the study, the research team has developed a draft version of literature search strategies with the help of an expert librarian at Université de Montréal (Additional file 2). This draft of the MEDLINE search strategy will be finalized and adapted to the other databases using the proper syntax, subject headings and controlled vocabulary considering maximized sensitivity of the search. In order to maximize the yield of the search strategy, no language restrictions in the search strategy will be used. Hand searching the list of references in the identified publications, NICE Evidence and TRIP database will be done to identify the relevant articles in the grey literature. The PROSPERO will be searched for recently completed systematic reviews on the topic. The references of relevant studies will be verified for relevant publications.

Study records

Data management, selection and data collection process

Data will be collected using EndNote software and a pre-designed data collection form. The reliability of data selection process will be pilot tested in 10% of randomly included articles, and Cohen's kappa will be calculated to assess the inter-reviewer (AIJ, EE) agreement on study eligibility. Two independent reviewers (AIJ, EE) will screen all retrieved titles and abstracts using the eligibility criteria. In the case of incomplete information provided by the title and abstract, the full text will be used to determine the study's eligibility to be included for the study. In the case of multiple reports of the same study, the most recent article will be included in the review.

Disagreements between the two reviewers will be resolved by discussion and resolved through consensus-seeking. If agreement cannot be achieved, the opinion of a third reviewer (IK) will be sought.

Data items

The data will be extracted independently by 2 reviewers (AIJ, EE) from the full text of the included studies. The extracted information will include: authors, country, year of publication, aim of the study, study design, sample size, study participants' characteristics (age, sex, the stage of CRC for cases), study population, exposure description, the technique used to quantify the exposure, type and number of controls, and the number of *F.nucleaum*-positive, as well as the main results. In the case of insufficient data, we will contact authors via email for additional information. If the missing data cannot be rectified by author contact, we will use narrative approaches to describe the major findings.

Outcomes and prioritization

As stated in the outcomes section, colorectal cancer will be the study outcome.

Risk of bias and level of evidence

Two reviewers will independently assess the risk of bias of the eligible studies using the Newcastle-Ottawa scale (NOS)⁵². This 8-items scale allows to assess the quality of the articles based on: the selection of the study groups; the comparability of the groups; and the ascertainment of either the exposure or outcome of interest for case-control or cohort studies, respectively. Disagreement will be resolved by consultation with a third reviewer.

We will also evaluate the level of evidence of all studies according to the Oxford Level of Evidence⁵³.

DATA SYNTHESIS

We will use two approaches for data synthesis. The descriptive synthesis will be conducted according to the Centre for Reviews and Dissemination⁵⁴ and will include text and tables to summarize the characteristics of the findings and explain the findings. Where feasible (availability of two or more studies with similar study design, estimates of 'relative' measures of association (risk ratio, incidence-odds ratio, rate ratio, hazard ratio, prevalence ratio, prevalence-odds ratio) and their corresponding measures of imprecision (standard error, confidence interval)), the data will be pooled using a random-effects model.

Heterogeneity across studies will be tested using Cochran's Q and the I^2 statistic. To examine the potential sources of heterogeneity (due to person characteristics, study design, etc.) across the studies, subgroup analyses and meta-regression will be conducted. We will use the Comprehensive Meta-Analysis Version 2 to conduct the meta-analysis⁴.

Meta-biases

The potential publication bias will be assessed by funnel plots⁵⁵. Tests for funnel plot asymmetry will be conducted if the number of studies included in the meta-analysis is more than 10⁵⁶.

Confidence in cumulative evidence

The Oxford Level of Evidence^{57, 58} and The Grading of Recommendations Assessment, Development, and Evaluation (GRADE) approach will be used to evaluate the level of evidence of all studies.

Differences between the protocol and the review

Any deviations from the protocol due to unanticipated issues will be reported in the final review⁵⁹.

DISCUSSION

This systematic review will assess the role of *F. nucleatum* in the etiology of CRC. Specifically, we will identify, assess, and synthesize the available evidence from published observational studies on the role played by *F. nucleatum infestation* in the colon in the development of CRC.

Caution will have to be taken when interpreting the results of this systematic review. We are aware that observational studies are subject to a high risk of bias due to potential outcome confounding. In addition, if the heterogeneity of the studies is high, this may preclude obtaining a meaningful pooled estimate of the association of interest (or introduce challenges in interpreting a pooled estimate of the association).

Despite the above limitations, we expect that the systematic review proposed here will be of high scientific and pragmatic value. The study aims to facilitate achieving a comprehensive and up-to-date understanding of the association between *F. nucleatum* and CRC. To our knowledge, our systematic review will be the first to synthesize the available evidence on this association. Findings from this study could help pave the way for the development of new methods of prevention, diagnosis, and treatment of CRC.

References

1. Ferlay JS EM, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase. In: GLOBOCAN 2012 v10 V, editor: Lyon, France. International Agency for Research on Cancer 2013.
2. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, et al. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut* 2017;66(4):683-91.
3. Grady WM, Markowitz SD. The Molecular Pathogenesis of Colorectal Cancer and Its Potential Application to Colorectal Cancer Screening. *Dig Dis Sci* 2014.
4. Mundade R, Imperiale TF, Prabhu L, Loehrer PJ, Lu T. Genetic pathways, prevention, and treatment of sporadic colorectal cancer. *Oncoscience* 2014;1(6):400-06.
5. Aleksandrova K, Pischon T, Jenab M, et al. Combined impact of healthy lifestyle factors on colorectal cancer: a large European cohort study. *BMC Med* 2014;12(1):168.
6. Marshall JR. Prevention of colorectal cancer: diet, chemoprevention, and lifestyle. *Gastroenterol Clin North Am* 2008;37(1):73-82, vi.
7. World Cancer Research Fund International/American Institute for Cancer Research. Continuous Update Project Report: Diet, Nutrition, Physical Activity and Colorectal Cancer; 2017.
8. National Cancer Institute Cancer of the colon and rectum. 2010. "<http://www.cancer.gov/cancertopics/types/colon-and-rectal>".
9. Vano YA, Rodrigues MJ, Schneider SM. [Epidemiological link between eating habits and cancer: the example of colorectal cancer]. *Bull Cancer* 2009;96(6):647-58.
10. World Cancer Research Fund International Dutch Review Team The associations between food, nutrition and physical activity and the risk of colorectal cancer and underlying mechanisms. The Netherlands: American Institute for Cancer Research 2006. "<http://www.dietandcancerreport.org/>".
11. Mima K, Nishihara R, Qian ZR, et al. *Fusobacterium nucleatum* in colorectal carcinoma tissue and patient prognosis. *Gut* 2015.
12. Yang Y, Weng W, Peng J, et al. *Fusobacterium nucleatum* Increases Proliferation of Colorectal Cancer Cells and Tumor Development in Mice by Activating TLR4 Signaling to NFkappaB, Upregulating Expression of microRNA-21. *Gastroenterology* 2016.
13. Ito M, Kanno S, Nosho K, et al. Association of *Fusobacterium nucleatum* with clinical and molecular features in colorectal serrated pathway. *Int J Cancer* 2015.
14. Bashir A, Miskeen AY, Bhat A, Fazili KM, Ganai BA. *Fusobacterium nucleatum*: an emerging bug in colorectal tumorigenesis. *Eur J Cancer Prev* 2015.
15. Kostic AD, Chun E, Robertson L, et al. *Fusobacterium nucleatum* potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment. *Cell Host & Microbe* 2013;14(2):207-15.
16. Kostic AD, Gevers D, Pedamallu CS, et al. Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome Res* 2012;22(2):292-8.
17. Allen-Vercoe E, Jobin C. *Fusobacterium* and Enterobacteriaceae: Important players for CRC? *Immunol Lett* 2014;162(2PA):54-61.
18. Allen-Vercoe E, Strauss J, Chadee K. *Fusobacterium nucleatum*: an emerging gut pathogen? *Gut Microbes* 2011;2(5):294-8.
19. Warren RL, Freeman DJ, Pleasance S, et al. Co-occurrence of anaerobic bacteria in colorectal carcinomas. *Microbiome* 2013;1(1):16.

20. Castellarin M, L. WR, Freeman JD, et al. *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome Research* 2012;22(2):299-306.
21. Rubinstein MR, Wang X, Liu W, et al. *Fusobacterium nucleatum* Promotes Colorectal Carcinogenesis by Modulating E-Cadherin/ β -Catenin Signaling via its FadA Adhesin. *Cell Host & Microbe* 2013;14(2):195-206.
22. Shet UK, Oh HK, Kim HJ, et al. Quantitative analysis of periodontal pathogens present in the saliva of geriatric subjects. *J Periodontal Implant Sci* 2013;43(4):183-90.
23. Han YW. *Fusobacterium nucleatum*: a commensal-turned pathogen. *Curr Opin Microbiol* 2015;23:141-7.
24. Karpathy SE, Qin X, Gioia J, et al. Genome sequence of *Fusobacterium nucleatum* subspecies polymorphum - a genetically tractable fusobacterium. *PLoS One* 2007;2(7):e659.
25. Park SN, Cho E, Kim HS, et al. Draft Genome Sequence of *Fusobacterium nucleatum* subsp. animalis ChDC F324, Isolated from a Human Subgingival Plaque in the Republic of Korea. *Genome Announc* 2013;1(6).
26. Park SN, Kong SW, Park MS, et al. Draft genome sequence of *Fusobacterium nucleatum* subsp. fusiforme ATCC 51190T. *J Bacteriol* 2012;194(19):5445-46.
27. Park SN, Cho E, Kim HS, et al. Draft Genome Sequence of *Fusobacterium nucleatum* subsp. nucleatum ChDC F316, Isolated from a Human Peri-implantitis Lesion in the Republic of Korea. *Genome Announc* 2013;1(6).
28. Park SN, Cho E, Kim HS, et al. Draft Genome Sequence of *Fusobacterium nucleatum* subsp. vincentii ChDC F8, Isolated from a Human Subgingival Plaque in the Republic of Korea. *Genome Announc* 2013;1(6).
29. Kapatral V, Ivanova N, Anderson I, et al. Genome analysis of *F. nucleatum* sub spp vincentii and its comparison with the genome of *F. nucleatum* ATCC 25586. *Genome Res* 2003;13(6A):1180-89.
30. Park SN, Kong SW, Kim HS, et al. Draft genome sequence of *Fusobacterium nucleatum* ChDC F128, isolated from a periodontitis lesion. *J Bacteriol* 2012;194(22):6322-3.
31. Kapatral V, Anderson I, Ivanova N, et al. Genome sequence and analysis of the oral bacterium *Fusobacterium nucleatum* strain ATCC 25586. *J Bacteriol* 2002;184(7):2005-18.
32. Liu Y, Huang X, Yan Y, et al. Dental fear and its possible relationship with periodontal status in Chinese adults: a preliminary study. *BMC Oral Health* 2015;15:18.
33. Signat B, Roques C, Poulet P, Duffaut D. *Fusobacterium nucleatum* in Periodontal health and Disease. *Curr Issues Mol Biol* 2011;13:25-36.
34. Swidsinski A, Dörffel Y, Loening-Baucke V, et al. Acute appendicitis is characterized by local invasion with *Fusobacterium nucleatum/necrophorum*. *Gut* 2011;60:34-40.
35. Han YW, Wang X. Mobile Microbiome: Oral Bacteria in Extra-oral Infections and Inflammation. *Journal of Dental Research* 2013;92(6):485-91.
36. Keku TO, McCoy AN, Azcarate-Peril AM. *Fusobacterium* spp. and colorectal cancer: cause or consequence? *Trends in Microbiology* 2013;21(10):506-08.
37. Dejea CM, Wick EC, Hechenbleikner EM, et al. Microbiota organization is a distinct feature of proximal colorectal cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2014;111(51):18321-6.
38. Gao Z, Guo B, Gao R, Zhu Q, Qin H. Microbiota dysbiosis is associated with colorectal cancer. *Front Microbiol* 2015;6:20.

39. Sears CL, Garrett WS. Microbes, microbiota, and colon cancer. *Cell Host & Microbe* 2014;15(3):317-28.
40. Flanagan L, Schmid J, Ebert M, et al. *Fusobacterium nucleatum* associates with stages of colorectal neoplasia development, colorectal cancer and disease outcome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014;33(8):1381-90.
41. McCoy AN, Araujo-Perez F, Azcarate-Peril A, et al. *Fusobacterium* is associated with colorectal adenomas. *PLoS One* 2013;8(1):e53653.
42. Yu YN, Yu TC, Zhao HJ, et al. Berberine may rescue *Fusobacterium nucleatum*-induced colorectal tumorigenesis by modulating the tumor microenvironment. *Oncotarget* 2015;6(31):32013-26.
43. Wei Z, Cao S, Liu S, et al. Could gut microbiota serve as prognostic biomarker associated with colorectal cancer patients' survival? A pilot study on relevant mechanism. *Oncotarget* 2016;7(29):46158-72.
44. Whitmore SE, Lamont RJ. Oral bacteria and cancer. *PLoS Pathog* 2014;10(3):e1003933.
45. Tahara T, Shibata T, Kawamura T, et al. *Fusobacterium* detected in colonic biopsy and clinicopathological features of ulcerative colitis in Japan. *Dig Dis Sci* 2015;60(1):205-10.
46. Roth AD, Tejpar S, Delorenzi M, et al. Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial. *J Clin Oncol* 2010;28(3):466-74.
47. Therkildsen C, Bergmann TK, Henrichsen-Schnack T, Ladelund S, Nilbert M. The predictive value of KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA and PTEN for anti-EGFR treatment in metastatic colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Acta Oncol* 2014;53(7):852-64.
48. Wang HF, Li LF, Guo SH, et al. Evaluation of antibody level against *Fusobacterium nucleatum* in the serological diagnosis of colorectal cancer. *Sci Rep* 2016;6:33440.
49. Shamseer L, Moher D, Clarke M, et al. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015: elaboration and explanation. *Bmj* 2015;350:g7647.
50. Moher D, Shamseer L, Clarke M, et al. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015 statement. *Syst Rev* 2015;4:1.
51. Stroup DF, Berlin JA, Morton SC, et al. Meta-analysis of observational studies in epidemiology: a proposal for reporting. Meta-analysis Of Observational Studies in Epidemiology (MOOSE) group. *Jama* 2000;283(15):2008-12.
52. Wells GA SB, O'Connell D, Peterson J, Welch V, Losos M, Tugwell P. The Newcastle-Ottawa Scale (NOS) for Assessing the Quality of Nonrandomised Studies in Meta-Analyses. 2004. "http://www.ohri.ca/programs/clinical_epidemiology/oxford.asp".
53. Soder B, Yakob M, Meurman JH, et al. Periodontal disease may associate with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2011;127(2):497-502.
54. Centre for Reviews and Dissemination. *Systematic Reviews. CRD's guidance for undertaking reviews in health care.* York: Centre for Reviews and Dissemination: University of York; 2009.
55. Sutton AJ, Duval SJ, Tweedie RL, Abrams KR, Jones DR. Empirical assessment of effect of publication bias on meta-analyses. *Bmj* 2000;320(7249):1574-7.
56. Higgins JPT GSe *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions Version 5.1.0 [updated March 2011].* 2011. "<http://handbook.cochrane.org>".
57. OCEBM Levels of Evidence Working Group *The Oxford 2011 Levels of Evidence.* Oxford Centre for Evidence-Based Medicine. "<http://www.cebm.net/index.aspx?o=5653>".

58. Guyatt G, Oxman AD, Akl EA, et al. GRADE guidelines: 1. Introduction-GRADE evidence profiles and summary of findings tables. *J Clin Epidemiol* 2011;64(4):383-94.
59. Silagy CA, Middleton P, Hopewell S. Publishing protocols of systematic reviews: comparing what was done to what was planned. *Jama* 2002;287(21):2831-4.

5.3 Article 3- Detection of *Fusobacterium nucleatum* in feces and colorectal mucosa as a risk factor for colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis.

Article publié à *Systematic Reviews* (2020), 9:276.

Amal Idrissi Janati¹, Igor Karp^{2,3}, Claudie Laprise⁴, Hisham Sabri⁴ and Elham Emami^{4*}.

¹ Faculté de médecine dentaire, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

² Département d'épidémiologie et de biostatistique de l'École de médecine et de médecine dentaire Schulich, Université Western Ontario, London, Ontario, Canada.

³ Département de médecine sociale et préventive, École de santé publique, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

⁴ Faculté de médecine dentaire et des sciences de la santé orale, Université McGill, Montréal, Québec, Canada.

* Auteur correspondant.

L'article tel qu'il est publié dans la revue est présenté en Annexe 5.

5.3.1 Contribution des auteurs

A. Idrissi Janati a procédé à toutes les étapes de la réalisation de la revue systématique et de la méta-analyse, a rédigé le manuscrit en totalité et conçu tous les tableaux et figures. I. Karp et E. Emami ont conseillé sur toutes les questions méthodologiques, les analyses statistiques et révisé le manuscrit. C. Laprise et H. Sabri ont participé à la sélection des études et à l'extraction des données et ont révisé le manuscrit. Tous les auteurs ont approuvé la version finale de ce manuscrit.

5.3.2 Manuscrit

LIST OF ABBREVIATIONS

CRC: Colorectal cancer

F. nucleatum: *Fusobacterium nucleatum*

CI: Confidence interval

OR: Odds ratio

PRISMA: Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-analyses

MOOSE: Meta-analysis of Observational Studies in Epidemiology

NOS: Newcastle Ottawa scale

AHRQ: Agency for Healthcare Research and Quality

RA: Relative abundance

RQ: Relative quantification

IBD: Inflammatory bowel disease

PCR: Polymerase chain reaction

qPCR: Quantitative polymerase chain reaction

FISH: Fluorescence in situ hybridization.

ABSTRACT

Background: Colorectal cancer (CRC) is a major cause of cancer deaths worldwide. Accumulating evidence suggests a potentially important role of colorectal infection with *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) in colorectal carcinogenesis. We conducted a systematic review, including both a qualitative synthesis and a meta-analysis, to synthesize the evidence from the epidemiological literature on the association between *F. nucleatum* detection in the colon/rectum and CRC.

Methods: A systematic literature search of Ovid MEDLINE(R), Embase, Web of Science Core Collection, EBM Reviews – Cochrane Database of Systematic Reviews, and CINAHL Plus with Full Text was conducted using earliest inclusive dates up to 4 October 2020. Eligible studies were original, comparative observational studies that reported results on colorectal *F. nucleatum* detection and CRC. Two independent reviewers extracted the relevant information. Odds ratio (OR) estimates were pooled across studies using the random-effects model. Newcastle-Ottawa scale was used to critically appraise study quality.

Results: Twenty-four studies were included in the systematic review, of which 12 were included in the meta-analysis. Studies investigated *F. nucleatum* in feces, colorectal tissue samples, or both. In most studies included in the systematic review, the load of *F. nucleatum* was higher, on average, in specimens from CRC patients than in those from CRC-free controls. Meta-analysis showed a positive association between *F. nucleatum* detection in colorectal specimens and CRC (OR= 8.3; 95% Confidence interval (95%CI): 5.2 to 13.0).

Conclusions: The results of this systematic review suggest that *F. nucleatum* in the colon/rectum is associated with CRC.

BACKGROUND

Colorectal cancer (CRC) is a significant burden on global public health: it is the fourth and third most commonly diagnosed cancer in men and women,¹ respectively, with more than a million new cases per year worldwide.² It is also the fourth leading cause of death from cancer in the world.¹ While some CRC cases are attributed to inheritance and inflammatory bowel disease, about 80% of them are sporadic.³ Thus, identification of etiological factors is essential for efforts to reduce the morbidity and mortality from CRC.

Over the years, epidemiological studies have identified a number of CRC risk factors, such as diet, cigarette smoking, obesity, physical inactivity, diabetes, and certain genetic polymorphisms.⁴⁻¹¹ Furthermore, the role of some bacteria in colon carcinogenesis seems quite plausible.^{12, 13} In 2011, Sears and Pardoll suggested that bacteria are the main drivers of the intestinal mucosa immune response and subsequent changes in the function and genetics of epithelial cells, which support oncogenic transformation.¹⁴ These ideas have rapidly gained credibility due to important discoveries on the role of gut microbial dysbiosis and specifically, of the bacterium *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) in colorectal carcinogenesis.¹⁵⁻²⁵ *F. nucleatum* is one of the dominant species of 500 or more organisms that coexist in the oral cavity²⁶ and the most prevalent oral species in extra-oral infections.^{27, 28} Two virulence factors have been identified for *F. nucleatum*: an adhesin FadA and a self-transporting protein Fap2.²⁸ On the one hand, FadA allows *F. nucleatum* to invade human epithelial cells, activate β -catenin signaling, induce expression of the oncogenic gene, and promote the growth of colorectal tumor cells.^{24, 25, 29-32} On the other hand, the protein Fap2 inhibits the activity of immune cells and thus potentiates the progression of CCR.^{32, 33} This suggests that *F. nucleatum* may participate in the colorectal tumor process and thus be a pro-oncogenic bacterium. In a murine model of CRC (APC +/-), the introduction of *F. nucleatum* increased tumor multiplicity and the selective recruitment of myeloid cells infiltrating tumors, thereby promoting tumor progression.¹⁸ *F. nucleatum* also stimulates the recruitment of tumor-infiltrating immune cells, which generates an inflammatory microenvironment conducive to the progression of colorectal neoplasia.¹⁸ Mouse tumors (APC

+/-) exposed to *F. nucleatum* have a pro-inflammatory expression, similar to that observed in human colorectal tumors positive for *F. nucleatum*.¹⁸

Over the last decade, many subsequent studies have reported an overabundance of *F. nucleatum* in colorectal tissues and stools from subjects diagnosed with CRC compared with CRC-free “controls.” The literature on this topic has been growing rapidly but has not yet been reviewed. We therefore conducted a systematic review and a meta-analysis to review the available literature on the association between *F. nucleatum* infection in the colon and CRC.

METHODS

This systematic review protocol has been registered with the International Prospective Register of Systematic Reviews (PROSPERO) on 10 July 2018 (registration number CRD42018095866). The protocol for this systematic review was published previously.³⁴ This systematic review follows the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) guidelines as well as the Meta-analysis of Observational Studies in Epidemiology (MOOSE) guidelines (see Additional file 1 for PRISMA checklist).

Search strategy

Literature search covered the following databases: All Ovid MEDLINE(R), Embase, Web of Science Core Collection, EBM Reviews – Cochrane Database of Systematic Reviews, and CINAHL Plus with Full Text. A comprehensive search from each database’s earliest inclusive dates (1946 for Ovid Medline, 1974 for Embase, 1945 for Web of Science, and 2008 for EBM Reviews) to 31 December 2018 was first conducted. Specific details regarding the search strategies appear in Table 11. The electronic literature search was complemented by hand-searching the list of references in the identified publications.

An update of the literature search was then carried out on 4 October 2020, in order to identify additional human studies that were published in French and English, since the initial search.

Tableau 11. – Initial search strategy

Database and search dates	Search #1	Search #2	Search #3	Search #4	Search #5
All Ovid MEDLINE(R). January 1, 1946, to December 31, 2018	exp Colonic Polyps/ or exp Colorectal Neoplasms/	((colon\$ or colorect\$ or rect\$ or sigmoid) adj5 (polyp\$ or adeno\$ or cancer\$ or carcinoma\$ or malignan\$ or metastas\$ or neoplas\$ or oncolog\$ or tumo\$)).tw.	#1 OR #2	Fusobacterium nucleatum/ or exp Fusobacterium Infections/ or nucleatum.tw.	#3 AND #4
Embase. January 1, 1974 to December 31, 2018	exp Colon Polyp/ or exp Colorectal Tumor/	((colon\$ or colorect\$ or rect\$ or sigmoid) adj5 (polyp\$ or adeno\$ or cancer\$ or carcinoma\$ or malignan\$ or metastas\$ or neoplas\$ or oncolog\$ or tumo\$)).tw.	#1 OR #2	Fusobacterium nucleatum/ or exp Fusobacterium Infection/ or nucleatum.tw.	#3 AND #4
CINAHL Plus with Full Text. January 1, 1981 to December 31, 2018	TX ((colon* or colorect* or rect* or sigmoid) N5 (polyp* or adeno* or cancer* or carcinoma* or malignan* or metastas* or neoplas* or oncolog* or tumo*))	(MH "Colonic Polyps") OR (MH "Colorectal Neoplasms+")	#1 OR #2	(MH "Fusobacterium Infections+") OR TX nucleatum	#3 AND #4
Web of Science Core Collection. January 1, 1945 to December 31, 2018	TOPIC: (((colon* or colorect* or rect* or sigmoid) NEAR/5 (polyp* or adeno* or cancer* or carcinoma* or malignan* or metastas* or neoplas* or oncolog* or tumo*)))	TOPIC: (nucleatum)	#1 AND #2		
EBM Reviews – Cochrane Database of Systematic Reviews. January 1, 2005 to December 31, 2018	((colon\$ or colorect\$ or rect\$ or sigmoid) adj5 (polyp\$ or adeno\$ or cancer\$ or carcinoma\$ or malignan\$ or metastas\$ or neoplas\$ or oncolog\$ or tumo\$)).tw.	nucleatum.tw.	#1 AND #2		

Inclusion and exclusion criteria

Eligible studies were original, comparative observational studies that reported results on colorectal *F. nucleatum* infection in at least two groups: individuals diagnosed with CRC and colorectal-adenoma- and CRC-free subjects (in this article, this population will be referred to as “controls”). No demographic or geographic limitations were applied. Only studies published in English or French were included. Colorectal *F. nucleatum* had to be investigated either in feces or in biopsies from tumors in CRC patients and from healthy colorectal mucosa in “controls.” Ascertainment of *F. nucleatum* infection had to be based on microbiological detection and/or quantification tests such as any polymerase chain reaction (PCR) technique, sequencing, or microscopy visualization (e.g., fluorescence in situ hybridization technique (FISH)). Also, *Fusobacterium* had to be investigated at the species level, and the data had to be available for the particular species of *F. nucleatum*. Studies reporting data on genus or phylum levels only were thus excluded. The data on the CRC status, the outcome of interest, had to be based on laboratory-confirmed diagnosis (and thus had to be ascertained via a cancer registry or medical records).

Study selection

Two independent reviewers (AIJ and CL) performed the study selection process based on title and abstract. Retained studies were then full text screened by the same reviewers independently to verify the inclusion criteria. Any disagreement was resolved by discussion. If consensus could not be reached, a third reviewer determined the eligibility and approved the final list of retained studies.

Quality assessment and data extraction

We used the Newcastle-Ottawa Scale (NOS) to assess the quality of the included observational studies. The scale includes three domains: *Selection* (4 items), *Comparability* (1 item), and *Exposure* (3 items). A study can be awarded a maximum of one star for each numbered item within the selection and exposure categories. A maximum of two stars can be given for comparability. Study quality was then classified as poor, fair, or good, according to the Agency for Healthcare Research and Quality (AHRQ) thresholds for converting NOS scores, described as follows: i) Good quality = 3 or 4 stars in selection domain AND 1 or 2 stars in comparability domain AND 2 or 3 stars in outcome/exposure domain; ii) Fair quality = 2 stars in selection domain AND 1 or 2 stars in comparability domain AND 2 or 3 stars in outcome/exposure domain;

and iii) Poor quality = 0 or 1 star in selection domain OR 0 stars in comparability domain OR 0 or 1 star in outcome/exposure domain.³⁵⁻³⁸

The data from each study were independently extracted by two independent reviewers (AIJ and CL, AIJ and HS) and then reciprocally verified. Disagreements of two reviewers were resolved by discussion. If consensus could not be reached, a third reviewer was consulted. The following information from each article was extracted: authors' names, country, year of publication, aim of the study, study design, study population, sample size (number of cases and number of controls), study participants' characteristics, identification sources, criteria of matching (if any), inclusion and exclusion criteria (including any restriction of last antibiotic consumption, precursors of cancer, or inflammatory bowel disease (IBD)), localization of the tumor (colon or rectal or colorectal tumors), type of collected specimens (stools or biopsies or both), exposure definition (frequency of presence of *F. nucleatum* in specimens, relative abundance or relative quantification of bacteria load), the technique used to detect and quantify the bacterium load, and main results and the accompanying results of statistical tests. For studies comparing more groups with controls and CRC patients (e.g., adenoma or IBD patients), only data on CRC patients and controls was extracted. Similarly, when any included study performed a second validation bacterial analysis on the same participants or on a subsample, only the results of the first technique were extracted. (See supplementary material)

Statistical analysis

We used two approaches for data synthesis, a narrative and a quantitative synthesis using a meta-analysis. The descriptive synthesis was conducted according to the Centre for Reviews and Dissemination and included text and tables to summarize the findings.

To perform a meta-analysis, we included studies reporting any measure of association between *F. nucleatum* and CRC, or reporting proportions or numbers of *F. nucleatum*-positive samples in CRC cases and controls that allowed us to calculate estimates of odds ratios along with the corresponding 95% confidence intervals (CI). Then a pooled OR estimate and its corresponding 95% CI were calculated. The data was pooled using a random-effects model.³⁹ Heterogeneity across studies was tested using Cochran's Q and the I_2 statistic, and potential publication bias was investigated by visual inspection of funnel plots and Egger's regression asymmetry test.

A subgroup meta-analysis using a random-effects model was subsequently performed in order to investigate the change in *F. nucleatum* association to CRC by population area, type of colorectal

specimen, and microbiological test, as well as to verify the effect of including participants with history of IBD or a recent antibiotic use in the included studies. Comprehensive Meta-Analysis Version 3 was used to conduct the meta-analysis.

RESULTS

Search results

Initial search (31December 2018) and its recent update (4 October 2020) retrieved 987 records from databases and 22 additional records through manual search of relevant reviews. After removal of 397 duplicates, 612 articles were screened based on titles and abstracts, which resulted in 514 excluded articles. Ninety-eight full-text publications were assessed for eligibility. Of these, 74 were excluded for not meeting inclusion criteria. Finally, 24 studies⁴⁰⁻⁶³ were included in the systematic review, of which 12 were included in the meta-analysis. Figure 5 shows the study flow diagram.



PRISMA 2009 Flow Diagram

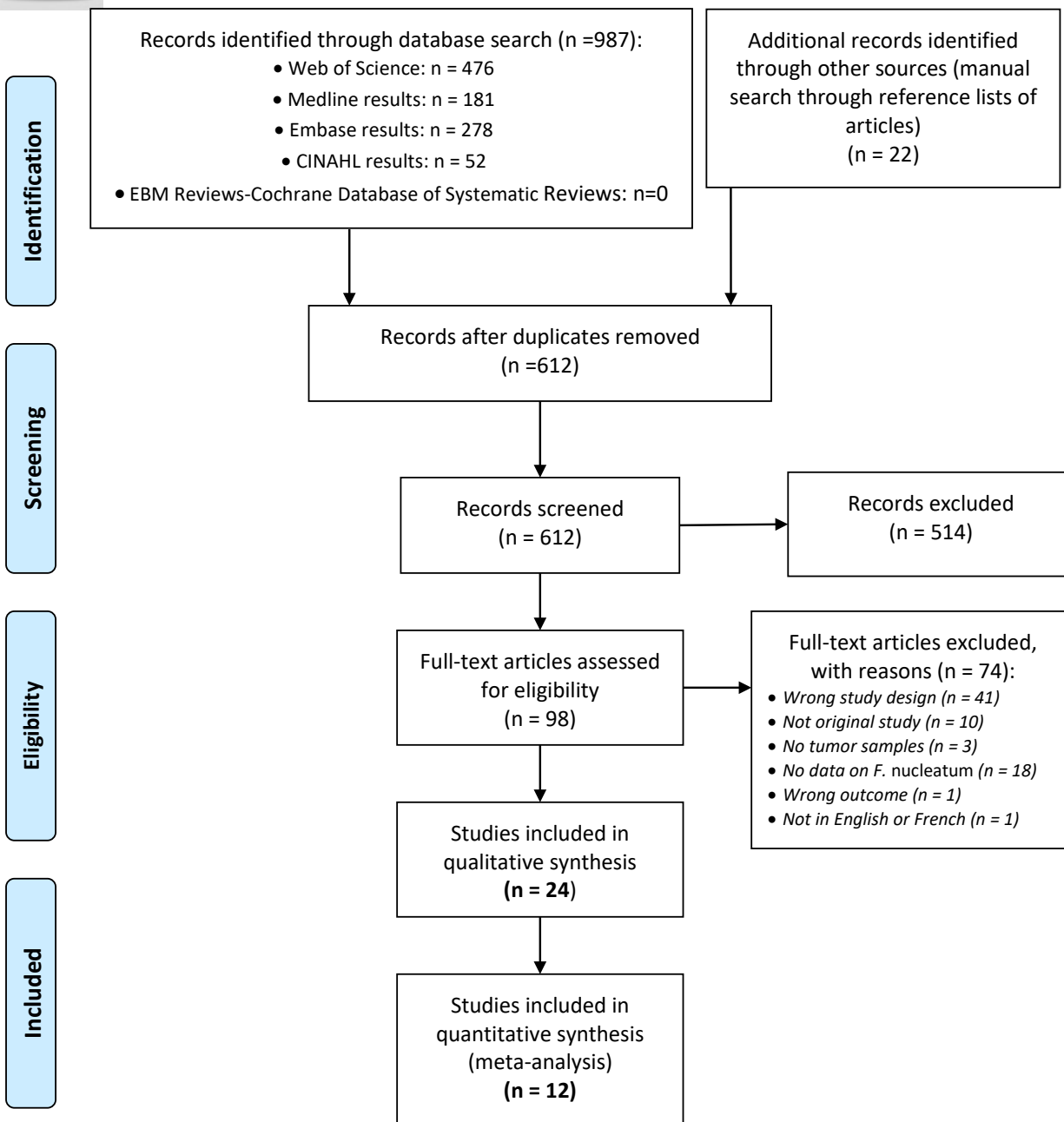


Figure 5. – Flow diagram for selection of studies included in the systematic review and meta-analysis

Characteristics of studies included in the systematic review

The characteristics of the 24 studies included in the systematic review are summarized in Table 12. Studies were published between 2012 and 2020 and were mostly conducted in Asia: Twelve in China, one in Japan, and two in Iran. Six studies were conducted in Europe (Germany, Spain, Italy, Ireland, Norway, and Sweden), and three in the Americas (two in USA and one in Brazil). Studies were designed as “non-nested” case-control (n=21), cross sectional (n=1), or nested case-control (n=2), with poor or fair quality assessment of 14 studies, according to the AHRQ scale. Studies failed often in fulfilling *Selection of controls* and *Non-response rate* items.

In seven studies, cases and controls were matched for two to four variables, including age, gender, body mass index, ethnicity, and the time period of sample collection.^{42, 47, 50, 51, 53, 54, 57, 62} There were 13 studies that excluded subjects with reported antibiotic use in the last month, or in the last 3 months or 6 months, and 11 studies that excluded patients previously diagnosed with IBD.

The majority of studies investigated *F. nucleatum* in feces only (18 studies), while three studies analyzed biopsies only, and another three studies analyzed both types of specimens. Quantitative PCR was the most used bacteria detection technique followed by sequencing techniques, while only one study used FISH technique.

In most of the included studies, feces were collected before colonoscopy or surgery, except for the study by Yu et al. (2017)⁶⁰ where feces were collected more after colonoscopy than before. Tunsjo et al. (2019)⁶¹ also reported collecting feces either before colonoscopy or one week after. In four studies, no information was provided about the timing of specimen collection^{43, 54, 57}.

Tableau 12. – Characteristics of studies included in the systematic review

First author (Year)	Country	Study design	No. of CRC / C	Age, mean (SD)		Exclusion of subjects with history of antibiotic use (period)	Exclusion of subjects with history of IBD diagnosis	Specimen type	Specimen collection time	Detection method	Study quality based on NOS scores
				CRC	C						
Amitay (2017) ⁴⁰	Germany	NCC	46 /231	66.9 (-)	62.1 (-)	No	Yes	Feces	Before colonoscopy	16S rRNA gene analysis	Poor
Yu (2015) ⁴¹	China	CC	42 /52	---	---	Yes (last 6 months)	Yes	Feces & Biopsy [†]	Feces: non reported Biopsies: left tissues	454 FLX pyrosequenc- ing & PCR	Poor
Zhang (2018) ⁴²	China	CC	130/130	60.5 (9.8)	58.6 (8.9)	Yes (last 6 months)	Yes	Feces	Before colonoscopy	16S rDNA sequencing & PCR	Good
Flanagan (2014) ⁴³	Ireland	CC	7 /25	---	---	No	Yes	Feces	---	q PCR	Poor
Fukugaiti (2015) ⁴⁴	Brazil	CC	7/10	65.4 (1.1)	54.8 (1.3)	Yes (unspecified)	No	Feces	Before colonoscopy	q PCR	Poor
Suehiro (2017) ⁴⁵	Japan	CC	158/60	69 (-)	32 (-)	No	No	Feces	Prior to bowel preparation	dd-PCR	Poor
Rezasoltani(2018) ⁴⁶	Iran	CC	20/31	60.9 (13.5)	59.8 (17)	Yes (last 6 months)	Yes	Feces	Before colonoscopy	q PCR	Poor
Eklof (2017) ⁴⁷	Sweden	NCC	39/65	34 (-)	34 (-)	No	Yes (for C only)	Feces	Prior to bowel preparation	q PCR	Good
Guo (2018) ⁴⁸	China	CC	215/156	---	---	Yes (last 3 months)	Yes	Feces	Time of diagnosis, before resection	q PCR	Poor
Liang (2017) ⁴⁹ Cohort I Cohort II	China China	CC	170/200 33/36	67.2 (11.6) 63.4 (9.6)	59.3 (5.8) 53.2 (12.2)	Yes (last 3 months)	No	Feces	Before or one month after colonoscopy	q PCR	Good
Mira-P (2015) ⁵⁰	Spain	CC	7/9	71.1 (10.1)	52.6 (15.2)	No	No	Feces & Biopsy ^{††}	≥1 week before colonoscopy	q PCR	Good
Repass (2018) ⁵¹	USA	CC	40/40	---	---	No	No	Biopsy	During surgery	q PCR	Fair
Russo (2017) ⁵²	Italy	CC	10/10	---	---	Yes (last 3 months)	No	Feces	1day before surgery for CRC& unspecified for C	q PCR	Poor

Continued											
First author (Year)	Country	Study design	No. of CRC / C	Age mean (SD)		Exclusion of subjects with history of antibiotic use (period)	Exclusion of subjects with history of IBD diagnosis	Specimen type	Specimen collection time	Detection method	Study quality based on NOS scores
				CRC	C						
Votgmann (2016) ⁵³	USA	CC	52/52	61.8 (-)	61.2 (-)	No	No	Feces	Prior to surgery or other treatment	WGSS	Good
Wang (2016) ⁵⁴	China	CC	10/10	54.8 (-)	54 (-)	No	No	Feces	---	PCR	Good
Wang (2012) ⁵⁵	China	CC	46/56	60*	49*	Yes (last 3 months)	Yes (for C only)	Feces	Before surgery for CRC patients & unspecified for C	q PCR	Poor
Wong (2017) ⁵⁶	China	CC	104/102	66.9 (10.1)	57.1 (5.8)	Yes (last 3 months)	Yes	Feces	Prior to bowel preparation for colonoscopy	q PCR	Poor
Wu (2013) ⁵⁷	China	CC	19/20	58.3 (8.7)	53.2 (5.4)	Yes (last 3 months)	Yes (for C only)	Feces	---	q PCR	Good
Xie (2017) ⁵⁸	China	CC	327/242	63.5 (10.2)	60.1 (8.4)	Yes (last month)	No**	Feces	Prior to bowel preparation for surgery or endoscopy	q PCR	Good
Yu (2016) ⁵⁹	China	CC	93/20	59.25(-)	---	No	No	Biopsy	Colonoscopy or surgery	FISH	Poor
Yu (2017) ⁶⁰	China	CC	74/54	63 (50.7)	67 (34.9)	Yes (last 3 months)	Yes	Feces	Before, or mostly after colonoscopy	Metagenomic sequencing	Poor
Tunsjø (2019) ⁶¹	Norway	CC	23/22	70 (-)	57 (-)	No	No	Feces & Biopsy ^{†††}	Prior to bowel preparation or 1 week after colonoscopy	q PCR	Poor
Liu (2020) ⁶²	China	CC	53/45	52.4 (18.8)	53.7 (16.7)	Yes (last month)	Yes	Feces	Prior to bowel preparation for colonoscopy	q PCR	Good
Kashani (2020) ⁶³	Iran	CS	35/45	---	---	No	No	Biopsy	Colonoscopy	PCR	Satisfactory [‡]

No. : number; CRC: colorectal cancer cases; C: controls (colorectal-adenoma- and CRC-free subjects); IBD: inflammatory bowel disease; NCC: nested case-control; CC: case-control; CS: cross sectional; q PCR: quantitative polymerase chain reaction; NOS: Newcastle-Ottawa scale; WGSS: Whole genome shotgun sequencing; dd-PCR: droplet digital PCR; FISH: fluorescent in situ hybridization; --- : not reported; *: median; ** Controls were those with normal or chronic inflamed colorectal mucosa; †: Biopsies were taken from only 31/42 CRC and 37/52 C ; ††: Biopsies were taken from 7/7 CRC and 5/9 C; †††: Biopsies were taken from 21/23 CRC and 11/22 C; ‡: In NOS adapted for CS studies, the study quality is based on the total score and rated as follow: *very good* (9-10 points); *good* (7-8 points); *satisfactory* (5-6 points); and *unsatisfactory* (0 to 4 points).

Comparison of Fusobacterium nucleatum load in colorectal specimens between colorectal cancer cases and controls

As shown in table 13, *F. nucleatum* quantification (load) in colorectal specimens was reported by 18 studies,^{41-50, 52, 53, 55, 56, 58, 60-62} including one study with two independent cohorts.⁴⁹ Bacteria quantification was mostly performed in stool specimens, except for Yu et al. (2015)⁴¹ who quantified the bacteria in both feces and biopsies. Votgmann et al. (2016),⁵³ Wang et al. (2012),⁵⁵ and Zhang et al. (2018)⁴² reported the relative abundance (RA) of the bacteria as a percentage, corresponding to the contribution of *F. nucleatum* to the total bacteria present in specimens.^{42, 53, 55}. Their results confirmed that *F. nucleatum* does not naturally contribute to a healthy gut microbiome (RA varied from 0.001 to 0.003% in controls). When investigated in CRC case specimens, *F. nucleatum* was significantly more abundant than in controls, but still in very small proportions (RA varied from 0.061 to 0.17%). While only four studies reported results of absolute quantification of *F. nucleatum*, either as copy number or bacteria counts, the majority of studies performed relative quantification (RQ) of *F. nucleatum* to the total bacteria present in specimens based on the $\Delta\Delta Cq$ method. These RQ studies reported a significantly higher *F. nucleatum* load in colorectal specimens of CRC patients compared to controls, except for two studies.^{50, 52} Fold change in *F. nucleatum* from controls to CRC cases was estimated by three studies with very different values: 132-fold according to Wong et al. (2017)⁵⁶, 66-fold according to Tunsjo et al. (2015)⁶¹, and 5.2-fold reported by Xie et al. (2017).⁵⁸

Tableau 13. – Studies comparing *Fusobacterium nucleatum* load in colorectal specimens of colorectal cancer cases and controls

First author (Year)	Specimen type (No. of specimens CRC/C)	<i>F. nucleatum</i> quantification measures reported	Statistics reported	<i>F. nucleatum</i> load in CRC compared to C		
				C	CRC	p
Relative abundance :						
Zhang (2018)	Feces (130/130)	Relative contribution to total bacteria (%)	Mean	0.001	0.17	< 0.001
Votgmann (2016)	Feces (52/53)	Relative contribution to total bacteria (%)	Mean	0.003	0.08	0.043
Wang (2012)	Feces (46/56)	Relative contribution to total bacteria (%)	Mean	0.002	0.061	0.005
Absolute quantification :						
Yu (2017)	Feces (74/54)	Bacteria counts	Rank mean	45.09 IMG 40.32 MLG 54.62 OTU	78.66 IMG 82.14 MLG 71.71 OTU	< 0.001
Suehiro (2017)	Feces (158/60)	Absolute copy number of <i>F. nucleatum</i>	Median (min-max)	17.5 (0 - 5793)	317 (0 - 17343)	< 0.0001
Fukugaiti (2015)	Feces (7/10)	Log no. copies of <i>F. nucleatum</i> /gram	Mean±SD (min-max)	4.0 ± 1.5 (1.0 - 6.4)	6.2 ± 1.5 (3.5 - 8.0)	0.01
Mira-P (2015)	Feces (6/10)	Log no. gene copies of <i>F. nucleatum</i> /mg	Median (IQR)	4.16 (3.47 - 4.85)	4.70 (3.85 - 5.15)	---
Rezasoltani (2018)	Feces (20/31)	C _q value (Quantity of <i>F. nucleatum</i> =10 ($\frac{C_q-b}{m}$))	Mean (SD)	29.16 (3.31)	17.74 (3.59)	< 0.05
Liu (2020)	Feces (53/45)	Log 10 copies of <i>F. nucleatum</i> /gram	Mean (SD)	≈3.5 (1)	≈6 (1)	< 0.01
Relative quantification :						
Russo (2017)	Feces (10/10)	Ratio: $\frac{C_q \text{ } F.nucleatum}{C_q \text{ total bacteria}}$	Mean	≈2.25	≈1.8	>0.05
Yu (2015)	Feces (42/52) Biopsy (31/37)	ΔC _q value	Median [IQR]	≈ 26 [2] ≈ 27 [2]	≈19 [2] ≈ 18 [3]	< 0.001 < 0.001
Flanagan (2014)	Feces (7 /25)	2 ^{-ΔC_q} value	Median	2 ⁻²¹	2 ⁻¹⁵	0.02
Liang (2017) Coh I	Feces (170/200)	2 ^{-ΔC_q} value	Median	≈2 ⁻¹⁷	≈2 ⁻⁵	< 0.0001
Liang (2017) Coh II	Feces (33/36)	2 ^{-ΔC_q} value	Median	≈2 ⁻¹⁶	≈2 ⁻¹³	0.012
Eklof (2017)	Feces (39/66)	Log 2 ^{-ΔC_q}	Median [IQR]	≈-10 [2]	≈-7 [5]	< 0.001
Guo (2018)	Feces (215/156)	Log 2 ^{-ΔC_q}	Mean	≈-4	≈-3	< 0.0001
Wong (2017)	Feces (104/102)	Log 2 ^{-ΔC_q} (Fold change from HC to CRC)	Mean	≈-7	≈ -5 (132)	< 0.001
Xie (2017)	Feces (327/242)	Log ₂ RQ, based on ΔC _q (Fold change from HC to CRC)	Mean	≈-20	≈ -16 for early stage & -18 for advanced stage (5.12)	0.006 < 0.001
Tunsgjø (2019)	Feces (23/22)	2 ^{-ΔC_q} value (Fold change from HC to CRC)	Median	≈2 ⁻⁷	≈2 ⁻⁵ (66)	0.0073

CRC: colorectal cancer cases; C: controls (colorectal-adenoma- and CRC-free CRC and C subjects); SD: standard deviation; Coh: cohort; OTUs: operational taxonomic units; MLGs: metagenomic linkage groups; IMG: integrated microbial genome; C_q: quantification cycle in qPCR; ΔC_q = the average C_q value of *F. nucleatum* – the average C_q value of total bacteria (or reference gene); --- : not reported; ≈ : a value read from a graph in the study material; min: minimum; max: maximum.

Comparison of frequency of presence of *Fusobacterium nucleatum* in colorectal specimens between colorectal cancer cases and controls

Rather than absolute or relative quantification of *F. nucleatum* load, some studies compared the frequency of presence of the bacteria in colorectal specimens between controls and CRC patients, as shown in table 14. Some studies^{40, 44, 49-51, 53, 54, 57, 60, 61, 63} reported the frequency of presence of the bacterium in colorectal specimens when the bacterium was simply detected (by PCR, sequencing, or FISH techniques), while other studies^{45, 47, 58} reported the frequency of presence of the bacterium when its load level was above a specific cut-off value. The cut-off values were typically set to the values that served to achieve the highest discrimination between CRC patients and controls in terms of Youden index. Tunsjo et al. (2019)⁶¹ set a cut-off value for detecting *F. nucleatum* in feces, but not in biopsies. As shown in table 15, the cut-off value was not reported in one study,⁵⁸ and varied between the three others: 260 copies of *F. nucleatum* by Suehiro et al. (2017),⁴⁵ and a $2^{-\Delta Cq}$ of 0.00026 (2^{-12}) for both Eklof et al. (2017)⁴⁷ and Tunsjo et al. (2019).⁶¹ *F. nucleatum* was commonly detected in all specimens across studies, except for Mira-P et al. (2015) and Wu et al. (2013), who did not detect the bacterium in controls' biopsies and controls' feces respectively.^{50, 57} The frequency of specimens positive to *F. nucleatum* was higher among CRC patients than controls in all the studies. The study by Yu et al. (2016) was the only one to use FISH technique, which allowed for quantifying the bacteria within tissues (called invasive *F. nucleatum*) and in the biofilm separately. Their results showed a higher frequency of presence of *F. nucleatum* in tissues than in biofilm.

Tableau 14. – Frequency of presence of *Fusobacterium nucleatum* in colorectal cancer and controls' specimens; and odds ratio for the association between *Fusobacterium nucleatum* and colorectal cancer

First Author (Year)	Specimen type (no. of specimens CRC/C)	Definition of specimen positive to <i>F.nucleatum</i>	Prevalence of <i>F. nucleatum</i> (+)			OR [95% CI]	Adjusted OR [95% CI]
			C (%)	CRC (%)	p		
Amitay (2017)	Feces (46 /231)	<i>F.nucleatum</i> is detected	20	51	< 0.001	4.16 [2.15-8.07]	---
Fukugaiti (2015)	Feces (7/10)	<i>F.nucleatum</i> is detected	90	100	---	2.37 [0.08-66.88]	---
Liang (2017) Coh I	Feces (170/200)	<i>F.nucleatum</i> is detected	72	98.2	< 0.0001	21.22 [6.57-68.5]	---
Mira-P (2015)	Feces (7/9)	<i>F.nucleatum</i> is detected	22.2	85	---	19.86 [1.47-268.17]	---
	Biopsy (7/5)	<i>F.nucleatum</i> is detected	0	26,6	---	4.6 [0.18-121.18]	---
Votgmann (2016)	Feces (52/52)	<i>F.nucleatum</i> is detected	26.9	63.5	0.0002	4.72 [2.05-10.85]	---
Wang (2016)	Feces (10/10)	<i>F.nucleatum</i> is detected	10	60	---	13.5 [1.2-152.21]	---
Wu (2013)	Feces (19/20)	<i>F.nucleatum</i> is detected	0	68.4	---	85.15 [4.42-1638.85]	---
Yu (2017)	Feces (74/54)	<i>F.nucleatum</i> is detected	3.7	52.7	7.53E-08	29 [6.57-128]	---
Kashani (2020)	Biopsy (35/45)	<i>F.nucleatum</i> is detected	24	68	0.0001	6.74 [2.5-18.07]	---
Repass (2018)	Biopsy (40/40)	The product is amplified in the qPCR reaction	5	40	---	12.67 [2.67-60.05]	---
Yu (2016)	Biopsy (93/20)	Average number of bacteria per field ≥ 5 , visualized by FISH technique	Invasive: 20 In biofilms: 10	Invasive: 65.9 [†] In biofilms: 48.4 [†]	< 0.05	7.73 [2.38-25.07] ^{††}	---
Tunnsjø (2019)	Feces (23/22)	<i>F.nucleatum</i> detected with ΔCq values <12	0	35	---	24.9 [1.33-463.72]	---
	Biopsy (21/11)	<i>F.nucleatum</i> is detected	18	52	---	4.93 [0.85-28.67]	---
Suehiro (2017)	Feces (158/60)	<i>F.nucleatum</i> detected at a higher level based on cut-off value (> 260 copies)*	10	54	---	10.57 [4.3-25.98]	---
Eklof (2017)	Feces (39/65)	<i>F.nucleatum</i> detected at a higher level based on cut-off value ($2^{-\Delta Cq} > 0.00026$ $\approx 2^{-12}$)**	24.3	69.2	---	7 [2.89-16.96]	---
Xie (2017)	Feces (327/242)	<i>F.nucleatum</i> detected at a higher level based on cut-off value (value is not reported)***	---	---	---	4.31 [2.96-6.28]	4.28 [†] [2.27-8.09]

no. : number; CRC: colorectal cancer cases; C: Controls (colorectal-adenoma- and CRC-free subjects); OR: Odds ratio; --- : not reported; [†] the value was calculated as the average of reported prevalence in proximal and distal separately; * 260 copies of *F.nucleatum* was the best cut-off point to discriminate between HC and CRC in Receiver Operating Characteristic (ROC) analysis resulting in estimated sensitivity of 54% and estimated specificity of 90% and the area under the ROC curve was 0.75 ; ** the cut-off value of 0.00026 ($\approx 2^{-12}$) gave the most reliable analysis for detecting cancer in the study patients, with estimated specificity of 76.9%; *** ROC curve was used to evaluate the diagnostic value of bacterial candidates in distinguishing CRC and controls and to determine the best cut-off values that maximized the Youden index; ^{††} OR was calculated based on prevalence of invasive *F.nucleatum* (in tissues) as its detection was higher than within biofilms; [†] OR adjusted for age, gender, FIT test, two additional bacteria markers, history of diabetes and high blood pressure.

Association between Fusobacterium nucleatum and colorectal cancer

To perform a meta-analysis on the association between *F. nucleatum* and CRC, we pooled data from 12 studies^{40, 44, 49-51, 53, 54, 57, 59-61, 63} that operationally defined the presence of *F. nucleatum* in terms of the detection of the bacterium in colorectal specimens, with no use of a cut-off value that optimizes distinction between cases and controls, as described above. As shown in figure 6, the overall pooled OR and the corresponding 95% CI estimated in a random-effects model show a positive association between *F. nucleatum* detection in colorectal specimens and CRC (OR= 8.3; 95% Confidence interval (95%CI): 5.2 to 13.0), with moderate heterogeneity ($I_2= 26.32\%$, p value for heterogeneity = 0.18). Funnel plot for investigating publication bias is presented in figure 7. Visual inspection of the funnel plot does not suggest an evident publication bias, which was also confirmed by Egger's regression test ($p=0.053$). Adjusted pooled OR estimate could not be calculated due to non-availability of adjusted OR estimates from the reports of the individual studies.

Subgroup meta-analysis shows a stronger association between *F. nucleatum* and CRC in Asiatic populations, compared to European and American populations; as well as in studies excluding subjects with reported antibiotic use in the last 3 months, compared with studies that did not exclude these subjects (figure 8). However, the association was not statistically significantly different by specimen type (stools vs. biopsies), bacterial detection technique (FISH vs. qPCR vs. sequencing), or previous IBD diagnosis as exclusion criteria for study participation.

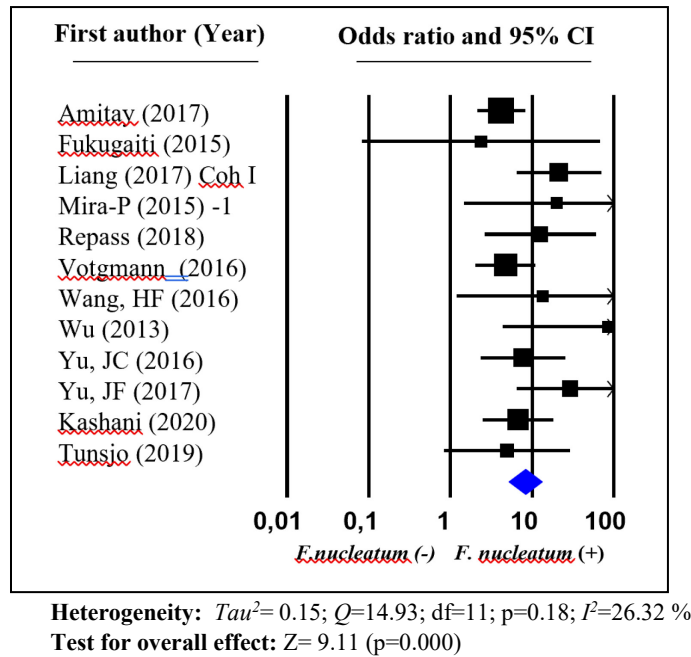


Figure 6. – Forest plot of the association between *Fusobacterium nucleatum* in colorectal specimens and colorectal cancer: Results of a random-effects meta-analysis of 12 observational studies

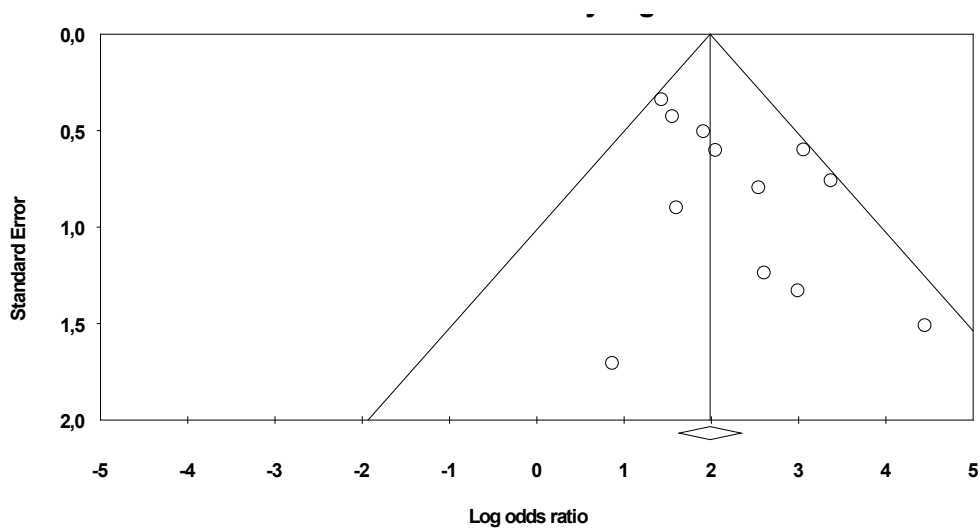


Figure 7. – Funnel plot of the natural logarithm-transformed odds ratio estimates, by the corresponding standard error

Circles: studies in the meta-analysis.

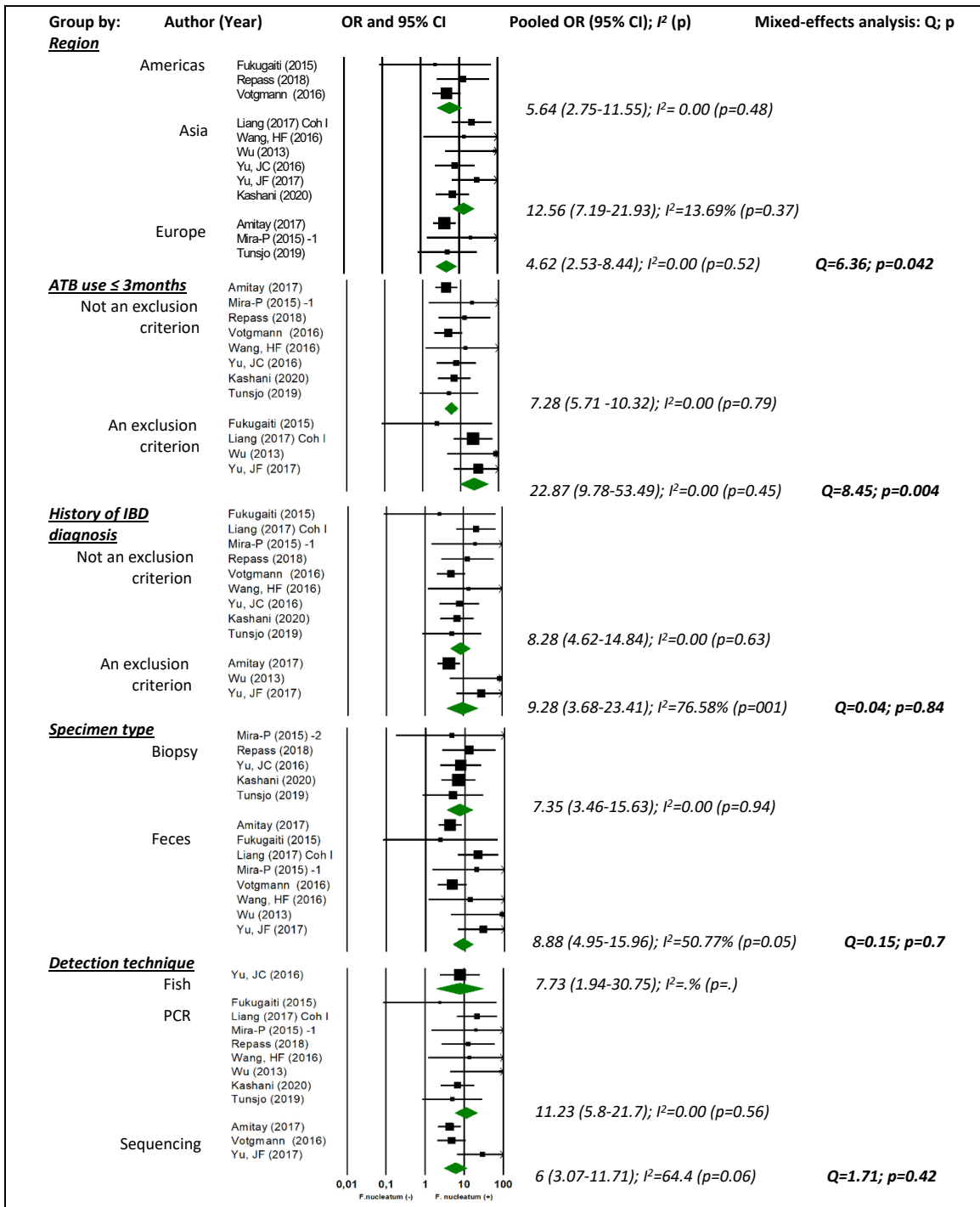


Figure 8. – Forest plots for subgroup meta-analysis

ATB: Antibiotic; IBD: Inflammatory bowel disease; OR: Odds ratio

DISCUSSION

This systematic review summarizes results from 24 observational studies that compared the prevalence of the presence of *F. nucleatum* and/or the mean/median of *F. nucleatum* load in colorectal specimens, among cases of CRC and controls. Studies used mainly two ways to compare CRC patients and controls in regard to colorectal infection by *F. nucleatum*: 1) bacterium load expressed by RA (a percentage expressing the relative contribution of *F. nucleatum* to total bacteria), absolute quantification (bacteria count), or more often by RQ ($2^{-\Delta C_q}$ value by q PCR technique, with $\Delta C_q = (\text{the average } C_q \text{ value of } F. \text{ nucleatum} - \text{the average } C_q \text{ value of total bacteria or reference gene})$); and 2) frequency of the presence of *F. nucleatum* in colorectal specimens.

It is true that RA and RQ are both relative measures of the bacterium load, but many studies used one or the other term to express the same thing, which can be confusing. Thus, in this systematic review, we tried to differentiate between the two terms, RA and RQ, and represent results accordingly. This showed that RA was used less commonly than RQ, even if RA also allows better comparison between healthy and altered microbiome composition, since dysbiosis is, by definition, the loss in representation of different bacterial phyla within the whole bacterial composition of the microbiome.

We also mention some issues with publishing data of *F. nucleatum* RQ in individual studies. Most of the time, RQ was extracted from papers' supplementary tables or graphs that were often poorly annotated. Also, even if individual studies based their RQ on a common $\Delta\Delta C_q$ method, values were reported differently across studies. Thus, we encourage researchers to standardize the way to report RQ data.

Overall, results of absolute and relative quantification of *F. nucleatum* were higher in CRC cases compared to controls across most studies. Only three studies reported the fold change of *F. nucleatum* load from controls to CRC cases, but one was much larger than the others: 5.12-fold by Xie et al. (2017)⁵⁸, 66-fold by Tunsjo et al. (2019)⁶¹ and 132-fold by Wong et al. (2017).⁵⁶ When comparing these studies, Xie et al. (2017)⁵⁸ included subjects with chronic inflamed colorectal mucosa within their control group, while Wong et al. (2017)⁵⁶ excluded subjects with IBD; Tunsjo et al. (2019)⁶¹, for their part, didn't report excluding IBD patients from participation. Presence of IBD patients among controls in the study of Xie et al. (2017)⁵⁸ could probably have blurred the difference in *F. nucleatum* load between their CRC and controls. In this regard, we

mention a study by Strauss et al. (2011) who isolated *Fusobacterium* spp. from 63.6% of patients with gastrointestinal disease compared to 26.5% of healthy controls ($P = 0.01$), with *F. nucleatum* representing 69% of recovered *Fusobacterium* spp. in their IBD patients.⁶⁴

Our meta-analysis included 12 studies based on a total of 1,098 cases and 1,069 controls. Only crude pooled OR could be calculated, and it shows an association between the presence of *F. nucleatum* in feces or colorectal mucosa and CRC.

All included studies reported results of *F. nucleatum* detection in specimens collected just before colonoscopy or surgery. Furthermore, the estimated OR for the association between *F. nucleatum* and CRC was not adjusted for potential confounders. Thus, causal explanation of the “positive” empirical association (as quantified by the pooled-OR estimate) is not warranted, in our view. However, the involvement of *F. nucleatum* in early CRC carcinogenesis stages has been suggested by other studies that identified the bacterium in precancerous lesions. Its RA was reported to be higher in adenomas than in healthy tissues and lower in adenomas than in carcinomas, reflecting a gradual enrichment of the colon with *F. nucleatum* in parallel to the adenoma-carcinoma sequence.⁶⁵⁻⁶⁷ The level of *F. nucleatum* also seems to increase with advancing stages of dysplasia.⁴³

Subgroup meta-analysis suggested (even if weakly) that the *F. nucleatum*–CRC association (if it does exist) may be stronger in Asian populations than in American or European ones. This finding seems to be in line with the results of a recent meta-analysis by Qian Huang et al. (2018)⁶⁸ on the diagnostic value of fecal *F. nucleatum* in screening CRC, which had a better performance in Asians. The apparent dependence of the association between *F. nucleatum* and CRC on population area may be explained by lifestyle differences between populations and/or by diversity in human gut microbiomes at the population level. Nishijima S et al. (2016) analyzed gut microbiomes of Japanese individuals by comparing metagenomic data obtained from 106 Japanese subjects with those from 11 other nations. They found that gut microbiome of the Japanese is considerably different from those of other populations and cannot be explained by diet alone.⁶⁹

We also found that the estimated association between *F. nucleatum* and CRC was stronger in the subgroup of studies that excluded subjects with recent antibiotic use, compared with the subgroup of studies that did not. This can be explained by a possible bias due to introducing subjects with microbiomes altered by recent antibiotic use.

Some studies failed in reporting critical information, such as time of specimen collection, which was not reported by four studies.^{41, 43, 54, 57} Also, in one study,⁶⁰ feces were collected most frequently after colonoscopy. However, colonic microbiota has been shown to be disturbed by the bowel cleansing protocol and takes about two weeks to recover to its original composition depending on the cleansing protocol.⁷⁰

F. nucleatum is a very heterogeneous species of the Fusobacteria phylum and has been classified into four to five subspecies: *animalis*, *nucleatum*, *polymorphum*, *vincentii* / *fusifforme*. *F. nucleatum*, subsp. *nucleatum*, is mainly isolated in periodontal pathological sites, while *F. nucleatum* subsp. *vincentii* / *fusifforme* is often isolated from healthy sites as normal flora. *F. nucleatum* subsp. *animalis* and *polymorphum* are associated with complications of pregnancy and *F. nucleatum* subsp. *animalis* is associated with inflammatory bowel disease.⁷¹ In our systematic review, data about subspecies of *F. nucleatum* was only reported by the study of Amitay et al. (2017),⁴⁰ in which the four subspecies were identified: ssp. *nucleatum*, *animalis*, *vincentii*, and *polymorphum*. In a study by Ye et al. (2017), five *F. nucleatum* subspecies were identified in clinical CRC specimens, with ssp. *animalis* being the most common one.⁷² Komiya et al. (2019) examined whether identical strains of *F. nucleatum* could be isolated from colorectal and saliva specimens from the same patient. Saliva and colorectal specimens were analyzed from 14 CRC patients by qPCR, of which 40% exhibited identical strains of *F. nucleatum* in their colorectal and saliva specimens.⁷³

The oral cavity can serve as a reservoir for the systemic dissemination of pathogenic bacteria and their toxins, leading to infections and inflammations in distant bodily sites. Several oral species were identified in infections at extraoral sites. Han et al. (2013)²⁸ suggested a spread of oral infection due to transient bacteremia leading to bacterial colonization in extraoral sites, systemic damage by toxins free of oral pathogens, and systemic inflammation caused by soluble antigens of oral pathogens. *F. nucleatum* is one of the most dominant species of the oral microbiota.²⁶ It often aggregates with other oral bacteria and plays an essential role in the formation of dental plaque, acting as a bridge between early colonizing bacteria (Gram-positive bacteria) and late colonizing bacteria (Gram-negative bacteria).⁷⁴ Such a mechanism resembles the proposed *driver-passenger model* in explaining how bacteria in the intestinal microbiota could be involved in carcinogenesis. The first step consists of colonization of the intestine by pathogenic bacteria known as “drivers” with pro-inflammatory and pro-carcinogenic potential (*B. fragilis* and *E. coli*

in particular). The tumor progression would then cause a modification in the tumor microenvironment, allowing colonization by opportunistic bacteria known as “passengers” (*F. nucleatum* and *Streptococcus gallolyticus* in particular), promoting further development of the tumor.^{75, 76} The bacterial “drivers” and “passengers” would thus have distinct temporal roles in the pathogenesis of CRC.⁷⁵ This model implies that there is not a single bacterium that would alone be incriminated in the occurrence and development of CRC, but rather a bacterial community whose taxonomic composition continues to change throughout the tumorigenic process, thereby allowing specific bacteria to play their role in tumor transformation, according to their virulence and other properties. Moreover, some believe that the oral bacterium *F. nucleatum* plays a role in the development of CRC within a bacterial community or biofilm, rather than as an individual pathogen.⁷⁷ Warren et al. (2013) analyzed the bacterial composition of 130 colorectal tumors and their surrounding healthy tissues, and confirmed the over-representation of *Fusobacterium*, but in the simultaneous presence of two other commensal oral bacteria, *Leptotrichia* and *Campylobacter*, in individual tumors.²²

CONCLUSION

The results of this systematic review and meta-analysis suggest that the *F. nucleatum* in feces or colorectal mucosa is associated with CRC. Future clinical and epidemiological studies should address the potential role of *F. nucleatum* in the etiology of CRC. Further, the bacterium should be investigated in the colon at the subspecies level to assess the oral origin of colorectal infection with *F. nucleatum*.

Funding

This work was supported by a doctoral scholarship from the Fonds de Recherche du Québec-Santé and an award from Études Supérieures et Postdoctorales of Université de Montréal (to: Amal Idrissi Janati).

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the help of Natalie Clairoux and Patrice Dupont (librarians at Bibliothèque de la Santé, Université de Montréal) for helping with the search strategy.

References

1. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, et al. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut* 2017;66(4):683-91.
2. Potter JD LN. *Genetics of Colorectal Cancer*. New York, USA: Springer Science + Business Media; 2009.
3. Müller MF, Ibrahim AEK, Arends MJ. Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Archiv* 2016;469(2):125-34.
4. Cross, A.J., et al., A large prospective study of meat consumption and colorectal cancer risk: an investigation of potential mechanisms underlying this association. *Cancer Research*, 2010. 70(6): p. 2406-14.
5. Larsson, S.C. and A. Wolk, Meat consumption and risk of colorectal cancer: a meta-analysis of prospective studies. *International Journal of Cancer*, 2006. 119(11): p. 2657-64.
6. Liang, P.S., T.-Y. Chen, and E. Giovannucci, Cigarette smoking and colorectal cancer incidence and mortality: systematic review and meta-analysis. *International Journal of Cancer*, 2009. 124(10): p. 2406-15.
7. Ning Y, Wang L, Giovannucci EL. A quantitative analysis of body mass index and colorectal cancer: findings from 56 observational studies. *Obes Rev* 2010;11(1):19-30.
8. Robsahm TE, Aagnes B, Hjartåker A, et al. Body mass index, physical activity, and colorectal cancer by anatomical subsites: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Eur J Cancer Prev* 2013;22(6):492-505.
9. Deng L, Gui Z, Zhao L, Wang J, Shen L. Diabetes mellitus and the incidence of colorectal cancer: an updated systematic review and meta-analysis. *Dig Dis Sci* 2012;57(6):1576-85.
10. Cyr A, Dunnagan TA, Haynes G. Efficacy of the health belief model for predicting intention to pursue genetic testing for colorectal cancer. *J Genet Couns* 2010;19(2):174-86.
11. Cho E, Smith-Warner SA, Ritz J, et al. Alcohol intake and colorectal cancer: a pooled analysis of 8 cohort studies. *Ann Intern Med* 2004;140(8):603-13.
12. Ray K. Colorectal cancer: *Fusobacterium nucleatum* found in colon cancer tissue--could an infection cause colorectal cancer? *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 2011;8(12):662.
13. Collins D, Hogan AM, Winter DC. Microbial and viral pathogens in colorectal cancer. *Lancet Oncol* 2011;12(5):504-12.
14. Sears CL, Pardoll DM. Perspective: alpha-bugs, their microbial partners, and the link to colon cancer. *J Infect Dis* 2011;203(3):306-11.
15. Mima K, Nishihara R, Qian ZR, et al. *Fusobacterium nucleatum* in colorectal carcinoma tissue and patient prognosis. *Gut* 2016;65(12):1973-80.
16. Yang Y, Weng W, Peng J, et al. *Fusobacterium nucleatum* Increases Proliferation of Colorectal Cancer Cells and Tumor Development in Mice by Activating Toll-Like Receptor 4 Signaling to Nuclear Factor-kappaB, and Up-regulating Expression of MicroRNA-21. *Gastroenterology* 2017;152(4):851-66.e24.
17. Bashir A, Miskeen AY, Bhat A, Fazili KM, Ganai BA. *Fusobacterium nucleatum*: an emerging bug in colorectal tumorigenesis. *European Journal of Cancer Prevention* 2015;24(5):373-85.
18. Kostic AD, Chun E, Robertson L, et al. *Fusobacterium nucleatum* potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment. *Cell Host & Microbe* 2013;14(2):207-15.

19. Kostic AD, Gevers D, Pedamallu CS, et al. Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome Res* 2012;22(2):292-8.
20. Allen-Vercoe E, Jobin C. *Fusobacterium* and Enterobacteriaceae: important players for CRC? *Immunol Lett* 2014;162(2 Pt A):54-61.
21. Allen-Vercoe E, Strauss J, Chadee K. *Fusobacterium nucleatum*: an emerging gut pathogen? *Gut Microbes* 2011;2(5):294-8.
22. Warren RL, Freeman DJ, Pleasance S, et al. Co-occurrence of anaerobic bacteria in colorectal carcinomas. *Microbiome* 2013;1(1):16.
23. Castellarin M, Warren RL, Freeman JD, et al. *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome Research* 2012;22(2):299-306.
24. Rubinstein MR, Wang X, Liu W, et al. *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/beta-catenin signaling via its FadA adhesin. *Cell Host & Microbe* 2013;14(2):195-206.
25. Ito M, Kanno S, Noshio K, et al. Association of *Fusobacterium nucleatum* with clinical and molecular features in colorectal serrated pathway. *International Journal of Cancer* 2015;137(6):1258-68.
26. Kapatral V, Anderson I, Ivanova N, et al. Genome sequence and analysis of the oral bacterium *Fusobacterium nucleatum* strain ATCC 25586. *J Bacteriol* 2002;184(7):2005-18.
27. Han YW. *Fusobacterium nucleatum* interaction with host cells- Oral microbial communities: genomic inquiry and interspecies communication; 2011.
28. Han YW, Wang X. Mobile microbiome: oral bacteria in extra-oral infections and inflammation. *Journal of Dental Research* 2013;92(6):485-91.
29. Kostic ADC, E.; Robertson, L.; Glickman, J. N.; Gallini, C. A.; Michaud, M.; Clancy, T. E.; Chung, D. C.; Lochhead, P.; Hold, G. L.; El-Omar, E. M.; Brenner, D.; Fuchs, C. S.; Meyerson, M.; Garrett, W. S. *Fusobacterium nucleatum* potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment. *Cell Host & Microbe* 2013;14(2):207-15.
30. Han YW, Ikegami A, Rajanna C, et al. Identification and characterization of a novel adhesin unique to oral fusobacteria. *J Bacteriol* 2005;187(15):5330-40.
31. Fardini Y, Wang X, Temoin S, et al. *Fusobacterium nucleatum* adhesin FadA binds vascular endothelial cadherin and alters endothelial integrity. *Mol Microbiol* 2011;82(6):1468-80.
32. Gur C, Ibrahim Y, Isaacson B, et al. Binding of the Fap2 protein of *Fusobacterium nucleatum* to human inhibitory receptor TIGIT protects tumors from immune cell attack. *Immunity* 2015;42(2):344-55.
33. Shang FM, Liu HL. *Fusobacterium nucleatum* and colorectal cancer: A review. *World Journal of Gastrointestinal Oncology* 2018;10(3):71-81.
34. Idrissi Janati A, Karp I, Sabri H, Emami E. Is a fusobacterium nucleatum infection in the colon a risk factor for colorectal cancer?: a systematic review and meta-analysis protocol. *Syst Rev* 2019;8(1):114.
35. Singh MK, J.; Singh, S.; Thumburu, KK.; Jaiswal, N.; Chauhan, A.; Agarwal, A.; Paul, N.; Sagwal, S. . Comparison of Newcastle Ottawa scale (NOS) and Agency for Health Research and Quality (AHRQ) as risk of bias assessment tools for cohort studies. In: Filtering the information overload for better decisions. Abstracts of the 23rd Cochrane Colloquium; 2015 3-7 Oct; Vienna, Austria. John Wiley & Sons; 2015.

36. Katsigianni M, Karageorgiou V, Lambrinouadaki I, Siristatidis C. Maternal polycystic ovarian syndrome in autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis. *Mol Psychiatry* 2019;24(12):1787-97.
37. Perletti G, Monti E, Magri V, et al. The association between prostatitis and prostate cancer. Systematic review and meta-analysis. *Arch Ital Urol Androl* 2017;89(4):259-65.
38. Pillinger T, Osimo EF, Brugger S, et al. A Meta-analysis of Immune Parameters, Variability, and Assessment of Modal Distribution in Psychosis and Test of the Immune Subgroup Hypothesis. *Schizophr Bull* 2019;45(5):1120-33.
39. Michael Borenstein, Larry V.Hedges, Julian P.T.Higgins, R.Rothstein H. Introduction to Meta-Analysis. John Wiley & Sons, Ltd ed. UK; 2009.
40. Amitay ELW, S.; Vital, M.; Pieper, D. H.; Hofler, D.; Gierse, I. J.; Butt, J.; Balavarca, Y.; Cuk, K.; Brenner, H. Fusobacterium and colorectal cancer: causal factor or passenger? Results from a large colorectal cancer screening study. *Carcinogenesis* 2017;38(8):781-88.
41. Yu YN, Yu TC, Zhao HJ, et al. Berberine may rescue Fusobacterium nucleatum-induced colorectal tumorigenesis by modulating the tumor microenvironment. *Oncotarget* 2015;6(31):32013-26.
42. Zhang YZY, X.; Yu, E. D.; Wang, N.; Cai, Q. C.; Shuai, Q.; Yan, F. H.; Jiang, L. F.; Wang, H. X.; Liu, J. X.; Chen, Y.; Li, Z. S.; Jiang, Q. W. Changes in gut microbiota and plasma inflammatory factors across the stages of colorectal tumorigenesis: a case-control study. *Bmc Microbiology* 2018;18(1):10.
43. Flanagan LS, J.; Ebert, M.; Soucek, P.; Kunicka, T.; Liska, V.; Bruha, J.; Neary, P.; Dezeeuw, N.; Tommasino, M.; Jenab, M.; Prehn, J. H.; Hughes, D. J. Fusobacterium nucleatum associates with stages of colorectal neoplasia development, colorectal cancer and disease outcome. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 2014;33(8):1381-90.
44. Fukugaiti MHI, A.; , Fern; es, M. R.; Ribeiro, U.; Nakano, V.; Avila-Campos, M. J. High occurrence of Fusobacterium nucleatum and Clostridium difficile in the intestinal microbiota of colorectal carcinoma patients. *Brazilian Journal of Microbiology* 2015;46(4):1135-40.
45. Suehiro YS, K.; Nishioka, M.; Hashimoto, S.; Takami, T.; Higaki, S.; Shindo, Y.; Hazama, S.; Oka, M.; Nagano, H.; Sakaida, I.; Yamasaki, T. Highly sensitive stool DNA testing of Fusobacterium nucleatum as a marker for detection of colorectal tumours in a Japanese population. *Annals of Clinical Biochemistry* 2017;54(1):86-91.
46. Rezasoltani SS, M.; Asadzadeh Aghdaei, H.; Nazemalhosseini Mojarad, E.; Dabiri, H.; Akhavan Sepahi, A.; Modarressi, M. H.; Feizabadi, M. M.; Zali, M. R. Applying simple linear combination, multiple logistic and factor analysis methods for candidate fecal bacteria as novel biomarkers for early detection of adenomatous polyps and colon cancer. *Journal of Microbiological Methods* 2018;155:82-88.
47. Eklof VL-B, A.; Zingmark, C.; Edin, S.; Larsson, P.; Karling, P.; Alexeyev, O.; Rutegard, J.; Wikberg, M. L.; Palmqvist, R. Cancer-associated fecal microbial markers in colorectal cancer detection. *International Journal of Cancer* 2017;141(12):2528-36.
48. Guo SL, L.; Xu, B.; Li, M.; Zeng, Q.; Xiao, H.; Xue, Y.; Wu, Y.; Wang, Y.; Liu, W.; Zhang, G. A Simple and Novel Fecal Biomarker for Colorectal Cancer: Ratio of Fusobacterium Nucleatum to Probiotics Populations, Based on Their Antagonistic Effect. *Clinical Chemistry* 2018;64(9):1327-37.
49. Liang QC, J.; Chen, Y.; Huang, Y.; Higashimori, A.; Fang, J.; Brim, H.; Ashktorab, H.; Chien Ng, S.; Ng, S. S. M.; Zheng, S.; Chan, F. K. L.; Sung, J. J. Y.; Yu, J. Fecal bacteria

- act as novel biomarkers for noninvasive diagnosis of colorectal cancer. *Clinical Cancer Research* 2017;23(8):2061-70.
50. Mira-Pascual L, Cabrera-Rubio R, Ocon S, et al. Microbial mucosal colonic shifts associated with the development of colorectal cancer reveal the presence of different bacterial and archaeal biomarkers. *J Gastroenterol* 2015;50(2):167-79.
 51. Repass JRPC, Biology; Iorns, E.; Denis, A.; Williams, S. R.; Perfito, N.; Errington, T. M. Replication Study: *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *eLife* 2018;7:13.
 52. Russo EB, G.; Chiellini, C.; Fagorzi, C.; Niccolai, E.; Taddei, A.; Ricci, F.; Ringressi, M. N.; Borrelli, R.; Melli, F.; Miloeva, M.; Bechi, P.; Mengoni, A.; Fani, R.; Amedei, A. Preliminary comparison of oral and intestinal human microbiota in patients with colorectal cancer: A pilot study. *Frontiers in Microbiology* 2017;8(2699):2699.
 53. Vogtmann EH, X.; Zeller, G.; Sunagawa, S.; Voigt, A. Y.; Hercog, R.; Goedert, J. J.; Shi, J.; Bork, P.; Sinha, R. Colorectal Cancer and the Human Gut Microbiome: Reproducibility with Whole-Genome Shotgun Sequencing. *PLoS One* 2016;11(5):e0155362.
 54. Wang HFL, L. F.; Guo, S. H.; Zeng, Q. Y.; Ning, F.; Liu, W. L.; Zhang, G. Evaluation of antibody level against *Fusobacterium nucleatum* in the serological diagnosis of colorectal cancer. *Scientific Reports* 2016;6:10.
 55. Wang TC, G.; Qiu, Y.; Fei, N.; Zhang, M.; Pang, X.; Jia, W.; Cai, S.; Zhao, L. Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers. *Isme j* 2012;6(2):320-9.
 56. Wong SHK, T. N. Y.; Chow, T. C.; Luk, A. K. C.; Dai, R. Z. W.; Nakatsu, G.; Lam, T. Y. T.; Zhang, L.; Wu, J. C. Y.; Chan, F. K. L.; Ng, S. S. M.; Wong, M. C. S.; Ng, S. C.; Wu, W. K. K.; Yu, J.; Sung, J. J. Y. Quantitation of faecal *Fusobacterium* improves faecal immunochemical test in detecting advanced colorectal neoplasia. *Gut* 2017;66(8):1441-48.
 57. Wu NY, X.; Zhang, R.; Li, J.; Xiao, X.; Hu, Y.; Chen, Y.; Yang, F.; Lu, N.; Wang, Z.; Luan, C.; Liu, Y.; Wang, B.; Xiang, C.; Wang, Y.; Zhao, F.; Gao, G. F.; Wang, S.; Li, L.; Zhang, H.; Zhu, B. Dysbiosis signature of fecal microbiota in colorectal cancer patients. *Microb Ecol* 2013;66(2):462-70.
 58. Xie YHG, Q. Y.; Cai, G. X.; Sun, X. M.; Zou, T. H.; Chen, H. M.; Yu, S. Y.; Qiu, Y. W.; Gu, W. Q.; Chen, X. Y.; Cui, Y.; Sun, D.; Liu, Z. J.; Cai, S. J.; Xu, J.; Chen, Y. X.; Fang, J. Y. Fecal *Clostridium symbiosum* for Noninvasive Detection of Early and Advanced Colorectal Cancer: Test and Validation Studies. *EBioMedicine*;25:32-40.
 59. Yu JC, Y.; Fu, X.; Zhou, X.; Peng, Y.; Shi, L.; Chen, T.; Wu, Y. Invasive *Fusobacterium nucleatum* may play a role in the carcinogenesis of proximal colon cancer through the serrated neoplasia pathway. *International Journal of Cancer* 2016;139(6):1318-26.
 60. Yu JF, Q.; Wong, S. H.; Zhang, D.; Yi Liang, Q.; Qin, Y.; Tang, L.; Zhao, H.; Stenvang, J.; Li, Y.; Wang, X.; Chen, N.; Wu, W. K. K.; Al-Aama, J.; Nielsen, H. J.; Kiilerich, P.; Jensen, B. A. H.; Yau, T. O.; Lan, Z.; Jia, H.; Li, J.; Xiao, L.; Lam, T. Y. T.; Ng, S. C.; Cheng, A. S. L.; Wong, V. W. S.; Chan, F. K. L.; Xu, X.; Yang, H.; Madsen, L.; Datz, C.; Tilg, H.; Brunner, N.; Kristiansen, K.; Arumugam, M.; Sung, J. J. Y.; Wang, J. Metagenomic analysis of faecal microbiome as a tool towards targeted non-invasive biomarkers for colorectal cancer. *Gut* 2017;66(1):70-78.
 61. Tunsjo HS, Gundersen G, Rangnes F, et al. Detection of *Fusobacterium nucleatum* in stool and colonic tissues from Norwegian colorectal cancer patients (vol 38, pg 1367, 2019). *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 2019;39(1):213-13.

62. Liu X, Cheng YW, Shao L, Ling ZX. Alterations of the Predominant Fecal Microbiota and Disruption of the Gut Mucosal Barrier in Patients with Early-Stage Colorectal Cancer. *Biomed Research International* 2020;2020.
63. Kashani N, Bezmin Abadi AT, Rahimi F, Forootan M. FadA-positive *Fusobacterium nucleatum* is prevalent in biopsy specimens of Iranian patients with colorectal cancer. *New Microbes and New Infections* 2020;34 (no pagination).
64. Strauss J, Kaplan GG, Beck PL, et al. Invasive potential of gut mucosa-derived *Fusobacterium nucleatum* positively correlates with IBD status of the host. *Inflamm Bowel Dis* 2011;17(9):1971-8.
65. Rezasoltani S, Asadzadeh Aghdaei H, Dabiri H, et al. The association between fecal microbiota and different types of colorectal polyp as precursors of colorectal cancer. *Microb Pathog* 2018;124:244-49.
66. McCoy AN, Araujo-Perez F, Azcarate-Peril A, et al. *Fusobacterium* Is Associated with Colorectal Adenomas. *Plos One* 2013;8(1):8.
67. Ye XC, Wang R, Bhattacharya R, et al. *Fusobacterium Nucleatum* Subspecies *Animalis* Influences Proinflammatory Cytokine Expression and Monocyte Activation in Human Colorectal Tumors. *Cancer Prevention Research* 2017;10(7):398-409.
68. Huang Q, Peng Y, Xie F. Fecal *fusobacterium nucleatum* for detecting colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Int J Biol Markers* 2018:1724600818781301.
69. Nishijima S, Suda W, Oshima K, et al. The gut microbiome of healthy Japanese and its microbial and functional uniqueness. *DNA Res* 2016;23(2):125-33.
70. Jalanka J, Salonen A, Salojarvi J, et al. Effects of bowel cleansing on the intestinal microbiota. *Gut* 2015;64(10):1562-8.
71. Nie S, Tian B, Wang X, et al. *Fusobacterium nucleatum* subspecies identification by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2015;53(4):1399-402.
72. Ye X, Wang R, Bhattacharya R, et al. *Fusobacterium Nucleatum* Subspecies *Animalis* Influences Proinflammatory Cytokine Expression and Monocyte Activation in Human Colorectal Tumors. *Cancer Prev Res (Phila)* 2017;10(7):398-409.
73. Komiya Y, Shimomura Y, Higurashi T, et al. Patients with colorectal cancer have identical strains of *Fusobacterium nucleatum* in their colorectal cancer and oral cavity. *Gut* 2019;68(7):1335-37.
74. Liu D. *Molecular detection of human bacterial pathogens*: CRC Press; 2011.
75. Tjalsma H, Boleij A, Marchesi JR, Dutilh BE. A bacterial driver-passenger model for colorectal cancer: beyond the usual suspects. *Nat Rev Microbiol* 2012;10(8):575-82.
76. Gao Z, Guo B, Gao R, Zhu Q, Qin H. Microbiota disbiosis is associated with colorectal cancer. *Front Microbiol* 2015;6:20.
77. Flynn KJ, Baxter NT, Schloss PD. Metabolic and Community Synergy of Oral Bacteria in Colorectal Cancer. *Msphere* 2016;1(3):May-Jun.

5.4 Article 4- Investigation of *Fusobacterium Nucleatum* in Saliva and Colorectal Mucosa: A Pilot Study

Article publié au journal *Scientific report* 2022 Apr 4;12(1):5622.

Amal Idrissi Janati¹, Igor Karp², Daniel Von Renteln³, Mickael Bouin³, Younan Liu⁴, Simon D. Tran⁴, Elham Emami^{5*}

¹ Faculté de médecine dentaire, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

² Département d'épidémiologie et de biostatistique de l'École de médecine et de médecine dentaire Schulich, Université Western Ontario, London, Ontario, Canada.

³ Département de gastroentérologie, Centre hospitalier et universitaire de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

⁴ Laboratoire de recherche sur le génie tissulaire et les cellules souches crâniofaciales, Université McGill, Montréal, Québec, Canada.

⁵ Faculté de médecine dentaire et des sciences de la santé orale, Université McGill, Montréal, Québec, Canada.

* Auteur correspondant

L'article tel qu'il a été publié est présenté en Annexe 6.

5.4.1. Contribution des auteurs

A. Idrissi Janati a contribué à la conception de l'étude, assuré le recrutement des participants, l'acquisition et l'interprétation des données. Elle a rédigé la totalité du manuscrit et apporté les corrections suggérées par les directeurs de recherche et les réviseurs du journal où le manuscrit était soumis pour publication. I. Karp et E. Emami ont participé à la conception de l'étude, supervisé l'opérationnalisation de l'étude et les analyses de données et ont corrigé le manuscrit. D. Van Renteln et M. Bouin ont conseillé sur la conception du projet, soutenu la réalisation de l'étude dans le département d'endoscopie, collecté les biopsies colorectales, révisé et approuvé le manuscrit. Y. Liu et S. D Tran ont conseillé sur les méthodes de conservation et d'analyse microbiologique des échantillons biologiques. Y. Liu a conduit les analyses par qPCR et révisé le manuscrit. S D Tran a supervisé les analyses microbiologiques, a rédigé la section de l'article sur l'analyse qPCR, a révisé et approuvé le manuscrit.

5.4.2 Manuscript

LIST OF ABBREVIATIONS

BMI: Body mass index

CA: Conventional adenoma

CHUM: University of Montreal Hospital Center

CRC: Colorectal cancer

CRN: Colorectal neoplasm

EMR: Endoscopic mucosal resection

F. nucleatum: *Fusobacterium nucleatum*

IBD: Inflammatory bowel disease

MSI: Microsatellite Instability

NSAID: Non-steroidal anti-inflammatory drug

PCR: Polymerase chain reaction

PD: Periodontal disease

Quantitative polymerase chain reaction: q PCR

RQ: Relative quantification

SSA: Serrated sessile adenomas

ABSTRACT

Objectives: As evidence has been linking the oral bacterium *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) to colorectal tumorigenesis, we aimed to produce preliminary data on the expression of *F. nucleatum* in both oral and colorectal body sites in cases diagnosed with colorectal neoplasms (CRN) and CRN-free controls.

Materials and Methods: We conducted a pilot hospital-based case-control study among patients who underwent colonoscopy examination. Saliva samples and biopsies from healthy colon mucosa from CRN cases and CRN-free controls, and from tumors in cases, were collected, as well as data on periodontal condition and potential CRN risk factors.

Results: A total of 22 CRN cases and 21 CRN-free controls participated in this study, with a total of 135 biospecimens collected and analyzed by qPCR for detection and quantification of *F. nucleatum*. The detection rate of *F. nucleatum* was 95% in saliva samples and 18% in colorectal mucosa specimens. The median (95% CI) salivary *F. nucleatum* level was 0.35 (0.15-0.82) and

0.12 (0.05-0.65) in case and control groups respectively, with a Spearman correlation of 0.64 (95% CI: 0.2-0.94) between *F. nucleatum* level in saliva and healthy colorectal mucosa in controls.

Conclusions: Our study results support the need for and the feasibility of further studies that aim to investigate the association between oral and colorectal levels of *F. nucleatum* in CRN cases and controls.

Clinical Relevance: Considering the current evidence linking *F. nucleatum* to colorectal carcinogenesis, investigating the role of oral *F. nucleatum* expression in its colorectal enrichment is crucial for colorectal cancer screening and prevention avenues.

BACKGROUND

Colorectal cancer (CRC) is the third most commonly diagnosed cancer and the second cause of death from cancer worldwide, with over 1,900,000 newly diagnosed cases and over 900,000 deaths in 2020 ¹. Most CRCs arise from adenomatous polyps, which can eventually degenerate into invasive carcinomas ². The potential for malignant progress depends on the histologic pattern of growth (with villous pattern being an adverse indicator), size, multiplicity of polyps, and high-grade dysplasia status ³. A small proportion of CRCs develop under the alternative “serrated pathway”, from serrated polyps frequently located in the proximal colon, and are linked to the Microsatellite Instability phenotype, resulting from a deficiency of the DNA repair system ².

Over the last decade, many studies have reported an enrichment of *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) in colorectal tissues and stools collected from subjects diagnosed with cancerous and even precancerous colorectal lesions ⁴⁻⁶. The involvement of *F. nucleatum* in early colorectal carcinogenesis stages has been suggested by studies that identified the bacterium in colorectal adenomas, with a gradual enrichment of the colon with *F. nucleatum* in parallel to the adenoma-carcinoma sequence ⁷⁻⁹. Moreover, the bacterium was identified with two virulence factors promoting colorectal carcinogenesis. The first factor is FadA, an adhesin that allows *F. nucleatum* to invade human epithelial cells, activate β -catenin signaling, induce expression of the oncogenic gene, and promote the growth of colorectal tumor cells ¹⁰. The second factor is a self-transporting protein Fap2, which inhibits the activity of immune cells and thus potentiates the progression of CRC ¹¹.

F. nucleatum is also among the dominant species of the oral cavity ^{12, 13} and plays an essential role in the formation of dental plaque. It also promotes the colonization and invasion of tooth surfaces

by other pathogenic species, which in turn stimulates the recruitment and activation of local immune cells, resulting in destruction of tooth-supporting tissues and progression of periodontitis^{14, 15}. *F. nucleatum* is abundant in salivary samples from patients with gingivitis and chronic periodontitis¹⁶.

It has been suggested that gut enrichment with *F. nucleatum* is sourced intra-individually from the oral cavity¹⁷⁻¹⁹, in the presence of periodontal sites, which may explain the association of periodontal disease (PD) with CRC and colorectal adenomas²⁰⁻²³. However, the hypothesis of an intra-individual oral source of gut enrichment with *F. nucleatum* still needs to be tested, which would require epidemiologic data on paired measures of both oral and gut *F. nucleatum* levels in subjects diagnosed with colorectal neoplasms (CRN) and in CRN-free controls. To date, few studies have investigated *F. nucleatum* in saliva from subjects with CRN and CRN-free controls^{17, 18, 24-29}, only two studies have investigated paired saliva and colorectal specimens in these groups^{24, 28}, and none has explored the link between paired oral and colorectal levels of *F. nucleatum* in subjects with CRN and CRN-free controls (see table 15 for the studies' summary).

Tableau 15. – Summary of studies that investigated *F. nucleatum* in saliva and / or colorectal mucosa or stool in colorectal cancer cases and controls

Author (year)	Country	No. of CRC cases/C	Exclusion if previous ATB use (period)	Specimen type	Specimen collection time	Collection kits and storage conditions	Bacterial analysis method	<i>F. nucleatum</i> detection and level quantification outcomes
Russo et al. (2017)	Italy	10/10	Yes (≤ 3months)	Unstimulated saliva Stool	1 day before surgery	Sterile tube, -80 °C	Next Generation Sequencing & qPCR	<i>F. nucleatum</i> level: <ul style="list-style-type: none"> • In saliva: No significant difference between CRC cases and C • In stool: No significant difference between CRC cases and C • Saliva Vs stool: higher abundance of <i>F.nucleatum</i> in saliva than in stool, in CRC (p<0.01) and in C (p<0.002)
Guyen et al. (2019)	Turkey	71/77	Yes (≤ 3months)	Saliva	Before cancer treatments	Centrifuge tube, -20 °C	qPCR	<i>F. nucleatum</i> detection: CRC cases: 97.2% Vs C: 96.1%; p>0.99 <i>F. nucleatum</i> level: (in Log10 copies/ml) CRC cases: 6.89 ± 1.07 Vs C: 6.35 ± 0.78; p= 0.001
Komiya et al. (2019)	Japan	14/0 (No C)	Yes (≤ 1 month)	Saliva Tumor mucosa	Before/after coloscopy During coloscopy	Sterile tubes, anaerobic conditions	PCR (conventional)	<i>F. nucleatum</i> detection: <ul style="list-style-type: none"> • Saliva: 100% • Tumor mucosa: 57% • Saliva and tumor mucosa: 43% (<i>F. nucleatum</i> identical strain in 75% of patients with both saliva and tumor (+) to <i>F. nucleatum</i>)
Kato et al. (2016)	USA	68 /122	---	Oral rinse	---	Commercial mouthwash (15% of alcohol), -80 °C	16SrRNA gene sequencing	Dominant Phyla: Fusobacteria was not dominant, only 3.7% of all sequences. No association between <i>F.nucleatum</i> and CRC
Abed et al. (2020)	Israel	7/0 (No C)	No: ATB was taken just before surgery	Saliva Tumor mucosa	1 day before surgery, or just after coloscopy 45 min after resection	Sterile tubes, anaerobic conditions	PCR (conventional)	<i>F. nucleatum</i> detection: <ul style="list-style-type: none"> • Saliva: 100% • Tumor mucosa: 100%
		3/0 (No C)	Yes: ATB not taken before surgery	Saliva Tumor mucosa	Same others		Whole genome sequencing	Great similarity between <i>F.nucleatum</i> strains in saliva and tumor in each subject
Kageyama et al. (2019)	Japan	24/118	Yes (≤ 1 month)	Stimulated saliva	Before cancer therapy	Sterile tube, -80 °C	16SrRNA gene sequencing	Differentially abundant OTUs: OTUs corresponding to <i>F.nucleatum</i> were not the most abundant bacteria OTUs in CRC
Yaohua et al. (2019)	USA	231 / 462	Yes (≤ 1 week)	Oral rinse	---	Commercial mouthwash, -80 °C	16S rRNA gene sequencing	<i>F.nucleatum</i> detection: CRC cases: 99.6% Vs C: 99.6% (p=1)
Flemer et al. (2017)	Ireland	99/103 + (32 polyp patients)	Yes (≤ 1month) (ATB during surgery time)	Oral swabs (45CRC& 25C) Stool (only CRC&C) Colorectal and tumor mucosa	--- Before coloscopy During surgery or coloscopy	-80 °C -80 °C RNA later at 4°C for 12 h, then at -20°C	16S rRNA gene amplicon sequencing	<i>F. nucleatum</i> abundance: Fusobacterium less abundant in oral swabs of CRC cases compared to C

No.: Number; CRC: Colorectal cancer; C: Controls; *F.nucleatum*: *Fusobacterium nucleatum*; ATB: Antibiotic; OTU: Operational taxonomic unit

OBJECTIVES

This pilot study aimed to generate preliminary data on detection and quantification of *F. nucleatum* in both saliva and colorectal mucosa in subjects diagnosed with CRN and CRN-free controls. Ultimately, these preliminary data can help in designing a subsequent large epidemiological study investigating *F. nucleatum* in both oral and colorectal sites concomitantly in subjects diagnosed with CRN and CRN-free controls.

METHODOLOGY

We carried out a pilot hospital-based case-control study in the setting of University of Montreal Hospital Center in Montreal, Quebec, Canada. Participants were patients who underwent colonoscopy in the gastroenterology department between February 2018 and November 2019. Specifically, we identified patients who were scheduled for colonoscopy exam as part of CRC screening, or as a CRC diagnostic test upon recent change in bowel habits, rectal bleeding, unexplained iron deficiency anemia, or a positive Fecal Immunochemical Test. Patients with advanced colorectal adenoma or CRC were also identified among patients scheduled for an endoscopic mucosal resection technique, after they were diagnosed with polyps suspected of being neoplastic, based on a recent medical imaging or colonoscopy. Endoscopic mucosal resection is indicated for resection of the carpet-type adenomatous colonic polyp, and superficial early colorectal cancers that are well and/or moderately differentiated and limited to the mucosa³⁰.

The study inclusion criteria were: 1) aged 40–80 years; 2) resident of Montreal metropolitan area; 3) speaking French and/or English; 4) no prior diagnosis of cancer; 6) no history of hereditary colorectal disease; 7) no history of inflammatory bowel disease; and 8) no history of treatment with antibiotics within the past three months.

Patients with histologically confirmed advanced colorectal adenoma or CRC were included in the “case” group of CRN. Advanced colorectal adenoma refers to adenomas with high risk of malignant transformation, which is defined by one or more of the following criteria being met: 3-10 adenomas; high-grade dysplasia; tubulovillous or villous appearance; adenoma > 1 cm in diameter; serrated sessile adenomas³¹. Patients whose colonoscopy did not result in the diagnosis of CRC, colorectal advanced adenoma, or inflammatory bowel disease were included in the ‘control’ group.

Eligible patients who agreed to participate in the study were invited to complete a multi-item study questionnaire, provide a saliva sample, and provide consent for biopsy collection during colonoscopy examination. The study was approved by the University of Montreal Hospital Centre Research Ethics Committee, and all study participants signed the study consent before undergoing their colonoscopy. Participants were confirmed for eligibility only after colonoscopy examination. Participant status (case or control) was confirmed by histological investigation.

Data collection

Participants were administered a multi-item study-questionnaire that had been used by the research team in a previous population-based case-control study, COLDENT study, investigating the association between PD and sporadic CRC³². The questionnaire included different sections on sociodemographic and medical history information, cigarette smoking, anthropometric measures, non-steroidal anti-inflammatory drugs use, oral health, dietary habits, and total physical activity³²⁻³⁶. A life-course approach was used to document cumulative long-term history regarding cigarette smoking, specific dietary habits, and physical activity.

Thus, collected data enabled the description of study participants regarding sociodemographic characteristics, periodontal health status, as well as potential risk factors of CRN/CRC, namely age, gender, education attainment, income, body mass index, history of type II diabetes, history of CRC in first-degree relatives, history of regular use of non-steroidal anti-inflammatory drugs, lifetime cumulative cigarette smoking, consumption of red meats, processed meats, and total alcoholic drinks since early adulthood, as well as lifetime total physical activity score. Positive history of PD was defined as self-reported PD with bone loss, a previous professional diagnosis or treatment of PD, or history of clinical symptoms and complications of the disease, such as frequent gum bleeding, tooth mobility, or tooth loss because of PD or tooth mobility³².

Collection of biospecimens

In preparation to colonoscopy examination, all participants received the protocol for conventional bowel preparation, which consists of a diet restricted in residue for 2 days, followed by a strict liquid diet and laxatives (Bi-Peglyte[®] and Dulcolax 5 mg[®]) in the day before colonoscopy. During colonoscopy, biopsies were taken from healthy mucosa in cases and controls, and from polyps (or tumors) in cases. Given the differences in gut microbial composition between proximal and distal colon sites, biopsies of healthy mucosa were separately collected from ascending and descending colon. Biopsies of polyps were taken from freshly excised polyps before they were sent for

histopathology analysis. If a clinical decision was made during colonoscopy to delay a polyp removal and take biopsies for histopathology analysis (when a malignant lesion is suspected), an extra-biopsy was then taken for the present study analysis. All biopsies were collected in physiological solution (NaCl 0.9%), then immediately transferred to empty sterile containers.

Unstimulated saliva was collected from participants the day of colonoscopy, or a few days later (at the time of interview), by spitting in a commercial collection kit for DNA stabilization (DNAGenotek (OMNI gene•ORAL | OM-501 kit[®]). Participants were warned not to eat, drink, smoke, or chew gum for 30 minutes before saliva collection. Mucosa and saliva specimens were immediately stored at -80 °C until analysis.

Bacterial DNA extraction and quantitative polymerase chain reaction (qPCR)

Genomic DNA was isolated from saliva and colon tissue samples using the QIAamp DNA Mini Kit (Cat#51304, Qiagen, USA) and procedures were done according to the manufacturer's instructions. DNA content was quantified using the Bio-Rad SmartSpec 3000 Spectrophotometer (Bio-Rad, 170-2501, USA). DNA sequences of TaqMan primer and probe used to detect 16S ribosomal RNA gene of *F. nucleatum* were similar to those described by Mima et al. (2015)³⁷: *F. nucleatum* forward primer, 5'-CAACCATTACTTTAACTCTACCATGTTCA-3'; *F. nucleatum* reverse primer, 5'-GTTGACTTTACAGAAGGAGATTATGTAAAAATC-3'; *F. nucleatum* FAM probe, 5'-GTTGACTTTACAGAAGGAGATTA-3'. For human colon tissue, SLCO2A1 was used as endogenous control gene (Hs01114926_m1, FisherThermo Scientific, USA). For human saliva, the MEFE gene (Ba042114926-s1, FisherThermo Scientific, USA) was used as reference gene. A total of 80 ng DNA was used in qPCR reaction and the total reaction volume was 10 ul. Amplification and detection of DNA was performed with the StepOnePlus Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, USA), using the following reaction conditions: 10 min at 95°C, 40 cycles of 15 sec at 95°C, and 1 min at 60°C. For quality control, DNA of *F. nucleatum* strain ATCC 25586 was used as a positive control. No DNA loading and Diethyl pyrocarbonate (DEPC) treated water were used as negative controls. *F. nucleatum* positivity was defined as a detectable level of *F. nucleatum* DNA within 40 PCR cycles, and *F. nucleatum* negativity was defined as an undetectable level with a proper amplification of human reference gene SLCO2A1. The bacterium level relative quantification is automatically provided by StepOne Plus Realtime PCR Systems

(Applied Biosystems, USA) as $2^{-\Delta Cq}$ value, with ΔCq = average Cq value of *F. nucleatum* – average Cq value of total bacteria or of the reference gene.

STATISTICAL ANALYSIS

Since this is a pilot study, the statistical analysis performed was purely exploratory, in order to help future studies in study-design decisions, including sample-size calculations.

The distributions of relevant characteristics concerning CRN risk factors in the case and control series were presented with mean and standard deviation, or median and inter-quartile range (when data seemed non-normally distributed) for continuous variables, and percentage for categorical variables. Based on data from qPCR analysis of study specimens, we calculated both frequencies of positive detection of *F. nucleatum* and medians of $2^{-\Delta Cq}$ with their corresponding 95% confidence intervals (CI), in each group (cases and controls) and each specimen type (saliva, colorectal mucosa). Also, coefficients of Spearman correlation between salivary and colorectal *F. nucleatum* levels, as well as between *F. nucleatum* levels in healthy mucosa of both the ascending and descending colon were presented with their corresponding 95% CIs. IBM SPSS Statistics version 26 was used for statistical analysis.

RESULTS

A total of 75 potentially eligible participants were solicited, of whom 20 did not meet the study eligibility criteria, and 12 refused to participate. Therefore 43 patients participated to this pilot study, including 22 cases of CRN and 21 CRN-free controls.

All participants, except one case, completed the study questionnaire. Distributions of cases and controls according to sociodemographic and other relevant characteristics are presented in table 16. In general, case and control groups were similar regarding education attainment (mostly college or university), family history of CRC, and history of diabetes. However, cases were mostly males (81%), slightly older, and less regular users of non-steroidal anti-inflammatory drugs than controls. Also, although the frequency of cigarette smoking was similar in the two groups, the median number of packs-years among smokers in the case group was much higher than for smokers in the control group. Patients in the control group consumed more red and processed meats but fewer alcoholic drinks than cases. Ten participants (7 cases and 3 controls) had a positive history of PD.

Tableau 16. – Sociodemographic characteristics and potential colorectal neoplasms risk factors in study participants

Characteristic	Cases (n=22)	Controls (n=21)
Age, years (mean ±SD)	63.9 (9.6)	60.4 (9.1)
Gender (n)		
Male	18	10
Canadian born		
Yes (n)	16	18
Native tongue		
French (n)	15	20
Education attainment		
College or University (n)	15	15
Living alone		
Yes (n)	5	11
BMI, kg/m ² (mean ±SD)	27.7 (6)	26.2 (4)
Family history of CRC		
Yes (n)	4	2
Regular use of NSAIDs		
Yes (n)	3	9
Diabetes		
Yes (n)	3	3
Periodontal disease		
Yes (n)	7	3
Personal income (CAD\$ per year) (Median (IQR))	35 000 (40 000)	45 000 (80 000)
History of smoking		
Positive (n)	14	14
Cigarette smoking, packs-years (Median (IQR))	22.5 (33.9)	14.4 (27)
Lifetime average daily total alcoholic drinks ^a (Median (IQR))	1 (1.62)	0.8 (1.2)
Lifetime average weekly servings ^b of:		
Red meats	2.1 (3.1)	3.2 (5.6)
Processed meats (Median (IQR))	1.5 (2.1)	1.8 (3.3)
Lifetime total physical activity score, MET hour/week/year (Median (IQR))	88.7 (95.7)	70.5 (114)

BMI: Body mass index; NSAID: Non-steroidal anti-inflammatory drugs; CAD\$, Canadian dollar, MET: Metabolic equivalent of task; a: one drink includes beer (355 ml bottle or can), wine (180 ml), or liquor (150 ml); b: 1 serving of red meats=180-240g, 1 serving of processed meats=55g; SD: Standard deviation; IQR: Interquartile range.

All cases had undergone polypectomy or endoscopic mucosal resection during colonoscopy, and one polyp was removed in each patient, except for two patients with two polyps removed during the same colonoscopy, bringing the total CRN specimens to 24. Characteristics of the CRN (location, histological type, and size) are presented in table 17. Fifteen polyps were located in the proximal colon, and 9 in the distal colon. Upon the histopathology report, 15 polyps were conventional adenomas (namely, of the tubular, tubulovillous, or villous histology type), two were serrated sessile adenomas, and two early-stage CRCs. Besides specimens of CRN, biopsy specimens were collected from healthy mucosa in 17 cases (13 from ascending colon and 4 descending colon) and 21 controls (20 from ascending colon and 1 descending). Saliva samples were collected in all participants. Thus, a total of 135 study biospecimens were analyzed by qPCR for detection and quantification of *F. nucleatum* levels.

Table 18 shows the *F. nucleatum* detection rate by biospecimen type (saliva, mucosa), in case and control groups. *F. nucleatum* was detected in saliva specimens from almost all cases (21/22) and controls (20/21). *F. nucleatum* levels (measured by qPCR as $2^{-\Delta Cq}$) in saliva ranged from barely detectable (0.000004) to 3.17 and 2.65, in cases and controls respectively. The median (95% CI) of salivary *F. nucleatum* level was 0.345 (0.15-0.82) and 0.12 (0.05-0.65) in case and control groups respectively (Figure 9); and 0.4 (0.13-0.53) in participants with positive history of PD vs 0.14 (0.18-0.73) in participants with negative history of PD.

In colorectal mucosa, *F. nucleatum* was detected in only one case (5%) within both healthy mucosa (from both ascending and descending colon specimens) and polyp, and in 9 controls' healthy mucosa specimens (ascending and/or descending colon) (43%). The polyp where *F. nucleatum* was detected was a conventional adenoma, tubular subtype, located in the proximal colon.

The level of *F. nucleatum* in controls' healthy mucosa specimens ranged from 0.116 to 2.02 in the ascending colon, and from 0.045 to 1.2 in the descending colon. *F. nucleatum* level in healthy mucosa from the case detected with *F. nucleatum* was higher than the maximum observed in controls: 2.574 in the ascending colon, 1.143 in the descending colon, and 1.952 in the polyp.

The Spearman correlation coefficient between *F. nucleatum* levels in saliva and mucosa samples was 0.64 (95% CI: 0.2 - 0.94). This was calculated for controls only, as in cases only one subject had *F. nucleatum* detected in both saliva and colorectal mucosa specimens. We also explored if there was any correlation between levels of *F. nucleatum* in healthy mucosa of both ascending and

descending colon, and the corresponding Spearman correlation coefficient was calculated as 0.68 (95CI: 0.25-0.96).

Tableau 17. – Characteristics of colorectal neoplasms in case group

Cases	Colorectal neoplasms				Paired healthy mucosa: biopsy collection site	
	Colorectal anatomic site (segment)	Histologic type (subtype)	High grade dysplasia	Size † (cm)	Ascending colon	Descending colon
1.	Proximal (Caecum)	SA (sessile serrated)		2	X	X
2.	Proximal (Transverse)	SA (sessile serrated)		6	X	X
3.	Proximal (Ascending)	CA (Tubular)		4	X	X
4.	Proximal (Ascending)	CA (Tubular)		16	X	X
5.	1 Proximal (Hepatic flexure)	CA (Tubular)	X	3		
	2 Proximal (Ascending)	CA (Tubular)		5		
6.	Distal (Rectum)	CA (Tubular)		2.5		X
7.	Proximal (Ascending)	CA (Tubulovillous)	X	5	X	X
8.	Proximal (Caecum)	CA (Tubulovillous)		5	X	X
9.	Proximal (Caecum)	CA (Tubulovillous)		4.5		
10.	Proximal (Ascending)	CA (Tubulovillous)	X	3.5		
11.	Proximal (Caecum)	CA (Tubulovillous)		5	X	X
12.	Proximal (Hepatic flexure)	CA (Tubulovillous)		2	X	
13.	Distal (Sigmoid)	CA (Tubulovillous)		2.5	X	X
14.	Distal (Rectum)	CA (Tubulovillous)	X	10	X	X
15.	Distal (Rectum)	CA (Tubulovillous)		2.5		X
16.	1 Distal (Rectum)	CA (Tubulovillous)		5		
	2 Distal (Recto-sigmoid)	CA (Tubulovillous)		2		
17.	Distal (Rectum)	CA (Tubulovillous)	X	7		
18.	Proximal (Transverse)	CA (Villous)		4	X	
19.	Proximal (Ascending)	CA (Villous)		5	X	
20.	Proximal (Caecum)	CA (Villous)	X	5		X
21.	Distal (Rectum)	CRC (High-grade intraepithelial epidermoid neoplasia)	X			X
22.	Distal (Sigmoid)	CRC (moderately differentiated adenocarcinoma developed on a villous adenoma)	X	7		X

SA: Serrated adenoma; CA: Conventional adenoma; CRC: colorectal cancer; X: applicable; †: the largest diameter is reported

Tableau 18. – Detection rate of *Fusobacterium nucleatum* by specimen type and participant group

Specimen type	Case group (n=22)		Control group (n=21)	
	Total number of specimens	<i>F. nucleatum</i> detected n	Total number of specimens	<i>F. nucleatum</i> detected n
Saliva	22	21	21	20
Healthy mucosa-ascending colon	13	1	20	9
Healthy mucosa-descending colon	14	1	21	6
Colorectal neoplasms	24	1	NA	NA

NA: non-applicable; *Fusobacterium nucleatum*: *F. nucleatum*

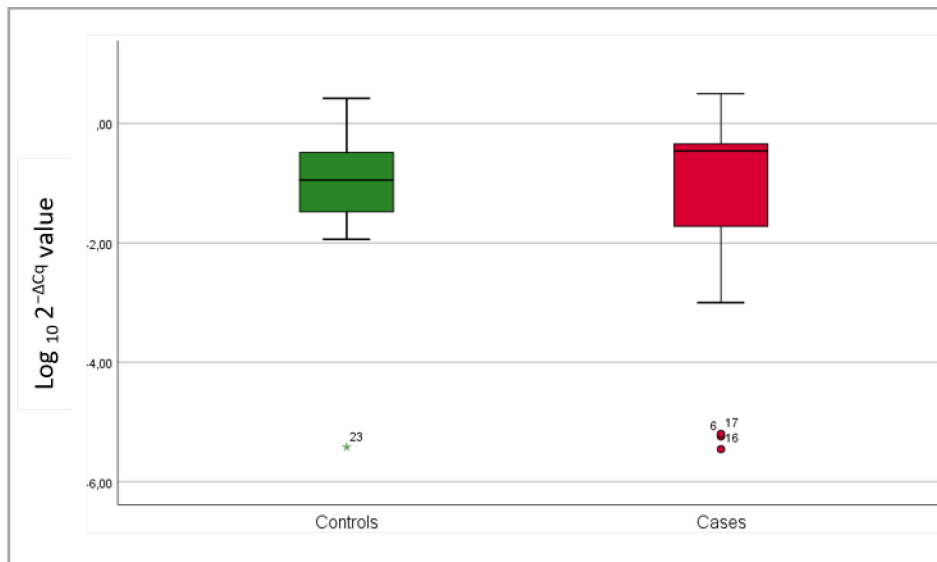


Figure 9. – Relative quantification of *Fusobacterium nucleatum* level in saliva, in case and control groups

Fusobacterium nucleatum level in saliva specimens is measured by qPCR as $2^{-\Delta Cq}$

DISCUSSION

In this pilot study, we generated preliminary data on detection and quantification of *F. nucleatum* in both saliva and colorectal mucosa from patients diagnosed with CRN and CRN-free controls.

We were able to collect and analyze a total of 135 biospecimens including saliva samples and healthy-colon mucosa biopsies from most cases and controls, and CRN biopsies from all cases.

F. nucleatum in saliva from CRN cases and CRN-free controls: Analysis with qPCR showed high detection rates of *F. nucleatum* in saliva from both case and control groups, consistent with previous studies^{25, 29}. *F. nucleatum* is in fact a commensal bacterium of the oral cavity, which explains its more common detection in saliva regardless of disease status. We also found a higher median level of *F. nucleatum* in saliva from the case group than from controls. A recent study in Turkey with a large number of participants (71 CRC cases and 77 controls)²⁵, and also using qPCR for microbial saliva analysis, showed a higher mean amount of *F. nucleatum* in CRC group than in control group (6.89 Log10 copies / ml in the case group vs 6.35 in the control group, p= 0.001). However, two other studies that applied 16SrRNA gene sequencing found similar salivary levels of *F. nucleatum* relative abundance in cases and controls. The first study was conducted in the USA²⁷, and saliva was collected by oral rinse with a commercial mouthwash, among 68 CRC cases and 122 controls. The second was conducted in Japan²⁶ and included unstimulated saliva from 24 CRC cases (and other cancers of the digestive tract) and 118 controls. In both studies, Fusobacterium was not the dominant bacterium.

F. nucleatum in colorectal mucosa from CRN cases and CRN-free controls: We found a low global detection rate of *F. nucleatum* in colorectal mucosa specimens in the controls, and it was even lower in the cases. At first, this finding might appear contradictory to previous reports finding *F. nucleatum* to be associated with CRN⁷⁻⁹. However, when considering the histologic type and the location of CRN in the patients in our study, our results can be seen to be consistent with those previous findings. Mima et al. (2016)³⁸ analyzed 1,102 colorectal tumors with qPCR, in 13% of which *F. nucleatum* was detected. When analyzing by colorectal tumor site, *F. nucleatum* detection was 15% and 9% in proximal and distal-rectal sites, respectively. Also, in a previous study by Yu et al. (2016)³⁹ where *F. nucleatum* was investigated in 280 CRNs and 20 healthy mucosa specimens from independent controls using FISH technique, *F. nucleatum* was prevalent in proximal serrated sessile adenomas, but rare in conventional adenomas³⁹. According to that study, the frequency of *F. nucleatum* positivity (defined as >5 visualized probes per field) was 29% in proximal conventional adenomas, 24% in distal conventional adenomas, 79% in serrated sessile adenomas, 90% in proximal CRCs, 42% in distal CRCs, and 20% in healthy mucosa from independent controls. High abundance of invasive *F. nucleatum* (defined as > 20 visualized probes per field) was present in 5.3% of proximal conventional adenomas, 2.4% of distal conventional adenomas, 49% of serrated sessile adenomas, 71% of proximal CRCs, 38% of distal CRCs, and

none of the 20 healthy mucosa samples. We point out that the CRNs sampled in our study included 12 proximal conventional adenomas, 6 distal conventional adenomas, 2 serrated sessile adenomas and 2 distal CRCs, and that *F. nucleatum* was detected in a proximal conventional adenoma.

In this pilot study, we noticed that *F. nucleatum* was usually either detected in both subject's proximal and distal colon sites (ascending and descending colon healthy mucosa specimens), or not detected at all in both colon sites. On the other hand, we noticed that *F. nucleatum* level in the ascending colon moderately correlated with level in the descending colon. This could probably be because some subjects naturally harbor *F. nucleatum* in their gut microbiome, whereas others do not, which can also explain the detection of *F. nucleatum* in healthy mucosa of some controls in many previous studies. We can also think *F. nucleatum* may be associated to the intestinal disorders that led patients in the control group to undergo colonoscopy, and that it may be particularly involved in the serrated neoplasia pathway (where sessile serrated adenomas are precursors to tumors with sporadic microsatellite instability), and less in the conventional adenoma-carcinoma sequence, as suggested by Yu et al. (2016)³⁹.

Comparison of *F. nucleatum* in saliva and in colorectal mucosa within CRN cases and CRN-free controls: Detection rate of *F. nucleatum* in colorectal mucosa was much lower than in saliva, and few subjects had *F. nucleatum* detected in both sites. We found a moderate correlation between *F. nucleatum* level in saliva and healthy proximal colorectal mucosa in controls, but we could not explore this correlation in cases as *F. nucleatum* was detected in colorectal mucosa specimens of only one CRN case. The only data that could serve as comparison to our finding came from two previous studies that investigated *F. nucleatum* in a few samples of saliva and colorectal tumors in the same CRC cases, without control group and without bacterium quantification, as only conventional PCR (non-quantitative) was used^{18,28}. *F. nucleatum* was detected less commonly in mucosa samples than in saliva in the first study (in 8 /14 tumors and 14/14 saliva)¹⁸, and in all specimens in the second one (in 10 tumors and 10 saliva)²⁸.

In conclusion, concerning the objectives of the pilot study, our study findings provide potentially useful preliminary data on expression of *F. nucleatum* in both oral and colorectal body sites in patients diagnosed with CRN and CRN-free controls. Further studies that aim to assess the association between oral and colorectal levels of *F. nucleatum* in CRN cases are still needed and can draw from our methods and results in making study-design decisions, including the

inclusion/exclusion criteria, selection of study participants, data collection instruments and analysis, and sample size calculation. They also should pay attention to both the histologic type and site of CRNs to be included, and optimally focus on proximal location and adenoma of sessile type. To quantify *F. nucleatum* in colorectal healthy mucosa, there may no longer be a need for collection and analysis of two different specimens from both proximal and distal colon sites, as one specimen (preferably from the proximal colon) can be sufficiently informative, especially given that some patients may not consent to provide biopsies from healthy mucosa even if they agree to provide specimens of their tumor, which they know will be excised anyway. Finally, studies should generally plan a quantitative microbial analysis of *F. nucleatum* in saliva specimens: non-quantitative techniques (such as conventional PCR, for example) only assess the presence of the bacterium.

Our preliminary results encourage future research to investigate oral and colorectal enrichment in *F. nucleatum*, in patients with precancerous lesions as well as cancerous lesions at different stages of colorectal malignant transformation, to overcome the difficulty of conducting prospective research on the causal role of the oral bacterium *F. nucleatum* in colorectal carcinogenesis. If the hypothesis of an intra-individual oral origin of the colorectal enrichment in *F. nucleatum* is confirmed, this may have potential impact on colorectal cancer prevention, diagnosis, and treatment. Thus, many studies are investigating the potential of candidate fecal bacteria as biomarkers for early detection of adenomatous polyps and colon cancer^{40, 41}. Under the same perspective, saliva can be a promising non-invasive screening tool for colorectal adenoma and cancer. Also, and more importantly, investigating the association between the oral and colorectal levels of *F. nucleatum* in colorectal neoplasms patients can advance the understanding of the mechanism(s) underlying the connection between periodontal disease and colorectal cancer, which may involve the translocation of periodontal pathogens to the gut and the release of their pro-oncogen and pro-inflammatory virulence products. Periodontal disease is suggested as a risk factor for CRC⁴², but the mechanisms of the association have yet to be elucidated. Thus, a subsequent, larger epidemiological study on this topic is highly recommended.

Acknowledgments

We thank all study participants, as well as Dr Sacha Sidani and Dr Simon Bouchard who helped in participant identification and biopsy collection.

References

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 2021;71(3):209-49.
2. Keum N, Giovannucci E. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2019;16(12):713-32.
3. Sara Pecori, Paola Capelli, Marco Vergine, Menestrina F. Pathological Features of Sporadic Colonic Adenoma. In: Springer, editor. *Intestinal Polyps and Polyposis: From Genetics to Treatment and Follow-up*; 2009. p. 19-47.
4. Flanagan LS, J.; Ebert, M.; Soucek, P.; Kunicka, T.; Liska, V.; Bruha, J.; Neary, P.; Dezeew, N.; Tommasino, M.; Jenab, M.; Prehn, J. H.; Hughes, D. J. *Fusobacterium nucleatum* associates with stages of colorectal neoplasia development, colorectal cancer and disease outcome. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 2014;33(8):1381-90.
5. Yu YNY, T. C.; Zhao, H. J.; Sun, T. T.; Chen, H. M.; Chen, H. Y.; An, H. F.; Weng, Y. R.; Yu, J.; Li, M.; Qin, W. X.; Ma, X.; Shen, N.; Hong, J.; Fang, J. Y. Berberine may rescue *Fusobacterium nucleatum*-induced colorectal tumorigenesis by modulating the tumor microenvironment. *Oncotarget* 2015;6(31):32013-26.
6. Wong SHK, T. N. Y.; Chow, T. C.; Luk, A. K. C.; Dai, R. Z. W.; Nakatsu, G.; Lam, T. Y. T.; Zhang, L.; Wu, J. C. Y.; Chan, F. K. L.; Ng, S. S. M.; Wong, M. C. S.; Ng, S. C.; Wu, W. K. K.; Yu, J.; Sung, J. J. Y. Quantitation of faecal *Fusobacterium* improves faecal immunochemical test in detecting advanced colorectal neoplasia. *Gut* 2017;66(8):1441-48.
7. Rezasoltani S, Asadzadeh Aghdai H, Dabiri H, et al. The association between fecal microbiota and different types of colorectal polyp as precursors of colorectal cancer. *Microb Pathog* 2018;124:244-49.
8. McCoy AN, Araujo-Perez F, Azcarate-Peril A, et al. *Fusobacterium* Is Associated with Colorectal Adenomas. *Plos One* 2013;8(1):8.
9. Ye XC, Wang R, Bhattacharya R, et al. *Fusobacterium Nucleatum* Subspecies *Animalis* Influences Proinflammatory Cytokine Expression and Monocyte Activation in Human Colorectal Tumors. *Cancer Prevention Research* 2017;10(7):398-409.
10. Rubinstein MR, Wang X, Liu W, et al. *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/ β -catenin signaling via its FadA adhesin. *Cell Host Microbe* 2013;14(2):195-206.
11. Gur C, Ibrahim Y, Isaacson B, et al. Binding of the Fap2 protein of *Fusobacterium nucleatum* to human inhibitory receptor TIGIT protects tumors from immune cell attack. *Immunity* 2015;42(2):344-55.
12. Kapatral V, Anderson I, Ivanova N, et al. Genome sequence and analysis of the oral bacterium *Fusobacterium nucleatum* strain ATCC 25586. *J Bacteriol* 2002;184(7):2005-18.
13. Han YW. *Fusobacterium nucleatum* interaction with host cells- Oral microbial communities: genomic inquiry and interspecies communication; 2011.
14. Dumitrescu AL. *Etiology and pathogenesis of periodontal disease*. London & New York: Springer; 2010.
15. Signat B, Roques C, Poulet P, Duffaut D. *Fusobacterium nucleatum* in periodontal health and disease. *Current Issues in Molecular Biology* 2011;13(2):25-36.

16. Saygun I, Nizam N, Keskiner I, et al. Salivary infectious agents and periodontal disease status. *J Periodontal Res* 2011;46(2):235-9.
17. Abed J, Maalouf N, Manson AL, et al. Colon Cancer-Associated *Fusobacterium nucleatum* May Originate From the Oral Cavity and Reach Colon Tumors via the Circulatory System. *Front Cell Infect Microbiol* 2020;10:400.
18. Komiya Y, Shimomura Y, Higurashi T, et al. Patients with colorectal cancer have identical strains of *Fusobacterium nucleatum* in their colorectal cancer and oral cavity. *Gut* 2019;68(7):1335-37.
19. Schmidt TS, Hayward MR, Coelho LP, et al. Extensive transmission of microbes along the gastrointestinal tract. *Elife* 2019;8.
20. Xuan K, Jha AR, Zhao T, Uy JP, Sun C. Is periodontal disease associated with increased risk of colorectal cancer? A meta-analysis. *Int J Dent Hyg* 2020.
21. Lee D, Jung KU, Kim HO, Kim H, Chun HK. Association between oral health and colorectal adenoma in a screening population. *Medicine (Baltimore)* 2018;97(37):e12244.
22. Lo CH, Nguyen LH, Wu K, et al. Periodontal Disease, Tooth Loss, and Risk of Serrated Polyps and Conventional Adenomas. *Cancer Prev Res (Phila)* 2020;13(8):699-706.
23. Kim GW, Kim YS, Lee SH, et al. Periodontitis is associated with an increased risk for proximal colorectal neoplasms. *Sci Rep* 2019;9(1):7528.
24. Flemer B, Warren RD, Barrett MP, et al. The oral microbiota in colorectal cancer is distinctive and predictive. *Gut* 2018;67(8):1454-63.
25. Guven DC, Dizdar O, Alp A, et al. Analysis of *Fusobacterium nucleatum* and *Streptococcus gallolyticus* in saliva of colorectal cancer patients. *Biomark Med* 2019;13(9):725-35.
26. Kageyama S, Takeshita T, Takeuchi K, et al. Characteristics of the Salivary Microbiota in Patients With Various Digestive Tract Cancers. *Front Microbiol* 2019;10:1780.
27. Kato I, Vasquez AA, Moyerbrailean G, et al. Oral microbiome and history of smoking and colorectal cancer. *J Epidemiol Res* 2016;2(2):92-101.
28. Russo E, Bacci G, Chiellini C, et al. Preliminary Comparison of Oral and Intestinal Human Microbiota in Patients with Colorectal Cancer: A Pilot Study. *Front Microbiol* 2017;8:2699.
29. Yang Y, Cai Q, Shu XO, et al. Prospective study of oral microbiome and colorectal cancer risk in low-income and African American populations. *Int J Cancer* 2019;144(10):2381-89.
30. Mannath J, Rangunath K. Endoscopic mucosal resection: who and how? *Therap Adv Gastroenterol* 2011;4(5):275-82.
31. Imperiale TF, Ransohoff DF, Itzkowitz SH, et al. Multitarget stool DNA testing for colorectal-cancer screening. *N Engl J Med* 2014;370(14):1287-97.
32. Idrissi Janati A, Karp I, Latulippe J-F, Charlebois P, Emami E. Periodontal Disease as a Risk Factor for Sporadic Colorectal Cancer: Results from COLDENT Study. Accepted for publication in *Cancer Causes Control* on Dec 3rd, 2021.
33. Friedenreich CM, Courneya KS, Bryant HE. The lifetime total physical activity questionnaire: development and reliability. *Med Sci Sports Exerc* 1998;30(2):266-74.
34. Willett WC, Reynolds RD, Cottrell-Hoehner S, Sampson L, Browne ML. Validation of a semi-quantitative food frequency questionnaire: comparison with a 1-year diet record. *J Am Diet Assoc* 1987;87(1):43-7.
35. Cade J, Thompson R, Burley V, Warm D. Development, validation and utilisation of food-frequency questionnaires - a review. *Public Health Nutr* 2002;5(4):567-87.
36. Siemiatycki J, Krewski D, Franco E, Kaiserman M. Associations between cigarette smoking and each of 21 types of cancer: a multi-site case-control study. *Int J Epidemiol* 1995;24(3):504-14.

37. Mima K, Sukawa Y, Nishihara R, et al. Fusobacterium nucleatum and T Cells in Colorectal Carcinoma. *JAMA Oncol* 2015;1(5):653-61.
38. Mima K, Cao Y, Chan AT, et al. Fusobacterium nucleatum in Colorectal Carcinoma Tissue According to Tumor Location. *Clin Transl Gastroenterol* 2016;7(11):e200.
39. Yu J, Chen Y, Fu X, et al. Invasive Fusobacterium nucleatum may play a role in the carcinogenesis of proximal colon cancer through the serrated neoplasia pathway. *Int J Cancer* 2016;139(6):1318-26.
40. Rezasoltani S, Sharafkhah M, Asadzadeh Aghdai H, et al. Applying simple linear combination, multiple logistic and factor analysis methods for candidate fecal bacteria as novel biomarkers for early detection of adenomatous polyps and colon cancer. *J Microbiol Methods* 2018;155:82-88.
41. Suehiro Y, Sakai K, Nishioka M, et al. Highly sensitive stool DNA testing of Fusobacterium nucleatum as a marker for detection of colorectal tumours in a Japanese population. *Ann Clin Biochem* 2017;54(1):86-91.
42. Xuan K, Jha AR, Zhao T, Uy JP, Sun C. Is periodontal disease associated with increased risk of colorectal cancer? A meta-analysis. *Int J Dent Hyg* 2021;19(1):50-61.

6. DISCUSSION

Dans ce projet doctoral, nous avons mené trois projets de recherche distincts dont les objectifs convergent ensemble vers l'analyse et la compréhension de l'association entre la MP et le CCR sporadique. Ainsi, grâce à l'analyse des données du projet COLDENT, on a pu vérifier la présence d'une association entre la MP et le CCR. L'investigation des mécanismes de cette association est, quant à elle, entamée grâce aux résultats de notre revue systématique avec méta-analyse et de l'étude de pilote sur *F. nucleatum* dans la salive et le côlon.

C'est sous cette perspective et poursuivant cet objectif général du présent projet doctoral que nous présenterons notre discussion des résultats.

6.1 Étude de l'association entre la maladie parodontale et le cancer colorectal

6.1.1 Apport de l'étude de faisabilité du Projet COLDENT

Avant d'interpréter les résultats du projet COLDENT, sur l'association entre la MP et le CCR, il est important de revenir sur l'importance des recommandations recueillies de l'analyse des résultats de l'étude de faisabilité, et qui ont permis de mener avec succès l'étude principale COLDENT.

Ceci est un extrait de mon mémoire de maîtrise, Chapitre 4 : Discussion, section 4-1(p 74-75) : ***La santé orale compromise comme facteur de risque pour le cancer colorectal sporadique (COLDENT): une étude de faisabilité***, publié en avril 2014:

« APPORT DE L'ÉTUDE DE FAISABILITÉ POUR L'ÉTUDE PRINCIPALE

L'étude de faisabilité a été de grande utilité pour préparer l'étude principale. Une bonne coordination entre l'équipe de recherche et les personnes ressources dans les hôpitaux a été établie. L'expérience vécue nous a permis d'identifier les besoins et d'appuyer les demandes auprès des comités d'éthique de la recherche des divers établissements. Le but était de permettre un recrutement optimal tout en respectant la confidentialité des patients.

La nature pilote de cette étude nous a autorisé à apporter des changements à la méthodologie alors que l'étude était déjà entamée. Cela représente un grand avantage des études de faisabilité. Les modifications sont ainsi testées à leur tour, avant d'apporter des changements finaux à l'étude principale.

Ainsi, à l'issue des résultats de cette étude, les modifications suivantes ont été apportées à l'étude principale :

- La population de l'étude COLDENT s'est limitée à celle de l'île de Montréal et de Laval et non à la population de la région métropolitaine de recensement de Montréal. La raison était que peu de cas identifiés habitaient dans la région métropolitaine à l'extérieur de l'île de Montréal et de Laval.

- L'appariement entre les cas et les témoins selon le lieu de résidence ne s'est pas avéré nécessaire.

- L'âge minimal des participants a été fixé à 40 ans car très peu de cas identifiés étaient plus jeunes que 40 ans.

- La collecte des données est faite uniquement par des questionnaires. Ceux-ci peuvent être administrés à l'unité de recherche, à domicile ou à l'hôpital. Ils sont aussi conçus pour être auto-administrés.

- Les données collectées ont été directement saisies sur une base de données informatique afin d'éviter les erreurs de saisie.

- La taille échantillonnale de l'étude principale COLDENT a été recalculée à 674 participants, dont 337 cas et 337 témoins. Le budget de l'étude s'élève aux alentours de 400\$/participant, si on inclut tous les frais afférents (Compensations du personnel, matériel, compensations des participants...etc.).

L'étude COLDENT a reçu le financement de la Société de recherche sur le cancer à la fin de l'année 2012. Étant donné que toutes les procédures ont été standardisées lors de l'étude de faisabilité, l'étude COLDENT n'a pris que peu de délais pour commencer. Le recrutement s'est déroulé au niveau de trois hôpitaux de Montréal et l'approbation du comité d'éthique de la recherche d'un quatrième hôpital est prévue dans les prochains délais. Le taux de participation a augmenté significativement. La collecte des données est en cours et elle est assurée par le personnel déjà entraîné. »

On peut constater l'importance des résultats de l'étude de faisabilité car ils nous ont indiqué la nécessité d'apporter des modifications au protocole initial de l'étude principale, avant qu'elle ne commence. D'ailleurs, ils nous ont permis de mener l'étude subséquente à plus grande échelle. Nous résumons, ci-dessous, ce qui a été concrètement accompli lors des deux étapes de l'étude COLDENT :

Tableau 19. – Réalisations de l'étude de faisabilité et de l'étude principale COLDENT

	Étude de faisabilité	Étude principale
Nombre d'hôpitaux où sont recrutés les cas	3 à Région métropolitaine de Montréal	4 à Île de Montréal & 1 à Laval
Aire de résidence des témoins	Région métropolitaine de Montréal	Île de Montréal et Laval
Durée de déroulement	18 mois	72 mois
Réponse au recrutement (Taux de coopération)		
Cas	73 %	76 %
Témoins	32 %	45 %
Moyens de collecte des données sur la MP et facteurs de risque du CCR	Questionnaires et examen dentaire	Questionnaires
Nombre de participants		
Total	69	658
Cas	30	348
Témoins	39	310

Le tableau ci-dessus confirme l'intérêt de promouvoir les études de faisabilité. En effet, elles permettent de confronter la méthodologie préalablement planifiée pour des projets de recherche d'envergure à la réalité de les exécuter sur le terrain. Souvent, des modifications du plan initial s'avèrent nécessaires avant d'entamer l'étude principale. Le choix de celles-ci est un compromis entre l'accomplissement de l'étude et les méthodes justes pour y arriver sans altérer la validité interne et externe des résultats attendus.

6.1.2 Résultats sur l'association entre la maladie parodontale et le cancer colorectal

Les résultats de notre projet de recherche COLDENT suggèrent que le taux de CCR, en contrôlant pour la majorité des facteurs de confusion potentiels, était plus élevé chez les personnes avec un historique positif de la MP que les personnes sans historique de MP (Rapport des taux ajusté = 1,45 ; IC à 95 % : 1,04-2,01) ($p = 0,026$).

Nos résultats concordent avec ceux de deux grandes études antérieures qui ont aussi rapporté une association significativement positive entre la MP et le CCR. La première est l'étude de cohorte rétrospective, analysant les données de 106 487 inscrits à l'assurance-maladie nationale

Taiwanaise (n = 106 487), dans laquelle la MP était définie par des codes administratifs attribués au diagnostic clinique de la gingivite et de la parodontite³¹. Les résultats montrent que la MP augmente de 64% le risque de CCR (RRI ajusté = 1,64; IC à 95% = 1,50–1,80). Ces résultats sont néanmoins obtenus en ajustant uniquement pour les trois variables d'âge, de sexe et de comorbidités. L'étude est malheureusement très propice à un biais de mesure de la MP par possibilité de surcodage délibéré des prestataires de santé et à un biais de confusion par absence de contrôle des facteurs de risque du CCR^{31,208}. Dans la deuxième étude, Arora et al.³⁷ ont analysé les données d'un sous-échantillon (n = 15 333) d'une cohorte prospective de jumeaux suédois, âgés de 38 ans et plus, pour lesquels la MP était recherchée par une question sur la mobilité et la perte spontanée des dents. Leurs résultats montrent que les personnes exposées à la MP avaient 62 % plus de risque que les non exposés (Risque relatif ajusté = 1,62; IC à 95% = 1,13-2,33), en ajustant pour une multitude de facteurs de risque du CCR sauf pour les consommations alimentaires à risque du CCR et l'activité physique. Vu la définition adoptée de la MP, on peut déduire que leur mesure d'association traduit plus le risque de CCR lié à la MP à un stade avancé et non pour les autres stades de la maladie.

Dans d'autres études, même avec des échantillons de grande taille, une association positive avec le CCR n'est constaté que pour la MP sévère. À titre d'exemple l'étude de Momen-Heravi et al.³⁴, cette étude de cohorte prospective est menée auprès d'infirmières américaines, *l'American Nurses' Health Study*. et portant sur un sous-échantillon (n=69 656). La MP est définie par une question sur un antécédent de perte osseuse parodontale. La gravité de la perte osseuse est ensuite classée selon la perception des participants en aucune, légère ou modérée/sévère. Les résultats de l'étude ne montrent aucune association entre les antécédents de perte osseuse parodontale et le CCR (RRI = 0,89 ; IC à 95 % : 0,72-1,10). Cependant, une tendance d'association se dessine lorsque la perte osseuse est modérée/sévère et le CCR (RRI = 1,22; IC à 95 % : 0,91-1,63). Tous ces résultats sont obtenus en ajustant pour plusieurs facteurs de risque du CCR (âge, ethnicité, diabète, IMC, tabagisme, antécédents de CCR chez les parents au premier degré, antécédents de sigmoïdoscopie/coloscopie, activité physique actuelle, consommation d'alcool, de viandes rouges et de viandes transformées, usage régulier d'aspirine, usage de multivitamines, apport de calcium, de vitamine D, d'acide folique et hormonothérapie substitutive)³⁴.

Causalité de l'association entre la MP et le CCR

À la lumière des résultats de notre étude, on ne peut pas se prononcer sur un éventuel lien de causalité entre la MP et le CCR puisque l'association retrouvée est certes significativement positive, mais faible. Aussi, nous n'avons pas encore suffisamment de données épidémiologiques fiables pour vérifier la consistance de cette association. Nous n'avons pas non plus été en mesure de vérifier une relation proportionnelle entre l'exposition et la maladie. C'est-à-dire qu'une augmentation de la durée d'exposition à la MP ou de son degré de sévérité entraînerait parallèlement une augmentation du risque de CCR associé.

Nous avons en effet exploré le lien temporel entre l'historique de la MP et le diagnostic du CCR chez les participants avec un historique positif de MP. Nous avons trouvé que pour 75% des cas ayant eu un historique positif de MP, le début de la maladie se situait dans des tranches d'âge antérieures à celle du diagnostic du CCR (au moins 15 ans). Malheureusement, on n'a pas pu calculer la durée exacte de l'exposition à la MP, mais juste l'estimer d'une façon très approximative en utilisant les données disponibles.

Cependant, on peut évoquer deux études qui ont analysé l'association entre la MP et les adénomes colorectaux, considérés comme des stades précoces de cancers colorectaux. Une association significative entre la MP et les adénomes colorectaux est rapportée dans les deux études de Lee et al.²⁰⁶ et de Lo et al.²⁰⁷. Dans la dernière étude de Lo et al.²⁰⁷, les chercheurs ont mené une analyse groupée des données de deux cohortes prospectives d'un total de 42 486 hommes professionnels de la santé et de femmes infirmières aux États-Unis²⁰⁷. Leurs résultats montrent une association significative entre la MP (définie sur la base d'un antécédent de diagnostic professionnel) et les adénomes, qu'ils soient conventionnels (RC ajusté = 1,11; IC à 95% = 1,02-1,19), ou festonnées (RC ajusté = 1,17; IC à 95% = 1,06-1,29). Les mesures d'association sont ajustées pour plusieurs facteurs de confusion potentiels. Certes, l'association est dans ce cas aussi significative, mais demeure assez faible pour prouver un lien de causalité.

6.1.3 Forces de l'étude COLDENT

6.1.3.1 Définition de la maladie parodontale

La décision de ne pas mener d'exams cliniques parodontaux a été prise en se basant sur les résultats de l'étude de faisabilité, où l'examen parodontal n'a pu être réalisé que chez 7/30 cas et

26/39 témoins. Vu la participation différentielle à l'examen parodontal entre les cas et les témoins, son instauration dans l'étude principale aurait inévitablement exposé l'étude à un biais de sélection qui aurait affecté la validité des résultats.

Nous avons alors donné une grande importance à la définition précise de cas de la MP par des mesures auto-rapportées, afin qu'on puisse le plus possible se rapprocher d'une classification basée sur des indices cliniques. D'où l'utilisation de plusieurs questions dont les réponses nous procurent différentes catégories d'information entourant la MP. D'ailleurs, deux revues systématiques sur la validité des mesures auto-rapportées de la MP^{193, 203} s'accordent sur l'incapacité d'une seule question à détecter la condition de MP dans une population, car ces questions ont certes une spécificité élevée, mais une sensibilité faible. S'ajoute à cela que la validité d'une question est liée à la population spécifique où elle a été examinée. Blicher et al.¹⁹³, à l'issue des résultats de leur revue systématique, avaient alors recommandé de combiner plusieurs questions de différentes catégories d'information, ainsi que d'utiliser des variantes d'une question (dans la même catégorie) pour augmenter le taux de détection de la MP par la mesure auto-rapportée¹⁹³.

Malheureusement, l'usage d'une seule question pour définir un cas de MP est resté assez fréquent dans les études observationnelles et plusieurs associations entre la MP et des maladies systémiques sont évoquées sur la base d'une telle définition de cas de MP. Or, L'utilisation d'une seule question peut amener à une sous-estimation de la prévalence de la MP et par conséquent un biais de mesure si cette sous-estimation est différentielle.

Pour valider notre façon de procéder avec la définition de la MP, nous avons effectué une revue de la littérature des études observationnelles qui ont exploré l'association entre la MP définie par mesures auto-rapportées (en tant qu'exposition principale) et toutes sortes de maladies systémiques (en tant que résultats). Le but était de comparer la prévalence de la MP auto-rapportée dans ces études à celle rapportée par des statistiques de surveillance basées sur des examens parodontaux cliniques, dans une même population ou des populations très semblables. Ceci nous a donné aussi une idée sur l'importance du problème de la mauvaise classification de la MP, qui désormais ne concerne pas seulement les études ayant analysé l'association entre la MP et le CCR (comme déjà vu dans la revue de littérature), mais bien plus encore. Nous avons résumé les résultats de notre revue dans le tableau 20 suivant :

Tableau 20. – Usage des mesures parodontales auto-rapportées dans les études observationnelles sur l’association entre la maladie parodontale et les maladies, ou indicateurs de maladies

Auteurs, année, (références)	Maladie ou indicateur de maladie systémique (outcome) associé (e) à la MP	Étude originale : Titre, devis; Échantillon où la MP est auto-rapportée (N, âge et particularités); Pays	Période & Mesure de la MP auto-rapportée	Prévalence de la MP dans l'échantillon	Catégorie d'information ciblée par la question sur la MP
UNE SEULE CATÉGORIE D'INFORMATION CIBLÉE PAR LA (LES) QUESTION (S) SUR LA MP					
Bertrand et al. 2017	Lymphome non Hodgkinien	Health Professionals Follow-up Study (HPFS) <ul style="list-style-type: none"> • Cohorte prospective • N= 51529 • Hommes professionnels de la santé (dentistes, vétérinaires, pharmaciens, optométristes, ostéopathes et podiatres) • Âge : 40-75 ans • USA 	1986 : <i>« Have you been professionally diagnosed with periodontitis with bone loss? »</i>	Parodontite : 16 %	Antécédent de diagnostic professionnel de MP
Boylan et al. 2014	Ulcère gastrique and duodénal				
Joshiyura et al. 1996	Maladie coronarienne				
Joshiyura et al. 2004	Biomarqueurs de maladie cardiovasculaire				
Michaud et al. 2008	Cancer et cancers par site				
Michaud et al. 2016	Cancer et cancers par site chez non-fumeurs				
Oh et al. 2020	Cancer de la vessie				
Pasquale et al. 2016	Glaucome primitif à angle ouvert				
R-Tumanyan et al. 2012 (38, 204, 260-266)	Hypertension				
Arkema et al. 2010	Polyarthrite rhumatoïde	The Nurses' Health Study (NHS) <ul style="list-style-type: none"> • Cohorte prospective nationale • N= 121700 • Femmes infirmières • Âge: 30-55 ans (1976) • USA 	1992 : <i>« In the last two years have you had periodontal surgery (not including root canals)? »</i> (En 1998, la question a été modifiée en: <i>« Have you had a history of periodontal bone loss? »</i>)	MP : 12 %	Antécédent de diagnostic professionnel de MP
Momen-H et al. 2017	Cancer colorectal				
Nakib et al. 2013 (34, 267, 268)	Psoriasis				
Freudenheim et al. 2016	Cancer du sein	Women's Health Initiative Observational Cohort Study (WHI-OS) <ul style="list-style-type: none"> • Cohorte prospective nationale • N= 93676 • Femmes post-ménopausées • Âge : 50–79 ans • USA 	1998 : <i>« Has a dentist or dental hygienist ever told you that you had periodontal or gum disease? »</i>	MP : 26 %	Antécédent de diagnostic professionnel de MP
Gordon et al. 2019	Hypertension				
LaMonte et al. 2017	Maladies cardiovasculaires, accident vasculaire cérébral et mortalité				
Mai et al. 2014	Cancer du poumon				
Nwizu et al. 2017 (35, 269-272)	Cancer total et cancers par site				

Tableau 20. – Usage des mesures parodontales auto-rapportées dans les études observationnelles sur l'association entre la maladie parodontale et les maladies, ou indicateurs de maladies					
Auteurs, année, (références)	Maladie ou indicateur de maladie systémique (outcome) associé (e) à la MP	Étude originale : Titre, devis; Échantillon où la MP est auto-rapportée (N, âge et particularités); Pays	Période & Mesure de la MP auto-rapportée	Prévalence de la MP dans l'échantillon	Catégorie d'information ciblée par la question sur la MP
Groves et al. 2015 (273)	Calcium de l'artère coronaire (prédicteur d'effets indésirables coronariens majeurs)	Coronary Artery Calcification in Type 1 Diabetes (CACTI) study <ul style="list-style-type: none"> • Cohorte prospective • N= 1420 • Âge: 20–55 ans • USA (Colorado) 	2000–2002 : <i>« Have you ever been told by a dentist or dental hygienist that you have gum disease? »</i>	MP : 14 %	Antécédent de diagnostic professionnel de MP
Pitiphat et al. 2008 (274)	Issues défavorables de la grossesse	Project Viva <ul style="list-style-type: none"> • Cohorte prospective • N= 1635 • Femmes en début de grossesse • USA (Massachusetts) 	1999–2002 : <i>« Have you ever been told by a dentist or dental hygienist that you have periodontal disease (gum disease with bone loss)? »</i>	Parodontite : 4 %	Antécédent de diagnostic professionnel de MP
Mochari et al. 2008 (275)	Marqueurs inflammatoires du risque de maladie cardio-vasculaire	FIT Heart <ul style="list-style-type: none"> • Étude transversale • N=421 • Âge: 20 à 79 ans • USA 	2005–2007 : 1. <i>« Have you ever been informed that you have periodontal (gum) disease? »</i> & 2. <i>« Have you ever received treatment for periodontal disease? »</i>	MP : 23 %	Antécédent de diagnostic professionnel de MP
Ylostalo et al. 2006	Maladies cardiovasculaires et indicateurs de risques sanitaires élevés	The Northern Finland birth cohort <ul style="list-style-type: none"> • Cohorte prospective • N= 6033 • Âge: 31 ans • Finlande 	1997–1998 : <i>« In your opinion, do your gums bleed when you brush your teeth? »</i>	Gingivite : 33 %	Manifestations cliniques de MP
Ylostalo et al. 2008 (276, 277)	Niveau de protéine C-réactive				
Oliveira et al. 2016 (278)	Diabète type 1	Brazilian Nationwide Survey <ul style="list-style-type: none"> • Étude transversale multicentrique • N= 3591 • Âge moyen: 21 ans • Brésil 	2008–2010 : <i>« Do you think you have gum disease? »</i>	MP : 5 %	Perception individuelle de son état de santé parodontale

Tableau 20. – Usage des mesures parodontales auto-rapportées dans les études observationnelles sur l'association entre la maladie parodontale et les maladies, ou indicateurs de maladies

Auteurs, année, (références)	Maladie ou indicateur de maladie systémique (outcome) associé (e) à la MP	Étude originale : Titre, devis; Échantillon où la MP est auto-rapportée (N, âge et particularités); Pays	Période & Mesure de la MP auto-rapportée	Prévalence de la MP dans l'échantillon	Catégorie d'information ciblée par la question sur la MP
Howell et al. 2001 (279)	Maladies cardiovasculaires	Physicians' Health Study I (PHS I) <ul style="list-style-type: none"> • Étude prospective • N=22071 • Hommes médecins • Âge: 40 à 84 ans • USA 	1982 : <i>« Do you have a personal history of periodontal disease? »</i>	MP : 12 %	Perception individuelle de son état de santé parodontale
DEUX CATÉGORIES D'INFORMATION CIBLÉES PAR LA (LES) QUESTION (S) SUR LA MP					
Kaneto et al. 2012 (280, 281)	Ulcères peptiques	MY Health Up Study <ul style="list-style-type: none"> • Enquête prospective • N= 28 765 • Employés d'une compagnie d'assurance • Japon 	2004 : 1. <i>« Have you been told you have periodontitis? »</i> & Score de risque de MP=nombre total de manifestations cliniques rapportées : i) Saignement; ii) Dents mobiles; iii) Mauvaise haleine	MP : 21 %	Antécédent de diagnostic professionnel & Manifestations cliniques de MP
Gonzalez-N et al. 2018 (282)	Incidents cardiovasculaires et mortalité	Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA) <ul style="list-style-type: none"> • Cohorte prospective multicentrique • N=6814 • Âge: 45–84 ans • USA 	2000–2002 : 1. <i>« Have you had history of periodontitis or gum disease? »</i> 2. <i>« Have you had lost teeth due to periodontitis or gum disease? »</i> MP si oui à question 1 ou 2	MP : 27 %	Antécédent de diagnostic professionnel & Manifestations cliniques de MP

Tableau 20. – Usage des mesures parodontales auto-rapportées dans les études observationnelles sur l’association entre la maladie parodontale et les maladies, ou indicateurs de maladies

Auteurs, année, (références)	Maladie ou indicateur de maladie systémique (outcome) associé (e) à la MP	Étude originale : Titre, devis; Échantillon où la MP est auto-rapportée (N, âge et particularités); Pays	Période & Mesure de la MP auto-rapportée	Prévalence de la MP dans l'échantillon	Catégorie d'information ciblée par la question sur la MP
TROIS CATÉGORIES D'INFORMATION CIBLÉES PAR LA (LES) QUESTION (S) SUR LA MP					
Bensley et al. 2011 (283)	Syndrome métabolique et nombre de maladies chroniques	Washington Adult Health Survey (WAHS) <ul style="list-style-type: none"> • Enquête transversale • N = 672 • Âge: ≥ 25 years • USA 	2006–2007 : <ol style="list-style-type: none"> 1. « <i>Have you ever had scaling, root planing, surgery, or other treatment for gum disease?</i> » 2. « <i>Have you ever had any teeth that have become loose by themselves without injury?</i> » 3. « <i>How would you rate the health of your gums? (Excellent, very good, good, fair, or poor)</i> » 4. « <i>Has a dental professional ever told you that you have gum disease? »</i> (MP sévère si réponse Oui à 1 ou 2; MP légère- modérée si Non à 1&2) et ('moyen' ou 'mauvais' 3 ou Oui à 4); et pas de MP sinon) 	MP : 47 % (Sévère: 24 % Légère-moderée : 18 %)	Antécédent de diagnostic & Manifestations cliniques de MP & Perception individuelle de son état de santé parodontale

On peut voir dans le tableau ci-dessus le nombre important de maladies systémiques dont l'association avec la MP a été étudiée en s'appuyant sur les mesures auto-rapportées. La majorité des publications que nous avons recensées sont des analyses secondaires de données provenant de quelques grandes cohortes populationnelles. On constate néanmoins que la majorité de ces études définissent la MP auto-rapportée sur la base d'une seule question, ou parfois plusieurs questions mais qui ne ciblent qu'une seule catégorie d'information. Ainsi, l'étude de Mochari et al.²⁷⁵: les deux questions: « *Have you ever been informed that you have periodontal (gum) disease?* »; et « *Have you ever received treatment for periodontal disease?* », informent sur un antécédent de diagnostic professionnel de MP.

Comme pour la définition de cas de MP fondée sur des mesures cliniques, un protocole de sondage parodontal partiel a tendance à sous-estimer la prévalence de la MP comparé à un protocole de sondage parodontal de la bouche complète¹⁹². De la même manière, l'utilisation d'une question ciblant un seul aspect de l'information sur la MP a aussi tendance à sous-estimer la prévalence de la MP comparé à l'usage de plusieurs questions, qui renseignent sur plus d'une catégorie d'information sur la MP. D'ailleurs, on peut facilement le constater à travers le tableau ci-dessus. A titre d'exemple, on peut simplement comparer la prévalence de la MP dans les études menées aux États-Unis, selon le nombre de catégories d'information ciblée par les mesures parodontales auto-rapportées qu'ils utilisent :

➤ L'étude de Groves et al.²⁷³, est menée au Colorado (2000–2002) auprès de participants âgés de 20 à 55 ans. Elle définit la MP par l'utilisation d'une seule question sur la présence ou non d'un diagnostic antérieur de MP. La question classe 14% des participants comme ayant une MP. D'autres études américaines faisant usage d'une seule question sur la MP ont recensé des prévalences de MP légèrement plus basses ou plus élevées. Cette fluctuation des résultats reflète les différences de caractéristiques des participants à chaque étude, et qui affectent en général le risque de MP (ex. médecins hommes, infirmières femmes, femmes post-ménopausées, femmes en début de grossesse).

➤ L'étude de Gonzalez-N et al.²⁸², est menée aussi aux États-Unis et à la même période que celle de Groves et al.²⁷³ (questionnaire sur la MP administré en 2000–2002). Elle définit un cas de MP par l'entremise de questions qui renseignent sur deux aspects de la MP (antécédent de

diagnostic professionnel de MP + complication clinique de la MP). Les résultats de cette étude révèlent une prévalence de **27%**.

➤ L'étude de Bensley et al.²⁸³, est une enquête de terrain aux États-Unis entre 2006 et 2007, auprès d'un échantillon probabiliste issu d'un échantillonnage stratifié en grappes à plusieurs degrés (*3-stage stratified cluster design*) selon des intervalles de revenu annuel des ménages. Ils définissent la MP sur la base de plusieurs questions enquêtant sur trois aspects de l'information : antécédent de diagnostic professionnel de MP + complications cliniques de MP + auto-connaissance de son état parodontal. Leur définition de cas de MP a classé **47%** des participants comme ayant une MP.

À la lumière de ces résultats, on conclut que plus la définition de la MP se base sur plusieurs informations différentes, plus on détecte de cas de la maladie et plus on se rapproche d'une classification basée sur des mesures cliniques. À ce titre, on peut toujours comparer la prévalence de MP auto-rapportée de 47% dans l'étude de Bensley et al.²⁸³ aux statistiques nationales américaines de surveillance basées sur des examens cliniques rapportées par Eke et al.¹⁶⁷. Ces derniers ont analysé les données de 10 683 adultes américains dentés, âgés de 30 à 79 ans, ayant participé à l'un des trois cycles de la *National Health and Nutrition Examination Survey* (2009–2010, 2011–2012 et de 2013–2014) et qui ont subi un examen parodontal complet de la bouche. Eke et al.¹⁶⁷ ont défini les cas de parodontite selon la définition de référence des CDC et l'AAP. Leurs résultats montrent que **42,2 %** avaient une catégorie de parodontite, composée de 7,8% de parodontites sévères et 34,4% de parodontites non sévères (modérées et légères combinées)¹⁶⁷.

En résumé, l'utilisation d'une seule question pour définir un cas de MP dans une étude épidémiologique est source de sous-estimation de la prévalence de la maladie dans l'échantillon étudiée. Ce qui pourrait introduire un biais de classification lorsque cette sous-estimation est différentielle. Cette dernière serait presque inévitable vu que les facteurs qui peuvent influencer la fiabilité de la réponse à une question sur la MP sont aussi des facteurs de risque des maladies étudiées, tels que l'âge, le sexe, le niveau d'éducation, le niveau socio-économique, l'accès aux soins de santé, etc. D'où l'importance de prêter une attention particulière à la définition de cas de MP par mesures auto-rapportées et on peut dire que notre définition de cas de MP est une force de notre étude.

6.1.3.2 Contrôle des facteurs de confusion

La deuxième force de notre étude est qu'elle est conçue spécifiquement pour vérifier l'association entre la MP et le CCR. Notre méthodologie est établie pour atteindre cet objectif tout en prêtant une attention particulière au contrôle des biais encourus. Comme déjà expliqué dans la revue de littérature, les études primaires qui ont étudié le lien entre la MP et le CCR étaient plutôt rares et la majorité des études étaient des analyses secondaires de données. Il est vrai que ces dernières sont aussi utiles en recherche car permettent de profiter de la disponibilité des données, surtout celles provenant de larges cohortes prospectives avec de longues années de suivi, ou encore provenant de bases de santé. Mais malheureusement, vu que les données collectées dans les études primaires répondent initialement à d'autres objectifs que les objectifs de recherche des analyses secondaires, des données peuvent être partiellement, ou même complètement, manquantes pour certaines variables d'intérêt. Ce qui peut expliquer la définition inadéquate de la MP et le contrôle insuffisant pour les facteurs de risque du CCR, dans la majorité des études antérieures sur l'association entre la MP et le CCR.

Ainsi, pour un bon contrôle du biais de confusion, nous avons non seulement collecté les données sur l'exposition à la majorité des facteurs de risque établis/potentiels du CCR, mais aussi pris en considération la durée et l'intensité d'exposition à ces facteurs de risque durant toute la durée de vie. D'où le calcul des paquets-années de cigarettes consommées, des moyennes de consommation des viandes rouges et transformées et d'alcool depuis le début de l'âge adulte et le score moyen d'activité physique totale de la vie. La recherche des expositions aux facteurs de risque du CCR au début de la vie est de plus en plus recommandée, vu la longue durée de développement du CCR et l'augmentation d'incidence du CCR chez les sujets jeunes au cours de ces dernières années²⁸⁴. Aussi, dans l'analyse de l'association entre la MP et le CCR, nous avons évité toute catégorisation non nécessaire des covariables continues, qui serait source de perte d'information, de perte de puissance statistique et de biais de confusion résiduel ^{161, 285, 286}.

6.1.4 Limites de l'étude COLDENT

Nous avons rencontré un faible taux de coopération dans notre série de témoins (45%), alors qu'il était plus élevé dans la série des cas (76%). La participation aux études épidémiologiques a en effet diminué au cours des dernières décennies pour tous les types d'étude et plus fortement pour les témoins dans les études cas-témoins à base populationnelle ^{242, 287}. Selon une revue récente de Xu

et al.²⁸⁸, le taux de réponse médian dans les études cas-témoins entre 2001 et 2010 était de 75,6 % (Intervalle interquartile: 60,2-79,5) dans les séries de cas et de 53 % (Intervalle interquartile: 46,6-67,3) dans les séries de témoins provenant de la population générale.

Les études ayant un faible taux de participation, sont plus vulnérables à un biais de sélection^{242, 243}. Nous avons tout même été capable de vérifier la présence de biais de sélection et d'ajuster notre analyse d'association pour les facteurs ayant influencé la volonté de participation, en l'occurrence l'âge et le niveau d'éducation atteint. En revanche, nous n'avons pas collecté de données sur l'exposition à la MP chez les sujets ayant refusé de participer. Par conséquent, nous ignorons si l'état parodontal de ces derniers était différent de celui des participants à l'étude. Cependant, vu qu'on ne menait pas d'examens dentaires, il serait peu probable que l'état parodontal d'une personne affecte sa décision à participer à l'étude. Ainsi, il est possible que les sujets qui ont une bonne condition buccale se sentent moins concernés et soient alors plus enclins à refuser de participer. Dans ce cas, cela aurait sous-estimé l'association entre la MP et le CCR en augmentant la proportion de témoins exposés à la MP parmi les participants, par rapport à la proportion réelle de témoins exposés à la MP dans la population générale. La situation contraire est tout aussi envisageable si la mauvaise condition buccodentaire de certains individus les avait amenés à refuser de participer à l'étude, et aurait ainsi surestimé l'association entre la MP et le CCR. Néanmoins, la prévalence de la MP chez les témoins de l'étude (38%) ne semble pas être sous-estimée par rapport à celle de la population générale. D'après les dernières statistiques canadiennes sur la prévalence de la MP, 32 % des adultes de 20 à 79 ans avait une gingivite, 16 % avait une parodontite modérée et 4 % une parodontite sévère, selon le rapport de l'Enquête Canadienne sur les Mesures de la Santé (ECMS) de 2007-2009¹⁶⁸. Ces statistiques pourraient même être sous-estimés puisqu'elles sont basées sur un protocole de sondage parodontal partiel de la bouche, qui a tendance à sous-estimer la prévalence de la MP par rapport à un protocole de sondage parodontal de bouche complète¹⁹².

Notre investigation rétrospective des expositions aux facteurs de risque comportementaux du CCR à des périodes lointaines de la vie des participants, peut amener une certaine inexactitude de l'information collectée. D'autant plus que cette information concerne parfois les premières périodes de la vie, surtout chez les personnes les plus âgées. Il est aussi possible que les cas aient été plus enclins à se rappeler avec plus de précision de leurs habitudes de vie à risque du CCR que les témoins, exposant ainsi nos résultats à un biais de rappel (*Recall bias*)²⁸⁹. Pour améliorer le

rappel de l'information, nous avons fait appel à certaines techniques tels que le rajout de sections d'introduction dans les questionnaires, l'administration du questionnaire de la diète sur des tranches d'âge et l'utilisation d'un guide d'entrevue lors de l'administration des questionnaires. Celui-ci sert à situer les sujets dans le temps par rapport à des événements importants qui ont marqué leur vie, et améliorer ainsi leur rappel de l'information. Aussi, lors de la présentation de l'étude aux participants et afin de ne pas susciter un rappel d'information plus précis pour un questionnaire que pour un autre, nous avons pris le soin de ne pas mettre l'emphase sur aucun facteur de risque de CCR en particulier. Par ailleurs, limiter la date du diagnostic du CCR à 6 mois dans les critères d'inclusion des cas avait aussi comme but de diminuer l'inexactitude d'information différentielle avec les témoins. Étant donné que bien souvent des changements d'habitudes de vie chez les cas (ex. diète, tabagisme, activité physique) vont suivre la prise en charge médicale pour le cancer. Ces changements peuvent altérer la mémoire antérieure des cas quant à leurs habitudes de vie précédant le diagnostic²⁸⁹.

On peut aussi considérer comme limite de l'étude, l'incapacité de nos questions sur la MP de distinguer entre les cas de gingivite et de parodontite, et entre les cas de MP traitées et non traitées. Les personnes classées comme ayant eu des antécédents de MP incluent certainement des cas de gingivite et de parodontite qui ont été traitées avec succès et suivis régulièrement, mais on en ignore leur nombre. Vu la différence de réversibilité entre la gingivite et la parodontite et de l'effet du traitement parodontal et de la maintenance sur le contrôle de l'inflammation locale, il aurait été très utile de disposer de l'information précise sur le type de l'affection et de son évolution. La MP est certes une maladie chronique, mais un parodonte soigné et stabilisé est un parodonte qui ne montre plus de signes d'inflammation. Stipulant que la MP augmenterait le risque de CCR par l'effet de la diffusion des produits d'inflammation locale vers la circulation sanguine. Un contrôle de cette inflammation par traitement parodontal devrait raisonnablement supprimer, ou au moins réduire le risque de CCR chez des patients diagnostiqués avec MP mais dont le parodonte a été traité et régulièrement contrôlé par la suite. Il est permis de penser que cette information manquante dans les études qui ont analysé l'association entre la MP et le CCR incluant la nôtre, fait que même avec des échantillons de grande taille, l'association se montre significativement faible, ou significative uniquement pour la parodontite sévère.

6.2 Étude des mécanismes d'association entre la maladie parodontale et le cancer colorectal

Dans le but d'entamer la compréhension des mécanismes d'association entre la MP et le CCR, nous avons mené une revue systématique avec méta-analyse sur l'association entre la détection de la bactérie parodontopathogène *F. nucleatum* dans le côlon et le CCR. On a mené également une étude pilote pour vérifier la faisabilité de rechercher la bactérie *F. nucleatum* dans les deux milieux oral et colorectal, chez des patients diagnostiqués avec des lésions cancéreuses et précancéreuses colorectales.

6.2.1 Association entre la détection de *F. nucleatum* dans le côlon et cancer colorectal

Notre revue systématique sur l'association entre la détection de *F. nucleatum* dans le côlon et le CCR a inclus 24 études observationnelles qui ont comparé la présence et/ou le niveau de la bactérie *F. nucleatum*, dans des échantillons de selles ou de muqueuse colorectale, entre un groupe de cas de CCR et un groupe de témoins indemnes de lésions cancéreuses et précancéreuses colorectales. Les résultats de notre revue systématique montrent que dans la majorité des études où la charge de *F. nucleatum* dans les échantillons colorectaux était quantifiée, celle-ci était significativement plus élevée chez les cas de CCR que chez les témoins.

Nous avons ensuite mené une méta-analyse de 12 études observationnelles qui ont rapporté le pourcentage des échantillons colorectaux où *F. nucleatum* était détecté, pour un total de 1098 cas de CCR et 1069 témoins. Seul le rapport de cotes combiné brut a pu être calculé en raison de la non-disponibilité des estimés de rapports de cotes ajustés dans les études individuelles. Les résultats montrent une association significativement positive entre la détection de la bactérie *F. nucleatum* dans le côlon-rectum et le CCR (RC combiné = 8,3; IC à 95% = 5,2-13; Indice d'hétérogénéité $I_2 = 26,3\%$; valeur p pour hétérogénéité = 0,18), mais sans aucun contrôle pour les facteurs de confusion potentiels. D'ailleurs, on a constaté que, dans la majorité des études analysées, l'accent était mis plus sur le côté technique de l'analyse microbiologique des échantillons que sur le profil des participants. Les chercheurs étaient certes souvent rigoureux et innovants dans les procédés d'analyse microbiologique des échantillons, mais n'analysaient que rarement les expositions concurrentes des sujets à d'autres facteurs de risque du CCR et qui affecteraient la représentation même des bactéries dans le côlon, tels que l'obésité, le tabagisme, la consommation d'alcool, la diète et l'activité physique²⁹⁰⁻²⁹³. En outre, les échantillons sont prélevés

au moment où les tumeurs colorectales étaient déjà développées, on ne peut donc pas confirmer que *F. nucleatum* est effectivement l'agent causal dans le développement du CCR²⁹⁴. En effet, il est légitime de penser que l'enrichissement enregistré de *F. nucleatum* dans le côlon est survenu tardivement, et il résulterait des conditions créées par la tumeur elle-même.

Il faut reconnaître qu'il est difficile d'étudier le microbiote intestinal en général ou d'investiguer *F. nucleatum*, dans des échantillons colorectaux d'une manière prospective sur de nombreuses années. C'est pour ça qu'on se fie aux résultats des études expérimentales et à la superposition des résultats des études sur l'altération du microbiote à différents stades de développement tumoral (carcinomes comparés aux adénomes et aux tissus sains) qui laissent suggérer un lien de causalité. *F. nucleatum* était en effet identifiée dans les lésions précancéreuses (différents types histologiques d'adénomes)^{17, 127}, avec une abondance relativement plus élevée dans les adénomes que dans les tissus sains¹³⁵. Cette abondance est néanmoins moins élevée dans les adénomes que dans les carcinomes, ceci reflète une augmentation graduelle et parallèle à l'évolution du processus tumoral de la séquence adénome-carcinome¹²⁶. Cependant, les résultats des études ne sont pas unanimes, car d'autres études n'ont pas trouvé de différences notables d'expression de *F. nucleatum* dans le côlon entre des cas d'adénomes colorectaux et des témoins. Nous en citons l'exemple de l'étude d'Amitay et al.²⁹⁴ qui ont examiné la présence et l'abondance relative de *Fusobacterium* dans des échantillons de selles de 500 participants, incluant des patients diagnostiqués avec CCR (n=46), adénomes avancés (n=113), adénomes non avancés (n=110) et des témoins (n=231). Ils ont trouvé que l'abondance de *Fusobacterium* dans les selles était fortement associée avec la présence de CCR, mais non avec la présence d'adénomes, qu'ils soient avancés ou pas²⁹⁴. Dans une autre étude, Flanagan et al.¹³⁴ ont comparé les niveaux de *F. nucleatum* entre des cas de CCR (n=7), d'adénomes de différents stades (n=24) et des témoins (n=25). Leurs résultats révèlent des niveaux de *F. nucleatum* plus élevés dans des adénomes avancés comparés à des adénomes non avancés, et plus élevés dans les cancers colorectaux que dans les adénomes. Toutefois, il n'y avait pas de différence de niveaux de *F. nucleatum* entre les témoins et les adénomes¹³⁴.

Dans une autre étude de Zhang et al. (2018)²⁹⁵, les chercheurs ont analysé à la fois les changements de composition bactérienne dans les selles et de facteurs d'inflammation plasmatiques chez 130 patients atteints de CCR, 88 patients atteints d'adénomes colorectaux avancés, 62 patients atteints de polypes intestinaux bénins et 130 témoins. Ils ont trouvé que vingt-quatre espèces bactériennes,

incluant le *F. nucleatum*, s'enrichissaient d'un stade à un autre de la séquence adénome-carcinome (témoins < polypes < adénomes avancés < CCR). Cette augmentation de charge bactérienne s'accompagnait aussi d'une augmentation des niveaux sanguins de deux facteurs d'inflammation, précisément de la protéine C-réactive (CRP) et du récepteur du facteur soluble de nécrose tumorale de type II (sTNFR-II), qui inhibe les effets pro-inflammatoires médiés par le TNF α . Le niveau de CRP était plus élevé chez les patients avec CCR comparés aux patients avec adénomes avancés ($p < 0,001$) et aux témoins ($p = 0,002$). La CRP était aussi plus élevée dans le groupe de polypes que chez les témoins ($p = 0,031$). Le niveau de sTNFR-II dans le groupe de CCR et d'adénomes avancés était plus élevé que chez les témoins²⁹⁵.

6.2.2 Faisabilité d'une étude principale sur l'investigation de *F. nucleatum* dans la salive et le côlon en lien avec le cancer colorectal

Nous avons mené une étude pilote pour : i) tester la faisabilité d'une étude cas-témoins à base hospitalière ultérieure et ii) produire des données préliminaires sur l'investigation de la bactérie parodontopathogène, *F. nucleatum*, dans les échantillons de salive et de muqueuse colorectale, chez des cas diagnostiqués avec des néoplasies colorectales et des témoins sans néoplasies.

L'étude pilote a un rôle primordial dans la planification et la réalisation d'une étude subséquente à large échelle. Elle nous offre des résultats préliminaires ainsi qu'une idée sur le type d'obstacles rencontrés lors de la réalisation pratique de l'étude. Nous allons aborder dans la prochaine rubrique les défis rencontrés dans l'étude pilote, les solutions apportées et les résultats préliminaires.

6.2.2.1 Source d'identification et de recrutement des participants

L'objectif de l'étude pilote était de recruter 20 cas de CCR ou d'adénomes avancés et 20 témoins appariés par catégorie d'âge et de sexe. La source d'identification initiale pour les cas et les témoins était les listes de rendez-vous de coloscopies des trois gastro-entérologistes qui collaborent au projet. Les patients consécutifs identifiés étaient alors sollicités. Les formulaires de consentement devaient être signés avant l'examen de coloscopie pour pouvoir prélever les biopsies, alors que l'éligibilité définitive des participants n'était confirmée qu'après l'examen de coloscopie. Le statut de cas ou témoins était confirmé ultérieurement par le résultat de l'examen histologique.

Cette source d'identification était fructueuse pour recruter des témoins, mais pas les cas d'adénomes colorectaux avancés et encore moins les cas de CCR. Aussi, elle a accéléré le recrutement de témoins par rapport aux cas, ce qui n'a pas permis de réaliser l'appariement qui était planifié.

Pour y palier, nous avons ajouté une autre source d'identification des cas d'adénomes avancés, qui était la liste de patients programmés pour une résection mucosale endoscopique (résection par coloscopie) d'adénomes colorectaux avancés récemment diagnostiqués.

On doit reconnaître que le choix du département de coloscopie pour recruter des cas de CCR s'est avéré une source d'identification peu efficace. D'ailleurs, nous n'avons eu que deux cas de CCR parmi les 22 cas de néoplasies qui ont participé à l'étude. La raison est que notre procédure de recrutement s'est basée sur la détection aléatoire de tumeurs malignes lors des centaines de coloscopies conduites par jour dans le département d'endoscopie. S'appuyer sur cette procédure pour recruter un nombre suffisant de cas de CCR nécessite la collaboration de tous les médecins du département, la sollicitation de tous les patients qui seront examinés par coloscopie et l'obtention de leurs consentements préalablement à l'examen. Ce n'était pas possible d'attendre de découvrir une lésion d'aspect douteux afin de demander le consentement immédiat du patient pour prélever les biopsies avant la fin de l'examen de coloscopie. En réalité, les patients sont souvent sous médication sédatrice et sont donc incapables de procurer un consentement éclairé. À cela s'ajoute que les médecins exigent un personnel de recherche présent lors de la coloscopie pour transférer les biopsies dans les contenants de conservation et assurer leur stockage par la suite.

6.2.2.2 Collecte des échantillons biologiques et administration des questionnaires

Nous avons constaté qu'un bon nombre de participants désiraient compléter toute la participation le jour même de leur coloscopie, quitte à parfois signer le formulaire de consentement dans la salle d'attente et compléter le questionnaire et l'échantillon de salive dans la civière en attendant de passer dans la salle d'examen. Les conditions n'étaient pas souvent idéales et nécessitaient une grande flexibilité de notre part pour s'adapter continuellement avec les circonstances des participants et du département, pour ne pas gêner le personnel de soins. Ces contraintes peuvent affecter la fiabilité des données collectées par notre questionnaire. Par ailleurs, la durée assez

longue de l'entrevue (1h à 1h30 nécessaire) pouvait épuiser certains participants et en conséquence affecter leurs réponses précisément lors des dernières sections du questionnaire.

Nous avons aussi constaté que la collecte des biopsies de muqueuse saine était parfois refusée par les patients programmés pour une résection mucosale endoscopique, en particulier ceux avec adénomes avancés. Ces patients étaient différents des témoins car ils savaient déjà qu'ils avaient un adénome avancé au moment où on les a recrutés. Ils étaient anxieux à cause des risques liés à ce type d'intervention. Ceci les amenait parfois à accepter la participation seulement si les biopsies sont collectées sur le (s) polypes excisé (s) et pas sur la muqueuse saine. Quant aux témoins, subissant leur première coloscopie, ils ne sont pas toujours inquiets des risques de l'examen mais plutôt du résultat qu'ils recevront. Quand ces témoins acceptent l'idée de participer à l'étude, ils sont plus réceptifs à procurer des échantillons de la muqueuse saine.

Un autre défi rencontré lors de la collecte des données, est la nécessité qu'un personnel de recherche soit présent pendant les coloscopies des participants pour assurer la cueillette des biopsies et leur conservation. Ceci peut s'avérer problématique quand on a plusieurs participants prévus pour la même journée. S'ajoute à cela que souvent, on se retrouve à attendre avec le patient de longues heures avant qu'il ne passe en salle d'examen, à cause des retards imprévus dans le déroulement des examens. Aussi, les coloscopies durent parfois plus longtemps que prévu, surtout lorsqu'il s'agit d'une résection mucosale endoscopique et le personnel de recherche doit rester dans la salle d'examen jusqu'à la fin de la procédure pour la cueillette des échantillons. Étant la seule personne qui assurait toutes les tâches du projet, il fallait parfois dans une même journée, obtenir les consentements signés d'un ou de plusieurs participants, administrer les questionnaires, collecter les échantillons de salive, assister aux coloscopies et aller déposer les échantillons dans les congélateurs à -80°C du CRCHUM dès qu'ils étaient collectés.

6.2.2.3 Résultats préliminaires

Comme indiqué auparavant, les analyses statistiques menés sont faites uniquement dans un but exploratoire. Le but est de produire des résultats préliminaires qui nous aideraient, ainsi que d'autres chercheurs, à mieux concevoir une étude subséquente à plus large échelle. Analyser et critiquer nos résultats nous permettra de réviser et rectifier la méthodologie du projet initial, en prenant en compte sa réalisation pratique. En conclusion, nous avons soulevé des défis majeurs,

rencontrés dans l'étude pilote, et avons suggéré des solutions pour y pallier dans une étude ultérieure.

Quant aux résultats préliminaires sur la détection et la quantification relative de la bactérie *F. nucleatum* dans les deux milieux, oral et colorectal, ceci est un récapitulatif des principaux résultats :

- a. Aucune différence de taux de détection de la bactérie dans les échantillons salivaires entre les deux groupes de cas et de témoins;
- b. Un niveau médian de la bactérie dans les échantillons salivaires du groupe de cas plus élevé que celui dans le groupe de témoins;
- c. Très faible taux de détection de *F. nucleatum* dans les échantillons de muqueuse colorectale comparé à celui dans les échantillons salivaires;
- d. La majorité des cas de néoplasies avaient des adénomes avancés de type conventionnel (20/24). Les patients avec des adénomes de type sessile et des carcinomes n'étaient que 4 au total. Ce qui donne une idée sur la fréquence de détection de ces types de lésions à prévoir dans l'étude principale, au cas où on procède de la même façon de recruter que dans l'étude pilote.
- e. La bactérie *F. nucleatum* était plus détectée dans les échantillons tissulaires chez les témoins que chez les cas : 9 témoins avec la bactérie détectée dans l'un des échantillons de muqueuse saine, contre un seul cas où la bactérie était détectée à la fois dans ses deux échantillons de muqueuse saine et de polype.

Nous avons bien discuté ces résultats dans l'article de l'étude et avons suggéré que les manifestations gastro-intestinales qui avaient motivé la coloscopie chez certains sujets du groupe contrôle auraient pu être liées à la détection de *F. nucleatum* dans leur muqueuse intestinale. D'ailleurs les études antérieures qui ont analysé la bactérie dans des échantillons de muqueuse colorectale, la détection de la bactérie chez le groupe des témoins était rarement nulle²⁹⁶⁻²⁹⁹. Il faut garder à l'esprit que ces témoins étaient aussi recrutés parmi ceux qui ont subi une coloscopie, puisque c'est la seule manière qui permettait la collecte de biopsies colorectales chez des sujets sains à des fins de recherche. Seule une étude antérieure par Mira-Pascual et al.³⁰⁰, qui avait comparé la détection de *F. nucleatum* dans la muqueuse colorectale entre des cas de néoplasies colorectales et des témoins, rapporte un taux de détection de *F. nucleatum* de 0 % chez les témoins, qui n'étaient cependant que 5 biopsies examinées. Aussi, les témoins de cette étude étaient des

patients asymptomatiques qui passaient une coloscopie dans le cadre du dépistage préventif, justifié par un antécédent de diagnostic de CCR chez un parent de premier degré.

Nous avons aussi suggéré que le faible taux de détection de la bactérie dans les échantillons tissulaires chez notre série de cas était dû au profil histologique et à la localisation des néoplasies colorectales détectées dans notre échantillon. Nous n'avons eu que deux cas de CCR localisés dans le côlon distal et deux cas d'adénome sessile. Or, il est rapporté par Yu et al.²⁹⁹, que *F. nucleatum* serait plus fréquemment détecté dans des adénomes de type sessile que dans ceux de type conventionnel et plus dans les carcinomes du côlon proximal que dans ceux du côlon distal^{299, 301}. Encore il ne faudrait pas omettre de mentionner les résultats contraires de deux autres études par Ito et al.³⁰² et Gao et al.⁵. Dans la première étude, Ito et al.³⁰² ont analysé 500 spécimens d'adénomes sessiles et non-sessiles, ils n'ont trouvé aucune différence significative de détection de *F. nucleatum* par type histologique d'adénomes. Dans la deuxième étude, Gao et al.⁵ ont procédé à un séquençage d'échantillons de tissu tumoral provenant de tumeurs colorectales du côlon proximal (n=15) et du côlon distal (n=16). Leurs résultats montrent que *Fusobacterium* faisait partie des espèces bactériennes plus abondantes dans les tumeurs du côlon distal que dans celles du côlon proximal.

7. RECOMMANDATIONS POUR LES ÉTUDES FUTURES

Nos résultats suggèrent une association entre la MP et le CCR chez un échantillon issu de la population de l'île de Montréal et de Laval. Des données épidémiologiques fiables et chez des populations différentes sont encore nécessaires pour vérifier la cohérence de cette association.

À l'égard des constats qu'on a relevés sur les défaillances méthodologiques des études antérieures, nous recommandons lors des études futures de prêter une attention particulière à la définition de la MP, qu'elle soit sur la base de mesures cliniques ou de mesures auto-rapportées, et au contrôle adéquat des facteurs de risque du CCR.

Il serait très utile lors des études futures, qui feraient usage des mesures parodontales auto-rapportées, de collecter de l'information additionnelle permettant de distinguer entre les différents stades d'évolution de la MP (gingivite, parodontite modérée et parodontite sévère/avancée), et entre les cas de MP traitée ou non traitée. De cette manière on pourrait estimer et comparer les taux de CCR liés aux différents stades de la MP, et d'explorer une éventuelle différence de risque de CCR entre les sujets exposés à la MP qui ont été traités et ceux qui ne l'ont jamais été. Autrement, on pourrait aussi étudier l'effet d'une prise en charge adéquate de la MP sur la réduction du risque de CCR, si des données de cohortes prospectives sont disponibles.

Aussi, vérifier un lien de causalité entre la MP et le CCR nécessiterait des études de grandes cohortes prospectives avec de nombreuses longues années de suivi, ce qui est difficilement envisageable. Pour y remédier, on pourrait mener des études cas-témoins avec deux groupes de cas: un groupe de patients diagnostiqués avec des lésions précancéreuses (adénomes avancés) et un groupe de patients diagnostiqués avec un CCR. Étudier l'association entre la MP pour ces deux types de lésions peut nous informer si la MP augmenterait le risque de CCR dès les premiers stades de développement de lésions précancéreuses, ou si son effet est plutôt tardif. Si tel est le cas, l'effet de l'exposition à la MP devrait probablement être analysé en tenant compte de l'âge où commence l'exposition à la MP, de la durée d'exposition à la MP (qui tiendrait compte des traitements reçus) et de la sévérité de la MP. Par la même occasion, documenter l'âge de début de l'exposition à la MP et son évolution, permettra aussi de vérifier la relation temporelle entre le début de la MP et le diagnostic du CCR et d'analyser un effet de « gradient biologique » de la durée d'exposition à la

MP et de son degré de sévérité sur le risque de CCR, dans une perspective de montrer si la relation entre la MP et le CCR est causale ou non.

Dans le cadre d'investigation du rôle de la bactérie *F. nucleatum* dans le développement du CCR, il serait pertinent à ce stade de mener une revue systématique avec méta-analyse sur l'association entre la détection de *F. nucleatum* dans le côlon et les adénomes colorectaux, en tenant compte des différents types histologiques, stades de progression et localisation des adénomes. Aussi, nous encourageons les futures recherches à tenir compte des expositions concurrentes aux facteurs de risque du CCR lors de la mesure d'association entre la détection (ou le niveau) de *F. nucleatum* dans le côlon et le CCR.

Pour notre future étude principale et probablement celle d'autres chercheurs sur l'investigation de l'origine orale de l'enrichissement colorectal en *F. nucleatum* en lien avec le développement de CCR, le recrutement et la collecte des données restent les défis majeurs. Ces derniers amènent des soucis logistiques et des coûts élevés à prévoir pour combler les besoins en personnel de recherche et les coûts d'analyse microbiologique. Il est clair aussi qu'une étude ultérieure nécessiterait d'élargir la collaboration avec les autres cliniciens gastro-entérologues et favoriser le parrainage du projet par les chercheurs cliniciens du département. Mener un projet de recherche dans son milieu de travail est assurément plus facile à implanter que lorsque le projet est mené par des chercheurs externes. D'ailleurs, le recrutement d'une infirmière au département comme assistant de recherche au projet faciliterait énormément le déroulement du recrutement et de la collecte des données. Autrement, on souligne que le nouveau CHUM autant que son centre de recherche offrent un environnement idéal pour mener des projets de recherche cliniques et épidémiologiques.

Il serait important que la série des cas inclût des cas de lésions précancéreuses et cancéreuses colorectales pour parer à la difficulté d'investiguer les modifications possibles de l'expression orale et colorectale de *F. nucleatum* d'une façon prospective. Les sources de sélection pour les cas et les témoins doivent être optimisées en vue d'atteindre une taille échantillonnale suffisante pour mener des analyses statistiques pour les différents types histologiques et localisations des néoplasies. Il serait alors plus judicieux de recruter les cas de CCR dans le département de chirurgie et les cas d'adénomes avancés et les témoins dans le département d'endoscopie. On pourrait aussi complètement modifier la procédure du recrutement en identifiant les cas à travers le département

d'histologie. Les cas seront alors identifiés parmi ceux ayant un rapport d'histologie confirmant une lésion cancéreuse ou précancéreuse colorectale.

Aussi, il faudrait documenter les motifs cliniques ayant motivé la coloscopie chez les témoins pour en tenir compte lors des analyses statistiques. Ou encore, on pourrait tout simplement ne recruter que des patients asymptomatiques en tant que témoins. Ça serait notamment le cas de sujets qui passeraient la coloscopie dans le cadre d'un dépistage préventif du CCR, motivé par l'âge du participant ou par un antécédent de CCR chez un parent de premier degré.

Les sources d'identification des cas et des témoins étant testées, il serait recommandé pour une étude ultérieure d'entamer le recrutement par celui des cas afin de permettre l'appariement des témoins aux cas par catégorie d'âge et de sexe. Le recrutement des témoins se fera alors au fur et à mesure du recrutement des cas.

Quant à la collecte des données, on recommanderait fortement de réviser les priorités des données à collecter par le questionnaire de l'étude, et le raccourcir pour que son administration soit moins prolongée ne dépassant pas une demi-heure.

Le taux de détection est élevé et similaire de *F. nucleatum* dans la salive chez les deux groupes, ce qui est prévisible vu que la bactérie est commensale de la bouche. De ce fait, il serait fortement recommandé que les études futures planifient d'emblée la quantification relative du niveau de la bactérie et non sa simple détection. Il serait encore plus instructif de procéder avec des techniques de séquençage, qui permettraient d'obtenir l'abondance relative de la bactérie plutôt qu'une valeur de quantification relative exprimée en $2^{-\Delta Cq}$ que fournissent les techniques de PCR quantitatives. L'abondance relative serait exprimée en termes de pourcentage correspondant à la contribution de la bactérie au total des bactéries présentes dans les échantillons. C'est en effet, l'augmentation ou la diminution de l'abondance relative qui refléterait mieux un état de dysbiose intestinale. Le séquençage permettrait aussi de vérifier les autres changements de représentations bactériennes autres que *F. nucleatum* afin de vérifier si *F. nucleatum* agit seul, ou en synergie avec d'autres espèces. Aussi, il serait intéressant d'analyser l'expression de *F. nucleatum* à l'échelle de sous-espèces, pour vérifier la similitude entre les sous-espèces de *F. nucleatum* en bouche et dans les lésions tumorales colorectales et s'il y a une sous-espèce incriminée en particulier dans le risque de CCR. D'ailleurs, Ye et al. ³⁰³, dans leur étude, ont analysé des tumeurs colorectales à l'échelle des sous-espèces, subsp. *animalis* était la plus prévalente des sous-espèces de *F. nucleatum* dans

les tumeurs colorectales³⁰³. Komiya et al.¹⁴⁷ ont analysé des échantillons de tumeurs colorectales et de salive chez 14 cas de CCR. *F. nucleatum* était détecté dans tous les échantillons salivaires et dans 8/14 échantillons de lésions, mais chez un nombre très restreint de cas : des souches identiques de *F. nucleatum* étaient rencontrées chez 10/14 et chez 3/3 cas respectivement¹⁴⁷.

Aussi, il serait intéressant de vérifier les changements des marqueurs d'inflammation sanguins et étudier leur corrélation avec les niveaux de *F. nucleatum*. Néanmoins, prévoir des prélèvements sanguins dans l'étude compliquerait la réalisation de l'étude et pourrait engendrer un faible taux de participation.

8. IMPLICATIONS ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE

- La première implication de nos résultats est la nécessité d'améliorer la surveillance nationale de la MP et, éventuellement, changer son approche :

D'après les données du projet COLDENT, 38 % des témoins qui sont issus de la population générale de Montréal et Laval, ont un historique positif d'exposition à la MP. Nos résultats apportent ainsi une idée sur la prévalence de la MP dans une population métropolitaine québécoise, alors que de telles données sont manquantes. Les dernières statistiques nationales sur la MP datent désormais de plus d'une décennie, quand des mesures de santé buccodentaire étaient collectées dans le cadre de l'Enquête Canadienne sur les Mesures de la Santé (ECMS), à son cycle 1 (2007–2009). Ce n'est qu'après 7 cycles biennaux successifs de l'ECMS, que celle-ci inclura de nouveau des mesures de santé buccodentaire, lors de son huitième cycle prévu pour 2022–2023. Il est effectivement important d'assurer une surveillance nationale plus fréquente de la MP, afin d'orienter les mesures de santé publique à son égard. En raison de sa prévalence élevée, la MP est en plus incriminée dans plusieurs maladies systémiques et devrait bénéficier d'un intérêt plus accru de la part des instances de santé. Les examens cliniques parodontaux sont malheureusement très coûteux et difficiles à greffer sur des enquêtes populationnelles de santé, telle que l'ECMS. Or, les mesures auto-rapportées de MP sont une bonne alternative à considérer. On espère alors que nos résultats et notre discussion sur les mesures auto-rapportées de la MP inciteront au développement de nouveaux outils de surveillance populationnelle de la MP fondés sur ces mesures, ce qui rendra les statistiques nationales de la MP plus accessibles. On espère aussi qu'on incitera les chercheurs en épidémiologie parodontale à appliquer plus de vigueur dans la définition de la MP sur la base de mesures auto-rapportées.

- La deuxième implication de nos résultats est de mieux sensibiliser sur l'importance de la santé buccodentaire et de l'accès aux soins buccodentaires :

Nos résultats suggèrent que la MP serait associée au risque du CCR, une autre maladie qui s'ajoute à la liste des maladies systémiques associées à la MP. Cette information devrait alarmer la santé publique, la communauté scientifique et le public sur le danger de sous-estimer les conséquences néfastes de la MP sur l'état de santé générale. On espère que nos résultats vont sensibiliser les décideurs de santé publique, les conseils d'ordre des professionnels dentaires (dentistes et

hygiénistes) et les facultés dentaires à fournir plus d'efforts pour améliorer l'accès aux soins de prévention et de traitement de MP, surtout auprès de personnes défavorisées. Sans traitement, les cas de gingivites réversibles évoluent vers des cas de parodontites irréversibles, et les lésions débutantes vers des lésions avancées, mettant en péril la pérennité des dents à long terme³⁰⁴. La MP est d'ailleurs la deuxième cause des extractions dentaires, sachant que la perte des dents altère non seulement la fonction et l'esthétique, mais porte aussi préjudice à l'estime de soi. À cela, un sentiment d'injustice sociale s'ajouterait chez les personnes défavorisées, dont le manque d'accès aux traitements conservateurs les contraint à subir des extractions dentaires. On peut donner l'exemple concret du Québec, où les prestataires d'aide sociale de dernier recours peuvent bénéficier d'extractions dentaires gratuites, mais pas de traitements de la MP. L'Académie canadienne des sciences de la santé, dans son rapport sur l'accès aux soins buccodentaires auprès des personnes vulnérables au Canada (2014), reconnaît le coût comme obstacle majeur d'accès aux soins dentaires³⁰⁵. D'après ce rapport, les groupes vulnérables au Canada sont plus susceptibles d'éviter le dentiste en raison du coût, alors qu'ils sont aussi plus susceptibles d'avoir des caries non traitées, des maladies de gencive, des dents manquantes et des douleurs dentaires. Ces groupes incluent entre autres, les personnes à faible revenu, les personnes avec handicap et les immigrants³⁰⁵. Chez ces derniers, le manque d'accès aux soins dentaires est préalablement documenté^{306, 307}. On s'aperçoit d'ailleurs que la prévalence de la MP chez nos témoins est élevée, sachant qu'ils proviennent d'une population où presque le 1/3 est composé d'immigrants : Selon Statistiques Canada (2016), Montréal et Laval comptent respectivement 34 % et 29 % d'immigrants³⁰⁸.

- La troisième implication de nos résultats serait de nouvelles perspectives de recherche biomédicale :

Nos résultats de la revue systématique avec méta-analyse et de l'étude pilote ont pour but d'initier la recherche sur la compréhension des mécanismes qui peuvent associer la MP au CCR. D'autres études sont nécessaires. On espère que nos résultats encourageront d'autres chercheurs à continuer sur la même voie, à savoir explorer le rôle de *F. nucleatum*, et éventuellement d'autres bactéries orales, dans la dysbiose intestinale colorectale. Les résultats de ces études pourront amener de nouvelles approches préventives, thérapeutiques et peut être même diagnostiques du CCR, par

l'utilisation de la salive comme moyen de dépistage non invasif pour les adénomes et cancers colorectaux.

Aussi, le fait que la MP, par l'entremise de ses bactéries pathogènes, puisse entraîner une dysbiose colorectale pro-inflammatoire et pro-oncogène, pourrait envisager une nouvelle approche de traitement coordonné de la parodontite et des maladies gastro-intestinales. Des recherches futures pourraient par exemple vérifier l'effet qu'aurait l'usage de probiotiques destinés à traiter la MP, sur la composition du microbiote intestinal. Plus généralement, des études ultérieures pourraient identifier ou promouvoir des souches bactériennes probiotiques qui entreraient sélectivement en compétition avec *F. nucleatum*, dans les deux milieux oral et colorectal. À ce titre, on peut citer l'exemple des souches de *Weissella cibaria* (*W. cibara*), qui par sa production de peroxyde d'hydrogène, inhiberait particulièrement la prolifération de *F. nucleatum*^{309, 310}. Dans un essai randomisé à double insu, l'usage de pastilles de probiotique *W. cibara* pendant 8 semaines après un curetage parodontal réduisait significativement le nombre de bactéries *F. nucleatum* en bouche par rapport au placebo³¹⁰. Selon une étude in vitro, une certaine souche de *W. cibara* préviendrait la prolifération de cellules cancéreuses du côlon³¹¹. Des études cliniques pour vérifier cet effet sont encore nécessaires et indispensables.

9. CONCLUSION

Dans le cadre de ce projet doctoral, nous avons essayé de procéder, avec une approche pragmatique, à l'étude de l'association entre la MP et le CCR sporadique. D'où les trois projets de recherche, certes distincts, mais qui s'harmonisent ensemble et se complètent pour un avancement des connaissances sur le rôle de la MP comme facteur de risque du CCR.

Ainsi, les résultats de notre étude populationnelle et de notre revue systématique avec méta-analyse suggèrent respectivement que, l'exposition à la MP et la présence d'un important pathogène parodontal dans le côlon, seraient associées au CCR. L'étude pilote, quant à elle, a permis de franchir une étape importante dans la réalisation d'une étude ultérieure qui permettrait d'explorer et de mieux comprendre les mécanismes d'action de la MP dans le développement du CCR.

En général, ce projet met la lumière sur un éventuel rôle de la MP comme un facteur de risque modifiable du CCR. Certes, nos résultats ne peuvent encore le confirmer, mais ils encouragent et justifient le besoin pour des études futures qui permettraient de vérifier le rôle causal de la MP dans le développement du CCR et d'élucider ses mécanismes d'action.

Références

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 2021;71(3):209-49.
2. Keum N, Giovannucci E. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2019;16(12):713-32.
3. Comité consultatif des statistiques canadiennes sur le cancer. Statistiques canadiennes sur le cancer 2019. cancer.ca/Statistiques-cancer-Canada-2019-FR (consulté le 16 Avril 2021).
4. Comité consultatif des statistiques canadiennes sur le cancer. Statistiques canadiennes sur le cancer 2018. Toronto (Ont.), Société canadienne du cancer; 2018. Disponible à l'adresse : www.cancer.ca/Canadian-Cancer-Statistics-2018-FR (consulté en mai 2021).
5. Gao Z, Guo B, Gao R, Zhu Q, Qin H. Microbiota disbiosis is associated with colorectal cancer. *Front Microbiol* 2015;6:20.
6. Yu LC, Wei SC, Ni YH. Impact of microbiota in colorectal carcinogenesis: lessons from experimental models. *Intest Res* 2018;16(3):346-57.
7. Mima K, Nishihara R, Qian ZR, et al. *Fusobacterium nucleatum* in colorectal carcinoma tissue and patient prognosis. *Gut* 2016;65(12):1973-80.
8. Yang Y, Weng W, Peng J, et al. *Fusobacterium nucleatum* Increases Proliferation of Colorectal Cancer Cells and Tumor Development in Mice by Activating Toll-Like Receptor 4 Signaling to Nuclear Factor-kappaB, and Up-regulating Expression of MicroRNA-21. *Gastroenterology* 2017;152(4):851-66.e24.
9. Bashir A, Miskeen AY, Bhat A, Fazili KM, Ganai BA. *Fusobacterium nucleatum*: an emerging bug in colorectal tumorigenesis. *European Journal of Cancer Prevention* 2015;24(5):373-85.
10. Kostic AD, Chun E, Robertson L, et al. *Fusobacterium nucleatum* potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment. *Cell Host & Microbe* 2013;14(2):207-15.
11. Kostic AD, Gevers D, Pedamallu CS, et al. Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome Res* 2012;22(2):292-8.
12. Allen-Vercoe E, Jobin C. *Fusobacterium* and Enterobacteriaceae: important players for CRC? *Immunol Lett* 2014;162(2 Pt A):54-61.
13. Allen-Vercoe E, Strauss J, Chadee K. *Fusobacterium nucleatum*: an emerging gut pathogen? *Gut Microbes* 2011;2(5):294-8.
14. Warren RL, Freeman DJ, Pleasance S, et al. Co-occurrence of anaerobic bacteria in colorectal carcinomas. *Microbiome* 2013;1(1):16.
15. Castellarin M, Warren RL, Freeman JD, et al. *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome Research* 2012;22(2):299-306.
16. Rubinstein MR, Wang X, Liu W, et al. *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/beta-catenin signaling via its FadA adhesin. *Cell Host & Microbe* 2013;14(2):195-206.

17. Ito M, Kanno S, Nosho K, et al. Association of *Fusobacterium nucleatum* with clinical and molecular features in colorectal serrated pathway. *International Journal of Cancer* 2015;137(6):1258-68.
18. Ray K. Colorectal cancer: *Fusobacterium nucleatum* found in colon cancer tissue--could an infection cause colorectal cancer? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2011;8(12):662.
19. Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol* 2018;89 Suppl 1:S173-s82.
20. Chestnutt IG, Binnie VI, Taylor MM. Reasons for tooth extraction in Scotland. *Journal of Dentistry* 2000;28(4):295-7.
21. Hull PS, Worthington HV, Clerehugh V, et al. The reasons for tooth extractions in adults and their validation. *Journal of Dentistry* 1997;25(3-4):233-7.
22. Nazir MA. Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. *Int J Health Sci (Qassim)* 2017;11(2):72-80.
23. Cullinan MP, Seymour GJ. Periodontal disease and systemic illness: will the evidence ever be enough? *Periodontology 2000* 2013;62(1):271-86.
24. Wu T, Trevisan M, Genco RJ, et al. Periodontal disease and risk of cerebrovascular disease: the first national health and nutrition examination survey and its follow-up study. *Archives of Internal Medicine* 2000;160(18):2749-55.
25. Azarpazhooh A, Leake JL. Systematic review of the association between respiratory diseases and oral health. *Journal of Periodontology* 2006;77(9):1465-82.
26. Chambrone L, Pannuti CM, Guglielmetti MR, Chambrone LA. Evidence grade associating periodontitis with preterm birth and/or low birth weight: II: a systematic review of randomized trials evaluating the effects of periodontal treatment. *Journal of Clinical Periodontology* 2011;38(10):902-14.
27. Fitzpatrick SG, Katz J. The association between periodontal disease and cancer: a review of the literature. *Journal of Dentistry* 2010;38(2):83-95.
28. Meyer MS, Joshipura K, Giovannucci E, Michaud DS. A review of the relationship between tooth loss, periodontal disease, and cancer. *Cancer Causes & Control* 2008;19(9):895-907.
29. Castellarin M, Warren RL, Freeman JD, et al. *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome Res* 2012;22(2):299-306.
30. Kraus S, Arber N. Inflammation and colorectal cancer. *Curr Opin Pharmacol* 2009;9(4):405-10.
31. Hu JM, Shen CJ, Chou YC, et al. Risk of colorectal cancer in patients with periodontal disease severity: a nationwide, population-based cohort study. *Int J Colorectal Dis* 2018;33(3):349-52.
32. Mai X, LaMonte MJ, Hovey KM, et al. Periodontal disease severity and cancer risk in postmenopausal women: the Buffalo OsteoPerio Study. *Cancer Causes Control* 2016;27(2):217-28.
33. Michaud DS, Lu J, Peacock-Villada AY, et al. Periodontal Disease Assessed Using Clinical Dental Measurements and Cancer Risk in the ARIC Study. *J Natl Cancer Inst* 2018;110(8):843-54.

34. Momen-Heravi F, Babic A, Tworoger SS, et al. Periodontal disease, tooth loss and colorectal cancer risk: Results from the Nurses' Health Study. *Int J Cancer* 2017;140(3):646-52.
35. Nwizu NN, Marshall JR, Moysich K, et al. Periodontal Disease and Incident Cancer Risk among Postmenopausal Women: Results from the Women's Health Initiative Observational Cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2017;26(8):1255-65.
36. Ahn J, Segers S, Hayes RB. Periodontal disease, Porphyromonas gingivalis serum antibody levels and orodigestive cancer mortality. *Carcinogenesis* 2012;33(5):1055-8.
37. Arora M, Weuve J, Fall K, Pedersen NL, Mucci LA. An exploration of shared genetic risk factors between periodontal disease and cancers: a prospective co-twin study. *Am J Epidemiol* 2010;171(2):253-9.
38. Michaud DS, Liu Y, Meyer M, Giovannucci E, Joshipura K. Periodontal disease, tooth loss, and cancer risk in male health professionals: a prospective cohort study. *Lancet Oncol* 2008;9(6):550-8.
39. Hujoel PP, Drangsholt M, Spiekerman C, Weiss NS. An exploration of the periodontitis-cancer association. *Ann Epidemiol* 2003;13(5):312-6.
40. Idrissi Janati A. La santé orale compromise comme facteur de risque potentiel pour le cancer colorectal sporadique (COLDENT) : une étude de faisabilité. <http://hdl.handle.net/1866/11339> [Dépot institutionnel des thèses et mémoires électroniques: Université de Montréal; 2014.
41. Idrissi Janati A, Durand R, Karp I, Emami E. Compromised Oral Health as a Risk Factor for Sporadic Colorectal Cancer: A feasibility study. IADR/AADR/CADR General Session & Exhibition, Boston, Massachusetts, USA. <https://iadr.abstractarchives.com/abstract/15iags-2122003/compromised-oral-health-as-a-risk-factor-for-sporadic-colorectal-cancer-a-feasibility-study>. 2015.
42. Douaiher J, Ravipati A, Grams B, et al. Colorectal cancer-global burden, trends, and geographical variations. *J Surg Oncol* 2017;115(5):619-30.
43. The Global Cancer Observatory 2020. Colorectal cancer. https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/10_8_9-Colorectum-fact-sheet.pdf.
44. Darren R. Brenner, Hannah K. Weir, Alain A. Demers, et al. Estimations prévues du cancer au Canada en 2020. *CMAJ*, le 2 mars 2020; 192:E199205. DOI : 10.1503/cmaj.191292.
45. Comité consultatif des statistiques canadiennes sur le cancer, en collaboration avec la Société canadienne du cancer, Statistique Canada et l'Agence de la santé publique du Canada. *Statistiques canadiennes sur le cancer 2021*. Toronto (Ontario) : Société canadienne du cancer, 2021. cancer.ca/Canadian-Cancer-Statistics-2021-FR. Consulté avril 2022.
46. Brenner DR, Ruan Y, Shaw E, et al. Increasing colorectal cancer incidence trends among younger adults in Canada. *Prev Med* 2017;105:345-49.
47. O'Sullivan DE, Hilsden RJ, Ruan Y, et al. The incidence of young-onset colorectal cancer in Canada continues to increase. *Cancer Epidemiol* 2020;69:101828.
48. Canadian Task Force on Preventive Healthcare. Recommendations on screening for colorectal cancer in primary care. *Can Med Assoc J* 2016;188:340-8.
49. Center MM, Jemal A, Ward E. International trends in colorectal cancer incidence rates. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2009;18(6):1688-94.

50. Partenariat canadien contre le cancer. Dépistage du cancer au Canada : Aperçu de la participation au dépistage du cancer du sein, du col de l'utérus et colorectal. Toronto: Partenariat canadien contre le cancer; janvier 2015.
51. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, et al. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut* 2017;66(4):683-91.
52. Kraus S, Arber N. Inflammation and colorectal cancer. *Current Opinion in Pharmacology* 2009;9(4):405-10.
53. Yang L, Pei Z. Bacteria, inflammation, and colon cancer. *World Journal of Gastroenterology* 2006;12(42):6741-6.
54. Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* 1999;116(6):1453-6.
55. Burisch J, Munkholm P. Inflammatory bowel disease epidemiology. *Current Opinion in Gastroenterology* 2013;29(4):357-62.
56. Munkholm P. Review article: the incidence and prevalence of colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;18 Suppl 2:1-5.
57. Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut* 2001;48(4):526-35.
58. Müller MF, Ibrahim AE, Arends MJ. Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Arch* 2016;469(2):125-34.
59. Kinsella AR. Colorectal cancer: A scientific perspective. Cambridge University Press ed. USA; 1993.
60. Brown G. Colorectal cancer. USA: Cambridge University Press; 2007.
61. Gordon PH, Nivatongs S. Neoplasms of the Colon, Rectum and Anus. Second ed. New York: Informa Healthcare USA, Inc; 2007. p. 400.
62. Keum N, Wu K, Giovannucci E, Hunter DJ. (2018). Colorectal cancer. Dans Adami HO, Hunter DJ, Lagiou P, and Mucci L, *Textbook of cancer epidemiology* (3rd ed; p1-79). Oxford Scholarship Online. DOI: 10.1093/oso/9780190676827.001.0001. 2018.
63. Zhu Q, Gao R, Wu W, Qin H. The role of gut microbiota in the pathogenesis of colorectal cancer. *Tumour Biol* 2013;34(3):1285-300.
64. Pecori S, Capelli P, Vergine M, Manestrina F. Pathological Features of Sporadic Colonic Adenoma. In: Delaini GG, Skřička T, Colucci G, editors. *Intestinal Polyps and Polyposis: From Genetics to Treatment and Follow-up*. Milano: Springer Milan; 2009. p. 19-37.
65. Mauri G, Sartore-Bianchi A, Russo AG, et al. Early-onset colorectal cancer in young individuals. *Mol Oncol* 2019;13(2):109-31.
66. Butterworth AS, Higgins JP, Pharoah P. Relative and absolute risk of colorectal cancer for individuals with a family history: a meta-analysis. *Eur J Cancer* 2006;42(2):216-27.
67. Siegel R, Desantis C, Jemal A. Colorectal cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* 2014;64(2):104-17.
68. Augustus GJ, Ellis NA. Colorectal Cancer Disparity in African Americans: Risk Factors and Carcinogenic Mechanisms. *Am J Pathol* 2018;188(2):291-303.
69. Hwee J, Bougie E. Do cancer incidence and mortality rates differ among ethnicities in Canada? *Health Rep* 2021;32(8):3-17.

70. Egeberg R, Halkjaer J, Rottmann N, Hansen L, Holten I. Social inequality and incidence of and survival from cancers of the colon and rectum in a population-based study in Denmark, 1994-2003. *Eur J Cancer* 2008;44(14):1978-88.
71. Doubeni CA, Laiyemo AO, Major JM, et al. Socioeconomic status and the risk of colorectal cancer: an analysis of more than a half million adults in the National Institutes of Health-AARP Diet and Health Study. *Cancer* 2012;118(14):3636-44.
72. Coughlin SS. Social determinants of colorectal cancer risk, stage, and survival: a systematic review. *Int J Colorectal Dis* 2020;35(6):985-95.
73. Liang PS, Chen TY, Giovannucci E. Cigarette smoking and colorectal cancer incidence and mortality: systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer* 2009;124(10):2406-15.
74. Botteri E, Iodice S, Bagnardi V, et al. Smoking and colorectal cancer: a meta-analysis. *Jama* 2008;300(23):2765-78.
75. Botteri E, Borroni E, Sloan EK, et al. Smoking and Colorectal Cancer Risk, Overall and by Molecular Subtypes: A Meta-Analysis. *Am J Gastroenterol* 2020;115(12):1940-49.
76. Tsoi KK, Pau CY, Wu WK, et al. Cigarette smoking and the risk of colorectal cancer: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009;7(6):682-88.e1-5.
77. McNabb S, Harrison TA, Albanes D, et al. Meta-analysis of 16 studies of the association of alcohol with colorectal cancer. *Int J Cancer* 2020;146(3):861-73.
78. Cho E, Smith-Warner SA, Ritz J, et al. Alcohol intake and colorectal cancer: a pooled analysis of 8 cohort studies. *Ann Intern Med* 2004;140(8):603-13.
79. Cai S, Li Y, Ding Y, Chen K, Jin M. Alcohol drinking and the risk of colorectal cancer death: a meta-analysis. *Eur J Cancer Prev* 2014;23(6):532-9.
80. Chan DS, Lau R, Aune D, et al. Red and processed meat and colorectal cancer incidence: meta-analysis of prospective studies. *PLoS One* 2011;6(6):e20456.
81. Händel MN, Rohde JF, Jacobsen R, et al. Processed meat intake and incidence of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Eur J Clin Nutr* 2020;74(8):1132-48.
82. International Agency for Research on Cancer. 2018. Consumption of red meat and processed meat. Volume 114. <http://monographs.iarc.fr/>.
83. Dai Z, Xu YC, Niu L. Obesity and colorectal cancer risk: a meta-analysis of cohort studies. *World J Gastroenterol* 2007;13(31):4199-206.
84. Dong Y, Zhou J, Zhu Y, et al. Abdominal obesity and colorectal cancer risk: systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Biosci Rep* 2017;37(6).
85. Ma Y, Yang Y, Wang F, et al. Obesity and risk of colorectal cancer: a systematic review of prospective studies. *PLoS One* 2013;8(1):e53916.
86. Xie F, You Y, Huang J, et al. Association between physical activity and digestive-system cancer: An updated systematic review and meta-analysis. *J Sport Health Sci* 2021;10(1):4-13.
87. Robsahm TE, Aagnes B, Hjartåker A, et al. Body mass index, physical activity, and colorectal cancer by anatomical subsites: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Eur J Cancer Prev* 2013;22(6):492-505.
88. Wu L, Yu C, Jiang H, et al. Diabetes mellitus and the occurrence of colorectal cancer: an updated meta-analysis of cohort studies. *Diabetes Technol Ther* 2013;15(5):419-27.

89. Yuhara H, Steinmaus C, Cohen SE, et al. Is diabetes mellitus an independent risk factor for colon cancer and rectal cancer? *Am J Gastroenterol* 2011;106(11):1911-21; quiz 22.
90. Deng L, Gui Z, Zhao L, Wang J, Shen L. Diabetes mellitus and the incidence of colorectal cancer: an updated systematic review and meta-analysis. *Dig Dis Sci* 2012;57(6):1576-85.
91. Yu F, Guo Y, Wang H, et al. Type 2 diabetes mellitus and risk of colorectal adenoma: a meta-analysis of observational studies. *BMC Cancer* 2016;16:642.
92. Sun L, Yu S. Diabetes mellitus is an independent risk factor for colorectal cancer. *Dig Dis Sci* 2012;57(6):1586-97.
93. Tomić T, Domínguez-López S, Barrios-Rodríguez R. Non-aspirin non-steroidal anti-inflammatory drugs in prevention of colorectal cancer in people aged 40 or older: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Epidemiol* 2019;58:52-62.
94. Bosetti C, Santucci C, Gallus S, Martinetti M, La Vecchia C. Aspirin and the risk of colorectal and other digestive tract cancers: an updated meta-analysis through 2019. *Ann Oncol* 2020;31(5):558-68.
95. World Cancer Research Fund-American Institute for Cancer Research. Continuous Project Update Expert Report 2018. Diet, nutrition, physical activity and colorectal cancer. Available at [dietandcancerreport.org](https://www.aicr.org/wp-content/uploads/2020/01/colorectal-cancer-2017-report.pdf). <https://www.aicr.org/wp-content/uploads/2020/01/colorectal-cancer-2017-report.pdf> (consulté 11 oct 2021).
96. Huncharek M, Muscat J, Kupelnick B. Colorectal cancer risk and dietary intake of calcium, vitamin D, and dairy products: a meta-analysis of 26,335 cases from 60 observational studies. *Nutr Cancer* 2009;61(1):47-69.
97. Boughanem H, Canudas S, Hernandez-Alonso P, et al. Vitamin D Intake and the Risk of Colorectal Cancer: An Updated Meta-Analysis and Systematic Review of Case-Control and Prospective Cohort Studies. *Cancers (Basel)* 2021;13(11).
98. Koushik A, Hunter DJ, Spiegelman D, et al. Fruits, vegetables, and colon cancer risk in a pooled analysis of 14 cohort studies. *J Natl Cancer Inst* 2007;99(19):1471-83.
99. Oh H, Kim H, Lee DH, et al. Different dietary fibre sources and risks of colorectal cancer and adenoma: a dose-response meta-analysis of prospective studies. *Br J Nutr* 2019;122(6):605-15.
100. Cao H, Wang C, Chai R, Dong Q, Tu S. Iron intake, serum iron indices and risk of colorectal adenomas: a meta-analysis of observational studies. *Eur J Cancer Care (Engl)* 2017;26(5).
101. Yu XF, Zou J, Dong J. Fish consumption and risk of gastrointestinal cancers: a meta-analysis of cohort studies. *World J Gastroenterol* 2014;20(41):15398-412.
102. Landman C, Quévrain E. Gut microbiota: Description, role and pathophysiologic implications. *Rev Med Interne* 2016;37(6):418-23.
103. Bruneau A, Baylatry MT, Joly AC, Sokol H. Gut microbiota: What impact on colorectal carcinogenesis and treatment? *Bull Cancer* 2018;105(1):70-80.
104. Zeng MY, Inohara N, Nunez G. Mechanisms of inflammation-driven bacterial dysbiosis in the gut. *Mucosal Immunol* 2017;10(1):18-26.
105. Petersen C, Round JL. Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. *Cell Microbiol* 2014;16(7):1024-33.
106. Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, Knight R. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell* 2012;148(6):1258-70.

107. Cryan JF, Dinan TG. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nat Rev Neurosci* 2012;13(10):701-12.
108. García-Castillo V, Sanhueza E, McNerney E, Onate SA, García A. Microbiota dysbiosis: a new piece in the understanding of the carcinogenesis puzzle. *J Med Microbiol* 2016;65(12):1347-62.
109. Sears CL, Pardoll DM. Perspective: alpha-bugs, their microbial partners, and the link to colon cancer. *Journal of Infectious Diseases* 2011;203(3):306-11.
110. Sobhani I, Bergsten E, Couffin S, et al. Colorectal cancer-associated microbiota contributes to oncogenic epigenetic signatures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019;116(48):24285-95.
111. Dove WF, Clipson L, Gould KA, et al. Intestinal neoplasia in the ApcMin mouse: independence from the microbial and natural killer (beige locus) status. *Cancer Res* 1997;57(5):812-4.
112. Uronis JM, Muhlbauer M, Herfarth HH, et al. Modulation of the intestinal microbiota alters colitis-associated colorectal cancer susceptibility. *PLoS One* 2009;4(6):e6026.
113. Zackular JP, Baxter NT, Iverson KD, et al. The gut microbiome modulates colon tumorigenesis. *MBio* 2013;4(6):e00692-13.
114. Gao Z, Guo B, Gao R, Zhu Q, Qin H. Microbiota disbiosis is associated with colorectal cancer. *Frontiers in Microbiology* 2015;6:20.
115. Ahn J, Sinha R, Pei Z, et al. Human gut microbiome and risk for colorectal cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 2013;105(24):1907-11.
116. Borges-Canha M, Portela-Cidade JP, Dinis-Ribeiro M, Leite-Moreira AF, Pimentel-Nunes P. Role of colonic microbiota in colorectal carcinogenesis: a systematic review. *Revista Espanola de Enfermedades Digestivas* 2015;107(11):659-71.
117. Tjalsma H, Boleij A, Marchesi JR, Dutilh BE. A bacterial driver-passenger model for colorectal cancer: beyond the usual suspects. *Nat Rev Microbiol* 2012;10(8):575-82.
118. Cheng Y, Ling Z, Li L. The Intestinal Microbiota and Colorectal Cancer. *Front Immunol* 2020;11:615056.
119. Liu, D and Dong, X. (2011). *Fusobacterium*. Dans Liu, D. *Molecular detection of human bacterial pathogens* (p. 543-553). CRC Press.
120. Nie S, Tian B, Wang X, et al. *Fusobacterium nucleatum* subspecies identification by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2015;53(4):1399-402.
121. Kolenbrander PE. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. *Annu Rev Microbiol* 2000;54:413-37.
122. Kolenbrander PE, London J. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *J Bacteriol* 1993;175(11):3247-52.
123. Bolstad AI, Jensen HB, Bakken V. Taxonomy, biology, and periodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum*. *Clin Microbiol Rev* 1996;9(1):55-71.
124. Han YW, Wang X. Mobile microbiome: oral bacteria in extra-oral infections and inflammation. *J Dent Res* 2013;92(6):485-91.
125. Koliarakis I, Messaritakis I, Nikolouzakis TK, et al. Oral Bacteria and Intestinal Dysbiosis in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci* 2019;20(17).

126. Yu YN, Yu TC, Zhao HJ, et al. Berberine may rescue *Fusobacterium nucleatum*-induced colorectal tumorigenesis by modulating the tumor microenvironment. *Oncotarget* 2015;6(31):32013-26.
127. Park CH, Han DS, Oh YH, et al. Role of *Fusobacteria* in the serrated pathway of colorectal carcinogenesis. *Scientific Reports* 2016;6:25271.
128. Yu J, Chen Y, Fu X, et al. Invasive *Fusobacterium nucleatum* may play a role in the carcinogenesis of proximal colon cancer through the serrated neoplasia pathway. *International Journal of Cancer* 2016;139(6):1318-26.
129. Mima K, Cao Y, Chan AT, et al. *Fusobacterium nucleatum* in Colorectal Carcinoma Tissue According to Tumor Location. *Clinical and Translational Gastroenterology* 2016;7(11):e200.
130. Fukugaiti MH, Ignacio A, Fernandes MR, et al. High occurrence of *Fusobacterium nucleatum* and *Clostridium difficile* in the intestinal microbiota of colorectal carcinoma patients. *Brazilian Journal of Microbiology* 2015;46(4):1135-40.
131. Viljoen KS, Dakshinamurthy A, Goldberg P, Blackburn JM. Quantitative profiling of colorectal cancer-associated bacteria reveals associations between *Fusobacterium* spp., enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* (ETBF) and clinicopathological features of colorectal cancer. *PLoS ONE [Electronic Resource]* 2015;10(3):e0119462.
132. Mira-Pascual L, Cabrera-Rubio R, Ocon S, et al. Microbial mucosal colonic shifts associated with the development of colorectal cancer reveal the presence of different bacterial and archaeal biomarkers. *Journal of Gastroenterology* 2015;50(2):167-79.
133. Mima K, Sukawa Y, Nishihara R, et al. *Fusobacterium nucleatum* and T Cells in Colorectal Carcinoma. *JAMA Oncology* 2015;1(5):653-61.
134. Flanagan L, Schmid J, Ebert M, et al. *Fusobacterium nucleatum* associates with stages of colorectal neoplasia development, colorectal cancer and disease outcome. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 2014;33(8):1381-90.
135. McCoy AN, Araujo-Perez F, Azcarate-Peril A, et al. *Fusobacterium* is associated with colorectal adenomas. *PLoS ONE [Electronic Resource]* 2013;8(1):e53653.
136. Kostic AD, Gevers D, Pedamallu CS, et al. Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome Research* 2012;22(2):292-8.
137. Strauss J, Kaplan GG, Beck PL, et al. Invasive potential of gut mucosa-derived *Fusobacterium nucleatum* positively correlates with IBD status of the host. *Inflammatory Bowel Diseases* 2011;17(9):1971-8.
138. Wei Z, Cao S, Liu S, et al. Could gut microbiota serve as prognostic biomarker associated with colorectal cancer patients' survival? A pilot study on relevant mechanism. *Oncotarget* 2016;7(29):46158-72.
139. Han YW, Ikegami A, Rajanna C, et al. Identification and characterization of a novel adhesin unique to oral *Fusobacteria*. *Journal of Bacteriology* 2005;187(15):5330-40.
140. Fardini Y, Wang X, Temoin S, et al. *Fusobacterium nucleatum* adhesin FadA binds vascular endothelial cadherin and alters endothelial integrity. *Molecular Microbiology* 2011;82(6):1468-80.
141. Gur C, Ibrahim Y, Isaacson B, et al. Binding of the Fap2 protein of *Fusobacterium nucleatum* to human inhibitory receptor TIGIT protects tumors from immune cell attack. *Immunity* 2015;42(2):344-55.

142. Shang FM, Liu HL. Fusobacterium nucleatum and colorectal cancer: A review. *World J Gastrointest Oncol* 2018;10(3):71-81.
143. Flynn KJ, Baxter NT, Schloss PD. Metabolic and Community Synergy of Oral Bacteria in Colorectal Cancer. *mSphere* 2016;1(3).
144. Han YW, Ikegami A, Rajanna C, et al. Identification and characterization of a novel adhesin unique to oral fusobacteria. *J Bacteriol* 2005;187(15):5330-40.
145. Russo E, Bacci G, Chiellini C, et al. Preliminary Comparison of Oral and Intestinal Human Microbiota in Patients with Colorectal Cancer: A Pilot Study. *Front Microbiol* 2017;8:2699.
146. Guven DC, Dizdar O, Alp A, et al. Analysis of Fusobacterium nucleatum and Streptococcus gallolyticus in saliva of colorectal cancer patients. *Biomark Med* 2019;13(9):725-35.
147. Komiya Y, Shimomura Y, Higurashi T, et al. Patients with colorectal cancer have identical strains of Fusobacterium nucleatum in their colorectal cancer and oral cavity. *Gut* 2019;68(7):1335-37.
148. Kato I, Vasquez AA, Moyerbrailean G, et al. Oral microbiome and history of smoking and colorectal cancer. *J Epidemiol Res* 2016;2(2):92-101.
149. Abed J, Maalouf N, Manson AL, et al. Colon Cancer-Associated Fusobacterium nucleatum May Originate From the Oral Cavity and Reach Colon Tumors via the Circulatory System. *Front Cell Infect Microbiol* 2020;10:400.
150. Kageyama S, Takeshita T, Takeuchi K, et al. Characteristics of the Salivary Microbiota in Patients With Various Digestive Tract Cancers. *Front Microbiol* 2019;10:1780.
151. Yang Y, Cai Q, Shu XO, et al. Prospective study of oral microbiome and colorectal cancer risk in low-income and African American populations. *Int J Cancer* 2019;144(10):2381-89.
152. Flemer B, Warren RD, Barrett MP, et al. The oral microbiota in colorectal cancer is distinctive and predictive. *Gut* 2018;67(8):1454-63.
153. Saygun I, Nizam N, Keskiner I, et al. Salivary infectious agents and periodontal disease status. *J Periodontal Res* 2011;46(2):235-9.
154. Signat B, Roques C, Poulet P, Duffaut D. Role of Fusobacterium nucleatum in periodontal health and disease. *Current Issues in Molecular Biology* 2011;13(2):25-36.
155. Schmidt TS, Hayward MR, Coelho LP, et al. Extensive transmission of microbes along the gastrointestinal tract. *Elife* 2019;8.
156. Chapple ILC, Mealey BL, Van Dyke TE, et al. Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. 2018;89(S1):S74-S84.
157. Murakami S, Mealey BL, Mariotti A, Chapple ILC. Dental plaque-induced gingival conditions. *J Periodontol* 2018;89 Suppl 1:S17-s27.
158. Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *Lancet* 2005;366(9499):1809-20.
159. Holtfreter B, Albandar JM, Dietrich T, et al. Standards for reporting chronic periodontitis prevalence and severity in epidemiologic studies: Proposed standards from the Joint EU/USA Periodontal Epidemiology Working Group. *J Clin Periodontol* 2015;42(5):407-12.
160. Dumitrescu AL. Periodontal Disease – A Public Health Problem. 2016;3(278).
161. Brenner H, Blettner M. Controlling for continuous confounders in epidemiologic research. *Epidemiology* 1997;8(4):429-34.

162. Nocini R, Lippi G, Mattiuzzi C. Periodontal disease: The portrait of an epidemic. *J. Public Health Emerg* 2020;4(10).
163. Chen MX, Zhong YJ, Dong QQ, Wong HM, Wen YF. Global, regional, and national burden of severe periodontitis, 1990-2019: An analysis of the Global Burden of Disease Study 2019. *J Clin Periodontol* 2021.
164. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* 2018;392(10159):1789-858.
165. European Federation of Periodontology. Time to take gum disease seriously-The societal and economic impact of periodontitis. The Economist Intelligence Unit Limited 2021. <https://eiuperspectives.economist.com/healthcare/time-take-gum-disease-seriously-societal-and-economic-impact-periodontitis> accessed August 4th 2021.
166. Petersen PE, Ogawa H. The global burden of periodontal disease: towards integration with chronic disease prevention and control. *Periodontol 2000* 2012;60(1):15-39.
167. Eke PI, Borgnakke WS, Genco RJ. Recent epidemiologic trends in periodontitis in the USA. *Periodontol 2000* 2020;82(1):257-67.
168. Santé Canada. Sommaire du rapport des résultats du module sur la santé buccodentaire de l'Enquête canadienne sur les mesures de la santé 2007-2009. <https://www.caphd.ca/sites/default/files/CHMS-F-summ.pdf> (Consulté janvier 2022).
169. Trombelli L, Farina R, Silva CO, Tatakis DN. Plaque-induced gingivitis: Case definition and diagnostic considerations. *J Clin Periodontol* 2018;45 Suppl 20:S44-s67.
170. Schätzle M, Löe H, Lang NP, et al. The clinical course of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2004;31(12):1122-7.
171. Schluger S, Yuodelis R, Page RC, Johnson RH. Periodontal disease : basic phenomena, clinical management, an occlusal and restorative interrelationships. 2nd ed. Philadelphia & London; 1990.
172. Dumitrescu AL. Etiology and pathogenesis of periodontal disease. London & New York: Springer; 2010.
173. Eke PI, Genco RJ. CDC Periodontal Disease Surveillance Project: background, objectives, and progress report. *Journal of Periodontology* 2007;78(7 Suppl):1366-71.
174. Lang NP, Schätzle MA, Löe H. Gingivitis as a risk factor in periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2009;36 Suppl 10:3-8.
175. Morimoto-Yamashita D; Tokuda M; Kikuchi K; Maruyama I; Torii M; Kawahara K. (2011). HMGB1: A Novel Inflammatory Mediator in Chronic Periodontitis. Dans Yamamoto S, Periodontal Disease: Symptoms, Treatment and Prevention (pp. 269-282). Sho L. Yamamoto editor.
176. Craig RG, Perna AM, Pecoits-Filho R, Levin NW, Kotanko P. Periodontal diseases and systemic inflammation. *Seminars in Dialysis* 2013;26(1):23-8.
177. Kabwe M, Brown TL, Dashper S, et al. Genomic, morphological and functional characterisation of novel bacteriophage FNU1 capable of disrupting *Fusobacterium nucleatum* biofilms. *Scientific Reports* 2019;9.
178. Moutsopoulos NM, Madianos PN. Low-grade inflammation in chronic infectious diseases: paradigm of periodontal infections. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2006;1088:251-64.

179. Caton JG, Armitage G, Berglundh T, et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Clin Periodontol* 2018;45 Suppl 20:S1-s8.
180. Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Periodontol* 2018;89 Suppl 1:S159-s72.
181. Genco RJ, Borgnakke WS. Risk factors for periodontal disease. *Periodontol* 2000 2013;62(1):59-94.
182. Van Dyke TE, Sheilesh D. Risk factors for periodontitis. *J Int Acad Periodontol* 2005;7(1):3-7.
183. Abusleme L, Hoare A, Hong BY, Diaz PI. Microbial signatures of health, gingivitis, and periodontitis. *Periodontol* 2000 2021;86(1):57-78.
184. Flemmig TF. Periodontitis. *Annals of Periodontology* 1999(1):32-37.
185. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998;25(2):134-44.
186. Jan Lindhe TK, Niklaus P. Laug. *Clinical periodontology and implant dentistry*, 4th edition. UK: Blackwell Munksgaard 2003.
187. Signat B, Roques C, Poulet P, Duffaut D. *Fusobacterium nucleatum* in periodontal health and disease. *Current Issues in Molecular Biology* 2011;13(2):25-36.
188. Bolstad AI, Jensen HB, Bakken V. Taxonomy, biology, and periodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum*. *Clinical Microbiology Reviews* 1996;9(1):55-71.
189. Todd A. Lee, Pharm.D., A. Simon Pickard (2013). Exposure Definition and Measurement. Dans Velentgas P, Dreyer NA, Nourjah P, Smith SR, Torchia MM, eds. *Developing a Protocol for Observational Comparative Effectiveness Research: A User's Guide*. (AHRQ Publication No. 12(13)-EHC099, p. 45-57). www.effectivehealthcare.ahrq.gov/Methods-OCER.cfm.
190. Fitzpatrick SG, Katz J. The association between periodontal disease and cancer: a review of the literature. *J Dent* 2010;38(2):83-95.
191. Meyer MS, Joshipura K, Giovannucci E, Michaud DS. A review of the relationship between tooth loss, periodontal disease, and cancer. *Cancer Causes Control* 2008;19(9):895-907.
192. Page RC, Eke PI. Case definitions for use in population-based surveillance of periodontitis. *J Periodontol* 2007;78(7 Suppl):1387-99.
193. Blicher B, Joshipura K, Eke P. Validation of self-reported periodontal disease: a systematic review. *J Dent Res* 2005;84(10):881-90.
194. Costa FO, Guimarães AN, Cota LO, et al. Impact of different periodontitis case definitions on periodontal research. *J Oral Sci* 2009;51(2):199-206.
195. Borrell LN, Papapanou PN. Analytical epidemiology of periodontitis. *J Clin Periodontol* 2005;32 (Suppl 6):132-58.
196. Chatzopoulos GS, Cisneros A, Sanchez M, Lunos S, Wolff LF. Validity of self-reported periodontal measures, demographic characteristics, and systemic medical conditions. *J Periodontol* 2018;89(8):924-32.
197. Gilbert AD, Nuttall NM. Self-reporting of periodontal health status. *Br Dent J* 1999;186(5):241-4.
198. Slade GD. Interim analysis of validity of periodontitis screening questions in the Australian population. *J Periodontol* 2007;78(7 Suppl):1463-70.

199. Buhlin K, Gustafsson A, Andersson K, Håkansson J, Klinge B. Validity and limitations of self-reported periodontal health. *Community Dent Oral Epidemiol* 2002;30(6):431-7.
200. Saka-Herrán C, Jané-Salas E, González-Navarro B, Estrugo-Devesa A, López-López J. Validity of a self-reported questionnaire for periodontitis in Spanish population. *J Periodontol* 2020.
201. Foster Page LA, Thomson WM, Broadbent JM. Validity of self-reported periodontal questions in a New Zealand cohort. *Clin Oral Investig* 2016;20(3):563-9.
202. Ramos RQ, Bastos JL, Peres MA. Validity of periodontitis screening questions in a Brazilian adult population-based study. *Braz Oral Res* 2016;30(1):e114.
203. Abbood HM, Hinz J, Cherukara G, Macfarlane TV. Validity of Self-Reported Periodontal Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Periodontol* 2016;87(12):1474-83.
204. Michaud DS, Kelsey KT, Papathanasiou E, Genco CA, Giovannucci E. Periodontal disease and risk of all cancers among male never smokers: an updated analysis of the Health Professionals Follow-up Study. *Ann Oncol* 2016;27(5):941-7.
205. Kim GW, Kim YS, Lee SH, et al. Periodontitis is associated with an increased risk for proximal colorectal neoplasms. *Sci Rep* 2019;9(1):7528.
206. Lee D, Jung KU, Kim HO, Kim H, Chun HK. Association between oral health and colorectal adenoma in a screening population. *Medicine (Baltimore)* 2018;97(37):e12244.
207. Lo CH, Nguyen LH, Wu K, et al. Periodontal Disease, Tooth Loss, and Risk of Serrated Polyps and Conventional Adenomas. *Cancer Prev Res (Phila)* 2020;13(8):699-706.
208. Hsieh CY, Su CC, Shao SC, et al. Taiwan's National Health Insurance Research Database: past and future. *Clin Epidemiol* 2019;11:349-58.
209. Madhloom ZS, Melconian AK, Mahmood A. The role of microbiota fusobacterium nucleatum as a possibly important etiological factor in the initiation and progression of colorectal cancer. *Indian Journal of Public Health Research and Development* 2020;11(4):1297-302.
210. Xuan K, Jha AR, Zhao T, Uy JP, Sun C. Is periodontal disease associated with increased risk of colorectal cancer? A meta-analysis. *Int J Dent Hyg* 2020.
211. Han YW, Wang X. Mobile microbiome: oral bacteria in extra-oral infections and inflammation. *Journal of Dental Research* 2013;92(6):485-91.
212. Scannapieco FA, Panagakos FS. Periodontal inflammation: from gingivitis to systemic disease? In: InTech, editor. *Gingival Diseases: Their Aetiology, Prevention and Treatment*. Croatia; 2011. p. 149-72.
213. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature* 2008;454(7203):436-44.
214. Francescone R, Hou V, Grivennikov SI. Microbiome, inflammation, and cancer. *Cancer J* 2014;20(3):181-9.
215. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 2001;357(9255):539-45.
216. González-Pérez A, García Rodríguez LA, López-Ridaura R. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on cancer sites other than the colon and rectum: a meta-analysis. *BMC Cancer* 2003;3:28.
217. Kundu JK, Surh YJ. Inflammation: gearing the journey to cancer. *Mutat Res* 2008;659(1-2):15-30.

218. Brennan CA, Garrett WS. Gut Microbiota, Inflammation, and Colorectal Cancer. *Annu Rev Microbiol* 2016;70:395-411.
219. Rothman KJ, Greenland S, Lash TL. *Modern epidemiology*. 3e éd. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2008. p. 142-85.
220. Friedenreich CM, Courneya KS, Bryant HE. The lifetime total physical activity questionnaire: development and reliability. *Med Sci Sports Exerc* 1998;30(2):266-74.
221. Willett WC, Reynolds RD, Cottrell-Hoehner S, Sampson L, Browne ML. Validation of a semi-quantitative food frequency questionnaire: comparison with a 1-year diet record. *J Am Diet Assoc* 1987;87(1):43-7.
222. Cade J, Thompson R, Burley V, Warm D. Development, validation and utilisation of food-frequency questionnaires - a review. *Public Health Nutr* 2002;5(4):567-87.
223. Siemiatycki J, Krewski D, Franco E, Kaiserman M. Associations between cigarette smoking and each of 21 types of cancer: a multi-site case-control study. *Int J Epidemiol* 1995;24(3):504-14.
224. Sarah MacLaughlin, Friedenreich C. Cancer epidemiology and prevention research, Alberta Health Services. Lifetime Total Physical Activity Questionnaire comprehensive users' guide. 2016. <https://www.cepr.ca/questionnaires/life-time-physical-activity-questionnaire-ltpaq/>. Accessed 3 January 2020. 2016.
225. Berney LR, Blane DB. Collecting retrospective data: accuracy of recall after 50 years judged against historical records. *Soc Sci Med* 1997;45(10):1519-25.
226. Lang NP, Bartold PM. Periodontal health. *J Periodontol* 2018;89 Suppl 1:S9-s16.
227. Cole SR, Platt RW, Schisterman EF, et al. Illustrating bias due to conditioning on a collider. *Int J Epidemiol* 2010;39(2):417-20.
228. Shrier I, Platt RW. Reducing bias through directed acyclic graphs. *BMC Med Res Methodol* 2008;8:70.
229. Hernán MA, Hernández-Díaz S, Robins JM. A structural approach to selection bias. *Epidemiology* 2004;15(5):615-25.
230. McNamee R. Confounding and confounders. *Occup Environ Med* 2003;60(3):227-34; quiz 164, 234.
231. Graham R. Law, Paul D. Baxter, Gilthorpe MS. Selection Bias in Epidemiologic Studies. Dans Yu-Kang Tu et Darren C. Greenwood, *Modern Methods for Epidemiology*. p 57-72: Springer Science+Business Media Dordrecht; 2012.
232. Graham R. Law, Rosie Green, Ellison GTH. Confounding and Causal Path Diagrams. Dans Yu-Kang Tu et Darren C. Greenwood, *Modern Methods for Epidemiology*. p 1-14: Springer Science+Business Media Dordrecht; 2012.
233. Tu Y-K. Directed Acyclic Graphs and Structural Equation Modelling. Dans Yu-Kang Tu et Darren C. Greenwood, *Modern Methods for Epidemiology*. p 191-203: Springer Science+Business Media Dordrecht; 2012.
234. Cheung YB, Ma X, Lam KF, Li J, Milligan P. Bias control in the analysis of case-control studies with incidence density sampling. *Int J Epidemiol* 2019;48(6):1981-91.
235. Labrecque JA, Hunink MMG, Ikram MA, Ikram MK. Do Case-Control Studies Always Estimate Odds Ratios? *Am J Epidemiol* 2021;190(2):318-21.
236. Pearce N. What does the odds ratio estimate in a case-control study? *Int J Epidemiol* 1993;22(6):1189-92.

237. Waltoft BL, Pedersen CB, Nyegaard M, Hobolth A. The importance of distinguishing between the odds ratio and the incidence rate ratio in GWAS. *BMC Med Genet* 2015;16:71.
238. Menard S. *Applied logistic regression analysis* (2nd ed.). SAGE Publications, Inc. <https://www.doi.org/10.4135/9781412983433>; 2002.
239. Takahashi M. Statistical Inference in Missing Data by MCMC and Non-MCMC Multiple Imputation Algorithms: Assessing the Effects of Between-Imputation Iterations. *Data Science Journal* 2017;16(37):1-17. DOI: <https://doi.org/10.5334/dsj-2017-037>.
240. James Honaker, Gary King, Blackwell M. Amelia II: A Program for Missing Data. *Journal of Statistical Software* 2011;45(7):<http://www.jstatsoft.org/>.
241. Hennekens CH. *Épidémiologie en médecine*. Paris: Paris : Éd. Frison-Roche; 1998.
242. Morton LM, Cahill J, Hartge P. Reporting participation in epidemiologic studies: a survey of practice. *Am J Epidemiol* 2006;163(3):197-203.
243. Aigner A, Grittner U, Becher H. Bias due to differential participation in case-control studies and review of available approaches for adjustment. *PLoS One* 2018;13(1):e0191327.
244. Idrissi Janati A, Karp I, Durand R, Rompré P, Emami E. Comparaison entre les mesures objectives et subjectives de la santé buccodentaire. *Journées dentaires de l'Ordre des Dentistes du Québec, Montréal, Canada*. . 2013.
245. Idrissi Janati A, Karp I, Durand R, Voyer R, Emami E. Recherche sur la santé orale compromise comme facteur de risque potentiel pour le cancer colorectal sporadique: une étude pilote. *Journée scientifique du Réseau de Recherche en Santé Buccodentaire et Osseuse, Estrie, Canada*. 2014.
246. Idrissi Janati A, Karp I, Durand R, Voyer R, Emami E. Recherche sur la santé orale compromise comme facteur de risque potentiel pour le cancer colorectal sporadique: une étude pilote. *Journée scientifique de la Faculté de médecine dentaire, Université de Montréal, Montréal, Canada*. 2014.
247. Morgan RL, Whaley P, Thayer KA, Schünemann HJ. Identifying the PECO: A framework for formulating good questions to explore the association of environmental and other exposures with health outcomes. *Environ Int* 2018;121(Pt 1):1027-31.
248. Ouzzani M, Hammady H, Fedorowicz Z, Elmagarmid A. Rayyan-a web and mobile app for systematic reviews. *Syst Rev* 2016;5(1):210.
249. Deeks JJ, Dinnes J, D'Amico R, et al. Evaluating non-randomised intervention studies. *Health Technol Assess* 2003;7(27):iii-x, 1-173.
250. Bundgaard-Nielsen C, Baandrup UT, Nielsen LP, Sørensen S. The presence of bacteria varies between colorectal adenocarcinomas, precursor lesions and non-malignant tissue. *BMC Cancer* 2019;19(1):1-13.
251. Singh MK, J.; Singh, S.; Thumburu, KK.; Jaiswal, N.; Chauhan, A.; Agarwal, A.; Paul, N.; Sagwal, S. . Comparison of Newcastle Ottawa scale (NOS) and Agency for Health Research and Quality (AHRQ) as risk of bias assessment tools for cohort studies. In: *Filtering the information overload for better decisions. Abstracts of the 23rd Cochrane Colloquium; 2015 3-7 Oct; Vienna, Austria. John Wiley & Sons; 2015.*

252. Katsigianni M, Karageorgiou V, Lambrinouadaki I, Siristatidis C. Maternal polycystic ovarian syndrome in autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis. *Mol Psychiatry* 2019;24(12):1787-97.
253. Perletti G, Monti E, Magri V, et al. The association between prostatitis and prostate cancer. Systematic review and meta-analysis. *Arch Ital Urol Androl* 2017;89(4):259-65.
254. Pillinger T, Osimo EF, Brugger S, et al. A Meta-analysis of Immune Parameters, Variability, and Assessment of Modal Distribution in Psychosis and Test of the Immune Subgroup Hypothesis. *Schizophr Bull* 2019;45(5):1120-33.
255. Margulis AV, Pladevall M, Riera-Guardia N, et al. Quality assessment of observational studies in a drug-safety systematic review, comparison of two tools: the Newcastle-Ottawa Scale and the RTI item bank. *Clin Epidemiol* 2014;6:359-68.
256. Mannath J, Rangunath K. Endoscopic mucosal resection: who and how? *Therap Adv Gastroenterol* 2011;4(5):275-82.
257. Imperiale TF, Ransohoff DF, Itzkowitz SH, et al. Multitarget stool DNA testing for colorectal-cancer screening. *N Engl J Med* 2014;370(14):1287-97.
258. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000;25(2):169-93.
259. Mima K, Sukawa Y, Nishihara R, et al. *Fusobacterium nucleatum* and T Cells in Colorectal Carcinoma. *JAMA Oncol* 2015;1(5):653-61.
260. Bertrand KA, Shingala J, Evens A, et al. Periodontal disease and risk of non-Hodgkin lymphoma in the Health Professionals Follow-Up Study. *Int J Cancer* 2017;140(5):1020-26.
261. Boylan MR, Khalili H, Huang ES, et al. A prospective study of periodontal disease and risk of gastric and duodenal ulcer in male health professionals. *Clin Transl Gastroenterol* 2014;5:e49.
262. Joshipura KJ, Rimm EB, Douglass CW, et al. Poor oral health and coronary heart disease. *J Dent Res* 1996;75(9):1631-6.
263. Joshipura KJ, Wand HC, Merchant AT, Rimm EB. Periodontal disease and biomarkers related to cardiovascular disease. *J Dent Res* 2004;83(2):151-5.
264. Oh H, Lee DH, Giovannucci EL, Keum N. Gastric and duodenal ulcers, periodontal disease, and risk of bladder cancer in the Health Professionals Follow-up Study. *Cancer Causes Control* 2020;31(4):383-91.
265. Pasquale LR, Hyman L, Wiggs JL, et al. Prospective Study of Oral Health and Risk of Primary Open-Angle Glaucoma in Men: Data from the Health Professionals Follow-up Study. *Ophthalmology* 2016;123(11):2318-27.
266. Rivas-Tumanyan S, Spiegelman D, Curhan GC, Forman JP, Joshipura KJ. Periodontal disease and incidence of hypertension in the health professionals follow-up study. *Am J Hypertens* 2012;25(7):770-6.
267. Arkema EV, Karlson EW, Costenbader KH. A prospective study of periodontal disease and risk of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2010;37(9):1800-4.
268. Nakib S, Han J, Li T, Joshipura K, Qureshi AA. Periodontal disease and risk of psoriasis among nurses in the United States. *Acta Odontol Scand* 2013;71(6):1423-9.
269. Freudenheim JL, Genco RJ, LaMonte MJ, et al. Periodontal Disease and Breast Cancer: Prospective Cohort Study of Postmenopausal Women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2016;25(1):43-50.

270. Gordon JH, LaMonte MJ, Zhao J, et al. Association of Periodontal Disease and Edentulism With Hypertension Risk in Postmenopausal Women. *Am J Hypertens* 2019;32(2):193-201.
271. LaMonte MJ, Genco RJ, Hovey KM, et al. History of Periodontitis Diagnosis and Edentulism as Predictors of Cardiovascular Disease, Stroke, and Mortality in Postmenopausal Women. *J Am Heart Assoc* 2017;6(4).
272. Mai X, LaMonte MJ, Hovey KM, et al. History of periodontal disease diagnosis and lung cancer incidence in the Women's Health Initiative Observational Study. *Cancer Causes Control* 2014;25(8):1045-53.
273. Groves DW, Krantz MJ, Hokanson JE, et al. Comparison of Frequency and Duration of Periodontal Disease With Progression of Coronary Artery Calcium in Patients With and Without Type 1 Diabetes Mellitus. *Am J Cardiol* 2015;116(6):833-7.
274. Pitiphat W, Joshipura KJ, Gillman MW, et al. Maternal periodontitis and adverse pregnancy outcomes. *Community Dent Oral Epidemiol* 2008;36(1):3-11.
275. Mochari H, Grbic JT, Mosca L. Usefulness of self-reported periodontal disease to identify individuals with elevated inflammatory markers at risk of cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 2008;102(11):1509-13.
276. Ylostalo PV, Jarvelin MR, Laitinen J, Knuuttila ML. Gingivitis, dental caries and tooth loss: risk factors for cardiovascular diseases or indicators of elevated health risks. *J Clin Periodontol* 2006;33(2):92-101.
277. Ylostalo PV, Jarvelin MR, Laitinen J, Knuuttila ML. Self-reported gingivitis and tooth loss poorly predict C-reactive protein levels: a study among Finnish young adults. *J Clin Periodontol* 2008;35(2):114-9.
278. Oliveira LS, Lira-Junior R, Figueredo CM, Gomes MB, Fischer RG. Self-Reported Periodontitis and Complications in Type 1 Diabetes Patients: A Brazilian Nationwide Survey. *Braz Dent J* 2016;27(5):599-603.
279. Howell TH, Ridker PM, Ajani UA, Hennekens CH, Christen WG. Periodontal disease and risk of subsequent cardiovascular disease in U.S. male physicians. *J Am Coll Cardiol* 2001;37(2):445-50.
280. Kaneto C, Toyokawa S, Inoue K, et al. Association between periodontal disease and peptic ulcers among Japanese workers: MY health up study. *Glob J Health Sci* 2012;4(2):42-9.
281. Noguchi S, Toyokawa S, Miyoshi Y, et al. Five-year follow-up study of the association between periodontal disease and myocardial infarction among Japanese male workers: MY Health Up Study. *J Public Health (Oxf)* 2015;37(4):605-11.
282. Gonzalez-Navarro B, Pinto-Sala X, Corbella E, et al. Associations between self-reported periodontal disease, assessed using a very short questionnaire, cardiovascular disease events and all-cause mortality in a contemporary multi-ethnic population: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Atherosclerosis* 2018;278:110-16.
283. Bensley L, VanEenwyk J, Ossiander EM. Associations of self-reported periodontal disease with metabolic syndrome and number of self-reported chronic conditions. *Prev Chronic Dis* 2011;8(3):A50.
284. Nimptsch K, Wu K. Is Timing Important? The Role of Diet and Lifestyle during Early Life on Colorectal Neoplasia. *Curr Colorectal Cancer Rep* 2018;14(1):1-11.
285. Royston P, Altman DG, Sauerbrei W. Dichotomizing continuous predictors in multiple regression: a bad idea. *Stat Med* 2006;25(1):127-41.

286. Groenwold RH, Klungel OH, Altman DG, et al. Adjustment for continuous confounders: an example of how to prevent residual confounding. *Cmaj* 2013;185(5):401-6.
287. Galea S, Tracy M. Participation rates in epidemiologic studies. *Ann Epidemiol* 2007;17(9):643-53.
288. Xu M, Richardson L, Campbell S, Pintos J, Siemiatycki J. Response rates in case-control studies of cancer by era of fieldwork and by characteristics of study design. *Ann Epidemiol* 2018;28(6):385-91.
289. Coughlin SS. Recall bias in epidemiologic studies. *J Clin Epidemiol* 1990;43(1):87-91.
290. Savin Z, Kivity S, Yonath H, Yehuda S. Smoking and the intestinal microbiome. *Arch Microbiol* 2018;200(5):677-84.
291. Qamar N, Castano D, Patt C, et al. Meta-analysis of alcohol induced gut dysbiosis and the resulting behavioral impact. *Behav Brain Res* 2019;376:112196.
292. Niederreiter L, Adolph TE, Tilg H. Food, microbiome and colorectal cancer. *Dig Liver Dis* 2018;50(7):647-52.
293. Song M, Chan AT. Environmental Factors, Gut Microbiota, and Colorectal Cancer Prevention. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2019;17(2):275-89.
294. Amitay EL, Werner S, Vital M, et al. Fusobacterium and colorectal cancer: causal factor or passenger? Results from a large colorectal cancer screening study. *Carcinogenesis* 2017;38(8):781-88.
295. Zhang Y, Yu X, Yu E, et al. Changes in gut microbiota and plasma inflammatory factors across the stages of colorectal tumorigenesis: a case-control study. *BMC Microbiol* 2018;18(1):92.
296. Kashani N, Bezmin Abadi AT, Rahimi F, Forootan M. FadA-positive Fusobacterium nucleatum is prevalent in biopsy specimens of Iranian patients with colorectal cancer. *New Microbes New Infect* 2020;34:100651.
297. Repass J. Replication Study: Fusobacterium nucleatum infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Elife* 2018;7.
298. Tunsjø HS, Gundersen G, Rangnes F, et al. Detection of Fusobacterium nucleatum in stool and colonic tissues from Norwegian colorectal cancer patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2019;38(7):1367-76.
299. Yu J, Chen Y, Fu X, et al. Invasive Fusobacterium nucleatum may play a role in the carcinogenesis of proximal colon cancer through the serrated neoplasia pathway. *Int J Cancer* 2016;139(6):1318-26.
300. Mira-Pascual L, Cabrera-Rubio R, Ocon S, et al. Microbial mucosal colonic shifts associated with the development of colorectal cancer reveal the presence of different bacterial and archaeal biomarkers. *J Gastroenterol* 2015;50(2):167-79.
301. Mima K, Cao Y, Chan AT, et al. Fusobacterium nucleatum in Colorectal Carcinoma Tissue According to Tumor Location. *Clin Transl Gastroenterol* 2016;7(11):e200.
302. Ito M, Kanno S, Nosho K, et al. Association of Fusobacterium nucleatum with clinical and molecular features in colorectal serrated pathway. *Int J Cancer* 2015;137(6):1258-68.
303. Ye X, Wang R, Bhattacharya R, et al. Fusobacterium Nucleatum Subspecies Animalis Influences Proinflammatory Cytokine Expression and Monocyte Activation in Human Colorectal Tumors. *Cancer Prev Res (Phila)* 2017;10(7):398-409.

304. Chapple IL, Van der Weijden F, Doerfer C, et al. Primary prevention of periodontitis: managing gingivitis. *J Clin Periodontol* 2015;42 Suppl 16:S71-6.
305. Canadian Academy of Health Sciences, 2014. Improving access to oral health care for vulnerable people living in Canada. https://cahs-acss.ca/wp-content/uploads/2015/07/Access_to_Oral_Care_FINAL_REPORT_EN.pdf (consulté le 1 mars 2022).
306. Calvasina P, Muntaner C, Quiñonez C. Factors associated with unmet dental care needs in Canadian immigrants: an analysis of the longitudinal survey of immigrants to Canada. *BMC Oral Health* 2014;14:145.
307. Mehra VM, Costanian C, Khanna S, Tamim H. Dental care use by immigrant Canadians in Ontario: a cross-sectional analysis of the 2014 Canadian Community Health Survey (CCHS). *BMC Oral Health* 2019;19(1):78.
308. Statistique Canada. 2017. Série « Perspective géographique », Recensement de 2016. <https://www12.statcan.gc.ca/census-recensement/2016/as-sa/fogs-spg/Facts-cma-fra.cfm?LANG=Fra&GK=CMA&GC=462&TOPIC=7>. Consulté 1 mars 2022.
309. Kang MS, Kim BG, Chung J, Lee HC, Oh JS. Inhibitory effect of *Weissella cibaria* isolates on the production of volatile sulphur compounds. *J Clin Periodontol* 2006;33(3):226-32.
310. Kang MS, Lee DS, Lee SA, Kim MS, Nam SH. Effects of probiotic bacterium *Weissella cibaria* CMU on periodontal health and microbiota: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *BMC Oral Health* 2020;20(1):243.
311. Le B, Ngoc APT, Yang SH. Synbiotic fermented soymilk with *Weissella cibaria* FB069 and xylooligosaccharides prevents proliferation in human colon cancer cells. *J Appl Microbiol* 2020;128(5):1486-96.

Annexes

Annexe 1. Questionnaires de l'étude COLDENT

1. Questionnaire sociodémographique et histoire médicale

Date:

				/			/				
a	a	a	a		m	m		j	j		

Identification Code:

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Veillez répondre aux questions suivantes, S'il vous plaît :

1. Êtes vous Mâle ou Femelle ?

2. Date de naissance : ____/____/____
Mois/jour/année

3. Êtes-vous né(e) au Canada?

Oui Non (dans quel pays êtes-vous né(e)?: _____

4. Si non, quand avez-vous déménagé au Canada? Année : _____

Les personnes qui vivent au Canada proviennent de plusieurs milieux culturels et géo ethniques différents.

5. Quel est **votre** parcours géo ethnique? Veuillez cocher tout ce qui s'applique.

Africain (Afrique /Afro-américain)

Amérique du nord (Canadien-français, Canadien-Anglais, Américain, Mexicain)

Asie de l'Est (*Veillez en cocher un, SVP*) : Chinois Japonais Coréen

Amérique du sud (Latine / Hispano-américain)

Européen (par exemple Slaves, Germaniques, Anglo-saxon, Scandinave, Grecque)

Asie du sud (par exemple des Indes orientales, Pakistanais, Sri lankais)

Autochtones / Natif américain

Asie du sud est (par exemple au Cambodge, Indonésie, Laotien, Vietnamien)

Moyen-Orient /Afrique du nord (par exemple Afghan, Algérien, Marocain, Égyptien, Iranien, Irakien, Israéliens, Palestinien, Syrien, Tunisien, Ture)

Autre – Spécifiez: _____

En référant à la liste ci-dessus:

6. Quel est l'origine culturelle et géo ethnique de **vos parents**?

Mère? _____

Père? _____

7. Quel est l'origine culturelle et géo ethnique de vos **grands- parents**?

Mère du père? _____ Mère de la mère? _____

Père du père? _____ Père de la mère? _____

8. Quelle est votre langue maternelle? _____

Date:

a	a	a	a	/	m	m	/	j	j

Identification Code:

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

9. Pour chacun de vos parents biologiques et frère (s) ou sœur (s), cochez la case appropriée à l'égard de chacune des maladies suivantes qu'ils ont maintenant ou déjà eu dans le passé. Sinon, laissez vide SVP.

	Frères		Sœurs		Mère	Père
	Oui	Nombre de frères avec cancer	Oui	Nombre de sœurs avec cancer	Oui	Oui
Cancer du colon						
Cancer du rectum						

10. Avez-vous déjà été diagnostiqué avec une de ces maladies? (Cochez tout ce qui s'applique)

	Oui	Non	Année		Oui	Non	Année
	Diabète					Maladies inflammatoires de l'intestin	
Syndrome héréditaire				La polypose adénomateuse familiale			
Polypose juvénile				Syndrome Peutz-Jeghers			
Polypose hamartomateuse				Adénome du côlon			

11. Quel est votre revenu personnel?
- | | |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> Moins que \$10,000 par année | <input type="checkbox"/> \$10,000 à \$19,999 par année |
| <input type="checkbox"/> \$20,000 à \$29,999 par année | <input type="checkbox"/> \$30,000 à \$39,999 par année |
| <input type="checkbox"/> \$40,000 à \$49,999 par année | <input type="checkbox"/> \$50,000 à \$59,999 par année |
| <input type="checkbox"/> \$60,000 à \$69,999 par année | <input type="checkbox"/> \$70,000 ou plus par année |
| <input type="checkbox"/> Ne sais pas | <input type="checkbox"/> Préfère de ne pas répondre |

12. Quel est votre revenu familial à la maison?
- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Moins que \$10,000 par année | <input type="checkbox"/> \$10,000 to \$29,999 par année |
| <input type="checkbox"/> \$30,000 à \$49,999 par année | <input type="checkbox"/> \$50,000 à \$69,999 par année |
| <input type="checkbox"/> \$70,000 à \$89,999 par année | <input type="checkbox"/> \$90,000 à \$109,999 par année |
| <input type="checkbox"/> \$110,000 à \$139,999 par année | <input type="checkbox"/> \$140,000 ou plus par an |
| <input type="checkbox"/> Ne sais pas | <input type="checkbox"/> Préfère de ne pas répondre |

13. Habitez-vous: Seul (e) En famille Avec d'autres adultes Préfère de ne pas répondre

14. Quel a été le plus haut niveau de scolarité que vous avez complété? (Veuillez en encercler un, SVP)

<input type="checkbox"/> Pas d'école	<input type="checkbox"/> Préfère ne pas répondre						
École primaire	1	2	3	4	5	6	7
École secondaire	7	8	9	10	11	12	certificat d'équivalence
Collège (CEGEP/technique)	<input type="checkbox"/> programme avant l'université			<input type="checkbox"/> technologie/program professionnel			
Université (professionnel)	<input type="checkbox"/> baccalauréat		<input type="checkbox"/> maîtrise		<input type="checkbox"/> doctorat		

Date:

				/			/		
a	a	a	a		m	m		j	j

Identification Code:

--	--	--	--	--	--	--	--

15. Quel est votre statut actuel du travail?

- | | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> Travailleur à temps plein | <input type="checkbox"/> Femme au foyer /soignant |
| <input type="checkbox"/> Travailleur à temps partiel | <input type="checkbox"/> Handicapés médicaux |
| <input type="checkbox"/> Travailleur occasionnel | <input type="checkbox"/> À la retraite |
| <input type="checkbox"/> Travailleur à domicile | <input type="checkbox"/> Autre _____ |
| <input type="checkbox"/> Étudiant | <input type="checkbox"/> Préfère ne pas répondre |
| <input type="checkbox"/> Sans emplois ____ années ____ mois | |

16. Quel est votre statut matrimonial?

- | | | |
|---|-------------------------------------|---|
| <input type="checkbox"/> Marié(e) | <input type="checkbox"/> Veuf (ve) | <input type="checkbox"/> Divorcé (e) |
| <input type="checkbox"/> Conjoint(e) de fait | <input type="checkbox"/> Séparé (e) | <input type="checkbox"/> Célibataire (e), jamais marié(e) |
| <input type="checkbox"/> Préfère de ne pas répondre | | |

2. Questionnaire sur la taille et le poids

Date:

2	0	1	2	/		/		
a	a	a	a		m	m	j	j

 Ne pas remplir cette case :

--	--	--	--	--	--	--	--

 Code d'identification :

1. Est-ce que vous connaissez votre poids à la naissance?

--	--	--	--

 ou

--	--

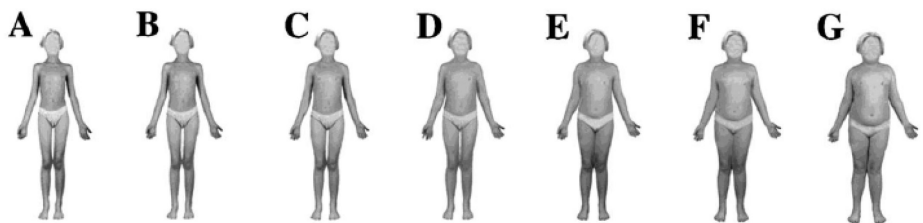
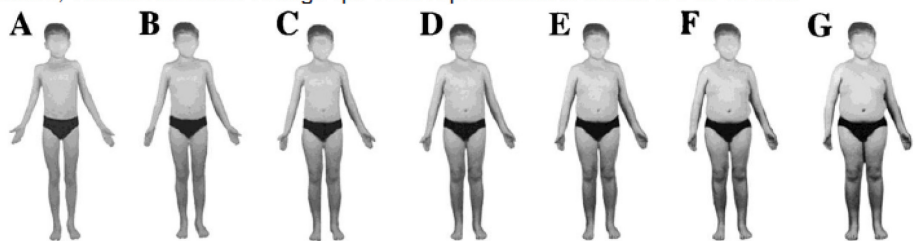
--	--

 Ne sait pas Préfère ne pas répondre
grammes livres oz

1. a Si vous ne connaissez pas votre poids à la naissance, est-ce que vous étiez:
(Cochez seulement une s'il vous plait)

Un petit bébé Ne sait pas
 Un bébé moyen Préfère ne pas répondre
 Un grand bébé

2. Regardez les images suivantes représentant différentes tailles corporelles d'un enfant, veuillez identifier l'image qui vous représentait le mieux à 5 et 10 ans.



À 5 ans:

A	B	C	D	E	F	G	Ne sait pas	Préfère ne pas répondre

À 10 ans :

A	B	C	D	E	F	G	Ne sait pas	Préfère ne pas répondre

Date:

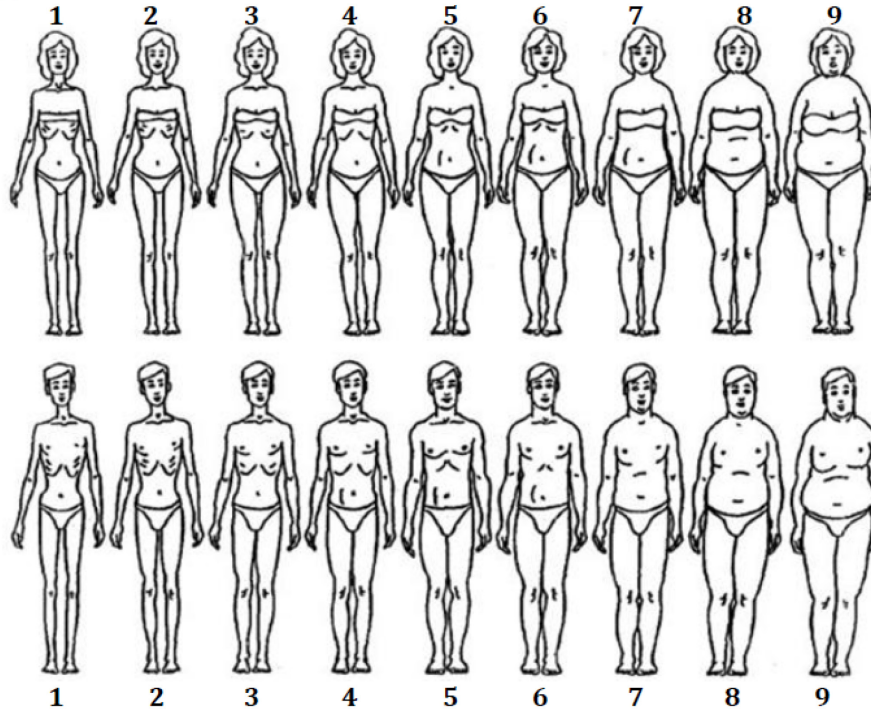
2	0	1	2	/		/			
a	a	a	a		m	m		j	j

Ne pas remplir cette case :

Code d'identification :

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

3. Sur les images suivantes, représentant différentes tailles corporelles, indiquez à quelle image vous ressemblez aux âges suivants, en cochant la bonne case dans le tableau ci-dessous. Veuillez aussi écrire votre poids à ces âges, si vous vous en rappelez?



ÂGE	1	2	3	4	5	6	7	8	9	POIDS	
										kg	livres
20-29 ans											
30-39 ans											
40-49 ans											
50-59 ans											
60-69 ans											
70-80 ans											

Date:

2	0	1	2	/			/		
a	a	a	a		m	m		j	j

Ne pas remplir cette case :

Code d'identification :

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

4. Quel est la plus grande taille que vous ayez atteinte (sans chaussure)?

ou Ne sait pas Préfère ne pas répondre
pieds pouces cm

5. Combien pesiez-vous il y a deux ans?

ou Ne sait pas Préfère ne pas répondre
kg livres

6. Si c'est possible, pourriez-vous mesurer et marquer votre taille et poids maintenant ?

ou
pieds pouces cm

ou
Kg livres

7. Si c'est possible, pourriez-vous mesurer et marquer votre tour de taille et votre tour de hanches ?

Tour de hanches à la partie la plus large ou
pouces cm

Le tour de taille au niveau du nombril ou juste au-dessus ou
pouces cm

3. Questionnaire sur le tabagisme

Date:

				/			/		
a	a	a	a		m	m		j	j

Code d'identification :

--	--	--	--	--	--	--	--

Veuillez répondre aux questions suivantes

1) Avez-vous déjà fumé un total de 100 cigarettes ou plus dans votre vie?

<input type="radio"/> Oui	<input type="radio"/> Je ne sais pas
<input type="radio"/> Non (Si non, ce questionnaire est terminé)	<input type="radio"/> Préfère de ne pas répondre

2) Y a-t-il déjà eu une période durant laquelle vous avez fumé des cigarettes régulièrement (au moins une fois par semaine)?

<input type="radio"/> Oui	<input type="radio"/> Je ne sais pas
<input type="radio"/> Non	<input type="radio"/> Préfère de ne pas répondre

3) Quel âge aviez-vous la première fois quand vous avez commencé à fumer des cigarettes régulièrement ?

_____ ans

4) Fumez-vous encore des cigarettes?

<input type="radio"/> Oui	<input type="radio"/> Je ne sais pas
<input type="radio"/> Non	<input type="radio"/> Préfère de ne pas répondre

5) Si non, quel âge aviez-vous lorsque vous avez cessé de fumer régulièrement _____ ans

6) Pendant les périodes où vous fumiez, combien de cigarettes aviez-vous l'habitude de fumer? (généralement 1 paquet contient 20 cigarettes)

_____ # de cigarettes

<input type="radio"/> Par jour	<input type="radio"/> Je ne sais pas
<input type="radio"/> Par semaine	<input type="radio"/> Préfère de ne pas répondre
<input type="radio"/> Par mois	

7) Y avait-il déjà eu des périodes pendant lesquelles vous aviez abandonné le tabagisme pendant au moins 12 mois et aviez recommencé?

<input type="radio"/> oui de l'âge à l'âge	<input type="radio"/> Non
<input type="radio"/> de l'âge à l'âge	<input type="radio"/> Je ne sais pas
<input type="radio"/> de l'âge à l'âge	<input type="radio"/> Je préfère de ne pas répondre

Date:

				/			/		
a	a	a	a		m	m		j	j

Code d'identification :

--	--	--	--	--	--	--	--

- 8) Nous voudrions avoir une idée sur le type et la quantité de cigarettes que vous aviez fumé à différents moments de votre vie. Nous voudrions que vous pensiez à quatre années différentes dans votre vie. Essayez svp de vous rappeler de vos habitudes de consommation de tabac à ces moments (s'il y a lieu).

De (âge)	À (âge)	Nombre de cigarettes par jour	Marque la plus fumée	Type le plus fumé	
				<input type="radio"/> Avec filtre	<input type="radio"/> Roulé
				<input type="radio"/> Sans filtre	<input type="radio"/> Je ne sais pas
				<input type="radio"/> Avec filtre	<input type="radio"/> Roulé
				<input type="radio"/> Sans filtre	<input type="radio"/> Je ne sais pas
				<input type="radio"/> Avec filtre	<input type="radio"/> Roulé
				<input type="radio"/> Sans filtre	<input type="radio"/> Je ne sais pas
				<input type="radio"/> Avec filtre	<input type="radio"/> Roulé
				<input type="radio"/> Sans filtre	<input type="radio"/> Je ne sais pas

Merci pour votre participation !

4. Questionnaire sur la consommation de médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens

Le questionnaire comprend plusieurs pages similaires à la page ci-dessous, avec les mêmes questions qui se répètent pour les pour se renseigner sur les anti-inflammatoires suivants : (Nom de la famille et exemples de noms commerciaux)

1) Ibuprofène hors prescription

2) Ibuprofène sous prescription: Advil, Motrin, Nuprin, Apo- Ibuprofen, Novo- Profen

3) Naproxène : Naprosyn, Aleve, Anaprox, Naxen, Apo-Naproxen, Novo-Naprox

4) Sulindac : Clinoril, Apo-Sulin, Novo-Sudac

5) Nabumetone: Relafen

6) Diclofenac: Voltaren, Cataflam, Apo-Diclo, Novo-Difenac

7) Piroxicam: Feldene, Apo-Piroxicam, Novo-Pirocam

8) Indometacin: Indocid, Apo-Indomethacine, Novo-Methacin

9) Ketoprofène : Orudis, Oruvail, Rhodis

10) Celecoxib: Celebrex;

11) Rofecoxib: Vioxx

12) Vadecoxib: Bextra

13) Aspirine

a a a a / m m / j j

ID [] [] [] [] [] [] [] []

	1. Ibuprofène hors prescription	2. Ibuprofène sous PRESCRIPTION: Advil, Motrin, Nuprin, Apo- Ibuprofen, Novo-Profen
Avez-vous déjà pris ce médicament?	<input type="radio"/> Oui <input type="radio"/> Non (Passez au 2)	<input type="radio"/> Oui <input type="radio"/> Non (Passez au 3)
Avez-vous déjà pris ce médicament <u>régulièrement, cela veut dire : au moins un comprimé/gélule par mois pendant 6 mois continus ou plus longtemps?</u>	<input type="radio"/> Oui <input type="radio"/> Non (Passez au 2) <input type="radio"/> Ne sais pas (Passez au 2) <input type="radio"/> Préfère ne pas répondre (Passez au 2)	<input type="radio"/> Oui <input type="radio"/> Non (Passez au 3) <input type="radio"/> Ne sais pas (Passez au 3) <input type="radio"/> Préfère ne pas répondre (Passez au 3)
Pourquoi avez-vous déjà pris ce médicament régulièrement ?	<input type="radio"/> Douleurs d'arthrite <input type="radio"/> Douleurs menstruelles <input type="radio"/> Douleurs générales <input type="radio"/> Douleurs têtes/migraines <input type="radio"/> Autres (Spécifiez) : _____ <input type="radio"/> Ne sais pas <input type="radio"/> Préfère ne pas répondre	<input type="radio"/> Douleurs d'arthrite <input type="radio"/> Douleurs menstruelles <input type="radio"/> Douleurs générales <input type="radio"/> Douleurs têtes/migraines <input type="radio"/> Autres (Spécifiez) : _____ <input type="radio"/> Ne sais pas <input type="radio"/> Préfère ne pas répondre
Est-ce que ce médicament était pris régulièrement après avis du médecin ?	<input type="radio"/> Oui <input type="radio"/> Non <input type="radio"/> Je ne me souviens pas	<input type="radio"/> Oui <input type="radio"/> Non <input type="radio"/> Je ne me souviens pas
Quand avez-vous commencé à prendre ce médicament régulièrement ?	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> / ou <input type="text"/> _____ année âge <input type="radio"/> Ne sais pas	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> / ou <input type="text"/> _____ année âge <input type="radio"/> Ne sais pas
Quand était la dernière fois où vous avez pris régulièrement ce médicament?	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> ou <input type="text"/> _____ année mois âge <input type="radio"/> Je prends encore ce médicament <input type="radio"/> Je ne me souviens pas	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> ou <input type="text"/> _____ année mois âge <input type="radio"/> Je prends encore ce médicament <input type="radio"/> Je ne me souviens pas
Pendant cette période, avez-vous arrêté de prendre ce médicament pour 6 mois ou plus?	<input type="radio"/> Oui <input type="radio"/> Non <input type="radio"/> Ne sais pas <input type="radio"/> Préfère ne pas répondre	<input type="radio"/> Oui <input type="radio"/> Non <input type="radio"/> Ne sais pas <input type="radio"/> Préfère ne pas répondre
Pendant combien de semaines, mois ou années en tout, avez-vous régulièrement pris ce médicament?	<input type="text"/> <input type="text"/> # de <input type="radio"/> Semaines <input type="radio"/> Mois <input type="radio"/> Années <input type="radio"/> Ne sais pas <input type="radio"/> Préfère ne pas répondre	<input type="text"/> <input type="text"/> # de <input type="radio"/> Semaines <input type="radio"/> Mois <input type="radio"/> Années <input type="radio"/> Ne sais pas <input type="radio"/> Préfère ne pas répondre
Pendant que vous preniez régulièrement ce médicament, combien de fois, en moyenne, l'avez-vous pris? Autrement dit, combien de fois par jour/semaine/mois l'avez-vous pris?	<input type="text"/> <input type="text"/> par <input type="radio"/> Jour <input type="radio"/> Semaine <input type="radio"/> Année <input type="radio"/> Ne sais pas <input type="radio"/> Préfère ne pas répondre	<input type="text"/> <input type="text"/> par <input type="radio"/> Jour <input type="radio"/> Semaine <input type="radio"/> Année <input type="radio"/> Ne sais pas <input type="radio"/> Préfère ne pas répondre

5. Questionnaire sur la santé buccodentaire

Date:

a	a	a	a	/	m	m	/	j	j

Code d'identification:

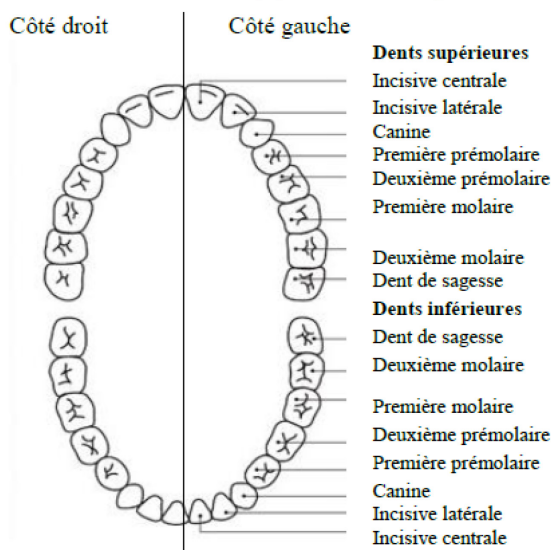
--	--	--	--	--	--	--	--

S'il vous plait, utilisez un miroir pour répondre aux questions 1 à 8.

1. **Combien de dents naturelles avez-vous actuellement dans votre bouche** (y compris les dents avec des couronnes dessus) Si vous avez une prothèse amovible (partielle), veuillez l'enlever avant de compter.

J'ai un total de dents naturelles dans ma bouche.

2. **Dans le schéma suivant, veuillez tracer un cercle autour des dents que vous avez actuellement en bouche et une croix (X) sur les dents que vous avez perdues.**



2. a : Si vous avez des dents qui manquent, veuillez alors choisir l'une des raisons suivantes de leur absence : (vous pouvez cocher plus d'une case).

- Agénésie (la ou les dents concernées n'ont jamais poussé).
- La ou les dents ne pouvaient plus être soignées (Grande carie, échec de traitement de canal ou d'obturation coronaire).
- Maladie parodontale.
- La ou les dents étaient très mobiles.
- À cause d'un accident ou d'un traumatisme.
- À l'occasion d'un traitement ou alignement orthodontique.
- Autres, spécifiez :

Date:

a	a	a	a	/	m	m	/	j	j	j	j

Code d'identification:

--	--	--	--	--	--	--	--

ÉVALUATION DE L'ÉTAT PARODONTAL

S'il vous plaît répondez aux questions suivantes.

27. **Est ce qu'un dentiste ou un hygiéniste dentaire vous a déjà dit que vous aviez une maladie des gencives?**

Oui Non

27. a. **Si oui, quand?**

Entre 20-34 ans Entre 35-49 ans

Entre 50-64 ans ≥65 ans

28. **Vos gencives saignent-elles habituellement?**

Oui Non

28. a. **Si oui, quand saignent-elles habituellement ? (Veuillez vérifier les situations suivantes)**

	Oui	Non
Lors du brossage	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Lors de l'utilisation du fil inter dentaire	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Lorsque vous mangez	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Spontanément	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

28. b. **Si oui, quand ont-elles commencé à saigner ?**

Entre 20-34 ans Entre 35-49 ans

Entre 50-64 ans ≥65 ans

29. **29. Est ce qu'un dentiste ou un hygiéniste dentaire vous a déjà dit que vous aviez une « poche parodontale profonde »?**

Oui Non

29. a. **Si oui, quand?**

Entre 20-34 ans Entre 35-49 ans

Entre 50-64 ans ≥65 ans

30. **Avez-vous eu une maladie parodontale avec perte d'os?**

Oui Non

30. a. **Si oui, quand?**

Entre 20-34 ans Entre 35-49 ans

Entre 50-64 ans ≥65 ans

Date:

a	a	a	a	/	m	m	/	j	j											

Code d'identification:

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

31. Est ce que certaines de vos dents sont mobiles ou instables ?

Oui Non

31. a. Si oui, depuis quand?

Entre 20-34 ans Entre 35-49 ans

Entre 50-64 ans ≥65 ans

32. Pouvez-vous voir d'avantage les racines de vos dents maintenant que dans le passé?

Oui Non

33. Vous a-t-on dit que vous aviez besoin d'un traitement parodontal ou gingival ?

Oui Non

33. a. Si oui, quand?

Entre 20-34 ans Entre 35-49 ans

Entre 50-64 ans ≥65 ans

34. Avez-vous déjà eu une chirurgie gingivale ou parodontale?

Oui Non

34. a. Si oui, quel type de chirurgie et quand?

	Entre 20-34 ans	Entre 35-49 ans	Entre 50-64 ans	≥ 65 ans
Grefe gingivale	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Curetage parodontal	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Implants	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Autres, veuillez spécifier :	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

35. Quand était votre dernière visite dentaire ?

0-6 mois 6-12 mois plus de 12 mois

36. Y-a-t-il quelque chose à rajouter à propos de votre santé bucco-dentaire dont on ne vous a pas interrogé ?

Oui Non

36. a. Si oui, l'interviewer pourrait l'écrire ici :

6. Questionnaire sur la diète

QUESTIONNAIRE SUR LA DIETE

Ce questionnaire concerne vos habitudes alimentaires durant votre vie.

Les mêmes questions se répètent pour des intervalles d'âge différents: entre 20 et 34 ans, entre 35 et 49 ans, entre 50 et 64 ans et enfin pour 65 et plus.

Dans chaque rangée des tableaux, cochez seulement une case qui correspond le mieux à votre consommation. Prenez en considération les tailles des portions. (Par exemple, si vous avez consommé 3 tasses de lait entier par jour, en moyenne, entre les âges de 20-34, vous devez cocher la case qui dit 2-3 pour jour.)

Poids et mesures: 355 ml = 12 oz
1 tasse = 250 ml = 8 oz
 $\frac{3}{4}$ tasse = 190 ml = 6 oz
 $\frac{1}{2}$ tasse = 125 ml = 4 oz
180-240 g = 6-8 oz
50 g = 1 $\frac{1}{2}$ oz
35 g = 1 $\frac{1}{4}$ oz
30 g = 1 oz

7.

Nous avons annexé seulement les 3 premières pages du questionnaire, puisque les mêmes questions se répètent ensuite pour les périodes d'âge suivantes (35-49 ans, 50-64 ans, et 65 et plus)

ALIMENTS /SUPPLEMENTS ET QUANTITÉS	Consommation moyenne quand vous aviez 20 à 34 ans									
	Par jour				Par semaine			Par mois	Presque jamais	Jamais
	6+	4-6	2-3	1	5-6	2-4	1	1-3		
Produits Laitiers										
Lait écrémé ou à faible teneur en matières grasses (1 tasse)										
Lait entier ou lait à 2% (encerclez un) (1 tasse)										
Yaourt (¾ tasse)										
Crème glacée (½ tasse)										
Fromage blanc (= cottage) (½ tasse)										
Fromage à pâte dure (= hard cheese), nature ou en plat (30g)										
Margarine (1 cuillère à soupe ajoutée aux aliments ou au pain)										
Beurre (1 cuillère à soupe ajoutée aux aliments ou au pain)										
Fruits										
Pommes ou poires fraîches (1 moyenne)										
Oranges (1 moyenne)										
Orange ou jus de pamplemousse (½ tasse)										
Pêches, abricots, prunes fraîches (séchées ou en boîte) (½ tasse)										
Bananes (1 moyenne)										
Autres fruits frais ou (½ tasse) en conserve										
Légumes										
Haricots verts (½ tasse)										
Brocoli (½ tasse)										
Chou cabus, chou-fleur or chou de Bruxelles (½ tasse)										
Carottes (entières ou ½ tasse cuites)										
Mais (épi ou ½ tasse)										
épinards ou autres légumes verts (½ tasse)										
Petits pois, fèves d'haricots frais, congelés ou en boîte (½ tasse)										
Courge jaune (d'hiver) (½ tasse)										
Patates douces (½ tasse)										
Fèves ou des lentilles, séchées (½ tasse)										
Tomates (1) ou jus de tomate (½ tasse)										

ALIMENTS /SUPPLEMENTS ET QUANTITÉS	Consommation moyenne quand vous aviez 20 à 34 ans									
	Par jour				Par semaine			Par mois	Presque jamais	Jamais
	6+	4-6	2-3	1	5-6	2-4	1	1-3		
Viandes										
Poulet, sans peau (180-240g)										
Poulet, avec peau (180-240g)										
Hamburgers (1)										
Hot dogs (1)										
Viandes transformées (saucisse, salami, Bologne, etc.) (morceau ou tranche)										
Bacon (2 tranches)										
Bœuf, porc or agneau en sandwich ou plat mélangé (ragoût, cocotte, lasagne, etc.) (180-240g)										
Bœuf, porc or agneau comme plat principal (steak, rôti, jambon, etc.) (180-240g)										
poisson (180-240g)										
œufs (1)										
Bonbons, Viennoiseries, Céréales										
Chocolat (30g)										
Friandises sans chocolat (30g)										
Tarte, fait maison (tranche)										
Tarte, déjà préparée (tranche)										
Gâteau (tranche)										
Biscuits (1)										
Céréales déjeuner froid (½ tasse)										
Pain blanc (tranche)										
Pain complet ou à grains entiers (tranche)										
Divers										
Beurre d'arachides (cuillère à soupe)										
Chips de maïs ou de pommes de terre (petit sac ou 30g)										
Patates frites (½ tasse)										
Noix (30g)										

ALIMENTS /SUPPLEMENTS ET QUANTITÉS	Consommation moyenne quand vous aviez 20 à 34 ans									
	Par jour				Par semaine			Par mois	Presque jamais	Jamais
	6+	4-6	2-3	1	5-6	2-4	1	1-3		
Pommes de terre, purée (½ tasse) ou au four (1)										
Riz ou pâtes (½ tasse)										
Café, non décaféiné (1 tasse)										
Thé (1 tasse)										
Bière (bouteille ou canette de 355 ml)										
Vin (180 ml)										
Liqueur (whiskey, gin, etc.) (50 ml)										
Coca Cola, Pepsi ou autres cola (250 ml)										
Boisson gazeuse faible en calorie (250 ml)										
Autres boissons gazeuses (root beer, soda au gingembre 7-Up, etc.) (250 ml)										
Punch saveur de fruit ou boissons non gazeuses (8 oz / 250 ml)										
Aliments frits à la maison tout genre (portions)										
Édulcorant artificiel (sachet, comprimé, cuillère à soupe etc.)										
Vitamines										
Multivitamines										
Vitamine A										
Vitamine C										
Vitamine D										
Vitamine E										
Acide folique										

Quand vous aviez 20 à 34 ans Avez-vous utilisé un four à micro-ondes (pendant ce temps)? Non oui
 Combien de fois avez-vous mangé du foie (portion 90-120g) ? 1 par semaine 2-3 par mois 1 par mois ou moins jamais
 Qu'avez-vous fait avec le gras visible sur votre viande? Mangé la plupart mangé une partie mangé le moins possible
 Quel gras utilisiez-vous pour la cuisson à ce moment? Lard ou beurre huile végétale graisse végétale margarine
 Quel gras utilisiez-vous pour la friture à ce moment? Lard ou beurre huile végétale graisse végétale margarine
 Suiviez-vous une diète spéciale à ce moment? Non oui; si oui pendant ____ans type de diète_____
 Selon quelle forme utilisiez-vous votre margarine à ce moment? forme de bâton forme de tube

ColDent
 Willet Version auto-adm; Révisée 27 avril 2012

8. Questionnaire sur l'activité physique totale de la vie

Date:

				/			/		
a	a	a	a		m	m		j	j

Code d'identification:

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

QUESTIONNAIRE SUR L'ACTIVITÉ PHYSIQUE TOTALE DURANT VOTRE VIE

Ce questionnaire porte sur les habitudes d'activité physique au cours de votre vie, plus précisément, les emplois, les tâches ménagères et les activités récréatives.

1. EMPLOIS ET ACTIVITÉS BÉNÉVOLES :

*Dans chacune des rangées du tableau ci-dessous, veuillez noter tout emploi que vous avez occupé durant votre vie, pour **au moins 8 heures par semaine pendant 4 mois de l'année (128 heures au total par an, soit 2.5 heures par semaine pendant une année)**, à partir de votre premier emploi.*

Pour chacun de ces emplois, nous vous prions de remplir les cases concernant le titre de l'emploi, la description (rémunéré ou bénévole), l'âge où vous avez commencé et l'âge où vous avez cessé d'occuper cet emploi. Nous voulons aussi savoir le nombre de mois par année, jours par semaine et heures par jour que vous avez travaillé pour chacun des emplois. Pour la question sur l'intensité de l'activité physique que vous aviez dû effectuer pour chaque emploi, nous vous invitons à choisir une intensité parmi ces 4 classes :

Intensité 1 = Emplois qui exigent seulement une position assise avec un minimum de marche.

Intensité 2 = Emplois qui exigent un minimum d'effort physique, comme la position debout et la marche lente. Il n'ya pas d'augmentation de la fréquence cardiaque et pas de transpiration non plus.

Intensité 3 = Emplois qui nécessitent le transport de charges légères et la marche continue. Ces activités augmentent légèrement le rythme cardiaque et entraînent une légère transpiration.

Intensité 4 = Emplois qui exigent le port de charges lourdes, la marche rapide et l'escalade. Ces emplois augmentent considérablement le rythme cardiaque et entraînent une transpiration abondante.

DOSSIER DES ACTIVITÉS PROFESSIONNELLES ET BÉNÉVOLES DE VOTRE VIE

No. des rangées _____

Remplissez autant de rangées dont vous avez besoin.

No.	Titre de l'emploi	Description de l'activité professionnelle	Âge de début d'activité	Âge de fin d'activité	Nbre de mois/an.	Nbre de jours/sem.	Nombre d'heures par jour		Intensité de l'activité (1,2,3,4)	Avez-vous déjà marché, vélo, patins à roulettes, ou courir à cet emploi?	Lesquels avez-vous fait normalement? (Cochez tout ce qui s'applique.)	Temps passé pour se rendre au travail en marche, vélo, patins ou course			
							Hr	Min				No. de mois/an.	No. de jours/sem.	Heure /Jour	
														Hr	min
1	<input type="radio"/> Bénévole <input type="radio"/> Rémunéré	<input type="radio"/> 1 <input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3 <input type="radio"/> 4	¹ <input type="radio"/> oui ² <input type="radio"/> non (passez à l'emploi suivant)	¹ <input type="radio"/> marche ² <input type="radio"/> bicyclette ³ <input type="radio"/> patin à roulettes ⁴ <input type="radio"/> courir ⁵ <input type="radio"/> autre
2	<input type="radio"/> Bénévole <input type="radio"/> Rémunéré	<input type="radio"/> 1 <input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3 <input type="radio"/> 4	¹ <input type="radio"/> oui ² <input type="radio"/> non (passez à l'emploi suivant)	¹ <input type="radio"/> marche ² <input type="radio"/> bicyclette ³ <input type="radio"/> patin à roulettes ⁴ <input type="radio"/> courir ⁵ <input type="radio"/> autre
3	<input type="radio"/> Bénévole <input type="radio"/> Rémunéré	<input type="radio"/> 1 <input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3 <input type="radio"/> 4	¹ <input type="radio"/> oui ² <input type="radio"/> non (passez à l'emploi suivant)	¹ <input type="radio"/> marche ² <input type="radio"/> bicyclette ³ <input type="radio"/> patin à roulettes ⁴ <input type="radio"/> courir ⁵ <input type="radio"/> autre

2. ACTIVITÉS MÉNAGÈRES

Maintenant, veuillez nous informer sur vos habitudes de ménage et vos activités de jardinage durant votre vie. Commencez par votre première activité dans le passé, puis continuez jusqu'à présent. S'il vous plaît indiquez, uniquement les activités que vous avez fait au moins 7 heures par semaine pendant 4 mois de l'année (112 heures au total par année ou 2h15min par semaine et par an).

Pour vous aider, pensez à une journée ou une semaine qui étaient typiques pour vous. Puis pensez à combien d'heures de ménage, jardinage, travail dans la cour, ou travail autour de votre maison que vous avez fait dans une journée typique ou par semaine. Pour les activités saisonnières, comme le jardinage, vous pouvez les indiquer séparément de toutes les autres activités ménagères qui sont faites tout au long de l'année. Les activités assises (comme la couture ou le paiement de factures) ne sont pas incluses. La garde d'enfants et le ménage sont inclus.

Pour chacune des activités, veuillez choisir une intensité parmi les trois catégories citées ci-dessous :

- **Catégorie 2** : Activités qui exigent peu d'effort physique, comme les activités qui sont effectuées debout ou avec une marche lente.
- **Catégorie 3** : Activités qui ne sont pas épuisants, qui augmentent légèrement le rythme cardiaque et peut entraîner une transpiration légère.
- **Catégorie 4** : Activités qui augmentent le rythme cardiaque et provoquent une transpiration abondante. Ces activités comprennent celles qui nécessitent de soulever ou déplacer des objets lourds ou frotter vigoureusement, pendant des périodes assez longues.

(Vous pouvez mettre plus d'un choix pour la même activité, par exemple : le jardinage pourrait être de 1 heure à l'intensité 2 et 2 heures à l'intensité 3):

DOSSIER À VIE DES ACTIVITÉS MÉNAGÈRES

No. des rangées _____ Remplissez autant de rangées dont vous avez besoin.

	Activités	Âge du début	Âge de la fin	Nombre de mois / année	Nombre de semaines /mois	Nombre de jours/ semaine	Fois par jour Hrs. Mins		Heures par jour passées à des activités qui étaient dans la catégorie:		
									2	3	4
1
2
3
4
5
6

3. EXERCISES ET ACTIVITÉS SPORTIVES

Maintenant, nous voudrions savoir tous vos exercices ou activités sportives, durant votre vie, partant de votre enfance jusqu'à présent. Indiquez seulement les activités que vous avez faites au moins 2 heures par semaine pendant 4 mois de l'année (32 heures au total par an ou 40 minutes par semaine et par an).

Veillez citer les exercices et activités sportives que vous avez faits au moins 10 fois au cours de votre vie. A part les sports et l'exercice physique, nous aimerions aussi savoir si vous marchiez, faisiez du vélo, courriez ou faisiez du patin à roulettes pour vous rendre à l'école. Si tel est le cas, veuillez alors le citer parmi vos activités sportives. Vous pouvez commencer par les activités que vous avez faites pendant vos années d'études, y compris vos cours d'éducation physique (gymnase).

Pour chacune de vos activités physiques, choisissez une intensité parmi ces 3 catégories :

- Catégorie 2 = Activités qui exigent peu d'effort physique.
- Catégorie 3 = Activités qui ne sont pas épuisants, qui augmentent légèrement le rythme cardiaque et peuvent entraîner une légère transpiration.
- Catégorie 4 = Activités qui augmentent le rythme cardiaque et provoquent une transpiration abondante.

DOSSIER À VIE DES ACTIVITÉS SPORTIVES & EXERCISE

No. des rangées _____ Remplissez autant de rangées dont vous avez besoin.

No.	Description de l'exercice / activité sportive	Code (ne rien écrire ici)	Âge de début	Âge de la fin	Nombre de mois/année	Nombre de semaines/année	Nombre de jours/semaine	Temps par activité		Intensité (2,3,4)
								Hrs	Mins	
1	<input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3 <input type="radio"/> 4
2	<input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3 <input type="radio"/> 4
3	<input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3 <input type="radio"/> 4
4	<input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3 <input type="radio"/> 4
5	<input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3 <input type="radio"/> 4
6	<input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3 <input type="radio"/> 4

Annexe 2. Newcastle Ottawa Scale pour l'évaluation de la qualité des études cas-témoins

NEWCASTLE - OTTAWA QUALITY ASSESSMENT SCALE CASE CONTROL STUDIES

Note: A study can be awarded a maximum of one star for each numbered item within the Selection and Exposure categories. A maximum of two stars can be given for Comparability.

Selection

- 1) Is the case definition adequate?
 - a) yes, with independent validation ✳
 - b) yes, eg record linkage or based on self reports
 - c) no description
- 2) Representativeness of the cases
 - a) consecutive or obviously representative series of cases ✳
 - b) potential for selection biases or not stated
- 3) Selection of Controls
 - a) community controls ✳
 - b) hospital controls
 - c) no description
- 4) Definition of Controls
 - a) no history of disease (endpoint) ✳
 - b) no description of source

Comparability

- 1) Comparability of cases and controls on the basis of the design or analysis
 - a) study controls for _____ (Select the most important factor.) ✳
 - b) study controls for any additional factor ✳ (This criteria could be modified to indicate specific control for a second important factor.)

Exposure

- 1) Ascertainment of exposure
 - a) secure record (eg surgical records) ✳
 - b) structured interview where blind to case/control status ✳
 - c) interview not blinded to case/control status
 - d) written self report or medical record only
 - e) no description
- 2) Same method of ascertainment for cases and controls
 - a) yes ✳
 - b) no
- 3) Non-Response rate
 - a) same rate for both groups ✳
 - b) non respondents described
 - c) rate different and no designation

Annexe 3. Article 1

Cancer Causes & Control
https://doi.org/10.1007/s10552-021-01541-y

ORIGINAL PAPER



Periodontal disease as a risk factor for sporadic colorectal cancer: results from COLDENT study

Amal Idrissi Janati¹ · Igor Karp² · Jean-François Latulippe³ · Patrick Charlebois⁴ · Elham Emami⁵

Received: 2 July 2021 / Accepted: 14 December 2021
© The Author(s) 2021

Abstract

Colorectal cancer remains the top leading cancer worldwide. Accumulating evidence suggests periodontal pathogens are involved in colorectal carcinogenesis, indicating the need for high-quality epidemiological evidence linking periodontal disease (PD) and colorectal cancer (CRC). Thus, we conducted the first population-based case–control study that was specifically designed to investigate the association between compromised oral health and sporadic CRC. A total of 348 incident cases of colon or rectal cancer, and 310 age and sex frequency-matched controls, from the Montreal island and Laval population participated in the study. Data were collected on PD and on several CRC risk factors using validated questionnaires. A life-course approach was used to document long-term history regarding lifestyle factors. Multivariable unconditional logistic regression analysis was used to estimate the rate ratio (RR) quantifying the association between CRC and PD. Results showed that the rate of new diagnosis of CRC in persons with a positive history of PD was 1.45 times higher than in those with a negative history of PD adjusting for age, sex, BMI, education, income, diabetes, family history of CRC, regular use of non-steroidal anti-inflammatory drugs, lifetime cumulative smoking, lifetime consumption of red meats, processed meats, and alcoholic drinks, and lifetime total physical activity score (adjusted RR = 1.45; 95% CI 1.04–2.01; $p=0.026$). Our results support the hypothesis of an association between PD and sporadic CRC risk.

Keywords Periodontal disease · Periodontitis · Gingivitis · Colorectal cancer

Abbreviations

BMI	Body mass index	FFQ	Food Frequency Questionnaire
CDC-AAP	Centers for Disease Control and Prevention and the American Academy of Periodontology	LTPAQ	Lifetime Total Physical Activity Questionnaire
CI	Confidence interval	MET	Metabolic-equivalent of task
CRC	Colorectal cancer	NA-NSAIDs	Non-aspirin non-steroidal anti-inflammatory drugs
		NSAIDs	Non-steroidal anti-inflammatory drugs
		PD	Periodontal disease
		RR	Rate ratio
		RRa	Adjusted rate ratio

✉ Elham Emami
elham.emami@mcgill.ca

¹ Faculty of Dentistry, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada

² Department of Epidemiology and Biostatistics, Schulich School of Medicine and Dentistry, University of Western Ontario, London, ON, Canada

³ Department of Surgery, Hospital Maisonneuve-Rosemont, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada

⁴ Department of Surgery, McGill University Health Centre, Montreal, QC, Canada

⁵ Faculty of Dental Medicine and Oral Health Sciences, McGill University, 2001 McGill College Avenue, Suite 500, Montreal, QC H3A 1G1, Canada

Background

Colorectal cancer (CRC) is the third most commonly diagnosed cancer and the second cause of death from cancer worldwide, with over 1,900,000 new cases and over 900,000 deaths in 2020 (Global Cancer Observatory-World Health Organization) [1]. While CRC can develop in inflammatory bowel diseases or hereditary syndromes, most CRC cases are sporadic [2]. Many factors are associated with sporadic CRC, including higher age, male sex,

low socioeconomic status, diabetes mellitus, high adiposity, history of CRC in first-degree relatives, tobacco smoking, high consumption of red and processed meat, and heavy intake of alcohol [3–9]. On the other hand, physical activity and use of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) decrease the risk of CRC [10–12].

In recent years, studies have suggested that periodontal disease (PD) may increase the risk of CRC. PD is a chronic inflammatory disease, caused by dysbiosis in plaque biofilms, and characterized by progressive destruction of the tooth-supporting tissues [13]. PDs include gingivitis, which refers to gingival inflammation caused by bacteria accumulating in the gingival margin, and periodontitis, where the breakdown of teeth-supporting tissues occurs [14]. The disease manifests in gingival bleeding, clinical attachment loss and radiographically assessed alveolar bone loss, and presence of periodontal pockets. Severity and extent of clinical manifestations increase with disease progression and can reach a high level of tooth mobility and, ultimately, tooth loss in advanced stages [13]. Beyond oral health, PD seems to also impact some extra-oral health outcomes and has been found to be associated with major systemic diseases, including cardiovascular, respiratory, chronic kidney, and metabolic diseases, adverse pregnancy outcomes, rheumatoid arthritis, and cancers [15]. The putative mechanism of PD and cancer association involves the spread of periodontal pathogens to extra-oral sites, dissemination of bacteria endotoxins, and release of inflammation products directly into the bloodstream. Chronic inflammation, on the other hand, promotes carcinogenesis by induction of gene mutations, inhibition of apoptosis, stimulation of angiogenesis, cell proliferation, and epigenetic alterations [16, 17]. PD has been linked to gastrointestinal cancers, but the strength of evidence differs across cancer sites [18]. To date, several papers have been published on the association of CRC and PD [19–27], all of which relied on secondary analysis of data from studies that had been designed for other purposes. These papers suffer from various methodological limitations including, notably, misclassification of PD status and other relevant characteristics, residual confounding [28], and the low number of documented CRC cases. As a result, the etiologic role of PD in the occurrence of CRC remains uncertain. Thus, to better assess the possible etiologic role of PD in the occurrence of CRC, valid and reproducible epidemiological evidence is needed.

Objective

The objective of this study was to investigate whether PD increases the risk of sporadic CRC.

Methods

Study design

COLDENT study is a “population-based” case–control study that was carried out in the Montreal metropolitan area (Montreal island and Laval), Quebec, from January 2013 to December 2019. The CRC cases were instances of histologically confirmed colon or rectal cancer diagnosed in the 6 months preceding their identification. CRC case identification relied on the assistance of medical staff in surgery and oncology departments of five main hospitals providing CRC care to residents of Montreal island and Laval. The control series was selected by random sampling of age- and sex-based strata of the population of Montreal island and Laval by relying on the Quebec Electoral Office lists during 2013–2019. Specifically, a control-to-case ratio of approximately 1:1 was aimed at across the strata defined by age (within 10 year categories) and sex. The identified/selected subjects were sent the study introductory letter and received a phone call from research staff in the following week. Several callbacks were made for non-responding numbers. The inclusion criteria for both cases and controls were as follows: (1) aged 40–80 years old; (2) resident of Montreal island or Laval; (3) Canadian citizen; (4) speak English and/or French; (5) no prior diagnosis of cancer; and (6) no prior diagnosis of an inflammatory or a hereditary bowel disease, including Lynch syndrome, hereditary non-polyposis colorectal cancer, familial adenomatous polyposis, and related polyposis. Eligible respondents who agreed to participate in the study were invited to complete a multi-item study questionnaire in either a face-to-face or phone interview. If an eligible responder was unable to attend the interview, the questionnaire was offered for self-administration. In that case, the participant was instructed on questionnaire completion and was called back by research staff upon receipt of the completed questionnaire. Face-to-face interviews were carried out in research units, at the participant’s home, or in hospitals for CRC patients.

The study was approved by the Research Ethics Committees of all participating institutions, and all study participants were given all the information needed before they signed the study consent form.

Data collection

Data on PD were collected using eight validated questions that address three categories of information on the subject’s periodontal condition: history of diagnosis or treatment of PD; symptoms or complications of PD; and

Table 1 Questions on self-reported periodontal disease

History of professional diagnosis of periodontal disease:		
1. Has a dentist or dental hygienist ever told you that you had gum disease?	<input type="checkbox"/> Yes	<input type="checkbox"/> No
2. Has a dentist or dental hygienist ever told you that you had “deep pockets”?	<input type="checkbox"/> Yes	<input type="checkbox"/> No
3. Have you ever been told that you needed periodontal or gum treatments?	<input type="checkbox"/> Yes	<input type="checkbox"/> No
4. Have you ever had periodontal (gum) surgery?	<input type="checkbox"/> Yes	<input type="checkbox"/> No
<input type="checkbox"/> Surgical curettage (Other answer choices were not considered in defining PD)		
Symptoms or complications of periodontal disease:		
5. Do your gums usually bleed?	<input type="checkbox"/> Yes	<input type="checkbox"/> No
6. Are any of your teeth loose or wobbly?	<input type="checkbox"/> Yes	<input type="checkbox"/> No
7. If you have any missing teeth, please indicate the reasons for their loss (check all that apply):		
<input type="checkbox"/> Periodontal disease <input type="checkbox"/> The tooth or the teeth were very wobbly (Other answer choices were not considered in defining PD)		
Self-awareness of periodontal disease:		
8. Have you ever had periodontal disease with bone loss?	<input type="checkbox"/> Yes	<input type="checkbox"/> No

self-awareness of PD [29, 30] (see Table 1). For each category of information, questions with the highest diagnostic performance indicators were selected, based on results of a previous systematic review by Blicher [30] on validity of self-reported periodontal disease measurements. In a more recent systematic review with meta-analysis, by Abbood [29], on self-reported PD, the estimated pooled diagnostic odds ratios (95% CI) of moderate PD by the questions on previous treatment of PD (deep cleaning); tooth mobility without injury; gum bleeding; and self-awareness of having gum disease were 2.38 (1.35–4.2), 6.99 (3.17–15.43), 1.40 (0.91–2.16), and 3.20 (2.23–4.57), respectively, and 11.72 (4.12–33.36), 2.24 (1.05–4.80), 1.95 (1.25–3.03), and 3.35 (2.17–5.18), respectively, for severe PD [29]. Moderate and severe PD were defined based on the gold standard PD case definition by the Centers for Disease Control and Prevention and the American Academy of Periodontology (CDC-AAP) [31].

Further, seven study-questionnaires were administered: Sociodemographic and Medical History, Smoking, Height and Weight, Anti-inflammatory Medications, Oral Health, Food Frequency (FFQ), and Lifetime Total Physical Activity (LTPAQ) questionnaires [32–36]. Through administration of these questionnaires, we collected data on history of cigarette smoking, including age started, age ended, years quit during period of usage, and intensity (number of cigarettes smoked per day, per week, or per month). Participants were asked to report all occupational, household, and recreational activities they had done in their lifetime. The minimum threshold for an activity to be reported in the LTPAQ is

124 h/year for occupational, 112 h/year for household, and 32 weeks/year for recreational activities [37]. Each activity was described in terms of duration (age started and age ended), frequency (number of hours per week, weeks per month, and months per year of activity practice), and intensity: light, moderate, and vigorous. Weak intensity was only used for occupational activities to describe those that require sitting with minimal walking.

For dietary risk factors, data were collected on intake of different kinds of red meats and processed meats and of different alcoholic beverages since adulthood. Specifically, red meats referred to meat in hamburgers, beef, pork, and lamb; processed meats referred to bacon, hot dogs, or other kinds of processed meats as salami, bologna, and sausages; and alcoholic drinks referred to beer, wine, and liquor. The FFQ was then administered for four age periods: 20–34, 35–49, 50–64, and 65–80 years. Interviewers relied on the lifetime grid technique to enhance recall accuracy [38].

Coding of data on periodontal disease and covariates

Subjects were classified as having a positive history of PD if they reported previous professional diagnosis or treatment of PD, and/or if they had experienced either frequent gingival bleeding, or tooth loss caused by tooth mobility or PD, and/or if they were self-aware of having PD. Periodontal health status of participants who answered Yes to only question 6 about tooth mobility (see questions in Table 1) was considered as unknown since tooth mobility could also be caused

by an occlusal trauma in a healthy periodontium. Participants were considered as “unexposed” to PD if none of the responses they provided to the 8 questions was positive.

Covariates for adjustment included age, gender, education attainment (elementary school vs. high school and \geq college), annual personal income, body mass index (BMI), history of type II diabetes, history of CRC in first-degree relatives, history of regular use of NSAIDs (Yes/No), lifetime measure of cigarette smoking (as quantified by packs-years), lifetime measures of consumption of red meats, processed meats, and alcohol, as well as lifetime cumulative physical activity score.

Regular use of NSAIDs was defined as use of at least one tablet/capsule of NSAIDs per month for six continuous months or longer, of aspirin and non-aspirin NSAIDs (NA-NSAIDs). The number of packs-years was calculated as the product of the number of cigarettes smoked per day divided by 20 and the number of years smoked. Lifetime measures of consumption of red meats, processed meats, and alcoholic drinks were calculated as the average number of consumed weekly servings for red and processed meats, and of daily drinks for alcohol, since the participant was 20 years old.

Lifetime physical activity score was represented by the average amount of total energy expended during occupational, recreational, and household activities, expressed by metabolic-equivalent of task (MET) in MET-hour/week/year [37, 39–41]. For this, we assigned MET values to the intensity of physical activities: weak as 1.5, light as 2.5, moderate as 4, and vigorous as 8. To consider both the effects of duration and intensity, each activity was converted into energy expended by multiplying its assigned MET value with the reported hours spent in the activity per year, and the number of years the activity lasted. All subject activities were then summed to derive subject lifetime cumulative energy expended in MET-hours-years. This cumulative measure was then divided by the individual’s age (in years) and by 52 (i.e., the number of weeks in a year) to derive physical activity scores in MET-hour/week/year.

Statistical analysis

The distributions of potential confounders in the case and control series were examined by calculating the median and inter-quartile range for continuous variables, and percentage for categorical variables.

We fitted multivariable unconditional logistic regression models to estimate the rate ratio (RR) quantifying the association between CRC and PD. Specifically, in the multivariable models, the RR was adjusted for the matching variables (age and sex) and for all the other potential confounders, namely, education attainment, annual personal income, BMI, history of type II diabetes, history of CRC in first-degree relatives, history of regular use of aspirin and NA-NSAIDs,

lifetime measure of cigarette smoking, lifetime measure of consumption of red meats, lifetime measure of consumption of processed meats, lifetime measure of consumption of alcohol, and lifetime cumulative physical activity score. The linearity in the logit was assessed for all continuous independent variables, namely age, BMI, annual personal income, lifetime measure of consumption of red meats, processed meats, and alcoholic drinks, and lifetime physical activity score, using the Box-Tidwell test, which involves adding simultaneously interaction terms of each continuous variable and its natural logarithm (X_i multiplied by $\ln(X_i)$) to the multivariable regression model [42]. The test revealed that none of the interaction terms involving the above-mentioned continuous covariates was statistically significant at the alpha level of 0.05.

The percentages for missing data for each variable were less than 10%, except for regular use of aspirin (23%), which was absent from the NSAID questionnaire during the first year of the study (see Supplementary Table S1). Missing data were addressed with the multiple imputation method using the Expectation–Maximization with Bootstrapping algorithm [43]: 10 complete datasets were generated to produce pooled “final” RR estimates along with their corresponding 95% confidence intervals (CIs). To improve performance of the imputation algorithm, auxiliary variables were included for imputation, in addition to all the variables included in the “associational” models. Continuous variables with asymmetric distribution, or extreme values, as for cumulative cigarette smoking, lifetime measures of consumption of red meats, processed meats, and alcoholic drinks, were log-transformed ($\text{Log}_{10}(X_i)$ or $\text{Log}_{10}(X_i + 1)$) before imputation. Imputed values of continuous variables were restricted to the observed minimum and maximum values. Imputation was done respecting the scale of each variable (i.e., continuous, ordinal, or categorical) with the Amelia II package in R, version 3.5.3 [44].

Results

A total of 1040 potentially eligible cases of CRC were identified from the five participating hospitals. We approached 972 patients, of whom 483 did not meet the study eligibility criteria, mainly because of their residence area ($n = 109$), previous diagnosis of cancer ($n = 105$), long time since CRC diagnosis ($n = 93$), age ($n = 89$), and language criteria ($n = 56$). Twenty-nine were not able to participate (16 were too ill or too busy because of their cancer treatments, eight had a cognitive or mental illness, five died between the time of their identification and the time when we attempted to reach them or meet for an interview), and 112 refused to participate. Thus, 348 CRC patients took part in the study. During the same period, 1346 CRC-free controls were sent

the introduction letter. We were unable to reach 450 subjects, including 119 subjects whose contact details (address and/or phone number) had changed, and five subjects who had died between the time of their selection and the time when we attempted to reach them. Among 896 subjects who were reached, 186 did not meet the study eligibility criteria (mostly because of a previous cancer ($n=79$), and not speaking French or English ($n=52$)), five subjects were unable to participate because of a cognitive condition, and 395 refused to participate. Thus, 310 control subjects took part in the study (see flow chart in Fig. 1).

Table 2 presents the distributions of the CRC cases and controls (both overall and according to their PD-history status) according to sociodemographic and other relevant characteristics. Regarding sociodemographic and anthropometric characteristics, cases and controls showed similar mean age (63 years old) and BMI (26 kg/m^2), and similar relative frequencies of lifestyle and family history of CRC in first-degree relatives. However, the case series showed higher relative frequencies of male gender, elementary and high school education, and history of type II diabetes. Further, the median personal income in the cases was lower than in the controls. The relative frequency of regular use of aspirin was higher in the cases than in the controls, while the relative frequency of regular use of NA-NSAIDs was lower in the

cases than in the controls. Considering assessed behavioral CRC risk factors in lifetime, the cases showed a higher proportion of smokers, higher average number of packs-years, higher level of intake of processed meats, and higher average MET-hour/week/year scores in their occupational activities.

The prevalence of PD, including gingivitis and periodontitis, was higher in the case group (46%) than in the control group (38%). Overall, cases were more likely to report previous diagnosis or a symptom of PD, or to be aware of having PD with bone loss, than controls. The complication of advanced PD, tooth loss due to mobility or PD, was less frequent (8% in cases and 4.8% in controls).

Results from multiple logistic regression analysis showed that the rate of (new diagnosis of) CRC in persons with a positive history of PD was 1.4 times higher than in those with a negative history of PD when adjusting only for age and gender (adjusted rate ratio (RR_a) = 1.4; 95% CI 1.02–1.91; $p=0.037$) and 1.45 times higher than in those with a negative history of PD when adjusting, in addition, for BMI, education, income, diabetes, family history of CRC, regular use of aspirin and NA-NSAIDs, lifetime cumulative smoking, lifetime consumption of red meats, processed meats, and alcoholic drinks, and lifetime total physical activity score (RR_a = 1.45; 95% CI 1.04–2.01; $p=0.026$). The results are summarized in Table 3.

Fig. 1 Flow chart of COLD-ENT study recruitment

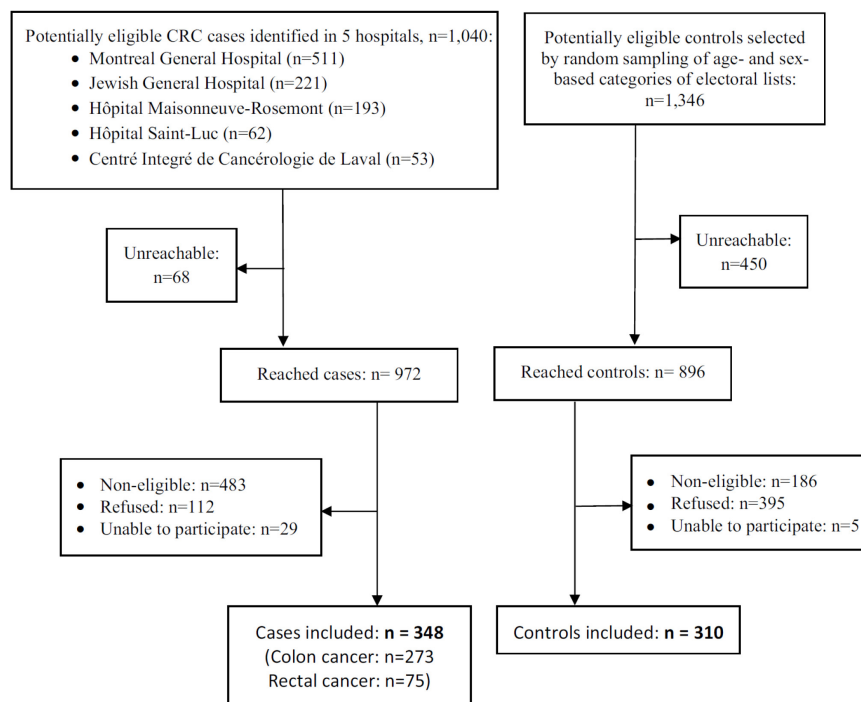


Table 2 Sociodemographic characteristics and CRC risk factors in COLDENT study participants

Characteristic	Cases, <i>n</i> = 348 <i>n</i> (%)	Controls, <i>n</i> = 310 <i>n</i> (%)		
	Total	Total	Positive history of PD (<i>n</i> = 117)	Negative history of PD (<i>n</i> = 183)
Age, years (mean (SD))	63.2 (9.8)	63.1 (9.8)	61.4 (9.6)	63.7 (9.8)
Gender				
Male	215 (62)	170 (55)	66 (56)	98 (54)
Canadian born				
Yes	216 (62)	210 (68)	77 (66)	126 (69)
Native tongue				
French	155 (46)	183 (59)	63 (55)	112 (64)
English	60 (18)	40 (13)	20 (17)	20 (12)
Other language	123 (36)	75 (24)	32 (28)	42 (24)
Education attainment				
Elementary school	29 (9)	9 (3)	4 (3)	5 (3)
High school	116 (34)	92 (30)	36 (31)	53 (30)
College or University	197 (58)	199 (64)	76 (65)	117 (67)
Living alone				
Yes	71 (21)	80 (26)	27 (23)	47 (26)
BMI, kg /m ² (mean (SD))	26.1 (5.7)	26.3 (6.2)	27 (5.7)	27.4 (4.7)
Family history of CRC				
Positive	43 (12)	38 (12)	13 (11)	24 (13)
History of diabetes				
Positive	69 (20)	39 (13)	14 (12)	23 (13)
History of regular use of NA-NSAIDs				
Positive	62 (18)	67 (22)	28 (25)	39 (21)
History of regular use of aspirin				
Positive	85 (27)	50 (26)	16 (21)	33 (30)
Personal income (CAD\$ per year)	35 000 (50 000)	45 000 (40 000)	45 000 (50 000)	45 000 (40 000)
History of cigarette smoking				
Positive	206 (59)	174 (56)	73 (62)	97 (53)
Cigarette smoking, packs-years (Median (IQR))	3.6 (24)	2 (22)	2.2 (17.5)	1.8 (23.5)
Lifetime average daily alcoholic drinks ^a (Median (IQR))	0.4 (1.1)	0.5 (1)	0.4 (0.9)	0.5 (1)
Lifetime average weekly servings ^b of:				
Red meats (Median (IQR))	4.3 (3.5)	4 (3.5)	4.4 (3.5)	3.9 (3.3)
Processed meats (Median (IQR))	2.6 (3.5)	1.8 (3.3)	1.8 (3.2)	1.8 (3.3)
Lifetime average MET hour/week/year (Median (IQR))				
Occupational	60.3 (51.6)	48.7 (40.8)	50.5 (41.5)	46.9 (36.5)
Household	13.4 (27.6)	13.1 (25.1)	12.3 (26)	13.6 (23.7)
Recreational	8 (14)	7.7 (12.8)	8.4 (12.7)	6.5 (11.3)
Total physical activity	95.7 (78.2)	85 (53)	84.8 (44.9)	84.9 (53.6)

The frequencies presented in the table correspond to valid percentages

CRC colorectal cancer, *BMI* body mass index, *NA-NSAIDs* non-aspirin non-steroidal anti-inflammatory drugs, *CAD\$* Canadian dollar, *MET* metabolic equivalent of task, *SD* standard deviation, *IQR* interquartile range

^aOne drink include beer (355 ml bottle or can), wine (180 ml), or liquor (150 ml)

^bOne serving of red meats = 180–240 g, one serving of processed meats = 55 g

Table 3 Rate ratio (RR) for association between periodontal disease and colorectal cancer

	RR (95% CI); <i>p</i> value
Adjusted for age and sex	1.4 (1.02–1.91); <i>p</i> =0.037
Adjusted for all covariates ^a	1.45 (1.04–2.01); <i>p</i> =0.026

^aAge, sex, education attainment, annual personal income, BMI, history of type II diabetes, history of CRC in first-degree relatives, history of regular use of aspirin and non-aspirin non-steroidal anti-inflammatory drugs, lifetime measure of cigarette smoking, lifetime measure of consumption of red meats, lifetime measure of consumption of processed meats, lifetime measure of consumption of alcohol, and lifetime cumulative physical activity score

Discussion

In this case–control study, we investigated the association between PD and CRC, and relied on multiple self-reported measurements to ascertain the PD status. Our findings suggest that the CRC rate is increased in persons with a positive history of PD compared with persons with a negative history of PD, even upon adjustment for a number of potential confounders. Studies that previously examined the association between CRC and self-reported PD [22, 23, 25, 26] assessed PD status with only one question, which was about previous professional diagnosis of PD, among a cohort of American male health professionals and a cohort of elderly women [23, 26]; self-awareness of periodontal bone loss in American women nurses [22]; or a clinical sign of PD (tooth mobility with consequent tooth loss) in a cohort of adult Swedish twins [25]. Unlike those studies, we ascertained self-reported PD exposure using a combination of questions that concerned the three types of information together. Using only one question can be expected to result in PD-status misclassification, especially in persons with lower education or socio-economic level [45]. For example, questions related to professional diagnosis will favor accurate answers in subjects who had more access to dental care. [29, 30] Thus, persons who have not visited a dentist in years may not report any previous diagnosis of PD and will be classified as unexposed, while in fact they could well have the disease, especially given their poorer access to, and lower levels of use of, dental care. According to the Canadian Health Measures Survey 2007–2009, 48% of Canadian adults who have not been to a dental professional in last year had gingivitis, and 48% of Canadian adults from the lower income group had gingivitis, compared with 25% of Canadians with higher incomes [46]. Questions about the most easily perceived clinical signs, such as tooth mobility, or tooth loss caused by mobility, and PD have greater informativeness in detecting PD but may result in failure to detect early stages of the disease, including gingivitis and mild periodontitis. This justifies questioning on gingival bleeding as well. Self-awareness

of one's own PD condition is more informative among educated people and dental or health care users. To conclude, combining different questions—as recommended by Blicher et al. [30] and Abbood et al. [29] in their systematic reviews' conclusions—will enhance the ability of the questions to identify history of PD. Those authors also recommended using variations of the same question in order to stimulate the person's memory; thus, we used different questions to retrieve a previous diagnosis or treatment of PD.

According to our self-reported PD definition, we found that 38% of controls had either gingivitis or periodontitis, and if we refer to those who reported tooth loss because of mobility and PD, we can consider 5% of controls had advanced PD. These statistics seem to be in line with those from the Canadian Health Measures Survey (2007–2009), where partial-mouth periodontal examination was used, and which estimated that 32% of Canadian adults (20–79 years of age) had gingivitis, 21% of adults with natural teeth had, or had had, a moderate or a severe periodontal (gum) problem, and 4% of Canadian adults had severe periodontal disease [46]. According to complete-mouth examination in the National Health and Nutrition Examination Surveys (2009–2014), and the CDC-AAP case definition [31], the estimated prevalence of total periodontitis in dentate US adults aged 30–79 years was 42%, including 8% severe periodontitis.

We found a statistically significant association of CRC with PD ($RR_a = 1.45$; 95% CI 1.04–2.01) ($p = 0.026$), adjusting for a number of potential confounders. Similarly, two previous studies have reported a positive association of CRC with PD. The first is a large retrospective cohort study ($n = 106,487$) based on administrative data from Taiwan's National Health Insurance Research Database [19]. The estimated hazard ratio (HR) (95% CI) was 1.64 (1.50–1.80), adjusting only for age, gender, and comorbidity. PD classification in that study relied on established administrative codes given to clinical diagnosis of gingivitis and periodontitis, and no additional information was provided on any standardized clinical measures or definition of PD. In addition to this, and to the high risk of residual confounding due poor adjustment, using the Insurance Health database was criticized in another report for the significant risk of misclassification due to deliberate over-coding by health and dental care providers to avoid refusal of reimbursement by medical insurance [47]. The results of this study should thus be interpreted with great caution. In the second study, Arora [25] analyzed data from a large Swedish prospective cohort study of homo- and heterozygous twins, which had been originally designed to study the role of environmental and genetic factors in cardiovascular disease and cancer. Their analysis included 15,333 twins who answered the question on periodontal status: "Have you noticed that some of your own teeth have come loose or fallen out on their

own?" Participants were then classified as having PD if at least half of their teeth were wobbly, indicating that PD is at an advanced stage. Participants who reported having a few loose teeth were separately classified as having minor mobility. Almost 6% of participants had advanced PD and an additional 12% of participants reported minor tooth mobility. Participants had a median age at study entry of 51 years and followed-up for a median period of 27 years, with a total of 200 CRC cases documented. Upon adjustment for gender, age, education, employment, number of siblings, smoking status (5 categories counting number of packs per day), smoking status of partner, alcohol status (current, former, never), body mass index (4 categories), and diabetes, the estimated HR (95% CI) was 1.62 (1.13–2.33). Unfortunately, the list of potential confounders adjusted for did not include dietary risk factors and physical activity level. Furthermore, the PD measure in that study excluded gingivitis and early-stage periodontitis.

Different results were reported by Momen-Heravi [22], who analyzed data from the American Nurses' Health Study. The analysis included a subsample of 69,656 participants who were asked if they had a history of periodontal bone loss (in study cycle of 1998). Where the answer was yes, participants indicated the severity of the bone loss (none, mild, moderate/severe). After 18 years of follow-up, a total of 739 CRC was documented for this analysis. Overall, the study results suggested no association between history of periodontal bone loss and CRC (HR = 0.89; 95% CI 0.72–1.10), although they were weakly suggestive of positive association for moderate/severe bone loss and CRC (HR = 1.22; 95% CI 0.91–1.63), adjusting for age, ethnicity, smoking, history of CRC in first-degree relatives, history of sigmoidoscopy/colonoscopy, current physical activity, regular aspirin use, multivitamin use, diabetes, alcohol consumption, BMI, energy-adjusted intake of total calcium, vitamin D, folate, red meat and processed meat, and hormonal replacement therapy). The study indeed has many strengths, such as its prospective design, large sample size, and adjustment for numerous potential confounders.

Results from these epidemiological studies on the association between PD and CRC (or colorectal adenoma [48, 49]) have been synthesized in a recent meta-analysis, by Xuan [50]. Specifically, these authors reported that periodontal disease was statistically significantly associated with colorectal tumor (pooled "relative risk" and 95% CI: 1.25 (1.06–1.38), although there was high heterogeneity across studies ($I_2 = 83.9%$) [50].

The oral cavity can indeed serve as a reservoir for the systemic dissemination of pathogenic bacteria and their toxins, leading to infections and inflammations in distant bodily sites, and several oral species were identified in infections at extra-oral sites [51]. Scannapieco and Panagakos [52] suggested four potential pathways that may allow oral bacteria

and gingival inflammation to influence systemic health, including bacteremia, systemic spread of locally produced inflammatory mediators, eliciting an autoimmune response, and aspiration or ingestion of oral bacteria into the intestine or respiratory tract [52]. As for CRC, a periodontal pathogen, *Fusobacterium nucleatum*, has been particularly involved in CRC tumorigenesis, and its presence in colorectal mucosa and feces has been found to be associated with CRC [53]. The development of CRC is, on the other hand, strongly influenced by the inflammatory condition of the colon, as shown in patients with inflammatory bowel disease, where chronic and severe inflammation of the colon increases their risk of developing CRC [54].

To our knowledge, the COLDENT project was the first epidemiological study specifically designed to assess the association between PD and CRC. In the study we used rigorous methods for documentation of the main exposure, study outcome, and the potential confounding factors. Moreover, we followed a life-course approach to document long-term history regarding lifestyle factors and other relevant characteristics. We also chose to assess PD based on self-reported measures, because they allow easier standardization of the exposure measurements and definition than dental examination, which is sensitive to inter- and intra-examiner variation.

Our results support the hypothesis of an association between PD and sporadic CRC risk. Further epidemiological studies aimed at production of high-quality evidence on the putatively causal relation between PD and CRC occurrence and on the possible mechanisms underlying that relation are recommended.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s10552-021-01541-y>.

Acknowledgements We thank all participants in the COLDENT study, Dr Carole Richard, Dr Nathalie Aucoin, Dr Marylise Boutros, and the late Dr Phillip Gordon, as well as all nurses and administrative staff who helped in study participant identification and recruitment in the participating hospitals: Montreal General Hospital, Jewish General Hospital, Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Hôpital Côte Saint Luc du CHUM, and Centre Intégré de Cancérologie de Laval. We also thank research assistant Mrs Nancy Faraj, and statistician Mr Miguel Chagnon who helped with multiple imputation.

Funding This project was supported by an operating grant from the Cancer Research Society. AIJ was supported by a doctoral scholarship from the Fonds de Recherche du Québec-Santé.

Data availability Data supporting the findings of this study will be available if the institutional review boards accept and upon a request from the corresponding author.

Declarations

Conflict of interest The authors declare no competing interests.

Ethical approval The study was approved by the Research Ethics Committees of all participating institutions, and all study participants were given all the information needed before they signed the study consent form.

Consent for publication Not applicable.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Sung H, Ferlay J, Siegel RL et al (2021) Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 71(3):209–249
- Ponz de Leon M, Percesepe A (2000) Pathogenesis of colorectal cancer. *Dig Liver Dis* 32(9):807–821
- Coughlin SS (2020) Social determinants of colorectal cancer risk, stage, and survival: a systematic review. *Int J Colorectal Dis* 35(6):985–995
- Deng L, Gui Z, Zhao L, Wang J, Shen L (2012) Diabetes mellitus and the incidence of colorectal cancer: an updated systematic review and meta-analysis. *Dig Dis Sci* 57(6):1576–1585
- Ning Y, Wang L, Giovannucci EL (2010) A quantitative analysis of body mass index and colorectal cancer: findings from 56 observational studies. *Obes Rev* 11(1):19–30
- Botteri E, Iodice S, Bagnardi V et al (2008) Smoking and colorectal cancer: a meta-analysis. *JAMA* 300(23):2765–2778
- Händel MN, Rohde JF, Jacobsen R et al (2020) Processed meat intake and incidence of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Eur J Clin Nutr* 74(8):1132–1148
- Smolińska K, Paluszkiwicz P (2010) Risk of colorectal cancer in relation to frequency and total amount of red meat consumption. Systematic review and meta-analysis. *Arch Med Sci* 6(4):605–610
- McNabb S, Harrison TA, Albanes D et al (2020) Meta-analysis of 16 studies of the association of alcohol with colorectal cancer. *Int J Cancer* 146(3):861–873
- Robsahm TE, Aagnes B, Hjartåker A et al (2013) Body mass index, physical activity, and colorectal cancer by anatomical subsites: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Eur J Cancer Prev* 22(6):492–505
- Bosetti C, Santucci C, Gallus S, Martinetti M, La Vecchia C (2020) Aspirin and the risk of colorectal and other digestive tract cancers: an updated meta-analysis through 2019. *Ann Oncol* 31(5):558–568
- Tomić T, Domínguez-López S, Barrios-Rodríguez R (2019) Non-aspirin non-steroidal anti-inflammatory drugs in prevention of colorectal cancer in people aged 40 or older: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Epidemiol* 58:52–62
- Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N et al (2018) Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol* 89(Suppl 1):S173–S182
- Petersen PE, Ogawa H (2012) The global burden of periodontal disease: towards integration with chronic disease prevention and control. *Periodontology* 2000 60(1):15–39
- Nazir MA (2017) Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. *Int J Health Sci (Qasim)* 11(2):72–80
- Castellarin M, Warren RL, Freeman JD et al (2012) *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome Res* 22(2):299–306
- Kraus S, Arber N (2009) Inflammation and colorectal cancer. *Curr Opin Pharmacol* 9(4):405–410
- Zhang Y, Sun C, Song EJ et al (2020) Is periodontitis a risk indicator for gastrointestinal cancers? A meta-analysis of cohort studies. *J Clin Periodontol* 47(2):134–147
- Hu JM, Shen CJ, Chou YC et al (2018) Risk of colorectal cancer in patients with periodontal disease severity: a nationwide, population-based cohort study. *Int J Colorectal Dis* 33(3):349–352
- Mai X, LaMonte MJ, Hovey KM et al (2016) Periodontal disease severity and cancer risk in postmenopausal women: the Buffalo OsteoPerio Study. *Cancer Causes Control* 27(2):217–228
- Michaud DS, Lu J, Peacock-Villada AY et al (2018) Periodontal disease assessed using clinical dental measurements and cancer risk in the ARIC Study. *J Natl Cancer Inst* 110(8):843–854
- Momen-Heravi F, Babic A, Tworoger SS et al (2017) Periodontal disease, tooth loss and colorectal cancer risk: results from the Nurses' Health Study. *Int J Cancer* 140(3):646–652
- Nwizu NN, Marshall JR, Moysich K et al (2017) Periodontal disease and incident cancer risk among postmenopausal women: results from the Women's Health Initiative Observational Cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 26(8):1255–1265
- Ahn J, Segers S, Hayes RB (2012) Periodontal disease, *Porphyromonas gingivalis* serum antibody levels and orodigestive cancer mortality. *Carcinogenesis* 33(5):1055–1058
- Arora M, Weuve J, Fall K, Pedersen NL, Mucci LA (2010) An exploration of shared genetic risk factors between periodontal disease and cancers: a prospective co-twin study. *Am J Epidemiol* 171(2):253–259
- Michaud DS, Liu Y, Meyer M, Giovannucci E, Joshipura K (2008) Periodontal disease, tooth loss, and cancer risk in male health professionals: a prospective cohort study. *Lancet Oncol* 9(6):550–558
- Hujoel PP, Drangsholt M, Spiekerman C, Weiss NS (2003) An exploration of the periodontitis-cancer association. *Ann Epidemiol* 13(5):312–316
- Becher H (1992) The concept of residual confounding in regression models and some applications. *Stat Med* 11(13):1747–1758
- Abbood HM, Hinz J, Cherukara G, Macfarlane TV (2016) Validity of self-reported periodontal disease: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol* 87(12):1474–1483
- Blicher B, Joshipura K, Eke P (2005) Validation of self-reported periodontal disease: a systematic review. *J Dent Res* 84(10):881–890
- Eke PI, Borgnakke WS, Genco RJ (2020) Recent epidemiologic trends in periodontitis in the USA. *Periodontology* 2000 82(1):257–67
- Friedenreich CM, Courneya KS, Bryant HE (1998) The lifetime total physical activity questionnaire: development and reliability. *Med Sci Sports Exerc* 30(2):266–274
- Willett WC, Reynolds RD, Cottrell-Hoehner S, Sampson L, Browne ML (1987) Validation of a semi-quantitative food frequency questionnaire: comparison with a 1-year diet record. *J Am Diet Assoc* 87(1):43–47

34. Cade J, Thompson R, Burley V, Warm D (2002) Development, validation and utilisation of food-frequency questionnaires—a review. *Public Health Nutr* 5(4):567–587
35. Siemiatycki J, Krewski D, Franco E, Kaiserman M (1995) Associations between cigarette smoking and each of 21 types of cancer: a multi-site case-control study. *Int J Epidemiol* 24(3):504–514
36. Idrissi Janati A (2014) La santé orale compromise comme facteur de risque potentiel pour le cancer colorectal sporadique (COLD-ENT): une étude de faisabilité. Thèses et mémoires électroniques de l'Université de Montréal. <http://hdl.handle.net/1866/11339>. Accessed 1 June 2021
37. MacLaughlin S, Friedenreich C (2016) Cancer epidemiology and prevention research, Alberta Health Services. Lifetime Total Physical Activity Questionnaire comprehensive users' guide. <https://www.cepr.ca/questionnaires/life-time-physical-activity-questionnaire-ltpaq/>. Accessed 3 January 2020
38. Berney LR, Blane DB (1997) Collecting retrospective data: accuracy of recall after 50 years judged against historical records. *Soc Sci Med* 45(10):1519–1525
39. Tudor-Locke C, Ainsworth BE, Washington TL, Troiano R (2011) Assigning metabolic equivalent values to the 2002 census occupational classification system. *J Phys Act Health* 8(4):581–586
40. Mansoubi M, Pearson N, Clemes SA et al (2015) Energy expenditure during common sitting and standing tasks: examining the 1.5 MET definition of sedentary behaviour. *BMC Public Health* 15:1–8
41. Shih IF, Liew Z, Krause N, Ritz B (2016) Lifetime occupational and leisure time physical activity and risk of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 28:112–117
42. Menard S (2002) Applied logistic regression analysis, 2nd edn. Sage Publications, Inc, USA. <https://doi.org/10.4135/9781412983433>
43. Takahashi M (2017) Statistical inference in missing data by mcmc and non-mcmc multiple imputation algorithms: assessing the effects of between-imputation iterations. *Data Sci J* 16(37):1–17. <https://doi.org/10.5334/dsj-2017-037>
44. Honaker J, King G, Blackwell M (2011) Amelia II: a program for missing data. *J Statistical Softw* 45(7). <http://www.jstatsoft.org/> Accessed 20 Dec 2020
45. Tomar S (2005) Individual self-reported items are not accurate markers for a history of chronic periodontitis. *J Evid Based Dent Pract* 5(4):219–221
46. Canada H (2010) Summary report on the findings of the oral health component of the Canadian Health Measures Survey 2007–2009
47. Hsieh CY, Su CC, Shao SC et al (2019) Taiwan's National Health Insurance Research Database: past and future. *Clin Epidemiol* 11:349–358
48. Kim GW, Kim YS, Lee SH et al (2019) Periodontitis is associated with an increased risk for proximal colorectal neoplasms. *Sci Rep* 9(1):7528
49. Lee D, Jung KU, Kim HO, Kim H, Chun HK (2018) Association between oral health and colorectal adenoma in a screening population. *Medicine (Baltimore)* 97(37):e12244
50. Xuan K, Jha AR, Zhao T, Uy JP, Sun C (2020) Is periodontal disease associated with increased risk of colorectal cancer? A meta-analysis. *Int J Dent Hyg*. <https://doi.org/10.1111/idh.12483>
51. Han YW, Wang X (2013) Mobile microbiome: oral bacteria in extra-oral infections and inflammation. *J Dent Res* 92(6):485–491
52. Scannapieco FA, Panagakos FS (2011) Periodontal inflammation: from gingivitis to systemic disease? In: InTech (ed) *Gingival diseases: their aetiology, prevention and treatment*. Croatia, pp 149–172
53. Idrissi Janati A, Karp I, Laprise C, Sabri H, Emami E (2020) Detection of *Fusobacterium nucleatum* in feces and colorectal mucosa as a risk factor for colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Syst Rev* 9(1):276
54. Brennan CA, Garrett WS (2016) Gut microbiota, inflammation, and colorectal cancer. *Annu Rev Microbiol* 70:395–411

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Annexe 4. Article 2

Idrissi Janati et al. *Systematic Reviews* (2019) 8:114
<https://doi.org/10.1186/s13643-019-1031-7>

Systematic Reviews

PROTOCOL

Open Access

Is a fusobacterium nucleatum infection in the colon a risk factor for colorectal cancer?: a systematic review and meta-analysis protocol



Amal Idrissi Janati¹, Igor Karp^{2,3}, Hisham Sabri⁴ and Elham Emami^{5,6*} 

Abstract

Background: Despite a considerable amount of epidemiological research for identification of risk factors involved in the development of colorectal cancer, the current understanding of the etiology of this disease remains rather poor.

Accumulating evidence suggests a potentially important role of infection with *Fusobacterium nucleatum* in the colon in colorectal carcinogenesis. The objective of this systematic review is to synthesize the epidemiological evidence on the association between infection with *Fusobacterium nucleatum* in the colon and colorectal cancer.

Methods: This systematic review will include observational studies (cohort, case-control, cross-sectional) in humans in which the role of *Fusobacterium nucleatum* in the etiology of colorectal cancer was investigated. MEDLINE, EMBASE, Web of Science, and Cochrane Database of Systematic Reviews will be searched using a comprehensive search strategy and manual screening of references. Two reviewers will independently identify eligible studies and extract the data from the included studies. The quality of studies will be assessed by using the Newcastle-Ottawa scale. Random-effects models will be used to estimate pooled measures of association (where feasible). Meta-regression and subgroup analyses will be conducted to explore the potential sources of heterogeneity. The Meta-Analysis of Observational Studies in Epidemiology (MOOSE) guidelines and the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) statement will be followed for reporting.

Discussion: Deepening knowledge regarding the etiology of colorectal cancer and the potential implications of *Fusobacterium nucleatum* in this disease is instrumental for prevention, diagnosis, and treatment of this often-fatal disease. This review will produce summarized current evidence on this topic.

Systematic review registration: This systematic review protocol has been registered with the International Prospective Register of Systematic Reviews (PROSPERO) on 10 July 2018 (registration number CRD42018095866).

Keywords: Colorectal cancer, *Fusobacterium nucleatum*, Systematic review protocol, Meta-analysis

* Correspondence: elham.emami@mcgill.ca

⁵Faculty of Dentistry, McGill University, Montreal, Canada

⁶Department of Restorative Dentistry, Faculty of Dentistry, McGill University, 2001 McGill College Avenue, Suite 500, Montreal, QC H3A 1G1, Canada

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2019 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

Rationale

In 2012, over a million new cases of colorectal cancer (CRC) and more than half a million deaths due to CRC were estimated to occur globally [1]. Of cancers that affect both men and women, CRC is the third most commonly diagnosed malignancy and the fourth most fatal in the world [2]. The numbers of new cases of CRC and CRC deaths are expected to increase to 60% by 2030 [2].

The etiology of CRC is widely recognized as being multifactorial [3, 4], and previous research has suggested that modification of environmental and lifestyle factors can lead to important changes in cancer risk [5, 6]. Still, according to comprehensive reviews of the available evidence conducted by expert panels from the American Institute for Cancer Research and the World Cancer Research Fund, the overall evidence for the causal nature of the association with CRC is considered convincing for only some of the previously suggested factors, namely, excess body fat, consuming processed meats and red meat, physical inactivity, cigarette smoking, and alcohol consumption [7]. For the majority of the putative risk factors, the level of evidence is considered either fair or inadequate [7–10]. Thus, identification of modifiable risk factors that could serve as targets for preventive interventions is a current public-health priority.

In the past few years, advances in high-throughput sequencing technologies have led to important discoveries on the role of gut microbial dysbiosis and specifically, of *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) in colorectal carcinogenesis [11–21]. *F. nucleatum* is a Gram-negative, non-spore-forming anaerobic bacterium commonly found in saliva and oral biofilm [18, 22, 23]. It is one of the dominant species of more than 500 organisms of the oral cavity and has five subspecies with different specific genome sequences [24–31]. This invasive proinflammatory agent is involved in the pathogenesis of periodontal diseases [22] as well as of other oral [32] and extra-oral infections [33, 34]. *F. nucleatum* can independently invade host cells via surface adhesins and invasion molecules such as FadA [21, 35]. Importantly, once disseminated outside the oral cavity, FadA activates proinflammatory and oncogenic signals and stimulates the growth of epithelial cells. Human studies have demonstrated that the FadA gene level in CRC tissue is higher than in normal tissue and is correlated with expression of inflammatory genes [21]. Furthermore, a recent study found a strong correlation between *F. nucleatum* and proinflammatory markers such as COX-2, IL-8, IL-6, IL1 β , and TNF- α in CRC [15]. This evidence suggests that colonization resistance of the healthy gut can be disrupted by bacterial species that trigger a systematic inflammatory response, such as seen in periodontal

disease. In a study by Dejea et al. [36], the rate of CRC occurrence was more than five times as high in individuals with gut bacterial biofilms as in those without them [36]. Interestingly, the gut bacterial biofilm composition and invasiveness were similar to those found in oral biofilm in periodontal disease, with *Fusobacteria* being a dominant species [36].

F. nucleatum is now considered to be a pathogenic bacterium of the gut that can invade the colorectal submucosa and epithelium. Various studies have shown an overabundance of *F. nucleatum* in tumors and fecal samples [37] of CRC patients [15, 17, 19–21, 38]. Additionally, some studies have demonstrated that levels of *F. nucleatum* increased in parallel with the transition from healthy colorectal tissue to adenomas and finally to CRC [39–41]. *F. nucleatum* levels in cancerous colorectal tissue have also been shown to serve as a prognostic indicator in CRC [11, 39, 42]. In vitro and in vivo studies showed that *F. nucleatum* interrupts oncogene signaling and cell–cell adhesion and inhibits the anti-tumor activities of natural killer and cytotoxic T cells as well as anti-tumor immunity [38, 43]. Increased levels of *F. nucleatum* have been shown to be associated with microsatellite instability and molecular subsets of CRCs such as the CpG island methylator phenotype [11, 44]. Decreased expression of MLH1, a primary cause of microsatellite instability, was found in samples abundant in *F. nucleatum* [13, 42]. Other markers of poor prognosis such as KRAS and BRAF are also overexpressed in samples rich in *F. nucleatum* [13, 45, 46]. Moreover, CRC patients have been found to have an increased level of serum anti-*F. nucleatum* antibodies [47].

The literature on the association between *F. nucleatum* and CRC is growing but has not yet been systematically reviewed to date. We aim to conduct a systematic review of observational studies on the association between *F. nucleatum* and CRC.

Objectives

The aim of this review is to systematically identify, review, and assess the quality of available literature on the association between *F. nucleatum* and CRC. The findings of this systematic review will help answer the following question: does *F. nucleatum* play a role in the etiology of CRC? If feasible, a meta-analysis will be conducted to estimate pooled measures of association between *F. nucleatum* and CRC.

Methods

The protocol has been developed in accordance with the preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols 2015 (PRISMA-P) [48, 49], which is available in Additional file 1. However, as at issue in this review is the topic of disease etiology (rather

than intervention effects), the PICO format will be replaced by PECO (population, exposure, control, outcome), as detailed in the MOOSE (the Meta-analysis of Observational Studies in Epidemiology) guidelines [50].

Eligibility criteria

Studies will be selected according to the following criteria:

Study design

Original observational research studies that address the association between *E. nucleatum* and CRC will be included in this review. This includes cohort studies, case-control studies, and cross-sectional studies. Case reports, position papers, and reviews will be excluded from the current review.

Participants/population

The population of interest will be unrestricted in terms of age, sex, ethnicity, socioeconomic status, occupation, or history of other diseases.

Exposure

The review will consider the exposure of interest, the *E. nucleatum* infection in the colon. Ascertainment of this infection should be based on tests such as quantitative polymerase chain reaction (qPCR), 16S rRNA gene sequencing, or fluorescence in situ hybridization (FISH).

Comparator

The comparator category will be the absence of the *E. nucleatum* infection in the colon.

Outcomes

The outcome of interest will be the presence of CRC, based on clinically confirmed diagnosis (i.e., cancer registry, hospital, or doctors' records).

Setting and language

There will be no restriction by study setting. English- and French-language publications will be considered for full-text analysis in this systematic review, and eligible articles in other languages will be translated using Google Translate.

Information sources

An electronic literature search will be conducted in the following databases: MEDLINE (OVID interface, 1946 onwards), EMBASE (OVID interface, 1974 onwards), Web of Science, and Cochrane Database of Systematic Reviews (CDSR). Since the vast majority of research conducted on this topic has been carried out in the past 10 years, the start date for the literature search will not be limited in order to maximize the number of

publications considered. The electronic literature search will be complemented by hand searching the list of references in the identified publications or relevant reviews. NICE Evidence and TRIP database will be searched for gray literature using subject keywords. Ongoing studies (which have not resulted in publications on the topic at issue) will not be considered in the review.

Search strategy

Using medical subject headings (MeSH), EMTREEs and text words related to the field of the study, the research team has developed a draft version of literature search strategies with the help of an expert librarian at Université de Montréal (Additional file 2). This draft of the MEDLINE search strategy will be finalized and adapted to the other databases using the proper syntax, subject headings, and controlled vocabulary considering maximized sensitivity of the search. In order to maximize the yield of the search strategy, no language restrictions in the search strategy will be used. Hand searching the list of references in the identified publications, NICE Evidence and TRIP database will be done to identify the relevant articles in the gray literature. The PROSPERO will be searched for recently completed systematic reviews on the topic. The references of relevant studies will be verified for relevant publications.

Study records

Data management, selection, and data collection process

Data will be collected using EndNote software and a pre-designed data collection form. The reliability of data selection process will be pilot tested in 10% of randomly included articles, and Cohen's kappa will be calculated to assess the inter-reviewer (AIJ, EE) agreement on study eligibility. Two independent reviewers (AIJ, EE) will screen all retrieved titles and abstracts using the eligibility criteria. In the case of incomplete information provided by the title and abstract, the full text will be used to determine the study's eligibility to be included for the study. In the case of multiple reports of the same study, the most recent article will be included in the review.

Disagreements between the two reviewers will be resolved by discussion and resolved through consensus-seeking. If an agreement cannot be achieved, the opinion of a third reviewer (IK) will be sought.

Data items

The data will be extracted independently by two reviewers (AIJ, EE) from the full text of the included studies. The extracted information will include authors, country, year of publication, aim of the study, study design, sample size, study participants' characteristics (age, sex, the stage of CRC for cases), study population, exposure description, the technique used to quantify the

exposure, type and number of controls, and the number of *F. nucleatum*-positive, as well as the main results. In the case of insufficient data, we will contact authors via email for additional information. If the missing data cannot be rectified by author contact, we will use narrative approaches to describe the major findings.

Outcomes and prioritization

As stated in the outcomes section, colorectal cancer will be the study outcome.

Risk of bias and level of evidence

Two reviewers will independently assess the risk of bias of the eligible studies using the Newcastle-Ottawa scale (NOS) [51]. This 8-item scale allows to assess the quality of the articles based on the selection of the study groups; the comparability of the groups; and the ascertainment of either the exposure or outcome of interest for case-control or cohort studies, respectively. Disagreement will be resolved by consultation with a third reviewer.

We will also evaluate the level of evidence of all studies according to the Oxford Level of Evidence [52].

Data synthesis

We will use two approaches for data synthesis. The descriptive synthesis will be conducted according to the Centre for Reviews and Dissemination [53] and will include text and tables to summarize the characteristics of the findings and explain the findings. Where feasible (availability of two or more studies with similar study design, estimates of 'relative' measures of association (risk ratio, incidence-odds ratio, rate ratio, hazard ratio, prevalence ratio, prevalence-odds ratio) and their corresponding measures of imprecision (standard error, confidence interval)), the data will be pooled using a random-effects model.

Heterogeneity across studies will be tested using Cochran's Q and the I^2 statistic. To examine the potential sources of heterogeneity (due to personal characteristics, study design, etc.) across the studies, subgroup analyses and meta-regression will be conducted. We will use the Comprehensive Meta-Analysis Version 2 to conduct the meta-analysis [4].

Meta-biases

The potential publication bias will be assessed by funnel plots [54]. Tests for funnel plot asymmetry will be conducted if the number of studies included in the meta-analysis is more than 10 [55].

Confidence in cumulative evidence

The Oxford Level of Evidence [56, 57] and The Grading of Recommendations Assessment, Development, and

Evaluation (GRADE) approach will be used to evaluate the level of evidence of all studies.

Differences between the protocol and the review

Any deviations from the protocol due to unanticipated issues will be reported in the final review [58].

Discussion

This systematic review will assess the role of *F. nucleatum* in the etiology of CRC. Specifically, we will identify, assess, and synthesize the available evidence from published observational studies on the role played by *F. nucleatum* infestation in the colon in the development of CRC.

Caution will have to be taken when interpreting the results of this systematic review. We are aware that observational studies are subject to a high risk of bias due to potential outcome confounding. In addition, if the heterogeneity of the studies is high, this may preclude obtaining a meaningful pooled estimate of the association of interest (or introduce challenges in interpreting a pooled estimate of the association).

Despite the above limitations, we expect that the systematic review proposed here will be of high scientific and pragmatic value. The study aims to facilitate achieving a comprehensive and up-to-date understanding of the association between *F. nucleatum* and CRC. To our knowledge, our systematic review will be the first to synthesize the available evidence on this association. Findings from this study could help pave the way for the development of new methods of prevention, diagnosis, and treatment of CRC.

Additional files

Additional file 1: PRISMA-P 2015 Checklist. (DOCX 35 kb)

Additional file 2: MEDLINE search strategy. (DOCX 13 kb)

Abbreviations

CDSR: Cochrane Database of Systematic Reviews; CRC: Colorectal cancer; *F. nucleatum*: *Fusobacterium nucleatum*; FISH: Fluorescence in situ hybridization; GRADE: Grading of Recommendations Assessment, Development, and Evaluation; MOOSE: Meta-Analysis of Observational Studies in Epidemiology; NOS: Newcastle-Ottawa scale; PRISMA: Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses; PRISMA-P: Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses protocols; PROSPERO: Prospective Register of Systematic Reviews; qPCR: Quantitative polymerase chain reaction

Acknowledgements

Dr. Emami's research is supported by the Fonds de Recherche Québec-Santé (Établissement de jeunes chercheurs cliniciens) as well as Canadian Institutes of Health Research. Additional funding was also provided by a doctoral training scholarship through the Fonds de recherche du Québec.

Amendments

If amendments need to be made to this protocol, we will give the date of each amendment, describe the change and provide the rationale in this section.

Funding

No external funding.

Availability of data and materials

Not applicable.

Authors' contributions

All authors have made significant contributions to this systematic review protocol. As a first author, AJ has developed this review protocol and conducted the preliminary literature review. She designed the search strategy with an expert librarian at Université de Montréal. She will extract the data with EE. EE as the corresponding author will coordinate all aspects of the study. She has collaborated in the protocol development and writing the protocol and will be involved in the data collection and data analysis and interpretation of the results. IK was involved in the protocol development and will contribute to data analysis and data interpretation. HS and RP were involved in the drafting of this manuscript. All the authors revised the manuscript and approved the final version.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Faculté de Médecine Dentaire, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada. ²Department of Epidemiology and Biostatistics, Schulich School of Medicine and Dentistry, University of Western Ontario, 1151, Richmond St., Kresge Building, Room K214, London, Ontario N6A 5C1, Canada. ³Department of Social and Preventive Medicine, School of Public Health, Université de Montréal, Montreal, Canada. ⁴Department of Psychology, Concordia University, Montreal, Canada. ⁵Faculty of Dentistry, McGill University, Montreal, Canada. ⁶Department of Restorative Dentistry, Faculty of Dentistry, McGill University, 2001 McGill College Avenue, Suite 500, Montreal, QC H3A 1G1, Canada.

Received: 2 December 2018 Accepted: 23 April 2019

Published online: 10 May 2019

References

- Ferlay JSEM, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase. In: GLOBOCAN 2012 v10 V. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2013.
- Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, et al. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*. 2017;66(4):683–91.
- Grady WM, Markowitz SD. The molecular pathogenesis of colorectal cancer and its potential application to colorectal cancer screening. *Dig Dis Sci*. 2015;60(3):762–72.
- Mundade R, Imperiale TF, Prabhu L, Loehrer PJ, Lu T. Genetic pathways, prevention, and treatment of sporadic colorectal cancer. *Oncoscience*. 2014;1(6):400–6.
- Aleksandrova K, Pischon T, Jenab M, et al. Combined impact of healthy lifestyle factors on colorectal cancer: a large European cohort study. *BMC Med*. 2014;12(1):168.
- Marshall JR. Prevention of colorectal cancer: diet, chemoprevention, and lifestyle. *Gastroenterol Clin N Am*. 2008;37(1):73–82 vi.
- World Cancer Research Fund International/American Institute for Cancer Research. Continuous update project report: diet, nutrition, physical activity and colorectal Cancer; 2017.
- National Cancer Institute Cancer of the colon and rectum. "<http://www.cancer.gov/cancertopics/types/colon-and-rectal>". Accessed 2017.
- Vano YA, Rodrigues MJ, Schneider SM. Epidemiological link between eating habits and cancer: the example of colorectal cancer *Bull Cancer*. 2009;96(6):647–58.
- World Cancer Research Fund International Dutch Review Team the associations between food, nutrition and physical activity and the risk of colorectal cancer and underlying mechanisms. The Netherlands: American Institute for Cancer Research 2006. "<http://www.dietandcancerreport.org/>". Accessed 2017.
- Mima K, Nishihara R, Qian ZR, et al. Fusobacterium nucleatum in colorectal carcinoma tissue and patient prognosis. *Gut*. 2016;65(12):1973–80.
- Yang Y, Weng W, Peng J, et al. Fusobacterium nucleatum Increases Proliferation of Colorectal Cancer Cells and Tumor Development in Mice by Activating Toll-Like Receptor 4 Signaling to Nuclear Factor-kappaB, and Up-regulating Expression of MicroRNA-21. *Gastroenterol*. 2017;152(4):851–866.e24.
- Ito M, Kanno S, Noshio K, et al. Association of Fusobacterium nucleatum with clinical and molecular features in colorectal serrated pathway. *Int J Cancer*. 2015;137(6):1258–68.
- Bashir A, Miskeen AY, Bhat A, Fazili KM, Ganai BA. Fusobacterium nucleatum: an emerging bug in colorectal tumorigenesis. *Eur J Cancer Prev*. 2015;24(5):373–85.
- Kostic AD, Chun E, Robertson L, et al. Fusobacterium nucleatum potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment. *Cell Host Microbe*. 2013;14(2):207–15.
- Kostic AD, Gevers D, Pedamallu CS, et al. Genomic analysis identifies association of fusobacterium with colorectal carcinoma. *Genome Res*. 2012;22(2):292–8.
- Allen-Vercoe E, Jobin C. Fusobacterium and Enterobacteriaceae: important players for CRC? *Immunol Lett*. 2014;162(2PA):54–61.
- Allen-Vercoe E, Strauss J, Chadee K. Fusobacterium nucleatum: an emerging gut pathogen? *Gut Microbes*. 2011;2(5):294–8.
- Warren RL, Freeman DJ, Pleasance S, et al. Co-occurrence of anaerobic bacteria in colorectal carcinomas. *Microbiome*. 2013;1(1):16.
- Castellarin M, WR L, Freeman JD, et al. Fusobacterium nucleatum infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome Res*. 2012;22(2):299–306.
- Rubinstein MR, Wang X, Liu W, et al. Fusobacterium nucleatum promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/ β -catenin signaling via its FadA Adhesin. *Cell Host Microbe*. 2013;14(2):195–206.
- Han YW. Fusobacterium nucleatum: a commensal-turned pathogen. *Curr Opin Microbiol*. 2015;23C:141–7.
- Shet UK, Oh HK, Kim HJ, et al. Quantitative analysis of periodontal pathogens present in the saliva of geriatric subjects. *J Periodontol Implant Sci*. 2013;43(4):183–90.
- Karpathy SE, Qin X, Gioia J, et al. Genome sequence of fusobacterium nucleatum subspecies polymorphum - a genetically tractable fusobacterium. *PLoS One*. 2007;2(7):e659.
- Park SN, Cho E, Kim HS, et al. Draft genome sequence of fusobacterium nucleatum subsp. animalis ChDC F324, isolated from a human subgingival plaque in the Republic of Korea. *Genome Announc*. 2013;1(6).
- Park SN, Kong SW, Park MS, et al. Draft genome sequence of fusobacterium nucleatum subsp. fusiforme ATCC 51190T. *J Bacteriol*. 2012;194(19):5445–6.
- Park SN, Cho E, Kim HS, et al. Draft genome sequence of fusobacterium nucleatum subsp. nucleatum ChDC F316, isolated from a human peri-implantitis lesion in the Republic of Korea. *Genome Announc*. 2013;1(6).
- Park SN, Cho E, Kim HS, et al. Draft genome sequence of fusobacterium nucleatum subsp. vincentii ChDC F8, isolated from a human subgingival plaque in the Republic of Korea. *Genome Announc*. 2013;1(6).
- Kapatral V, Ivanova N, Anderson I, et al. Genome analysis of F. nucleatum sub spp vincentii and its comparison with the genome of F. nucleatum ATCC 25586. *Genome Res*. 2003;13(6A):1180–9.
- Park SN, Kong SW, Kim HS, et al. Draft genome sequence of fusobacterium nucleatum ChDC F128, isolated from a periodontitis lesion. *J Bacteriol*. 2012;194(22):6322–3.
- Kapatral V, Anderson I, Ivanova N, et al. Genome sequence and analysis of the oral bacterium fusobacterium nucleatum strain ATCC 25586. *J Bacteriol*. 2002;184(7):2005–18.
- Signat B, Roques C, Poulet P, Duffaut D. Fusobacterium nucleatum in periodontal health and disease. *Curr Issues Mol Biol*. 2011;13:25–36.
- Swidsinski A, Dörffel Y, Loening-Baucke V, et al. Acute appendicitis is characterized by local invasion with Fusobacterium nucleatum/necrophorum. *Gut*. 2011;60:34–40.
- Han YW, Wang X. Mobile microbiome: Oral Bacteria in extra-oral infections and inflammation. *J Dent Res*. 2013;92(6):485–91.

35. Keku TO, McCoy AN, Azcarate-Peril AM. Fusobacterium spp. and colorectal cancer: cause or consequence? *Trends Microbiol.* 2013;21(10):506–8.
36. Dejea CM, Wick EC, Hechenbleikner EM, et al. Microbiota organization is a distinct feature of proximal colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(51):18321–6.
37. Gao Z, Guo B, Gao R, Zhu Q, Qin H. Microbiota dysbiosis is associated with colorectal cancer. *Front Microbiol.* 2015;6:20.
38. Sears CL, Garrett WS. Microbes, microbiota, and colon cancer. *Cell Host Microbe.* 2014;15(3):317–28.
39. Flanagan L, Schmid J, Ebert M, et al. Fusobacterium nucleatum associates with stages of colorectal neoplasia development, colorectal cancer and disease outcome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014;33(8):1381–90.
40. McCoy AN, Araujo-Perez F, Azcarate-Peril A, et al. Fusobacterium is associated with colorectal adenomas. *PLoS One.* 2013;8(1):e53653.
41. Yu YN, Yu TC, Zhao HJ, et al. Berberine may rescue fusobacterium nucleatum-induced colorectal tumorigenesis by modulating the tumor microenvironment. *Oncotarget.* 2015;6(31):32013–26.
42. Wei Z, Cao S, Liu S, et al. Could gut microbiota serve as prognostic biomarker associated with colorectal cancer patients' survival? A pilot study on relevant mechanism. *Oncotarget.* 2016;7(29):46158–72.
43. Whitmore SE, Lamont RJ. Oral bacteria and cancer. *PLoS Pathog.* 2014;10(3):e1003933.
44. Tahara T, Shibata T, Kawamura T, et al. Fusobacterium detected in colonic biopsy and clinicopathological features of ulcerative colitis in Japan. *Dig Dis Sci.* 2015;60(1):205–10.
45. Roth AD, Tejpar S, Delorenzi M, et al. Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial. *J Clin Oncol.* 2010;28(3):466–74.
46. Therkildsen C, Bergmann TK, Henrichsen-Schnack T, Ladelund S, Nilbert M. The predictive value of KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA and PTEN for anti-EGFR treatment in metastatic colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Acta Oncol.* 2014;53(7):852–64.
47. Wang HF, Li LF, Guo SH, et al. Evaluation of antibody level against fusobacterium nucleatum in the serological diagnosis of colorectal cancer. *Sci Rep.* 2016;6:33440.
48. Shamseer L, Moher D, Clarke M, et al. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015: elaboration and explanation. *Bmj.* 2015;350:g7647.
49. Moher D, Shamseer L, Clarke M, et al. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015 statement. *Syst Rev.* 2015;4:1.
50. Stroup DF, Berlin JA, Morton SC, et al. Meta-analysis of observational studies in epidemiology: a proposal for reporting. Meta-analysis of observational studies in epidemiology (MOOSE) group. *Jama.* 2000;283(15):2008–12.
51. Wells GA SB, O'Connell D, Peterson J, Welch V, Losos M, Tugwell P. The Newcastle-Ottawa scale (NOS) for assessing the quality of nonrandomised studies in meta-analyses. 2004. "http://www.ohri.ca/programs/clinical_epidemiology/oxford.asp".
52. Soder B, Yakob M, Meurman JH, et al. Periodontal disease may associate with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;127(2):497–502.
53. Centre for Reviews and Dissemination. Systematic reviews. CRD's guidance for undertaking reviews in health care. York: Centre for Reviews and Dissemination: University of York; 2009.
54. Sutton AJ, Duval SJ, Tweedie RL, Abrams KR, Jones DR. Empirical assessment of effect of publication bias on meta-analyses. *Bmj.* 2000;320(7249):1574–7.
55. Higgins JPT GSe Cochrane handbook for systematic reviews of interventions version 5.1.0 [updated March 2011]. 2011. "<http://handbook.cochrane.org>". Accessed 2017.
56. OCEBM levels of evidence working group the Oxford 2011 levels of evidence. Oxford Centre for Evidence-Based Medicine. "<http://www.cebm.net/index.aspx?o=5653>". Accessed 2017.
57. Guyatt G, Oxman AD, Aki EA, et al. GRADE guidelines: 1. Introduction- GRADE evidence profiles and summary of findings tables. *J Clin Epidemiol.* 2011;64(4):383–94.
58. Silagy CA, Middleton P, Hopewell S. Publishing protocols of systematic reviews: comparing what was done to what was planned. *JAMA.* 2002; 287(21):2831–4.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



Detection of *Fusobacterium nucleatum* in feces and colorectal mucosa as a risk factor for colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis



Amal Idrissi Janati¹, Igor Karp^{2,3}, Claudie Laprise⁴, Hisham Sabri⁴ and Elham Emami^{4*} 

Abstract

Background: Colorectal cancer (CRC) is a major cause of cancer deaths worldwide. Accumulating evidence suggests a potentially important role of colorectal infection with *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) in colorectal carcinogenesis. We conducted a systematic review, including both a qualitative synthesis and a meta-analysis, to synthesize the evidence from the epidemiological literature on the association between *F. nucleatum* detection in the colon/rectum and CRC.

Methods: A systematic literature search of Ovid MEDLINE(R), Embase, Web of Science Core Collection, EBM Reviews—Cochrane Database of Systematic Reviews, and CINAHL Plus with Full Text was conducted using earliest inclusive dates up to 4 October 2020. Eligible studies were original, comparative observational studies that reported results on colorectal *F. nucleatum* detection and CRC. Two independent reviewers extracted the relevant information. Odds ratio (OR) estimates were pooled across studies using the random effects model. Newcastle-Ottawa scale was used to critically appraise study quality.

Results: Twenty-four studies were included in the systematic review, of which 12 were included in the meta-analysis. Studies investigated *F. nucleatum* in feces, colorectal tissue samples, or both. In most studies included in the systematic review, the load of *F. nucleatum* was higher, on average, in specimens from CRC patients than in those from CRC-free controls. Meta-analysis showed a positive association between *F. nucleatum* detection in colorectal specimens and CRC (OR = 8.3; 95% confidence interval (95% CI) 5.2 to 13.0).

Conclusions: The results of this systematic review suggest that *F. nucleatum* in the colon/rectum is associated with CRC.

Systematic review registration: This systematic review protocol has been registered with the International Prospective Register of Systematic Reviews (PROSPERO) on July 10, 2018 (registration number CRD42018095866).

Keywords: Colorectal cancer, *Fusobacterium nucleatum*, Systematic review, Meta-analysis

* Correspondence: elham.emami@mcgill.ca

⁴Faculty of Dentistry, McGill University, 2001 McGill College Avenue, Suite 500, Montreal, QC H3A 1G1, Canada

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2020, corrected publication 2021. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Background

Colorectal cancer (CRC) is a significant burden on global public health: it is the fourth and third most commonly diagnosed cancer in men and women [1], respectively, with more than a million new cases per year worldwide [2]. It is also the fourth leading cause of death from cancer in the world [1]. While some CRC cases are attributed to inheritance and inflammatory bowel disease, about 80% of them are sporadic [3]. Thus, identification of etiological factors is essential for efforts to reduce the morbidity and mortality from CRC.

Over the years, epidemiological studies have identified a number of CRC risk factors, such as diet, cigarette smoking, obesity, physical inactivity, diabetes, and certain genetic polymorphisms [4–11]. Furthermore, the role of some bacteria in colon carcinogenesis seems quite plausible [12, 13]. In 2011, Sears and Pardoll suggested that bacteria are the main drivers of the intestinal mucosa immune response and subsequent changes in the function and genetics of epithelial cells, which support oncogenic transformation [14]. These ideas have rapidly gained credibility due to important discoveries on the role of gut microbial dysbiosis and specifically of the bacterium *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) in colorectal carcinogenesis [15–25]. *F. nucleatum* is one of the dominant species of 500 or more organisms that coexist in the oral cavity [26] and the most prevalent oral species in extra-oral infections [27, 28]. Two virulence factors have been identified for *F. nucleatum*: an adhesin FadA and a self-transporting protein Fap2 [28]. On the one hand, FadA allows *F. nucleatum* to invade human epithelial cells, activate β -catenin signaling, induce expression of the oncogenic gene, and promote the growth of colorectal tumor cells [24, 25, 29–32]. On the other hand, the protein Fap2 inhibits the activity of immune cells and thus potentiates the progression of CRC [32, 33]. This suggests that *F. nucleatum* may participate in the colorectal tumor process and thus be a pro-oncogenic bacterium. In a murine model of CRC (APC +/-), the introduction of *F. nucleatum* increased tumor multiplicity and the selective recruitment of myeloid cells infiltrating tumors, thereby promoting tumor progression [18]. *F. nucleatum* also stimulates the recruitment of tumor-infiltrating immune cells, which generate an inflammatory microenvironment conducive to the progression of colorectal neoplasia [18]. Mouse tumors (APC +/-) exposed to *F. nucleatum* have a pro-inflammatory expression, similar to that observed in human colorectal tumors positive for *F. nucleatum* [18].

Over the last decade, many subsequent studies have reported an overabundance of *F. nucleatum* in colorectal tissues and stools from subjects diagnosed with CRC compared with CRC-free “controls.” The literature on this topic has been growing rapidly but has not yet been

reviewed. We therefore conducted a systematic review and a meta-analysis to review the available literature on the association between *F. nucleatum* infection in the colon and CRC.

Methods

This systematic review protocol has been registered with the International Prospective Register of Systematic Reviews (PROSPERO) on 10 July 2018 (registration number CRD42018095866). The protocol for this systematic review was published previously [34]. This systematic review follows the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) guidelines as well as the Meta-analysis of Observational Studies in Epidemiology (MOOSE) guidelines (see Additional file 1 for PRISMA checklist).

Search strategy

Literature search covered the following databases: all Ovid MEDLINE(R), Embase, Web of Science Core Collection, EBM Reviews—Cochrane Database of Systematic Reviews, and CINAHL Plus with Full Text. A comprehensive search from each database’s earliest inclusive dates (1946 for Ovid Medline, 1974 for Embase, 1945 for Web of Science, and 2008 for EBM Reviews) to 31 December 2018 was first conducted. Specific details regarding the search strategies appear in Table 1. The electronic literature search was complemented by hand-searching the list of references in the identified publications.

An update of the literature search was then carried out on 4 October 2020, in order to identify additional human studies that were published in French and English, since the initial search.

Inclusion and exclusion criteria

Eligible studies were original, comparative observational studies that reported results on colorectal *F. nucleatum* infection in at least two groups: individuals diagnosed with CRC and colorectal-adenoma- and CRC-free subjects (in this article, this population will be referred to as “controls”). No demographic or geographic limitations were applied. Only studies published in English or French were included. Colorectal *F. nucleatum* had to be investigated either in feces or in biopsies from tumors in CRC patients and from healthy colorectal mucosa in “controls.” Ascertainment of *F. nucleatum* infection had to be based on microbiological detection and/or quantification tests such as any polymerase chain reaction (PCR) technique, sequencing, or microscopy visualization (e.g., fluorescence in situ hybridization technique (FISH)). Also, *Fusobacterium* had to be investigated at the species level, and the data had to be available for the particular species of *F. nucleatum*. Studies

Table 1 Initial search strategy

Database and search dates	Search #1	Search #2	Search #3	Search #4	Search #5
All Ovid MEDLINE (R). January 1, 1946, to December 31, 2018	exp Colonic Polyps/ or exp Colorectal Neoplasms/	((colon\$ or colorect\$ or rect\$ or sigmoid) adj5 (polyp\$ or adeno\$ or cancer\$ or carcinoma\$ or malignan\$ or metastas\$ or neoplas\$ or oncolog\$ or tumo\$)).tw.	#1 OR #2	Fusobacterium nucleatum/ or exp Fusobacterium Infections/ or nucleatum.tw.	#3 AND #4
Embase. January 1, 1974, to December 31, 2018	exp Colon Polyp/ or exp Colorectal Tumor/	((colon\$ or colorect\$ or rect\$ or sigmoid) adj5 (polyp\$ or adeno\$ or cancer\$ or carcinoma\$ or malignan\$ or metastas\$ or neoplas\$ or oncolog\$ or tumo\$)).tw.	#1 OR #2	Fusobacterium nucleatum/ or exp Fusobacterium Infection/ or nucleatum.tw.	#3 AND #4
CINAHL Plus with Full Text. January 1, 1981, to December 31, 2018	TX ((colon* or colorect* or rect* or sigmoid) N5 (polyp* or adeno* or cancer* or carcinoma* or malignan* or metastas* or neoplas* or oncolog* or tumo*))	(MH "Colonic Polyps") OR (MH "Colorectal Neoplasms+")	#1 OR #2	(MH "Fusobacterium Infections+") OR TX nucleatum	#3 AND #4
Web of Science Core Collection. January 1, 1945, to December 31, 2018	TOPIC: (((colon* or colorect* or rect* or sigmoid) NEAR/5 (polyp* or adeno* or cancer* or carcinoma* or malignan* or metastas* or neoplas* or oncolog* or tumo*)))	TOPIC: (nucleatum)	#1 AND #2		
EBM Reviews—Cochrane Database of Systematic Reviews. January 1, 2005, to December 31, 2018	((colon\$ or colorect\$ or rect\$ or sigmoid) adj5 (polyp\$ or adeno\$ or cancer\$ or carcinoma\$ or malignan\$ or metastas\$ or neoplas\$ or oncolog\$ or tumo\$)).tw.	nucleatum.tw.	#1 AND #2		

reporting data on genus or phylum levels only were thus excluded. The data on the CRC status, the outcome of interest, had to be based on laboratory-confirmed diagnosis (and thus had to be ascertained via a cancer registry or medical records).

Study selection

Two independent reviewers (AIJ and CL) performed the study selection process based on title and abstract. Retained studies were then full-text screened by the same reviewers independently to verify the inclusion criteria. Any disagreement was resolved by discussion. If consensus could not be reached, a third reviewer determined the eligibility and approved the final list of retained studies.

Quality assessment and data extraction

We used the Newcastle-Ottawa Scale (NOS) to assess the quality of the included observational studies. The scale includes three domains: *selection* (4 items), *comparability* (1 item), and *exposure* (3 items). A study can be awarded a maximum of one star for each numbered item within the selection and exposure categories. A maximum of two stars can be given for comparability. Study quality was then classified as poor, fair, or good, according to the Agency for Healthcare Research and Quality (AHRQ) thresholds for converting NOS scores,

described as follows: (i) good quality = 3 or 4 stars in selection domain AND 1 or 2 stars in comparability domain AND 2 or 3 stars in outcome/exposure domain; (ii) fair quality = 2 stars in selection domain AND 1 or 2 stars in comparability domain AND 2 or 3 stars in outcome/exposure domain; and (iii) poor quality = 0 or 1 star in selection domain OR 0 stars in comparability domain OR 0 or 1 star in outcome/exposure domain [35–38].

The data from each study were independently extracted by two independent reviewers (AIJ and CL, AIJ and HS) and then reciprocally verified. Disagreements of two reviewers were resolved by discussion. If consensus could not be reached, a third reviewer was consulted. The following information from each article was extracted: authors' names, country, year of publication, aim of the study, study design, study population, sample size (number of cases and number of controls), study participants' characteristics, identification sources, criteria of matching (if any), inclusion and exclusion criteria (including any restriction of last antibiotic consumption, precursors of cancer, or inflammatory bowel disease (IBD)), localization of the tumor (colon or rectal or colorectal tumors), type of collected specimens (stools or biopsies or both), exposure definition (frequency of presence of *F. nucleatum* in specimens, relative abundance, or relative quantification of bacteria load), the

technique used to detect and quantify the bacterium load, and main results and the accompanying results of statistical tests. For studies comparing more groups with controls and CRC patients (e.g., adenoma or IBD patients), only data on CRC patients and controls was extracted. Similarly, when any included study performed a second validation bacterial analysis on the same participants or on a subsample, only the results of the first technique were extracted. (See [supplementary material](#))

Statistical analysis

We used two approaches for data synthesis, a narrative and a quantitative synthesis using a meta-analysis. The descriptive synthesis was conducted according to the Centre for Reviews and Dissemination and included text and tables to summarize the findings.

To perform a meta-analysis, we included studies reporting any measure of association between *F. nucleatum* and CRC, or reporting proportions or numbers of *F. nucleatum*-positive samples in CRC cases and controls that allowed us to calculate estimates of odds ratios along with the corresponding 95% confidence intervals (CI). Then, a pooled OR estimate and its corresponding 95% CI were calculated. The data was pooled using a random effects model [39]. Heterogeneity across studies was tested using Cochran's Q and the I_2 statistic, and potential publication bias was investigated by visual inspection of funnel plots and Egger's regression asymmetry test.

A subgroup meta-analysis using a random effects model was subsequently performed in order to investigate the change in *F. nucleatum* association to CRC by population area, type of colorectal specimen, and microbiological test, as well as to verify the effect of including participants with history of IBD or a recent antibiotic use in the included studies. Comprehensive Meta-Analysis Version 3 was used to conduct the meta-analysis.

Results

Search results

Initial search (31 December 2018) and its recent update (4 October 2020) retrieved 987 records from databases and 22 additional records through manual search of relevant reviews. After removal of 397 duplicates, 612 articles were screened based on titles and abstracts, which resulted in 514 excluded articles. Ninety-eight full-text publications were assessed for eligibility. Of these, 74 were excluded for not meeting inclusion criteria. Finally, 24 studies [40–63] were included in the systematic review, of which 12 were included in the meta-analysis. Figure 1 shows the study flow diagram.

Characteristics of studies included in the systematic review

The characteristics of the 24 studies included in the systematic review are summarized in Table 2. Studies were published between 2012 and 2020 and were mostly conducted in Asia: twelve in China, one in Japan, and two in Iran. Six studies were conducted in Europe (Germany, Spain, Italy, Ireland, Norway, and Sweden), and three in the Americas (two in USA and one in Brazil). Studies were designed as “non-nested” case-control ($n = 21$), cross sectional ($n = 1$), or nested case-control ($n = 2$), with poor or fair quality assessment of 14 studies, according to the AHRQ scale. Studies failed often in fulfilling *selection of controls* and *non-response rate* items.

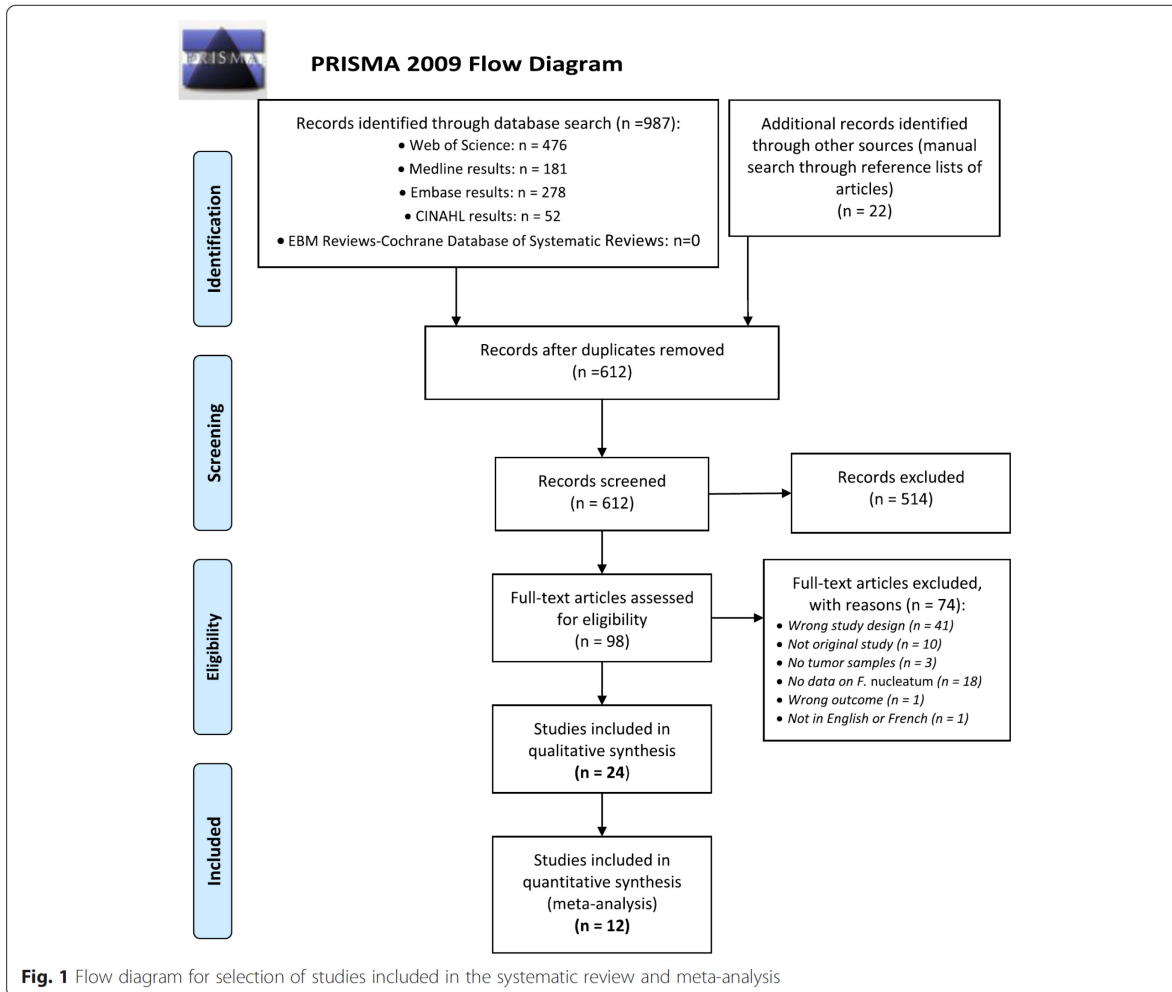
In seven studies, cases and controls were matched for two to four variables, including age, gender, body mass index, ethnicity, and the time period of sample collection [42, 47, 50, 51, 53, 54, 57, 62]. There were 13 studies that excluded subjects with reported antibiotic use in the last month, or in the last 3 months or 6 months, and 11 studies that excluded patients previously diagnosed with IBD.

The majority of studies investigated *F. nucleatum* in feces only (18 studies), while three studies analyzed biopsies only, and another three studies analyzed both types of specimens. Quantitative PCR was the most used bacteria-detection technique followed by sequencing techniques, while only one study used FISH technique.

In most of the included studies, feces were collected before colonoscopy or surgery, except for the study by Yu et al. [60] where feces were collected more after colonoscopy than before. Tunsjo et al. [61] also reported collecting feces either before colonoscopy or 1 week after. In four studies, no information was provided about the timing of specimen collection [43, 54, 57].

Comparison of *Fusobacterium nucleatum* load in colorectal specimens between colorectal cancer cases and controls

As shown in Table 3, *F. nucleatum* quantification (load) in colorectal specimens was reported by 18 studies [41–50, 52, 53, 55, 56, 58, 60–62] including one study with two independent cohorts [49]. Bacteria quantification was mostly performed in stool specimens, except for Yu et al. [41] who quantified the bacteria in both feces and biopsies. Vogtmann et al. [53], Wang et al. [55], and Zhang et al. [42] reported the relative abundance (RA) of the bacteria as a percentage, corresponding to the contribution of *F. nucleatum* to the total bacteria present in specimens [42, 53, 55]. Their results confirmed that *F. nucleatum* does not naturally contribute to a healthy gut microbiome (RA varied from 0.001 to 0.003% in controls). When investigated in CRC case specimens, *F. nucleatum* was significantly more abundant than in controls, but still in very



small proportions (RA varied from 0.061 to 0.17%). While only four studies reported results of absolute quantification of *F. nucleatum*, either as copy number or bacteria counts, the majority of studies performed relative quantification (RQ) of *F. nucleatum* to the total bacteria present in specimens based on the $\Delta\Delta Cq$ method. These RQ studies reported a significantly higher *F. nucleatum* load in colorectal specimens of CRC patients compared to controls, except for two studies [50, 52]. Fold change in *F. nucleatum* from controls to CRC cases was estimated by three studies with very different values: 132-fold according to Wong et al. [56], 66-fold according to Tunsjo et al. [61], and 5.2-fold reported by Xie et al. [58].

Comparison of frequency of presence of *Fusobacterium nucleatum* in colorectal specimens between colorectal cancer cases and controls

Rather than absolute or relative quantification of *F. nucleatum* load, some studies compared the frequency

of presence of the bacteria in colorectal specimens between controls and CRC patients, as shown in Table 4. Some studies [40, 44, 49–51, 53, 54, 57, 60, 61, 63] reported the frequency of presence of the bacterium in colorectal specimens when the bacterium was simply detected (by PCR, sequencing, or FISH techniques), while other studies [45, 47, 58] reported the frequency of presence of the bacterium when its load level was above a specific cutoff value. The cutoff values were typically set to the values that served to achieve the highest discrimination between CRC patients and controls in terms of Youden index. Tunsjo et al. [61] set a cutoff value for detecting *F. nucleatum* in feces, but not in biopsies. As shown in Table 4, the cutoff value was not reported in one study [58] and varied between the three others: 260 copies of *F. nucleatum* by Suehiro et al. [45] and a $2^{-\Delta Cq}$ of 0.00026 (2^{-12}) for both Eklof et al. [47] and Tunsjo et al. [61].

Table 2 Characteristics of studies included in the systematic review

First author (year)	Country	Study design	No. of CRC / C	Age, mean (SD) CRC	Age, mean (SD) C	Exclusion of subjects with history of antibiotic use (period)	Exclusion of subjects with history of IBD diagnosis	Specimen type	Specimen collection time	Detection method	Study quality based on NOS scores
Amitay (2017) [40]	Germany	NCC	46/231	66.9 (-)	62.1 (-)	No	Yes	Feces	Before colonoscopy	16S rRNA gene analysis	Poor
Yu (2015) [41]	China	CC	42/52	---	---	Yes (last 6 months)	Yes	Feces and biopsy ^c	Feces: non-reported Biopsies: left tissues	454 FLX pyrosequencing and PCR	Poor
Zhang (2018) [42]	China	CC	130/130	60.5 (9.8)	58.6 (8.9)	Yes (last 6 months)	Yes	Feces	Before colonoscopy	16S rDNA sequencing and PCR	Good
Flanagan (2014) [43]	Ireland	CC	7/25	---	---	No	Yes	Feces	---	qPCR	Poor
Fukugaiti (2015) [44]	Brazil	CC	7/10	65.4 (1.1)	54.8 (1.3)	Yes (unspecified)	No	Feces	Before colonoscopy	qPCR	Poor
Suehiro (2017) [45]	Japan	CC	158/60	69 (-)	32 (-)	No	No	Feces	Prior to bowel preparation	dd-PCR	Poor
Rezasoltani (2018) [46]	Iran	CC	20/31	60.9 (13.5)	59.8 (17)	Yes (last 6 months)	Yes	Feces	Before colonoscopy	qPCR	Poor
Eklöf (2017) [47]	Sweden	NCC	39/65	34 (-)	34 (-)	No	Yes (for C only)	Feces	Prior to bowel preparation	qPCR	Good
Guo (2018) [48]	China	CC	215/156	---	---	Yes (last 3 months)	Yes	Feces	Time of diagnosis, before resection	qPCR	Poor
Liang (2017) [49]											
Cohort I	China	CC	170/200	67.2 (11.6)	59.3 (5.8)	Yes (last 3 months)	No	Feces	Before or one month after colonoscopy	qPCR	Good
Cohort II	China		33/36	63.4 (9.6)	53.2 (12.2)						
Mira-Pascual (2015) [50]	Spain	CC	7/9	71.1 (10.1)	52.6 (15.2)	No	No	Feces and biopsy ^d	≥ 1 week before colonoscopy	qPCR	Good
Repass (2018) [51]	USA	CC	40/40	---	---	No	No	Biopsy	During surgery	qPCR	Fair
Russo (2017) [52]	Italy	CC	10/10	---	---	Yes (last 3 months)	No	Feces	1 day before surgery for CRC and unspecified for C	qPCR	Poor
Vogtmann (2016) [53]	USA	CC	52/52	61.8 (-)	61.2 (-)	No	No	Feces	Prior to surgery or other treatment	WGSS	Good
Wang (2016) [54]	China	CC	10/10	54.8 (-)	54 (-)	No	No	Feces	---	PCR	Good
Wang (2012) [55]	China	CC	46/56	60 ^a	49 ^a	Yes (last 3 months)	Yes (for C only)	Feces	Before surgery for CRC patients and unspecified for C	qPCR	Poor

Table 2 Characteristics of studies included in the systematic review (Continued)

First author (year)	Country	Study design	No. of CRC / C	Age, mean (SD) CRC	C	Exclusion of subjects with history of antibiotic use (period)	Exclusion of subjects with history of IBD diagnosis	Specimen type	Specimen collection time	Detection method	Study quality based on NOS scores
Wong (2017) [56]	China	CC	104/102	66.9 (10.1)	57.1 (5.8)	Yes (last 3 months)	Yes	Feces	Prior to bowel preparation for colonoscopy	qPCR	Poor
Wu (2013) [57]	China	CC	19/20	58.3 (8.7)	53.2 (5.4)	Yes (last 3 months)	Yes (for C only)	Feces	---	qPCR	Good
Xie (2017) [58]	China	CC	327/242	63.5 (10.2)	60.1 (8.4)	Yes (last month)	No ^b	Feces	Prior to bowel preparation for surgery or endoscopy	qPCR	Good
Yu (2016) [59]	China	CC	93/20	59.25(-)	---	No	No	Biopsy	Colonoscopy or surgery	FISH	Poor
Yu (2017) [60]	China	CC	74/54	63 (50.7)	67 (34.9)	Yes (last 3 months)	Yes	Feces	Before or mostly after colonoscopy	Metagenomic sequencing	Poor
Tunsgjo (2019) [61]	Norway	CC	23/22	70 (-)	57 (-)	No	No	Feces and biopsy ^e	Prior to bowel preparation or 1 week after colonoscopy	qPCR	Poor
Liu (2020) [62]	China	CC	53/45	52.4 (18.8)	53.7 (16.7)	Yes (last month)	Yes	Feces	Prior to bowel preparation for colonoscopy	qPCR	Good
Kashani (2020) [63]	Iran	CS	35/45	---	---	No	No	Biopsy	Colonoscopy	PCR	Satisfactory ^f

No. number, CRC colorectal cancer cases, C controls (colorectal-adenoma- and CRC-free subjects), IBD inflammatory bowel disease, MCC nested case-control, CC case-control, CS cross sectional, qPCR quantitative polymerase chain reaction, NOS Newcastle-Ottawa scale, WGSS whole genome shotgun sequencing, dd-PCR droplet digital PCR, FISH fluorescent in situ hybridization

--- Not reported

^aMedian

^bControls were those with normal or chronic inflamed colorectal mucosa

^cBiopsies were taken from only 31/42 CRC and 37/52 C

^dBiopsies were taken from 7/7 CRC and 5/9 C

^eBiopsies were taken from 21/23 CRC and 11/22 C

^fIn NOS adapted for CS studies, the study quality is based on the total score and rated as follow: very good (9–10 points), good (7–8 points), satisfactory (5–6 points), and unsatisfactory (0 to 4 points)

Table 3 Studies comparing *F. nucleatum* load in colorectal specimens of colorectal cancer cases and controls

First author (year)	Specimen type (No. of specimens CRC/C)	<i>F. nucleatum</i> quantification measures reported	Statistics reported	<i>F. nucleatum</i> load in CRC compared to C		P
				C	CRC	
Relative abundance						
Zhang (2018) [42]	Feces (130/130)	Relative contribution to total bacteria (%)	Mean	0.001	0.17	< 0.001
Vogtmann (2016) [53]	Feces (52/53)	Relative contribution to total bacteria (%)	Mean	0.003	0.08	0.043
Wang (2012) [55]	Feces (46/56)	Relative contribution to total bacteria (%)	Mean	0.002	0.061	0.005
Absolute quantification						
Yu (2017) [60]	Feces (74/54)	Bacteria counts	Rank mean	45.09 IMG 40.32 MLG 54.62 OTU	78.66 IMG 82.14 MLG 71.71 OTU	< 0.001
Suehiro (2017) [45]	Feces (158/60)	Absolute copy number of <i>F. nucleatum</i>	Median (min-max)	17.5 (0-5793)	317 (0-17,343)	< 0.0001
Fukugaiti (2015) [44]	Feces (7/10)	Log no. copies of <i>F. nucleatum</i> /gram	Mean ± SD (min-max)	4.0 ± 1.5 (1.0-6.4)	6.2 ± 1.5 (3.5-8.0)	0.01
Mira-Pascual (2015) [50]	Feces (6/10)	Log no. gene copies of <i>F. nucleatum</i> /mg	Median (IQR)	4.16 (3.47-4.85)	4.70 (3.85-5.15)	—
Rezasoltani (2018) [46]	Feces (20/31)	C _q value (Quantity of <i>F. nucleatum</i> = 10 ^(C_q-9))	Mean (SD)	29.16 (3.31)	17.74 (3.59)	< 0.05
Liu (2020) [62]	Feces (53/45)	Log 10 copies of <i>F. nucleatum</i> / gram	Mean (SD)	≈3.5 (1)	≈6 (1)	< 0.01
Relative quantification						
Russo (2017) [52]	Feces (10/10)	Ratio: $\frac{C_q \text{ } F. \text{ nucleatum}}{C_q \text{ total bacteria}}$	Mean	≈2.25	≈1.8	> 0.05
Yu (2015) [41]	Feces (42/52)	ΔC_q value	Median (IQR)	≈26 [2]	≈19 [2]	< 0.001
Flanagan (2014) [43]	Biopsy (31/37)			≈27 [2]	≈18 [3]	< 0.001
Liang (2017) [49] Coh I	Feces (7/25)	2 ^{-ΔC_q} value	Median	2 ⁻²¹	2 ⁻¹⁵	0.02
Liang (2017) [49] Coh II	Feces (170/200)	2 ^{-ΔC_q} value	Median	≈2 ⁻¹⁷	≈2 ⁻⁵	< 0.0001
Eklhof (2017) [47]	Feces (33/36)	2 ^{-ΔC_q} value	Median	≈2 ⁻¹⁶	≈2 ⁻¹³	0.012
Guo (2018) [48]	Feces (39/66)	Log 2 ^{-ΔC_q}	Median (IQR)	≈-10 [2]	≈-7 [5]	< 0.001
Wong (2017) [56]	Feces (215/156)	Log 2 ^{-ΔC_q}	Mean	≈-4	≈-3	< 0.0001
Xie (2017) [58]	Feces (104/102)	Log 2 ^{-ΔC_q} (fold change from HC to CRC)	Mean	≈-7	≈-5 (132)	< 0.001
Tunjsjo (2019) [61]	Feces (327/242)	Log ₂ -RQ based on ΔC_q (Fold change from HC to CRC)	Mean	≈-20	≈-16 for early stage and -18 for advanced stage (5.12)	0.006 < 0.001
	Feces (23/22)	2 ^{-ΔC_q} value (fold change from HC to CRC)	Median	≈2 ⁻⁷	≈2 ⁻⁵ (66)	0.0073

CRC colorectal cancer cases, C controls (colorectal-adenoma- and CRC-free CRC and C subjects), SD standard deviation, Coh cohort, OTUs operational taxonomic units, MLGs metagenomic linkage groups, IMG integrated microbial genome, C_q quantification cycle in qPCR, ΔC_q the average C_q value of *F. nucleatum*—the average C_q value of total bacteria (or reference gene), min minimum, max maximum

—Not reported

≈A value read from a graph in the study material

Table 4 Frequency of presence of *F. nucleatum* in CRC and controls' specimens and odds ratio for the association between *F. nucleatum* and colorectal cancer

First author (year)	Specimen type (no. of specimens CRC/C)	Definition of specimen positive to <i>F. nucleatum</i>	Prevalence of <i>F. nucleatum</i> (+) C (%)	CRC (%)	p	OR [95% CI]	Adjusted OR [95% CI]
Amitay (2017) [40]	Feces (46/231)	<i>F. nucleatum</i> is detected	20	51	< 0.001	4.16 [2.15–8.07]	---
Fukugaiti (2015) [44]	Feces (7/10)	<i>F. nucleatum</i> is detected	90	100	---	2.37 [0.08–66.88]	---
Liang (2017) [49] Coh I	Feces (170/200)	<i>F. nucleatum</i> is detected	72	98.2	< 0.0001	21.22 [6.57–68.5]	---
Mira-Pascual (2015) [50]	Feces (7/9)	<i>F. nucleatum</i> is detected	22.2	85	---	19.86 [1.47–268.17]	---
Vogtmann (2016) [53]	Biopsy (7/5)	<i>F. nucleatum</i> is detected	0	26.6	---	4.6 [0.18–121.18]	---
Wang (2016) [54]	Feces (52/52)	<i>F. nucleatum</i> is detected	26.9	63.5	0.0002	4.72 [2.05–10.85]	---
Wu (2013) [57]	Feces (10/10)	<i>F. nucleatum</i> is detected	10	60	---	13.5 [1.2–152.21]	---
Yu (2017) [60]	Feces (19/20)	<i>F. nucleatum</i> is detected	0	68.4	---	85.15 [4.42–1638.85]	---
Yu (2017) [60]	Feces (74/54)	<i>F. nucleatum</i> is detected	3.7	52.7	7.53E-08	29 [6.57–128]	---
Kashani (2020) [63]	Biopsy (35/45)	<i>F. nucleatum</i> is detected	24	68	0.0001	6.74 [2.5–18.07]	---
Repass (2018) [51]	Biopsy (40/40)	The product is amplified in the qPCR reaction	5	40	---	1.267 [2.67–60.05]	---
Yu (2016) [59]	Biopsy (93/20)	Average number of bacteria per field ≥ 5 , visualized by FISH technique	Invasive 20, in biofilms 10	Invasive 65.9 ^a , in biofilms 48.4 ^a	< 0.05	7.73 [2.38–25.07] ^e	---
Tunsjo (2019) [61]	Feces (23/22)	<i>F. nucleatum</i> detected with ΔCq values < 12	0	35	---	24.9 [1.33–463.72]	---
Suehiro (2017) [45]	Biopsy (21/11)	<i>F. nucleatum</i> is detected	18	52	---	4.93 [0.85–28.67]	---
Suehiro (2017) [45]	Feces (158/60)	<i>F. nucleatum</i> detected at a higher level based on cutoff value (> 260 copies) ^b	10	54	---	10.57 [4.3–25.98]	---
Eklhof (2017) [47]	Feces (39/65)	<i>F. nucleatum</i> detected at a higher level based on cutoff value ($2^{-\Delta Cq} > 0.00026 \approx 2^{-12}$) ^c	24.3	69.2	---	7 [2.89–16.96]	---
Xie (2017) [58]	Feces (327/242)	<i>F. nucleatum</i> detected at a higher level based on cutoff value (value is not reported) ^d	---	---	---	4.31 [2.96–6.28]	4.28 ^f [2.27–8.09]

no. number, CRC colorectal cancer cases, C controls (colorectal-adenoma- and CRC-free subjects), OR odds ratio

---Not reported

^aThe value was calculated as the average of reported prevalence in proximal and distal separately

^b260 copies of *F. nucleatum* was the best cutoff point to discriminate between HC and CRC in receiver operating characteristic (ROC) analysis resulting in estimated sensitivity of 54% and estimated specificity of 90%, and the area under the ROC curve was 0.75

^cThe cutoff value of 0.00026 ($= 2^{-\Delta Cq} = 2^{-12}$) gave the most reliable analysis for detecting cancer in the study patients, with estimated specificity of 76.9%

^dROC curve was used to evaluate the diagnostic value of bacterial candidates in distinguishing CRC and controls and to determine the best cutoff values that maximized the Youden index

^eOR was calculated based on prevalence of invasive *F. nucleatum* (in tissues) as its detection was higher than within biofilms

^fOR adjusted for age, gender, FIT test, two additional bacteria markers, history of diabetes, and high blood pressure

F. nucleatum was commonly detected in all specimens across studies, except for Mira-Pascual et al. and Wu et al., who did not detect the bacterium in controls' biopsies and controls' feces respectively [50, 57]. The frequency of specimens positive to *F. nucleatum* was higher among CRC patients than controls in all the studies. The study by Yu et al. was the only one to use FISH technique, which allowed for quantifying the bacteria within tissues (called invasive *F. nucleatum*) and in the biofilm separately. Their results showed a higher frequency of presence of *F. nucleatum* in tissues than in biofilm.

Association between *Fusobacterium nucleatum* and colorectal cancer

To perform a meta-analysis on the association between *F. nucleatum* and CRC, we pooled data from 12 studies [40, 44, 49–51, 53, 54, 57, 59–61, 63] that operationally defined the presence of *F. nucleatum* in terms of the detection of the bacterium in colorectal specimens, with no use of a cutoff value that optimizes distinction between cases and controls, as described above. As shown in Fig. 2, the overall pooled OR and the corresponding 95% CI estimated in a random effects model show a positive association between *F. nucleatum* detection in colorectal specimens and CRC (OR = 8.3; 95% confidence interval (95% CI) 5.2 to 13.0), with moderate heterogeneity ($I_2 = 26.32\%$, p value for heterogeneity = 0.18). Funnel plot for investigating publication bias is presented in Fig. 3. Visual inspection of the funnel plot does not suggest an evident publication bias, which was also confirmed by Egger's regression test ($p = 0.053$).

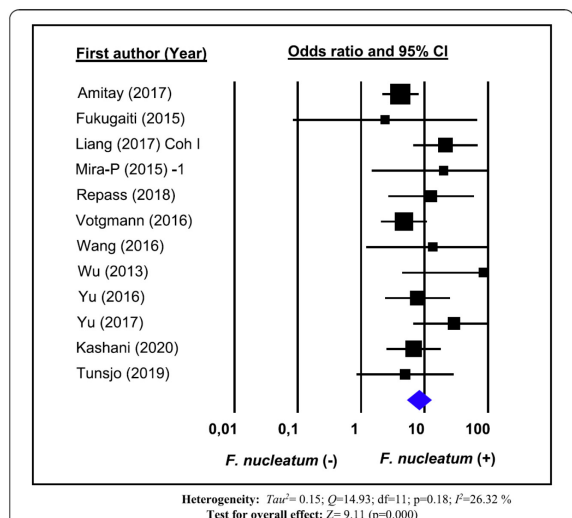


Fig. 2 Forest plot of the association between *F. nucleatum* in colorectal specimens and colorectal cancer. Results of a random-effects meta-analysis of 12 observational studies

Adjusted pooled OR estimate could not be calculated due to non-availability of adjusted OR estimates from the reports of the individual studies.

Subgroup meta-analysis shows a stronger association between *F. nucleatum* and CRC in Asiatic populations, compared to European and American populations, as well as in studies excluding subjects with reported antibiotic use in the last 3 months, compared with studies that did not exclude these subjects (Fig. 4). However, the association was not statistically significantly different by specimen type (stools vs. biopsies), bacterial detection technique (FISH vs. qPCR vs. sequencing), or previous IBD diagnosis as exclusion criteria for study participation.

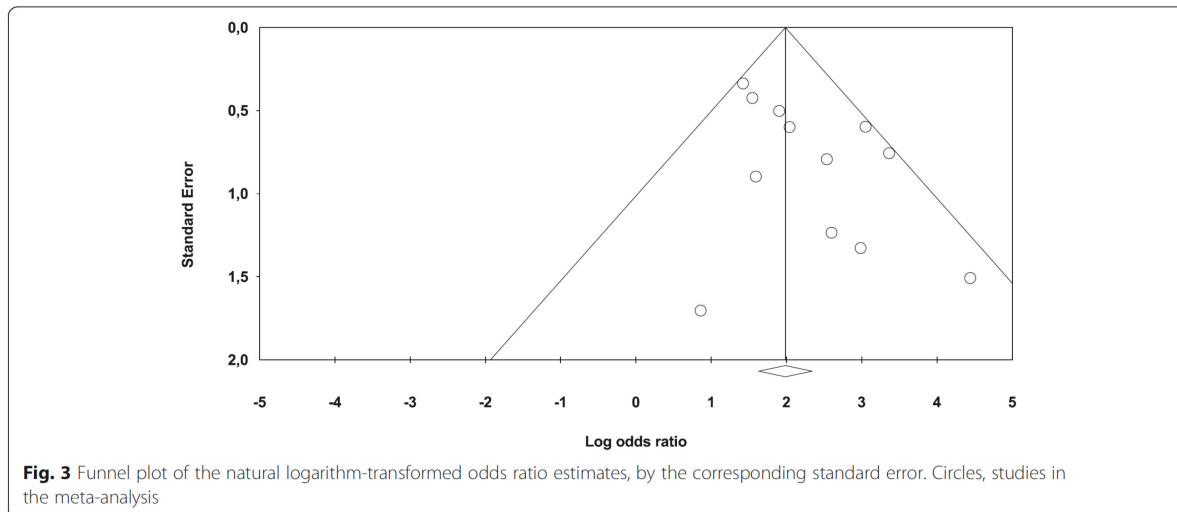
Discussion

This systematic review summarizes results from 24 observational studies that compared the prevalence of the presence of *F. nucleatum* and/or the mean/median of *F. nucleatum* load in colorectal specimens, among cases of CRC and controls. Studies used mainly two ways to compare CRC patients and controls in regard to colorectal infection by *F. nucleatum*: (1) bacterium load expressed by RA (a percentage expressing the relative contribution of *F. nucleatum* to total bacteria), absolute quantification (bacteria count), or more often by RQ ($2^{-\Delta Cq}$ value by qPCR technique, with $\Delta Cq =$ (the average Cq value of *F. nucleatum* - the average Cq value of total bacteria or reference gene)); and (2) frequency of the presence of *F. nucleatum* in colorectal specimens.

It is true that RA and RQ are both relative measures of the bacterium load, but many studies used one or the other term to express the same thing, which can be confusing. Thus, in this systematic review, we tried to differentiate between the two terms, RA and RQ, and represent results accordingly. This showed that RA was used less commonly than RQ, even if RA also allows better comparison between healthy and altered microbiome composition, since dysbiosis is, by definition, the loss in representation of different bacterial phyla within the whole bacterial composition of the microbiome.

We also mention some issues with publishing data of *F. nucleatum* RQ in individual studies. Most of the time, RQ was extracted from papers' supplementary tables or graphs that were often poorly annotated. Also, even if individual studies based their RQ on a common $\Delta\Delta Cq$ method, values were reported differently across studies. Thus, we encourage researchers to standardize the way to report RQ data.

Overall, results of absolute and relative quantification of *F. nucleatum* were higher in CRC cases compared to controls across most studies. Only three studies reported the fold change of *F. nucleatum* load from controls to CRC cases, but one was much larger than the others:



5.12-fold by Xie et al. [58], 66-fold by Tunsjo et al. [61], and 132-fold by Wong et al. [56]. When comparing these studies, Xie et al. [58] included subjects with chronic inflamed colorectal mucosa within their control group, while Wong et al. [56] excluded subjects with IBD; Tunsjo et al. [61], for their part, did not report excluding IBD patients from participation. Presence of IBD patients among controls in the study of Xie et al. [58] could probably have blurred the difference in *F. nucleatum* load between their CRC and controls. In this regard, we mention a study by Strauss et al. who isolated *Fusobacterium* spp. from 63.6% of patients with gastrointestinal disease compared to 26.5% of healthy controls ($P = 0.01$), with *F. nucleatum* representing 69% of recovered *Fusobacterium* spp. in their IBD patients [64].

Our meta-analysis included 12 studies based on a total of 1098 cases and 1069 controls. Only crude pooled OR could be calculated, and it shows an association between the presence of *F. nucleatum* in feces or colorectal mucosa and CRC.

All included studies reported results of *F. nucleatum* detection in specimens collected just before colonoscopy or surgery. Furthermore, the estimated OR for the association between *F. nucleatum* and CRC was not adjusted for potential confounders. Thus, causal explanation of the “positive” empirical association (as quantified by the pooled-OR estimate) is not warranted, in our view. However, the involvement of *F. nucleatum* in early CRC carcinogenesis stages has been suggested by other studies that identified the bacterium in precancerous lesions. Its RA was reported to be higher in adenomas than in healthy tissues and lower in adenomas than in carcinomas, reflecting a gradual enrichment of the colon with *F. nucleatum* in parallel to the adenoma-carcinoma

sequence [65–67]. The level of *F. nucleatum* also seems to increase with advancing stages of dysplasia [43].

Subgroup meta-analysis suggested (even if weakly) that the *F. nucleatum*–CRC association (if it does exist) may be stronger in Asian populations than in American or European ones. This finding seems to be in line with the results of a recent meta-analysis by Huang et al. [68] on the diagnostic value of fecal *F. nucleatum* in screening CRC, which had a better performance in Asians. The apparent dependence of the association between *F. nucleatum* and CRC on population area may be explained by lifestyle differences between populations and/or by diversity in human gut microbiomes at the population level. Nishijima et al. analyzed gut microbiomes of Japanese individuals by comparing metagenomic data obtained from 106 Japanese subjects with those from 11 other nations. They found that gut microbiome of the Japanese is considerably different from those of other populations and cannot be explained by diet alone [69].

We also found that the estimated association between *F. nucleatum* and CRC was stronger in the subgroup of studies that excluded subjects with recent antibiotic use, compared with the subgroup of studies that did not. This can be explained by a possible bias due to introducing subjects with microbiomes altered by recent antibiotic use.

Some studies failed in reporting critical information, such as time of specimen collection, which was not reported by four studies [41, 43, 54, 57]. Also, in one study [60], feces were collected most frequently after colonoscopy. However, colonic microbiota has been shown to be disturbed by the bowel cleansing protocol and takes

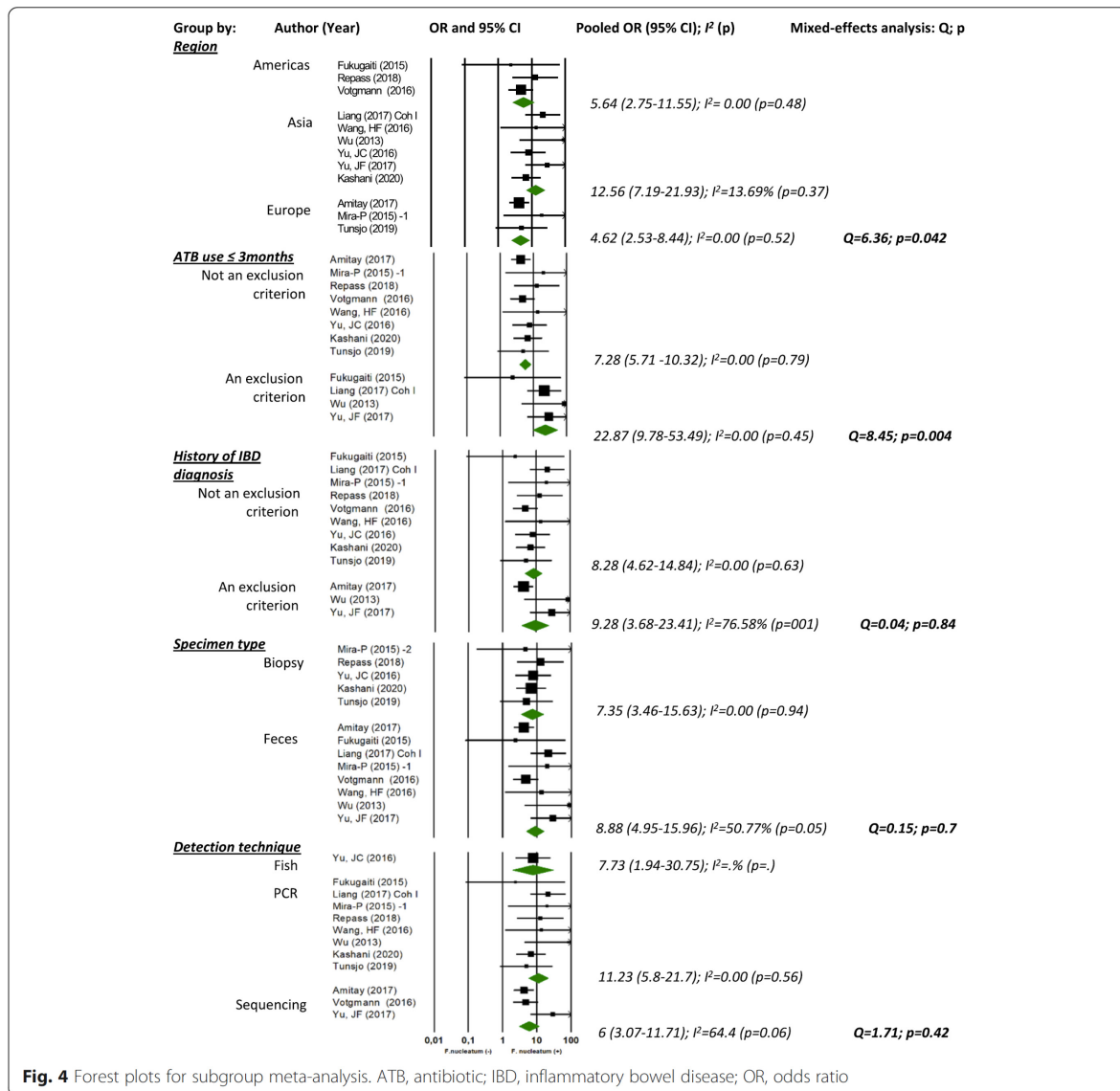


Fig. 4 Forest plots for subgroup meta-analysis. ATB, antibiotic; IBD, inflammatory bowel disease; OR, odds ratio

about 2 weeks to recover to its original composition depending on the cleansing protocol [70].

F. nucleatum is a very heterogeneous species of the Fusobacteria phylum and has been classified into four to five subspecies: *animalis*, *nucleatum*, *polymorphum*, *vincentii/fusifforme*. *F. nucleatum*, subsp. *nucleatum*, is mainly isolated in periodontal pathological sites, while *F. nucleatum* subsp. *vincentii/fusifforme* is often isolated from healthy sites as normal flora. *F. nucleatum* subsp. *animalis* and *polymorphum* are associated with complications of pregnancy, and *F. nucleatum* subsp. *animalis* is associated with inflammatory bowel disease [71]. In our systematic review, data about

subspecies of *F. nucleatum* was only reported by the study of Amitay et al. [40], in which the four subspecies were identified: ssp. *nucleatum*, *animalis*, *vincentii*, and *polymorphum*. In a study by Ye et al., five *F. nucleatum* subspecies were identified in clinical CRC specimens, with ssp. *animalis* being the most common one [72]. Komiya et al. examined whether identical strains of *F. nucleatum* could be isolated from colorectal and saliva specimens from the same patient. Saliva and colorectal specimens were analyzed from 14 CRC patients by qPCR, of which 40% exhibited identical strains of *F. nucleatum* in their colorectal and saliva specimens [73].

The oral cavity can serve as a reservoir for the systemic dissemination of pathogenic bacteria and their toxins, leading to infections and inflammations in distant bodily sites. Several oral species were identified in infections at extraoral sites. Han et al. [28] suggested a spread of oral infection due to transient bacteremia leading to bacterial colonization in extraoral sites, systemic damage by toxins free of oral pathogens, and systemic inflammation caused by soluble antigens of oral pathogens. *F. nucleatum* is one of the most dominant species of the oral microbiota [26]. It often aggregates with other oral bacteria and plays an essential role in the formation of dental plaque, acting as a bridge between early colonizing bacteria (Gram-positive bacteria) and late colonizing bacteria (Gram-negative bacteria) [74]. Such a mechanism resembles the proposed *driver-passenger model* in explaining how bacteria in the intestinal microbiota could be involved in carcinogenesis. The first step consists of colonization of the intestine by pathogenic bacteria known as “drivers” with pro-inflammatory and pro-carcinogenic potential (*B. fragilis* and *E. coli* in particular). The tumor progression would then cause a modification in the tumor microenvironment, allowing colonization by opportunistic bacteria known as “passengers” (*F. nucleatum* and *Streptococcus gallolyticus* in particular), promoting further development of the tumor [75, 76]. The bacterial “drivers” and “passengers” would thus have distinct temporal roles in the pathogenesis of CRC [75]. This model implies that there is not a single bacterium that would alone be incriminated in the occurrence and development of CRC, but rather a bacterial community whose taxonomic composition continues to change throughout the tumorigenic process, thereby allowing specific bacteria to play their role in tumor transformation, according to their virulence and other properties. Moreover, some believe that the oral bacterium *F. nucleatum* plays a role in the development of CRC within a bacterial community or biofilm, rather than as an individual pathogen [77]. Warren et al. analyzed the bacterial composition of 130 colorectal tumors and their surrounding healthy tissues, and confirmed the over-representation of *Fusobacterium*, but in the simultaneous presence of two other commensal oral bacteria, *Leptotrichia* and *Campylobacter*, in individual tumors [22].

Conclusion

The results of this systematic review and meta-analysis suggest that the *F. nucleatum* in feces or colorectal mucosa is associated with CRC. Future clinical and epidemiological studies should address the potential role of *F. nucleatum* in the etiology of CRC. Further, the bacterium should be investigated in the colon at the subspecies level to assess the oral origin of colorectal infection with *F. nucleatum*.

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s13643-020-01526-z>.

Additional file 1. PRISMA 2009 checklist.

Additional file 2. Supplementary material.

Abbreviations

CRC: Colorectal cancer; *F. nucleatum*: *Fusobacterium nucleatum*; 95% CI: 95% confidence interval; OR: Odds ratio; PRISMA: Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-analyses; MOOSE: Meta-analysis of Observational Studies in Epidemiology; NOS: Newcastle-Ottawa scale; AHRQ: Agency for Healthcare Research and Quality; RA: Relative abundance; RQ: Relative quantification; IBD: Inflammatory bowel disease; PCR: Polymerase chain reaction; qPCR: Quantitative polymerase chain reaction; FISH: Fluorescence in situ hybridization

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the help of Natalie Clairoux and Patrice Dupont (librarians at Bibliothèque de la Santé, Université de Montréal) for helping with the search strategy.

Authors' contributions

AJ carried out the study design, study screening, data extraction, quality appraisal, and data analysis, and drafted the manuscript. IK carried out the study design, advised on all methodological issues, and critically revised the manuscript. CL participated in the study design, participated in the study screening and data extraction, and revised the manuscript. HS participated in data extraction and manuscript drafting and revised the manuscript. EE carried out study design, advised on all methodological issues, and critically revised the manuscript. All authors approved the final version of this manuscript.

Funding

This work was supported by a doctoral scholarship from the Fonds de Recherche du Québec-Santé and an award from Études Supérieures et Postdoctorales of Université de Montréal (to: Amal Idrissi Janati).

Competing interest

None declared

Author details

¹Faculty of Dentistry, Université de Montréal, Montreal, Canada. ²Department of Epidemiology and Biostatistics, Schulich School of Medicine and Dentistry, University of Western Ontario, London, Canada. ³Department of Social and Preventive Medicine, School of Public Health, Université de Montréal, Montreal, Canada. ⁴Faculty of Dentistry, McGill University, 2001 McGill College Avenue, Suite 500, Montreal, QC H3A 1G1, Canada.

Received: 19 July 2020 Accepted: 9 November 2020

Published online: 03 December 2020

References

1. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, et al. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*. 2017;66(4):683–91.
2. Potter JDLN. Genetics of colorectal cancer. New York: Springer Science + Business Media; 2009.
3. Müller MF, Ibrahim AEK, Arends MJ. Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Arch*. 2016;469(2):125–34.
4. Cross AJ, et al. A large prospective study of meat consumption and colorectal cancer risk: an investigation of potential mechanisms underlying this association. *Cancer Research*. 2010;70(6):2406–14.
5. Larsson SC, Wolk A. Meat consumption and risk of colorectal cancer: a meta-analysis of prospective studies. *International Journal of Cancer*. 2006; 119(11):2657–64.
6. Liang PS, Chen T-Y, Giovannucci E. Cigarette smoking and colorectal cancer incidence and mortality: systematic review and meta-analysis. *International Journal of Cancer*. 2009;124(10):2406–15.

7. Ning Y, Wang L, Giovannucci EL. A quantitative analysis of body mass index and colorectal cancer: findings from 56 observational studies. *Obes Rev*. 2010;11(1):19–30.
8. Robsahm TE, Aagnes B, Hjartaker A, et al. Body mass index, physical activity, and colorectal cancer by anatomical subsites: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Eur J Cancer Prev*. 2013;22(6):492–505.
9. Deng L, Gui Z, Zhao L, Wang J, Shen L. Diabetes mellitus and the incidence of colorectal cancer: an updated systematic review and meta-analysis. *Dig Dis Sci*. 2012;57(6):1576–85.
10. Cyr A, Dunnagan TA, Haynes G. Efficacy of the health belief model for predicting intention to pursue genetic testing for colorectal cancer. *J Genet Couns*. 2010;19(2):174–86.
11. Cho E, Smith-Warner SA, Ritz J, et al. Alcohol intake and colorectal cancer: a pooled analysis of 8 cohort studies. *Ann Intern Med*. 2004;140(8):603–13.
12. Ray K. Colorectal cancer: fusobacterium nucleatum found in colon cancer tissue—could an infection cause colorectal cancer? *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2011;8(12):662.
13. Collins D, Hogan AM, Winter DC. Microbial and viral pathogens in colorectal cancer. *Lancet Oncol*. 2011;12(5):504–12.
14. Sears CL, Pardoll DM. Perspective: alpha-bugs, their microbial partners, and the link to colon cancer. *J Infect Dis*. 2011;203(3):306–11.
15. Mima K, Nishihara R, Qian ZR, et al. Fusobacterium nucleatum in colorectal carcinoma tissue and patient prognosis. *Gut*. 2016;65(12):1973–80.
16. Yang Y, Weng W, Peng J, et al. Fusobacterium nucleatum increases proliferation of colorectal cancer cells and tumor development in mice by activating Toll-like receptor 4 signaling to nuclear factor-kappaB, and up-regulating expression of MicroRNA-21. *Gastroenterology*. 2017;152(4):851–66.e24.
17. Bashir A, Miskeen AY, Bhat A, Fazili KM, Ganai BA. Fusobacterium nucleatum: an emerging bug in colorectal tumorigenesis. *European Journal of Cancer Prevention*. 2015;24(5):373–85.
18. Kostic AD, Chun E, Robertson L, et al. Fusobacterium nucleatum potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment. *Cell Host & Microbe*. 2013;14(2):207–15.
19. Kostic AD, Gevers D, Pedamallu CS, et al. Genomic analysis identifies association of Fusobacterium with colorectal carcinoma. *Genome Res*. 2012;22(2):292–8.
20. Allen-Vercoe E, Jobin C. Fusobacterium and Enterobacteriaceae: important players for CRC? *Immunol Lett*. 2014;162(2 Pt A):54–61.
21. Allen-Vercoe E, Strauss J, Chadee K. Fusobacterium nucleatum: an emerging gut pathogen? *Gut Microbes*. 2011;2(5):294–8.
22. Warren RL, Freeman DJ, Pleasance S, et al. Co-occurrence of anaerobic bacteria in colorectal carcinomas. *Microbiome*. 2013;1(1):16.
23. Castellarin M, Warren RL, Freeman JD, et al. Fusobacterium nucleatum infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome Research*. 2012;22(2):299–306.
24. Rubinstein MR, Wang X, Liu W, et al. Fusobacterium nucleatum promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/beta-catenin signaling via its FadA adhesin. *Cell Host Microbe*. 2013;14(2):195–206.
25. Ito M, Kanno S, Noshio K, et al. Association of Fusobacterium nucleatum with clinical and molecular features in colorectal serrated pathway. *Int J Cancer*. 2015;137(6):1258–68.
26. Kapatral V, Anderson I, Ivanova N, et al. Genome sequence and analysis of the oral bacterium Fusobacterium nucleatum strain ATCC 25586. *J Bacteriol*. 2002;184(7):2005–18.
27. Han YW. Fusobacterium nucleatum interaction with host cells- Oral microbial communities: genomic inquiry and interspecies communication; 2011.
28. Han YW, Wang X. Mobile microbiome: oral bacteria in extra-oral infections and inflammation. *J Dent Res*. 2013;92(6):485–91.
29. Kostic ADC E, Robertson L, Glickman JN, Gallini CA, Michaud M, Clancy TE, Chung DC, Lochhead P, Hold GL, El-Omar EM, Brenner D, Fuchs CS, Meyerson M, Garrett WS. Fusobacterium nucleatum potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment. *Cell Host Microbe*. 2013;14(2):207–15.
30. Han YW, Ikegami A, Rajanna C, et al. Identification and characterization of a novel adhesin unique to oral fusobacteria. *J Bacteriol*. 2005;187(15):5330–40.
31. Fardini Y, Wang X, Temoin S, et al. Fusobacterium nucleatum adhesin FadA binds vascular endothelial cadherin and alters endothelial integrity. *Mol Microbiol*. 2011;82(6):1468–80.
32. Gur C, Ibrahim Y, Isaacson B, et al. Binding of the Fap2 protein of Fusobacterium nucleatum to human inhibitory receptor TIGIT protects tumors from immune cell attack. *Immunity*. 2015;42(2):344–55.
33. Shang FM, Liu HL. Fusobacterium nucleatum and colorectal cancer: a review. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*. 2018;10(3):71–81.
34. Idrissi Janati A, Karp I, Sabri H, Emami E. Is a fusobacterium nucleatum infection in the colon a risk factor for colorectal cancer?: a systematic review and meta-analysis protocol. *Syst Rev*. 2019;8(1):114.
35. Singh MK J, Singh S, Thumburu KK, Jaiswal N, Chauhan A, Agarwal A, Paul N, Sagwal S. Comparison of Newcastle Ottawa scale (NOS) and Agency for Health Research and Quality (AHRQ) as risk of bias assessment tools for cohort studies. In: Filtering the information overload for better decisions. Abstracts of the 23rd Cochrane Colloquium; 2015 3-7 Oct. Vienna: Wiley; 2015.
36. Katsigianni M, Karageorgiou V, Lambrinouadaki I, Siristatidis C. Maternal polycystic ovarian syndrome in autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis. *Mol Psychiatry*. 2019;24(12):1787–97.
37. Perletti G, Monti E, Magri V, et al. The association between prostatitis and prostate cancer. Systematic review and meta-analysis. *Arch Ital Urol Androl*. 2017;89(4):259–65.
38. Pillinger T, Osimo EF, Brugger S, et al. A meta-analysis of immune parameters, variability, and assessment of modal distribution in psychosis and test of the immune subgroup hypothesis. *Schizophr Bull*. 2019;45(5):1120–33.
39. Borenstein M, Hedges LV, Higgins JPT, H RR. Introduction to meta-analysis. UK: Wiley, Ltd ed; 2009.
40. Amitay ELW S, Vital M, Pieper DH, Hofler D, Gierse IJ, Butt J, Balavarca Y, Cuk K, Brenner H. Fusobacterium and colorectal cancer: causal factor or passenger? Results from a large colorectal cancer screening study. *Carcinogenesis*. 2017;38(8):781–8.
41. Yu YN, Yu TC, Zhao HJ, et al. Berberine may rescue Fusobacterium nucleatum-induced colorectal tumorigenesis by modulating the tumor microenvironment. *Oncotarget*. 2015;6(31):32013–26.
42. Zhang YZY X, Yu ED, Wang N, Cai QC, Shuai Q, Yan FH, Jiang LF, Wang HX, Liu JX, Chen Y, Li ZS, Jiang QW. Changes in gut microbiota and plasma inflammatory factors across the stages of colorectal tumorigenesis: a case-control study. *Bmc Microbiol*. 2018;18(1):10.
43. Flanagan LS J, Ebert M, Soucek P, Kunicka T, Liska V, Bruha J, Neary P, Dezeeuw N, Tommasino M, Jenab M, Prehn JH, Hughes DJ. Fusobacterium nucleatum associates with stages of colorectal neoplasia development, colorectal cancer and disease outcome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014;33(8):1381–90.
44. Fukugaiti MHI A, Fern; es, M. R.; Ribeiro, U.; Nakano, V.; Avila-Campos, M. J. High occurrence of Fusobacterium nucleatum and Clostridium difficile in the intestinal microbiota of colorectal carcinoma patients. *Brazil J Microbiol*. 2015;46(4):1135–40.
45. Suehiro YS K, Nishioka M, Hashimoto S, Takami T, Higaki S, Shindo Y, Hazama S, Oka M, Nagano H, Sakaida I, Yamasaki T. Highly sensitive stool DNA testing of Fusobacterium nucleatum as a marker for detection of colorectal tumours in a Japanese population. *Ann Clin Biochem*. 2017;54(1):86–91.
46. Rezasoltani SS M, Asadzadeh Aghdaei H, Nazemalhosseini Mojarad E, Dabiri H, Akhavan Sepahi A, Modarressi MH, Feizabadi MM, Zali MR. Applying simple linear combination, multiple logistic and factor analysis methods for candidate fecal bacteria as novel biomarkers for early detection of adenomatous polyps and colon cancer. *J Microbiol Method*. 2018;155:82–8.
47. Eklof VL-B A, Zingmark C, Edin S, Larsson P, Karlung P, Alexeyev O, Rutegard J, Wikberg ML, Palmqvist R. Cancer-associated fecal microbial markers in colorectal cancer detection. *Int J Cancer*. 2017;141(12):2528–36.
48. Guo SL L, Xu B, Li M, Zeng Q, Xiao H, Xue Y, Wu Y, Wang Y, Liu W, Zhang G. A simple and novel fecal biomarker for colorectal cancer: ratio of Fusobacterium nucleatum to probiotics populations, based on their antagonistic effect. *Clin Chem*. 2018;64(9):1327–37.
49. Liang QC J, Chen Y, Huang Y, Higashimori A, Fang J, Brim H, Ashktorab H, Chien Ng S, Ng SSM, Zheng S, Chan FKL, Sung JYJ, Yu J. Fecal bacteria act as novel biomarkers for noninvasive diagnosis of colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2017;23(8):2061–70.
50. Mira-Pascual L, Cabrera-Rubio R, Ocon S, et al. Microbial mucosal colonic shifts associated with the development of colorectal cancer reveal the presence of different bacterial and archaeal biomarkers. *J Gastroenterol*. 2015;50(2):167–79.
51. Repass JRPC, Biology, Iorns E, Denis A, Williams SR, Perfito N, Errington TM. Replication study: Fusobacterium nucleatum infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *eLife*. 2018;7:13.

52. Russo EB G, Chiellini C, Fagorzi C, Niccolai E, Taddei A, Ricci F, Ringressi MN, Borrelli R, Melli F, Miloeva M, Bechi P, Mengoni A, Fani R, Amedei A. Preliminary comparison of oral and intestinal human microbiota in patients with colorectal cancer: a pilot study. *Front Microbiol.* 2017;8(2699):2699.
53. Vogtmann EH X, Zeller G, Sunagawa S, Voigt AY, Hercog R, Goedert JJ, Shi J, Bork P, Sinha R. Colorectal cancer and the human gut microbiome: reproducibility with whole-genome shotgun sequencing. *PLoS One.* 2016; 11(5):e0155362.
54. Wang HFL LF, Guo SH, Zeng QY, Ning F, Liu WL, Zhang G. Evaluation of antibody level against *Fusobacterium nucleatum* in the serological diagnosis of colorectal cancer. *Sci Rep.* 2016;6:10.
55. Wang TC, G, Qiu, Y.; Fei, N.; Zhang, M.; Pang, X.; Jia, W.; Cai, S.; Zhao, L. Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers. *ISME J.* 2012;6(2):320–9.
56. Wong SHK TNY, Chow TC, Luk AKC, Dai RZW, Nakatsu G, Lam TYT, Zhang L, Wu JCY, Chan FKL, Ng SSM, Wong MCS, Ng SC, Wu WKK, Yu J, Sung JJJ. Quantitation of faecal *Fusobacterium* improves faecal immunochemical test in detecting advanced colorectal neoplasia. *Gut.* 2017;66(8):1441–8.
57. Wu NY X, Zhang R, Li J, Xiao X, Hu Y, Chen Y, Yang F, Lu N, Wang Z, Luan C, Liu Y, Wang B, Xiang C, Wang Y, Zhao F, Gao GF, Wang S, Li L, Zhang H, Zhu B. Dysbiosis signature of fecal microbiota in colorectal cancer patients. *Microb Ecol.* 2013;66(2):462–70.
58. Xie YHG QY, Cai GX, Sun XM, Zou TH, Chen HM, Yu SY, Qiu YW, Gu WQ, Chen XY, Cui Y, Sun D, Liu ZJ, Cai SJ, Xu J, Chen YX, Fang JY. Fecal *Clostridium* symbiosum for noninvasive detection of early and advanced colorectal cancer: test and validation studies. *EBioMed.* 2017;25:32–40.
59. Yu JC, Y.; Fu, X.; Zhou, X.; Peng, Y.; Shi, L.; Chen, T.; Wu, Y. Invasive *Fusobacterium nucleatum* may play a role in the carcinogenesis of proximal colon cancer through the serrated neoplasia pathway. *Int J Cancer.* 2016; 139(6):1318–26.
60. Yu JF Q, Wong SH, Zhang D, Yi Liang Q, Qin Y, Tang L, Zhao H, Stenvang J, Li Y, Wang X, Chen N, Wu WKK, Al-Aama J, Nielsen HJ, Killerich P, Jensen BAH, Yau TO, Lan Z, Jia H, Li J, Xiao L, Lam TYT, Ng SC, Cheng ASL, Wong VWS, Chan FKL, Xu X, Yang H, Madsen L, Datz C, Tilg H, Brunner N, Kristiansen K, Arumugam M, Sung JJJ, Wang J. Metagenomic analysis of faecal microbiome as a tool towards targeted non-invasive biomarkers for colorectal cancer. *Gut.* 2017;66(1):70–8.
61. Tunsjo HS, Gundersen G, Rangnes F, et al. Detection of *Fusobacterium nucleatum* in stool and colonic tissues from Norwegian colorectal cancer patients (vol 38, pg 1367, 2019). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2019;39(1):213.
62. Liu X, Cheng Y, Shao L, Ling Z. Alterations of the predominant fecal microbiota and disruption of the gut mucosal barrier in patients with early-stage colorectal cancer. *Biomed Res Int.* 2020;2020:2948282. <https://doi.org/10.1155/2020/2948282>. PMID: 32280686; PMCID: PMC7114766.
63. Kashani N, Bezmin Abadi AT, Rahimi F, Foroootan M. FadA-positive *Fusobacterium nucleatum* is prevalent in biopsy specimens of Iranian patients with colorectal cancer. *N Microbes N Infect.* 2020;34:100651. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2020.100651>. PMID: 32025313; PMCID: PMC6997561.
64. Strauss J, Kaplan GG, Beck PL, et al. Invasive potential of gut mucosa-derived *Fusobacterium nucleatum* positively correlates with IBD status of the host. *Inflamm Bowel Dis.* 2011;17(9):1971–8.
65. Rezasoltani S, Asadzadeh Aghdai H, Dabiri H, et al. The association between fecal microbiota and different types of colorectal polyp as precursors of colorectal cancer. *Microb Pathog.* 2018;124:244–9.
66. McCoy AN, Araujo-Perez F, Azcarate-Peril A, et al. *Fusobacterium* is associated with colorectal adenomas. *Plos One.* 2013;8(1):8.
67. Ye XC, Wang R, Bhattacharya R, et al. *Fusobacterium nucleatum* subspecies *animalis* influences proinflammatory cytokine expression and monocyte activation in human colorectal tumors. *Cancer Prev Res.* 2017;10(7):398–409.
68. Huang Q, Peng Y, Xie F. Fecal *Fusobacterium nucleatum* for detecting colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Int J Biol Markers.* 2018;1724600818781301. <https://doi.org/10.1177/1724600818781301>. Epub ahead of print. PMID: 29968498.
69. Nishijima S, Suda W, Oshima K, et al. The gut microbiome of healthy Japanese and its microbial and functional uniqueness. *DNA Res.* 2016;23(2): 125–33.
70. Jalanka J, Salonen A, Salojarvi J, et al. Effects of bowel cleansing on the intestinal microbiota. *Gut.* 2015;64(10):1562–8.
71. Nie S, Tian B, Wang X, et al. *Fusobacterium nucleatum* subspecies identification by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2015;53(4):1399–402.
72. Ye X, Wang R, Bhattacharya R, et al. *Fusobacterium nucleatum* subspecies *animalis* influences proinflammatory cytokine expression and monocyte activation in human colorectal tumors. *Cancer Prev Res (Phila).* 2017;10(7): 398–409.
73. Komiya Y, Shimomura Y, Higurashi T, et al. Patients with colorectal cancer have identical strains of *Fusobacterium nucleatum* in their colorectal cancer and oral cavity. *Gut.* 2019;68(7):1335–7.
74. Liu D. Molecular detection of human bacterial pathogens: CRC Press; 2011.
75. Tjalsma H, Boleij A, Marchesi JR, Dutilh BE. A bacterial driver-passenger model for colorectal cancer: beyond the usual suspects. *Nat Rev Microbiol.* 2012;10(8):575–82.
76. Gao Z, Guo B, Gao R, Zhu Q, Qin H. Microbiota dysbiosis is associated with colorectal cancer. *Front Microbiol.* 2015;6:20.
77. Flynn KJ, Baxter NT, Schloss PD. Metabolic and community synergy of oral bacteria in colorectal cancer. *Msphere.* 2016;1(3):e00102–16.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions





OPEN Investigation of *Fusobacterium Nucleatum* in saliva and colorectal mucosa: a pilot study

Amal Idrissi Janati¹, Igor Karp², Daniel Von Renteln³, Mickael Bouin³, Younan Liu⁴, Simon D. Tran⁴ & Elham Emami⁵✉

As evidence has been linking the oral bacterium *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) to colorectal tumorigenesis, we aimed to produce preliminary data on the expression of *F. nucleatum* in both oral and colorectal body sites in cases diagnosed with colorectal neoplasms (CRN) and CRN-free controls. We conducted a pilot hospital-based case–control study among patients who underwent colonoscopy examination. Saliva samples and biopsies from healthy colon mucosa from CRN cases and CRN-free controls, and from tumors in cases, were collected, as well as data on periodontal condition and potential CRN risk factors. A total of 22 CRN cases and 21 CRN-free controls participated in this study, with a total of 135 biospecimens collected and analyzed by qPCR for detection and quantification of *F. nucleatum*. The detection rate of *F. nucleatum* was 95% in saliva samples and 18% in colorectal mucosa specimens. The median (95% CI) salivary *F. nucleatum* level was 0.35 (0.15–0.82) and 0.12 (0.05–0.65) in case and control groups, respectively, with a Spearman correlation of 0.64 (95% CI 0.2–0.94) between *F. nucleatum* level in saliva and healthy colorectal mucosa in controls. Our study results support the need for and the feasibility of further studies that aim to investigate the association between oral and colorectal levels of *F. nucleatum* in CRN cases and controls.

Clinical Relevance: Considering the current evidence linking *F. nucleatum* to colorectal carcinogenesis, investigating the role of oral *F. nucleatum* expression in its colorectal enrichment is crucial for colorectal cancer screening and prevention avenues.

Abbreviations

CRC	Colorectal cancer
CRN	Colorectal neoplasm
<i>F. nucleatum</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
PCR	Polymerase chain reaction
PD	Periodontal disease
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction

Colorectal cancer (CRC) is the third most commonly diagnosed cancer and the second cause of death from cancer worldwide, with over 1,900,000 newly diagnosed cases and over 900,000 deaths in 2020¹. Most CRCs arise from adenomatous polyps, which can eventually degenerate into invasive carcinomas². The potential for malignant progress depends on the histologic pattern of growth (with villous pattern being an adverse indicator), size, multiplicity of polyps, and high-grade dysplasia status³. A small proportion of CRCs develop under the alternative “serrated pathway”, from serrated polyps frequently located in the proximal colon, and are linked to the Microsatellite Instability phenotype, resulting from a deficiency of the DNA repair system².

Over the last decade, many studies have reported an enrichment of *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) in colorectal tissues and stools collected from subjects diagnosed with cancerous and even precancerous colorectal

¹Faculty of Dentistry, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada. ²Department of Epidemiology and Biostatistics, Schulich School of Medicine and Dentistry, University of Western Ontario, London, ON, Canada. ³Department of Gastroenterology, University of Montreal Hospital Centre, Montreal, QC, Canada. ⁴McGill Craniofacial Tissue Engineering and Stem Cells Laboratory, Faculty of Dentistry, McGill University, Montreal, QC, Canada. ⁵Faculty of Dental Medicine and Oral Health Sciences, McGill University, 2001 McGill College Avenue, Suite 500, Montreal, QC H3A 1G1, Canada. ✉email: elham.emami@mcgill.ca

lesions^{4–6}. The involvement of *F. nucleatum* in early colorectal carcinogenesis stages has been suggested by studies that identified the bacterium in colorectal adenomas, with a gradual enrichment of the colon with *F. nucleatum* in parallel to the adenoma-carcinoma sequence^{7–9}. Moreover, the bacterium was identified with two virulence factors promoting colorectal carcinogenesis. The first factor is FadA, an adhesin that allows *F. nucleatum* to invade human epithelial cells, activate β -catenin signaling, induce expression of the oncogenic gene, and promote the growth of colorectal tumor cells¹⁰. The second factor is a self-transporting protein Fap2, which inhibits the activity of immune cells and thus potentiates the progression of CRC¹¹.

F. nucleatum is also among the dominant species of the oral cavity^{12,13} and plays an essential role in the formation of dental plaque. It also promotes the colonization and invasion of tooth surfaces by other pathogenic species, which in turn stimulates the recruitment and activation of local immune cells, resulting in destruction of tooth-supporting tissues and progression of periodontitis^{14,15}. *F. nucleatum* is abundant in salivary samples from patients with gingivitis and chronic periodontitis¹⁶.

It has been suggested that gut enrichment with *F. nucleatum* is sourced intra-individually from the oral cavity^{17–19}, in the presence of periodontal sites, which may explain the association of periodontal disease (PD) with CRC and colorectal adenomas^{20–23}. However, the hypothesis of an intra-individual oral source of gut enrichment with *F. nucleatum* still needs to be tested, which would require epidemiologic data on paired measures of both oral and gut *F. nucleatum* levels in subjects diagnosed with colorectal neoplasms (CRN) and in CRN-free controls. To date, few studies have investigated *F. nucleatum* in saliva from subjects with CRN and CRN-free controls^{17,18,24–29}, only two studies have investigated paired saliva and colorectal specimens in these groups^{24,28}, and none has explored the link between paired oral and colorectal levels of *F. nucleatum* in subjects with CRN and CRN-free controls (see Table 1 for the studies' summary).

Objectives

This pilot study aimed to generate preliminary data on detection and quantification of *F. nucleatum* in both saliva and colorectal mucosa in subjects diagnosed with CRN and CRN-free controls. Ultimately, these preliminary data can help in designing a subsequent large epidemiological study investigating *F. nucleatum* in both oral and colorectal sites concomitantly in subjects diagnosed with CRN and CRN-free controls.

Methodology

We carried out a pilot hospital-based case-control study in the setting of University of Montreal Hospital Center in Montreal, Quebec, Canada. Participants were consecutive patients who underwent colonoscopy in the gastroenterology department between February 2018 and November 2019. Specifically, we identified patients who were scheduled for colonoscopy exam as part of CRC screening, or as a CRC diagnostic test upon recent change in bowel habits, rectal bleeding, unexplained iron deficiency anemia, or a positive Fecal Immunochemical Test. Patients with advanced colorectal adenoma or CRC were also identified among patients scheduled for an endoscopic mucosal resection technique, after they were diagnosed with polyps suspected of being neoplastic, based on a recent medical imaging or colonoscopy. Endoscopic mucosal resection is indicated for resection of the carpet-type adenomatous colonic polyp, and superficial early colorectal cancers that are well and/or moderately differentiated and limited to the mucosa³⁰.

The study inclusion criteria were: (1) aged 40–80 years; (2) resident of Montreal metropolitan area; (3) speaking French and/or English; (4) no prior diagnosis of cancer; (5) no history of hereditary colorectal disease; (6) no history of inflammatory bowel disease; and (7) no history of treatment with antibiotics within the past 3 months.

Patients with histologically confirmed advanced colorectal adenoma or CRC were included in the “case” group of CRN. Advanced colorectal adenoma refers to adenomas with high risk of malignant transformation, which is defined by one or more of the following criteria being met: 3–10 adenomas; high-grade dysplasia; tubulovillous or villous appearance; adenoma > 1 cm in diameter; serrated sessile adenomas³¹. Patients whose colonoscopy did not result in the diagnosis of CRC, colorectal advanced adenoma, or inflammatory bowel disease were included in the ‘control’ group.

Eligible patients who agreed to participate in the study were invited to complete a multi-item study questionnaire, provide a saliva sample, and provide consent for biopsy collection during colonoscopy examination. The study was approved by the University of Montreal Hospital Centre Research Ethics Committee under the number: 2017-7068, CE 16.375—MJB, and all study participants signed the study consent before undergoing their colonoscopy. Participants were confirmed for eligibility only after colonoscopy examination. Participant status (case or control) was confirmed by histological investigation.

Data collection. Participants were administered a multi-item study-questionnaire that had been used by the research team in a previous population-based case-control study, COLDENT study, investigating the association between PD and sporadic CRC³². The questionnaire included different sections on sociodemographic and medical history information, cigarette smoking, anthropometric measures, non-steroidal anti-inflammatory drugs use, oral health, dietary habits, and total physical activity^{32–36}. A life-course approach was used to document cumulative long-term history regarding cigarette smoking, specific dietary habits, and physical activity.

Thus, collected data enabled the description of study participants regarding sociodemographic characteristics, periodontal health status, as well as potential risk factors of CRN/CRC, namely age, gender, education attainment, income, body mass index, history of type II diabetes, history of CRC in first-degree relatives, history of regular use of non-steroidal anti-inflammatory drugs, lifetime cumulative cigarette smoking, consumption of red meats, processed meats, and total alcoholic drinks since early adulthood, as well as lifetime total physical activity score. Positive history of PD was defined as self-reported PD with bone loss, a previous professional

Author -year	Country	No. of CRC cases/C	Exclusion if previous ATB use (period)	Specimen type	Specimen collection time	Collection kits and storage conditions	Bacterial analysis method	<i>F. nucleatum</i> detection and level quantification outcomes
Russo et al. 2017	Italy	10/10	Yes (last 3 months)	Unstimulated saliva	1 day before surgery	Sterile tube, -80 °C	Next generation sequencing & qPCR	<i>F. nucleatum</i> level: In saliva: No significant difference between CRC cases and C In stool: No significant difference between CRC cases and C Saliva Vs stool: higher abundance in saliva than in stool, in CRC (p < 0.01) and in C (p < 0.002)
				Stool				
				Fresh tumor mucosa (in CRC cases)	During surgery	0.9% NaCl solution, -80 °C		
Güven et al. 2019	Turkey	71/77	Yes (last 3 months)	Saliva	Before cancer treatments	Centrifuge tube, -20 °C	qPCR	<i>F. nucleatum</i> detection: CRC cases: 97.2% Vs C: 96.1%; p > 0.99 <i>F. nucleatum</i> level: (in Log10 copies/ml) CRC cases: 6.89 ± 1.07 Vs C: 6.35 ± 0.78; p = 0.001
Komiya et al. 2019	Japan	14/0 (No C)	Yes (last month)	Saliva	Before/after colonoscopy	Sterile tubes, anaerobic conditions	PCR (conventional)	<i>F. nucleatum</i> detection: Saliva: 100% Tumor mucosa: 57% Saliva and tumor mucosa: 43% (<i>F. nucleatum</i> identical strain in 75% of patients with both saliva and tumor positive to <i>F. nucleatum</i>)
				Tumor mucosa	During colonoscopy			
Kato et al. 2016	USA	68 /122	--	Oral rinse	--	Commercial mouthwash (15% alcohol), -80 °C	16SrRNA gene sequencing	Dominant Phyla: Fusobacteria was not dominant, only 3.7% of all sequences No association between <i>F. nucleatum</i> and CRC
Abed et al. 2020	Israel	7/0 (No C)	No: ATB was taken just before surgery	Saliva	1 day before surgery, or just after colonoscopy	Sterile tubes, anaerobic conditions	PCR (conventional)	<i>F. nucleatum</i> detection: Saliva: 100% Tumor mucosa: 100%
				Tumor mucosa	45 min after resection			
		3/0 (No C)	Yes (just before surgery)	Saliva	1 day before surgery, or just after colonoscopy	Sterile tubes, anaerobic conditions	Whole genome sequencing	Great similarity between <i>F. nucleatum</i> strains in saliva and tumor in each subject
				Tumor mucosa	45 min after resection			
Kageyama et al. 2019	Japan	24/118	Yes (last month)	Stimulated saliva	Before cancer therapy	Sterile tube, -80 °C	16SrRNA gene sequencing	Differentially abundant OTUs: OTUs corresponding to <i>F. nucleatum</i> were not the most abundant bacteria OTUs in CRC
Yang et al. 2019	USA	231 / 462	Yes (last week)	Oral rinse	-	Commercial mouthwash, -80 °C	16S rRNA gene sequencing	<i>F. nucleatum</i> detection: CRC cases: 99.6% Vs C: 99.6% (p = 1)
Flemer et al. 2017	Ireland	99/103 + (32 polyp patients)	Yes (last month) (ATB during surgery time)	Oral swabs (45 CRC & 25 C)	-	-80 °C	16S rRNA gene amplicon sequencing	<i>F. nucleatum</i> abundance: <i>Fusobacterium</i> less abundant in oral swabs of CRC cases compared to C
				Stool	Before colonoscopy	-80 °C		
				Colorectal and tumor mucosa	During surgery or colonoscopy	RNA later at 4 °C for 12 h, then at -20 °C		

Table 1. Summary of studies that investigated *Fusobacterium nucleatum* in saliva and/or colorectal mucosa or stool in colorectal cancer (CRC) cases and controls (C). No. Number, CRC Colorectal cancer, C Controls, *F. nucleatum* *Fusobacterium nucleatum*, ATB Antibiotic, OTU Operational taxonomic unit, - Not reported.

diagnosis or treatment of PD, or history of clinical symptoms and complications of the disease, such as frequent gum bleeding, tooth mobility, or tooth loss because of PD or tooth mobility³².

Collection of biospecimens. In preparation to colonoscopy examination, all participants received the protocol for conventional bowel preparation, which consists of a diet restricted in residue for 2 days, followed by a strict liquid diet and laxatives (Bi-Peglyte[®] and Dulcolax 5 mg[®]) in the day before colonoscopy. During colonoscopy, biopsies were taken from healthy mucosa in cases and controls, and from polyps (or tumors) in cases.

Given the differences in gut microbial composition between proximal and distal colon sites, biopsies of healthy mucosa were separately collected from ascending and descending colon. Biopsies of polyps were taken from freshly excised polyps before they were sent for histopathology analysis. If a clinical decision was made during colonoscopy to delay a polyp removal and take biopsies for histopathology analysis (when a malignant lesion is suspected), an extra-biopsy was then taken for the present study analysis. All biopsies were collected in physiological solution (NaCl 0.9%), then immediately transferred to empty sterile containers.

Unstimulated saliva was collected from participants the day of colonoscopy, or a few days later (at the time of interview), by spitting in a commercial collection kit for DNA stabilization (DNA Genotek (OMNI gene•ORAL | OM-501 kit)). Participants were warned not to eat, drink, smoke, or chew gum for 30 min before saliva collection. Mucosa and saliva specimens were immediately stored at -80°C until analysis.

Bacterial DNA extraction and quantitative polymerase chain reaction (qPCR). Genomic DNA was isolated from saliva and colon tissue samples using the QIAamp DNA Mini Kit (Cat#51304, Qiagen, USA) and procedures were done according to the manufacturer's instructions. DNA content was quantified using the Bio-Rad SmartSpec 3000 Spectrophotometer (Bio-Rad, 170–2501, USA). DNA sequences of TaqMan primer and probe used to detect 16S ribosomal RNA gene of *F. nucleatum* were similar to those described by Mima et al.³⁷: *F. nucleatum* forward primer, 5'-CAACCATTACTTTAACTCTACCATGTTCA-3'; *F. nucleatum* reverse primer, 5'-GTTGACTTTACAGAAGGAGATTATGTAAAAATC-3'; *F. nucleatum* FAM probe, 5'-GTTGACTTTACAGAAGGAGATTA-3'. For human colon tissue, SLCO2A1 was used as endogenous control gene (Hs01114926_m1, FisherThermo Scientific, USA). For human saliva, the MEF2 gene (Ba042114926-s1, FisherThermo Scientific, USA) was used as reference gene. A total of 80 ng DNA was used in qPCR reaction and the total reaction volume was 10 μl . Amplification and detection of DNA was performed with the StepOnePlus Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, USA), using the following reaction conditions: 10 min at 95°C , 40 cycles of 15 s at 95°C , and 1 min at 60°C . For quality control, DNA of *F. nucleatum* strain ATCC 25,586 was used as a positive control. No DNA loading and Diethyl pyrocarbonate (DEPC) treated water were used as negative controls. *F. nucleatum* positivity was defined as a detectable level of *F. nucleatum* DNA within 40 PCR cycles, and *F. nucleatum* negativity was defined as an undetectable level with a proper amplification of human reference gene SLCO2A1. The bacterium level relative quantification is automatically provided by StepOne Plus Realtime PCR Systems (Applied Biosystems, USA) as $2^{-\Delta\text{Cq}}$ value, with ΔCq = average Cq value of *F. nucleatum* – average Cq value of total bacteria or of the reference gene.

Statistical analysis. Since this is a pilot study, the statistical analysis performed was purely exploratory, in order to help future studies in study-design decisions, including sample-size calculations.

The distributions of relevant characteristics concerning CRN risk factors in the case and control series were presented with mean and standard deviation, or median and inter-quartile range (when data seemed non-normally distributed) for continuous variables, and percentage for categorical variables. Based on data from qPCR analysis of study specimens, we calculated both frequencies of positive detection of *F. nucleatum* and medians of $2^{-\Delta\text{Cq}}$ with their corresponding 95% confidence intervals (CI), in each group (cases and controls) and each specimen type (saliva, colorectal mucosa). Also, coefficients of Spearman correlation between salivary and colorectal *F. nucleatum* levels, as well as between *F. nucleatum* levels in healthy mucosa of both the ascending and descending colon were presented with their corresponding 95% CIs. IBM SPSS Statistics version 26 was used for statistical analysis.

Ethical approval. The study was approved by the University of Montreal Hospital Centre Research Ethics Committee, and we certify that the study was performed in accordance with the ethical standards as laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments.

Informed consent. All study participants have provided an informed consent to participate in the study.

Results

A total of 75 potentially eligible participants were solicited, of whom 20 did not meet the study eligibility criteria, and 12 refused to participate. Therefore 43 patients participated to this pilot study, including 22 cases of CRN and 21 CRN-free controls.

All participants, except one case, completed the study questionnaire. Distributions of cases and controls according to sociodemographic and other relevant characteristics are presented in Table 2. In general, case and control groups were similar regarding education attainment (mostly college or university), family history of CRC, and history of diabetes. However, cases were mostly males (81%), slightly older, and less regular users of non-steroidal anti-inflammatory drugs than controls. Also, although the frequency of cigarette smoking was similar in the two groups, the median number of packs-years among smokers in the case group was much higher than for smokers in the control group. Patients in the control group consumed more red and processed meats but fewer alcoholic drinks than cases. Ten participants (7 cases and 3 controls) had a positive history of PD.

All cases had undergone polypectomy or endoscopic mucosal resection during colonoscopy, and one polyp was removed in each patient, except for two patients with two polyps removed during the same colonoscopy, bringing the total CRN specimens to 24. Characteristics of the CRN (location, histological type, and size) are presented in Table 3. Fifteen polyps were located in the proximal colon, and 9 in the distal colon. Upon the histopathology report, 15 polyps were conventional adenomas (namely, of the tubular, tubulovillous, or villous histology type), two were serrated sessile adenomas, and two early-stage CRCs. Besides specimens of CRN, biopsy specimens were collected from healthy mucosa in 17 cases (13 from ascending colon and 4 descending

Characteristic	Cases, n = 22	Controls, n = 21
Age, years Mean (SD)	63.9 (9.6)	60.4 (9.1)
Gender, n (%)		
Male	18 (82)	10 (48)
Canadian born		
Yes, n (%)	16 (73)	18 (86)
Native tongue		
French, n (%)	15 (68)	20 (95)
Education attainment		
College or university, n (%)	15 (68)	15 (71)
Living alone		
Yes, n (%)	5 (23)	11 (52)
BMI, kg/m²		
Mean (SD)	27.7 (6)	26.2 (4)
Family history of CRC		
Yes, n (%)	4 (18)	2 (10)
Regular use of NSAIDs		
Yes, n (%)	3 (14)	9 (43)
Diabetes		
Yes, n (%)	3 (14)	3 (14)
Periodontal disease		
Yes, n (%)	7 (32)	3 (14)
Personal income (CAD\$ per year)		
Median (IQR)	35 000 (40 000)	45 000 (80 000)
History of smoking		
Positive, n (%)	14 (64)	14 (67)
Cigarette smoking, packs-years		
Median (IQR)	22.5 (33.9)	14.4 (27)
Lifetime average daily total alcoholic drinks^a		
Median (IQR)	1 (1.62)	0.8 (1.2)
Lifetime average weekly servings ^b of:		
Red meats	2.1 (3.1)	3.2 (5.6)
Processed meats	1.5 (2.1)	1.8 (3.3)
Median (IQR)		
Lifetime total physical activity score, MET hour/week/year	88.7 (95.7)	70.5 (114)
Median (IQR)		

Table 2. Sociodemographic characteristics and potential colorectal neoplasm risk factors in study participants. *BMI* Body mass index, *NSAID* Non-steroidal anti-inflammatory drugs, *CAD\$* Canadian dollars, *MET* Metabolic equivalent of task; a: one drink including beer (355 ml bottle or can), wine (180 ml), or liquor (150 ml); b: 1 serving of red meats = 180–240 g, 1 serving of processed meats = 55 g; SD: Standard deviation; IQR: Interquartile range.

colon) and 21 controls (20 from ascending colon and 21 descending). Saliva samples were collected in all participants. Thus, a total of 135 study biospecimens were analyzed by qPCR for detection and quantification of *F. nucleatum* levels.

Table 4 shows the *F. nucleatum* detection rate by biospecimen type (saliva, mucosa), in case and control groups. *F. nucleatum* was detected in saliva specimens from almost all cases (21/22) and controls (20/21). *F. nucleatum* levels (measured by qPCR as $2^{-\Delta C_t}$) in saliva ranged from barely detectable (0.000004) to 3.17 and 2.65, in cases and controls respectively. The median (95% CI) of salivary *F. nucleatum* level was 0.345 (0.15–0.82) and 0.12 (0.05–0.65) in case and control groups respectively (Fig. 1); and 0.4 (0.13–0.53) in participants with positive history of PD vs 0.14 (0.18–0.73) in participants with negative history of PD.

In colorectal mucosa, *F. nucleatum* was detected in only one case (5%) within both healthy mucosa (from both ascending and descending colon specimens) and polyp, and in 9 controls' healthy mucosa specimens (ascending and/or descending colon) (43%). The polyp where *F. nucleatum* was detected was a conventional adenoma, tubular subtype, located in the proximal colon.

The level of *F. nucleatum* in controls' healthy mucosa specimens ranged from 0.116 to 2.02 in the ascending colon, and from 0.045 to 1.2 in the descending colon. *F. nucleatum* level in healthy mucosa from the case detected with *F. nucleatum* was higher than the maximum observed in controls: 2.574 in the ascending colon, 1.143 in the descending colon, and 1.952 in the polyp.

Cases	Colorectal neoplasms				Paired healthy mucosa: biopsy collection site	
	Colorectal anatomic site (segment)	Histologic type (subtype)	High grade dysplasia	Size [†] (cm)	Ascending colon	Descending colon
3	Proximal (Caecum)	SA (sessile serrated)		2	X	X
4	Proximal (Transverse)	SA (sessile serrated)		6	X	X
5	Proximal (Ascending)	CA (Tubular)		4	X	X
6	Proximal (Ascending)	CA (Tubular)		16	X	X
7	Proximal (Hepatic flexure)	CA (Tubular)	X	3		
	Proximal (Ascending)	CA (Tubular)		5		
9	Distal (Rectum)	CA (Tubular)		2.5		X
10	Proximal (Ascending)	CA (Tubulovillous)	X	5	X	X
11	Proximal (Caecum)	CA (Tubulovillous)		5	X	X
12	Proximal (Caecum)	CA (Tubulovillous)		4.5		
13	Proximal (Ascending)	CA (Tubulovillous)	X	3.5		
14	Proximal (Caecum)	CA (Tubulovillous)		5	X	X
15	Proximal (Hepatic flexure)	CA (Tubulovillous)		2	X	
16	Distal (Sigmoid)	CA (Tubulovillous)		2.5	X	X
17	Distal (Rectum)	CA (Tubulovillous)	X	10	X	X
18	Distal (Rectum)	CA (Tubulovillous)		2.5		X
19	Distal (Rectum)	CA (Tubulovillous)		5		
	Distal (Recto-sigmoid)	CA (Tubulovillous)		2		
21	Distal (Rectum)	CA (Tubulovillous)	X	7		
22	Proximal (Transverse)	CA (Villous)		4	X	
23	Proximal (Ascending)	CA (Villous)		5	X	
24	Proximal (Caecum)	CA (Villous)	X	5		X
25	Distal (Rectum)	CRC (High-grade intraepithelial epidermoid neoplasia)	X			X
26	Distal (Sigmoid)	CRC (moderately differentiated adenocarcinoma developed on a villous adenoma)	X	7		X

Table 3. Characteristics of colorectal neoplasms in case group. SA Serrated adenoma, CA Conventional adenoma, CRC colorectal cancer, X applicable. [†]The largest diameter is reported.

Specimen type	Case group (n = 22)		Control group (n = 21)	
	Total number of specimens	<i>F. nucleatum</i> detected, n	Total number of specimens	<i>F. nucleatum</i> detected, n
Saliva	22	21	21	20
Healthy mucosa-ascending colon	13	1	20	9
Healthy mucosa-descending colon	14	1	21	6
Colorectal neoplasms	24	1	NA	NA

Table 4. Detection frequency of *Fusobacterium nucleatum* by specimen type and participant group. *F. nucleatum* *Fusobacterium nucleatum*, NA non-applicable.

The Spearman correlation coefficient between *F. nucleatum* levels in saliva and mucosa samples was 0.64 (95% CI: 0.2–0.94). This was calculated for controls only, as in cases only one subject had *F. nucleatum* detected in both saliva and colorectal mucosa specimens. We also explored if there was any correlation between levels of *F. nucleatum* in healthy mucosa of both ascending and descending colon, and the corresponding Spearman correlation coefficient was calculated as 0.68 (95 CI 0.25–0.96).

Discussion

In this pilot study, we generated preliminary data on detection and quantification of *F. nucleatum* in both saliva and colorectal mucosa from patients diagnosed with CRN and CRN-free controls.

We were able to collect and analyze a total of 135 biospecimens including saliva samples and healthy-colon mucosa biopsies from most cases and controls, and CRN biopsies from all cases.

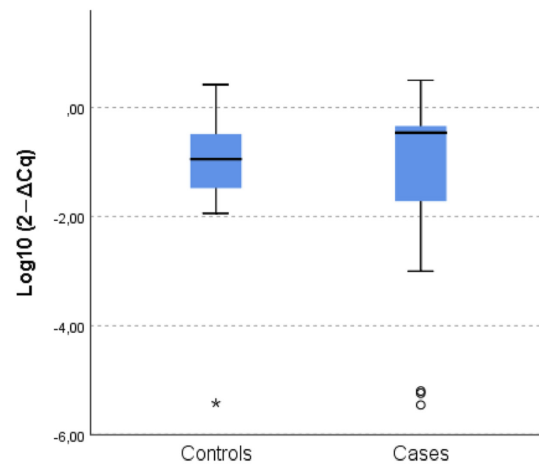


Figure 1. Relative quantification of *Fusobacterium nucleatum* level in saliva, in case and control groups. *Fusobacterium nucleatum* level in saliva specimens is measured by qPCR as $2 - \Delta Cq$.

***F. nucleatum* in saliva from CRN cases and CRN-free controls.** Analysis with qPCR showed high detection rates of *F. nucleatum* in saliva from both case and control groups, consistent with previous studies^{25,29}. *F. nucleatum* is in fact a commensal bacterium of the oral cavity, which explains its more common detection in saliva regardless of disease status. We also found a higher median level of *F. nucleatum* in saliva from the case group than from controls. A recent study in Turkey with a large number of participants (71 CRC cases and 77 controls)²⁵, and also using qPCR for microbial saliva analysis, showed a higher mean amount of *F. nucleatum* in CRC group than in control group (6.89 Log₁₀ copies / ml in the case group vs 6.35 in the control group, $p = 0.001$). However, two other studies that applied 16SrRNA gene sequencing found similar salivary levels of *F. nucleatum* relative abundance in cases and controls. The first study was conducted in the USA²⁷, and saliva was collected by oral rinse with a commercial mouthwash, among 68 CRC cases and 122 controls. The second was conducted in Japan²⁶, and included unstimulated saliva from 24 CRC cases (and other cancers of the digestive tract) and 118 controls. In both studies, *Fusobacterium* was not the dominant bacterium.

***F. nucleatum* in colorectal mucosa from CRN cases and CRN-free controls.** We found a low global detection rate of *F. nucleatum* in colorectal mucosa specimens in the controls, and it was even lower in the cases. At first, this finding might appear contradictory to previous reports finding *F. nucleatum* to be associated with CRN⁷⁻⁹. However, when considering the histologic type and the location of CRN in the patients in our study, our results can be seen to be consistent with those previous findings. Mima et al.³⁸ analyzed 1,102 colorectal tumors with qPCR, in 13% of which *F. nucleatum* was detected. When analyzing by colorectal tumor site, *F. nucleatum* detection was 15% and 9% in proximal and distal-rectal sites, respectively. Also, in a previous study by Yu et al.³⁹, where *F. nucleatum* was investigated in 280 CRNs and 20 healthy mucosa specimens from independent controls using FISH technique, that was further validated in 20 samples by *F. nucleatum*-specific PCR primers, *F. nucleatum* was prevalent in proximal serrated sessile adenomas, but rare in conventional adenomas³⁹. According to that study, the frequency of *F. nucleatum* positivity (defined as > 5 visualized probes per field) was 29% in proximal conventional adenomas, 24% in distal conventional adenomas, 79% in serrated sessile adenomas, 90% in proximal CRCs, 42% in distal CRCs, and 20% in healthy mucosa from independent controls. High abundance of invasive *F. nucleatum* (defined as > 20 visualized probes per field) was present in 5.3% of proximal conventional adenomas, 2.4% of distal conventional adenomas, 49% of serrated sessile adenomas, 71% of proximal CRCs, 38% of distal CRCs, and none of the 20 healthy mucosa samples. We point out that the CRNs sampled in our study included 12 proximal conventional adenomas, 6 distal conventional adenomas, 2 serrated sessile adenomas and 2 distal CRCs, and that *F. nucleatum* was detected in a proximal conventional adenoma.

In this pilot study, we noticed that *F. nucleatum* was usually either detected in both subject's proximal and distal colon sites (ascending and descending colon healthy mucosa specimens), or not detected at all in both colon sites. On the other hand, we noticed that *F. nucleatum* level in the ascending colon moderately correlated with level in the descending colon. This could probably be because some subjects naturally harbor *F. nucleatum* in their gut microbiome, whereas others do not, which can also explain the detection of *F. nucleatum* in healthy mucosa of some controls in many previous studies. We can also think *F. nucleatum* may be associated to the intestinal disorders that led patients in the control group to undergo colonoscopy, and that it may be particularly involved in the serrated neoplasia pathway (where sessile serrated adenomas are precursors to tumors with sporadic microsatellite instability), and less in the conventional adenoma-carcinoma sequence, as suggested by Yu et al.³⁹.

Comparison of *F. nucleatum* in saliva and in colorectal mucosa within CRN cases and CRN-free controls.

Detection rate of *F. nucleatum* in colorectal mucosa was much lower than in saliva, and few subjects had *F. nucleatum* detected in both sites. We found a moderate correlation between *F. nucleatum* level in saliva and healthy proximal colorectal mucosa in controls, but we could not explore this correlation in cases as *F. nucleatum* was detected in colorectal mucosa specimens of only one CRN case. The only data that could serve as comparison to our finding came from two previous studies that investigated *F. nucleatum* in a few samples of saliva and colorectal tumors in the same CRC cases, without control group and without bacterium quantification, as only conventional PCR (non-quantitative) was used^{18,28}. *F. nucleatum* was detected less commonly in mucosa samples than in saliva in the first study (in 8/14 tumors and 14/14 saliva)¹⁸, and in all specimens in the second one (in 10 tumors and 10 saliva)²⁸.

In conclusion, concerning the objectives of the pilot study, our study findings provide potentially useful preliminary data on expression of *F. nucleatum* in both oral and colorectal body sites in patients diagnosed with CRN and CRN-free controls. Further studies that aim to assess the association between oral and colorectal levels of *F. nucleatum* in CRN cases are still needed and can draw from our methods and results in making study-design decisions, including the inclusion/exclusion criteria, selection of study participants, data collection instruments and analysis, and sample size calculation. They also should pay attention to both the histologic type and site of CRNs to be included, and optimally focus on proximal location and adenoma of sessile type. To quantify *F. nucleatum* in colorectal healthy mucosa, there may no longer be a need for collection and analysis of two different specimens from both proximal and distal colon sites, as one specimen (preferably from the proximal colon) can be sufficiently informative, especially given that some patients may not consent to provide biopsies from healthy mucosa even if they agree to provide specimens of their tumor, which they know will be excised anyway. Finally, studies should generally plan a quantitative microbial analysis of *F. nucleatum* in saliva specimens: non-quantitative techniques (such as conventional PCR, for example) only assess the presence of the bacterium.

Our preliminary results encourage future research to investigate oral and colorectal enrichment in *F. nucleatum*, in patients with precancerous lesions as well as cancerous lesions at different stages of colorectal malignant transformation, to overcome the difficulty of conducting prospective research on the causal role of the oral bacterium *F. nucleatum* in colorectal carcinogenesis. If the hypothesis of an intra-individual oral origin of the colorectal enrichment in *F. nucleatum* is confirmed, this may have potential impact on colorectal cancer prevention, diagnosis, and treatment. Thus, many studies are investigating the potential of candidate fecal bacteria as biomarkers for early detection of adenomatous polyps and colon cancer^{40,41}. Under the same perspective, saliva can be a promising non-invasive screening tool for colorectal adenoma and cancer. Also, and more importantly, investigating the association between the oral and colorectal levels of *F. nucleatum* in colorectal neoplasms patients can advance the understanding of the mechanism(s) underlying the connection between periodontal disease and colorectal cancer, which may involve the translocation of periodontal pathogens to the gut and the release of their pro-oncogen and pro-inflammatory virulence products. Periodontal disease is suggested as a risk factor for periodontal disease⁴², but the mechanisms of the association have yet to be elucidated. Thus, a subsequent, larger epidemiological study on this topic is highly recommended.

Received: 24 December 2021; Accepted: 25 March 2022

Published online: 04 April 2022

References

- Sung, H. *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* **71**(3), 209–249 (2021).
- Keum, N. & Giovannucci, E. Global burden of colorectal cancer: Emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **16**(12), 713–732 (2019).
- Pecori, S. *et al.* Pathological Features of Sporadic Colonic Adenoma. In *Intestinal Polyps and Polyposis: From Genetics to Treatment and Follow-up* 19–47 (Springer, 2009).
- Flanagan, L. *et al.* Fusobacterium nucleatum associates with stages of colorectal neoplasia development, colorectal cancer and disease outcome. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **33**(8), 1381–1390 (2014).
- Yu, Y. N. *et al.* Berberine may rescue Fusobacterium nucleatum-induced colorectal tumorigenesis by modulating the tumor microenvironment. *Oncotarget* **6**(31), 32013–32026 (2015).
- Wong, S. H. *et al.* Quantification of faecal Fusobacterium improves faecal immunochemical test in detecting advanced colorectal neoplasia. *Gut* **66**(8), 1441–1448 (2017).
- Rezasoltani, S. *et al.* The association between fecal microbiota and different types of colorectal polyp as precursors of colorectal cancer. *Microb. Pathog.* **124**, 244–249 (2018).
- McCoy, A. N. *et al.* Fusobacterium Is associated with colorectal adenomas. *PLoS ONE* **8**(1), 8 (2013).
- Ye, X. C. *et al.* Fusobacterium nucleatum subspecies animalis influences proinflammatory cytokine expression and monocyte activation in human colorectal tumors. *Cancer Prev. Res.* **10**(7), 398–409 (2017).
- Rubinstein, M. R. *et al.* Fusobacterium nucleatum promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/ β -catenin signaling via its FadA adhesin. *Cell Host Microbe*. **14**(2), 195–206 (2013).
- Gur, C. *et al.* Binding of the Pap2 protein of Fusobacterium nucleatum to human inhibitory receptor TIGIT protects tumors from immune cell attack. *Immunity* **42**(2), 344–355 (2015).
- Kapatral, V. *et al.* Genome sequence and analysis of the oral bacterium Fusobacterium nucleatum strain ATCC 25586. *J. Bacteriol.* **184**(7), 2005–2018 (2002).
- Han, Y. W. Fusobacterium nucleatum interaction with host cells. In *Oral Microbial Communities: Genomic Inquiry and Interspecies Communication* (ed. Kolenbrander, P. E.) 221–223 (Springer, 2011).
- Dumitrescu, A. L. & Ohara, M. Periodontal microbiology. In *Etiology and Pathogenesis Of Periodontal Disease* 39–73 (Springer, Berlin, 2010).
- Signat, B., Roques, R., Poulet, P. & Duffaut, D. Fusobacterium nucleatum in periodontal health and disease. *Curr. Issues Mol. Biol.* **13**(2), 25–36 (2011).
- Saygun, I. *et al.* Salivary infectious agents and periodontal disease status. *J. Periodontol. Res.* **46**(2), 235–239 (2011).

17. Abed, J. *et al.* Colon cancer-associated *Fusobacterium nucleatum* may originate from the oral cavity and reach colon tumors via the circulatory system. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **10**(400), 10 (2020).
18. Komiya, Y. *et al.* Patients with colorectal cancer have identical strains of *Fusobacterium nucleatum* in their colorectal cancer and oral cavity. *Gut* **68**(7), 1335–1337 (2019).
19. Schmidt, T.S. *et al.* 2019. Extensive transmission of microbes along the gastrointestinal tract. *Elife* **8**.
20. Xuan, K. *et al.* Is periodontal disease associated with increased risk of colorectal cancer? A meta-analysis. *Int. J. Dent. Hyg* **2**, 2. <https://doi.org/10.1111/idh.12483> (2020).
21. Lee, D. *et al.* Association between oral health and colorectal adenoma in a screening population. *Medicine (Baltimore)* **97**(37), e12244. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000012244> (2018).
22. Lo, C. H. *et al.* Periodontal disease, tooth loss, and risk of serrated polyps and conventional adenomas. *Cancer Prev. Res. (Phila)*. **13**(8), 699–706 (2020).
23. Kim, G. W. *et al.* Periodontitis is associated with an increased risk for proximal colorectal neoplasms. *Sci. Rep.* **9**(1), 7528 (2019).
24. Flemer, B. *et al.* The oral microbiota in colorectal cancer is distinctive and predictive. *Gut* **67**(8), 1454–1463 (2018).
25. Guven, D. C. *et al.* Analysis of *Fusobacterium nucleatum* and *Streptococcus gallolyticus* in saliva of colorectal cancer patients. *Biomark. Med.* **13**(9), 725–735 (2019).
26. Kageyama, S. *et al.* Characteristics of the salivary microbiota in patients with various digestive tract cancers. *Front. Microbiol.* **10**, 1780 (2019).
27. Kato, I. *et al.* Oral microbiome and history of smoking and colorectal cancer. *J. Epidemiol. Res.* **2**(2), 92–101 (2016).
28. Russo, E. *et al.* Preliminary comparison of oral and intestinal human microbiota in patients with colorectal cancer: a pilot study. *Front. Microbiol.* **8**, 2699 (2017).
29. Yang, Y. *et al.* Prospective study of oral microbiome and colorectal cancer risk in low-income and African American populations. *Int. J. Cancer.* **144**(10), 2381–2389 (2019).
30. Mannath, J. & Ragunath, K. Endoscopic mucosal resection: Who and how?. *Therap. Adv. Gastroenterol.* **4**(5), 275–282 (2011).
31. Imperiale, T. F. *et al.* Multitarget stool DNA testing for colorectal-cancer screening. *N. Engl. J. Med.* **370**(14), 1287–1297 (2014).
32. Idrissi Janati, A., Karp, I., Latulippe, J.-F., Charlebois, P. & Emami, E. Periodontal disease as a risk factor for sporadic colorectal cancer: Results from COLDENT study. *Cancer Causes Control* **33**(3), 463–472 (2022).
33. Friedenreich, C. M., Courneya, K. S. & Bryant, H. E. The lifetime total physical activity questionnaire: Development and reliability. *Med. Sci. Sports Exerc.* **30**(2), 266–274 (1998).
34. Willett, W. C., Reynolds, R. D., Cottrell-Hoehner, S., Sampson, L. & Browne, M. L. Validation of a semi-quantitative food frequency questionnaire: Comparison with a 1-year diet record. *J. Am. Diet. Assoc.* **87**(1), 43–47 (1987).
35. Cade, J., Thompson, R., Burley, V. & Warm, D. Development, validation and utilisation of food-frequency questionnaires: A review. *Public Health Nutr.* **5**(4), 567–587 (2002).
36. Siemiatycki, J., Krewski, D., Franco, E. & Kaiserman, M. Associations between cigarette smoking and each of 21 types of cancer: A multi-site case-control study. *Int. J. Epidemiol.* **24**(3), 504–514 (1995).
37. Mima, K. *et al.* *Fusobacterium nucleatum* and T cells in colorectal carcinoma. *JAMA Oncol.* **1**(5), 653–661 (2015).
38. Mima, K. *et al.* *Fusobacterium nucleatum* in colorectal carcinoma tissue according to tumor location. *Clin. Transl. Gastroenterol.* **7**(11), e200 (2016).
39. Yu, J. *et al.* Invasive *Fusobacterium nucleatum* may play a role in the carcinogenesis of proximal colon cancer through the serrated neoplasia pathway. *Int. J. Cancer.* **139**(6), 1318–1326 (2016).
40. Rezasoltani, S. *et al.* Applying simple linear combination, multiple logistic and factor analysis methods for candidate fecal bacteria as novel biomarkers for early detection of adenomatous polyps and colon cancer. *J. Microbiol. Methods.* **155**, 82–88 (2018).
41. Suehiro, Y. *et al.* Highly sensitive stool DNA testing of *Fusobacterium nucleatum* as a marker for detection of colorectal tumours in a Japanese population. *Ann. Clin. Biochem.* **54**(1), 86–91 (2017).
42. Xuan, K. *et al.* Is periodontal disease associated with increased risk of colorectal cancer? A meta-analysis. *Int. J. Dent. Hyg.* **19**(1), 50–61 (2021).

Acknowledgements

We thank all study participants, as well as Dr Sacha Sidani and Dr Simon Bouchard who helped in participant identification and biopsy collection. We also thank the Network for Oral and Bone Health Research for its financial support to publication costs.

Author contributions

A.I.J. contributed to conception, design, data acquisition, and interpretation, and drafted and critically revised the manuscript. I.K. and E.E. contributed to conception, design and interpretation, and critically revised the manuscript. D.V.R. and M.B. contributed to conception and biopsy collection, and critically revised the manuscript. Y.L. and S.D.T. contributed to conception, performed microbial analysis, and critically revised the manuscript. All authors gave their final approval and agreed to be accountable for all aspects of the work.

Funding

Idrissi Janati, A was supported by a doctoral scholarship from the Fonds de Recherche du Québec-Santé (FRQ-S).

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Correspondence and requests for materials should be addressed to E.E.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2022

