

Évaluation du pouvoir transformant de l'exposition chronique à un cocktail de pesticides sur les cellules épithéliales coliques normale et cancéreuse : rôle du microbiote et de la signature calcique.

I. ARGUMENTAIRES DU PROJET ET ETAT DE L'ART

Les pesticides comprennent les insecticides, herbicides, fongicides ou fumigants. Ils sont, en outre, sous-classés, en fonction de leur mécanisme d'action, comme les organochlorés, les organophosphorés, les carbamides, les pyréthriinoïdes et autres (Akashe et al., 2018). L'utilisation massive de pesticides constitue un grave problème de santé publique dans le monde, causant environ 300 000 décès chaque année. La France et en particulier la région Hauts-de-France est une région fortement agricole et consommatrice de pesticides (INSERM, 2013). On estime que dans les années à venir, la quantité de pesticides rejetés dans l'environnement sera encore plus importante, en raison de la nécessité de fournir de la nourriture à une population mondiale croissante, ainsi que de faire face à diverses maladies infectieuses. Par conséquent, toutes les populations humaines seront inévitablement exposées à cette classe de produits chimiques, directement ou indirectement. Malgré les dispositions mises en place pour limiter l'utilisation de pesticides seuls ou en cocktails, l'exposition de ces xénobiotiques reste importante. Ces mélanges de résidus de pesticides peuvent donner lieu à des impacts sanitaires difficilement prévisibles actuellement, ce qui fait de la question de l'exposition chronique des cocktails à des faibles doses un enjeu de santé publique. Chaque individu est exposé au cours de sa vie à une multitude de pesticides, majoritairement par l'intermédiaire de l'alimentation. Le tube digestif est le premier organe à entrer en contact avec les résidus de pesticides. Les pesticides sont clairement identifiés comme des perturbateurs de l'homéostasie tissulaire, avec un risque évident sur la santé humaine à long terme. En effet, plusieurs études, à partir de modèles animaux et de cohortes observationnelles, ont établi un lien entre l'exposition aux pesticides et le développement de nombreuses pathologies notamment le cancer (Baudry et al., 2018; Calaf, 2021). La dernière expertise collective de l'INSERM de 2021 conclut qu'il existe une présomption forte d'un lien entre l'exposition aux pesticides dans un cadre professionnel et le cancer de la prostate, les lymphomes non hodgkiniens et le myélome multiple (Inserm, 2021). Il existe également une présomption forte d'une augmentation du risque de leucémies et de tumeurs du système nerveux central chez l'enfant lors d'une exposition au cours de l'enfance ou durant la grossesse. Cependant, très peu de données expérimentales sont disponibles sur d'autres cancers tels que le cancer colorectal (CCR). Avec près de 45 000 nouveaux cas et 18 000 décès par an, le CCR se place au troisième rang des cancers les plus fréquents et reste le second le plus meurtrier en France. Des études ont démontré que les patients atteints de CCR présentent des taux sanguins de résidus de pesticides plus élevés que la population générale, notamment concernant la famille des organochlorés et organophosphorés (Abolhassani et al., 2019; Lee et al., 2018; Park et al., 2021). De plus, une récente revue a permis de mettre en évidence une liste spécifique de pesticides entraînant un risque plus important de développer un CCR (Matich et al., 2021). La cohorte AGRICAN a démontré que les agriculteurs français cultivant des légumes et des fruits et donc fortement exposés aux pesticides présentent un risque augmenté de développer un CCR (Talibov et al., 2022). *In vitro*, l'exposition des cellules d'adénocarcinome du colon au chlorpyrifos et au dichlorodiphényltrichloroéthane, augmente, respectivement, la prolifération cellulaire via la voie de signalisation EGFR/ERK1/2 (Suriyo et al., 2015) et le stress oxydant (Song et al., 2014). Finalement, une étude récente a montré que l'exposition de lignées cellulaires de CCR à un cocktail de 5 pesticides parmi les plus retrouvés dans les résidus alimentaires des français en 2006 entraîne des lésions de l'ADN et des modifications du

cytosquelette (Mechanisms et al., 2021). Tous ces éléments suggèrent fortement l'impact des pesticides sur le processus de la cancérogénèse du colon.

Au niveau cellulaire, le traitement chronique par des pesticides s'accompagne d'une réaction inflammatoire, (augmentation de la production de cytokines inflammatoires : TNF- α , interleukine-6 (IL-6) et interleukine-1 β (IL-1 β) (Jung et al., 2015; Sule et al., 2022) la production de ROS (dérivés réactifs de l'oxygène tels que radicaux libres) (Uchendu et al., 2018), l'augmentation de l'activité des caspase-3 et 9 (Ojha & Gupta et al., 2015) et de la concentration du calcium cytoplasmique (Costas-Ferreira & Faro, 2021). En effet, la dérégulation de l'homéostasie du calcium constitue un des mécanismes d'action des insecticides organophosphorés (Costas-Ferreira & Faro, 2021; Ding et al., 2017; Meijer et al., 2014). Plusieurs travaux ont montré un effet protecteur des inhibiteurs de canaux calciques et/ou de la concentration du calcium intracellulaire sur la neurotoxicité induite par le dichlorvos (Choudhary & Gill, 2001; Hsu et al., 2019; Meijer et al., 2015; Raheja & Gill, et al., 2002).

L'altération de la signature calcique est aussi observée dans le développement et la progression du CCR (Pérez-Riesgo et al., 2017; Villalobos et al., 2019). Ce remodelage de l'homéostasie intracellulaire du Ca²⁺ favorise la prolifération, la migration et la survie des cellules CCR. L'expression des canaux calciques ORAI (Orai1, Orai2, Orai3), TRP (TRPC1) et des protéines STIM1 (protéine localisée au niveau du réticulum endoplasmique responsable de l'activation des canaux ORAI et de TRPC1) est augmentée par rapport à la lignée cellulaire épithéliale de la muqueuse du côlon humain normal NCM460 (Sanchez-collado et al., 2021). La surexpression de STIM1 est associée à une agressivité tumorale supérieure associant une augmentation de la taille tumorale, du risque de propagation métastatique lymphatique et une survie plus courte des patients (J. Y. Wang et al., 2015 ; Zhang et al., 2016). De plus, Orai1 et TRPC1 sont aussi impliqués dans la réaction inflammatoire du côlon (Villalobos et al., 2019; J. Y. Wang et al., 2012).

Un autre élément-clé de la régulation des contaminants alimentaires est le microbiote intestinal (MI), c'est-à-dire les bactéries qui colonisent le tube digestif et qui dialoguent, entre autres, avec le cerveau (Parker et al., 2020). Cet écosystème microbien intestinal est devenu aussi un sujet brûlant en recherche en raison de sa contribution à de nombreuses pathologies tels que les maladies inflammatoires ou le cancer (Bander et al., 2020; Y. Wang & Li, 2022). Dans des conditions normales et saines, le mucus est une barrière étanche de cellules épithéliales qui confinent la plupart des microbes à la lumière intestinale (Ghasemi-Niri et al., 2016; Qiu et al., 2020). L'augmentation du stress oxydatif et des marqueurs inflammatoires, engendrée par l'action des pesticides sur le MI serait à l'origine d'une inflammation chronique, d'une altération du phénotype cellulaire (Matich et al., 2021) et d'une résistance à la chimiothérapie (Doğanlar et al., 2020).

Ainsi, nous émettons l'hypothèse que l'exposition chronique à des concentrations subliminaires d'un cocktail de pesticides (**chlorpyrifos, glyphosate et l'imazalil**) les plus retrouvés dans notre alimentation pourrait induire une dysbiose intestinale, une perméabilité intestinale, une translocation bactérienne et la dérégulation de l'expression des transporteurs calciques favorisant l'apparition de lésions intraépithéliales inflammatoires et donc le risque de CCR. Nous déterminerons aussi la manière dont les acides gras à chaînes courtes, pourraient atténuer significativement les dysfonctionnements constatés tant au niveau du MI que sur le phénotype épithélial.

II. ETAT DES TRAVAUX ET OBJECTIFS

Ce projet s'inscrit dans la continuité d'un programme de recherche initié par le laboratoire PERITOX depuis 2010. Il concerne l'impact de l'exposition aux pesticides sur la santé en particulier les changements de la fonction intestinale. Nos études expérimentales, *in vivo* (rat) et *in vitro* (SHIME®), ont mis en évidence que l'exposition aux résidus de pesticides alimentaires, notamment le chlorpyrifos (CPF), déséquilibre le microbiote (dysbiose intestinale) en faveur des bactéries potentiellement pathogènes, induit une translocation bactérienne, module la perméabilité de la barrière intestinale et génère ainsi un passage non contrôlé et permissif non seulement d'agents pro-inflammatoires (cytokines, interleukines, bactéries vivantes, composants bactériens) (Guibourdenche et al., 2021; Joly Condette et al., 2015; N. Djekkoun et al., 2022; Reygner et al., 2016) mais aussi de neurotransmetteurs bactériens provenant de l'environnement du MI et des cellules immunitaires qui peuvent compromettre l'homéostasie intestinale conduisant à des troubles inflammatoires et neurologiques (Dinan & Cryan, 2017; Putignani et al., 2016).

Dans le but de contrer les effets des pesticides, une stratégie de prévention utilisant un prébiotique, l'inuline, a été mise en place. Les résultats montrent que l'exposition au CPF perturbe l'équilibre du MI (dysbiose intestinale), altérant la perméabilité de la BI et induisant une translocation bactérienne. La supplémentation en inuline rétablit l'équilibre du MI et prévient les effets du pesticide sur la BI et BHE (Joly Condette et al., 2022, Maria Abou Diwan et al., 2024 et 2025).

Au niveau du LPCM, dans un premier temps, nous avons évalué l'effet du traitement chronique au CPF sur l'expression (par qPCR) et activité (par imagerie calcique) des canaux TRP sensibles aux ROS. **Seul l'expression et l'activité de TRPA1 ont été affectée.** En effet, nos résultats montrent que les cellules normales et cancéreuses expriment TRPA1 ; avec une augmentation de l'expression de 46% dans les cellules cancéreuses HTC116 (Fig. 1A). L'exposition chronique des cellules normales au CPF (2 μ M) augmente l'expression de TRPA1 (Fig. 1A), la viabilité, mesurée en MTT ($24,6 \pm 4,8$ à 7 j, $39,4 \pm 3,7$ à 14 j, $45 \pm 3,6$ à 21 j, et $51 \pm 2,7\%$ à 28 jours, Fig. 1B, N=6), et la migration cellulaire mesurée en chambres de Boyden ($150 \pm 14,6\%$ à 21j, Fig. 1C, N=5, $p < 0.001$). La concentration du calcium ($[Ca^{2+}]_i$) basale est plus importante dans les cellules traitées par CPF (ratio de $1,14 \pm 0,02$ pour les cellules traitées (n=150 cellules) par rapport à $0,85 \pm 0,03$ dans les cellules non traitées ; 186 cellules, Fig. 1D, N=3, $p < 0,001$). La perfusion du CPF (2 μ M) augmente la $[Ca^{2+}]_i$ uniquement en présence du Ca^{2+} extracellulaire (2mM Ca^{2+} , (2Ca), Fig. 1E, n=300 cellules, N=5, $p < 0,001$) suggérant l'activation d'un canal calcique localisé au niveau de la membrane plasmique. La cinétique du signal calcique suggère l'implication du TRPA1. En effet, la perfusion d'un antagoniste spécifique du TRPA1 (HC-030031) à une concentration de 10 μ M, abolit l'effet CPF sur l'entrée calcique (Fig. 1F, n=300 cellules, N=4, $p < 0.001$). L'incubation des cellules normales en présence de CPF (2, 10, 50 μ M) seul ou en présence de HC-030031 (10 μ M) pendant 21 jours réduit drastiquement la viabilité (Fig. 1G, N=4, $p < 0,001$), et la migration induite par le CPF (Fig. 1H, N=4, $p < 0,001$).

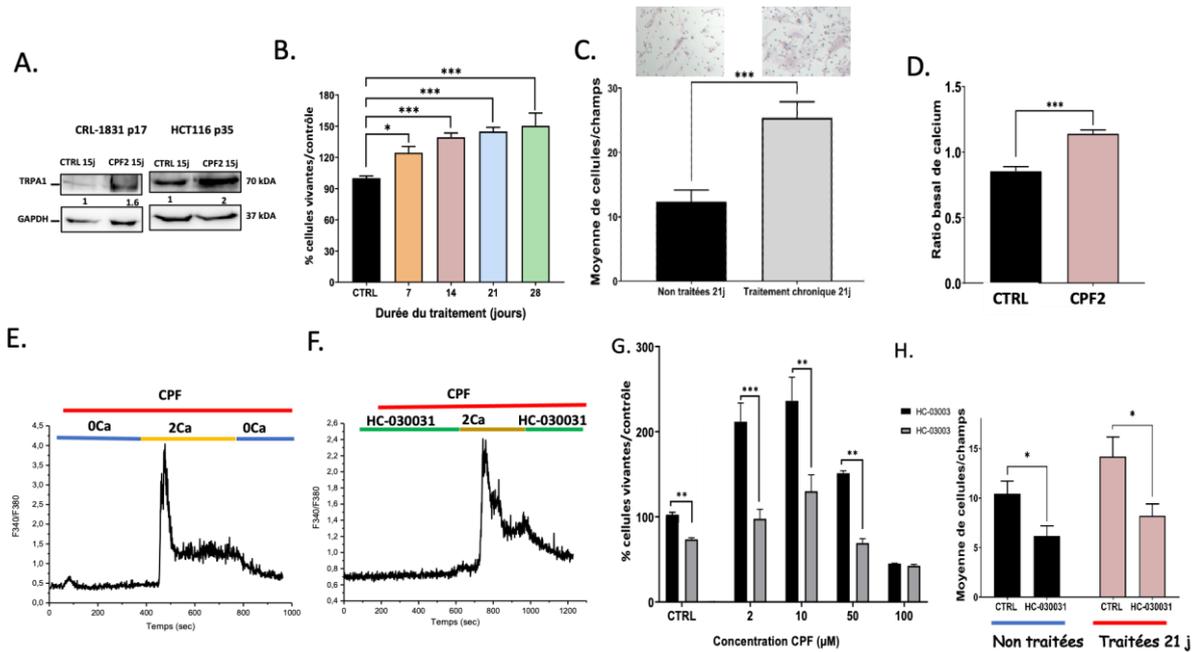


Figure 1 : L'exposition chronique des cellules épithéliales coliques normales au CPF favorise la prolifération et la migration en ciblant TRPA1. A) Effet d'un traitement chronique de CPF (2 μM) sur l'expression de TRPA1, la viabilité (B) et la migration (C). Le CPF augmente la $[Ca^{2+}]_i$ (D), en favorisant une entrée calcique (E), via TRPA1 (F). L'augmentation de la viabilité cellulaire par le CPF (2, 10 et 50 μM) pendant 21 jours, est antagonisée par inhibiteur de TRPA1 (HC-030031, 10 μM) (G), ainsi que la migration (H). *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, (N= 3-6).

L'exposition chronique des cellules cancéreuses HTC116 au CPF (2 μM) induit une forte augmentation de la migration ($104,8 \pm 14,5$ à 21j, Fig. 2A, N=4, $p < 0,01$) et une légère augmentation de la viabilité cellulaire à 7 et 14 j (Fig. 2B, N=4, $p < 0,001$). De plus, les cellules exposées au CPF sont peu sensibles à l'effet du 5-FU (25 μM, baisse de $15 \pm 3\%$ au lieu de $47,6 \pm 6\%$ pour les cellules non traitées, N=4, $p < 0,001$, Fig. 2C).

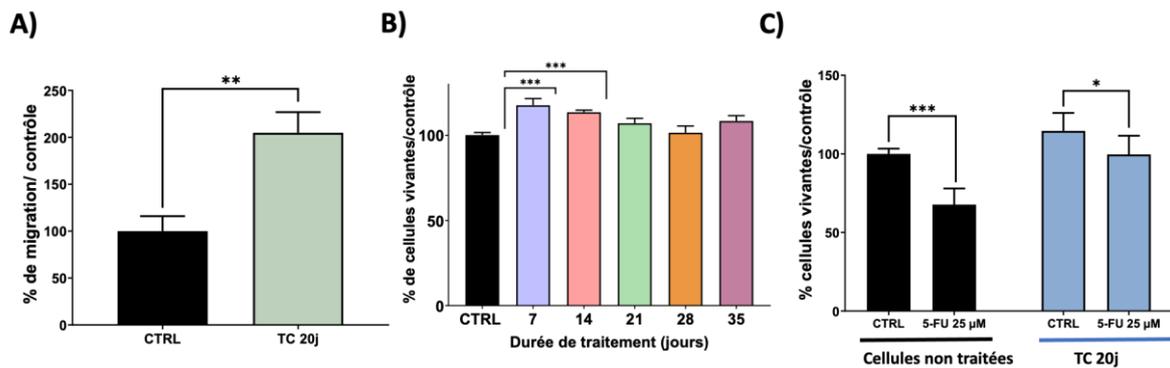


Figure 2 : Impact du traitement chronique de CPF (2 μM) sur les cellules cancéreuses HTC116. A) Effet sur la migration, la viabilité cellulaire de base (B) et en présence du 5-FU (25 μM). TC : traitement chronique pendant 20 jours. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ et * $p < 0,05$ (N=4).

En parallèle des études de l'équipe PériTox (voir plus haut), nous avons évalué l'effet des métabolites du MI-CPF sur les cellules cancéreuses. Nos premiers résultats montrent que l'exposition chronique, 1 mois, au MI-CPF (dilution au 1/1000, filtré) augmente la viabilité

(Fig. 3A, $N=3$, $p<0,01$), la migration (Fig. 3B, côlon ascendant, Fig. 3C ; côlon descendant, $N=3$, $p<0,001$) et induit des oscillations calciques des cellules HTC116 (Fig. 3D, $N=3$). D'une façon importante, ces effets sont observés avec les surnageants du côlon ascendant et descendant mais pas le côlon transverse.

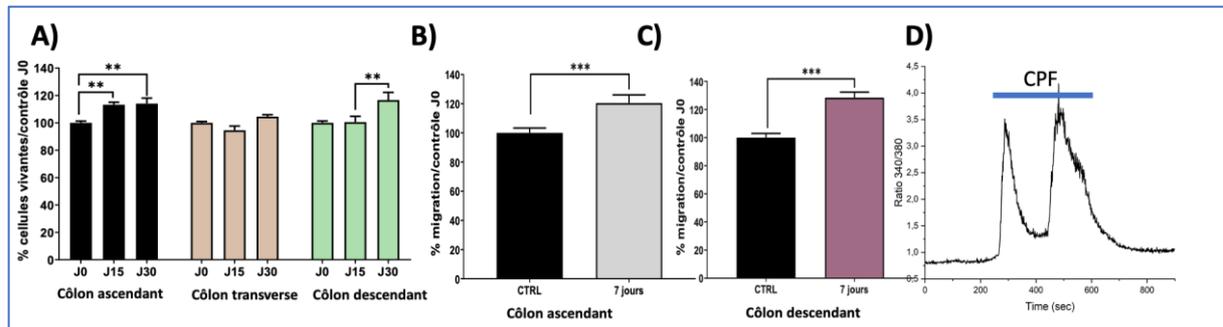


Figure 3 : Impact de l'exposition des cellules cancéreuses, pendant 7 jours, aux métabolites du MI de volontaires sains, traités 30j par le CPF. Les surnageants du côlon (ascendant, transverse et descendant) contrôles (J0) et exposés au CPF pendant 30 jours ont été filtrés. Les cellules ont été incubées avec les surnageants dilués au 1/1000 dans le milieu de culture. A) effet sur la viabilité cellulaire pendant 30 jours, chaque semaine, le milieu de culture a été changé et la viabilité mesurée ($N=3$, $p<0,01$). Effet des surnageants, même dilution, sur la migration (B, côlon ascendant, $N=3$, $p<0,001$) (C, côlon descendant, $N=3$, $p<0,001$). D) La perfusion des surnageants dilués au 1/1000 induit des oscillations calciques en présence de 2 mM de calcium dans le milieu extracellulaire ($N=3$).

L'ensemble de nos résultats est en faveur d'une forte implication de la signature calcique notamment du canal TRPA1 dans l'induction des effets délétères du CPF.

L'objectif de ce projet de thèse est : (i) évaluer l'effet direct du cocktail de pesticides sur la biologie des cellules normales et cancéreuse du côlon, (ii) caractériser la signature calcique impliquée dans l'acquisition du phénotype prolifératif et migratoire des cellules normales et l'agressivité du CCR suite à l'exposition chronique aux pesticides, (iii) Caractérisation des voies de signalisation sous-jacentes, (iv) évaluer les modifications du microbiote intestinal (MI) de volontaires sains et de patients atteints de CRR exposé aux pesticides, et étude de son impact sur la barrière intestinale et les caractéristiques biologiques des cellules normales et cancéreuses coliques (v) proposer une stratégie nutritionnelle préventive via les prébiotiques afin de contre carer les effets délétères de ces xénobiotiques.

Ce projet propose plusieurs voies thérapeutiques potentielles :

1. Préventives, en intervenant sur le microbiote : Prevention des effets cancérogènes des pesticides via le microbiote dans le contexte que le microbiote intestinal module la réponse des cellules coliques aux agressions environnementales, l'hypothèse thérapeutique : une modulation du microbiote pourrait prévenir ou atténuer les effets transformants du cocktail de pesticides

2. Ciblées, en attaquant les dérégulations calciques induites par l'expositions aux pesticides : Ciblage de la signature calcique dérégulée dans le contexte que l'exposition

chronique aux pesticides pourrait induire une perturbation du signal calcique, essentielle à la survie, prolifération et migration des cellules cancéreuses, l'Hypothèse thérapeutiques : ces altérations rendent les cellules cancéreuses vulnérables à un ciblage pharmacologique des voies calcique.

3. Restauration, traitement par de agents épigénétiques dans l'hypothèse de modifications épigénétiques durables, mais potentiellement réversibles, par l'exposition aux pesticides. Ces changements peuvent être ciblés par des modulateurs épigénétiques pour restaurer l'expression de gènes suppresseurs de tumeur et/ou sensibiliser les cellules cancéreuses à d'autres traitements.

III. METHODOLOGIES

Ce projet exige des approches multidisciplinaires nécessitant des échantillons humains, des lignées cellulaires normales, ainsi qu'une grande variété de techniques expérimentales. Toutes ces techniques sont utilisées en routine dans les laboratoires LPCM, PériTox ou au niveau de la plateforme technique CRRBM (Centre de Ressources Régionales en Biologie Moléculaire). Le Laboratoire au Liban dispose aussi d'un grand éventuel de techniques de biologie moléculaire, cellulaire, biochimie, culture cellulaires, immunohistochimie offrant à le (la) doctorante tous les outils complémentaires pour compléter et/ou réaliser ses expériences in vitro sur les cellules normales et cancéreuses. Il dispose aussi d'une plateforme permettant de faire l'étude épigénétique.

Le laboratoire PériTox (UMR I 01, UPJV, Amiens) se consacre à l'étude de l'impact des facteurs environnementaux, notamment les pesticides, sur le développement périnatal et les fonctions physiologiques vitales impliquées dans le bilan énergétique des populations sensibles, notamment les femmes enceintes et les enfants. Le laboratoire dispose et maîtrise la plateforme d'intestin artificiel adulte « SHIME® » qui permettra de simuler le MI et le suivi de l'exposition des cocktails de pesticides en supplémentation ou non avec le prébiotique. Cette équipe dispose également de toute l'infrastructure pour l'analyse de la culture microbienne (chambre anaérobie, PSM...) ainsi qu'une plateforme pour la biologie cellulaire et moléculaire.

Le LPCM (UR-4667, UPJV, Amiens) possède une expertise dans le domaine de la cancérogenèse et en particulier du changement de la signature ionique dans différents types de cancer dont le cancer colorectal. Il possède des compétences scientifiques et techniques pour l'étude de la biologie de la cellule cancéreuse (prolifération, migration, invasion, apoptose, autophagie et la morphologie...), de l'expression et de la fonctionnalité des canaux ioniques, ainsi que l'étude des voies de signalisation. Il dispose des outils nécessaires à l'analyse des processus cellulaires, en conditions normale et traitées (salles de culture cellulaire, FACS, Incucyte S3, 2 plateformes de biologie cellulaire et moléculaire, 1 plateforme de biochimie et d'immunohistochimie, Microscopes épi-fluorescents, 2 stations d'imagerie calcique, et de patch-calmp...). Il a aussi accès au confocal de la plateforme CRRBM de l'UPJV localisée sur le même site.

- Choix pesticides : Les pesticides envisagés, sont le chlorpyrifos ; insecticide, l'imazalil (fongicide), et le glyphosate (herbicide). Le rapport de 2019 de l'Union Européenne montre que ces résidus de pesticides sont présents dans les produits alimentaires de notre quotidien (Carrasco Cabrera & Medina Pastor, 2021; Nougadère et al., 2014). Le chlorpyrifos interfère avec le système endocrinien et dérégule la composition du microbiote intestinal (Li et al., 2019). Cette dysbiose intestinale change les métabolites produits par les microorganismes et induit ainsi une inflammation intestinale et une augmentation de la perméabilité intestinale (Zhao et

al., 2016). L'imazalil est un fongicide qui provoque une dysbiose intestinale et une inflammation colique (Jin et al., 2016). Le glyphosate modifie également la composition microbienne intestinale chez les rats et induit des réponses inflammatoires au niveau de l'intestin (Tang et al., 2020). Une étude en 2018, montre que le glyphosate a un impact sur l'axe intestin-cerveau en favorisant la prolifération des bactéries *Clostridium* chez des sujets autistes (Argou-Cardozo & Zeidán-Chuliá, 2018). De plus, The International Agency for Research on Cancer a identifié le glyphosate comme carcinogène probable en 2015.

Deux lignées cellulaires intestinales du colon sain seront utilisées dans ce travail : NCM460 et CCD 841 CoTr. Les cellules seront exposées pendant 3 et 30 jours au cocktail de pesticides ou au MI-cocktail.

La prolifération, survie, migration et invasion seront évaluées par les tests de MTT, le système d'imagerie cellulaire automatisée ImageXpress Pico, test de blessure et de chambres de boyden sans/avec matrigel, cytométrie en flux. Le secrétome (en particulier le TNF, IL-6, et des espèces réactives de l'oxygène (par Kit, qPCR), et la morphologie cellulaire (Immunofluorescence en marquant l'actine et la paxilline). L'évolution de la variation de la concentration cytosolique du calcium sera suivie par la Flexstation (technique qui permet de réaliser des acquisitions rapides et simultanées de variations de concentration calciques par fluorescence dans différentes conditions en temps réel). L'analyse transcriptomique sera réalisée par NANOSTRIG au sein du Laboratoire HEMATIM, UPJV. Le stress mitochondrial sera suivi par la sonde JC-1 et l'apoptose évaluée par différentes techniques : (double marquage Annexine V/7-AAD, ratio Bcl2/Bax, Hoescht et effet «Tunel», clivage des protéines PARP et Caspases 3 et 9). L'analyse épigénétique sur des cellules cancéreuses traitées par le cocktail des pesticides sera réalisée sur certains gènes suppresseurs de tumeurs (comme par exemple TP53) et gènes impliqués dans l'apoptose (comme par exemple BCL2) sont inactives par méthylation par différentes techniques : Bisulfite sequencing pour détecter la méthylation de l'ADN (Extraction de l'ADN, Traitement au bisulfite, PCR Spécifique de régions promotrices TP53 et quantification par qPCR) et Chip-seq (chromatine immunoprécipitations sequencing) pour identifier les modifications d'histones. En effet, les pesticides peuvent induire des modifications épigénétiques durables, ces changements peuvent révéler des mécanismes d'action indirects et cela aide à comprendre si les pesticides aggravent le comportement tumoral ou peuvent être utilisés à des doses spécifiques pour moduler l'expression génique. Cette étude suggère que les pesticides peuvent moduler l'expression génique par des mécanismes épigénétiques.

L'étude des processus apoptotiques, du cycle cellulaire, MTT, certaines voies de signalisation, par Western blot et/ou qPCR, ainsi que l'analyse épigénétiques seront réalisés au Liban

- **Le modèle SHIME®** (ou simulated human intestinal microbial environment) : modèle d'intestin artificiel : sera utilisé pour l'étude *in vitro* sur la perturbation du microbiote intestinal. Celui-ci mime chaque compartiment du tractus digestif de l'adulte (de l'estomac au côlon) et permet de mesurer l'activité et la transformation de l'aliment.

Des selles de 20 volontaires sains seront ensemencées dans les fermenteurs coliques (colon ascendant, transverse et descendant) du SHIME. Les pesticides en combinaison (à la dose journalière admissible, 1mg/1mL) seront inclus dans l'alimentation du SHIME® 1 fois par jour pendant 30 jours (Joly Condette et al., 2015; Reygner et al., 2016). Après exposition chronique à ce cocktail, les échantillons seront collectés et analysés à J0 (contrôle), J15 et J30 (effet chronique à court et long terme). La composition du microbiote (culture bactérienne, qPCR, NGS) et les métabolites bactériens (GC) seront analysés dans les différents compartiments du SHIME®. Le niveau des marqueurs inflammatoires dans les surnageants issus de la digestion *in vitro* (SHIME®) (protéine C-réactive ; cytokines pro-inflammatoires telles que TNF, IL1, IL6, IL10, TGF) sera analysé par des tests ELISA.

L'expression et la localisation des protéines des jonctions serrées (occludine, claudine-5, ZO-1) dans le modèle de barrière intestinale fera l'objet d'une caractérisation par qRT-PCR et Western blot, et immunocytochimie. La translocation bactérienne à travers la barrière intestinale sera évaluée par culture bactérienne et typage moléculaire. L'expression des molécules d'adhésion telles que ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1 sur la surface cellulaire des cellules épithéliales ainsi que les voies de signalisations (MAPK, NFkB) seront détectées par RT- qPCR et western blot.

- **Prélèvement biologique :**

Le service d'hépatogastroentérologie du CHU d'Amiens (Pr Fumery Mathurin et Dr Lucien Grados) participe au dépistage, au diagnostic et au traitement du CCR. C'est le principal centre de recours de Picardie sur cette thématique. Le service d'hépatogastroentérologie dispose d'une collection biologique au sein de la biobanque de Picardie contenant du sérum, plasma et une fecalothèque dans le cadre de collections s'intéressant à des patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, de pancréatite, ou d'hépatite alcoolique aigue ou encore de témoins. Un biobanking systématique de prélèvements sanguins et fécaux de patients avec un diagnostic récent de CCR est en cours de mise en place avec le partenariat de la biobanque de Picardie.

Le projet sera divisé en 5 tâches pour une durée totale de 3 ans.

Objectif 1 : Évaluer l'effet de l'exposition chronique à un cocktail de pesticides sur la biologie des cellules intestinales normales : morphologie, prolifération, apoptose/autophagie, mortalité, migration, invasion.

Les cellules des deux lignées cellulaires intestinales saines (CRL-1831, CCD841-CoN) et cancéreuses (HTC116, Caco-2) du colon seront exposées à un mélange de 3 pesticides (concentration totale du mélange 6 μ M dans le DMSO) pendant 3 jours (traitement aigue) et 30 jours (traitement chronique). Le mélange sera changé chaque 72h. Les cellules contrôles seront incubées dans le même milieu de culture avec DMSO ($\leq 1/1000$). Le milieu de culture sera aussi renouvelé chaque 72h. Nous ferons des études d'effet-dose et temps-dépendants après traitement cellulaire par le cocktail de pesticides et nous déterminerons IC₅₀, ainsi que d'éventuels effets toxiques.

Chaque 7 jours, nous évaluons l'effet sur la viabilité cellulaire, la morphologie, la prolifération, l'apoptose, la migration, l'invasion et le sécrétome.

Objectif 2 : Évaluer l'impact de l'exposition aux pesticides sur la signature calcique dans deux modèles cellulaires coliques normal et cancéreux.

A ce jour, des études sur l'effet toxiques des pesticides, particulièrement au niveau neuronal, ont montré l'implication des acteurs de l'homéostasie calcique (Costas-Ferreira & Faro, 2021). Nos résultats préliminaires suggèrent fortement TRPA1 comme cible privilégiée du CPF (**voir résultats plus haut**). Nous allons, **dans un premier temps**, évaluer le rôle de TRPA1 dans la prolifération, migration/invasion et la survie des cellules normales (CRL-1831, CCD841-CoN) et cancéreuses (HTC116, Caco-2) coliques exposées directement au CPF et au cocktail de pesticides. L'impact d'une exposition aux pesticides sur la migration et la survie en présence du 5-Fluorouracile sera aussi étudié dans les cellules cancéreuses. Nous déterminerons l'impact d'un traitement chronique, 30 jours, de CPF (2 μ M et 10 μ M) et du mélange des 3 pesticides (6

μM) sur l'expression, l'activité et la localisation subcellulaire de TRPA1 dans les cellules normales et cancéreuses en utilisant des techniques de Western blot, de qRT-PCR, d'imagerie calcique et de microscopie confocale. **Dans un second temps**, nous étudierons l'implication de TRPA1 dans les processus biologiques induits par CPF et le cocktail de pesticides dans les deux types cellulaires en utilisant 3 stratégies : (i) inhibition pharmacologique de TRPA1 par un inhibiteur spécifique (eg. HC-030031), (ii) par siRNA et/ou shRNA et (iii) l'activation de TRPA1 par un activateur spécifique (eg. AITC). Les techniques principales et reconnues pour les études de prolifération, apoptose, autophagie et migration/invasion seront utilisées. A savoir la cytométrie en flux pour l'étude du cycle cellulaire et apoptose (double marquage Annexine V/7-AAD), test de blessure et de chambres de boyden sans/avec matrigel pour la migration et l'invasion respectivement, l'immunodétection la forme phosphorylée de p62 et les isoformes de LC3I et LC3II et le calcul du rapport entre les deux protéines pour l'autophagie. Parallèlement, nous déterminerons le sécrétome (en particulier le TNF α , IL6, IL8, TGF β), la respiration mitochondriale et le taux glycolytique dans les cellules traitées à l'aide de l'analyseur de flux extracellulaire Seahorse, la production d'espères réactives à l'oxygène (ROS) mitochondriales (marquage fluorescent MitoSOX), intracellulaire (sonde DCFAD, FACS) et le potentiel mitochondrial avec la sonde JC-1, et la concentration du Ca²⁺ dans les mitochondries (microscopie confocale).

Afin de ne pas exclure d'autres cibles calciques du cocktail des pesticides, nous proposons de réaliser une analyse transcriptomique dans l'ensemble des conditions testées (cellules contrôles/cellules traitées par les pesticides pendant 30 jours). La validation de l'altération modifiée de certains gènes sera réalisée par qPCR et Western blot.

Objectif 3 : Identification des voies de signalisation calcium dépendantes.

Les mécanismes moléculaires-dépendants du Ca²⁺ et impliqués dans la prolifération, migration, résistance à la chimiothérapie des cellules cancéreuses ont déjà été publiés par l'équipe du Pr Ouadid-Ahidouch. Globalement, une analyse transcriptomique sera réalisée (en collaboration avec la Plateforme IPSIT, Université de Saclay, Paris), afin de mettre en évidence les voies dérégulées par le CPF, ou le cocktail des pesticides. Les voies hautement impliquées dans l'oncogenèse liée à un déséquilibre du stress oxydatif comme les facteurs de transcription NF- κ B, AP-1, HIF-1 α , PPAR- γ , β -caténine/Wnt et Nrf2 (Kansanen et al., 2013) seront recherchées. La modulation de l'activation des voies ERK1/2, PI3K/AKT/mTOR seront aussi quantifiées car ce sont les principales voies activées par TRPA1 dans l'adaptation des cellules cancéreuses aux ROS mitochondriaux (Takahashi et al., 2018). Pour cette approche, nous extrairons l'ARNm des cellules épithéliales coliques normales et cancéreuses exposées chroniquement ou non aux pesticides. La validation fonctionnelle des cibles se fera par la stratégie siRNA ou shRNA, l'inhibition et/ou activation de TRPA1 en utilisant les différentes techniques et les modèles de lignées cellulaires normales et cancéreuses citées plus haut.

Objectif 4 : Caractérisation du MI de volontaires sains et atteints de CCR exposé au cocktail de pesticides et évaluation sur la barrière intestinale et les modèles cellulaires.

- **Le modèle SHIME®** (ou simulated human intestinal microbial environment) : modèle d'intestin artificiel (Fig. 4) : sera utilisé pour l'étude *in vitro* sur la perturbation du microbiote intestinal. Celui-ci mime chaque compartiment du tractus digestif de l'adulte (de l'estomac au côlon) et permet de mesurer l'activité et la transformation de l'aliment.

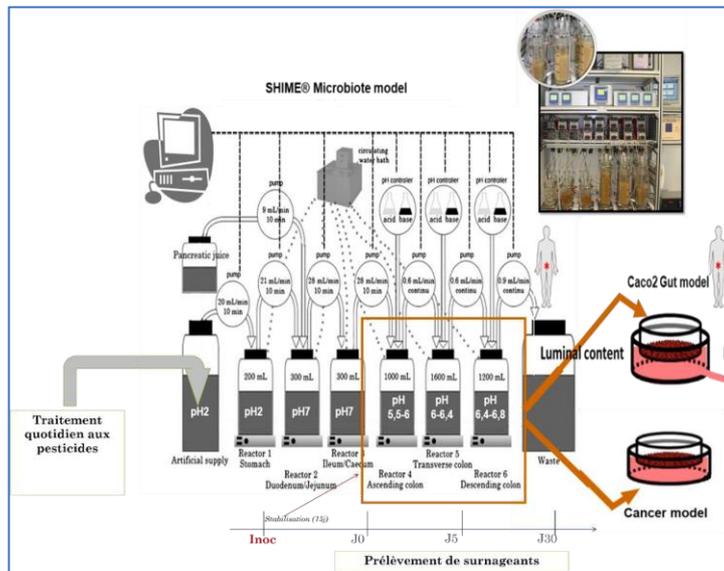


Fig. 4 : Modèle SHIME®: les surnageants issus de la digestion *in vitro* (SHIME®).

Cette plateforme intestinale artificiel adulte *in vitro* humaine permet de mimer et de créer un écosystème microbien intestinal humain allant de l'estomac jusqu'au colon. Le simulateur contient 6 fermenteurs en verre avec des régulateurs de pH associés. Les fermenteurs doivent permettre de travailler avec de gros volumes (>500 ml) afin que des échantillons jusqu'à 50 ml puissent être collectés sans impacter l'activité et la composition du microbiote résident. Chaque fermenteur mime une partie du tractus digestif : estomac, jéjunum/duodénum, ilion/caecum, colon ascendant, colon transverse et colon descendant (voir Fig. 4). Ceux-ci sont maintenus à 37°C par un bain marie et agités en permanence pour imiter les mouvements qui ont lieu dans l'intestin. Les fermenteurs sont reliés entre eux par des pompes péristaltiques qui permettent de recréer un temps de rétention des produits de l'intestin dans chacun des compartiments. Le dispositif est contrôlé par informatique, le pH et le potentiel redox sont constamment mesurés afin de s'assurer que les conditions physiologiques de chaque fermenteur soient similaires à celles que l'on trouve *in vivo*. Le potentiel redox est un indicateur de l'activité de l'oxygène, lorsqu'il est inférieur à -200 mV, le fermenteur est en condition anaérobie. Si ce n'est pas le cas, l'ajout de gaz est nécessaire. Une combinaison de ce modèle avec un modèle *in vitro* de la barrière intestinale permettrait de compléter l'investigation sur la sphère digestive par l'impact sur la perméabilité et la fonctionnalité de l'épithélium.

Nous avons déjà le MI et le MI-CPF et MI-Cocktail obtenus sur 20 volontaires. Dans le cadre de ce projet de thèse, des selles de 20 patients atteints de CCR seront ensemencées dans les fermenteurs coliques (colon ascendant, transverse et descendant) du SHIME®. Le CPF (à la dose journalière admissible, 1mg) et le cocktail (à la dose journalière admissible, 1mg) seront inclus dans l'alimentation du SHIME® 1 fois par jour pendant 30 jours. Après exposition chronique à ce cocktail, les échantillons seront collectés et analysés à J0 (contrôle), J15 et J30 (effet chronique à court et long terme). La composition du microbiote (culture bactérienne, qPCR, NGS) et les métabolites bactériens (GC) seront analysés dans les différents compartiments du SHIME®. Les pesticides seront dosés (prestation- Laboratoire IMITOX, Chambly (LC-MS/MS)). Le niveau des marqueurs inflammatoires dans les surnageants issus de la digestion *in vitro* (SHIME®) (protéine C-réactive ; cytokines pro-inflammatoires telles que TNF α , IL1, IL6, IL10, TGF β) sera analysé par des tests ELISA. L'expression et la localisation des protéines des jonctions serrées (occludine, claudine-5, ZO-1) dans le modèle de barrière intestinale (cellules CaCo2) fera l'objet d'une caractérisation par qRT-PCR et

Western blot, et immunocytochimie. La translocation bactérienne à travers ce modèle de barrière intestinale sera évaluée par culture bactérienne, typage moléculaire et dosage de métabolites bactériens comme le LPS par Limulus Assay et les mucopeptides par LC/HRMS. L'expression des molécules d'adhésion telles que ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1 sur la surface cellulaire des cellules épithéliales ainsi que les voies de signalisations (MAPK, NFκB) seront détectées par RT-qPCR et Western blot. L'expression de PPARα et PPARγ, qui sont liés à l'état inflammatoire et à la réponse immunitaire mais aussi au métabolisme, sera également quantifiée.

En parallèle, nous récupérons les surnageants des 3 parties du côlon que nous filtrons dans des conditions stériles, puis les cellules normales et cancéreuses seront exposées aux métabolites contrôles du MI-sain (MI) et CCR (MI-CCR) puis au MI exposés au CPF MI-CPF, Cocktail MI-COCK (MI volontaires sains) et MI-CCR-CPF et MI-CCR-COCK (MI Patients CCR). Nous évaluerons leur impact, en traitement chronique (30j) ou aiguë (3j), sur la viabilité, la migration des cellules normales et cancéreuses et la réponse des cellules cancéreuses au 5-FU. La dynamique calcique des cellules et l'implication potentielle du canal TRPA1 ou d'autres transporteurs calciques, seront aussi déterminées.

Le service d'hépatogastroentérologie du CHU d'Amiens (Pr Fumery Mathurin, et Dr Lucien Grados) participe au dépistage, au diagnostic et au traitement du CCR. Une collection biologique de sang, cheveux et tissu digestif issus de patients atteints de CCR (n=30) et de témoins (n=30) est en cours de mise en place. L'objectif global est d'évaluer l'exposition à différents pesticides en effectuant des dosages de leurs principaux métabolites au sein des tissus et prélèvements biologiques collectés. Dans le cadre de ce projet, des prélèvements de tissu colique sain seront effectués. Les données cliniques intégreront : l'âge, le sexe, le poids, la taille, l'indication de la résection colique, la consommation de tabac ou d'alcool, la présence d'un antécédent personnel de cancer. Des cellules intestinales humaines, obtenues à partir des prélèvements de tissu colique sain, serviront à réaliser des organoïdes afin (i) d'évaluer la toxicité et l'effet transformant du CPF, et du cocktail de pesticides, (ii) valider les transporteurs calciques, notamment TRPA1, comme biomarqueur de pesticides et/ou métabolites, (iii) valider l'effet bénéfique du prébiotique, et (iv) valider les principales voies de signalisation activées par ces pesticides.

Objectif 5 : Exploration des propriétés protectrices par stratégie nutritionnelle à base de prébiotique.

Le modèle SHIMES sera réutilisé en intégrant l'inuline dans son alimentation, en co-traitement avec les pesticides. Les pesticides en combinaison en en coexposition avec l'inuline seront inclus dans l'alimentation du SHIME® 1 fois par jour pendant 30 jours. Les échantillons seront collectés et analysés à J0 (contrôle), J15 et J30 (effet chronique). Nous examinerons les mécanismes moléculaires et cellulaires par lesquels ces métabolites améliorent l'intégrité de la BI et le phénotype de cellules de colon après exposition aux pesticides. Nous étudierons les caractéristiques phénotypiques, métaboliques et enzymatiques des barrières, notamment les jonctions serrées, les enzymes spécifiques, les transporteurs, les récepteurs, les voie de signalisation. Des études de fonctionnalités (utilisation d'inhibiteurs spécifiques par exemple) nous permettront de valider les cibles cellulaires identifiés. Les techniques et méthodes nécessaires ont déjà été détaillées dans les objectifs 2, 3 et 4.

Les techniques et méthodes nécessaires ont déjà été détaillées pour le SHIME dans l'obj 4. Notre attention se portera sur l'analyse de la composition du MI et la concentration de ses métabolites. Cela implique le dosage des métabolites microbiens. Nous nous concentrerons sur les mécanismes moléculaires et cellulaires par lesquels ces métabolites améliorent l'intégrité de la BI, réduisant ainsi le risque de développement du CCR. Cela inclura l'étude des voies de

HUET (2^{ème} année de thèse) sur l'impact des pesticides sur le microbiote intestinal et le CCR). De plus, nos résultats ont montré le rôle prépondérant du pesticide (CPF) dans le développement de l'inflammation colique, la translocation bactérienne et l'acquisition d'un pouvoir prolifératif et migratoire des cellules normales épithéliales du côlon. Le lien des pesticides avec le stress oxydatif, la modification de la signature calcique et un point commun avec les cellules cancéreuses, il nous est possible de suggérer que la signature calcique constituerait un acteur clé permettant l'apparition de cellules transformées et/ou cancéreuses associée aux effets des pesticides.

Les résultats de cette étude pour justifier la mise en place de grandes cohortes observationnelles afin de (i) confirmer le lien épidémiologique entre pesticides et CCR, (ii) déterminer leurs cibles ainsi que les voies de signalisation impliquées dans le changement du phénotype normal de l'épithélium colique et (iii) proposer une stratégie préventive. Ces informations pourraient faire modifier les stratégies de prévention du CCR et avec un impact majeur en termes de santé publique.

V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abou Diwan M, Huet A, Poiriez J, Joly Condette C, Delanaud S, Sevin E, Corona A, Rhazi L, Depeint F, Ouadid-Ahidouch H, Gosselet F, Bach V, Candela P, Khorsi-Cauet H. Effects of Chlorpyrifos on gut dysbiosis and barriers integrity in women with a focus on pregnancy and prebiotic intervention: Insights from advanced in vitro human models. *Environ Pollut*. 2025 Feb 15;367:125533. doi: 10.1016/j.envpol.2024.
- Abou Diwan M, Djekkoun N, Boucau MC, Corona A, Dehouck L, Biendo M, Gosselet F, Bach V, Candela P, Khorsi-Cauet H. Maternal exposure to pesticides induces perturbations in the gut microbiota and blood-brain barrier of dams and the progeny, prevented by a prebiotic. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2024 Oct;31(49):58957-58972. doi: 10.1007/s11356-024-34969-1.
- Abolhassani, M., Asadikaram, G., Paydar, P., Fallah, H., Aghaee-Afshar, M., Moazed, V., Akbari, H., Moghaddam, S. D., & Moradi, A. (2019). Organochlorine and organophosphorous pesticides may induce colorectal cancer; A case-control study. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 178(December 2018), 168–177. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.04.030>
- Akashé, M. M., Pawade, U. v, & Nikam, A. v. (2018). Classification of Pesticides: a Review. *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy*, 9(4), 144–150. <https://doi.org/10.7897/2277-4343.094131>
- Argou-Cardozo, I., & Zeidán-Chuliá, F. (2018). Clostridium Bacteria and Autism Spectrum Conditions: A Systematic Review and Hypothetical Contribution of Environmental Glyphosate Levels. *Medical Sciences*, 6(2), 29. <https://doi.org/10.3390/medsci6020029>
- Bander, Z. al, Nitert, M. D., Mousa, A., & Naderpoor, N. (2020). The gut microbiota and inflammation: An overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(20), 1–22. <https://doi.org/10.3390/ijerph17207618>
- Baudry, J., Assmann, K. E., Touvier, M., Allès, B., Seconda, L., Latino-Martel, P., Ezzedine, K., Galan, P., Hercberg, S., Lairon, D., & Kesse-Guyot, E. (2018). Association of Frequency of Organic Food Consumption with Cancer Risk: Findings from the NutriNet-Santé Prospective Cohort Study. *JAMA Internal Medicine*, 178(12), 1597–160
- Calaf, G. M. (2021). Role of organophosphorous pesticides and acetylcholine in breast carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, 76(February), 206–217.
- Carrasco Cabrera, L., & Medina Pastor, P. (2021). The 2019 European Union report on pesticide residues in food. *EFSA Journal*, 19(4). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6491>
- Choudhary, S., & Gill, K. D. (2001). Protective effect of nimodipine on dichlorvos-induced delayed neurotoxicity in rat brain. *Biochemical Pharmacology*, 62(9), 1265–1272. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(01\)00762-6](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(01)00762-6)
- Costas-Ferreira, C., & Faro, L. R. F. (2021). Systematic review of calcium channels and intracellular calcium signaling: Relevance to pesticide neurotoxicity. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(24). <https://doi.org/10.3390/ijms222413376>
- Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2017). The Microbiome-Gut-Brain Axis in Health and Disease. In *Gastroenterology Clinics of North America* (Vol. 46, Issue 1, pp. 77–89). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2016.09.007>
- Ding, Q., Fang, S., Chen, X., Wang, Y., Li, J., Tian, F., Xu, X., Attali, B., Xie, X., & Gao, Z. (2017). TRPA1 channel mediates organophosphate-induced delayed neuropathy. *Cell Discovery*, 3, 1–15. <https://doi.org/10.1038/celldisc.2017.24>
- Doğanlar, O., Doğanlar, Z. B., Kurtdere, A. K., Chasan, T., & Ok, E. S. (2020). Chronic exposure of human glioblastoma tumors to low concentrations of a pesticide mixture induced multidrug resistance against chemotherapy agents. In *Ecotoxicology and Environmental Safety* (Vol. 202). <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110940>
- Ghasemi-Niri, S. F., Maqbool, F., Baeri, M., Gholami, M., & Abdollahi, M. (2016). Phosalone-induced inflammation and oxidative stress in the colon: Evaluation and treatment. *World Journal of Gastroenterology*, 22(21), 4999–5011. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i21.4999>
- Guibourdenche, M., el Khayat El Sabbouri, H., Djekkoun, N., Khorsi-Cauet, H., Bach, V., Anton, P. M., & Gay-Quéheillard, J. (2021). Programming of intestinal homeostasis in male rat offspring after maternal exposure to chlorpyrifos and/or to a high fat diet. *Scientific Reports*, 11(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90981-2>

- Hsu, S. S., Jan, C. R., & Liang, W. Z. (2018). The investigation of the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin (LCT)-affected Ca²⁺ homeostasis and -activated Ca²⁺ -associated mitochondrial apoptotic pathway in normal human astrocytes: The evaluation of protective effects of BAPTA-AM (a selective . *NeuroToxicology*, *69*, 97–107. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2018.09.009>
- Hsu, S. S., Jan, C. R., & Liang, W. Z. (2019). Uncovering malathion (an organophosphate insecticide) action on Ca²⁺ signal transduction and investigating the effects of BAPTA-AM (a cell-permeant Ca²⁺ chelator) on protective responses in glial cells. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *157*(February), 152–160. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.03.015>
- INSERM. (2013). *Effets sur la santé une expertise collective de l'Inserm Pesticides : définitions , usages et voies d'exposition*. 06.
- Inserm. (2021). Pesticides et effets sur la santé : nouvelles données - Résumé. *Expertise Collective*, 2021.
- Jin, C., Zeng, Z., Fu, Z., & Jin, Y. (2016). Oral imazalil exposure induces gut microbiota dysbiosis and colonic inflammation in mice. *Chemosphere*, *160*, 349–358. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.06.105>
- Joly Condette, C., Bach, V., Mayeur, C., Gay-Quéheillard, J., & Khorsi-Cauet, H. (2015). Chlorpyrifos Exposure during Perinatal Period Affects Intestinal Microbiota Associated with Delay of Maturation of Digestive Tract in Rats. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, *61*(1), 30–40. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000000734>
- Jung, I. H., Choi, J. H. K., Chung, Y. Y., Lim, G. L., Park, Y. N., & Park, S. W. (2015). Predominant Activation of JAK/STAT3 Pathway by Interleukin-6 Is Implicated in Hepatocarcinogenesis. *Neoplasia (United States)*, *17*(7), 586–597. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2015.07.005>
- Kuntz, M., Candela, P., Saint-Pol, J., Lamartinière, Y., Boucau, M. C., Sevin, E., Fenart, L., & Gosselet, F. (2015). Bexarotene Promotes Cholesterol Efflux and Restricts Apical-to-Basolateral Transport of Amyloid- β Peptides in an in Vitro Model of the Human Blood-Brain Barrier. *Journal of Alzheimer's Disease*, *48*(3), 849–862. <https://doi.org/10.3233/JAD-150469>
- Lee, Y. M., Kim, S. A., Choi, G. S., Park, S. Y., Jeon, S. W., Lee, H. S., Lee, S. J., Heo, S., & Lee, D. H. (2018). Association of colorectal polyps and cancer with low-dose persistent organic pollutants: A case-control study. *PLoS ONE*, *13*(12), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208546>
- Li, J. W., Fang, B., Pang, G. F., Zhang, M., & Ren, F. Z. (2019). Age- and diet-specific effects of chronic exposure to chlorpyrifos on hormones, inflammation and gut microbiota in rats. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *159*(May), 68–79. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.05.018>
- Matich, E. K., Laryea, J. A., Seely, K. A., Stahr, S., Su, L. J., & Hsu, P. C. (2021). Association between pesticide exposure and colorectal cancer risk and incidence: A systematic review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *219*(March 2022), 112327. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112327>
- Mechanisms, N., Arnaud, L. C., Gauthier, T., Naour, A. le, Hashim, S., Naud, N., Shay, J. W., Pierre, F. H., Boutet-robinet, E., & Huc, L. (2021). *Contaminants (4-Hydroxynonenal and Pesticides) on Colorectal*.
- Meijer, M., Brandsema, J. A. R., Nieuwenhuis, D., Wijnolts, F. M. J., Dingemans, M. M. L., & Westerink, R. H. S. (2015). Inhibition of Voltage-Gated Calcium Channels After Subchronic and Repeated Exposure of PC12 Cells to Different Classes of Insecticides. *Toxicological Sciences*, *147*(2), 607–617. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv154>
- Meijer, M., Hamers, T., & Westerink, R. H. S. (2014). Acute disturbance of calcium homeostasis in PC12 cells as a novel mechanism of action for (sub)micromolar concentrations of organophosphate insecticides. *NeuroToxicology*, *43*, 110–116. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2014.01.008>
- N. Djekkoun, F. Depeint, M. Guibourdenche, H. E. K. E. S., A. Corona , L. Rhazi, J. Gay-Queheillard 1 , L. Rouabah, F. H., & v. Bach, M. Benkhalifa, and H. K.-C. L. (2022). *Chronic Perigestational Exposure to Chlorpyrifos Induces Perturbations in Gut Bacteria and Glucose and Lipid Markers in Female Rats and Their Offspring*.
- Nougadère, A., Merlo, M., Héraud, F., Réty, J., Truchot, E., Vial, G., Cravedi, J. P., & Leblanc, J. C. (2014). How dietary risk assessment can guide risk management and food monitoring programmes: The approach and results of the French Observatory on Pesticide Residues (ANSES/ORP). *Food Control*, *41*(1), 32–48. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.12.025>

- Ojha, A., & Gupta, Y. K. (2015). Evaluation of genotoxic potential of commonly used organophosphate pesticides in peripheral blood lymphocytes of rats. *Human and Experimental Toxicology*, 34(4), 390–400. <https://doi.org/10.1177/0960327114537534>
- Park, E. Y., Kim, J., Park, E., Oh, J. K., Kim, B., & Lim, M. K. (2021). Serum concentrations of persistent organic pollutants and colorectal cancer risk: A case-cohort study within Korean National Cancer Center Community (KNCCC) cohort. *Chemosphere*, 271, 129596. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129596>
- Parker, A., Fonseca, S., & Carding, S. R. (2020). Gut microbes and metabolites as modulators of blood-brain barrier integrity and brain health. *Gut Microbes*, 11(2), 135–157. <https://doi.org/10.1080/19490976.2019.1638722>
- Pérez-Riesgo, E., Gutiérrez, L. G., Ubierna, D., Acedo, A., Moyer, M. P., Núñez, L., & Villalobos, C. (2017). Transcriptomic analysis of calcium remodeling in colorectal cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(5). <https://doi.org/10.3390/ijms18050922>
- Putignani, L., del Chierico, F., Vernocchi, P., Cicala, M., Cucchiara, S., & Dallapiccola, B. (2016). Gut Microbiota Dysbiosis as Risk and Premorbid Factors of IBD and IBS Along the Childhood-Adulthood Transition. *Inflammatory Bowel Diseases*, 22(2), 487–504. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000602>
- Qiu, S., Fu, H., Zhou, R., Yang, Z., Bai, G., & Shi, B. (2020). Toxic effects of glyphosate on intestinal morphology, antioxidant capacity and barrier function in weaned piglets. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 187(June 2019), 109846. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109846>
- Raheja, G., & Gill, K. D. (2002). Calcium homeostasis and dichlorvos induced neurotoxicity in rat brain. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 232(1–2), 13–18. <https://doi.org/10.1023/A:1014873031013>
- Réquilé, M., González Alvarez, D. O., Delanaud, S., Rhazi, L., Bach, V., Depeint, F., & Khorsi-Cauet, H. (2018). Use of a combination of in vitro models to investigate the impact of chlorpyrifos and inulin on the intestinal microbiota and the permeability of the intestinal mucosa. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(23), 22529–22540. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2332-4>
- Reygner, J., Condette, C. J., Bruneau, A., Delanaud, S., Rhazi, L., Depeint, F., Abdennebi-Najar, L., Bach, V., Mayeur, C., & Khorsi-Cauet, H. (2016). Changes in composition and function of human intestinal microbiota exposed to chlorpyrifos in oil as assessed by the SHIME® model. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13(11). <https://doi.org/10.3390/ijerph13111088>
- Rui-Xue Huo, Yi-Jia Wang, Shao-Bin Hou, Wei Wang, Chun-Ze Zhang, X.-H. W. (2022). *Gut mucosal microbiota profiles linked to colorectal cancer recurrence*. 9327(18).
- Sanchez-collado, J., Jardin, I., López, J. J., Ronco, V., Salido, G. M., Dubois, C., Prevarskaya, N., & Rosado, J. A. (2021). Role of orai3 in the pathophysiology of cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21), 1–11. <https://doi.org/10.3390/ijms222111426>
- Song, L., Zhao, J., Jin, X., Li, Z., Newton, I. P., Liu, W., Xiao, H., & Zhao, M. (2014). The organochlorine p,p'-dichlorodiphenyltrichloroethane induces colorectal cancer growth through Wnt/β-catenin signaling. *Toxicology Letters*, 229(1), 284–291. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.06.003>
- Sule, R. O., Condon, L., & Gomes, A. v. (2022). A Common Feature of Pesticides: Oxidative Stress - The Role of Oxidative Stress in Pesticide-Induced Toxicity. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/5563759>
- Suriyo, T., Tachachartvanich, P., Visitnonthachai, D., Watcharasit, P., & Satayavivad, J. (2015). Chlorpyrifos promotes colorectal adenocarcinoma H508 cell growth through the activation of EGFR/ERK1/2 signaling pathway but not cholinergic pathway. *Toxicology*, 338, 117–129. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2015.10.009>
- Talibov, M., Tual, S., Morlais, F., Meryet-Figuère, M., Boulanger, M., Bouvier, V., Perrier, S., Clin, B., Baldi, I., Lebailly, P., Dabakuyo-Yonli, S., Bara, S., Bouvier, A. M., Busquet, T., Colonna, M., Coureau, G., Delanoé, M., Grosclaude, P., Guizard, A. v., ... Woronoff, A. S. (2022). Colorectal cancer among farmers in the AGRICAN cohort study. *Cancer Epidemiology*, 78(March). <https://doi.org/10.1016/j.canep.2022.102125>

- Tang, Q., Tang, J., Ren, X., & Li, C. (2020). Glyphosate exposure induces inflammatory responses in the small intestine and alters gut microbial composition in rats. *Environmental Pollution*, 261, 114129. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114129>
- Uchendu, C., Ambali, S. F., Ayo, J. O., & Esievo, K. A. N. (2018). Chronic co-exposure to chlorpyrifos and deltamethrin pesticides induces alterations in serum lipids and oxidative stress in Wistar rats: mitigating role of alpha-lipoic acid. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(20), 19605–19611. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2185-x>
- Villalobos, C., Hernández-Morales, M., Gutiérrez, L. G., & Núñez, L. (2019). TRPC1 and ORAI1 channels in colon cancer. *Cell Calcium*, 81(June), 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2019.06.003>
- Wang, J. Y., Chen, B. K., Wang, Y. S., Tsai, Y. T., Chen, W. C., Chang, W. C., Hou, M. F., Wu, Y. C., & Chang, W. C. (2012). Involvement of store-operated calcium signaling in EGF-mediated COX-2 gene activation in cancer cells. *Cellular Signalling*, 24(1), 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.08.017>
- Wang, J. Y., Sun, J., Huang, M. Y., Wang, Y. S., Hou, M. F., Sun, Y., He, H., Krishna, N., Chiu, S. J., Lin, S., Yang, S., & Chang, W. C. (2015). STIM1 overexpression promotes colorectal cancer progression, cell motility and COX-2 expression. *Oncogene*, 34(33), 4358–4367. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.366>
- Wang, Y., & Li, H. (2022). Gut microbiota modulation: a tool for the management of colorectal cancer. *Journal of Translational Medicine*, 20(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12967-022-03378-8>
- Zhang, Z., Liu, X., Feng, B., Liu, N., Wu, Q., Han, Y., Nie, Y., Wu, K., Shi, Y., & Fan, D. (2016). Corrigendum: STIM1, a direct target of microRNA-185, promotes tumor metastasis and is associated with poor prognosis in colorectal cancer (*Oncogene* (2014) 34 (4808-4820) DOI: 10.1038/onc.2014.404). *Oncogene*, 35(46), 6043. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.140>
- Zhao, Y., Zhang, Y., Wang, G., Han, R., & Xie, X. (2016). Effects of chlorpyrifos on the gut microbiome and urine metabolome in mouse (*Mus musculus*). *Chemosphere*, 153, 287–293. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.03.055>