

Université de Montréal

**Vitamine D et prévention du cancer colorectal associé à la colite ulcéreuse :
modèles murins**

Ihsan Elimrani

Département de biochimie et médecine moléculaire
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise
en Science (M.Sc) en Biochimie
option Génétique Moléculaire

Mars, 2016

© Ihsan Elimrani, 2016

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

**Vitamine D et prévention du cancer colorectal associé à la colite ulcéreuse :
modèles murins**

Présenté par :

Ihsan Elimrani

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Nikolaus Heveker, président-rapporteur

Pierre Haddad, membre du jury

Edgard Delvin, directeur de recherche

Ernest Seidman, codirecteur de recherche

Résumé

Les patients atteints de maladies inflammatoires de l'intestin (MII) ont un risque accru de développer un cancer colorectal dû aux lésions épithéliales secondaires à l'inflammation chronique. La vitamine D (vD) régule NOD2, gène impliqué dans la réponse inflammatoire et dans la susceptibilité aux MII, et induit son expression dans les monocytes et dans l'épithélium intestinal. Dans ce projet, nous avons d'abord induit le cancer colorectal associé à la colite ulcéreuse (CAC) en administrant un traitement combiné d'azoxyméthane (AOM) et de dextran de sulfate de sodium (DSS) aux souris C57BL/6J. Par la suite, nous avons étudié l'effet d'une carence en vD₃ sur le développement du CAC et évalué la capacité préventive d'une supplémentation en vD₃ sur la tumorigenèse, et vérifié si cet effet est médié par NOD2, en utilisant les souris *Nod2*^{-/-}. Les C57BL/6J et les *Nod2*^{-/-}, ayant reçu une diète déficiente en vD₃, étaient moins résistantes au CAC par rapport aux souris supplémentées. Le pourcentage de perte de poids, l'indice d'activation de la maladie (DAI), le taux de mortalité et le poids relatif du côlon (mg/cm) chez les souris déficientes en vD₃ étaient plus élevés en comparaison avec celles supplémentées en vD₃. Une augmentation du score d'inflammation et de la multiplicité tumorale corrélait avec une expression accentuée de *Il6* dans les colonocytes des souris déficientes en vD₃. La vD₃ régulait l'expression génétique de *Cyp24*, *Vdr* et de gènes pro-inflammatoires chez les C57BL/6, comme chez les *Nod2*^{-/-}. En conclusion, la supplémentation en vD₃ peut prévenir le développement du CAC indépendamment de NOD2.

Mots-clés : Vitamine D, 25-hydroxyvitamine D₃, maladies inflammatoires de l'intestin, colite ulcéreuse, cancer colorectal, NOD2, murin, AOM/DSS

Abstract

Patients with inflammatory bowel disease (IBD) have an increased risk of developing colorectal cancer due to continuing epithelial cell injury from the chronic inflammatory process. Vitamin D (vD) regulates NOD2, a gene involved in the inflammatory response and in IBD susceptibility, and induces its expression in monocytes and intestinal epithelial cells. In this project, we first established an azoxymethane (AOM)/dextran sodium sulfate (DSS) murine model of colitis-associated colorectal cancer (CAC) using C57Bl/6J. We then investigated the effect of vD₃ deficiency on CAC development, and evaluated the ability of vD₃ supplementation to prevent tumorigenesis. Lastly, we assessed whether the preventive benefits of vD₃ on colon carcinogenesis are mediated via NOD2 using *Nod2* knockout mice (*Nod2*^{-/-}). vD₃ deficient C57Bl/6J and *Nod2*^{-/-} mice displayed increased severity of AOM/DSS-induced CAC compared to mice given vD₃ supplemented diets. In vD₃ deficient mice, body weight loss, Disease Activity Index (DAI), mortality rate and the colon weight/length ratio were higher compared to vD₃-supplemented mice. An increased inflammation score was observed in the mucosa of vD₃ deficient mice along with augmentation in the expression level of IL-6. Higher tumour multiplicity was also observed in vD₃ deficient groups compared to vD₃-supplemented groups. In both C57Bl/6J and *Nod2*^{-/-} mice, vD₃ regulated *Cyp24*, *Vdr* and pro-inflammatory genes. In conclusion, vD₃ supplementation can prevent CAC independently of NOD2.

Keywords: Vitamin D, 25-hydroxyvitamin D₃, inflammatory bowel disease, ulcerative colitis, colorectal cancer, NOD2, murine, AOM/DSS

Table des matières

Résumé	ii
Abstract.....	iii
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des abréviations	ix
Remerciements.....	xiv
1. Introduction	16
1.1 Cancer colorectal.....	16
1.1.1 Généralités	16
1.1.2 Carcinogenèse colorectale.....	17
1.1.2.1 Prédispositions génétiques et cancer sporadique	17
1.1.2.2. Altérations épigénétiques.....	19
1.2 Inflammation chronique et cancer colorectal.....	19
1.2.1 La réponse inflammatoire.....	20
1.2.2 Le cancer colorectal associé à la colite ulcéreuse.....	21
1.2.3 Le microbiote et la cancérogenèse du CAC.....	26
1.2.3.1 « Pattern Recognition Receptor » (PRRs).....	27
1.3 Vitamine D.....	35
1.3.1 Métabolisme global.....	36
1.3.2 Vitamine D et inflammation chronique.....	38
1.3.3 Vitamine D et cancer colorectal.....	41
1.4 Modèle murin du cancer associé à la colite.....	42
1.5 Hypothèses et objectifs du projet.....	44

2.	Résultats	45
2.1	Article	45
	Abstract	47
	Introduction	48
	Materials and methods	50
	Results	54
	Discussion.....	59
	Acknowledgements	66
	Reference.....	66
	Figures and legends.....	71
3.	Discussion générale	83
3.1	L'effet de la vD ₃ sur la sévérité de la colite et sur le taux de mortalité dans les deux modèles murins de CAC	85
3.2	L'action de la vD ₃ sur l'indice d'activité histopathologique du côlon dans les deux modèles murins de CAC	87
3.3	L'effet de l'administration préventive de la vD ₃ sur la tumorigenèse du côlon dans les deux modèles murins de CAC.....	88
3.4	L'administration préventive de la vD ₃ et l'expression des gènes impliqués dans la pathophysiologie du CAC dans le côlon des deux modèles murins de CAC.....	89
	3.4.1 L'effet de la vD ₃ sur l'expression relative de <i>Cyp24</i> et de <i>Vdr</i>	89
	3.4.2 L'effet de la vD sur l'expression relative de <i>Tlr4</i> et de <i>Nod2</i>	92
	3.4.3 L'influence d'une supplémentation en vD ₃ sur l'expression relative des médiateurs chimiques de l'inflammation.....	94
4.	Conclusion et perspectives.....	99
	Bibliographie	i

Annexe I

Permissions de reproduction des figures..... i

Annexe II

La contribution de l'auteur principal et des co-auteurs à l'article..... ii

Liste des tableaux

Tableau de l'article

TABLE 182

Liste des figures

Figures de l'introduction

Figure 1. Les modèles génétiques du cancer colorectal.....	19
Figure 2. Pathophysiologie du cancer colorectal sporadique et de cancer colorectal associé à la colite ulcéreuse	23
Figure 3. Les voies de signalisation de TLR2, TLR3, et TLR4.....	29
Figure 4. La transduction du signal par Nod1 et NOD2	32
Figure 5. Schéma simplifié du métabolisme de la vitamine D.....	38

Figures de l'article

Figure 1. Experimental protocol for the colitis associated colon carcinogenesis model induced using azoxymethane (AOM) and dextran sodium sulfate (DSS).....	71
Figure 2. The effect of vD deficiency and vD ₃ supplementation on susceptibility of C57BL/6J and Nod2 ^{-/-} to AOM/DSS-induced colitis associated cancer.	73
Figure 3. Macroscopic view of mouse colons in an experimental model of colitis associated colorectal cancer.....	75
Figure 4. Histological scoring of inflammation severity of colonic sections from distal segments of (A) C57BL/6J and (B) Nod2 ^{-/-} mice.....	76
Figure 5. Plasma 25(OH)D ₃ levels in (A) C57BL/6J and in (B) Nod2 ^{-/-} mice before and after administration of AOM and DSS.....	77
Figure 6. The effect of vD deficient and vD ₃ supplemented diets on the expression of <i>Cyp24</i> , <i>Vdr</i> , <i>Tlr4</i> , <i>Nod2</i> and pro-inflammatory genes (<i>Cox2</i> , <i>Tnfa</i> , <i>Il1b</i> and <i>Il6</i>) in colonic tissue collected from C57BL/6J (A,C,E) and from Nod2 ^{-/-} (B,D,F) mice.	81

Liste des abréviations

1,25(OH) ₂ D ₃	1,25-dihydroxyvitamin D ₃
25(OH)D ₃	25-hydroxyvitamin D ₃
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMP	Peptide antimicrobien
ANOVA	Analyse de la variance
AOM	Azoxyméthane
AP1	Activator protein1
APC	Adenomatous polyposis coli
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messager
BAX	Bcl-2-associated X protein
BCL2	B-cell lymphoma-2
BID	BH3-interacting domain death agonist
CAC	Cancer colorectal associé à la colite ulcéreuse
Caco-2	Human colonic adenocarcinoma cells
CAI	Cancer colorectal associé à l'inflammation
CARD	Caspase recruitment domain
CC	Conventional chow
CCR	Cancer colorectal
CDKN2A/p16	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A/p6
CIMP	CpG Island Methylator Phenotype
CIM	Chromosomal instability
CLR	C-type Lectin Receptor
c-Myc	Avian myelocytomatosis virus oncogene cellular homolog
COX	Cyclooxygenase
CTNNB1	Catenin beta-1
CU	Colite ulcéreuse
CYP24	1,25-dihydroxyvitamin D ₃ hydroxylase
CYP27	25-hydroxyvitamin D ₃ hydroxylase
DAI	Disease activity index
DAMP	Damage-associated molecule patterns

DAP	Acide D-glutamyl-meso-diamino-pimélique
DCC	Deleted in Colorectal Cancer
DKK-1	Dickkopf-related protein 1
DNMT	ADN méthyltransférase
DSS	Dextran sulfate sodium
FGF23	Fibroblast growth factor 23
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
H&E	Haematoxylin and eosin
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HFD	High fat diet
HLTF	Helicase-Like Transcription Factor
hMLH1	Human mutL homolog
hMSH2	Human mutS homolog 2
HNPCC	Cancer colorectal héréditaire sans polypose
HPLC-MS	High Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry
HT29	Human colon adenocarcinoma cell line
IIFN	Interféron de type 1
IAP	Inhibitor of apoptosis protein
IBD	Inflammatory bowel disease
IC	Instabilité chromosomique
IEN	Intraepithelial neoplasias
IκB	Inhibitor of kappa B
IMS	Instabilité microsatellite
INF-κB	Nuclear factor-kappa B
iNO	Inducible nitric oxide synthase
IRAK	Interleukin-1 receptor-associated kinase
IRF3	Interferon regulatory factor 3
Jak	Janus-associated kinase
KO	Knockout
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LL-37	Circulating cathelicidin
LPS	Lipopolysaccharide
LRR	Domaine extracellulaire riche en leucine)

MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MC	Maladie de Crohn
MDP	Muramyl dipeptide
MGMT	Methylguanine DNA methyltransferase
MII	Maladies inflammatoires de l'intestin
Min	Multiple intestinal neoplasia
MMR	MisMatch Repair
MPD	Muramyl dipeptide
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene 88
NEMO	NF-kB Essential Modulator
NLR	NOD Like Receptor
NLRP3	NOD Like Receptor Pyrin Domain Containing 3
NO	Monoxyde d'azote
NO ⁻	Oxyde nitrique
NOD	Nucleotide-binding oligomerisation domain
NSAID	Non-steroidal anti-inflammatory drug
O ₂ ⁻	Radical anion superoxyde
OH ⁻	Radical hydroxyle
p14 ^{ARF}	p14 ADP Ribosylation Factors
p53	Tumor Suppressor Gene
PAF	Polypose adénomateuse familiale
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
pERK	Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase3
PGE2	Prostaglandine E2
PGs	Prostaglandines
PMS2	Postmeiotic segregation increased 2
PRRs	Pattern recognition receptors
PYD	Pyrin domain
RIP2	Receptor-interacting protein 2
RLR	Retinoic acid-inducible gene (RIG)-I-Like Receptor
RNA	Ribonucleic acid
RNS	Reactive nitrogen species

ROS	Reactive oxygen species
RT-qPCR	Quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction
RXR	Retinoid X receptor
SEM	Standard error of the mean
Snail	Zn finger protein
SNP	Single nucleotide polymorphism
STAT	Signal transducers and activators of transcription
TAB1	TAK1-binding protein
TAK1	TGF- β -activated kinase
TGF	Transforming growth factor
Th	Lymphocytes T auxiliaires
TIR	Toll/Interleukin 1 receptor
TLR	Toll Like Receptor
TNF	Tumor necrosis factor
TNFR	Tumor necrosis factor receptor
TP53	Tumor Protein P53
TRAF	TNF receptor-associated factor
TRAM	TRIF related adaptor molecule
Treg	Lymphocytes T régulateurs
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β
vD ₂	Vitamine D ₂ , ergocalciférol
vD ₃	Vitamine D ₃ , cholécalciférol
VDBP	Vitamin D binding protein
VDR	Vitamin D receptor
VDRE	Vitamin D response element
Wnt	Wingless integration site
Δ Ct	Delta cycle threshold

Aux prunelles de mes yeux, mes enfants; Sawab et Morjana

Remerciements

La réalisation de ce projet n'aurait pas pu être possible sans la collaboration continue, ni l'appui inconditionnel de personnes dévouées et inspirantes.

En tout premier lieu, mes remerciements s'adressent à mon directeur de recherche, Dr Edgard Delvin. Merci pour votre disponibilité, votre patience et surtout pour la confiance que vous m'avez témoignée et pour la liberté avec laquelle j'ai pu mener mon projet de recherche.

Mes remerciements les plus sincères et les plus respectueux vont à mon codirecteur Dr Ernest Seidman pour ses qualités scientifiques et humaines. Merci de m'avoir accueillie au sein de votre équipe, et ce depuis 2005, où j'ai commencé comme assistante de recherche et terminé mon parcours comme étudiante candidate à la maîtrise. Je tiens à vous remercier pour la confiance que vous m'avez accordée toutes ces années, mais aussi pour l'autonomie que vous m'avez laissée pour mener mon projet à terme. Merci de m'avoir apporté un soutien constant dans les moments difficiles que j'ai dû traverser. Vous avez toute ma gratitude et mon admiration.

Je suis redevable et reconnaissante envers Dr Ijaz Qureshi qui m'a initiée à la recherche fondamentale et qui a été un mentor dans mon cheminement académique.

Mes vifs remerciements vont également à Dr Serge Dionne, pour son encadrement, sa rigueur et sa patience. Merci pour tes discussions fructueuses et pour tes judicieux conseils.

Sur la même voie, j'adresse un merci très chaleureux à mes collègues de laboratoire, Mme Denise Levesque et Anne Duhaime, pour leur précieux soutien et encouragement. Merci pour votre complicité et votre gaieté.

Un grand merci à Jamie Koenekoop pour ses disponibilités, son efficacité et sa patience sans faille. Merci pour ta généreuse collaboration lors des longues heures passées ensemble à l'animalerie.

Un clin d'œil particulier pour Mme Melissa Diamond pour son appui et son aide précieux concernant les tâches administratives.

Un merci spécial à mon amie Danielle Lapierre. Merci de m'avoir soutenue à travers les dures épreuves de la vie. Merci aussi pour ton amitié et ta générosité.

Je tiens à adresser mes profonds remerciements à toute ma famille. Merci mes sœurs pour votre soutien inépuisable. Merci mes chers parents de m'avoir encouragée à persévérer. Sans vous je n'aurais jamais eu la chance d'aller au bout de mes études.

Un dernier et un immense merci à mon cher mari pour sa patience et son soutien. Merci de m'avoir encouragée dans ce défi. Tu es toujours ma source d'inspiration et un exemple de détermination. Merci d'exister et d'exister pour moi et pour Sawab.

1. Introduction

1.1 Cancer colorectal

1.1.1 Généralités

Le cancer colorectal (CCR), le troisième cancer le plus fréquent dans le monde pour les deux sexes confondus, cause six cent mille décès par année. Il représente un problème majeur de santé publique pour tous les pays industrialisés en raison de sa prévalence croissante et de son incidence élevée (1, 2).

Les facteurs de risque associés au CCR sont classés selon deux catégories: les facteurs héréditaires (3) et les facteurs environnementaux (4). Les individus ayant des antécédents génétiques ou ayant eu une maladie inflammatoire de l'intestin (MII) ont environ 15 % de risque de développer des tumeurs colorectales, alors que les 85 % restants sont sporadiques. Les études épidémiologiques ont confirmé que les MII (5), l'obésité (6), le diabète (7), les habitudes de vie (8, 9) et la diète (10) sont les facteurs de risque prédominants dans ce type de cancer. Par exemple, plusieurs recherches ont démontré qu'une alimentation riche en fibres (11), en calcium (12) et en vitamine D (13, 14) contribue à réduire le taux d'incidence du cancer. D'autres études ont dévoilé l'impact de cette alimentation sur le microbiote intestinal, et sur les voies de signalisation de la régulation immunitaire impliquées dans la tumorigenèse de CCR (15, 16).

1.1.2 Carcinogenèse colorectale

1.1.2.1 Prédispositions génétiques et cancer sporadique

Les bases moléculaires du CCR d'origine héréditaire sont différentes de celles qui surviennent dans un contexte sporadique. Les syndromes héréditaires du cancer colorectal sont la polypose adénomateuse familiale (PAF) et le syndrome de Lynch, une forme de cancer héréditaire sans polypose (HNPCC) (17, 18).

Chez les sujets atteints de PAF, la mutation du gène *APC*, situé en 5q2, est souvent l'évènement précoce identifiable dans la carcinogenèse de ce type héréditaire de CCR. L'*APC* contrôle de nombreux gènes cibles impliqués dans la survie et dans la prolifération des tumeurs, comme le c-Myc, la Cycline-D, la Survivine, mais aussi dans la migration et l'adhésion cellulaire, telle que Snail et E-cadhérine. Ce contrôle s'effectue en modulant le taux cellulaire de β -caténine, un régulateur transcriptionnel de la voie de signalisation *Wnt* (19, 20).

Les patients touchés par le syndrome de Lynch sont porteurs de mutations au niveau des gènes *hMSH2* ou *hMLH1* ou *PMS2*. Ces derniers sont impliqués dans la reconnaissance et dans la réparation des mésappariements des bases de l'ADN durant la réplication, le système MMR (MisMatch Repair). Les erreurs successives qui ont lieu dans ce processus de réparation engendrent une instabilité des séquences microsatellites responsables de l'initiation et de la progression tumorale (17, 20).

Les cancers colorectaux sont en majorité sporadiques. Ils sont associés aux facteurs immunologiques et environnementaux. Ce type de CCR dérive de la transformation d'une muqueuse intestinale saine en carcinome invasif à la suite d'acquisitions séquentielles d'altérations génétiques (21, 22).

La transformation de l'adénome en carcinome dans le CCR résulte d'une accumulation d'évènements cellulaires conduisant, à terme, à la perte du contrôle prolifératif (23, 24). La

mise en évidence de tous ces événements par un ensemble important d'études mécanistiques, a permis la classification du CCR selon deux voies majeures d'instabilité génomique conduisant au CCR (Fig.1): la voie de l'instabilité chromosomique (IC) et la voie de l'instabilité microsatellitaire (IMS) (25-27).

Dans la voie de l'IC, modèle linéaire de l'évolution de la tumorigenèse (28), les séquences de la carcinogenèse colorectale débutent par l'apparition des polyadénomes bénins après une prolifération cellulaire des glandes intestinales, les cryptes de Lieberkühn. Ces polyadénomes représentent le stade précoce de la maladie puisqu'elles sont à l'origine de plus de 80 % des CCR. La survenue d'une série d'altérations génétiques multiples conduit à la transformation de ces polyadénomes en adénomes avancés de haut grade et à la progression de ces derniers vers un cancer invasif (Fig.1). La voie de l'IC est caractérisée par des pertes alléliques et des altérations chromosomiques de 1p (MYCL1) 5q (APC), 17p (p53), et 18q (DCC / SMAD4) (29-31).

Dans la voie de l'IMS, qui représente de 15 % à 20 % des CCR sporadiques, les tumeurs sont caractérisées par une accumulation de mutations (Fig.1). Les microsatellites sont de courtes séquences d'ADN hautement répétitives et réparties aléatoirement dans le génome. L'accumulation des mutations dans cette voie, caractérisée par la présence d'instabilité dans les zones microsatellites, est liée à un défaut dans la machinerie responsable du processus de réparation et de correction des mésappariements de l'ADN (le MMR) (17, 25). Ce défaut entraîne de nombreuses mutations au niveau des facteurs impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, dans l'apoptose et dans la prolifération cellulaire. Par exemple, la mutation du gène *TGFBR2* et celle du gène pro-apoptotique *BAX*. La forme mutée de *TGFBR2*, présente dans 85 % des tumeurs de l'IMS, conduit à son inactivation et à l'annulation de l'activité suppressive de tumeur de son ligand TGF- β 1(32). La forme mutée de *BAX* empêche la mort cellulaire programmée et favorise l'immortalisation cellulaire (33).

1.1.2.2. Altérations épigénétiques

Différentes des deux voies classiques d'instabilité génétique IC et IMS, la voie d'altération épigénétique CIMP (CpG Island Methylator Phenotype), découverte récemment, est aussi impliquée dans la transformation de l'épithélium colique normal en adénocarcinome. Cette voie est associée au taux croissant de l'activité enzymatique de l'ADN méthyltransférase (DNMT). Cette enzyme est responsable de l'inactivation par l'hyperméthylation des promoteurs, des gènes suppresseurs de tumeurs et des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, tels que *CDKN2A/p16*, *MGMT*, *p14^{ARF}*, et *HLTF* (27, 34, 35).

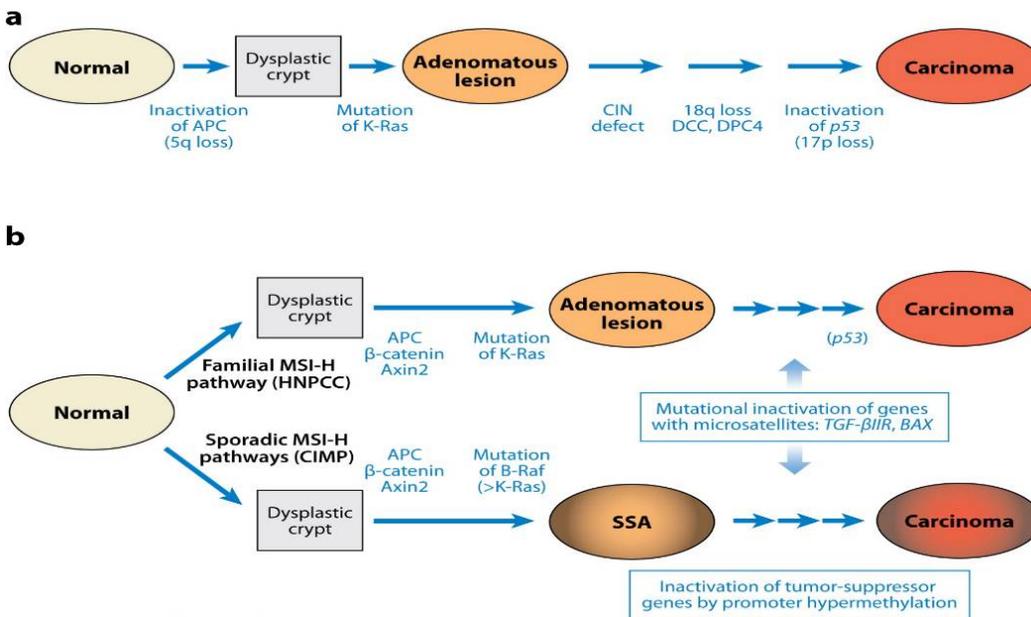


Figure 1. Les modèles génétiques du cancer colorectal
Tirée de Fearon ER, 2011 (18). Permission de reproduction accordée.

1.2 Inflammation chronique et cancer colorectal

Plusieurs études ont mis en évidence une association entre l'inflammation chronique, en particulier les maladies inflammatoires de l'intestin (MII), et la cancérogenèse du CCR. La durée et l'étendue de l'inflammation perturbent l'intégrité de la barrière épithéliale et peuvent

causer des dommages tissulaires irréversibles, démontrant ainsi le rôle actif de l'inflammation dans le développement du cancer (36-38). En produisant un microenvironnement inflammatoire, l'inflammation chronique peut aussi contribuer à promouvoir la prolifération cellulaire des tumeurs non initiées. En effet, il a été démontré que l'utilisation continue des anti-inflammatoires non stéroïdiens (NSAID) réduit non seulement le risque de mortalité due au CCR sporadique, mais qu'elle permet aussi une régression des adénomes chez les patients PAF qui héritent du gène *Apc* muté (39-41).

1.2.1 La réponse inflammatoire

L'inflammation est un processus réactif à un stress physiologique causé par une agression d'origine pathologique ou par un traumatisme physique ou chimique. Elle aboutit à la mise en place d'une réponse immunitaire. Cette réponse peut être rapide, mais non spécifique; c'est la composante innée de l'immunité. La réponse peut aussi être plus longue, mais spécifique, c'est la composante adaptative de l'immunité. Ces deux sous-systèmes immunitaires sont complémentaires et comptent chacun un arsenal cellulaire distinct avec des rôles spécifiques. L'articulation entre la composante innée et la composante adaptative de l'immunité est assurée par les interactions entre les cellules phagocytaires et lymphocytaires via la présentation de l'antigène (42). Au cours de la cascade inflammatoire, ces cellules immunitaires libèrent un grand nombre de médiateurs chimiques et de facteurs de signalisation, tels que l'histamine, les chémokines, les défensines et les cytokines pro-inflammatoires. Certaines cellules immunitaires produisent les formes réactives de l'oxygène (ROS), telles que le radical anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical hydroxyle (OH^{\cdot}) et l'oxyde nitrique (NO^{\cdot}). Lors d'une inflammation aiguë, ces médiateurs chimiques coordonnent de manière efficace la réponse immunitaire par l'entremise d'une

cascade de phénomènes synergiques, activateurs ou inhibiteurs, qui permettent une résolution rapide de l'inflammation, suivie par la cicatrisation et la guérison des lésions tissulaires.

Si la réponse immunitaire se prolonge à cause de la persistance de l'agression ou à cause d'un défaut au niveau de la restitution de l'épithélium, certaines anomalies dans la régulation du processus inflammatoire peuvent entraîner la chronicité de l'inflammation. Cette dernière est caractérisée par l'infiltration des cellules inflammatoires (macrophages, lymphocytes et plasmocytes) et par la destruction tissulaire qui prédisposent les cellules à une transformation oncogénique (43). Les principaux mécanismes oncogéniques de l'inflammation chronique sont l'induction de l'instabilité génomique, l'altération épigénétique ainsi que la promotion tumorale, la survie et l'angiogenèse. Il a été démontré que la production continue des ROS durant l'inflammation chronique (via COX-2) ainsi que l'expression aberrante de cytokines inflammatoires (via NF- κ B) contribuent, de façon quasi absolue, à la carcinogénèse (38) (Fig.2).

1.2.2 Le cancer colorectal associé à la colite ulcéreuse

Après les antécédents familiaux et l'hérédité (PAF, HNPCC), l'inflammation chronique représente le troisième facteur de risque au CCR. Les conséquences néfastes de cette inflammation sont la prédisposition des patients atteints de MII (30%) au cancer colorectal associé à l'inflammation (CAI) et le taux élevé de mortalité causée par ce type de cancer (Crohn: 46 %, colite ulcéreuse: 50 %). Les voies moléculaires menant au CAI diffèrent de la séquence classique du CCR. Chez les patients atteints de MII, l'inflammation chronique peut contribuer au développement des dysplasies de bas et de haut grade qui risquent d'évoluer en cancer CAI. Ainsi, les séquences «adénomes – carcinomes» observées durant la tumorigénèse sporadique du CCR deviennent «épithélium enflammé – hyperplasie –

dysplasies – carcinomes» durant la transformation cancéreuse des cellules de l'intestin du CAI chez les personnes atteintes de cette pathologie (5, 44) (Fig.2).

Les causes des MII sont multifactorielles. Elles se caractérisent par une rupture de l'homéostasie intestinale causée par un dysfonctionnement du système immunitaire dirigé contre des éléments de la flore intestinale chez des individus ayant une susceptibilité génétique. Les deux principales formes de MII sont la maladie de Crohn (MC) et la colite ulcéreuse (CU). Même si elles partagent de nombreux points symptomatiques en commun, la MC atteint en profondeur les tissus de la partie terminale de l'intestin grêle et du côlon, alors que la CU apparaît généralement au niveau du rectum pour se propager ensuite au niveau du côlon. Il y a 20 % de risque de développer un CAI au cours de la vie d'un patient atteint de la maladie de Crohn et 30 % chez les individus ayant une colite ulcéreuse. Chez ces derniers, le risque de cancer colorectal associé à la colite (CAC) augmente en parallèle avec la sévérité et la durée de la colite ulcéreuse. Son incidence est de 2 % après 10 ans, de 9 % après 20 ans et de 19 % après 30 ans (45, 46).

L'initiation et la progression tumorale du CAC dépendent de l'accumulation successive de mutations conduisant à l'inactivation des facteurs suppresseurs de tumeur et à l'activation des signaux de croissance et des oncogènes. Ces événements génétiques surviennent aussi dans le CCR sporadique, mais le moment de leur survenue et leur fréquence sont différents dans le CAC (47, 48). En effet, dans le CAC, les mutations du gène *p53* sont plus précoces et fréquentes que dans le cas du CCR sporadique. Contrairement au CCR, où ces mutations arrivent tard dans la tumorigenèse, les mutations en jeu dans le CAC se produisent au début de la séquence adénome-carcinome et elles sont souvent détectées dans la muqueuse non dysplasique (47). Même si les mutations d'*APC* sont moins communes dans le CAC (seulement 27,5 % des dysplasies de haut grade), une augmentation de la localisation nucléaire de la β -caténine a été observée dans des tumeurs du CAC (49, 50).

L'instabilité microsatellitaire (IMS), résultant du défaut de la machinerie préparatoire des mésappariements de l'ADN (MMR), contribue, comme dans le CCR, à la carcinogenèse du CAC. Cependant, cette instabilité est étroitement liée à la persistance du processus inflammatoire. Il a été démontré que l'augmentation de l'expression des deux micro-ARNs miR-155 et miR-21 liés à l'inflammation, cible une batterie de protéines impliquées dans le processus de MMR et constitue l'événement pré-néoplasique conduisant au développement du CAC (44, 51).

De nombreuses preuves ont aussi démontré que, durant une réponse inflammatoire prolongée et exagérée, l'activation des chémokines et des cytokines pro-inflammatoires, telles que IL-6, STAT3, TNF- α , IL-10, IL-12 et IL-23, contribue à la transformation et à la progression tumorale du CAC (50) (Fig.2).

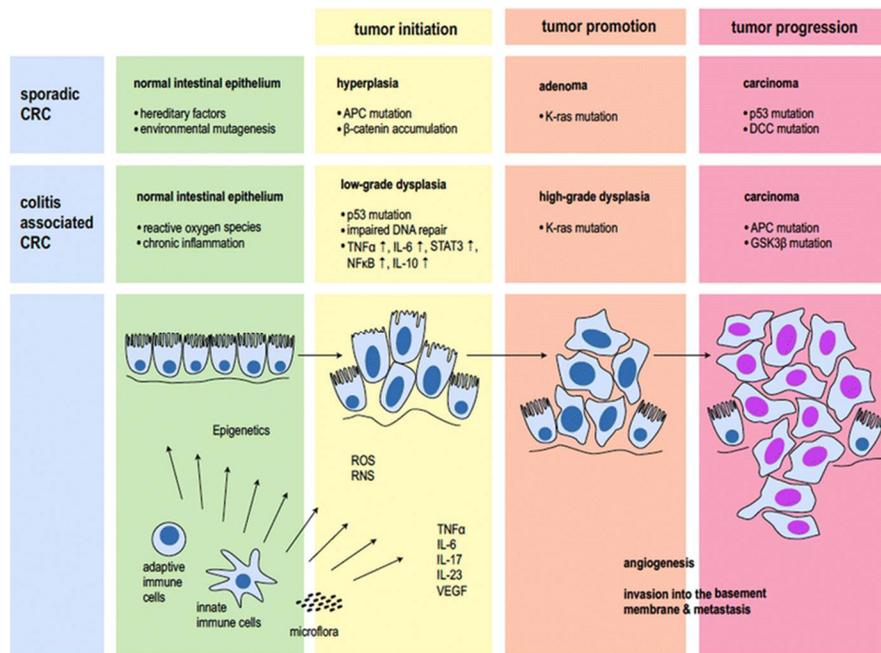


Figure 2. Pathophysiologie du cancer colorectal sporadique et de cancer colorectal associé à la colite ulcéreuse

Tirée de Foersch S et Neurath MF, 2014 (50). Permission de reproduction accordée.

Durant une réponse inflammatoire, la cytokine IL-6 est produite abondamment par les cellules de l'immunité innée et elle est responsable de l'activation de la voie de signalisation Jak/STAT3. Les études expérimentales menées sur le modèle murin induit par azoxyméthane (AOM)/ dextran de sulfate de sodium (DSS) ont montré que l'utilisation d'un antagoniste de l'IL-6 bloque l'activation de la voie de signalisation de STAT3 et prévient le processus de tumorigenèse (52). L'activation de la voie STAT3 contribue et conduit à l'expression des gènes impliqués dans la survie cellulaire et dans la prolifération tumorale. Dans le modèle des souris *IL6^{-/-}* traitées à l'AOM/DSS, Grivennikov et ses collaborateurs ont montré que le couple IL-6/STAT3 est requis pour réguler plusieurs gènes oncogéniques (53).

Plusieurs données scientifiques ont également permis d'élucider le rôle du TNF- α comme médiateur entre l'inflammation et le CAC. Une fois lié à son récepteur (TNF-R1), TNF- α peut transmettre deux types de signaux en fonction du contexte tissulaire : un signal anti-apoptotique, transmis par l'activation du facteur transcriptionnel NF- κ B, et un signal anti-tumoral, transmis par sa capacité à activer la Caspase-3 et à induire l'apoptose (50). Des études récentes qui ont utilisé le modèle murin du CAC (induit chimiquement par AOM/DSS) ont mis en évidence le rôle du TNF- α et de son récepteur dans la traduction des signaux transcriptionnels des gènes médiateurs dans l'inflammation liée au cancer. Les souris normales traitées par AOM/DSS et ayant reçu de l'Infliximab[®], un anticorps dirigé contre TNF- α , ont connu une diminution remarquable du nombre et de la taille de leurs tumeurs (54). De manière similaire, les souris dont on a invalidé le récepteur TNF-R1 et induit le CAC par l'AOM/DSS, avaient moins de lésions provoquées par l'inflammation, ce qui atténuait la formation et la progression des tumeurs associées à la colite (55). L'effet d'une activation soutenue de NF κ B par TNF- α sur la transformation tumorale et sur la résistance à la mort cellulaire a aussi été validé par l'utilisation de murins transgéniques pour la kinase *IKK β* constitutivement active. Les

cellules épithéliales intestinales de ces animaux ont connu une prolifération non régulée qui a mené à la formation des tumeurs (55).

Une autre cytokine impliquée de près dans la pathogénie de l'inflammation et de CAC est l'IL-10. C'est une molécule pléiotropique exerçant à la fois des effets anti-inflammatoires, en interférant négativement avec l'expression de l'IL-1 β et de TNF- α , et des effets pro-inflammatoires en stimulant, avec le microbiote intestinal, la présence d'un microenvironnement inflammatoire favorable à la progression tumorale. Les effets anti-inflammatoires de l'IL-10 ont été validés par l'utilisation des souris *Il10^{-/-}* avec AOM. Dans un environnement conventionnel, 60 % de ces souris ont développé des adénocarcinomes colorectaux. Cependant, les animaux *Il10^{-/-}* élevés dans un environnement stérile, sans micro-organismes résidents, n'ont développé aucune tumeur et aucune anomalie histologique. De plus, les souris issues d'un croisement entre les souris *Il10^{-/-}* et celles invalidées pour MyD88, protéine adaptatrice dans la voie de signalisation des TLRs, démontreraient une résistance à la tumorigenèse (56-58). Ces études ont permis de démontrer que la modulation du microbiote intestinal est fortement impliquée dans la pathogenèse du CAC.

La génération du stress oxydatif durant une réponse inflammatoire augmente la propension aux altérations géniques et à la transformation cellulaire, moteurs fondamentaux de la carcinogenèse du CAC. Les espèces réactives oxygénées (ROS) et les espèces réactives azotées (RNS), produites en grande quantité par les macrophages en réponse à une agression microbienne, provoquent des dommages à l'ADN (Fig.2). En l'absence des mécanismes de réparation de l'ADN, ces espèces réactives entraînent des mutations dans des gènes comme le *CTNNB1* (qui code la β -caténine), l'oncogène *KRAS* et le suppresseur de tumeurs *TP53* (50, 59-61).

En plus des réactifs ROS et RNS, le monoxyde d'azote (NO) est aussi produit en réponse à l'agression infectieuse; une surproduction de NO active la COX, une enzyme

responsable de la production des prostaglandines. Ces molécules sont impliquées dans la tumorigenèse car elle stimule la croissance, l'angiogenèse et l'invasion cellulaire (62-64). Une activité accrue de la synthase inductible de l'oxyde nitreux (iNOS), enzyme responsable de la production de NO, contribue fortement à la tumorigenèse associée à l'inflammation (65, 66). Chez les souris Min, mutées pour APC et développant spontanément des tumeurs intestinales, l'inhibition sélective de l'activité enzymatique de iNOS ou la délétion de son gène diminue l'incidence de ces tumeurs. Ces expériences avec les souris Min^{iNOS(-/-)} ont révélé le rôle-clé que tient iNOS dans l'initiation et la promotion du cancer (67, 68).

1.2.3 Le microbiote et la cancérogenèse du CAC

L'impact épigénétique du microbiote intestinal sur le développement du CAC est de plus en plus reconnu et accepté. La modification du mode de vie, de l'alimentaire et de l'hygiène a causé une diminution de la biodiversité de la microflore intestinale. Cette dysbiose causant un déséquilibre entre la défense et la tolérance, est fortement associée au développement des MII et du CAC. Une forte proportion de certaines espèces bactériennes, telles que la *Streptococcus bovis*, l'*Helicobacter pylori*, le *Bacteroides fragilis*, l'*Enterococcus faecalis*, le *Clostridium septicum*, le *Fusobacterium spp* et l'*Escherichia coli* NC101, est associée au développement du CCR. Le degré de virulence et de génotoxicité de ces bactéries provoque une dérégulation des voies de signalisation et une stimulation persistante de la réponse inflammatoire. La production aberrante des cytokines pro-inflammatoires et du stress oxydatif (ROS, RNS, NO), secondaire à cette stimulation accrue, perturbent la barrière gastrique et l'homéostasie intestinale, qui sont, en soit des événements pro-carcinogéniques (57, 69-72). L'évidence du rôle pro-tumoral de l'inflammation initié par les microorganismes intestinaux,

découle de l'absence de tumeurs gastriques chez les modèles expérimentaux murins du CCR (*Il10^{-/-}* et *Tgfb^{-/-}*) élevés dans des conditions stériles (73, 74).

La discrimination entre les microorganismes commensaux et les microorganismes pathogènes, une des caractéristiques fondamentales de la muqueuse intestinale, est assurée par des voies de signalisations induites par la reconnaissance spécifique des motifs moléculaires microbiens communs, PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns). Ces structures hautement conservées et présentes dans une variété de micro-organismes, sont reconnues par des récepteurs appelés PRR (Pattern Recognition Receptors). La stimulation des PRRs par les PAMPs permet d'adapter la réponse immunitaire en fonction de l'origine des stimuli (soi ou non-soi) et de déclencher une cascade spécifique de signalisation. Cette spécificité de la réponse immunitaire dépend aussi du type de PRR activé (75, 76).

1.2.3.1 « Pattern Recognition Receptor » (PRRs)

Il existe quatre classes différentes de familles de PRR intervenant toutes dans l'immunité intestinale: les TLRs (Toll-Like Receptors), les CLR (C-type lectin receptors), les NLRs (NOD-like receptors) et les RLRs (Retinoic acid-inducible gene (RIG)-I-like receptors) (74). Ces PRR sont exprimés par les cellules de l'immunité innée, comme les monocytes, les cellules dendritiques, les macrophages, les neutrophiles, les cellules épithéliales ainsi que par les cellules de l'immunité adaptative. Chaque PRR reconnaît de manière spécifique les PAMP, qu'ils soient d'origine bactérienne, virale, fongique ou protozoaire (77). À l'exception de quelques NLRs, la stimulation des PRRs par les PAMPs induit et régule la transcription de plusieurs gènes impliqués dans les réponses inflammatoires, tels que les cytokines pro-inflammatoires, l'interféron de type I (I IFNs), les chimiokines et les protéines antimicrobiennes. Le profil d'expression de ces gènes dépend du type de PRR stimulé (74). Les PRR les plus étudiés actuellement sont les TLRs et les NLRs.

Les récepteurs TLRs

Les TLRs forment deux sous-groupes, les TLRs intracellulaires (TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9) et les TLRs transmembranaires (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 et TLR11). Ces derniers possèdent un domaine extracellulaire riche en leucine LRR et une partie intracellulaire TIR partageant un domaine d'homologie avec le récepteur de l'IL-1. Le domaine extracellulaire permet la reconnaissance du ligand (PAMPs distincts) et de l'homodimérisation ou l'hétérodimérisation des TLRs, alors que le domaine intracellulaire permet la signalisation en aval et l'activation des facteurs de transcription NF- κ B (facteur nucléaire- κ B) et AP1 (activator protein1). Ces facteurs induisent la transcription des cytokines pro-inflammatoires et des chimiokines, ainsi que des facteurs impliqués dans l'activité antimicrobienne (78), telles les voies de signalisation induites par TLR2, TLR3 et TLR4 (Fig.3). Les lipoprotéines bactériennes sont reconnues par l'hétérodimérisation de TLR1/6 et de TLR2 et par les lipopolysaccharides (LPS), détectés par le complexe TLR4/MD2. L'activation de l'hétérodimère TLR1/6 et TLR2 par son ligand permet, via le domaine TIR, le recrutement des protéines adaptatrices MyD88 et TIRAP, ce qui entraîne la formation du complexe IRAKs et TRAF6. Le TRAF6, une ubiquitine-ligase-E3, active le complexe TAK1, TAB1 et TAB2/3 résultant en la phosphorylation de NEMO et en l'activation du complexe IKK. La protéine I κ B phosphorylée est dégradée tandis que NF- κ B est libéré pour être transporté dans le noyau, où il active la transcription des gènes codant les cytokines. En même temps, TAK1 (du complexe TAK1/TAB1/TAB2/3) active la voie de MAP Kinase qui, à son tour active AP-1, un facteur de transcription important pour l'expression des cytokines. La liaison de LPS au complexe TLR4/MD2, induit sa translocation, avec sa protéine adaptatrice TRAM, vers l'endosome renfermant le TLR3 activé par les fragments d'ARN exogènes. Les deux TLRs activent TRIF et plusieurs facteurs, à la fois responsables de l'activation de NF- κ B et de IRF3. Ces cascades d'activation aboutissent à la transcription des gènes pro-inflammatoires et des gènes de type I IFNs (Fig.3) (74).

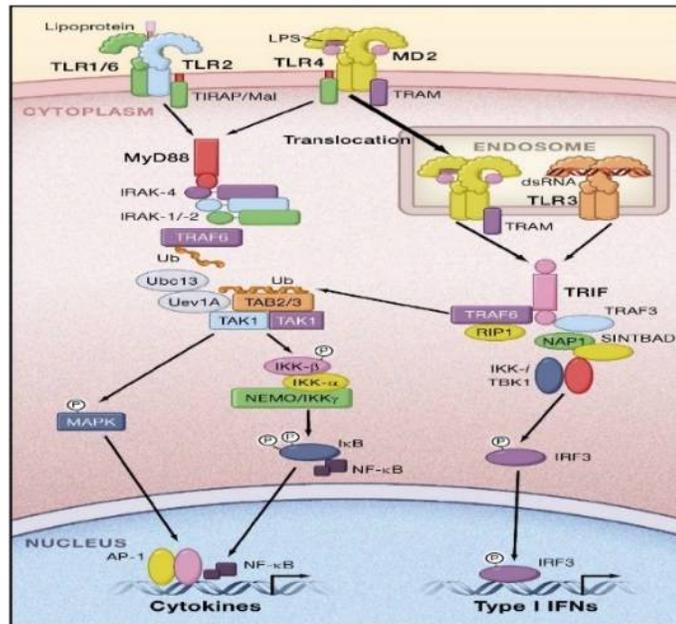


Figure 3. Les voies de signalisation de TLR2, TLR3, et TLR4
Tirée de Takeuchi O et Akira S, 2010 (66). Permission de reproduire accordée.

Les récepteurs TLRs et le cancer colorectal associé à l'inflammation

Les recherches effectuées au cours de cette dernière décennie ont mis en cause les voies de signalisation des TLRs dans le développement du CCR, en particulier TLR4 (77, 79-82). Il a été démontré que l'inhibition de la signalisation de ces récepteurs par l'inactivation de leur protéine adaptatrice MyD88 prohibait la tumorigenèse intestinale. En effet, les souris Min déficientes en MyD88 ($Apc^{Min/+} MyD88^{-/-}$), présentaient un taux réduit de mortalité associée au cancer ainsi qu'une réduction significative de la taille des tumeurs et du nombre de sites tumoraux en comparaison avec les souris contrôles ($Apc^{Min/+} MyD88^{+/+}$) (79). De même, les souris déficientes en TLR4 et induites par AOM/DSS étaient fortement protégées contre le développement des néoplasies, alors que, chez celles avec une activation constitutive de la

voie de signalisation de TLR4, le score de l'inflammation et le taux de tumeurs étaient élevés. Ces manifestations étaient aussi accompagnées d'une augmentation de l'expression de TNF- α et de COX-2 ainsi que d'une surproduction de PGE₂ dans leur muqueuse intestinale (80, 83, 84). Le traitement de ces souris avec un anticorps antagoniste de TLR4 (inhibant la signalisation par TLR4), diminuait de manière significative le développement de tumeurs (84).

De plus, les polymorphismes des gènes codants pour TLR4 et TLR2 sont associés à un risque accru de MII et de CAC et suggérés comme biomarqueurs potentiels de ces deux pathologies (85, 86). L'étude de la fréquence du polymorphisme TLR4 Asp299Gly (D299G) chez 182 patients atteints de MC, comparés à 188 contrôles, a permis d'associer ce polymorphisme à une augmentation du risque de développer cette maladie. Le polymorphisme de TLR4 (D299G) et celui de TLR2 (microsatellite de motif GT répété) sont également fortement liés au risque développer le CCR et ce, dans 89 % de cas de cancer colorectal. Une autre variante génétique de TLR4 et de TLR2 est le polymorphisme nucléotidique d'une base unique (SNP). Tous les SNPs identifiés dans ces deux récepteurs ont été associés à la survie relative du cancer après son diagnostic (85-89).

Les TLRs peuvent aussi interagir avec d'autres familles de PRRs, telles que les NODs, et induire la production des cytokines et des IFNs. Par exemple, un engagement coopératif de TLR4 avec NOD1 et NOD2 a été observé chez les monocytes humains et chez les cellules dendritiques stimulées (90). De plus, il a été démontré que la synergie entre la stimulation de TLR4 et de NOD2 dépend de l'intensité du signal médié par TLR4 (91-93).

Les récepteurs NLRs

Les NLRs représentent une grande famille de PRRs cytoplasmiques reconnaissant à la fois les ligands exogènes, PAMPs, et les ligands endogènes, DAMPs (damage-associated

molecule patterns). Les NLRs se subdivisent en 5 sous-familles : NLRA, NLRB, NLRC, NLRP, et NLRX (94). Ils possèdent généralement trois domaines successifs. Le premier est le domaine C-terminal, riche en leucine LRR, qui détecte les PAMPs et les DAMPs. Le deuxième est le domaine NACHT, responsable de l'oligomérisation et de la formation d'un large complexe d'activation. Le troisième est le domaine N-terminal de type PYD (pyrin domain) ou CARD (caspase recruitment domain), qui permet de recruter et d'activer les cibles moléculaires via une cascade de signalisation (94). La fonction et le rôle de la majorité des NLRs restent encore ambigus, à l'exception de NOD1/CARD4 et de NOD2/CARD5. Ces derniers sont les membres de la famille des NLRs les mieux caractérisés. La stimulation de ces deux récepteurs par des produits microbiens entraîne l'activation des voies de signalisation pro-inflammatoires qui permettent l'activation des cellules de l'immunité innée et adaptative. Dans certaines conditions, l'activation de ces voies de signalisation peut induire une réponse inflammatoire chronique et, même, initier une tumorigenèse colique (94-99). Ces deux récepteurs reconnaissent les PAMPs constituant la paroi bactérienne. NOD1 détecte les DAMPs dérivés du peptidoglycane de bactéries Gram⁻, alors que NOD2 reconnaît les MDPs (muramyl dipeptide) des Gram⁻ et Gram⁺. NOD1 est ubiquitaire dans les tissus humains, tandis que NOD2 est exprimée dans les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules de Paneth et les cellules épithéliales de l'intestin (100). Bien que plusieurs voies de signalisation, médiées par NOD1 et NOD2 aient été éclaircies, les cascades enzymatiques d'ubiquitination et de phosphorylation, mises en place pour la transduction du signal, peuvent varier en fonction du type de cellule stimulée, de l'intensité du signal et du type de PRRs participant (100-102). Par exemple, les voies de signalisation des NODs peuvent rejoindre celles des TLRs pour induire, en fonction de certaines conditions, une amplification ou une atténuation de la réponse (91-93).

Dans le cas d'une activation conjointe de NOD1 et de NOD2 (Fig.4), la signalisation débute à la suite de leur liaison avec leur ligand spécifique, suivie par une auto-oligomérisation et par le recrutement de RIP2 via le domaine CARD. RIP est activée après une série de phosphorylations et de polyubiquitinations par les membres de la famille de TRAF (TRAF2, TRAF5 et TRAF6), par ceux de la famille d'IAP (xIAP, cIAP1 et cIAP2) ou par ceux de BCL2 (BID). Il en résulte le recrutement de TAK1 et l'ubiquitination de NEMO. NEMO est responsable de l'activation de la voie canonique de NF- κ B. Cela mène ainsi à sa translocation au noyau, tandis que TAK1 active, via le complexe TA1 et TAB2/3, la voie des MAPKs. Ces deux voies permettent l'expression de plusieurs gènes cibles, dont les peptides antimicrobiens, tels que les α -défensines ainsi qu'une panoplie de chimiokines et de cytokines pro-inflammatoires (101).

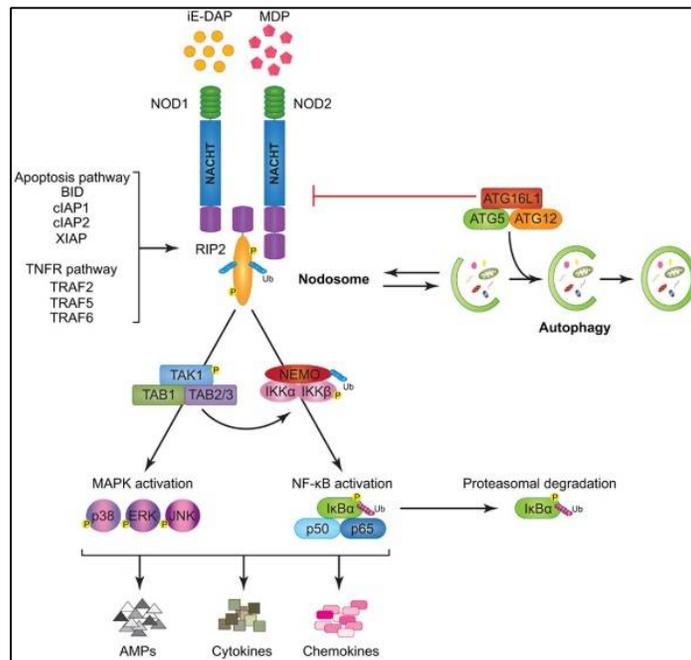


Figure 4. La transduction du signal par Nod1 et NOD2

Tirée de Saxena M et Yeretssian G, 2014 (101). Permission de reproduction accordée.

Les récepteurs NODs et le cancer colorectal associé à l'inflammation

Les récepteurs NODs sont associés à plusieurs pathologies inflammatoires et auto-immunes. Diverses anomalies structurales héréditaires au niveau de NODs sont impliquées dans la pathophysiologie des MII. Le mieux connu est le gène *Nod2*, puisqu'il est impliqué dans l'établissement de la MC. Le criblage du génome humain a permis d'identifier des polymorphismes dans les régions codantes de NOD2, à savoir R702W, G908R et 3020 insC. Ces trois variantes sont considérées comme des facteurs prédisposant au développement de la MC (103-105). En présence de MDP, les mutations de NOD2 ne permettent pas le recrutement de RIP2 et l'ubiquitination de NEMO; cela altère ainsi, la voie de signalisation en aval de l'activation de NF- κ B (104). L'altération de cette voie provoque une diminution de l'expression des α -défensines et une susceptibilité accrue aux infections bactériennes entériques ainsi qu'une activation excessive du système immunitaire adaptatif, aboutissant ainsi à une inflammation intestinale chronique (97). Le rôle de l'infection bactérienne comme facteur important dans la physiopathologie de la MC a été élucidé grâce à plusieurs modèles animaux d'inflammation intestinale. Les souris *Nod2*^{2939iC}, traitées par DSS pour induire une colite, ont montré une hyperactivation de NF- κ B en réponse au MDP et une sécrétion accrue de cytokines, en particulier IL-1- β . Une fois traitées avec des antibiotiques, ces souris devenaient résistantes au DSS (106). Il a aussi été démontré que les variantes de NOD2 régulent négativement la voie de signalisation médiée par les récepteurs TLRs. Les souris^{Leu1007fsinsC} étaient moins résistantes à la colite induite par DSS que les souris sauvages et elles montraient une augmentation de l'activation de la voie NF- κ B et une surproduction de l'IL-1B à la suite d'une stimulation par les ligands de TLR2 (107). Il a aussi été démontré, grâce à ces modèles expérimentaux, que la défaillance dans la voie de signalisation de NOD2 facilite non seulement l'infection de l'intestin par les bactéries entériques, mais entraîne aussi une rupture de tolérance vis-à-vis les bactéries commensales, et une réponse inflammatoire

prédominante qui peut constituer une étape précoce de la tumorigenèse intestinale (108). Les souris déficientes en NOD2 et RIP2 induites chimiquement par AOM/DSS possédaient un microbiote altéré (dysbiose) et produisaient une réponse inflammatoire pathologique qui corrélait avec une forte expression d'IL-6. Ces souris avaient aussi plus de tumeurs que les souris sauvages. De plus, l'implantation de la dysbiose de ces souris déficientes chez les souris sauvages, traitées avec AOM/DSS avait exacerbé la sévérité de l'inflammation et les lésions dysplasiques chez les souris sauvages (109). Ainsi, le rôle joué par NOD2 est crucial pour la régulation du microbiote et le maintien de la tolérance et de l'homéostasie intestinale.

Des études cliniques ont corrélié l'existence des polymorphismes R702W, G908R et 3020 insC avec l'incidence élevée du CCR chez les patients souffrant de la MC (110). Dans la population polonaise, la présence de la variante 3020 insC chez les patients ayant la MC semble augmenter le risque de ce type de cancer (111). D'autres études ont démontré la contribution d'agents infectieux comme facteur amplificateur de risque. Les individus avec des polymorphismes de NOD2 ont un taux bas de défensine et une diminution de la défense épithéliale intestinale, conséquence de la perte de régulation de la colonisation bactérienne par NOD2. Les essais cliniques réalisés auprès des sujets avec la variante 802C-T et porteurs d'*Helicobacter pylori* ont associé fortement ce polymorphisme et l'infection bactérienne à l'initiation et à la progression du cancer gastrique (112).

L'implication potentielle du microbiote dans le contrôle de l'inflammation intestinale et dans l'étiologie du CCR est consolidée par les données cliniques et par la contribution de NOD2 à la régulation de la tolérance immunitaire et au maintien de la stabilité du microbiote. Plusieurs études ont confirmé le rôle majeur de la diète sur le microbiome et sur la symbiose intestinale. Le régime alimentaire peut modifier le microenvironnement gastrique et la composition de la microflore intestinale jusqu'à provoquer, dans certaines conditions, une dysbiose (113). Une étude récente a démontré qu'une diète riche en gras (HFD) provoquait un déséquilibre du

microbiote chez la souris, contribuant ainsi au développement de la résistance à l'insuline semblable à celle produite chez les souris NOD2^{-/-} (114). A contrario, la stimulation de NOD2 les a protégées contre une inflammation exagérée associée à la dysbiose et contre la résistance à l'insuline (114). Par ailleurs, les souris NOD2^{-/-} déficientes en vitamine D (vD) présentaient une dérégulation de l'activité antimicrobienne et un déséquilibre des bactéries intestinales, les prédisposant au développement d'une colite ulcéreuse (115). L'impact de certains nutriments sur la modulation de l'expression de NOD2 a aussi été rapporté dans plusieurs expériences *in vitro*. Les cellules intestinales humaines (HIEC, HT29) et les cellules monocytiques THP-1 traitées avec le butyrate ou le 1,25-dihydroxylvitamine D₃ régulaient de manière positive l'expression des NOD2 (116). De plus, il a été démontré récemment que le traitement de monocytes et de cellules épithéliales humaines avec la vD₃ non seulement augmentait le niveau d'expression de NOD2, mais contribuait aussi de manière synergique à la production des peptides antimicrobiens lorsque NOD2 est stimulé par son ligand. Cette synergie était cependant complètement absente dans les macrophages de patients avec la MC homozygotes pour la variante non fonctionnelle de NOD2 (117). Ces données démontrent davantage la contribution de l'alimentation au maintien de l'homéostasie intestinale et à la prévention contre les inflammations chroniques et les cancers associés à l'inflammation.

1.3 Vitamine D

De nombreuses études et revues systématiques ont amplement démontré les effets bénéfiques de certains nutriments et suppléments sur les maladies inflammatoires de l'intestin et le cancer colorectal (10, 118, 119). La vitamine D (vD) en est un qui possède des actions anti-inflammatoires essentielles à la prévention des maladies chroniques et du CCR (120, 121). Plusieurs études cliniques laissent supposer qu'il existe un lien entre les faibles taux de vD et

la forte prévalence des maladies inflammatoires chroniques chez les caucasiens des climats nordiques (122-124).

1.3.1 Métabolisme global

La vD existe sous deux formes: la vD₃ (le cholécalciférol), d'origine animale, et la vD₂ (l'ergocalciférol), d'origine végétale. La vD₃ peut être de source exogène, étant présente dans plusieurs aliments naturellement riches ou supplémentés, ou de source endogène, synthétisée par la peau lors de l'exposition solaire. Sous l'action des rayons UVB du soleil, le 7-déhydrocholestérol épidermique est transformé en pré-vD₃ et ensuite converti en vD₃ sous l'effet de la chaleur corporelle (125). Liée à la protéine porteuse VDBP (vitamin D binding protein), elle est transportée vers le foie pour y être hydroxylée par la D-25-hydroxylase microsomiale (CYP2R1), en 25-hydroxyvitamine D₃ (25(OH)D₃), la forme circulante qui reflète le statut vitaminique D (Fig.5). Au niveau rénal, la 25(OH)D₃ subit une autre hydroxylation par l'enzyme 25(OH)D-1- α -hydroxylase (CYP27B1) pour donner la 1,25 dihydroxyvitamine D₃ (1,25(OH)₂D₃), la forme active de la vD étant donné sa fonction endocrine. La CYP27B1 est aussi exprimée dans d'autres cellules telles que, les monocytes, les macrophages, les ostéoblastes et les entérocytes, permettant ainsi une action autocrine et paracrine. La 1,25(OH)₂D₃ est véhiculée dans le sang par la VDBP et agit sur les cellules intestinales, osseuses, rénales et parathyroïdiennes pour réguler l'homéostasie phosphocalcique.

La production de 1,25(OH)₂D₃ est régulée par l'action de deux enzymes impliquées dans sa synthèse (CYP27B1) et dans son catabolisme (CYP24A1). L'activité de CYP27B1 est régulée positivement par la parathormone et par une basse calcémie, et négativement par le FGF23 (fibroblast growth factor 23) et par le mécanisme de rétro-inhibition exercé par la 1,25(OH)₂D₃ circulante. L'enzyme rénale CYP24A1 inactive la 1,25(OH)₂D₃ et la 25(OH)₂D₃ par hydroxylation au niveau du carbone 24, ce qui produit ainsi les métabolites 24,25-

dihydroxyvitamine D₃ (24,25(OH)₂D₃) et 1,24,25-trihydroxyvitamine D₃ (1,24,25(OH)₃D₃) (Fig.5). Le niveau d'expression du gène de la *Cyp24A1* est contrôlé par l'action de 1,25(OH)₂D₃, puisque le promoteur du gène codant cette enzyme renferme deux éléments de réponse à l'hormone (126-128).

Cette vitamine est impliquée dans plusieurs processus physiologiques (125). Elle joue un rôle indispensable dans le maintien de l'homéostasie phosphocalcique et osseuse ainsi que dans la modulation du système immunitaire, et dans la régulation de la prolifération cellulaire et de l'apoptose (129, 130). Au niveau de ses cellules cibles, la 1,25(OH)₂D₃ s'associe à son récepteur VDR, un facteur de transcription de la famille des récepteurs nucléaires. Le complexe VDR/1,25(OH)₂D₃ forme un hétérodimère avec le récepteur X des rétinoïdes (RXR) pour se lier aux séquences spécifiques d'ADN, appelées VDREs. Ces derniers sont des sites de liaison répondant à la vD et localisés dans la région promotrice de plusieurs gènes. En plus, de s'exprimer dans les reins et l'intestin, le VDR est également exprimé au niveau des cellules dendritiques, des monocytes, des macrophages et des lymphocytes T, où sont assurées d'autres fonctions biologiques de la vD comme, l'apoptose, la prolifération cellulaire et la modulation du système immunitaire (131).

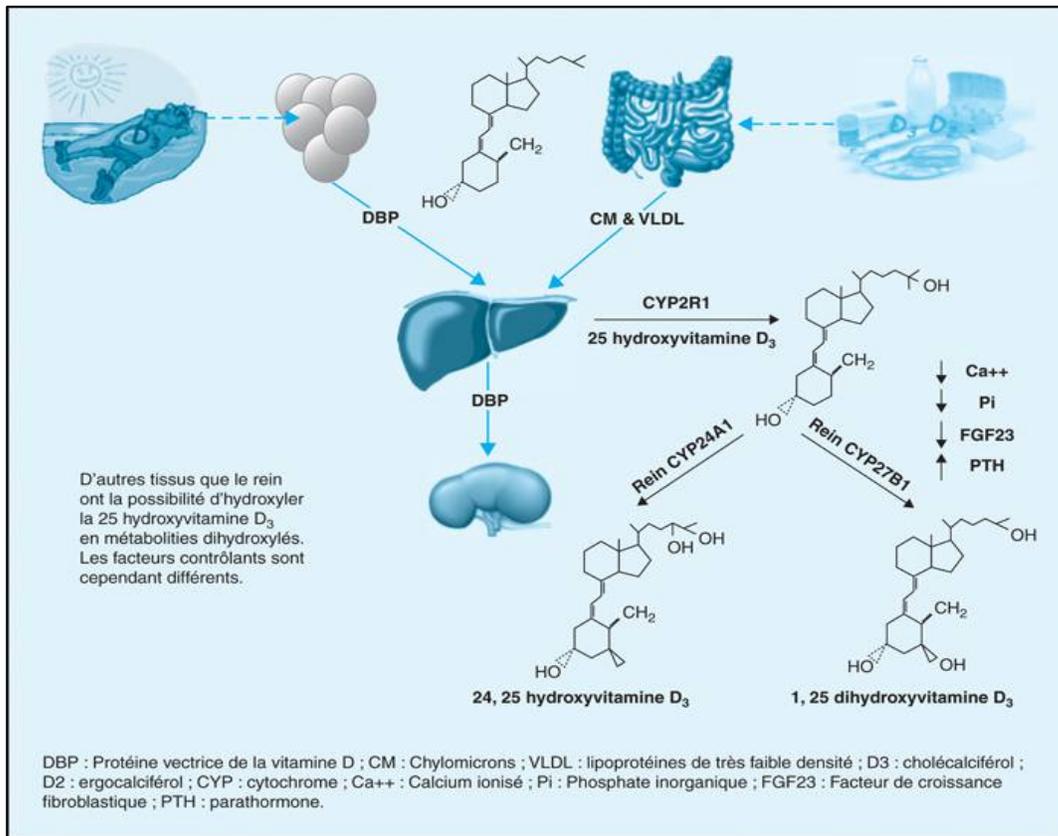


Figure 5. Schéma simplifié du métabolisme de la vitamine D

Tiré de Le Goff et coll, 2015 (128). Permission de reproduction accordée.

1.3.2 Vitamine D et inflammation chronique

Outre son rôle dans le métabolisme phosphocalcique et l'homéostasie osseuse, la vD intervient dans la modulation du système immunitaire en agissant sur l'immunité innée et adaptative. La présence de VDRE sur le promoteur du gène de la cathelicidine et de la β -défensine permet à la vD d'agir sur les cellules du système immunitaire inné et de stimuler la production de la cathelicidine et de la β -défensine, deux peptides antimicrobiens. Ces deux peptides assurent la première défense contre les agressions microbiennes, contribuant ainsi au maintien de l'intégrité de la barrière intestinale (132). Les études *in vitro* ont démontré que

l'activation de TLRs par leurs ligands au niveau des macrophages induit l'expression du CYP27B1 et du VDR, ce qui résulte en la synthèse locale de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, sa fixation sur le VDR pour assurer la stimulation et la synthèse des cathelicidines (133). De plus, la pré-incubation des monocytes et des cellules épithéliales avec $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ augmente le niveau d'expression de NOD2, ce qui stimule aussi la production de ces peptides antimicrobiens (117). Or, des études épidémiologiques ont démontré que des taux bas en $25(\text{OH})\text{D}_3$ sérique jumelés aux polymorphismes de NOD2 sont largement impliqués comme facteurs de risque pour MII (116, 134).

La vD agit également sur les acteurs de l'immunité adaptative tels que les cellules dendritiques et les lymphocytes B et T. Cependant, son action immunomodulatrice est généralement suppressive. En effet, les données *in vitro* ont montré que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ supprime l'activation des cellules T naïves en inhibant la maturation des cellules dendritiques myéloïdes. La $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ diminue la synthèse de l'IL-12 et IL-13 et bloque ainsi la différenciation des lymphocytes Th1 et Th17 (135, 136). L'action de la vD sur les cellules dendritiques ne se limite pas à cet effet. Le traitement de ces cellules avec $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ favorise la réponse immunitaire par les cellules T régulatrices sécrétrices de TGF- β et les cellules sécrétrices d'IL-10 (137). Une même action modulatrice est observée sur les lymphocytes B.

L'effet immunomodulateur de la vD sur les lymphocytes T et B peut être aussi médié indépendamment des cellules dendritiques. Étant donné que ces cellules expriment le CYP27B1 et le VDR, elles sont capables d'activer par elles-mêmes la $25(\text{OH})\text{D}_3$ tout en étant sensibles à l'action intracrane de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Cette dernière peut ainsi limiter la prolifération des cellules lymphocytaires B et ajuster la réponse immune des anticorps durant une stimulation massive du système immunitaire lors du processus inflammatoire (136, 138).

Les expériences effectuées *in vivo* ont aussi confirmé la stimulation immunitaire de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sur les T régulatrices (Treg) ainsi que son effet immunosuppresseur sur l'expression des cytokines par Th17. Le traitement d'un modèle murin de colite par la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en réduit la sévérité via la réduction de cellules Th1 et Th17 et de l'expression de la cytokine pro-inflammatoire IL-17, et via une régulation positive des cellules T reg (139). L'IL-17 est impliquée de très près dans l'immunopathogenèse des MII et dans la tumorigenèse du CCR (140, 141)

L'hyperperméabilité intestinale est un autre facteur associé à la pathogenèse des MII. Une inflammation chronique entraîne une modification dans la composition des protéines des jonctions serrées responsables du maintien de la polarité et de l'étanchéité des cellules épithéliales. Il en résulte une hyperperméabilité paracellulaire et un risque de translocation bactérienne, qui engendre l'activation des voies de signalisation intracellulaire et la transcription consécutive des gènes de cytokines pro-inflammatoires (142, 143). Il a été démontré que la vD joue un rôle dans l'intégrité de la barrière intestinale et qu'un déficit en vD peut promouvoir un dysfonctionnement de cette barrière et une exacerbation de l'inflammation (144). Dans les cellules Caco-2 en présence de DSS, le traitement avec $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ régule positivement l'expression des protéines des jonctions serrées essentielles à l'intégrité structurale et fonctionnelle de ces jonctions (145). Les expériences avec les souris dont le VDR est invalidé montrent une plus grande susceptibilité au DSS comparativement aux souris sauvages et elles ont moins de résistance transépithéliale. Les souris $\text{VDR}^{-/-}$ présentent également une dérégulation de l'expression des gènes codants pour des protéines des jonctions serrées épithéliales qui assurent l'intégrité de la barrière intestinale (145).

1.3.3 Vitamine D et cancer colorectal

De nombreuses données épidémiologiques suggèrent que l'insuffisance en vD, exprimée par des faibles concentrations sériques de 25(OH)D, observée dans les populations nordiques est associée à une incidence accrue des MII, du CCR et du CAC. De plus, des investigations cliniques ont aussi montré que l'épithélium intestinal de ces patients possède un niveau bas de récepteur VDR (146). D'autres études ont démontré une diminution significative du risque de CAC et de CCR associé à apport élevé de vD (147-150). Il a aussi été rapporté que le niveau élevé de cette vitamine a non seulement réduit la morbidité et la mortalité associées à ces deux types de cancer, mais a aussi prolongé significativement la survie des patients présentant des métastases colorectales avancées (151). Ces observations cliniques sont corroborées par des expériences sur les cellules cancéreuses en culture ou sur des modèles murins du CCR qui ont démontré les effets antiprolifératifs et pro-apoptotiques de la vD (152). Les travaux réalisés sur des souris nourries avec un régime de type «occidental», riche en lipides et pauvre en vD et en calcium, ont démontré un développement accru de tumeurs colorectales sans l'induction du cancer par un agent génotoxique, et que par ailleurs une supplémentation en vD et en calcium réduisait significativement l'incidence et la multiplicité des tumeurs coliques (153). Les expériences effectuées sur des modèles murins de l'inflammation associée au CCR ont également démontré une inhibition des stimuli inflammatoires (qui favorisent la tumorigenèse précoce) par la 1,25(OH)₂D₃ ou par ses analogues. Cette inhibition est basée sur l'activation du récepteur VDR conduisant à une diminution du niveau d'expression de c-Myc, COX-2 et pERK (154). Dans ce modèle animal de CAC, comme dans le modèle de culture cellulaire des monocytes humains, la 1,25(OH)₂D₃ inhibait ainsi la signalisation médiée par les TLRs en diminuant l'expression de TLR2 et TLR4 (155). De plus, il a été démontré que la signalisation médiée par la vD peut supprimer l'expression des gènes régulés par c-Myc. c-Myc est un facteur de transcription impliqué dans

la voie de signalisation de Wnt/ β -catenin et dans la différenciation et la prolifération cellulaire, et dont l'activité est fréquemment élevée dans le cancer(156). Il a été rapporté que l'inactivation du gène VDR chez les souris favorisait la prolifération cellulaire colonique et la surexpression de c-Myc (156). Ces observations ont été confirmées par les expériences *in vitro* montrant que la 1,25(OH)₂D₃ inhibait l'activité transcriptionnelle de la voie Wnt/ β -caténine et induisait l'expression de E-cadhérine et DKK-1 dans les lignées cancéreuses colorectales HCT116 et SW480 (157-159). Des résultats similaires ont été obtenus sur des souris *Apc*^{Min/+} chez lesquelles le traitement avec la 1,25(OH)₂D₃ et par ses analogues avait significativement réduit le nombre des tumeurs tout en diminuant la β -caténine nucléaire et l'expression de ses gènes cibles (160, 161). Par ailleurs, les souris doublement invalidées *Apc*^{Min/+}/*VDR*^{-/-}, avaient des tumeurs plus importantes et plus volumineuses comparativement aux souris *APC*^{Min/+}, conséquence de l'intensification de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine (162). D'autres expériences menées *in vivo* et *in vitro* ont suggéré que l'effet de la vD contre le CCR réside aussi dans sa capacité d'augmenter l'action antitumorale de certains agents chimiques, tels que le 5FU, l'Irinotecan et l'Oxaliplatine(163, 164).

1.4 Modèle murin du cancer associé à la colite

Plusieurs modèles expérimentaux de murins développant le CCR sporadique ou associé à l'inflammation ont été mis au point afin d'étudier l'implication de certaines voies de signalisation dans l'établissement de l'inflammation chronique conduisant à l'initiation et à la progression du CCR. Le premier modèle est celui induit chimiquement par AOM combiné au DSS. Le deuxième implique l'inactivation ou la surexpression des gènes impliqués dans la régulation de l'inflammation et de la tumorigenèse intestinale. Le troisième modèle est la xénogreffe de tumeurs humaines chez les souris (165). Afin d'accélérer le développement des

tumeurs, le premier modèle peut aussi être induit dans des souris porteuses des mutations génétiques ou dans des souris invalidées pour les gènes régulant les voies de la tumorigenèse, tels que le gène *Apc* et *p53* (166).

Le modèle murin de CCR chimiquement induit par AOM/DSS se résume à une seule injection d'AOM suivie de trois cycles d'exposition à de faibles doses de DSS (dans l'eau de boisson) avec des périodes de récupération plus ou moins longues dépendamment des souris et de leur fond génétique. Au bout de 10 semaines, ce modèle induit une croissance de plusieurs tumeurs au niveau du côlon (165). L'AOM est un composé alkylé qui cause la méthylation de la guanine au niveau de l'ADN, générant ainsi des lésions précancéreuses au niveau de l'épithélium intestinal (165). Le DSS est un agent inflammatoire. Il induit une atteinte au niveau basal des cryptes, ce qui facilite l'intrusion des microorganismes intestinaux dans la muqueuse et l'afflux de nombreuses cellules impliquées dans l'inflammation. Il en résulte une perte de l'architecture de la muqueuse qui altère l'intégrité de la barrière intestinale (167). Le fond génétique des rongeurs utilisés dans ce modèle cause une variation dans la susceptibilité au traitement avec AOM/DSS et influe sur l'incidence et la progression tumorale.

Le modèle AOM/DSS a considérablement contribué à la compréhension des mécanismes inflammatoires moteurs de la cancérogenèse colique et à la pathogenèse du CCR associé aux MII. Les modifications histologiques produites dans ce modèle ressemblent à celles présentes chez l'humain avec le CAC. À l'échelle moléculaire, les tumeurs induites dans ce modèle présentent des mutations dans K-Ras et dans β -caténine ainsi que des mutations dans les protéines responsables de la réparation de l'ADN (MMR), similaires à celles cumulées chez les patients souffrant du CAC. Cependant, des mutations d'*Apc* et de *p53* sont rarement observées dans ce modèle (165).

Les modèles murins utilisés dans ce mémoire sont les souris C57BL/6J et les souris *Nod2*^{-/-}. La colite a été induite chimiquement par AOM/DSS afin de créer un cancer colorectal associé à l'inflammation chronique.

1.5 Hypothèses et objectifs du projet

Comme nous l'avons mentionné, plusieurs études confirment que l'inflammation chronique est un facteur de risque majeur de CCR impliquant l'immunité innée (130, 134) notamment, via l'activation des voies de signalisations des TLRs et des NODs. La stimulation incontrôlée de ces voies de signalisations occasionne une dérégulation de la libération des cytokines pro-inflammatoires et une augmentation de la réponse de type Th1, mettant en péril l'homéostasie de l'épithélium intestinal menant ainsi à la survenue du CAC (134, 135). La vD module l'immunité innée. Elle agit sur les cellules dendritiques et les macrophages, et en active les voies de signalisations de NOD2 produisant les peptides antimicrobiens. Il en résulte une augmentation du pouvoir bactéricide cellulaire qui contribue au maintien de l'intégrité de la barrière intestinale et à la prévention contre les lésions précancéreuses. Les variantes non fonctionnelles du gène *Nod2* sont fortement associées aux MII. Les expériences effectuées sur les souris invalidées pour ce gène ont révélé une réduction de la diversité microbienne et une dysbiose intestinale. De plus, ces expériences ont permis de démontrer qu'une déficiente fonctionnelle de NOD2 prédispose à l'influence du microbiote intestinal dans l'établissement des MII et du CCR (95, 168). Nous avons récemment démontré que la 1,25(OH)₂D augmente l'effet synergique (MDP+LPS) pour le TNF- α et l'IL-23 dans les PBMC des patients atteints de MC, et pour le TNF- α , l'IL-23 et l'IL-10 dans les cellules dendritiques de ces patients (169). Nonobstant, nous soulignons que la majorité des études, en particulier celles effectuées *in vitro*, ont démontré l'effet chimiopréventif de la vD exogène administrée uniquement sous sa

forme active ou sous ses formes analogiques et rarement sous forme alimentaire ou en supplément.

À la lumière de ces faits, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle la vD_3 prévient le développement du CAC, et que cet effet est atténué par l'absence de l'action de NOD2. Pour vérifier notre hypothèse, nous avons utilisé, dans un premier temps, les souris C57BL/6J comme un modèle murin de la carcinogenèse associée à la colite. Dans un deuxième temps, nous avons utilisé les souris *Nod2*^{-/-}, un autre modèle de CAC ayant un gène *Nod2/CARD15* inactivé. Ce modèle nous a permis de vérifier si l'action préventive de la vD_3 était médiée par NOD2. Les deux modèles expérimentaux nous ont permis de répondre spécifiquement aux objectifs suivants:

1. Évaluer la capacité d'une supplémentation en vD_3 à prévenir la tumorigenèse du CAC.
2. Vérifier si l'effet préventif de la vD_3 sur le développement du CAC est médié par NOD2.

2. Résultats

L'article ci-joint décrit la démarche expérimentale de ce travail. Il expose les résultats obtenus suivis par la discussion. L'article a été soumis au journal «Nutrition and Cancer» en janvier 2016 (preuve de soumission annexe III). La contribution de l'auteur principal et des coauteurs à l'article est détaillée dans l'annexe II.

2.1 Article

Vitamin D Reduces Colitis and Inflammation-Associated Colorectal Cancer in Mice Independently of NOD2

Authors

Ihsan Elimrani^a, Jamie Koenekoop^a, Serge Dionne^a, Valerie Marcil^{a,b}, Edgard Delvin^b, Emile Levy^b, & Ernest G. Seidman^a

Affiliations

^aDivision of Gastroenterology, Research Institute, McGill University Health Center, Faculty of Medicine, McGill University, Montreal, Quebec, Canada

^bSainte Justine Hospital Research Center, Departments of Nutrition and Biochemistry, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada

Abstract

Patients with IBD are at increased risk of developing colorectal cancer, attributed in part to unremitting epithelial cell injury from chronic inflammation. Vitamin D (vD) induces NOD2 gene expression, enhancing immunity. vD deficiency impairs intestinal epithelial integrity and increases inflammation. The overall aim of this study was to investigate the effect of vD deficiency on colorectal cancer development and the ability of vD supplementation to inhibit tumorigenesis in the setting of colitis. We also assessed whether the preventive benefits of vD on colon carcinogenesis are mediated via NOD2. Inflammation-associated colorectal cancer was induced by treating C57BL/6J and Nod2^{-/-} mice with azoxymethane (AOM) and dextran sodium sulfate (DSS) cycles (x3). vD deficient mice displayed more severe DSS-induced colitis compared to mice given conventional chow or vD supplemented diets, as documented by greater weight loss, higher colitis activity index and colonic weight/length ratios, as well as lower survival rates. Increased histological inflammation score was observed in the mucosa of vD deficient mice along with higher levels of IL-6. Although the overall incidence of colonic tumors was not significantly different between vD deficient and vD supplemented mice, higher tumor multiplicity was observed in vD deficient compared to vD supplemented groups (in both mouse strains). After AOM/DSS treatment, decreased plasma 25(OH)D3 levels and down-regulation of vD target genes Cyp24 and Vdr were observed in mice given all three different diets (in both mouse strains) compared to saline-treated control mice on conventional chow. In conclusion, vD supplementation can prevent inflammation-associated colorectal cancer in both C57BL/6J and Nod2^{-/-} mice, independently of NOD2.

Key words

Vitamin D, colitis, colorectal cancer, NOD2

Introduction

Colorectal cancer (CRC) is the fourth leading cause of cancer-related deaths in the world. Epidemiological and biological studies support a clear association between chronic inflammation and CRC. Patients with longstanding inflammatory bowel disease (IBD) have an increased risk of developing CRC, presumed to be due in part to inflammatory immune cells promoting tumor formation (1-3). The host intestinal microbiome has also been linked to CRC. Recent studies indicate that colitis alone is not sufficient to promote colitis associated CRC and that tumor formation occurs when the inflammatory response is initiated by the gut microbiome (4).

Cells of the innate immune system display pattern recognition receptors (PRRs) that recognize structures conserved among microbial species, namely pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) (5). NOD2/CARD15 is a member of the Nod-like receptor family, a cytosolic subgroup of PRRs that recognize muramyl dipeptide (MPD) from Gram^{negative} and Gram^{positive} bacteria. The NOD2 pathway generates an acute inflammatory responses to eliminate bacteria and maintain mucosal homeostasis through the stimulation of signalling molecules (NF- κ B and MAPK) and the production of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β and IL-8) (6, 7). Over or underproduction of cytokines and/or signaling molecules could result in ineffective bacteria clearance or continuous stimulation, which in turn could lead to chronic intestinal inflammation (8, 9).

Loss-of-function NOD2 mutations are associated with aberrant intestinal immune responses to the gut microbiome, and constitute the leading genetic risk factor for Crohn's disease. These mutations are also thought to contribute to CRC susceptibility (10, 11). NOD2/CARD15 interacts with Toll-like receptors (TLRs), another family of PRRs, such as TLR4, and induce IL-12 and IFN- γ production characteristic of Th1-lineage immune responses. TLR4 induces COX-2 and PGE2 and is important for proliferation and apoptosis in response to intestinal mucosal

injury (12, 13). TLR4 expression is highly associated with gastric cancer. Tsai et al. showed that NOD2 has a dual role in the regulation of TLR4: it has a synergistic action on TLR4 co-stimulation, and may have a negative regulatory role on TLR4 in the absence of MDP (14).

Several dietary components and supplements are considered to have potent anti-carcinogenic properties against CRC (15). Epidemiological studies report that populations consuming higher amounts of vD have a lower incidence of CRC (16). A pooled analysis of 5 studies of serum 25(OH)D in association with CRC observed a 50% lower risk was associated with serum 25(OH)D levels ≥ 33 ng/mL, compared to ≤ 12 ng/mL (17). Recently, a nested case-control study using 274 CRC cases and 274 controls found a significant inverse association between pre-diagnostic 25(OH)D levels and risk of CRC (18).

vD is a fat-soluble vitamin which maintains calcium and phosphorus homeostasis. Vitamin D₃ (cholecalciferol) is synthesised in the skin from 7-dehydrocholesterol during exposure to sunlight. Alternatively, vD can be obtained from dietary sources, primarily fortified milk. Vitamin D₃ is the predominant form of vD in humans. Once formed by CYP27B1, 1,25 (OH)₂vD₃ carries out its diverse biological functions in the intestine, bone and kidney by signalling through the vitamin D receptor (VDR). vD modulates the expression of a large number of genes, such as CYP24, a key enzyme involved in the inactivation of 1,25 (OH)₂vD₃ (19, 20).

1,25 (OH)₂vD₃ is involved in many biological processes, such as apoptosis, cell proliferation and immune function (21, 22). As a modulator of innate and adaptive immunity, vD can affect carcinogenesis via changes in systemic inflammation, namely down-regulating the TLR signals, cytokines, adipokines and chemokines responsible for macrophage infiltration of adipose tissue (23). It is well established that vD modulates the composition of the gut microbiome and that vD deficiency provokes impaired epithelial integrity as well as increased inflammation (24-26). 1,25 (OH)₂vD₃ stimulates innate immunity by inducing NOD2 expression and by stimulating genes encoding antimicrobial peptides (AMP), such as defensins and cathelicidin (27, 28).

In a large multi-institutional IBD cohort, a low plasma level of 25(OH)D was recently associated with an increased risk of CRC (29). However, the preventive role of vD on colitis associated CRC is not well established. In this study, we employed azoxymethane (AOM) and dextran sodium sulfate (DSS) treated mice as a model of colon adenocarcinoma in the setting of colitis (30). In order to assess whether the beneficial preventive effects of vD₃ on CRC are dependent on the Nod2 pathway, we employed Nod2 knockout mice.

Materials and methods

Animals and diets

Five week old B6.129S1-Nod2^{tm1flv}/J (Nod2^{-/-}) mice and their genetic background strain 000664 C57BL6/J were purchased from Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA). Animals (weight = 15 - 20g) were housed in a pathogen free room in the animal housing facility. The mice were maintained on a 12-hour light/dark cycle with ad libitum access to conventional chow (ND; 2018 Teklad Global, 18% protein rodent diet) and water for a one week acclimatization period. All animal experiments were approved by the McGill Committee on Animal Care in Research according to the criteria of the Canadian Council on Animal Care. After acclimatization, the C57BL6/J and Nod2^{-/-} mice were randomly divided into specific treatment groups (one mouse/cage) and were randomly assigned to conventional chow (CC), a vitamin D deficient diet (vD def; TD.89123:<http://www.envigo.com/resources/data-sheets/td.89123.pdf>), or a vitamin D deficient diet supplemented with 5 IU/g vD₃ (vD def+vD₃; TD.110861) for 20 weeks. All diets were purchased from Harlan Laboratories (Indianapolis, IN).

Colitis-associated cancer induction

Five weeks after assignment to the various diets, mice were injected intraperitoneally with 10 mg/kg AOM (Fig.1). After 1 week, mice received 1.5% dextran sodium sulfate (DSS, MW

36,000-50,000, MP Biomedicals) in their drinking water for 7 days, followed by 3 weeks of regular water. DSS drinking water was filtered and prepared daily with a pH adjusted to 7.5. The DSS cycle was repeated two more times. The mice were then euthanized 5 weeks after the final DSS cycle (at week 20). For each dietary group (CC, vDdef, vDdef+vD₃) a control group received an intraperitoneal saline injection (instead of AOM) and were given regular water for the entire length of the experiment (without DSS). During the experimentation, the body weight of every mouse was monitored daily. At the end of the experiment, cumulative mortality was used to calculate the percentage of survival for each group.

Clinical assessment and weight/length ratio determination

The clinical assessment of all of the mice was monitored daily using an established DSS colitis disease activity index (DAI) (31). The DAI was calculated as the combined scores of 1) weight loss (0: ≤1%, 1: 1–5%, 2: 5–10%, 3: 10–15%, 4: ≥15%), 2) fecal blood (0: guaiac negative, 2: guaiac positive or 4: frank hematochezia) and 3) stool consistency (0: normal, 2: loose stools, 4: watery diarrhea). At the 20th week, all mice were euthanized and their colons were removed from the ileocecal junction to the anal verge and cleaned with saline. Colons were weighed, their length was measured and the weight/length ratio was calculated.

Tumor incidence, multiplicity, size and distribution

The colons were opened longitudinally and macroscopic examination was performed to count and measure tumor size in all colon sections. The incidence (number of mice with tumors/total mice in the group), multiplicity (mean number of tumors per mouse ± SEM), and mean tumor size ± SEM were calculated for each group.

Histology and scoring

After autopsy, a ~1 cm segment from the distal part of each isolated colon was removed and fixed in 10% neutral buffered formalin before being embedded in paraffin wax. Sections were stained with H&E and examined by light microscopy. Sections were graded using a cumulative

score for inflammatory cell infiltration, inflammatory cell localization and surface epithelial damage. Multiple sections at different depths were carried out to maximize chances of observing tumors. The sections were graded by an experienced pathologist blinded to the experimental conditions. Proliferative and neoplastic changes were characterized according to a validated classification (32).

Plasma 25-hydroxyvitamin D₃ levels

One day before AOM injection, 3 mice from each group were anesthetized and blood was collected for the measurement of baseline plasma 25-hydroxyvitamin D₃ (25(OH)D₃) levels. After the completion of the AOM/DSS treatment (week 20), blood was collected by cardiac puncture and centrifuged. Plasma was collected and 25(OH)D₃ measured by HPLC-MS.

RNA extraction and quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-qPCR)

Colon samples were homogenized and RNA was extracted using the total RNA extraction RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen Sciences, Germantown, MD USA). RNA concentration and quality were tested by measuring the absorbance ratio of 260/280 nm using a Nanodrop® ND-1000 Spectrophotometer. Complementary DNA was generated by reverse transcription of 1 µg RNA using the Applied Biosystems High Capacity Reverse Transcription Kit (Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. qPCRs were performed in a 96-well microtiter plate using the SybrGreen qPCR Master Mix (Quanta Biosciences, Gaithersburg, MD, USA). The amplification reaction was carried out using 40 cycles and was performed in triplicate for each gene in the same plate. The amplification conditions were as follows: 95 °C for 10 min followed by 40 cycles of 95 °C, 15 s, 60 °C, 1 min. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as an endogenous reference. The sequences of the primers used were as follows: Mouse *Gapdh* (33) [5'-GAAGGTCGGTGTGAACGGATTTGGC-3' (forward) and 5'-TTGATGTTAGTGGGGTCTCGCTCCTG-3' (reverse)], mouse 24-hydroxylase (*Cyp24a1*) (33)

[5'-CACACGCTGGCCTGGGACAC-3' (forward) and 5'-GGAGCTCCGTGACAGCAGCG-3' (reverse)], mouse *Vdr* (34) [5'-GAGGTGTCTGAAGCCTGGAG-3' (forward) and 5'-ACCTGCTTTCCTGGGTAGGT-3' (reverse)], mouse *Cox2* [5'-GGCGCAGTTTATGTTGTCTGT-3'(forward) and 5'-CAAGACAGATCATAAGCGAGGA-3' (reverse)], mouse *Tlr4* (35) [5'- TTTATTCAGAGCCGTTGGTG -3' (forward) and 5'-CAGAGGATTGTCCTCCCATT-3' (reverse)]; mouse *Nod2* (36) [5'-CACACATGGCCT TTGGTTTCCAGT-3' (forward) and 5'-AAAGAGCTG CAGTTGAGGGAGGAA-3' (reverse)]; mouse *Tnfa* (37) [5'-CCA CCACGCTCTTCTGTCTAC-3' (forward) and 5'-TGG GCTACAGGCTTGCTACT-3' (reverse)]; mouse *Il1b* (38)[5'-TCCAGCCAAGCTTCCTTGTGCAA-3' (forward) and 5'- GCTGCTGCGAGATTTGAAGCTGG-3' (reverse)]; and mouse *Il6* (35) [5'- CCAATTTCCAATGCTCTCCT-3' (forward) and 5'-ACCACAGTGAGGAATGTCCA-3' (reverse)].

Statistical analysis

The data are presented as mean \pm SEM. Statistical analysis was performed by GraphPad Prism 6.07 Software (San Diego, CA, USA). Statistical analysis was achieved using either a Student's *t* test, one-way ANOVA or Mann-Whitney non-parametric test. For the survival analysis, Log-rank test was used. A *p* value of < 0.05 was considered to be statistically significant.

The relative mRNA fold-changes (relative expression) between the animal groups were calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (39). For each sample, the first ΔC_t was calculated using the corresponding endogenous control (GAPDH). The second ΔC_t was calculated using the CC group as reference. Exponential values were then transformed in linear values and expressed as relative fold change in gene expression. The analyses and statistics were performed using the Expression Suite Software Version 1.0 (Applied Biosystems) and the Prism 6.07 Software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA). Data are expressed as means \pm SEM. For statistical

analysis, one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test was used and a p value < 0.05 was considered significant.

Results

Body weight and assessment of clinical disease activity

Weight loss in AOM/DSS treated mice was compared to their saline-injected controls (Fig.2A). The week following each DSS cycle, all AOM/DSS treated mice had lost 5-20% of their body weight. Both C57BL/6J and Nod2^{-/-} AOM/DSS treated mice fed a vD deficient diet (vDdef+AOM/DSS) showed significantly greater weight loss ($p<0.05$) compared to those fed conventional chow (CC+AOM/DSS). The weight loss in the vDdef+AOM/DSS group was greater compared to those supplemented with vD₃ (vDdef+vD₃+AOM/DSS), although statistical significance was not achieved. Although all saline-injected mice (CC, vDdef and vDdef +vD₃) gained weight during the study protocol, the increase in body weight of the saline-injected Nod2^{-/-} mice given a vD deficient diet was less than those on conventional chow or a vD₃ supplemented diet.

In all AOM/DSS mice, the clinical effects of the colitis were apparent from the 3rd day of DSS administration (Fig. 2B). This was characterized by progressive weight loss, along with hematochezia and diarrhea. A progressive increase in the DAI was observed in all DSS-treated mice. Notably, higher DAI scores were observed earliest for mice on vD deficient diet. DAI of both C57BL/6J and Nod2^{-/-} mice strains fed a vD₃ supplemented diet was significantly higher compared to mice on conventional chow but inferior to those on a vD deficient diet after each DSS cycle. vD₃ supplementation was associated with reduced weight loss and decreased DAI in C57BL/6J and Nod2^{-/-} mice.

Mouse mortality during the course of the experiment

Log-rank tests revealed a significant difference between the survival curves (Fig.2C) of the C57BL/6J groups that were given different diets, but the difference was non-significant in the Nod2^{-/-} groups (Chi-square=4.480; $p=0.10$). AOM/DSS treatment of C57BL/6J and Nod2^{-/-} fed a vD deficient diet had a very high mortality rate. Less than 50% of the animals survived to the 3rd DSS cycle ($p<0.05$). vD₃ supplementation prevented mortality in C57BL/6J mice, but the mortality was higher in Nod2^{-/-} mice at the 3rd DSS cycle (50%).

Colonic weight/length ratio is used as a marker of mucosal hyperplasia and colitis severity in chronic colitis. DSS treatment induced reductions in colon length of all animals (Fig.2D). In vD deficient mice, the colonic weight/length ratio was significantly higher in both mouse strains compared their saline-injected controls ($p=0.05$). In C57BL/6J AOM/DSS treated mice on vD deficient diets, the weight/length ratio was increased compared to AOM/DSS treated mice on conventional chow (40.13±5.10 vs 27.49±0.52 mg/cm, $p=0.02$) and vD₃ supplemented diet (40.13±5.10 vs 25.49±1.69 mg/cm, $p=0.03$). In Nod2^{-/-}, vD deficient mice showed a greater weight/length ratio compared to conventional chow and vD₃ supplemented diet mice, but this difference did not reach significance (36.58±7.98 vs 25.43±5.439 mg/cm, $p=0.49$ and vs 24.13±1.9 mg/cm, $p=0.68$). A significant difference was only observed between AOM/DSS treated Nod2^{-/-} mice on a vD deficient diet and saline-injected on the same diet (36.58±7.98 vs 17.83±0.79 mg/cm, $p=0.03$). In mice given vD₃ supplementation, a significant improvement of the survival rate and considerable reduction the colonic weight/length ratio was observed in C57BL/6J, but not Nod2^{-/-} mice.

Tumor incidence, multiplicity, size distribution and macroscopic appearance of colorectal tumors

Tumor incidence (Fig.3A) in AOM/DSS treated mice fed the vDdef diet was greater than those on CC in C57BL/6J (100% vs 33%) and Nod2^{-/-} mice (57% vs 30%). vD₃ supplementation

reduced the incidence by 20% in C57BL/6J, but not in Nod2^{-/-} mice. Tumor multiplicity also decreased significantly in vD₃ supplemented C57BL/6J mice compared to the vDdef group (5.25 ± 1.35 vs 1.40 ± 0.24, *p*<0.5) (Fig.3B). The difference did not reach statistical significance between the Nod2^{-/-} groups. The effect of supplemental vD₃ on size distribution of colorectal tumors was also evaluated (Fig.3C). Compared to the vDdef group, vD₃ supplementation decreased the number of small tumors (3.00 ± 1.11 vs 0.6 ± 0.20, *p*<0.5) and tended to decrease the large tumors (2.25 ± 0.90 vs 0.80 ± 0.20) in C57BL/6J mice. In Nod2^{-/-} mice, vD₃ supplementation decreased the number of large tumors compared to vDdef (0.20 ± 0.14 vs 1.71 ± 0.80, *p*<0.05) and tended to decrease the smaller ones. Macroscopically, the appearance of the colorectal tumors was more aggressive (Fig.3D) in both mice strains fed a vDdef diet. vD₃ supplementation reduced macroscopically visible lesions and large tumors.

Histological analysis and scoring of colonic tumors

Histological examination of the colonic mucosa revealed differences between dietary groups (Fig. 4). Histological score (cumulative score for inflammatory cell infiltration, inflammatory cell localization and surface epithelial damage) was statistically higher in vDdef compared to CC in C57BL/6J and Nod2^{-/-} mice (*p* = 0.03 for both). vD₃ supplementation tended to reduce the inflammation severity score in C57BL/6J mice but the difference did not reach statistical significance (Fig.4A). In Nod2^{-/-} mice, the difference was not significant either (Fig.4B). The histopathology analysis for tumor stage and nodal status (Table 1) revealed an absence of well-differentiated carcinomas in all AOM/DSS-treated C57BL/6J groups. However, 25% of tumors in vDdef and 20% of tumors in vD₃ supplemented Nod2^{-/-} mice were well-differentiated carcinomas. 75% of tumors in vDdef and 50% of tumors in vD₃ supplemented C57BL/6J mice were microscopic intraepithelial neoplasias (IEM). The more frequent colonic lesions encountered in C57BL/6J mice were IEM, whereas carcinomas were absent. In Nod2^{-/-} mice receiving the vDdef diet, 75% of the lesions were polyps and 25% were IEN. In the vD₃

supplemented group, there was a trend toward replacement of polyps by low-grade dysplasia of adenomas. Frequency of more invasive tumors (carcinomas) was not affected by dietary vD₃. The distribution of tumor types was not significantly affected by vD₃ supplementation.

Plasma 25-hydroxyvitamin D₃ levels

The plasma 25(OH)D₃ levels of all groups that were fed a vDdef diet were very low before and after AOM and DSS administration in both mouse strains (Fig 5). At week 4, supplemental vD₃ resulted in sufficient levels of 25(OH)D₃ ($\geq 75\text{nmol/L}$). The 25(OH)D₃ levels in both C57BL/6J (Fig.5A) and Nod2^{-/-} (Fig 5B) supplemented with vD₃ were significantly decreased ($p<0.05$) when mice were treated with AOM and DSS. A reduction in 25(OH)D₃ levels was also observed in the two mouse strains that were given CC ($p<0.05$). In saline-injected mice, the plasma 25(OH)D₃ levels remained stable throughout the experiment (data not shown).

Gene expression analysis

We measured the expression of vD target genes and those implicated in inflammation in colonic tissue (Fig 6). *Cyp24* expression, a target gene of vD, was significantly decreased in both saline-injected and AOM/DSS treated vDdef and vD₃ supplemented C57BL/6J mice compared to mice fed CC (Fig 6A). Colonic *Cyp24* expression was also decreased in Nod2^{-/-} vD₃ supplemented mice and it tended to be up-regulated in vDdef mice, without reaching significance (Fig 6B). The expression of *Vdr* was not statistically different in either mouse strain, although in saline-injected mice, vD₃ supplementation tended to increase *Vdr* expression compared to C57BL/6J mice on CC and compared to Nod2^{-/-} fed a vDdef diet. No noticeable difference was observed between AOM/DSS treated groups in either strain (Fig 6A,B). Although the expression of *Cox2* was higher in AOM/DSS treated C57BL/6J mice compared to saline-injected groups, only the CC fed group showed a significant difference. In AOM/DSS treated C57BL/6J mice, vD₃ supplementation decreased *Cox2* expression significantly compared to mice given CC ($p<0.05$) and slightly compared to those given a vD deficient diet

(Fig 6A). No significant *Cox2* expression changes occurred in *Nod2*^{-/-} tissues (Fig 6B). In C57BL/6J mice, the expression pattern of *Tlr4* remained stable within the different groups (Fig 6C). However, in *Nod2*^{-/-} mice, *Tlr4* was significantly down-regulated in all treated groups compared to saline-injected mice given CC ($p < 0.05$, $p < 0.001$). Moreover, in AOM/DSS treated mice, vDdef and vD₃ supplemented diets significantly reduced *Tlr4* expression compared to the CC (Fig 6C). The expression of *Nod2* was significantly regulated in AOM/DSS treated C57BL/6J but not in *Nod2*^{-/-} mice (Fig 6C,D). In fact, AOM/DSS treated C57BL/6J given a vDdef diet showed an increase level of expression of the *Nod2* gene compared to other treated groups. When AOM/DSS treated mice were supplemented with vD₃, *Nod2* expression was decreased in colonic tissue compared to that from vDdef fed mice. vD₃ treatment was not associated with a statistically significant decrease in *Tnfa* expression in the distal colon of either saline or AOM/DSS treated mice of both strains (Fig 6E,F). In C57BL/6J mice, AOM/DSS administration increased *Tnfa* expression compared to saline-injected mice given CC and the vD₃ supplemented diet (8-fold and 4-fold) but not the vDdef diet (Fig 6E). In *Nod2*^{-/-} mice, AOM/DSS administration increased *Tnfa* expression slightly in the CC group (4-fold) but no significant expression increase was observed in the groups fed a vDdef or vD₃ supplemented diet (Fig 6F). In C57BL/6J mice, supplemental vD₃ resulted in higher colonic *Il1b* expression compared to mice fed the vDdef diet (7-fold). In *Nod2*^{-/-} mice, vD₃ tended to reduce *Il1b* expression (Fig 6E,F). AOM/DSS treatment significantly increased *Il6* levels and vD₃ administration reduced its expression compared to CC and vDdef diets in both mouse strains ($p < 0.05$). In C57BL/6J, a 1-fold increase in pro-inflammatory *Il6* levels was seen in mice fed a vDdef diet compared to mice supplemented with vD₃, and a 3-fold rise in *Nod2*^{-/-} mice fed a vDdef diet compared to mice supplemented with vD₃ ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively).

Discussion

Multiple studies established that vD is implicated in the maintenance of intestinal barrier integrity and in innate immune responses, whereas vD deficiency is associated with an increased risk of IBD and may be implicated in the pathogenesis of CRC (15, 40). vD₃ stimulates innate immunity by inducing Nod2 expression, critically important to the maintenance of gut homeostasis (25, 27, 28). In this study, we evaluated the potential protective effects of supplemental vD₃ on the severity of experimental colitis as well as the risk of CRC using the AOM/DSS model of colitis-associated cancer.

The human intestine harbors an enormous number of bacteria that are constantly interacting with the gut immune system, eliciting non-pathological basal level immune responses. Increasing evidence points to dysbiosis of the microbiome as an underlying factor in susceptibility to IBD. Loss-of-function mutations in Nod2 are the strongest genetic factors linked to Crohn's disease. Indeed, Nod2 is a key regulator of microbiota in the intestine, as illustrated by microbiome dysregulation in Nod2-deficient mice (41). Nod2 is highly expressed in Paneth cells, which are responsible for the regulation of ileal microflora by antimicrobial compounds, and Nod2-deficient intestinal epithelial cells are unable to kill bacteria efficiently (42). It is therefore likely that Nod2 mutations in Crohn's disease may increase disease susceptibility by altering interactions between the microbiota and mucosal immunity. We recently demonstrated that 1,25(OH)₂D₃ is a direct inducer of *Nod2* expression and function (25, 28). We therefore investigated whether the beneficial effects of vD on colitis and CRC are mediated via Nod2 using ^{Nod2^{-/-}} knockout mice.

Our results show that vD supplementation ameliorates the signs and symptoms of DSS induced colonic inflammation, as demonstrated by significantly lower weight loss, less severe DAI, colonic weight/length and overall survival in C57BL/6J and Nod2^{-/-} mice. Interestingly, even animals not treated with AOM/DSS on a vD₃def diet had lower body weight than mice on CC

and vD₃ supplemented diet. It is well established that vD plays a crucial role on calcium metabolism and bone mineralisation. Among the consequences of vD deficiency are secondary hyperparathyroidism leading to mineralization defects and loss of bone density (43). Perhaps the lower weight is due to decreased bone density. Alternatively, it had been shown that mice lacking CYP27B1, the rate-limiting enzyme in vD activation, showed lower body weights and reduced abdominal fat mass (44).

Lower body weight in AOM/DSS-treated mice correlated with the clinical assessment of colitis severity. AOM/DSS administration resulted in a gradual increase of DAI during DSS administration followed by a slight decrease during recovery periods. vD₃ supplementation of C57BL/6J mice significantly attenuated the DAI during the recovering periods compared with mice fed a vDdef diet. Unexpectedly, the beneficial effect of vD₃ supplementation was also observed in Nod2^{-/-} mice, which suggest that the protective effect of vD₃ on colitis is not Nod2 dependent .

Mortality was higher in C57BL/6J mice fed with vD₃def diet compared to Nod2^{-/-} mice on the same diet, and Nod2^{-/-} mice fed a vD₃ supplemented diet were protected against mortality occurring during the first DSS cycle compared to C57BL/6J. The same clinical symptoms were observed in other AOM/DSS mice fed a vD supplemented diet. It was previously reported that IL-10 knockout mice fed with a vDdef diet had more severe diarrhea and a wasting disease, with higher mortality rates (45). Increased colonic weight /length ratio in AOM/DSS-treated groups of both mouse models fed vDdef diet was consistent with the observed greater DAI and the histological scores. vD₃ supplementation tended to decrease histological severity score, but the difference did not achieve significance. This could be explained by the decreased 25(OH)D₃ plasma levels after AOM/DSS induction of extensive colitis, partially leading to a loss of vD₃ beneficial effect. A similar observation was reported in DSS-induced colitis in mice. Plasma 25(OH)D₃ levels were lower compared to non DSS-treated mice with or without supplemental

1,25(OH)₂D diet (46). Overall, our results are consistent with a recent randomized trial showing that vD supplementation is beneficial in patients with Crohn's disease showing that increased vD levels in supplemented patients were associated with higher circulating cathelicidin (LL-37) concentrations, lower C reactive protein levels and improved intestinal permeability (47).

Although vD₃ supplementation did not decrease overall tumor incidence, it significantly reduced tumor multiplicity in C57BL/6J and moderately in Nod2^{-/-} mice. A lower number of large tumors were observed in Nod2^{-/-} mice fed a vD₃ supplemented diet. Previous investigation using DSS/AOM in CF1 mice did not observe a reduction in tumor incidence in vD₃ supplemented animals compare with those received vD metabolites or synthetics analogs (48). Our histopathology analysis revealed that the majority of the lesions in Nod2^{-/-} mice fed the vD₃def diet were non-malignant polyps. vD₃ supplementation was found to decrease polyp formation by 55%, without however altering the frequency of more invasive tumors (carcinoma).

Although we supplemented mice with a relatively high level of vD₃ (5 IU/g), it did not significantly regulate colonic gene expression in the manner predicted. The relative expression of *Cyp24a1* led to changes opposed to those previously reported to be mediated by VD₃ as *Cyp24A1* activity is induced by high levels of 25(OH)D₃ (44). We expected to observe an augmentation of *Cyp24a1* expression in colonic tissue of vD₃ supplemented mice. Unexpectedly, in both animal models exposed to AOM/DSS, *Cyp24a1* was down-regulated with vD₃ supplementation compared to animals fed a vD₃def diet. It is possible that chronic inflammation induction and long term vD₃ administration resulted in down-regulated *Cyp24* expression and that the AOM/DSS treatment altered *Cyp24* regulation. It is also possible that *Cyp24* is alternatively regulated in intestinal tissue. *In vitro* studies revealed that inflammation interferes with vD metabolism, and that TNF α and IL-6 inhibited the expression of vD activation gene *Cyp27B1* in colon cancer cells (49). The rapid activation of CYP27A1 and CYP27B1 after vD₃ addition was not accompanied by a sharp rise in CYP24 in HT29 cell (48). *In vivo* studies showed that

1,25OHD₃ treatment resulted in transient changes in colonic Cyp24 levels in DSS-induced colitis mice and that Cyp24 returned to basal levels 24 h after vD treatment (46). It is well established that VDR directly regulates renal CYP24A1 but constitutive CYP24 expression in intestine is very low or undetectable (50). The presence of a translatable splice variant of CYP24 has been reported in macrophages and exogenous 1,25(OH)₂D₃ effectively induced CYP24 mRNA, without alerting its enzyme activity (51).

The active form of vD₃, 1,25(OH)₂D₃ exerts most of its diverse biological activities through binding to a specific vD receptor (VDR), thereby activating the expression of many genes contributing to anti-neoplastic activity. Overexpression of VDR in intestinal cells inhibits colitis-associated increases in pro-inflammatory cytokines, and protects mice from developing colitis (52). In our study, changes in the relative expression of *Vdr* did not reach statistical significance. In both mouse strains, *Vdr* expression was decreased in AOM/DSS-treated mice on the various diets. We speculate that vD₃ may exert some of its biological activities in a VDR-independent manner. Colon cancer cell lines display a limited response to vD₃, and the expression of VDR is down-regulated in late stage CRC (53). Furthermore, IL-10 KO mice had lower colonic *Vdr* expression despite supplemental vD₃ (54). It has also demonstrated that a vD analogue was able to inhibit colon carcinogenesis in AOM/DSS mice, suggesting that VDR signaling may prevent the conversion of the inflammatory stimuli into a tumor promoting signal (55).

mRNA levels of both *Nod2* and *Tlr4* are increased in experimental colitis and in colitis-associated colon cancer (48). We thus investigated if they are also upregulated in the same manner in *Nod2*^{-/-} mice compared to control C57Bl/6J mice. In all AOM/DSS treated C57Bl/6J, *Tlr4* expression tended (without significance) to be higher compared to the control group. However, no difference was observed between mice fed a vD₃def and those vD₃ supplemented. In AOM/DSS and saline injected *Nod2*^{-/-} mice fed a vD₃def or vD₃ supplemented diet, *Tlr4* expression was found significantly lower compared the mice on CC. Murillo et al. reported a

time dependent effect of vD_3 and $1,25(OH)_2D_3$ on the expression of *TLR4* in HT29 cells as mRNA levels for *TLR4* were decreased following 8 hr of treatment and continued to decline after 24 hr (48). Furthermore, the effects of vD on the TLR4 pathway revealed a decrease in activation by NF- κ B accompanied by a decreased nuclear expression of NF- κ B (48). Tsai et al. showed that NOD2 has synergistic actions via co-stimulation with TLR4 (14). Thus, in *Nod2*^{-/-} mice, TLR4 might be regulated differently in the presence of AOM/DSS. Notably, our results were obtained in colonic tissue which contain several cell types that can express TLR4 including macrophages, dendritic cells, B and T cells as well as stromal cells.

Nod2 plays an important role in the homeostasis of intestinal mucosa and response to the microbiota. *Nod2*^{-/-} mice are unable to produce antibacterial molecules necessary for efficient control of bacterial burden (56). *Nod2* expression in C57BL/6J mice are consistent with those reported in previous studies (25, 27, 28). *Nod2* expression was higher in mice fed a vD_3 def diet and vD_3 supplementation significantly decreased its expression. The *Nod2* gene was not completely absent in the *Nod2*^{-/-} mice model employed, as they were generated using a targeting construct to replace CARD and NOD domains that are essential for *Nod2* activation (7). Our primer likely hybridized with the region of the NOD2 gene. As expected, the observed tendency of vD_3 to decrease *Nod2* expression in control mice was not found in *Nod2*^{-/-} mice.

The disrupted balance between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines plays a key role in colon cancer pathogenesis and prognosis (57). In the present study, we assessed the changes in gene expression of *Cox2*, *Tnfa*, *Il1b* and *Il6* in both AOM/DSS mouse strain on different vD diets. The preventive effects of vD_3 did not always correspond with a potent suppression of mucosal inflammatory responses. It is well documented that COX-2 is involved in the pathogenesis of chronic inflammatory diseases and is over-expressed in variety of tumors (58). Cox-2 inhibition reduced the progression of both hereditary and inflammatory intestinal cancer (48, 59). vD administration down-regulates COX-2 expression and its prostaglandin

products in macrophages (60, 61). In the present study, *Cox2* expression data in C57BL/6J are in agreement with those reported previously (62-64). The expression of *Cox2* in all AOM/DSS mice was increased compared to saline-injected controls and vD_3 supplementation inhibited its expression. The regulation of *Cox2* expression was strikingly different in *Nod2*^{-/-} mice: it was down-regulated in all treated mice compared to saline-injected mice on CC. We speculate that in this animal model, tumor formation in colitis-associated colon cancer may not require Cox-2. It was demonstrated that colitis-associated tumors induced by AOM/DSS can fully develop without Cox-2 involvement (65). It was also suggested that Cox-2 activity plays a beneficial, rather than a pro-inflammatory role, since clinical data revealed that treatment with NSAIDs (COX-2 inhibitors) is associated with a high incidence of exacerbation of the underlying IBD (66).

TNF- α generated by monocytes and macrophages is a key pro-inflammatory cytokine involved in the pathogenesis of IBD. Its expression is significantly increased in chronic inflammation and colon cancer. $1,25(OH)_2D_3$ in combination with calcium has been shown to down-regulate colonic TNF- α production (67). In this study *Tnfa* was highly expressed in AOM/DSS C57BL/6J and *Nod2*^{-/-} mice on CC compared to the saline-injected controls but no difference was noted between vD_3 def and vD_3 supplemented groups. The role of vD on TNF- α expression and production in inflammatory disease depends on the type of cells tested and their state of differentiation (68). For example, using nuclear run-off analysis, one study suggested that *TNFA* gene transcription is not affected by $1\alpha,25(OH)_2D_3$ (69).

Since IL-1 β also plays a key a role in the pathogenesis of gastrointestinal inflammatory disorders (70), we analysed its regulation. Animals fed a vD_3 supplemented diet had higher colonic *Il1b* expression compared to C57BL/6J mice on a vD def diet. In *Nod2*^{-/-} mice, vD did not impact its expression. Conversely, it was reported that, in mice, IL-1 β is increased in inflamed intestinal tissues (71). $1,25(OH)_2D_3$ treatment was shown to upregulate IL-1 β and

stimulate its secretion in infection-induced human macrophages (38). Furthermore, DSS activates the NLRP3 inflammasome, resulting in local release of IL-1 β that promotes inflammatory changes (72). Other studies proposed a possible interaction between NOD2 stimulation and NLR3 inflammasome in the activation of the NF- κ B, transcription, production and secretion of IL-1 β (73).

IL-6, yet another key inflammatory cytokine involved in the initiation and maintenance of systemic inflammation, has also been implicated in progression and severity of various inflammatory diseases, as well as in colorectal tumorigenesis (10). AOM/DSS increased *Il6* expression in both mouse strains in this study, whereas vD₃ supplementation reduced it, in agreement with previous studies (74, 75). Our data suggest that the increase in *Il6* expression could play a role in the regulation of CYP24A1. Since it was demonstrated in a colon cancer cell line that increasing exposition time to 1,25(OH)₂D₃ and IL-6 co-treatment highly reduces CYP24 expression, *Il6* increased expression could contribute to *Cyp24a* regulation (49).

In conclusion, our data show that vD supplementation can help prevent inflammation-associated colorectal cancer in both C57BL/6J and *Nod2*^{-/-} mice, independently of NOD2. Although both clinical and histological colitis scores were significantly improved in AOM/DSS treated mice fed a vD₃ supplemented diet, mucosal pro-inflammatory cytokine expression, with the exception of *Il6*, were not significantly reduced. Several factors **might explain differences between our results and** some previous studies. These include mouse strain, age and gender, differences in the gastrointestinal microflora, DSS concentration and duration of administration, and in the type of water (deionized, autoclave or tap) used to administrate the DSS. Although the results from experimental animal models cannot be translated to patients, the present study provides supportive data regarding the potential benefits of vD on colitis associated CRC.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge grant support from Dairy Farmers of Canada and the McGill University Health Center Foundation Owen Catchpugh Award for Innovative IBD Research. The principal investigator (EGS) is supported by a Canada Research Chair in Immune Mediated Gastrointestinal Disorders. We thank Ms. Denise Levesque for invaluable technical support and Ms. Melissa Diamond for the expert administrative assistance.

Reference

1. Brenner H, Kloor M, Pox CP. Colorectal cancer. *Lancet*. 383(9927):1490-502, 2014.
2. Grivennikov SI. Inflammation and colorectal cancer: colitis-associated neoplasia. *Semin Immunopathol*. 35(2):229-44, 2013.
3. Terzic J, Grivennikov S, Karin E, Karin M. Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology*. 138(6):2101-14 e5, 2010.
4. Arthur JC, Jobin C. The complex interplay between inflammation, the microbiota and colorectal cancer. *Gut Microbes*. 4(3):253-8, 2013.
5. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 140(6):805-20, 2010.
6. Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, et al. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem*. 278(11):8869-72, 2003.
7. Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y, Henegariu O, Inohara N, et al. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science*. 307(5710):731-4, 2005.
8. Bamias G, Corridoni D, Pizarro TT, Cominelli F. New insights into the dichotomous role of innate cytokines in gut homeostasis and inflammation. *Cytokine*. 59(3):451-9, 2012.
9. Tigno-Aranjuez JT, Abbott DW. Ubiquitination and phosphorylation in the regulation of NOD2 signaling and NOD2-mediated disease. *Biochim Biophys Acta*. 1823(11):2022-8, 2012.
10. Omrane I, Benammar-Elgaaied A. The immune microenvironment of the colorectal tumor: Involvement of immunity genes and microRNAs belonging to the TH17 pathway. *Biochim Biophys Acta*. 1856(1):28-38, 2015.
11. Lesage S, Zouali H, Cezard JP, Colombel JF, Belaiche J, et al. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet*. 70(4):845-57, 2002.

12. Fernandez-Garcia B, Eiro N, Gonzalez-Reyes S, Gonzalez L, Aguirre A, et al. Clinical significance of toll-like receptor 3, 4, and 9 in gastric cancer. *J Immunother.* 37(2):77-83, 2014.
13. Fukata M, Chen A, Klepper A, Krishnareddy S, Vamadevan AS, et al. Cox-2 is regulated by Toll-like receptor-4 (TLR4) signaling: Role in proliferation and apoptosis in the intestine. *Gastroenterology.* 131(3):862-77, 2006.
14. Tsai WH, Huang DY, Yu YH, Chen CY, Lin WW. Dual roles of NOD2 in TLR4-mediated signal transduction and -induced inflammatory gene expression in macrophages. *Cell Microbiol.* 13(5):717-30, 2011.
15. Pericleous M, Mandair D, Caplin ME. Diet and supplements and their impact on colorectal cancer. *J Gastrointest Oncol.* 4(4):409-23, 2013.
16. Dalberg J, Jacobsen O, Nielsen NH, Steig BA, Storm HH. Colorectal cancer in the Faroe Islands--a setting for the study of the role of diet. *J Epidemiol Biostat.* 4(1):31-6, 1999.
17. Gorham ED, Garland CF, Garland FC, Grant WB, Mohr SB, et al. Optimal vitamin D status for colorectal cancer prevention: a quantitative meta analysis. *Am J Prev Med.* 32(3):210-6, 2007.
18. Chandler PD, Buring JE, Manson JE, Giovannucci EL, Moorthy MV, et al. Circulating Vitamin D Levels and Risk of Colorectal Cancer in Women. *Cancer Prev Res (Phila).* 8(8):675-82, 2015.
19. Ramagopalan SV, Heger A, Berlanga AJ, Maugeri NJ, Lincoln MR, et al. A ChIP-seq defined genome-wide map of vitamin D receptor binding: associations with disease and evolution. *Genome Res.* 20(10):1352-60, 2010.
20. Lin R, White JH. The pleiotropic actions of vitamin D. *Bioessays.* 26(1):21-8, 2004.
21. Barragan M, Good M, Kolls JK. Regulation of Dendritic Cell Function by Vitamin D. *Nutrients.* 7(9):8127-51, 2015
22. Diaz L, Diaz-Munoz M, Garcia-Gaytan AC, Mendez I. Mechanistic Effects of Calcitriol in Cancer Biology. *Nutrients.* 7(6):5020-50, 2015.
23. Raman M, Milestone AN, Walters JR, Hart AL, Ghosh S. Vitamin D and gastrointestinal diseases: inflammatory bowel disease and colorectal cancer. *Therap Adv Gastroenterol.* 4(1):49-62, 2011.
24. Ooi JH, Li Y, Rogers CJ, Cantorna MT. Vitamin D regulates the gut microbiome and protects mice from dextran sodium sulfate-induced colitis. *J Nutr.* 143(10):1679-86, 2013.
25. Wang TT, Dabbas B, Laperriere D, Bitton AJ, Soualhine H, et al. Direct and indirect induction by 1,25-dihydroxyvitamin D3 of the NOD2/CARD15-defensin beta2 innate immune pathway defective in Crohn disease. *J Biol Chem.* 285(4):2227-31, 2010.
26. Zhao H, Zhang H, Wu H, Li H, Liu L, et al. Protective role of 1,25(OH)₂ vitamin D3 in the mucosal injury and epithelial barrier disruption in DSS-induced acute colitis in mice. *BMC Gastroenterol.* 12:57, 2012.
27. Dimitrov V, White JH. Species-specific regulation of innate immunity by vitamin D signaling. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2015.
28. Dionne S, Calderon MR, White JH, Memari B, Elimrani I, et al. Differential effect of vitamin D on NOD2- and TLR-induced cytokines in Crohn's disease. *Mucosal Immunol.* 7(6):1405-15, 2014.

29. Ananthakrishnan AN, Cheng SC, Cai T, Cagan A, Gainer VS, et al. Association between reduced plasma 25-hydroxy vitamin D and increased risk of cancer in patients with inflammatory bowel diseases. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 12(5):821-7, 2014.
30. De Robertis M, Massi E, Poeta ML, Carotti S, Morini S, et al. The AOM/DSS murine model for the study of colon carcinogenesis: From pathways to diagnosis and therapy studies. *J Carcinog.* 10:9, 2011.
31. Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, Sedergran DJ. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest.* 69(2):238-49, 1993.
32. Boivin GP, Washington K, Yang K, Ward JM, Pretlow TP, et al. Pathology of mouse models of intestinal cancer: consensus report and recommendations. *Gastroenterology.* 124(3):762-77, 2003.
33. Koszewski NJ, Horst RL, Goff JP. Importance of apical membrane delivery of 1,25-dihydroxyvitamin D3 to vitamin D-responsive gene expression in the colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 303(7):G870-8, 2012.
34. Chow EC, Quach HP, Vieth R, Pang KS. Temporal changes in tissue 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3, vitamin D receptor target genes, and calcium and PTH levels after 1,25(OH)2D3 treatment in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 304(9):E977-89, 2013.
35. Afrazi A, Sodhi CP, Good M, Jia H, Siggers R, et al. Intracellular heat shock protein-70 negatively regulates TLR4 signaling in the newborn intestinal epithelium. *J Immunol.* 188(9):4543-57, 2012.
36. Robertson SJ, Zhou JY, Geddes K, Rubino SJ, Cho JH, et al. Nod1 and Nod2 signaling does not alter the composition of intestinal bacterial communities at homeostasis. *Gut Microbes.* 4(3):222-31, 2013.
37. Mirpuri J, Sotnikov I, Myers L, Denning TL, Yarovinsky F, et al. *Lactobacillus rhamnosus* (LGG) regulates IL-10 signaling in the developing murine colon through upregulation of the IL-10R2 receptor subunit. *PLoS One.* 7(12):e51955, 2012.
38. Verway M, Bouttier M, Wang TT, Carrier M, Calderon M, et al. Vitamin D induces interleukin-1 β expression: paracrine macrophage epithelial signaling controls *M. tuberculosis* infection. *PLoS Pathog.* 9(6):e1003407, 2013.
39. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods.* 25(4):402-8, 2001.
40. DeLuca HF. Evolution of our understanding of vitamin D. *Nutr Rev.* 66(10 Suppl 2):S73-87, 2008.
41. Biswas A, Petnicki-Ocwieja T, Kobayashi KS. Nod2: a key regulator linking microbiota to intestinal mucosal immunity. *J Mol Med (Berl).* 90(1):15-24, 2012.
42. Caruso R, Warner N, Inohara N, Nunez G. NOD1 and NOD2: signaling, host defense, and inflammatory disease. *Immunity.* 41(6):898-908, 2014.
43. Lips P, van Schoor NM. The effect of vitamin D on bone and osteoporosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 25(4):585-91, 2011.
44. Bouillon R, Carmeliet G, Lieben L, Watanabe M, Perino A, et al. Vitamin D and energy homeostasis: of mice and men. *Nat Rev Endocrinol.* 10(2):79-87, 2014.

45. Cantorna MT, Munsick C, Bemiss C, Mahon BD. 1,25-Dihydroxycholecalciferol prevents and ameliorates symptoms of experimental murine inflammatory bowel disease. *J Nutr.* 130(11):2648-52, 2000.
46. Goff JP, Koszewski NJ, Haynes JS, Horst RL. Targeted delivery of vitamin D to the colon using beta-glucuronides of vitamin D: therapeutic effects in a murine model of inflammatory bowel disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 302(4):G460-9, 2012.
47. Raftery T, Martineau AR, Greiller CL, Ghosh S, McNamara D, et al. Effects of vitamin D supplementation on intestinal permeability, cathelicidin and disease markers in Crohn's disease: Results from a randomised double-blind placebo-controlled study. *United European Gastroenterol J.* 3(3):294-302, 2015.
48. Murillo G, Nagpal V, Tiwari N, Benya RV, Mehta RG. Actions of vitamin D are mediated by the TLR4 pathway in inflammation-induced colon cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 121(1-2):403-7, 2010.
49. Hummel DM, Fetahu IS, Groschel C, Manhardt T, Kallay E. Role of proinflammatory cytokines on expression of vitamin D metabolism and target genes in colon cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 144 Pt A:91-5, 2014.
50. Xu Y, Hashizume T, Shuhart MC, Davis CL, Nelson WL, et al. Intestinal and hepatic CYP3A4 catalyze hydroxylation of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D(3): implications for drug-induced osteomalacia. *Mol Pharmacol.* 69(1):56-65, 2006.
51. Ren S, Nguyen L, Wu S, Encinas C, Adams JS, et al. Alternative splicing of vitamin D-24-hydroxylase: a novel mechanism for the regulation of extrarenal 1,25-dihydroxyvitamin D synthesis. *J Biol Chem.* 280(21):20604-11, 2005.
52. Liu W, Chen Y, Golan MA, Annunziata ML, Du J, et al. Intestinal epithelial vitamin D receptor signaling inhibits experimental colitis. *J Clin Invest.* 123(9):3983-96, 2013.
53. Klampfer L. Vitamin D and colon cancer. *World J Gastrointest Oncol.* 6(11):430-7, 2014.
54. Glenn AJ, Fielding KA, Chen J, Comelli EM, Ward WE. Long-term vitamin D3 supplementation does not prevent colonic inflammation or modulate bone health in IL-10 knockout mice at young adulthood. *Nutrients.* 6(9):3847-62, 2014.
55. Fichera A, Little N, Dougherty U, Mustafi R, Cerda S, et al. A vitamin D analogue inhibits colonic carcinogenesis in the AOM/DSS model. *J Surg Res.* 142(2):239-45, 2007.
56. Couturier-Maillard A, Secher T, Rehman A, Normand S, De Arcangelis A, et al. NOD2-mediated dysbiosis predisposes mice to transmissible colitis and colorectal cancer. *J Clin Invest.* 123(2):700-11, 2013.
57. Li CP, Li JH, He SY, Chen O, Shi L. Effect of curcumin on p38MAPK expression in DSS-induced murine ulcerative colitis. *Genet Mol Res.* 14(2):3450-8, 2015.
58. Roelofs HM, Te Morsche RH, van Heumen BW, Nagengast FM, Peters WH. Over-expression of COX-2 mRNA in colorectal cancer. *BMC Gastroenterol.* 14:1, 2014.
59. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature.* 454(7203):436-44, 2008.
60. Liu X, Nelson A, Wang X, Farid M, Gunji Y, et al. Vitamin D modulates prostaglandin E2 synthesis and degradation in human lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 50(1):40-50, 2014.

61. Wang Q, He Y, Shen Y, Zhang Q, Chen D, et al. Vitamin D inhibits COX-2 expression and inflammatory response by targeting thioesterase superfamily member 4. *J Biol Chem.* 289(17):11681-94, 2014.
62. Steinbach G, Lynch PM, Phillips RK, Wallace MH, Hawk E, et al. The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med.* 342(26):1946-52, 2000.
63. Gupta RA, Dubois RN. Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. *Nat Rev Cancer.* 1(1):11-21, 2001.
64. Oshima M, Taketo MM. COX selectivity and animal models for colon cancer. *Curr Pharm Des.* 8(12):1021-34, 2002.
65. Ishikawa TO, Herschman HR. Tumor formation in a mouse model of colitis-associated colon cancer does not require COX-1 or COX-2 expression. *Carcinogenesis.* 31(4):729-36, 2010.
66. Guslandi M. Exacerbation of inflammatory bowel disease by nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cyclooxygenase-2 inhibitors: fact or fiction? *World J Gastroenterol.* 12(10):1509-10, 2006.
67. Froicu M, Zhu Y, Cantorna MT. Vitamin D receptor is required to control gastrointestinal immunity in IL-10 knockout mice. *Immunology.* 117(3):310-8, 2006.
68. Wobke TK, Sorg BL, Steinhilber D. Vitamin D in inflammatory diseases. *Front Physiol.* 5:244, 2014.
69. Muller K, Haahr PM, Diamant M, Rieneck K, Kharazmi A, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits cytokine production by human blood monocytes at the post-transcriptional level. *Cytokine.* 4(6):506-12, 1992.
70. Keller M, Ruegg A, Werner S, Beer HD. Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell.* 132(5):818-31, 2008.
71. Lopetuso LR, Chowdhry S, Pizarro TT. Opposing Functions of Classic and Novel IL-1 Family Members in Gut Health and Disease. *Front Immunol.* 4:181, 2013.
72. Bauer C, Duesell P, Mayer C, Lehr HA, Fitzgerald KA, et al. Colitis induced in mice with dextran sulfate sodium (DSS) is mediated by the NLRP3 inflammasome. *Gut.* 59(9):1192-9, 2010.
73. Ferrero-Miliani L, Nielsen OH, Andersen PS, Girardin SE. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1beta generation. *Clin Exp Immunol.* 147(2):227-35, 2007.
74. Nonn L, Peng L, Feldman D, Peehl DM. Inhibition of p38 by vitamin D reduces interleukin-6 production in normal prostate cells via mitogen-activated protein kinase phosphatase 5: implications for prostate cancer prevention by vitamin D. *Cancer Res.* 66(8):4516-24, 2006.
75. Daniel C, Sartory NA, Zahn N, Radeke HH, Stein JM. Immune modulatory treatment of trinitrobenzene sulfonic acid colitis with calcitriol is associated with a change of a T helper (Th) 1/Th17 to a Th2 and regulatory T cell profile. *J Pharmacol Exp Ther.* 324(1):23-33, 2008.

Figures and legends

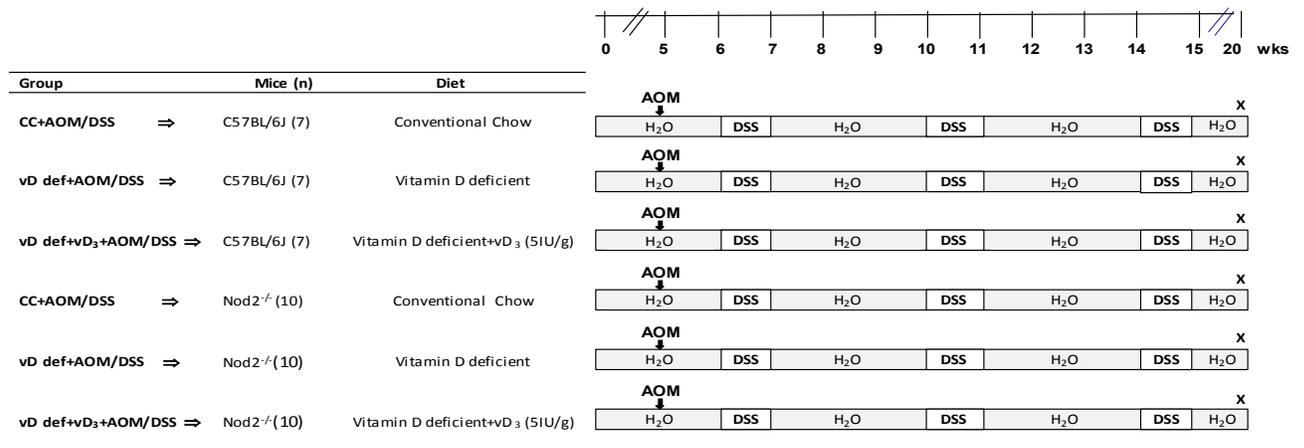
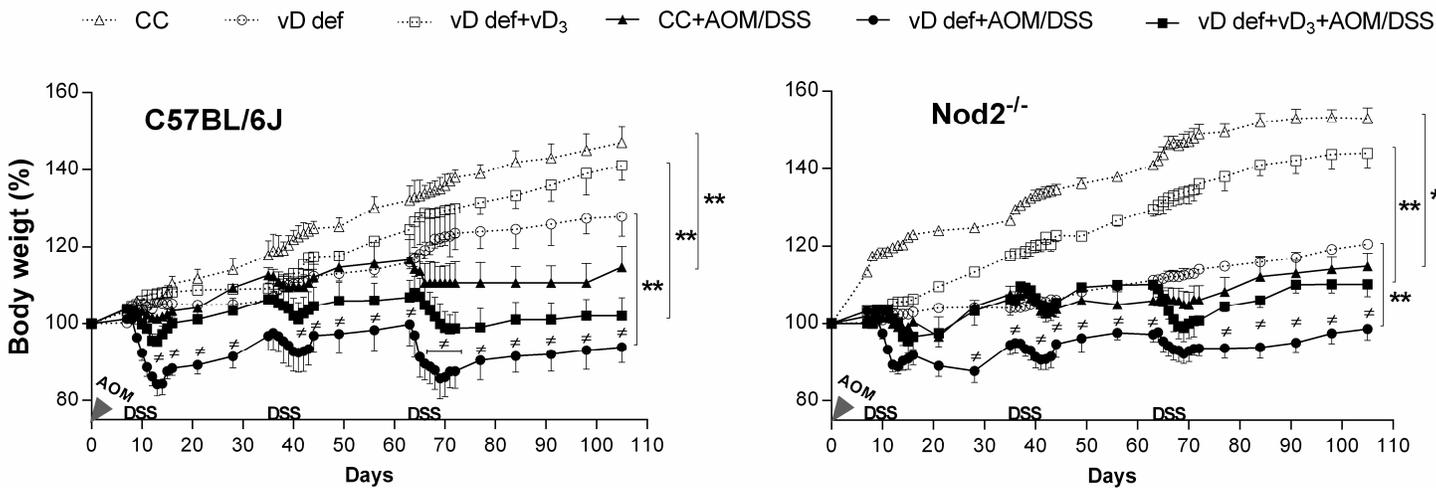


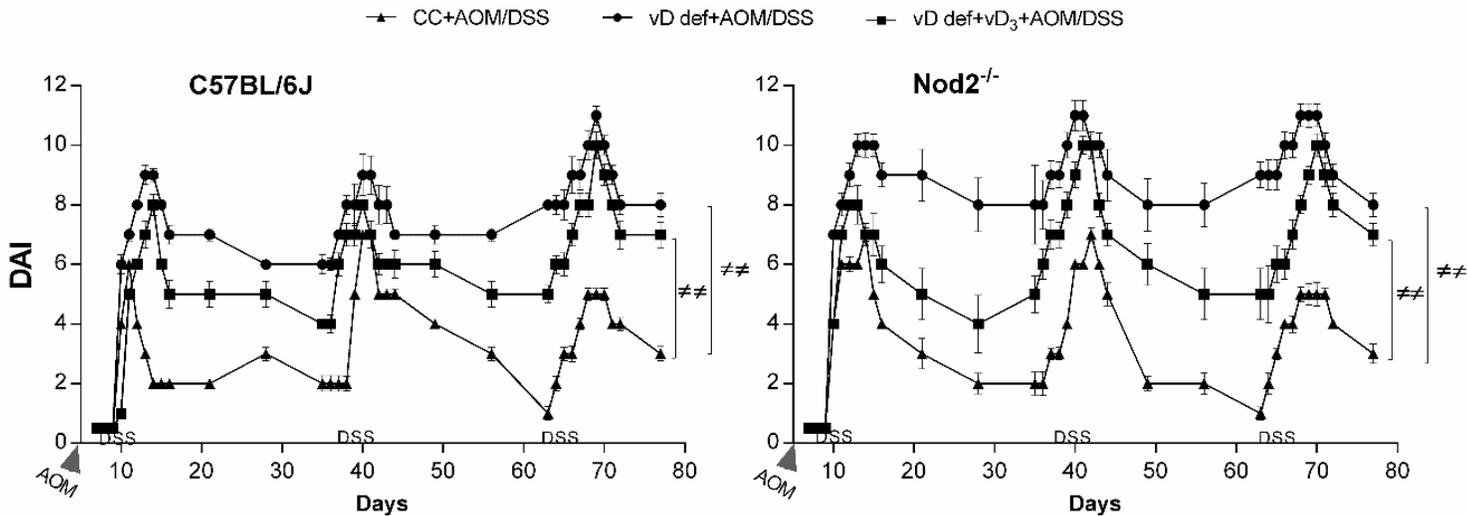
Figure 1. Experimental protocol for the colitis associated colon carcinogenesis model induced using azoxymethane (AOM) and dextran sodium sulfate (DSS).

After acclimatization, five week old C57BL6/J and Nod2^{-/-} mice were placed 1 mouse/cage in a pathogen free room. Mice were randomized to be fed conventional chow (CC), a vD deficient diet (vDdef) or the vDdef diet supplemented with vD₃ (5IU/g), for 20 weeks. One week after AOM injection (10 mg/kg body weight i.p), 1.5 % DSS was given in the drinking water for 7 days, followed by 3 weeks of regular water. This cycle was repeated 2 more times. Mice were euthanized (X) 5 weeks after the final DSS cycle (at week 20). For each group, control mice were used (CC, vDdef, vDdef+vD₃). The controls received a saline injection followed by regular water until the end of experiment. During the experimentation, clinical assessment of all animals was monitored daily using a Disease Activity Index. n = 7-10/group.

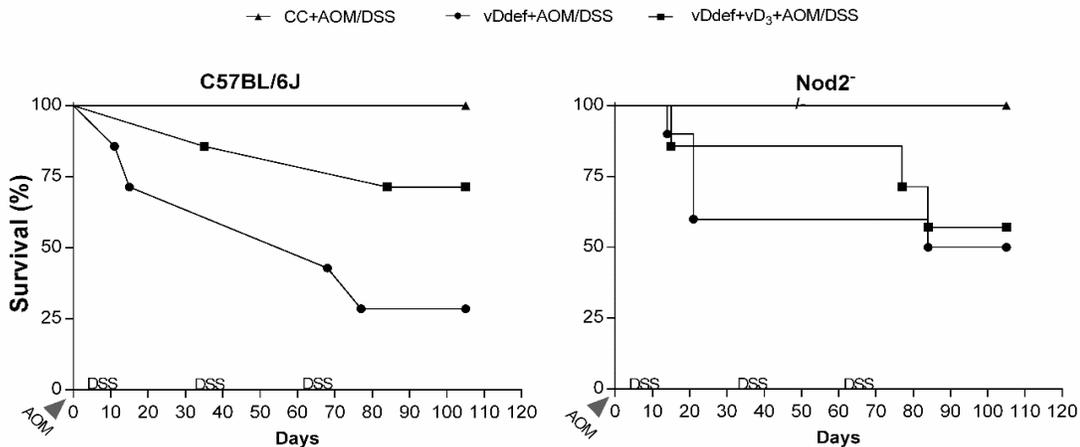
A



B



C



D

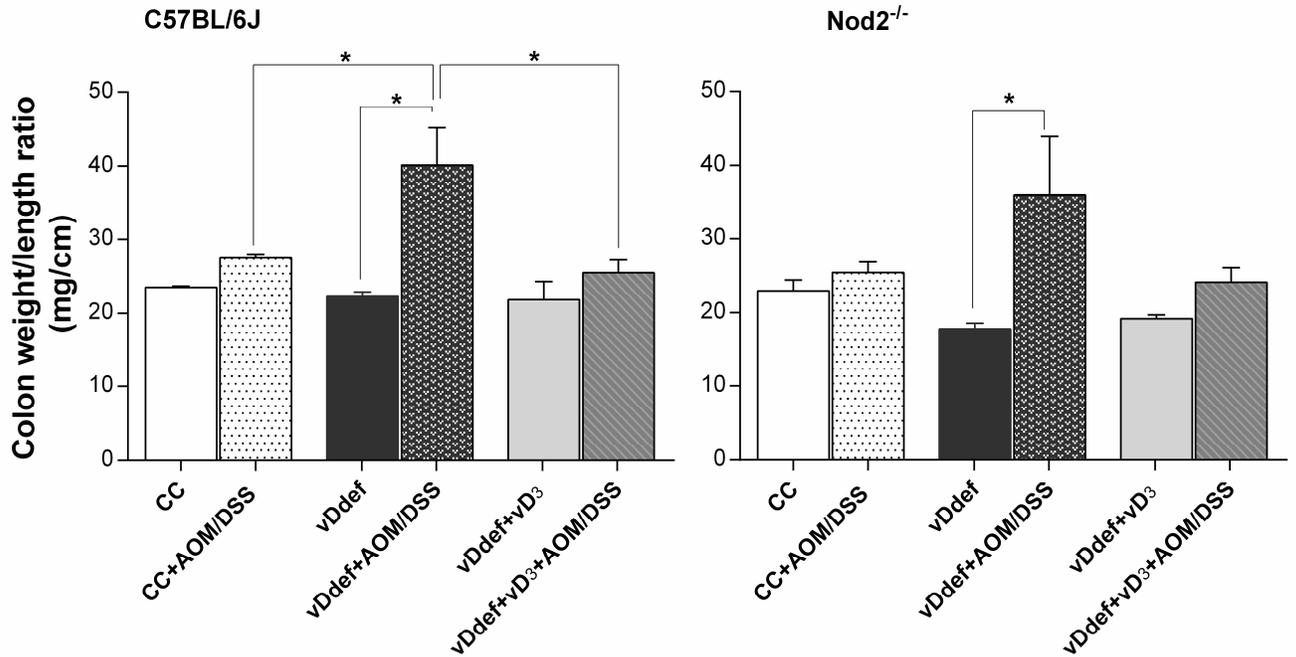
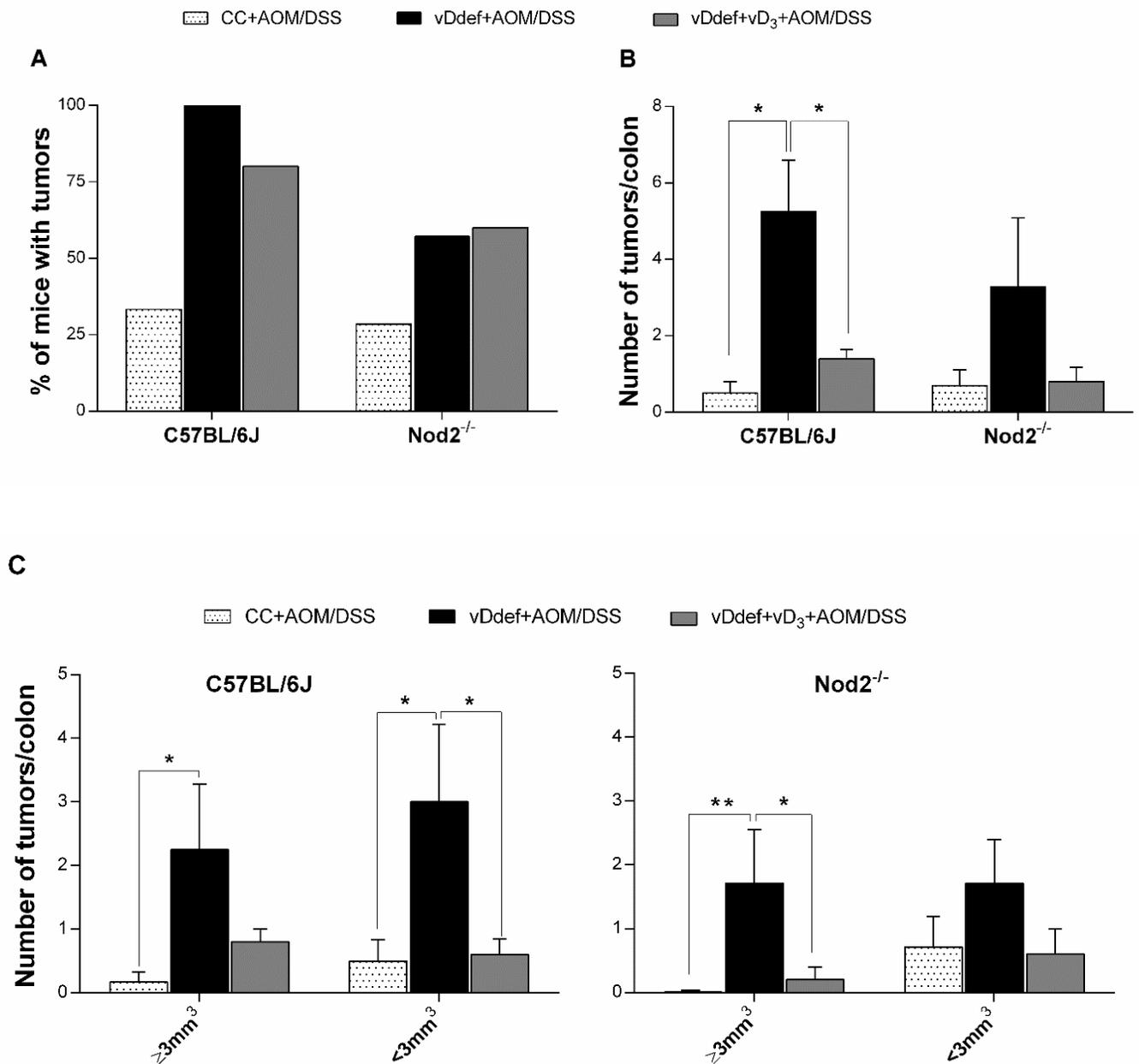


Figure 2. The effect of vD deficiency and vD₃ supplementation on susceptibility of C57BL/6J and Nod2^{-/-} to AOM/DSS-induced colitis associated cancer.

(A) Body weight, (B) colitis disease activity index (DAI) and (C) percentage of survival of C57BL/6J and Nod2^{-/-} following AOM and DSS administration on different diets. Body weight and clinical assessment in AOM and DSS-treated were monitored daily throughout the course of study (20 weeks). The parameters measured for DAI were body weight, evaluation of stool consistency and presence of fecal blood loss. (D) Colonic weight /length ratio of the colon of C57BL/6J and in Nod2^{-/-}. Mice were sacrificed at 20 weeks of experimentation, their colon was removed, washed and its length and weight was measured. Comparison of survival curves was achieved using Long-rank test. For C57BL/6J, survival curves are significantly different (Chi-square=8.187 and $p=0.017$). For Nod2^{-/-} mice, the differences are non-significant (Chi-

square=4.480 and $p=0.106$). All other data represent the mean and standard error of mean. *, significant ($p<0.05$, $**p<0.01$) difference from saline-injected groups within AOM-injected/DSS groups. \neq , significant ($p<0.05$) difference from AOM-injected/DSS groups with conventional chow within AOM-injected/DSS groups with vD deficient or vD₃ supplemented.). n = 7-10/group.



D

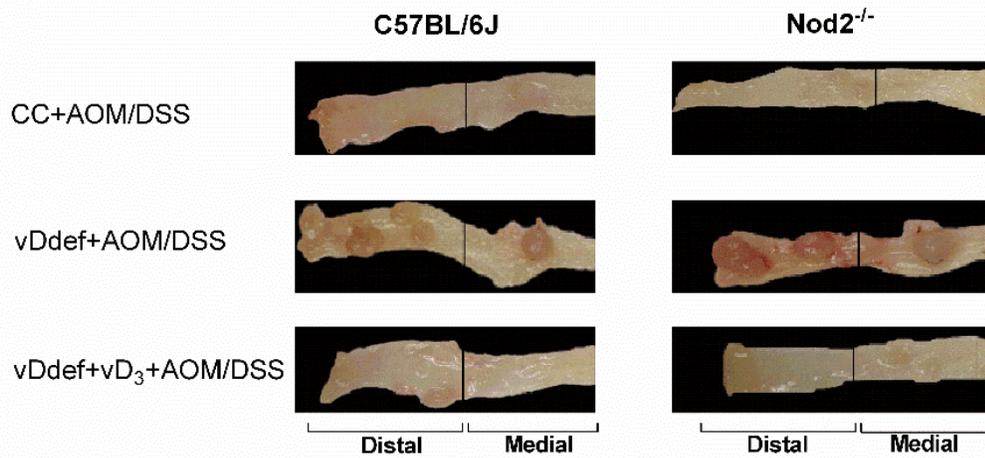


Figure 3. Macroscopic view of mouse colons in an experimental model of colitis associated colorectal cancer.

(A) incidence, (B) tumor multiplicity, (C) size distribution and (D) macroscopic appearance of colorectal tumors in C57BL/6J and Nod2^{-/-} mice. After mice euthanasia, the colon samples were cleaned, opened longitudinally and tumors were counted and sized. Data are expressed as means \pm SEM. * $p < 0.05$. $n = 3-10$ / group.

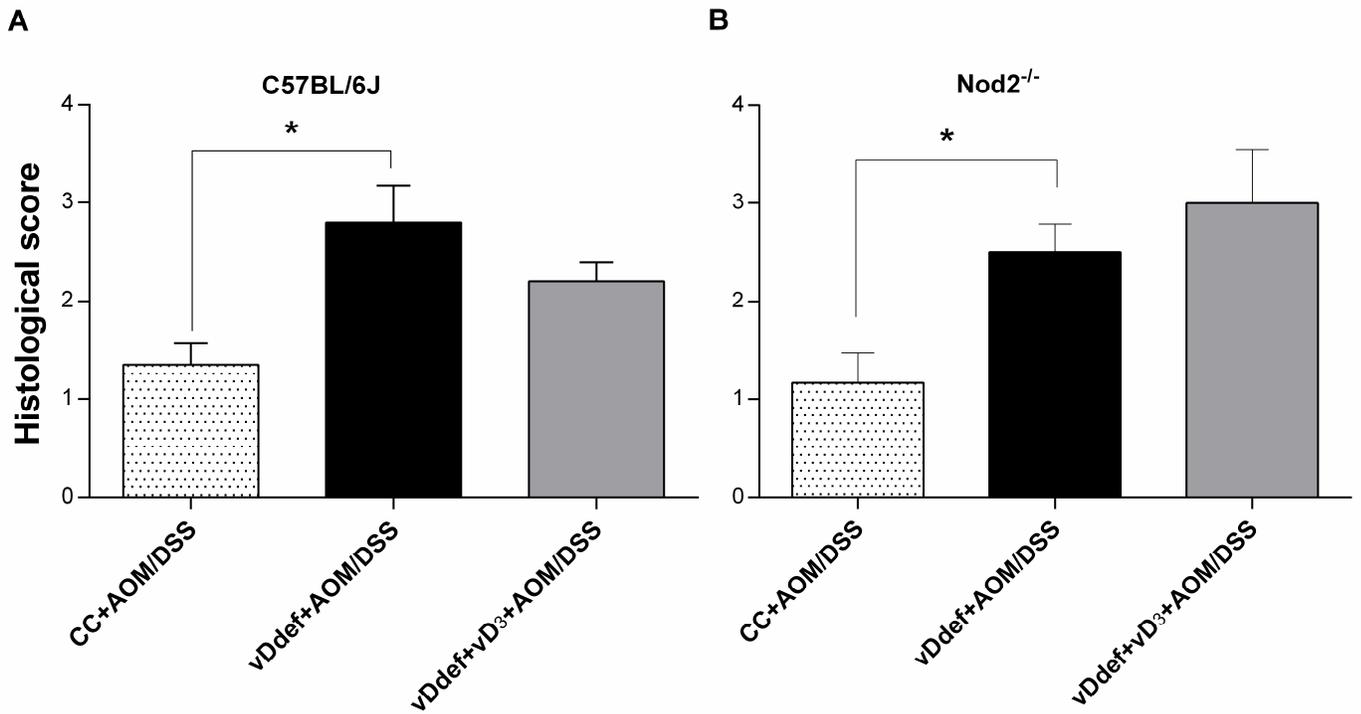


Figure 4. Histological scoring of inflammation severity of colonic sections from distal segments of (A) C57BL/6J and (B) Nod2^{-/-} mice.

After autopsy, ~1 cm of the distal colon was removed, fixed in 10% buffered formalin and paraffin embedded. Sections were graded blind by using a cumulative score for inflammatory cell infiltration, inflammatory cell localization and surface epithelial damage. Data are expressed as means ± SEM. n = 3-10 mice for each group, **p*<0.05.

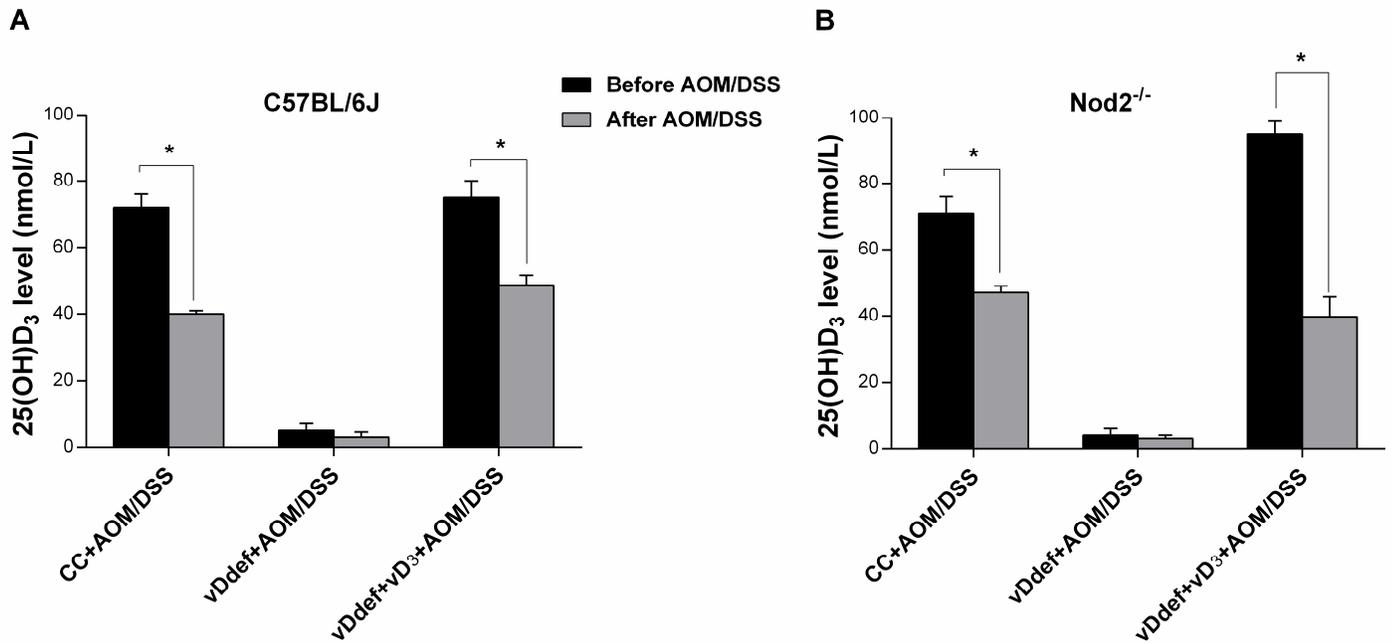
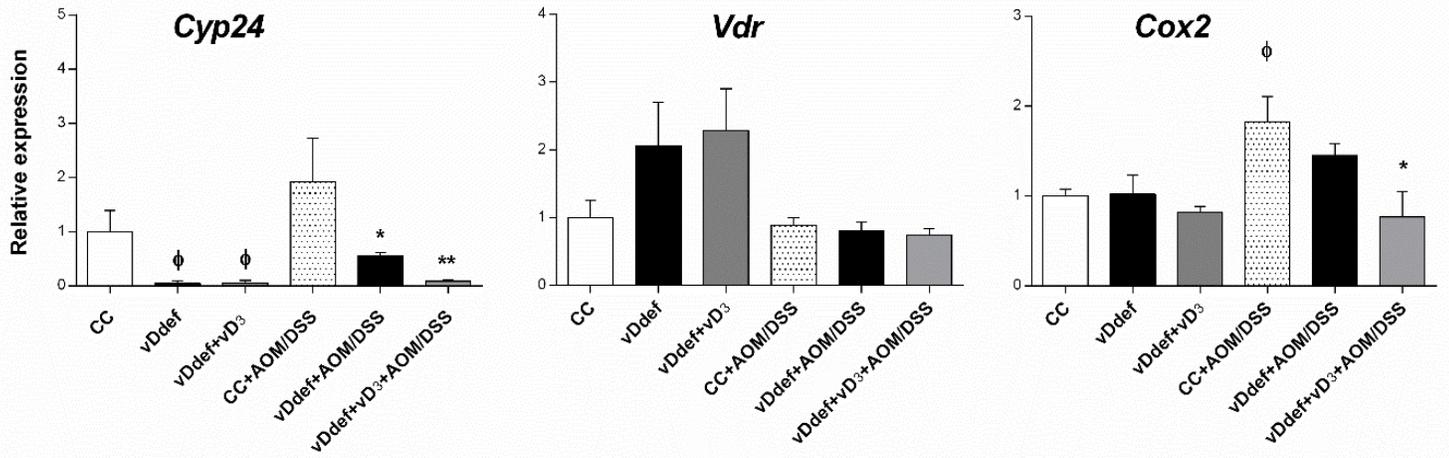


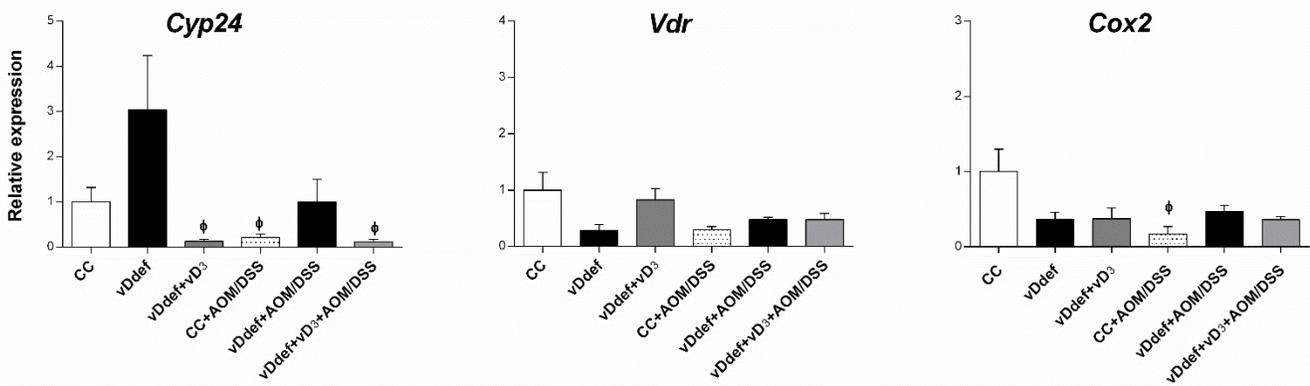
Figure 5. Plasma 25(OH)D₃ levels in (A) C57BL/6J and in (B) Nod2^{-/-} mice before and after administration of AOM and DSS.

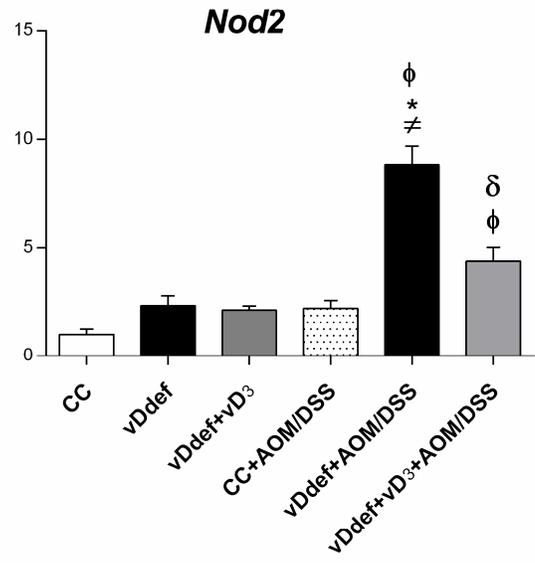
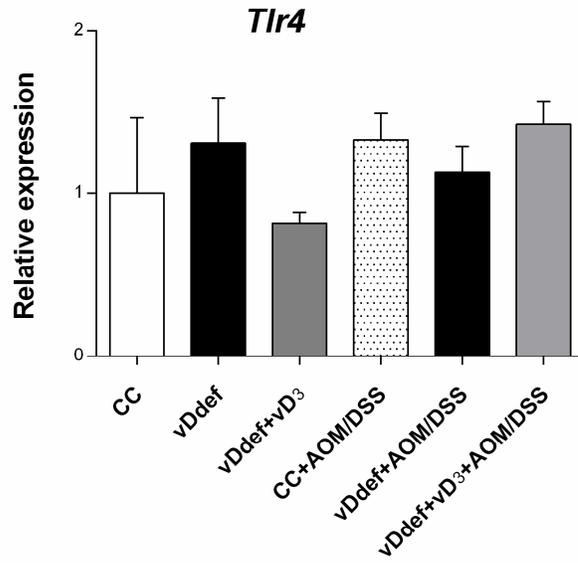
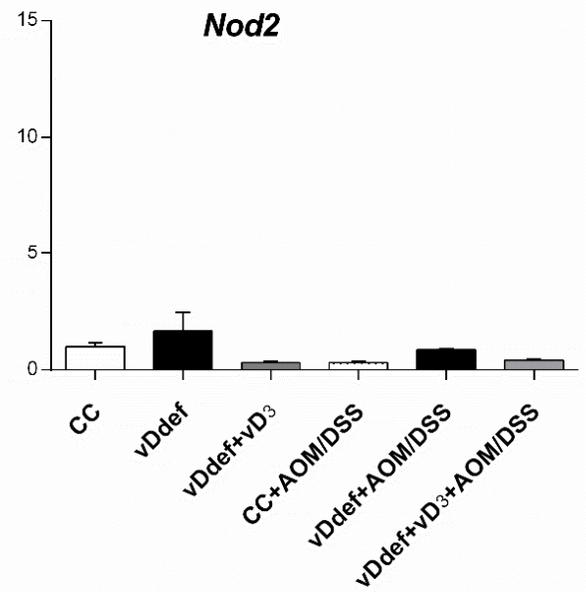
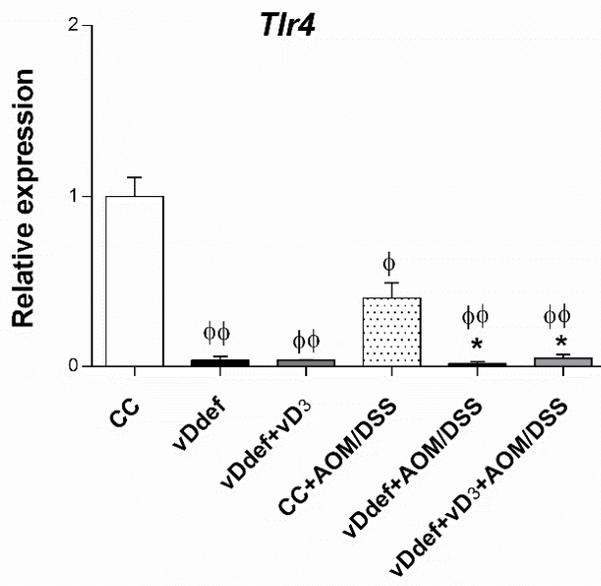
One day before AOM injection, 3 mice of each group were anesthetized and blood was collected for the measurement of plasma 25(OH)D₃ levels. At the end of the experiment, after colitis-associated cancer induction with AOM and DSS, blood was collected by cardiac puncture and centrifuged. Plasma was collected and 25(OH)D₃ was measured by HPLC-MS. Data are expressed as means ± SEM. n = 3-10/group.

A
C57BL/6J



B
Nod2^{-/-}



C**C57BL/6J****D*****Nod2*^{-/-}**

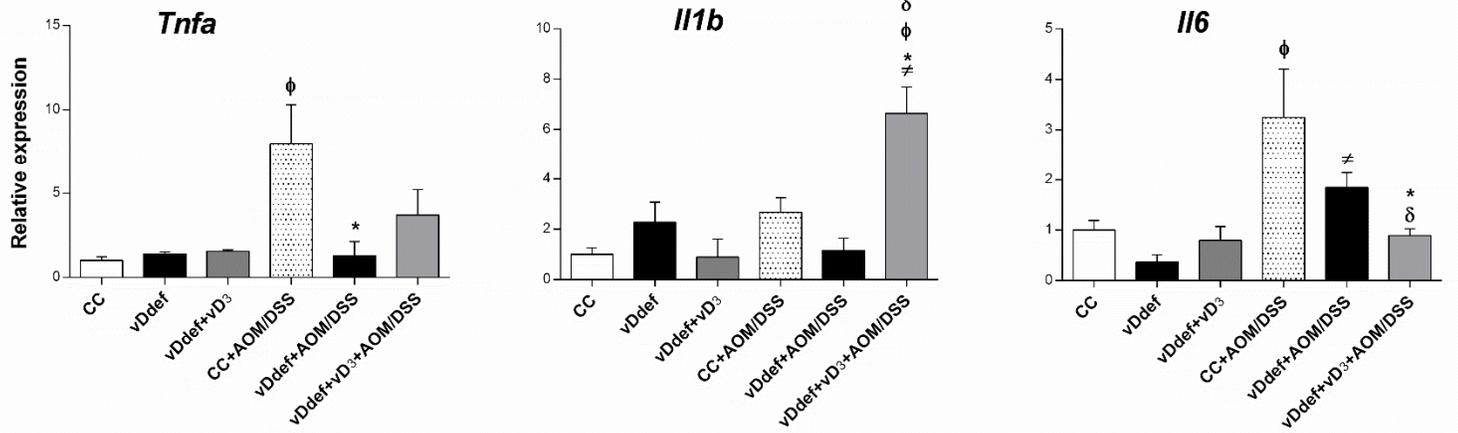
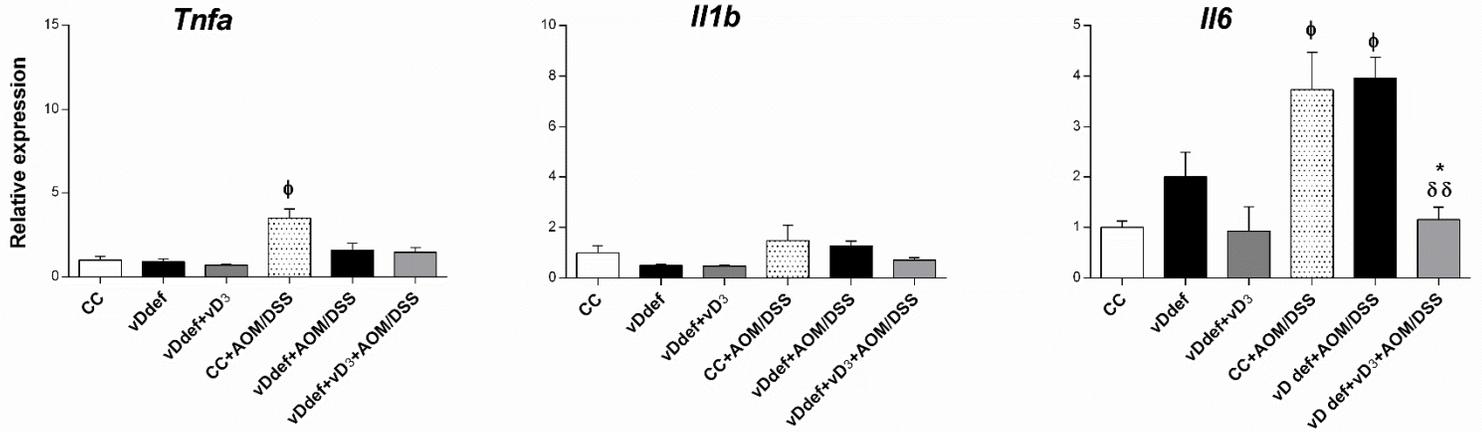
F**C57BL/6J****F****NOD2^{-/-}**

Figure 6. The effect of vD deficient and vD₃ supplemented diets on the expression of *Cyp24*, *Vdr*, *Tlr4*, *Nod2* and pro-inflammatory genes (*Cox2*, *Tnfa*, *Il1b* and *Il6*) in colonic tissue collected from C57BL/6J (A,C,E) and from *Nod2*^{-/-} (B,D,F) mice.

Each sample was normalized to *Gapdh* expression and analyzed relative to saline-injected C57BL/6J or *Nod2*^{-/-} mice on conventional chow (CC) using 2^{-ΔΔC} method.

φ Significant (p <0.05) difference from saline-injected group with conventional chow within saline-injected and AOM/DSS vD deficient or vD₃ supplemented groups.

* Significant (*p<0.05, **p<0.01) difference from AOM/DSS group with conventional chow within AOM/DSS vD deficient or vD₃ supplemented groups.

≠ Significant (p<0.05) difference from saline-injected groups within AOM/DSS treated groups.

δ Significant (*p<0.05) difference from AOM/DSS group with vD₃ supplemented diet within AOM/DSS vD deficient group (bar cluster; unpaired *t* test).

TABLE 1

Histopathology analysis for tumor stage and nodal status

	MICROSCOPIC									
	WELL-DIFFERENTIATED CARCINOMA		INTRAEPITHELIAL NEOPLASIA (<1mm)		LOW-GRADE DYSPLASIA/ADENOMA		FOCAL HYPERPLASIA		INFLAMMATORY POLYPS	
	C57BL/6J	Nod2 ^{-/-}	C57BL/6J	Nod2 ^{-/-}	C57BL/6J	Nod2 ^{-/-}	C57BL/6J	Nod2 ^{-/-}	C57BL/6J	Nod2 ^{-/-}
CC+AOM/DSS	0%	0%	30%	0%	0%	0%	0%	20	70	80%
vDdef+AOM/DSS	0%	25%	75%	0%	0%	0%	25%	0%	0%	75%
vDdef+vD ₃ +AOM/DSS	0%	20%	50%	20%	25%	40%	0%	0%	25%	20%

After autopsy, the colons of mice fed with conventional chow (CC+AOM/DSS) or vD deficient diet (vDdef+AOM/DSS) or with vD deficient diet supplemented with 5IU/g vD₃ (vDdef+vD₃+AOM/DSS) were collected and washed with saline. ~1 cm of the distal colon was removed, placed on a non-absorbent surface and fixed in 10% buffered formalin. The samples were processed to paraffin and embedded for sectioning on one of their side. Multiple sections at different depths were done to maximize chances of observing masse. The sections were graded by Pathologist blinded to experimental conditions, who characterized proliferative/neoplastic changes according to the classification in Boivin et al.

3. Discussion générale

Le CCR est une pathologie grave dont la prévalence est plus élevée dans les pays industrialisés (2). Dans son récent rapport annuel, Statistique Canada affirme que le CCR est la troisième forme de cancer la plus diagnostiquée et la deuxième cause de décès au Canada¹. Les causes du CCR sont multiples. Les facteurs, tels que l'environnement, les prédispositions génétiques et l'inflammation chronique de l'intestin, peuvent contribuer au développement du CCR. Les patients atteints des MII présentent un risque élevé de CCR (44). La persistance de la réponse inflammation chronique peut engendrer des lésions tissulaires qui risquent d'évoluer en cancer. De plus, les médiateurs de cette réponse sont des acteurs potentiels dans la carcinogénèse, puisqu'ils peuvent affecter le microenvironnement tumoral et favoriser la tumorigénèse du CCR (44). La physiopathologie des MII est complexe et multifactorielle. Elle fait intervenir de nombreux acteurs de la réponse immunitaire innée se caractérisant, entre autre, par une rupture de l'homéostasie intestinale (5, 57).

La modulation des réponses immunitaires innées et le maintien de l'homéostasie intestinale par la vD (135, 144, 145), ainsi qu'à l'inverse, une déficience en vD associée à un risque accru de développer les MII et le CCR ont déjà été démontrées (130, 134). Ces effets s'exercent par l'activation de la voie de signalisation du récepteur NOD2 (116, 169). Les polymorphismes du gène *Nod2* confèrent une susceptibilité accrue à l'apparition des MII, conséquence d'une altération du microbiote et d'une rupture de tolérance immunitaire innée vis-à-vis la flore intestinale (95, 168). Le dysfonctionnement immunitaire aboutit à une chronicité du processus inflammatoire provoquant des altérations histologiques et des lésions cellulaires qui peuvent constituer un terrain favorable à la survenue de CCR (101, 108, 109). La vD préserve la barrière

¹ Canadian Cancer Society's Advisory Committee on Cancer Statistics. (2015). Canadian Cancer Statistics 2015. Toronto, ON: Canadian Cancer Society.

intestinale en agissant, entre autres, sur les voies de l'immunité innée via l'activation de la voie de NOD2 (132, 145, 155). Nous avons récemment rapporté que le traitement avec $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ stimule l'activation de NOD2 et augmente l'effet synergique fourni par la coactivation de NOD2 et de TLR pour la production du $\text{TNF-}\alpha$ et de l'IL-23 dans les PBMC des patients atteints de MC, et pour la production du $\text{TNF-}\alpha$, l'IL-23 et de l'IL-10 dans les cellules dendritiques de ces patients (169). Dans la présente étude, nous avons évalué l'effet préventif d'une supplémentation en vD_3 sur la sévérité de la colite expérimentale et sur le développement du CAC dans un modèle murin de cancérogenèse colique induite par AOM et DSS. De plus, nous avons vérifié si cet effet préventif de la vD_3 est médié par NOD2 en utilisant des souris $\text{Nod2}^{-/-}$, comme un deuxième modèle murin de CAC. Nous avons divisé chaque modèle de souris en trois groupes auxquels nous avons administré trois différentes diètes et ce, durant cinq semaines avant l'induction du CAC avec AOM/DSS et durant toute la période expérimentale. Le premier groupe de souris C57BL/6J et un autre de $\text{Nod2}^{-/-}$ avaient reçu une diète conventionnelle (CC). Le deuxième groupe de C57BL/6J et un autre de $\text{Nod2}^{-/-}$ étaient nourris avec une diète déficiente en vD_3 (vD def). Le dernier groupe de souris C57BL/6J et un autre de $\text{Nod2}^{-/-}$ étaient nourris avec la même diète déficiente en vD_3 à laquelle nous avons ajouté 5IU/g de vD_3 ($\text{vD def} + \text{vD}_3$). Les groupes contrôles, des C57BL/6 et des $\text{Nod2}^{-/-}$, étaient soumis aux mêmes types de diètes, mais sans être induits par AOM/DSS. Ils étaient uniquement injectés avec un véhicule de solution saline comme contrôle. Au cours de cette étude, nous avons mesuré les paramètres suivants: le pourcentage de perte de poids corporelle, l'indice d'activation de la maladie (DAI) et le taux de survie. Le DAI représente un score combiné de la perte de poids par rapport au poids initial, la présence de sang dans les selles et la consistance des selles. Chaque paramètre possède un score de 0 à 4, pour une somme totale de 12.

3.1 L'effet de la vD₃ sur la sévérité de la colite et sur le taux de mortalité dans les deux modèles murins de CAC

Nos résultats démontrent que l'ajout de la vD₃ à la diète des souris estompe la sévérité et les symptômes de l'inflammation durant la survenue de la colite aiguë. De plus, les souris supplémentées en vD₃ récupéraient rapidement lors des périodes de rémission entre chaque cycle de DSS. Comparativement aux souris contrôles injectées au salin, les deux modèles de souris induites par l'AOM/DSS avaient perdu plus de poids. Cependant, celles supplémentées en vD₃ avaient une moins grande perte de poids par rapport à celles nourries avec une diète déficiente en vD₃. Il est intéressant de mentionner que toutes les souris contrôles injectées au salin auxquelles nous avons administré la diète de base (CC) et la diète enrichie en vD₃ avaient une différence de poids comparées à celles ayant reçu une diète déficiente en vD₃. Ces résultats peuvent suggérer une réduction de la densité osseuse chez les souris déficientes en vD₃. En effet, il est bien établi que la vD₃ joue un rôle indispensable dans le métabolisme phosphocalcique et dans la minéralisation osseuse. De plus, une insuffisance en vD₃ peut, entre autres, causer une hyperparathyroïdie secondaire qui engendre une perte osseuse (170). Il a été démontré que les souris invalidées pour VDR ou pour CYP27B1, enzyme responsable de la synthèse de la forme active de la vD (1,25(OH)₂D₃), avaient un faible poids corporel et montraient une baisse au niveau de la masse graisseuse abdominale (171). Tout au long de l'expérimentation, la perte de poids observée chez les souris induites par AOM/DSS corrélait avec les symptômes cliniques recueillis, tels que la diarrhée hémorragique, et ce, dans les deux modèles de souris, les C57BL/6J et les Nod2^{-/-}. En effet, durant l'induction de la colite aiguë par le DSS, nous avons enregistré une augmentation graduelle du score DAI, qui a été ensuite estompé durant les phases de rémission (entre les cycles de DSS). Dans le cas des souris C57BL/6J, la vD₃ diminuait significativement le score DAI en comparaison avec celles déficientes en vD₃. Il est apparu, lors de nos observations, que la supplémentation en vD₃

réduisait également le score DAI chez les souris *Nod2*^{-/-}, ce qui nous a menés à suggérer que l'action protectrice de la *vD*₃ sur la colite n'est pas médié par NOD2. De plus, nous avons rapporté que le taux de mortalité chez les souris *Nod2*^{-/-}, ayant une déficience en *vD*₃, était moins élevé par rapport aux souris C57BL/6J ayant le même déficit. De manière similaire, les souris *Nod2*^{-/-} nourries avec une diète enrichie en *vD*₃ étaient protégées contre la mortalité précoce dès le premier cycle de DSS comparativement aux souris C57BL/6J alimentées avec le même type de diète. Cependant, il n'y a pas eu de différences significatives dans le taux de mortalité entre les groupes supplémentés en *vD*₃ et ceux déficients à la dernière phase de l'expérimentation. Des observations similaires ont été rapportées par d'autres études utilisant un modèle murin AOM/DSS alimenté par la *vD*₃. En effet, cette étude a démontré que les souris invalidées pour l'IL-10 nourries, avec une diète déficiente en *vD*₃, montraient une sévérité accrue des manifestations cliniques avec un taux élevé de mortalité (172). L'évaluation du poids relatif du côlon (mg/cm) des souris induites par AOM/DSS sous différentes diètes corrélait avec les signes cliniques observés. En effet, ces souris avaient un poids relatif du côlon (mg/cm) plus élevé par rapport aux souris contrôles (salin). En plus, chez les souris C57BL/6J induites par AOM/DSS, l'ajout de la *vD*₃ à leur diète avait significativement diminué le poids relatif du côlon (mg/cm). Comparativement avec ces dernières, les souris *Nod2*^{-/-} avec la même diète avaient une légère diminution du poids relatif du côlon (mg/cm) sans pour autant être significative.

3.2 L'action de la vD₃ sur l'indice d'activité histopathologique du côlon dans les deux modèles murins de CAC

Le score de l'indice d'activité histopathologique, qui comprend les dommages de la surface épithéliale et le niveau d'infiltration de cellules inflammatoires, était élevé de façon significative autant chez les souris C57BL/6J que chez les Nod2^{-/-} induites par AOM/DSS. La supplémentation en vD₃ n'avait pas d'effet significatif sur le score de l'indice d'activité histopathologique. Nous avons attribué ces résultats à la diminution du niveau de 25(OH)D₃ sanguin mesuré après l'induction de la colite extensive par DSS, qui peut altérer l'action bénéfique de la vD₃. D'autres études menées sur les souris induites par DSS, nourries avec une diète enrichie en 1,25(OH)₂D₃, ont démontré que leur niveau plasmatique de 25(OH)D₃ était plus bas que les souris non induites en DSS (173). Ces observations suggèrent que le DSS peut interférer avec le processus d'absorption de la vD₃ et altérer son assimilation et son effet bénéfique. Le DSS est un agent inflammatoire provoquant une perte de l'architecture de la muqueuse et altérant l'intégrité de la barrière intestinale (167). Chez les patients atteints de la MC, la sévérité des signes cliniques va de pair avec le faible taux de vD sérique. Les phases actives de cette maladie sont caractérisées tant par la dysfonction et l'altération de la barrière intestinale que par les troubles d'absorptions. Une étude clinique, randomisée à double aveugle, a révélé qu'une supplémentation en vD des patients MC, durant les périodes de rémission (asymptomatiques), permet de prolonger ces périodes et de réduire de manière significative l'activité de cette maladie durant les phases actives (symptomatiques). La supplémentation en vD, durant les phases de rémission, contribuait au maintien de l'intégrité de la barrière gastro-intestinale et améliorait la perméabilité intestinale chez ces patients (174).

3.3 L'effet de l'administration préventive de la vD₃ sur la tumorigenèse du côlon dans les deux modèles murins de CAC

Globalement, nos résultats de l'incidence de tumeurs chez les deux modèles de souris n'étaient pas affectés de manière significative par l'ajout de la vD₃. Cependant, le nombre de tumeurs par côlon était considérablement réduit chez les souris C57BL/6J non déficientes en vD₃ *versus* la même souche de souris déficientes en vD₃. Le même phénomène a été observé chez les souris Nod2^{-/-}, mais la différence n'était pas significative entre les souris supplémentées en vD₃ et celles déficientes en vD₃. Les études antérieures utilisant des souris CF1 induites par AOM/DSS ont révélé que la supplémentation en vD n'avait pas un effet significatif sur la réduction de l'incidence tumorale, en comparaison à celles ayant reçue les formes analogiques de la vD (155). Les observations macroscopiques du côlon de ces deux modèles de souris dévoilent que la vD₃ agit considérablement sur la réduction de la taille des tumeurs chez ces souris, surtout chez les Nod2^{-/-}, où les grosses tumeurs ont été réduites de manière significative. Nous pouvons attribuer cette réduction de la taille des tumeurs à l'effet rapporté par des études ayant montré que la vD diminue l'intensification de la voie de signalisation de Wnt/ β -caténine. En effet, ces études ont rapporté que le traitement avec la vD avait réduit significativement la taille des tumeurs chez les souris APC^{Min/+} comparé aux souris Apc^{Min/+}/VDR^{-/-} (162). Ces dernières avaient des tumeurs plus volumineuses, suggérant que la vD peut contribuer à la séquestration de la β -caténine nucléaire et à la diminution de l'expression de ses gènes cibles (160, 161). Les analyses histopathologiques des tumeurs coliques des deux modèles de souris ont révélé l'absence d'une différence significative entre les diètes, à savoir celles supplémentées en vD₃ *versus* celles déficientes en vD₃. Néanmoins, la vD₃ avait réduit de 25% les néoplasies intraépithéliales microscopiques chez les souris C57BL/6J et avait réduit de 55% la formation des polypes intestinaux. Chez les souris Nod2^{-/-}, la vD₃ agissait légèrement sur la formation des adénocarcinomes sans pour autant modifier

significativement leur fréquence. Des données histologiques provenant d'une étude effectuée sur des rats induits par des injections successives d'AOM ont montré que la vD avait effectivement une action négative sur le nombre et la taille des grosses tumeurs, mais n'avait aucun pouvoir préventif, ni restauratif des hyperplasies glandulaires épithéliales (175).

3.4 L'administration préventive de la vD₃ et l'expression des gènes impliqués dans la pathophysiologie du CAC dans le côlon des deux modèles murins de CAC

Le modèle du CCR associé à l'inflammation induit par AOM/DSS est caractérisé par des changements au niveau de l'expression de plusieurs gènes impliqués à la fois dans le processus de l'inflammation tissulaire et dans la tumorigenèse intestinale, tels que TNF- α , l'IL-6, et la COX-2. La chronicité de l'inflammation induit également une fragilité au niveau de la barrière intestinale et une toxicité bactérienne, suggérant le rôle pivot des voies de signalisation via les récepteurs TLRs et NODs dans la pathologie de CAC (166).

3.4.1 L'effet de la vD₃ sur l'expression relative de *Cyp24* et de *Vdr*

Dans cette étude, l'expression des gènes au niveau du côlon démontre des résultats quasi contradictoires avec les recherches antérieures. L'analyse de ces résultats est limitée à ceux où la différence entre les groupes était significativement concluante. Nous avons d'abord mesuré l'effet d'une supplémentation en vD sur le niveau d'expression de certains gènes impliqués dans la régulation du métabolisme de la vD, tels que *Cyp24* et *Vdr* dans le côlon des deux modèles expérimentaux de souris. Dans ces dernières, la vD₃ régula de manière négative l'expression de *Cyp24*, gène codant pour l'enzyme CYP24 responsable du catabolisme de la vD (128). L'expression relative de ce gène avait baissé de manière significative dans le côlon des deux modèles de souris supplémentées ou non en vD₃,

comparativement aux celles nourries avec la diète de base CC. Nos résultats sont en contradiction avec les études antérieures, étant donné qu'une concentration élevée de vD stimulait l'expression de CYP24 (au niveau des différents tissus cibles), afin d'éviter une toxicité physiologique par la vD (171). Nous attribuons ces résultats à une possible répercussion de l'inflammation à long terme sur la régulation de CYP24, étant donné que l'irritabilité intestinale induite par DSS provoque une baisse du niveau sanguin de la vD, et ce, même chez les souris supplémentées en vD. Il est aussi possible que la CYP24 est régulée de manière différente dans le tissu intestinal. Il est bien établi que la synthèse de la forme hormonale active de la vD survient aussi dans les entérocytes, indépendamment de la contribution rénale, étant donné la présence de VDR, de CYP27 et CYP24 dans ces cellules. Toutefois, il a été rapporté que le niveau d'expression de VDR et des enzymes associées au métabolisme de la vD augmente durant les phases précoces de la différenciation cellulaire du CCR (134, 175). Les études menées sur une lignée cellulaire cancéreuse du côlon ont indiqué que l'inflammation interférait avec le métabolisme du vD. D'autant plus, le TNF- α et l'IL-6 inhibaient l'activation du gène *Cyp27* (176). De plus, l'ajout de la vD à d'autres cellules cancéreuses en culture induisait une activation rapide des enzymes responsables de l'anabolisme de la vD (CYP27A1 et CYP27B1) sans pour autant modifier de manière significative le niveau de CYP24 (155). Les expériences *in vivo* ont rapporté que la régulation de CYP24 au niveau des colonocytes des souris induites par DSS était de courte durée. Le gavage de ces souris avec le 1,25(OH) $_2$ D $_3$ augmentait l'expression de CYP24 colique uniquement pour quelques heures. Après 24 heures, l'action de vD sur CYP24 était limitée, puisque le niveau d'expression de cette enzyme était retourné à son niveau basal (173). Par ailleurs, il est connu que le récepteur VDR a un effet régulateur direct sur CYP24 au niveau des reins, alors qu'au niveau des intestins le profil d'expression de cette enzyme est modique et même indétectable dans certaines conditions (161). De surcroît, il a été suggéré l'existence d'une modification par épissage alternatif de la CYP24 au niveau

des cellules de type macrophage humain et que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ exogène agissait sur l'expression du gène *Cyp24*, sans pour autant induire son activité enzymatique (177). Il est évident que d'autres investigations devront être faites pour caractériser davantage le mécanisme d'action de la vD sur la régulation de ses enzymes cibles au niveau des colonocytes, sans négliger la répercussion du microbiote, étant donné le gradient oral/aboral.

L'activité biologique de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ est relayée par son récepteur nucléaire VDR, qui régule l'expression de nombreux gènes contribuant à son activité antinéoplasique. Il a été démontré que chez la souris, la délétion de ce récepteur exagère les manifestations cliniques de la colite et que, chez les patients avec une MC ou avec la colite ulcéreuse, le niveau d'expression de VDR est considérablement abaissé. Les rapports épidémiologiques ont également associé les polymorphismes du gène VDR au risque de MII (145, 178). De même, il a été démontré qu'une surexpression de VDR dans les cellules intestinales des souris avec une colite induite chimiquement leur conférait une forte résistance à la colite en inhibant, entre autres, la production des cytokines inflammatoires (146). Dans notre étude, les résultats obtenus par rapport à l'action de la vD₃ sur le niveau d'expression de VDR ne sont pas significatifs. Cependant, les résultats sont néanmoins indicatifs. L'expression relative de VDR avait considérablement diminué chez les deux modèles de souris (C57BL/6J et *Nod2*^{-/-}) induites par AOM/DSS en comparaison avec leurs contrôles injectés au salin. Soutenus par des études récentes, nous avançons que la vD₃ peut aussi exercer certaines de ses activités biologiques de manière indépendante de VDR, surtout en présence d'un microenvironnement tumoral. En effet, il a été rapporté que certaines lignées cellulaires cancéreuses avaient une réponse limitée à la vD₃ et que le niveau d'expression de VDR est négativement régulé dans la phase tardive du cancer du côlon (37). De plus, les expériences effectuées sur des souris invalidées pour IL-10 montraient que l'administration continue de vD₃ réduisait le niveau de l'expression de VDR dans les colonocytes de ces animaux (179).

3.4.2 L'effet de la vD sur l'expression relative de *Tlr4* et de *Nod2*

Il est bien établi que le niveau de l'ARNm des récepteurs TLR et NOD2 est augmenté dans les colonocytes des souris chez lesquelles a été induite une colite aiguë et un CAC (92, 155). Dans cette étude, nous voulions vérifier si ces récepteurs sont régulés d'une manière similaire dans les deux modèles de souris induites par AOM/DSS et si la supplémentation en vD agissait sur leur niveau d'expression dans le côlon des deux modèles. Le niveau d'expression de *Tlr4* dans les colonocytes des souris C57BL/6J n'était pas différent entre tous les groupes déficients en vD₃ et ceux supplémentés en vD₃. Par contre, tous les groupes de *Nod2*^{-/-} induits ou non par AOM/DSS montraient une réduction significative au niveau de l'expression relative de *Tlr4* par rapport aux *Nod2*^{-/-} nourris avec la diète de base CC. Aucune différence significative n'a été constatée entre les *Nod2*^{-/-} déficientes ou supplémentées en vD₃. Il a été démontré dans une étude menée par Murillo et collaborateurs que le traitement continu des cellules HT29 avec la vD₃ et la 1,25(OH)₂D₃ diminuait le niveau d'ARNm de *Tlr4* au bout de 8 heures jusqu'à complètement l'atténuer au bout de 24 heures (155). Ainsi, nous suggérons que l'effet de la vD₃ peut varier en fonction du temps chez nos deux modèles de souris induites par AOM/DSS. L'effet à long terme d'une supplémentation en vD₃ peut moduler de manière différente la réponse continue de l'inflammation et l'évolution du cancer, étant donné que le développement tumoral dans le modèle de CAC est un processus long et extrêmement complexe, impliquant un grand nombre d'événements inflammatoires et d'étapes d'altérations génétiques (166). En outre, il a été rapporté que l'effet de la vD sur la voie de signalisation médiée par TLR4 aboutit non seulement à une diminution au niveau de l'activation du facteur de transcription NF-κB, mais aussi provoque une réduction de son niveau transcriptionnel (155). De plus, il a été révélé que la costimulation de NOD2 et de TLR4 avait un effet synergique et favorisait l'expression de leurs gènes cibles. En l'absence de son ligand, NOD2 régulait négativement l'action de TLR4 dans une lignée cellulaire de macrophages de souris

(92). De ce fait, nous avançons que la régulation de TLR4 peut être différente dans notre modèle de CAC induit chez les souris invalidées pour le gène *Nod2*. Aussi, il est important de souligner que nos résultats n'indiquent pas nécessairement que le profil de l'expression de *Tlr4* reflète uniquement sa régulation au niveau des colonocytes, puisque l'échantillon tissulaire, prélevé au niveau du côlon des souris, renferme d'autres cellules infiltrées durant l'établissement de la pathologie telle que, les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules B et T. Sachant que ces cellules expriment aussi TLR4, le mode d'action de la vD peut varier en fonction du type de cellule.

Les interactions entre les facteurs de l'hôte et son microbiote sont cruciales pour le maintien de l'homéostasie intestinale. La réponse immunitaire contribue à la modulation de ces interactions en vue de garantir une tolérance vis-à-vis de la flore commensale. Il a été montré que NOD2 participe au dialogue établi entre l'immunité innée, l'épithélium intestinal et le microbiote. Les mutations non fonctionnelles du gène *Nod2*, impliquées dans la survenue des MII, pourraient être responsables de la dysbiose qui a comme corollaire, la rupture de l'homéostasie et la chronicité de la réponse inflammatoire. Il a été rapporté que la régulation des voies de signalisation médiées par les récepteurs TLRs n'est pas efficace en présence des variantes non fonctionnelles de NOD2. Ainsi, en présence d'un défaut dans NOD2, cette régulation aboutit à une réponse inflammatoire initiée par les TLRs, comme une réaction immunitaire inappropriée vis-à-vis le microbiote intestinal. En outre, l'absence de NOD2 chez les murins altère la production des molécules antibactériennes, qui jouent un rôle de première ligne dans la défense contre les agressions pathogènes, contribuant ainsi à conserver une flore intestinale équilibrée (109, 180). Les données recueillies, lors de notre étude sur le niveau d'expression du gène *Nod2* dans les souris C57BL/6J supplémentées ou non en vD₃, ne concordent pas avec celles rapportées par des travaux antérieurs (116, 169, 181). En effet, l'expression relative de *Nod2* était élevée dans le côlon des souris supplémenté ou non en vD₃

et induites par AOM/DSS en comparaison avec les souris contrôles sous les mêmes types de diètes. En plus, les souris déficientes en vD_3 avaient un niveau plus élevé de *Nod2* par rapport à celles supplémentées en vD_3 . À l'opposé de ces souris, aucune régulation n'a été induite dans le côlon des souris *Nod2*^{-/-} et les changements survenus dans les différents groupes s'avéraient statistiquement non concluants. Pour éviter toute confusion, il est nécessaire de préciser que les souris *Nod2*^{-/-} ont été générées par la méthode de «gene targeting» afin de remplacer le domaine CARD et NOD. Sachant que ces domaines sont indispensables au recrutement et à l'activation des effecteurs de la cascade de signalisation en aval de la liaison du ligand à NOD2, ces souris possèdent le gène *Nod2/CARD15*, mais il est non fonctionnel (105). Ainsi, les valeurs de l'expression relative de *Nod2*, détectées dans le tissu colique de ces souris, sont dues à l'hybridation de la sonde spécifique du gène en question. Toutefois, les résultats de l'expression de *Nod2*, dans le côlon de nos souris, montrent que la vD_3 ne semble pas intervenir dans la régulation de l'ARNm de ce gène. Ces résultats peuvent laisser penser que l'action préventive de la vD_3 dans ces souris n'est pas médiée par NOD2.

3.4.3 L'influence d'une supplémentation en vD_3 sur l'expression relative des médiateurs chimiques de l'inflammation

Un réseau immunitaire complexe est impliqué dans la pathogenèse du CCR associé à l'inflammation. Le déséquilibre de la balance entre les cytokines inflammatoires et celles anti-inflammatoires est responsable des manifestations caractéristiques du CAC (5, 166). Pour mettre en lumière les propriétés immunomodulatrices de la vD_3 , nous avons évalué la variation de l'expression des gènes *Cox2*, *Tnfa*, *Il1b* et *Il6* dans le côlon des deux modèles de souris induites par AOM/DSS supplémentées ou non en vD . Les résultats obtenus ne correspondaient pas à nos prédictions. L'effet préventif de la vD_3 ne se reflétait pas toujours par une réponse anti-inflammatoire.

La COX-2 est une enzyme principalement induite dans les sites inflammatoires et fortement impliquée dans le processus de carcinogenèse colique. Elle est surexprimée dans les tumeurs solides et son inhibition diminue la survie, la migration et l'invasion tumorales, tant dans le CCR d'origine héréditaire que dans le CCR associé à l'inflammation (155, 182). Il est généralement admis que l'administration de la vD régule négativement l'expression de COX-2 et la production des PGs dans les macrophages (183). Dans la présente étude, nos résultats des analyses par RT-PCR quantitative du niveau d'ARNm de *Cox2*, réalisées sur les souris C57BL/6J, corroborent avec les données de différents travaux (40, 184, 185). Effectivement, l'expression relative de *Cox2* avait augmenté dans le côlon de ces souris induites par AOM/DSS, comparativement à celles injectées avec le salin (les contrôles). De plus, la supplémentation en vD₃ diminuait le niveau d'expression de *Cox-2* dans ce modèle de souris, consolidant ainsi le rôle préventif et anti-inflammatoire de la vD dans CAC. En comparaison avec les souris C57BL/6J, le profil de l'expression de *Cox-2* dans le côlon des souris *Nod2*^{-/-} était discordant. Tous les groupes de ces souris induits ou non avec AOM/DSS montraient une régulation négative au niveau de l'expression du gène *Cox2* par rapport aux groupes contrôles nourris avec la diète de base (CC). Ces résultats obtenus arguent du fait que, dans ce modèle animal, la tumorigenèse colorectale dans le CAC ne nécessite pas l'expression de COX-2 ou du fait que le profil de l'expression génique de *Cox2* varie en fonction du type tumoral, du tissu touché et des stades du processus tumoral. Il a été démontré que la survenue des tumeurs dans le modèle de CAC, provoquée par AOM/DSS, peut ne pas impliquer l'activité de COX-2 étant donné que les souris invalidées pour COX-2 développaient des tumeurs coliques. Les auteurs de cette étude vont même jusqu'à suggérer que l'activité de COX-2 n'a pas un rôle pro-inflammatoire, mais plutôt un rôle bénéfique (186). En outre, d'autres travaux laissent supposer que la surexpression de COX-2 est plus importante dans les lésions pré-tumorales que dans les lésions tumorales elles-mêmes. Dans le CCR, il y a plus de COX-2 dans

l'adénome colorectal que dans l'adénocarcinome colorectal (187). Les données provenant d'études cliniques ont révélé que le traitement des patients avec les inhibiteurs de COX-2, tels que les NSAIDs, provoquent une exacerbation des MII (188).

Le TNF- α est un important médiateur de l'inflammation produit par les monocytes et les macrophages. Il est impliqué de près dans la pathogenèse de MII et dans la carcinogenèse du CCR et du CAC. Le TNF- α a un effet prédéterminant sur la prolifération et la mort cellulaire via l'activation de différents sentiers de signalisation, à la suite de sa liaison aux récepteurs TNFR1 et TNFR2 (166). De nombreux travaux menés *in vitro* et *in vivo* ont soutenu l'effet immunomodulateur de la vD et ont élucidé les mécanismes de cette modulation, en régulant, entre autres, le niveau de la cytokine TNF- α (13). De plus, il a été rapporté qu'une déficience en vD aggrave la sévérité des MII étant donné son rôle dans la régulation de l'expression de TNF- α et dans l'augmentation de l'efficacité des médicaments dirigés contre TNF (189, 190). Les études avec les souris ont montré que le traitement avec la 1,25(OH) $_2$ D $_3$ et avec le calcium agissait négativement sur le niveau de cette cytokine dans le côlon (191, 192). Nos analyses de PCR quantitatives de l'expression du gène *Tnfa* ont dévoilé que le niveau du transcrit de ce gène est plus élevé dans le côlon des deux modèles murins ayant reçu la diète de base CC et induits par AOM/DSS en comparaison à leurs contrôles injectés avec le salin. Cependant, aucune variation significative du niveau d'expression de ce gène n'a été remarquée entre les souris déficientes en vD $_3$ et celles supplémentées dans nos deux modèles murins. Des résultats controversés ont été également rapportés concernant l'action suppressive de la vD sur la production de TNF- α . Il a été suggéré que l'effet d'un traitement avec 1,25(OH) $_2$ D $_3$ sur l'expression et la production de TNF- α variait en fonction du type de lignée cellulaire et de l'état de différenciation de ces cellules (193). Les analyses génétiques utilisant «Nuclear run-off analysis» (méthode consistant à déterminer quel gène dans une population cellulaire est

exprimé à un temps donné) avaient révélé que la transcription de TNF- α n'est pas affectée directement par 1,25(OH) $_2$ D $_3$. Par ailleurs, le traitement des monocytes sanguins humains par 1,25(OH) $_2$ D $_3$ inhibait la production de plusieurs cytokines pro-inflammatoires y compris le TNF- α au niveau post transcriptionnel (194). Il est intéressant de rappeler que la stimulation des cellules immunitaires par les ligands de NOD2 aboutit à une sécrétion moindre au niveau de cytokines et que la costimulation des récepteurs NOD2 et TLR4 avait un effet de synergie pour l'induction de la production de plusieurs cytokines, incluant TNF- α (77, 81, 92). Ainsi, nous pensons que les résultats obtenus concernant l'expression de cette cytokine, surtout au niveau des souris Nod2 $^{-/-}$, sont possiblement liés à la non-fonction de NOD2 chez ces rongeurs.

L'IL-1 β est un autre facteur inflammatoire fortement impliqué dans plusieurs désordres gastro-intestinaux associés à l'inflammation. Le taux élevé de cette cytokine est également observé chez les patients avec les MII. L'IL-1 β fait partie de la superfamille d'IL-1 qui compte plusieurs membres, les plus étudiés étant l'IL-1 α et l'IL-1 β . Ils sont principalement produits par les macrophages de la muqueuse durant la survenue de l'inflammation et ils agissent sur les cellules épithéliales intestinales via le même récepteur; IL-1R (195, 196). L'IL-1 β est aussi connue comme un facteur important pour la perméabilité et le maintien de l'homéostasie intestinale via sa participation à la régulation des jonctions serrées des cellules épithéliales (197). Dans cette étude, nous avons testé l'impact d'une supplémentation en vD $_3$ sur le niveau d'expression de l'IL-1 β dans l'épithélium colique des deux modèles murins. Aucune différence significative n'a été notée dans les souris Nod2 $^{-/-}$, alors que chez les souris C57BL/6J, la supplémentation en vD $_3$ avait étonnamment induit une surexpression de cette cytokine. Plusieurs études ont soutenu que certains membres appartenant au système d'IL-1 possédaient des fonctions opposées durant la manifestation des MII et durant la cancérogenèse du CCR associée à l'inflammation. De plus, ces fonctions dépendent d'une

part de l'état inflammatoire et de sa localisation et d'autre part, de la phase de la maladie. Il a été démontré que chez les souris ayant une inflammation intestinale, l'augmentation de l'IL-1 β améliorait de manière significative la sévérité de la colite. De même, l'injection de ces souris avec l'IL-1 β recombinante produisait le même changement au niveau de la colite (195). De surcroît, le traitement des macrophages humains avec 1,25(OH) $_2$ D $_3$ régulaait de manière positive l'IL-1 β durant l'inflammation induite par un agent infectieux (198). D'autres études révèlent que l'administration de DSS active l'inflammasome NLRP3 et augmente la libération de l'IL-1 β , comme réponse au stress cellulaire provoqué par le DSS (199). En plus, des travaux antérieurs ont évoqué la possibilité d'une interaction entre l'inflammasome NLRP3 et la voie de signalisation de NOD2 pour l'activation de NF- κ B et la transcription, la production et la sécrétion de l'IL-1 β (98).

L'IL-6 fait aussi partie du réseau de cytokines inflammatoires jouant un rôle important dans l'initiation de l'inflammation ainsi que dans sa chronicité. Les analyses sanguines et les prélèvements des biopsies de la muqueuse intestinale des patients atteints de MII montrent un niveau élevé de cette cytokine chez ces individus. Pareillement, des niveaux élevés de l'IL-6 ont été détectés chez les patients ayant le CCR. Produite par les macrophages et les cellules dendritiques, l'IL-6 contrôle la transition de la réponse immunitaire entre le système inné et le système adaptatif (81, 200). Dans cette étude, nos résultats de RT-PCR quantitative du gène *Il6* montrent une augmentation de l'expression relative de ce gène dans le côlon des deux modèles de souris avec un CAC comparativement avec leurs contrôles (salin). Ces résultats sont en accord avec nos prédictions et concordent également avec les autres travaux (139, 201). De même, la supplémentation en vD $_3$ avait diminué le niveau de l'expression de l'IL-6 dans les deux modèles de souris. En plus, les données sur l'expression relative de l'IL-6 nous amènent à penser que le niveau élevé d'expression de cette cytokine peut avoir un effet sur la

régulation de CYP24 et sur le profil d'expression obtenu dans le côlon des deux modèles de souris. Certes, il a été démontré que le co-traitement d'une lignée cellulaire cancéreuse avec $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ et l'IL-6 pour une longue période (24 heures) diminuait le niveau d'expression de CYP24 (176).

4. Conclusion et perspectives

L'inflammation chronique est fortement associée à la pathophysiologie des MII et elle prédispose à la dysplasie et au développement de CCR. Les polymorphismes dans NOD2 sont liés aux multiples dérégulations au niveau de l'expression et de la production des cytokines pro-inflammatoires, ainsi qu'à la perturbation de l'homéostasie intestinale. La vD régule ces cytokines et contribue au maintien de l'intégrité de la barrière intestinale et la prévention contre les lésions cellulaires précancéreuses. Dans le but d'évaluer l'effet préventif d'une supplémentation en vD₃ sur la sévérité de la colite chronique et sur le développement du CAC, nous avons utilisé un modèle murin de cancérogenèse colique induite par AOM et DSS. Par la suite, dans le but de vérifier si l'effet préventif de la vD₃ est médié par NOD2, nous avons utilisé des souris *Nod2*^{-/-}, comme un autre modèle murin de CAC. Les résultats obtenus dans cette étude démontrent qu'une supplémentation en vD₃ peut aider à prévenir le cancer associé à l'inflammation chez les souris C57BL/6J comme chez les souris *Nod2*^{-/-}. Ainsi, l'effet préventif procuré par la vD₃ ne dépend pas de NOD2. Les données obtenues relatives aux scores cliniques et histologiques ainsi qu'aux nombres de tumeurs montrent une amélioration de ces manifestations chez les deux modèles de souris supplémentées en vD₃. Le profil d'expression des cytokines inflammatoires au niveau du côlon de ces souris ne révélait pas de différences statistiquement significatives entre les groupes déficients ou non en vD₃, à l'exception des

gènes *Ilf6* et *Cox2*. La supplémentation en vD_3 avait diminué le niveau de l'expression de *Cox2* uniquement dans les souris C57BL/6J, alors qu'elle avait réduit le niveau de *Ilf6* dans les deux modèles de souris. De ce fait, l'effet préventif de la vD_3 était aussi observé dans les souris *Nod2*^{-/-}, suggérant que l'action préventive de la vD dans le développement du CAC n'est pas médiée uniquement par la présence de NOD2 et que d'autres mécanismes pourraient être sollicités dans ce modèle de souris. Ainsi, dans des études futures, il serait éventuellement intéressant d'élucider ces mécanismes dans les souris *Nod2*^{-/-} en vérifiant l'impact d'une supplémentation en vD_3 sur le niveau d'expression des autres récepteurs, tels que NOD1 et TLR2, et aussi sur leurs effecteurs. Étant donné le rôle important des cytokines inflammatoires dans l'initiation et la progression tumorales du CAC, il serait aussi favorable de vérifier l'effet de la vD sur le profil de l'expression de ces cytokines directement dans les tumeurs colorectales des souris. Sachant que certaines études ont soulevé le phénomène temps-dépendant de l'action régulatrice de la vD sur les médiateurs de l'inflammation, il serait également pertinent de mesurer l'évolution de l'effet de la vD sur ces médiateurs à différentes phases de la carcinogenèse du CAC.

Plusieurs variables peuvent expliquer les disparités entre les résultats obtenus et les données de la littérature. Les variables associées aux modèles murins de CAC induit chimiquement par AOM/DSS sont les plus importantes. Le fond génétique, le sexe des souris ainsi que le microbiote, qui est modulé par le type de diètes administrées et par le type d'hébergement (conventionnel ou aseptique), sont des facteurs qui peuvent influencer la sensibilité et la susceptibilité des souris aux divers traitements et modifier leur réponse physiologique et ses paramètres mesurables. De plus, les concentrations de DSS et la durée de son administration ainsi que la nature d'eau utilisée (distillée ou stérile) pour dissoudre le DSS peuvent aussi justifier les disparités entre nos données et celles rapportées antérieurement.

Malgré la discordance de quelques résultats avec ceux rapportés par la littérature, les autres données obtenues dans cette étude sont prometteuses et elles permettent de supporter le rôle préventif potentiel de la vitamine D contre le cancer associé à l'inflammation.

Bibliographie

1. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*. 2013;49(6):1374-403.
2. Brenner H, Kloor M, Pox CP. Colorectal cancer. *Lancet*. 2014;383(9927):1490-502.
3. Taylor DP, Burt RW, Williams MS, Haug PJ, Cannon-Albright LA. Population-based family history-specific risks for colorectal cancer: a constellation approach. *Gastroenterology*. 2010;138(3):877-85.
4. Cunningham D, Atkin W, Lenz HJ, Lynch HT, Minsky B, Nordlinger B, et al. Colorectal cancer. *Lancet*. 2010;375(9719):1030-47.
5. Terzic J, Grivennikov S, Karin E, Karin M. Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology*. 2010;138(6):2101-14 e5.
6. Ma Y, Yang Y, Wang F, Zhang P, Shi C, Zou Y, et al. Obesity and risk of colorectal cancer: a systematic review of prospective studies. *PLoS One*. 2013;8(1):e53916.
7. Jiang Y, Ben Q, Shen H, Lu W, Zhang Y, Zhu J. Diabetes mellitus and incidence and mortality of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Eur J Epidemiol*. 2011;26(11):863-76.
8. 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.
9. Boyle T, Keegel T, Bull F, Heyworth J, Fritschi L. Physical activity and risks of proximal and distal colon cancers: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*. 2012;104(20):1548-61.
10. Norat T, Scoccianti C, Boutron-Ruault MC, Anderson A, Berrino F, Cecchini M, et al. European Code against Cancer 4th Edition: Diet and cancer. *Cancer Epidemiol*. 2015;39 Suppl 1:S56-66.
11. Aune D, Chan DS, Lau R, Vieira R, Greenwood DC, Kampman E, et al. Dietary fibre, whole grains, and risk of colorectal cancer: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *BMJ*. 2011;343:d6617.
12. Han C, Shin A, Lee J, Lee J, Park JW, Oh JH, et al. Dietary calcium intake and the risk of colorectal cancer: a case control study. *BMC Cancer*. 2015;15(1):966.
13. van Harten-Gerritsen AS, Balvers MG, Witkamp RF, Kampman E, van Duijnhoven FJ. Vitamin D, Inflammation, and Colorectal Cancer Progression: A Review of Mechanistic Studies and Future Directions for Epidemiological Studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2015;24(12):1820-8.
14. Ma Y, Zhang P, Wang F, Yang J, Liu Z, Qin H. Association between vitamin D and risk of colorectal cancer: a systematic review of prospective studies. *J Clin Oncol*. 2011;29(28):3775-82.
15. Bishehsari F, Mahdavinia M, Vacca M, Malekzadeh R, Mariani-Costantini R. Epidemiological transition of colorectal cancer in developing countries: environmental

factors, molecular pathways, and opportunities for prevention. *World J Gastroenterol.* 2014;20(20):6055-72.

16. Lakatos PL, Kiss LS, Miheller P. Nutritional influences in selected gastrointestinal diseases. *Digestive diseases (Basel, Switzerland).* 2011;29(2):154-65.

17. Maccaroni E, Bracci R, Giampieri R, Bianchi F, Belvederesi L, Brugiati C, et al. Prognostic impact of mismatch repair genes germline defects in colorectal cancer patients: are all mutations equal? *Oncotarget.* 2015;6(36):38737-48.

18. Fearon ER. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annual review of pathology.* 2011;6:479-507.

19. Rennoll S, Yochum G. Regulation of MYC gene expression by aberrant Wnt/beta-catenin signaling in colorectal cancer. *World journal of biological chemistry.* 2015;6(4):290-300.

20. Brosens LA, Offerhaus GJ, Giardiello FM. Hereditary Colorectal Cancer: Genetics and Screening. *The Surgical clinics of North America.* 2015;95(5):1067-80.

21. Carethers JM, Jung BH. Genetics and Genetic Biomarkers in Sporadic Colorectal Cancer. *Gastroenterology.* 2015;149(5):1177-90.e3.

22. 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.

23. Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2009;361(25):2449-60.

24. Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology.* 2007;50(1):113-30.

25. Imai K, Yamamoto H. Carcinogenesis and microsatellite instability: the interrelationship between genetics and epigenetics. *Carcinogenesis.* 2008;29(4):673-80.

26. Gemoll T, Auer G, Ried T, Habermann JK. Genetic Instability and Disease Prognostication. *Recent Results Cancer Res.* 2015;200:81-94.

27. Grady WM, Carethers JM. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology.* 2008;135(4):1079-99.

28. Vogelstein B, Fearon ER, Kern SE, Hamilton SR, Preisinger AC, Nakamura Y, et al. Allelotype of colorectal carcinomas. *Science.* 1989;244(4901):207-11.

29. Beerewinkel N, Antal T, Dingli D, Traulsen A, Kinzler KW, Velculescu VE, et al. Genetic progression and the waiting time to cancer. *PLoS computational biology.* 2007;3(11):e225.

30. Worthley DL, Whitehall VL, Spring KJ, Leggett BA. Colorectal carcinogenesis: road maps to cancer. *World J Gastroenterol.* 2007;13(28):3784-91.

31. Kambara T, Sharp GB, Nagasaka T, Takeda M, Sasamoto H, Nakagawa H, et al. Allelic loss of a common microsatellite marker MYCL1: a useful prognostic factor of poor outcomes in colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2004;10(5):1758-63.

32. Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, et al. Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science.* 1995;268(5215):1336-8.

33. Yagi OK, Akiyama Y, Nomizu T, Iwama T, Endo M, Yuasa Y. Proapoptotic gene BAX is frequently mutated in hereditary nonpolyposis colorectal cancers but not in adenomas. *Gastroenterology.* 1998;114(2):268-74.

34. Rashid A, Shen L, Morris JS, Issa JP, Hamilton SR. CpG island methylation in colorectal adenomas. *Am J Pathol.* 2001;159(3):1129-35.
35. Petko Z, Ghiassi M, Shuber A, Gorham J, Smalley W, Washington MK, et al. Aberrantly methylated CDKN2A, MGMT, and MLH1 in colon polyps and in fecal DNA from patients with colorectal polyps. *Clin Cancer Res.* 2005;11(3):1203-9.
36. Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis.* 2009;30(7):1073-81.
37. Klampfer L. Cytokines, inflammation and colon cancer. *Curr Cancer Drug Targets.* 2011;11(4):451-64.
38. Schetter AJ, Heegaard NH, Harris CC. Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways. *Carcinogenesis.* 2010;31(1):37-49.
39. Friis S, Riis AH, Erichsen R, Baron JA, Sorensen HT. Low-Dose Aspirin or Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug Use and Colorectal Cancer Risk: A Population-Based, Case-Control Study. *Ann Intern Med.* 2015;163(5):347-55.
40. Oshima M, Taketo MM. COX selectivity and animal models for colon cancer. *Curr Pharm Des.* 2002;8(12):1021-34.
41. Rajput S, Wilber A. Roles of inflammation in cancer initiation, progression, and metastasis. *Frontiers in bioscience (Scholar edition).* 2010;2:176-83.
42. Shalapour S, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer: an eternal fight between good and evil. *J Clin Invest.* 2015;125(9):3347-55.
43. Kelsall BL. Innate and adaptive mechanisms to control [corrected] pathological intestinal inflammation. *J Pathol.* 2008;214(2):242-59.
44. Van Der Kraak L, Gros P, Beauchemin N. Colitis-associated colon cancer: Is it in your genes? *World J Gastroenterol.* 2015;21(41):11688-99.
45. Yashiro M. Molecular Alterations of Colorectal Cancer with Inflammatory Bowel Disease. *Dig Dis Sci.* 2015;60(8):2251-63.
46. Danese S, Mantovani A. Inflammatory bowel disease and intestinal cancer: a paradigm of the Yin-Yang interplay between inflammation and cancer. *Oncogene.* 2010;29(23):3313-23.
47. Shigaki K, Mitomi H, Fujimori T, Ichikawa K, Tomita S, Imura J, et al. Immunohistochemical analysis of chromogranin A and p53 expressions in ulcerative colitis-associated neoplasia: neuroendocrine differentiation as an early event in the colitis-neoplasia sequence. *Hum Pathol.* 2013;44(11):2393-9.
48. Fujiwara I, Yashiro M, Kubo N, Maeda K, Hirakawa K. Ulcerative colitis-associated colorectal cancer is frequently associated with the microsatellite instability pathway. *Dis Colon Rectum.* 2008;51(9):1387-94.
49. Aust DE, Terdiman JP, Willenbacher RF, Chew K, Ferrell L, Florendo C, et al. Altered distribution of beta-catenin, and its binding proteins E-cadherin and APC, in ulcerative colitis-related colorectal cancers. *Mod Pathol.* 2001;14(1):29-39.
50. Foersch S, Neurath MF. Colitis-associated neoplasia: molecular basis and clinical translation. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71(18):3523-35.
51. Svrcek M, El-Murr N, Wanherdrick K, Dumont S, Beaugerie L, Cosnes J, et al. Overexpression of microRNAs-155 and 21 targeting mismatch repair proteins in inflammatory bowel diseases. *Carcinogenesis.* 2013;34(4):828-34.

52. Becker C, Fantini MC, Schramm C, Lehr HA, Wirtz S, Nikolaev A, et al. TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling. *Immunity*. 2004;21(4):491-501.
53. Grivennikov S, Karin E, Terzic J, Mucida D, Yu GY, Vallabhapurapu S, et al. IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell*. 2009;15(2):103-13.
54. Kim YJ, Hong KS, Chung JW, Kim JH, Hahm KB. Prevention of colitis-associated carcinogenesis with infliximab. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2010;3(10):1314-33.
55. Popivanova BK, Kitamura K, Wu Y, Kondo T, Kagaya T, Kaneko S, et al. Blocking TNF-alpha in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis. *J Clin Invest*. 2008;118(2):560-70.
56. Berg DJ, Davidson N, Kuhn R, Muller W, Menon S, Holland G, et al. Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1-like responses. *J Clin Invest*. 1996;98(4):1010-20.
57. Uronis JM, Muhlbauer M, Herfarth HH, Rubinas TC, Jones GS, Jobin C. Modulation of the intestinal microbiota alters colitis-associated colorectal cancer susceptibility. *PLoS One*. 2009;4(6):e6026.
58. Cario E, Gerken G, Podolsky DK. Toll-like receptor 2 controls mucosal inflammation by regulating epithelial barrier function. *Gastroenterology*. 2007;132(4):1359-74.
59. Murata M, Kawanishi S. Oxidative DNA damage induced by nitrotyrosine, a biomarker of inflammation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;316(1):123-8.
60. Ullman TA, Itzkowitz SH. Intestinal inflammation and cancer. *Gastroenterology*. 2011;140(6):1807-16.
61. Maddocks OD, Short AJ, Donnenberg MS, Bader S, Harrison DJ. Attaching and effacing *Escherichia coli* downregulate DNA mismatch repair protein in vitro and are associated with colorectal adenocarcinomas in humans. *PLoS One*. 2009;4(5):e5517.
62. Goodwin DC, Landino LM, Marnett LJ. Effects of nitric oxide and nitric oxide-derived species on prostaglandin endoperoxide synthase and prostaglandin biosynthesis. *FASEB J*. 1999;13(10):1121-36.
63. Mei JM, Hord NG, Winterstein DF, Donald SP, Phang JM. Expression of prostaglandin endoperoxide H synthase-2 induced by nitric oxide in conditionally immortalized murine colonic epithelial cells. *FASEB J*. 2000;14(9):1188-201.
64. Wang D, Wang H, Brown J, Daikoku T, Ning W, Shi Q, et al. CXCL1 induced by prostaglandin E2 promotes angiogenesis in colorectal cancer. *J Exp Med*. 2006;203(4):941-51.
65. Doi K, Akaike T, Horie H, Noguchi Y, Fujii S, Beppu T, et al. Excessive production of nitric oxide in rat solid tumor and its implication in rapid tumor growth. *Cancer*. 1996;77(8 Suppl):1598-604.
66. Chang CS, Chen WN, Lin HH, Wu CC, Wang CJ. Increased oxidative DNA damage, inducible nitric oxide synthase, nuclear factor kappaB expression and enhanced antiapoptosis-related proteins in *Helicobacter pylori*-infected non-cardiac gastric adenocarcinoma. *World J Gastroenterol*. 2004;10(15):2232-40.
67. Ahn B, Ohshima H. Suppression of intestinal polyposis in *Apc*(Min/+) mice by inhibiting nitric oxide production. *Cancer Res*. 2001;61(23):8357-60.

68. Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, Oshima H, Hancock B, Kwong E, et al. Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell*. 1996;87(5):803-9.
69. Irrazabal T, Belcheva A, Girardin SE, Martin A, Philpott DJ. The multifaceted role of the intestinal microbiota in colon cancer. *Mol Cell*. 2014;54(2):309-20.
70. Gagniere J, Raisch J, Veziat J, Barnich N, Bonnet R, Buc E, et al. Gut microbiota imbalance and colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2016;22(2):501-18.
71. O'Keefe SJ, Ou J, Aufreiter S, O'Connor D, Sharma S, Sepulveda J, et al. Products of the colonic microbiota mediate the effects of diet on colon cancer risk. *J Nutr*. 2009;139(11):2044-8.
72. Rowland IR. The role of the gastrointestinal microbiota in colorectal cancer. *Curr Pharm Des*. 2009;15(13):1524-7.
73. Asquith M, Powrie F. An innately dangerous balancing act: intestinal homeostasis, inflammation, and colitis-associated cancer. *J Exp Med*. 2010;207(8):1573-7.
74. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 2010;140(6):805-20.
75. Yang L, Pei Z. Bacteria, inflammation, and colon cancer. *World J Gastroenterol*. 2006;12(42):6741-6.
76. Fukata M, Arditi M. The role of pattern recognition receptors in intestinal inflammation. *Mucosal Immunol*. 2013;6(3):451-63.
77. Castano-Rodriguez N, Kaakoush NO, Mitchell HM. Pattern-recognition receptors and gastric cancer. *Front Immunol*. 2014;5:336.
78. Mukherjee S, Karmakar S, Babu SP. TLR2 and TLR4 mediated host immune responses in major infectious diseases: a review. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*. 2016.
79. Rakoff-Nahoum S, Medzhitov R. Regulation of spontaneous intestinal tumorigenesis through the adaptor protein MyD88. *Science*. 2007;317(5834):124-7.
80. Fukata M, Chen A, Klepper A, Krishnareddy S, Vamadevan AS, Thomas LS, et al. Cox-2 is regulated by Toll-like receptor-4 (TLR4) signaling: Role in proliferation and apoptosis in the intestine. *Gastroenterology*. 2006;131(3):862-77.
81. Omrane I, Benammar-Elgaaied A. The immune microenvironment of the colorectal tumor: Involvement of immunity genes and microRNAs belonging to the TH17 pathway. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1856(1):28-38.
82. Lowe EL, Crother TR, Rabizadeh S, Hu B, Wang H, Chen S, et al. Toll-like receptor 2 signaling protects mice from tumor development in a mouse model of colitis-induced cancer. *PLoS One*. 2010;5(9):e13027.
83. Fukata M, Hernandez Y, Conduah D, Cohen J, Chen A, Breglio K, et al. Innate immune signaling by Toll-like receptor-4 (TLR4) shapes the inflammatory microenvironment in colitis-associated tumors. *Inflamm Bowel Dis*. 2009;15(7):997-1006.
84. Fukata M, Shang L, Santaolalla R, Sotolongo J, Pastorini C, Espana C, et al. Constitutive activation of epithelial TLR4 augments inflammatory responses to mucosal injury and drives colitis-associated tumorigenesis. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17(7):1464-73.

85. Khor B, Gardet A, Xavier RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2011;474(7351):307-17.
86. Slattery ML, Herrick JS, Bondurant KL, Wolff RK. Toll-like receptor genes and their association with colon and rectal cancer development and prognosis. *Int J Cancer*. 2012;130(12):2974-80.
87. Boraska Jelavic T, Barisic M, Drmic Hofman I, Boraska V, Vrdoljak E, Peruzovic M, et al. Microsatellite GT polymorphism in the toll-like receptor 2 is associated with colorectal cancer. *Clin Genet*. 2006;70(2):156-60.
88. Hong J, Leung E, Fraser AG, Merriman TR, Vishnu P, Krissansen GW. TLR2, TLR4 and TLR9 polymorphisms and Crohn's disease in a New Zealand Caucasian cohort. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2007;22(11):1760-6.
89. Pierik M, Joossens S, Van Steen K, Van Schuerbeek N, Vlietinck R, Rutgeerts P, et al. Toll-like receptor-1, -2, and -6 polymorphisms influence disease extension in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis*. 2006;12(1):1-8.
90. Fritz JH, Girardin SE, Fitting C, Werts C, Mengin-Lecreulx D, Caroff M, et al. Synergistic stimulation of human monocytes and dendritic cells by Toll-like receptor 4 and NOD1- and NOD2-activating agonists. *Eur J Immunol*. 2005;35(8):2459-70.
91. Kim H, Zhao Q, Zheng H, Li X, Zhang T, Ma X. A novel crosstalk between TLR4- and NOD2-mediated signaling in the regulation of intestinal inflammation. *Sci Rep*. 2015;5:12018.
92. Tsai WH, Huang DY, Yu YH, Chen CY, Lin WW. Dual roles of NOD2 in TLR4-mediated signal transduction and -induced inflammatory gene expression in macrophages. *Cell Microbiol*. 2011;13(5):717-30.
93. Martinon F, Tschopp J. NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. *Trends Immunol*. 2005;26(8):447-54.
94. Kutikhin AG. Role of NOD1/CARD4 and NOD2/CARD15 gene polymorphisms in cancer etiology. *Hum Immunol*. 2011;72(10):955-68.
95. Caruso R, Warner N, Inohara N, Nunez G. NOD1 and NOD2: signaling, host defense, and inflammatory disease. *Immunity*. 2014;41(6):898-908.
96. Corridoni D, Arseneau KO, Cifone MG, Cominelli F. The dual role of nod-like receptors in mucosal innate immunity and chronic intestinal inflammation. *Front Immunol*. 2014;5:317.
97. Corridoni D, Arseneau KO, Cominelli F. Functional defects in NOD2 signaling in experimental and human Crohn disease. *Gut Microbes*. 2014;5(3):340-4.
98. Ferrero-Miliani L, Nielsen OH, Andersen PS, Girardin SE. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1beta generation. *Clin Exp Immunol*. 2007;147(2):227-35.
99. Lesage S, Zouali H, Cezard JP, Colombel JF, Belaiche J, Almer S, et al. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet*. 2002;70(4):845-57.
100. Strober W, Murray PJ, Kitani A, Watanabe T. Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nature reviews Immunology*. 2006;6(1):9-20.
101. Saxena M, Yeretssian G. NOD-Like Receptors: Master Regulators of Inflammation and Cancer. *Front Immunol*. 2014;5:327.

102. Philpott DJ, Sorbara MT, Robertson SJ, Croitoru K, Girardin SE. NOD proteins: regulators of inflammation in health and disease. *Nature reviews Immunology*. 2014;14(1):9-23.
103. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001;411(6837):599-603.
104. Cuffari C. The genetics of inflammatory bowel disease: diagnostic and therapeutic implications. *World journal of pediatrics : WJP*. 2010;6(3):203-9.
105. Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y, Henegariu O, Inohara N, Nunez G, et al. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science*. 2005;307(5710):731-4.
106. Maeda S, Hsu LC, Liu H, Bankston LA, Iimura M, Kagnoff MF, et al. Nod2 mutation in Crohn's disease potentiates NF-kappaB activity and IL-1beta processing. *Science*. 2005;307(5710):734-8.
107. Watanabe T, Kitani A, Murray PJ, Wakatsuki Y, Fuss IJ, Strober W. Nucleotide binding oligomerization domain 2 deficiency leads to dysregulated TLR2 signaling and induction of antigen-specific colitis. *Immunity*. 2006;25(3):473-85.
108. Tian Y, Li Y, Hu Z, Wang D, Sun X, Ren C. Differential effects of NOD2 polymorphisms on colorectal cancer risk: a meta-analysis. *Int J Colorectal Dis*. 2010;25(2):161-8.
109. Couturier-Maillard A, Secher T, Rehman A, Normand S, De Arcangelis A, Haesler R, et al. NOD2-mediated dysbiosis predisposes mice to transmissible colitis and colorectal cancer. *J Clin Invest*. 2013;123(2):700-11.
110. Papaconstantinou I, Theodoropoulos G, Gazouli M, Panoussopoulos D, Mantzaris GJ, Felekouras E, et al. Association between mutations in the CARD15/NOD2 gene and colorectal cancer in a Greek population. *Int J Cancer*. 2005;114(3):433-5.
111. Kurzawski G, Suchy J, Kladny J, Grabowska E, Mierzejewski M, Jakubowska A, et al. The NOD2 3020insC mutation and the risk of colorectal cancer. *Cancer Res*. 2004;64(5):1604-6.
112. Hnatyszyn A, Szalata M, Stanczyk J, Cichy W, Slomski R. Association of c.802C>T polymorphism of NOD2/CARD15 gene with the chronic gastritis and predisposition to cancer in *H. pylori* infected patients. *Experimental and molecular pathology*. 2010;88(3):388-93.
113. Vipperla K, O'Keefe SJ. Diet, microbiota, and dysbiosis: a 'recipe' for colorectal cancer. *Food Funct*. 2016.
114. Denou E, Lolmede K, Garidou L, Pomie C, Chabo C, Lau TC, et al. Defective NOD2 peptidoglycan sensing promotes diet-induced inflammation, dysbiosis, and insulin resistance. *EMBO molecular medicine*. 2015;7(3):259-74.
115. Lagishetty V, Misharin AV, Liu NQ, Lisse TS, Chun RF, Ouyang Y, et al. Vitamin D deficiency in mice impairs colonic antibacterial activity and predisposes to colitis. *Endocrinology*. 2010;151(6):2423-32.
116. Wang TT, Dabbas B, Laperriere D, Bitton AJ, Soualhine H, Tavera-Mendoza LE, et al. Direct and indirect induction by 1,25-dihydroxyvitamin D3 of the NOD2/CARD15-defensin beta2 innate immune pathway defective in Crohn disease. *J Biol Chem*. 2010;285(4):2227-31.

117. Leung CH, Lam W, Ma DL, Gullen EA, Cheng YC. Butyrate mediates nucleotide-binding and oligomerisation domain (NOD) 2-dependent mucosal immune responses against peptidoglycan. *Eur J Immunol*. 2009;39(12):3529-37.
118. Owczarek D, Rodacki T, Domagala-Rodacka R, Cibor D, Mach T. Diet and nutritional factors in inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol*. 2016;22(3):895-905.
119. Pericleous M, Mandair D, Caplin ME. Diet and supplements and their impact on colorectal cancer. *J Gastrointest Oncol*. 2013;4(4):409-23.
120. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med*. 2007;357(3):266-81.
121. Diaz L, Diaz-Munoz M, Garcia-Gaytan AC, Mendez I. Mechanistic Effects of Calcitriol in Cancer Biology. *Nutrients*. 2015;7(6):5020-50.
122. Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R, Fear N, Price A, Carpenter L, et al. Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut*. 1996;39(5):690-7.
123. Bernstein CN, Blanchard JF, Rawsthorne P, Wajda A. Epidemiology of Crohn's disease and ulcerative colitis in a central Canadian province: a population-based study. *Am J Epidemiol*. 1999;149(10):916-24.
124. Bernstein CN, Wajda A, Svenson LW, MacKenzie A, Koehoorn M, Jackson M, et al. The epidemiology of inflammatory bowel disease in Canada: a population-based study. *The American journal of gastroenterology*. 2006;101(7):1559-68.
125. Holick MF, Chen TC, Lu Z, Sauter E. Vitamin D and skin physiology: a D-lightful story. *J Bone Miner Res*. 2007;22 Suppl 2:V28-33.
126. Christakos S, Ajibade DV, Dhawan P, Fechner AJ, Mady LJ. Vitamin D: metabolism. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2010;39(2):243-53, table of contents.
127. Holick MF. Vitamin D: A millenium perspective. *Journal of cellular biochemistry*. 2003;88(2):296-307.
128. Le Goff C, Souberbielle JC, Delvin E, Cavalier E. [Vitamin D measurement: pre-analytical and analytical considerations]. *Annales de biologie clinique*. 2015;73(1):79-92.
129. Szymczak I, Pawliczak R. The Active Metabolite of Vitamin D3 as a Potential Immunomodulator. *Scandinavian journal of immunology*. 2016;83(2):83-91.
130. Tagliabue E, Raimondi S, Gandini S. Vitamin D, Cancer Risk, and Mortality. *Adv Food Nutr Res*. 2015;75:1-52.
131. Norman AW. From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. *Am J Clin Nutr*. 2008;88(2):491s-9s.
132. Wang TT, Nestel FP, Bourdeau V, Nagai Y, Wang Q, Liao J, et al. Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D3 is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. *J Immunol*. 2004;173(5):2909-12.
133. Liu PT, Stenger S, Li H, Wenzel L, Tan BH, Krutzik SR, et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science*. 2006;311(5768):1770-3.
134. Cross HS, Nittke T, Kallay E. Colonic vitamin D metabolism: implications for the pathogenesis of inflammatory bowel disease and colorectal cancer. *Mol Cell Endocrinol*. 2011;347(1-2):70-9.

135. Hewison M. Vitamin D and the intracrinology of innate immunity. *Mol Cell Endocrinol.* 2010;321(2):103-11.
136. Peelen E, Knippenberg S, Muris AH, Thewissen M, Smolders J, Tervaert JW, et al. Effects of vitamin D on the peripheral adaptive immune system: a review. *Autoimmun Rev.* 2011;10(12):733-43.
137. van Halteren AG, van Etten E, de Jong EC, Bouillon R, Roep BO, Mathieu C. Redirection of human autoreactive T-cells Upon interaction with dendritic cells modulated by TX527, an analog of 1,25 dihydroxyvitamin D(3). *Diabetes.* 2002;51(7):2119-25.
138. Lang PO, Samaras N, Samaras D, Aspinall R. How important is vitamin D in preventing infections? *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA.* 2013;24(5):1537-53.
139. Daniel C, Sartory NA, Zahn N, Radeke HH, Stein JM. Immune modulatory treatment of trinitrobenzene sulfonic acid colitis with calcitriol is associated with a change of a T helper (Th) 1/Th17 to a Th2 and regulatory T cell profile. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008;324(1):23-33.
140. Catana CS, Berindan Neagoe I, Cozma V, Magdas C, Tabaran F, Dumitrascu DL. Contribution of the IL-17/IL-23 axis to the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2015;21(19):5823-30.
141. Housseau F, Wu S, Wick EC, Fan H, Wu X, Llosa NJ, et al. Redundant innate and adaptive sources of IL-17 production drive colon tumorigenesis. *Cancer Res.* 2016.
142. Lameris AL, Huybers S, Kaukinen K, Makela TH, Bindels RJ, Hoenderop JG, et al. Expression profiling of claudins in the human gastrointestinal tract in health and during inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol.* 2013;48(1):58-69.
143. John LJ, Fromm M, Schulzke JD. Epithelial barriers in intestinal inflammation. *Antioxidants & redox signaling.* 2011;15(5):1255-70.
144. Assa A, Vong L, Pinnell LJ, Avitzur N, Johnson-Henry KC, Sherman PM. Vitamin D deficiency promotes epithelial barrier dysfunction and intestinal inflammation. *J Infect Dis.* 2014;210(8):1296-305.
145. Kong J, Zhang Z, Musch MW, Ning G, Sun J, Hart J, et al. Novel role of the vitamin D receptor in maintaining the integrity of the intestinal mucosal barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2008;294(1):G208-16.
146. Liu W, Chen Y, Golan MA, Annunziata ML, Du J, Dougherty U, et al. Intestinal epithelial vitamin D receptor signaling inhibits experimental colitis. *J Clin Invest.* 2013;123(9):3983-96.
147. Feskanich D, Ma J, Fuchs CS, Kirkner GJ, Hankinson SE, Hollis BW, et al. Plasma vitamin D metabolites and risk of colorectal cancer in women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004;13(9):1502-8.
148. Jacobs ET, Hibler EA, Lance P, Sardo CL, Jurutka PW. Association between circulating concentrations of 25(OH)D and colorectal adenoma: a pooled analysis. *Int J Cancer.* 2013;133(12):2980-8.
149. Gandini S, Boniol M, Haukka J, Byrnes G, Cox B, Sneyd MJ, et al. Meta-analysis of observational studies of serum 25-hydroxyvitamin D levels and colorectal, breast and prostate cancer and colorectal adenoma. *Int J Cancer.* 2011;128(6):1414-24.

150. Freedman DM, Looker AC, Chang SC, Graubard BI. Prospective study of serum vitamin D and cancer mortality in the United States. *J Natl Cancer Inst.* 2007;99(21):1594-602.
151. Printz C. High vitamin D levels increase survival rates in patients with metastatic colorectal cancer. *Cancer.* 2015;121(13):2105.
152. Klampfer L. Vitamin D and colon cancer. *World J Gastrointest Oncol.* 2014;6(11):430-7.
153. Newmark HL, Yang K, Kurihara N, Fan K, Augenlicht LH, Lipkin M. Western-style diet-induced colonic tumors and their modulation by calcium and vitamin D in C57Bl/6 mice: a preclinical model for human sporadic colon cancer. *Carcinogenesis.* 2009;30(1):88-92.
154. Fichera A, Little N, Dougherty U, Mustafi R, Cerda S, Li YC, et al. A vitamin D analogue inhibits colonic carcinogenesis in the AOM/DSS model. *J Surg Res.* 2007;142(2):239-45.
155. Murillo G, Nagpal V, Tiwari N, Benya RV, Mehta RG. Actions of vitamin D are mediated by the TLR4 pathway in inflammation-induced colon cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010;121(1-2):403-7.
156. Salehi-Tabar R, Nguyen-Yamamoto L, Tavera-Mendoza LE, Quail T, Dimitrov V, An BS, et al. Vitamin D receptor as a master regulator of the c-MYC/MXD1 network. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(46):18827-32.
157. Palmer HG, Gonzalez-Sancho JM, Espada J, Berciano MT, Puig I, Baulida J, et al. Vitamin D(3) promotes the differentiation of colon carcinoma cells by the induction of E-cadherin and the inhibition of beta-catenin signaling. *J Cell Biol.* 2001;154(2):369-87.
158. Pendas-Franco N, Aguilera O, Pereira F, Gonzalez-Sancho JM, Munoz A. Vitamin D and Wnt/beta-catenin pathway in colon cancer: role and regulation of DICKKOPF genes. *Anticancer Res.* 2008;28(5a):2613-23.
159. Kaler P, Augenlicht L, Klampfer L. Macrophage-derived IL-1beta stimulates Wnt signaling and growth of colon cancer cells: a crosstalk interrupted by vitamin D3. *Oncogene.* 2009;28(44):3892-902.
160. Huerta S, Irwin RW, Heber D, Go VL, Koeffler HP, Uskokovic MR, et al. 1alpha,25-(OH)(2)-D(3) and its synthetic analogue decrease tumor load in the Apc(min) Mouse. *Cancer Res.* 2002;62(3):741-6.
161. Xu H, Posner GH, Stevenson M, Campbell FC. Apc(MIN) modulation of vitamin D secosteroid growth control. *Carcinogenesis.* 2010;31(8):1434-41.
162. Larriba MJ, Ordonez-Moran P, Chicote I, Martin-Fernandez G, Puig I, Munoz A, et al. Vitamin D receptor deficiency enhances Wnt/beta-catenin signaling and tumor burden in colon cancer. *PLoS One.* 2011;6(8):e23524.
163. Milczarek M, Psurski M, Kutner A, Wietrzyk J. Vitamin D analogs enhance the anticancer activity of 5-fluorouracil in an in vivo mouse colon cancer model. *BMC Cancer.* 2013;13:294.
164. Milczarek M, Rosinska S, Psurski M, Maciejewska M, Kutner A, Wietrzyk J. Combined colonic cancer treatment with vitamin D analogs and irinotecan or oxaliplatin. *Anticancer Res.* 2013;33(2):433-44.

165. De Robertis M, Massi E, Poeta ML, Carotti S, Morini S, Cecchetelli L, et al. The AOM/DSS murine model for the study of colon carcinogenesis: From pathways to diagnosis and therapy studies. *J Carcinog*. 2011;10:9.
166. Kanneganti M, Mino-Kenudson M, Mizoguchi E. Animal models of colitis-associated carcinogenesis. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:342637.
167. Johansson ME, Gustafsson JK, Sjoberg KE, Petersson J, Holm L, Sjovall H, et al. Bacteria penetrate the inner mucus layer before inflammation in the dextran sulfate colitis model. *PLoS One*. 2010;5(8):e12238.
168. Biswas A, Petnicki-Ocwieja T, Kobayashi KS. Nod2: a key regulator linking microbiota to intestinal mucosal immunity. *J Mol Med (Berl)*. 2012;90(1):15-24.
169. Dionne S, Calderon MR, White JH, Memari B, Elimrani I, Adelson B, et al. Differential effect of vitamin D on NOD2- and TLR-induced cytokines in Crohn's disease. *Mucosal Immunol*. 2014;7(6):1405-15.
170. Lips P, van Schoor NM. The effect of vitamin D on bone and osteoporosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2011;25(4):585-91.
171. Bouillon R, Carmeliet G, Lieben L, Watanabe M, Perino A, Auwerx J, et al. Vitamin D and energy homeostasis: of mice and men. *Nat Rev Endocrinol*. 2014;10(2):79-87.
172. Cantorna MT, Munsick C, Bemiss C, Mahon BD. 1,25-Dihydroxycholecalciferol prevents and ameliorates symptoms of experimental murine inflammatory bowel disease. *J Nutr*. 2000;130(11):2648-52.
173. Goff JP, Koszewski NJ, Haynes JS, Horst RL. Targeted delivery of vitamin D to the colon using beta-glucuronides of vitamin D: therapeutic effects in a murine model of inflammatory bowel disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2012;302(4):G460-9.
174. Rafferty T, Martineau AR, Greiller CL, Ghosh S, McNamara D, Bennett K, et al. Effects of vitamin D supplementation on intestinal permeability, cathelicidin and disease markers in Crohn's disease: Results from a randomised double-blind placebo-controlled study. *United European Gastroenterol J*. 2015;3(3):294-302.
175. Refaat B, El-Shemi AG, Kensara OA, Mohamed AM, Idris S, Ahmad J, et al. Vitamin D3 enhances the tumouricidal effects of 5-Fluorouracil through multipathway mechanisms in azoxymethane rat model of colon cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2015;34:71.
176. Hummel DM, Fetahu IS, Groschel C, Manhardt T, Kallay E. Role of proinflammatory cytokines on expression of vitamin D metabolism and target genes in colon cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2014;144 Pt A:91-5.
177. Ren S, Nguyen L, Wu S, Encinas C, Adams JS, Hewison M. Alternative splicing of vitamin D-24-hydroxylase: a novel mechanism for the regulation of extrarenal 1,25-dihydroxyvitamin D synthesis. *J Biol Chem*. 2005;280(21):20604-11.
178. Simmons JD, Mullighan C, Welsh KI, Jewell DP. Vitamin D receptor gene polymorphism: association with Crohn's disease susceptibility. *Gut*. 2000;47(2):211-4.
179. Glenn AJ, Fielding KA, Chen J, Comelli EM, Ward WE. Long-term vitamin D3 supplementation does not prevent colonic inflammation or modulate bone health in IL-10 knockout mice at young adulthood. *Nutrients*. 2014;6(9):3847-62.

180. Berrington WR, Macdonald M, Khadge S, Sapkota BR, Janer M, Hagge DA, et al. Common polymorphisms in the NOD2 gene region are associated with leprosy and its reactive states. *J Infect Dis.* 2010;201(9):1422-35.
181. Dimitrov V, White JH. Species-specific regulation of innate immunity by vitamin D signaling. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2015.
182. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature.* 2008;454(7203):436-44.
183. Wang Q, He Y, Shen Y, Zhang Q, Chen D, Zuo C, et al. Vitamin D inhibits COX-2 expression and inflammatory response by targeting thioesterase superfamily member 4. *J Biol Chem.* 2014;289(17):11681-94.
184. Steinbach G, Lynch PM, Phillips RK, Wallace MH, Hawk E, Gordon GB, et al. The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med.* 2000;342(26):1946-52.
185. Gupta RA, Dubois RN. Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. *Nat Rev Cancer.* 2001;1(1):11-21.
186. Ishikawa TO, Herschman HR. Tumor formation in a mouse model of colitis-associated colon cancer does not require COX-1 or COX-2 expression. *Carcinogenesis.* 2010;31(4):729-36.
187. McEntee MF, Cates JM, Neilsen N. Cyclooxygenase-2 expression in spontaneous intestinal neoplasia of domestic dogs. *Veterinary pathology.* 2002;39(4):428-36.
188. Guslandi M. Exacerbation of inflammatory bowel disease by nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cyclooxygenase-2 inhibitors: fact or fiction? *World J Gastroenterol.* 2006;12(10):1509-10.
189. Santos-Antunes J, Nunes AC, Lopes S, Macedo G. The Relevance of Vitamin D and Antinuclear Antibodies in Patients with Inflammatory Bowel Disease Under Anti-TNF Treatment: A Prospective Study. *Inflamm Bowel Dis.* 2016.
190. Zator ZA, Cantu SM, Konijeti GG, Nguyen DD, Sauk J, Yajnik V, et al. Pretreatment 25-hydroxyvitamin D levels and durability of anti-tumor necrosis factor-alpha therapy in inflammatory bowel diseases. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2014;38(3):385-91.
191. Froicu M, Zhu Y, Cantorna MT. Vitamin D receptor is required to control gastrointestinal immunity in IL-10 knockout mice. *Immunology.* 2006;117(3):310-8.
192. Zhu Y, Mahon BD, Froicu M, Cantorna MT. Calcium and 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 target the TNF-alpha pathway to suppress experimental inflammatory bowel disease. *Eur J Immunol.* 2005;35(1):217-24.
193. Wobke TK, Sorg BL, Steinhilber D. Vitamin D in inflammatory diseases. *Front Physiol.* 2014;5:244.
194. Muller K, Haahr PM, Diamant M, Rieneck K, Kharazmi A, Bendtzen K. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits cytokine production by human blood monocytes at the post-transcriptional level. *Cytokine.* 1992;4(6):506-12.
195. Lopetuso LR, Chowdhry S, Pizarro TT. Opposing Functions of Classic and Novel IL-1 Family Members in Gut Health and Disease. *Front Immunol.* 2013;4:181.
196. Keller M, Ruegg A, Werner S, Beer HD. Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell.* 2008;132(5):818-31.

197. Al-Sadi R, Guo S, Dokladny K, Smith MA, Ye D, Kaza A, et al. Mechanism of interleukin-1beta induced-increase in mouse intestinal permeability in vivo. *Journal of Interferon & Cytokine Research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. 2012;32(10):474-84.
198. Verway M, Bouttier M, Wang TT, Carrier M, Calderon M, An BS, et al. Vitamin D induces interleukin-1beta expression: paracrine macrophage epithelial signaling controls M. tuberculosis infection. *PLoS Pathog*. 2013;9(6):e1003407.
199. Bauer C, Duewell P, Mayer C, Lehr HA, Fitzgerald KA, Dauer M, et al. Colitis induced in mice with dextran sulfate sodium (DSS) is mediated by the NLRP3 inflammasome. *Gut*. 2010;59(9):1192-9.
200. Jones SA. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J Immunol*. 2005;175(6):3463-8.
201. Nonn L, Peng L, Feldman D, Peehl DM. Inhibition of p38 by vitamin D reduces interleukin-6 production in normal prostate cells via mitogen-activated protein kinase phosphatase 5: implications for prostate cancer prevention by vitamin D. *Cancer Res*. 2006;66(8):4516-24.

Annexe I

Permissions de reproduction des figures

Annexe II

La contribution de l'auteur principal et des co-auteurs à l'article

Je déclare que j'ai réalisé toutes les expériences présentées dans cet article. J'ai aussi analysé les résultats et j'ai rédigé l'article sous la supervision de Dr Delvin et Dr Seidman. Le deuxième auteur, Jamie Koenekoop, m'a aidé durant l'admission de DSS aux souris et durant la récolte des échantillons. Il a aussi aidé à l'extraction d'ARN et a effectué quelques expériences de RT-qPCR pour le gène de référence. Le troisième auteur a contribué au design expérimental et au choix des gènes pour RT-qPCR. Dre Valérie Marcil a contribué aux calculs des valeurs d'expression des gènes et le choix du test statistique pour les résultats de RT-qPCR. Dr Émile Levy a contribué à la révision scientifique et à la correction de l'article.

