



HAL
open science

Caractérisation des effets immunomodulateurs et antiprolifératifs de la vitamine D : impact in vitro et in vivo dans un modèle d'adénocarcinome mammaire

Sahar Aldekwer

► **To cite this version:**

Sahar Aldekwer. Caractérisation des effets immunomodulateurs et antiprolifératifs de la vitamine D : impact in vitro et in vivo dans un modèle d'adénocarcinome mammaire. Santé. Université Clermont Auvergne, 2021. Français. NNT : 2021UCFAC004 . tel-03545382

HAL Id: tel-03545382

<https://theses.hal.science/tel-03545382>

Submitted on 27 Jan 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie, Santé, Agronomie, Environnement

Présentée à l'Université Clermont-Auvergne pour l'obtention du grade de Docteur
d'Université

(Décret du 5 juillet 1984)

Spécialité Biologie-Santé

Soutenue le 25 février 2021

Par

SAHAR ALDEKWER

**Caractérisation des effets immunomodulateurs et
antiprolifératifs de la vitamine D : impact *in vitro* et *in vivo*
dans un modèle d'adénocarcinome mammaire**

Equipe microEnvironnement CellulaiRE Immunomodulation et Nutrition (ECREIN)

Unité Nutrition Humaine (UNH), UMR 1019 INRAE-UCA

Membres de jury

Pr Bertrand LIAGRE, Université de Limoges, Fédération de recherche 3503 GEIST,
Laboratoire PEIRENE, rapporteur

Dr Hubert LINCET, MCU-HDR, Université Claude Bernard Lyon 1, UMR INSERM 1052 -
CNRS 5286, rapporteur

Pr Nathalie BOISSEAU, Université Clermont-Auvergne, Laboratoire AME2P, examinatrice

Pr Marie-Paule VASSON, Université Clermont-Auvergne, UMR INRAE 1019, directrice de
thèse

Pr Mona DIAB-ASSAF, Université Libanaise, Fanar, Laboratoire TMPA, co-directrice de
thèse, membre invité

Dr Jérémie TALVAS, MCU, Université Clermont-Auvergne, UMR INRAE 1019, co-
directeur de thèse, membre invité

Dr Adrien ROSSARY, MCU-HDR, Université Clermont-Auvergne, UMR INRAE 1019,
membre invité

Remerciements

*Je souhaite exprimer ma profonde gratitude et mes vifs remerciements à l'ensemble des membres du jury. Merci à Madame **Nathalie BOISSEAU**, pour me faire l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse après avoir activement participé à mon Comité de thèse. Merci également à Monsieur **Bertrand LIAGRE** et Monsieur **Hubert LINCET**, Rapporteurs de cette thèse, pour le temps qu'ils ont consacré à l'évaluation de mon manuscrit. C'est un immense honneur que vous me faites d'avoir accepté d'être membres du jury de ma thèse.*

*Je voudrais aussi remercier ma directrice de thèse, Madame **Marie-Paule VASSON**, pour la confiance qu'elle m'a accordée tout au long de mes travaux, pour son expertise, sa patience et son professionnalisme, en m'apprenant le travail rigoureux et la réflexion scientifique.*

*Un grand merci également à ma co-directrice de thèse au Liban Madame **Mona DIAB-ASSAF**, grâce à elle j'ai eu l'opportunité de continuer mes études de doctorat au sein de l'équipe **ECREIN**. Qu'elle soit aussi remerciée pour sa gentillesse, sa disponibilité et pour les nombreux encouragements qu'elle m'a prodigués.*

*Mes remerciements vont également à Monsieur **Jérémie TALVAS**, pour son encadrement, pour la gentillesse qu'il a manifestée à mon égard durant cette thèse, pour ses connaissances et pour tous les conseils et la confiance qu'il m'a accordés.*

*Je remercie Madame **Sophie SIXOU** et Monsieur **Jean-François LANDRIER** pour avoir accepté de faire partie du Comité de suivi de thèse, pour avoir ainsi suivi l'avancée de mes travaux de thèse et pour les précieux conseils qu'ils m'ont donnés.*

*Je remercie aussi vivement Madame **Corinne Aubel** pour m'avoir permis d'accéder à l'appareil de transfert de protéines et pour son aide précieuse.*

*Merci à Madame **Catherine DEFOORT** pour la réalisation et l'interprétation de l'analyse des différents métabolites de la vitamine D.*

*Un grand merci à Mesdames **Laurence MILLE** et **HAMARD** et **Iman MOMKEN** pour leur participation à l'élaboration de notre étude in vivo et pour leurs conseils scientifiques.*

*Je remercie spécialement les membres de l'équipe **ECREIN** pour m'avoir permis de réaliser ce travail avec eux. Je les remercie pour leur accueil exceptionnel et pour m'avoir apporté toute l'aide possible. Merci donc à **Adrien ROSSARY**, **Marie-Chantal FARGES**, **Nicolas GONCALVES-MENDES**, **Aicha DEMIDEM**, **Delphine LE GUENNEC** et **Réa BINGULA** pour tous les moments conviviaux partagés au laboratoire, pour leur aide et leur soutien. Plein de succès et de bonheur.*

*Je tiens particulièrement à remercier **Stéphanie ROUGE** pour sa bonne humeur exceptionnelle, sa joie de vivre, ses fous rires partagés, pour son aide précieuse lors des expérimentations et pour m'avoir fait partager son savoir-faire technique mais surtout, pour son humanisme et l'ambiance qu'elle amène au laboratoire.*

*Merci aussi à **Augustin Le NAOUR** pour sa sympathie, sa bonne humeur et ses conseils scientifiques et méthodologiques pertinents et tous les bons moments de travail et d'amitié partagés, toujours avec le sourire.*

*Je voudrais exprimer mes plus sincères remerciements à Mesdames **Florence CALDEFIE-CHEZET** et **Laetitia DELORT** pour la gentillesse qu'ils ont manifestée à mon égard et leurs conseils scientifiques au cours des réunions ECREIN.*

*Je remercie aussi tous les stagiaires que j'ai croisés pendant ma thèse. Je pense à **Adrien DESIDERIO** avec qui j'ai partagé toutes les galères de l'expérimentation in vivo mais, aussi et surtout les bons moments à la paillasse ou ailleurs. Merci à **Marianne DIAB** avec qui j'ai fait mes premiers pas de mon long voyage en France. Je vous souhaite une bonne continuation et plein de succès.*

*Je profite aussi de ces quelques lignes pour adresser mes sincères remerciements à mes amis de Liban, **Iman, Khouloud, Fatima, Bouchra, Zaynab** et **Doaà** qui m'accueillent toujours les bras ouverts à chaque retour.*

***Amer MOHSIN**, Merci d'avoir été toujours là pour me soutenir et pour les excellents moments que nous avons partagés. Je serais toujours reconnaissante pour tout ce que tu as fait pour rendre ma vie plus facile à Clermont-Ferrand. Je te remercie du fond de mon cœur et je te souhaite plein de joie et de bonheur dans ta vie.*

A mes parents Mostafa et Khitam

A mes sœurs Azza, Bouhra, Samar, Fatima et Nour

A mes frères Izzat et Hamada

Pour ces longues années de soutien inconditionnel, pour leur confiance permanente et l'acceptation de mes choix parfois ambitieux. Ils m'ont offert la possibilité de réaliser mon rêve. Ils ont toujours fait preuve de la plus grande des patiences et de la plus grande des compréhensions. Malgré toutes les difficultés qu'ont pu représenter ces longues années d'études, ils m'ont toujours facilité ce parcours, au prix de nombreux efforts. Il me sera impossible de rendre tout ce qui m'a été offert. Rien n'aurait été possible sans eux, cette réussite est donc un peu la mienne, mais surtout beaucoup la leur.

Aucun remerciement ne saurait être suffisant

Table des matières

RESUME.....	i
ABSTRACT.....	ii
PRODUCTION SCIENTIFIQUE.....	iii
ABREVIATIONS.....	iv
ILLUSTRATIONS.....	viii
INTRODUCTION.....	1
I VITAMINE D	3
I.1 Historique de la VitD	3
I.2 Sources et apports nutritionnels conseillés	4
I.3 Métabolisme de la VitD	5
I.4 Marqueurs biologiques du statut en VitD	7
I.4.1 Dosage de la 25D	8
I.4.2 Dosage de la 1,25D	9
I.5 Maintien de l'homéostasie de la VitD	9
I.6 Déficience en VitD : focus sur l'obésité	10
I.7 Effets génomiques de la 1,25D	11
I.8 Effets non génomiques de la 1,25D	13
I.9 Rôles biologiques de la VitD	15
II LE SYSTEME IMMUNITAIRE	17
II.1 IMMUNITE INNEE ET IMMUNITE ADAPTATIVE	17
II.1.1 L'immunité innée	17
II.1.1.i Barrière chimique et mécanique	18
II.1.1.ii Barrière cellulaire	18
II.1.2 L'immunité adaptative	21
II.1.2.i Immunité à médiation humorale	21
II.1.2.ii Immunité à médiation cellulaire	22
II.2 IMMUNITE TUMORALE	25
II.2.1 Points de contrôle immunitaires et cancer mammaire	26
II.2.2 Cellules immunitaires associés à la tumeur	28
II.2.2.i Macrophages associés à la tumeur	28
II.2.2.ii Cellules Natural Killer associée à la tumeur	29
II.2.2.iii Lymphocytes infiltrant les tumeurs	30
II.3 VITAMINE D ET IMMUNITE	31
II.3.1 Vitamine D et monocytes/macrophages	31
II.3.2 Vitamine D et Natural Killer	32
II.3.3 Vitamine D et lymphocytes	33
II.4 VITAMINE D ET IMMUNITE TUMORALE MAMMAIRE	34

II.5	OBESITE ET IMMUNITE TUMORALE MAMMAIRE.....	35
II.6	ACTIVITE PHYSIQUE ET IMMUNITE TUMORALE MAMMAIRE.....	37
III	CANCER DE LA GLANDE MAMMAIRE.....	40
III.1	MODELES DE CANCER MAMMAIRE MURIN.....	41
III.2	VITAMINE D ET CANCER MAMMAIRE.....	43
III.3	OBESITE ET CANCER MAMMAIRE.....	47
III.4	ACTIVITE PHYSIQUE ET CANCER MAMMAIRE.....	48
	OBJECTIFS DE LA THESE.....	51
	<i>Publication n°1.....</i>	<i>54</i>
	<i>Publication n°2.....</i>	<i>69</i>
	<i>Publication n°3.....</i>	<i>94</i>
	DISCUSSION.....	97
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	108
	REFERENCES.....	111
	RESUME.....	125

RESUME

La vitamine D (VitD) est une hormone liposoluble qui, outre son implication dans le métabolisme osseux, joue un rôle important dans la modulation de la réponse immunitaire et la surveillance anti-tumorale. De fait, il existe de plus en plus de données reliant le déficit en VitD et des problèmes de santé comme l'auto-immunité ou la sensibilité accrue aux infections. Le cancer du sein, le plus fréquent chez la femme, est associé à plusieurs facteurs de risque parmi lesquels le surpoids, notamment après la ménopause, et l'insuffisance d'activité physique. Plusieurs études de cohorte ont établi une relation, encore controversée, entre le risque de cancer du sein et le déficit en VitD.

Dans ce contexte, l'objectif de la thèse était de définir l'impact de la VitD sur les capacités de réponse des cellules immunocompétentes en lien avec la prolifération de cellules tumorales mammaires dans des modèles expérimentaux *ex vivo*, *in vitro* et *in vivo*.

Ex vivo, nous avons mis en évidence l'expression à l'état basal du VDR et des enzymes du métabolisme de la VitD (*CYP27B1* et *CYP24A1*) dans les PBMC (cellules mononucléées du sang) de donneurs sains. L'expression de ces marqueurs est peu influencée par la 25-OH VitD (25D) ou par des agents mimétiques bactérien (LPS) ou viral (PIC). Tandis que l'expression intracellulaire de la cathélicidine, peptide antimicrobien, est induite par la 25D sans et avec stimulation par LPS ou PIC, sa production extracellulaire est induite par la 25D uniquement en présence de ces stimulants.

In vitro, nous avons établi que les cellules murines, macrophagiques IC-21 et cancéreuses mammaires EO771, expriment les ARNm et les protéines de VDR, Cyp27b1 et Cyp24a1. Ces expressions sont modulées de façon inverse par la 25D et la 1,25(OH)₂D (1,25D) dans les 2 lignées. La 1,25D a un effet antiprolifératif sur les EO771, à l'inverse de la 25D. La co-culture des EO771 et des IC-21 supprime l'effet antiprolifératif de la 1,25D et polarise les IC-21 en type M2 anti-inflammatoire. L'expression génique de la cathélicidine dans les EO771 et les IC-21 n'est pas influencée ni par la 1,25D ni par la 25D alors que son expression protéique est stimulée par la 25D.

In vivo, nous avons évalué l'impact d'une supplémentation en VitD (D) associée ou non à une activité physique imposée modérée (Ex) sur le développement des tumeurs mammaires EO771 chez les souris C57BL/6 ovariectomisées, sous régime obésogène (HF) et hébergées en environnement enrichi. Nous avons observé des effets synergiques entre la VitD et l'Ex dans l'amélioration des capacités physiques des animaux et la limitation du surpoids, mais aucun impact sur la croissance tumorale. Pris isolément, l'Ex a amélioré la vigilance immunitaire et la supplémentation en VitD a favorisé un environnement immunitaire tolérogène.

En conclusion, les modèles cellulaires étudiés répondent à la signalisation de la VitD. La VitD favorise l'immunité innée en stimulant *in vitro* la sécrétion de la cathélicidine humaine et murine. La 1,25D a des effets antiprolifératifs contre les cellules EO771 qui favorisent un environnement immunosuppresseur. La supplémentation en VitD *in vivo* n'a pas d'effet sur la croissance tumorale, peut-être en raison d'un équilibre entre son effet apoptotique direct sur les EO771 et son effet pro-tumoral immunosuppresseur. L'intervention combinée de la supplémentation en VitD et de l'exercice physique imposé favorisent un environnement immunitaire tolérogène, sans incidence sur la croissance tumorale mammaire.

Mots clés : Calcitriol – Immunité – Cancer mammaire – Obésité – Activité physique

ABSTRACT

Vitamin D (VitD) is a steroid hormone, which, in addition to its involvement in bone metabolism, plays an important role in the modulation of immune response and anti-tumor surveillance. There is a growing evidence linking VitD deficiency and health problems such as autoimmunity or increased sensitivity to infections. Breast cancer, the most common in women, is associated with several risk factors including overweight, especially after menopause, and insufficient physical activity. Several cohort studies established a relationship, still controversial, between the risk of breast cancer and VitD deficiency.

In this context, the objective of the thesis was to define the impact of VitD on the response capacities of immunocompetent cells in link with the proliferation of mammary cancer cells in experimental models *ex vivo*, *in vitro* and *in vivo*.

Ex vivo, we demonstrated the basal expression of VDR and VitD metabolism enzymes (CYP27B1 and CYP24A1) in PBMCs (blood mononuclear cells) from healthy donors. The expression of these markers is little influenced by 25-OH VitD (25D) or by bacterial (LPS) or viral (PIC) mimetic agents. While intracellular expression of the antimicrobial peptide, cathelicidin, is induced by 25D with and without stimulation by LPS or PIC, its extracellular production is induced by 25D only in the presence of these stimulants.

In vitro, we have established that the mammary cancer EO771 and macrophage IC-21 murine lines express the mRNAs and proteins of VDR, Cyp27b1 and Cyp24a1. These expressions are modulated inversely by 25D and 1,25 (OH)₂D (1,25D) in the two lines. 1,25D has an antiproliferative effect on EO771, unlike 25D. Co-culture of EO771 and IC-21 suppresses the antiproliferative effect of 1,25D and polarizes IC-21 into the anti-inflammatory M2 type. Cathelicidin gene expression in EO771 and IC-21 is not influenced by either 1,25D or 25D while its protein expression is stimulated by 25D.

In vivo, we evaluated the impact of VitD supplementation associated or not with a moderate imposed physical activity (Ex) on the development of EO771 mammary tumors in ovariectomized C57BL/6 mice, under high fat diet (HF) and hosted in-enriched environment. We observed synergistic effects between VitD and Ex in improving the physical capacities of animals and limiting overweight, but no impact on tumor growth. Taken individually, Ex improved immune vigilance and VitD supplementation promoted a tolerogenic immune environment.

In conclusion, the cell models studied respond to VitD signaling. VitD promotes innate immunity by stimulating the secretion of human and murine cathelicidin *in vitro*. 1,25D has antiproliferative effects against EO771 cells, which promote an immunosuppressive environment. VitD supplementation *in vivo* has no effect on tumor growth, possibly due to an equilibrium between its direct apoptotic effect on EO771 and its immunosuppressive pro-tumor effect. The combined intervention of VitD supplementation and imposed physical exercise promotes a tolerogenic immune environment without affecting mammary tumor growth.

Keywords: Calcitriol - Immunity - Breast cancer - Obesity - Physical activity

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

Publications

- 1. 25-hydroxyvitamin D potentializes extracellular cathelicidin release from human PBMC stimulated ex vivo with either bacterial (LPS) or viral (P: IC) mimetics.**

Sahar Aldekwer, Nicolas Goncalves-Mendes, Guillaume Martinroche, Cassandra Lanchais, Stéphanie Rougé, Marie-Chantal Farges, Adrien Rossary, Mona Diab-Assaf, Marie-Paule Vasson, Jérémie Talvas

Article soumis à « Journal of Physiology and Biochemistry »

- 2. Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D and 25-hydroxyvitamin on murine mammary tumor EO771 and macrophagic IC-21 lines : In vitro study**

Sahar Aldekwer, Augustin Le Naour, Adrien Rossary, Mona Diab-Assaf, Marie-Paule Vasson, Jérémie Talvas

Article en cours de rédaction

- 3. Vitamin D supplementation associated with physical exercise promotes a tolerogenic immune environment without effect on mammary tumour growth in C57BL/6 mice**

Sahar Aldekwer, Adrien Desiderio, Marie-Chantal Farges, Stéphanie Rougé, Augustin Le Naour, Delphine Le Guennec, Nicolas Goncalves-Mendès, Laurence Mille-Hamard, Iman Momken, Adrien Rossary, Mona Diab-Assaf, Marie-Paule Vasson, Jérémie Talvas

Article accepté le 19 octobre 2020 dans l'« European Journal of Nutrition »

Communications affichées:

- 1. Congrès virtuel ESPEN 19- 22 septembre 2020 (Lyon)**

Titre: Vitamin D supplementation and physical exercise conjunction promotes a tolerogenic immune environment with no change in the mammary tumor growth in C57BL/6 mice.

Sahar Aldekwer, Adrien Desiderio, Marie-Chantal Farges, Stéphanie Rougé, Augustin Le Naour, Delphine Le Guennec, Nicolas Goncalves-Mendès, Laurence Mille-Hamard, Iman Momken, Adrien Rossary, Mona Diab-Assaf, Marie-Paule Vasson, Jérémie Talvas

- 2. Congrès virtuel JFN 25-27 novembre 2020 (Lille)**

Titre: Effets comparés de la 25-hydroxy et de la 1,25-dihydroxy Vitamine D sur la lignée d'adénocarcinome mammaire EO771 : approche in vitro

Sahar Aldekwer, Augustin Le Naour, Adrien Rossary, Mona Diab-Assaf, Marie-Paule Vasson, Jérémie Talvas

ABREVIATIONS

VitD : Vitamine D

25D: 25-hydroxyvitamine D

1,25D: 1,25 dihydroxyvitamine D

A

AA: Acide arachidonique

Akt (PKB): protein kinase B

ALB: Albumine

AMP: peptides antimicrobiens

AMPC: adénosine monophosphate cyclique

ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

AP : Activité physique

ARG1: arginase 1

ATG5 : protéine 5 liée à l'autophagie

B

Bax: BCL2 Associated X

β -défensine: DEFB/HBD

Bcl2: B-cell lymphoma 2

Bcl-xl : B-cell lymphoma extra Large

Bglap: Bone Gamma-Carboxyglutamate Protein

BPCO : Maladie pulmonaire obstructive chronique

BRCA : BReast CAncer gene

C

CaMKII: Calcium/calmodulin protein kinase II

CAMP: Cathelicidin antimicrobial peptide

CAMP /LL37 /CAP18 /FALL39 : Cathelicidine

CaT1 : Calcium transport protein 1

CBP/300 : EP300- CREB binding protein *p300*

CCL : C-C Motif chemokine Ligand

CDK: kinase dépendante des cyclines

CDX : Xénogreffe dérivée d'une lignée cellulaire isolée d'un patient

C/EBP: CAAT enhancer binding protein

CK5/6: Cytokeratin 5/6

CLS: structures en forme de couronne (*Crown-like structure*)

CMH: Complexe majeur d'histocompatibilité

COX-2 : Cyclooxygénase-2

CP : Cathepsines

CPA: Cellule Présentatrice d'Antigène

CRP : Protéine C-réactive

CTLA-4 : Cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4

CXCL: (C-X-C motif) chemokine ligand

CYP24A1: Cytochrome P450C24, 24 hydroxylase

CYP27B1 : Cytochromes P450C1, 1 α -hydroxylase

D

DAG: Diacylglycerol

DAMP: Motifs moléculaires associés aux dégâts (*Damage-Associated Molecular Patterns*)

DBP: protéine de liaison à la VitD

DC: Cellules Dendritiques

DMBA: 7,12-dimethylbenz(a) anthracène

DRIP: Protéines d'interaction avec les récepteurs de la VitD

E

ECaC : canal épithélial calcique
EGF: Facteur de croissance épidermique
ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay
EMT : Transition épithéliale-mésenchymateuse
ER : Estrogen receptor
ERK: Extracellular signal Regulated protein Kinase;
ETS 1: Avian Erythroblastosis Virus E26 Oncogene Homolog-1

F
FAO: Fatty-acid oxidation
Fas receptor: Tumor necrosis factor receptor superfamily member 6
FGF23: Facteur de croissance des fibroblastes 23
FOXP3: Forkhead box P3

G
GLUT4 : Glucose transporter type 4
GM-CSF : Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor
G-MDSC : Cellules granulocytaires myéloïdes suppressives

H
HAT: Histone acétylase
HER2 (ERBB2) : Human epidermal growth factor receptor 2
HPLC : High-performance liquid chromatography

I
ICAM-1: Intercellular Adhesion Molecule 1
IDO: Indoleamine 2,3-dioxygenase
IFI27L: Interferon, Alpha-Inducible Protein 27 like
IFI44L: Interferon-Induced Protein 44-Like
IGF: Facteur de croissance insulinique
IGFBP-3: Insulin-like growth factor-binding protein 3
Ig : immunoglobuline
INF: Interféron
IKK β : I- κ B kinase
IL: Interleukine
IL-1RA : interleukin-1 receptor antagonist
IMC : Indice de masse corporelle
INCA : Institut National du Cancer
iNOS: Oxyde nitrique synthase inductible
IRF1: Facteur de régulation de l'interféron 1
ISG: Interferon-Stimulated Protein
iTreg/pTreg: Lymphocytes T Régulatrices induites/périphériques

J
JAK: Janus kinase;
JNK: c-Jun N-terminal Kinase

L
LAK, Lymphokine Activated Killer
LB : Lymphocyte B
LC-MS /MS : Liquid chromatography coupled to tandem-mass spectrometry
LFA-1: Lymphocyte Function-Associated Antigen-1
LPS: Lipopolysaccharides
LT : Lymphocyte T

M
MAC : Complexe d'attaque terminal
Macrophage M1 : pro-inflammatoire
Macrophage M2 : anti-inflammatoire
MAP kinase: mitogen-activated protein kinase
MARRs : Protéine de liaison aux stéroïdes à réponse rapide associée à la membrane

MB-lectin: Mannan-Binding Lectin
 MCP-1: Monocyte chemoattractant protein 1
 MED1: Mediator Complex Subunit 1
 MICI : Maladie inflammatoire de l'intestin
 MMP: Métalloprotéinase
 MMTV: Virus de la tumeur mammaire murine
N
 NADPH oxidase : nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase
 NF-κB: Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
 NHR : Superfamille des récepteurs nucléaires
 NK: Cellule tueuse (*Natural Killer*)
 NKG2D : NK groupe 2 membre D
 NLR: Récepteurs de type NOD (*Nucleotide Oligomerization Domain Receptor*)
 MNU: N-méthyl-N-nitrosourée
 NO: Oxyde nitrique (Nitric Oxide)
O
 OAS: Oligoadenylate Synthetase
P
 PA: Plasminogène
 PAMPs : Pathogen Associated Molecular Patterns
 PDLIM2: PDZ-LIM domain-containing protein 2
 PD-1/PD-L1: Programmed cell death protein 1/son ligand
 PDX: Xénogreffe dérivée d'un patient
 PGE2 : Prostaglandines
 PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase
 PKC: protein kinase C
 PLA2: phospholipase A2
 PLAC1: Placental-specific protein 1
 PLC: phospholipase C
 PRRS: Récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (*Pattern recognition receptors*)
 PTH: Hormone parathyroïdienne
R
 Ras: Rat Sarcoma
 Rb-E2F: Rétinoblastome-E2 transcription factor
 RLR: *Retinoic acid-inducible gene (RIG)-I-Like Receptor*
 RNS: Espèces réactives de l'azote (*Reactive Nitrogen Species*)
 ROS: Espèces réactives de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species*)
 RP: Récepteur de progestérone
 RSAD2: Radical S-Adenosyl Methionine Domain Containing 2
 RunX: Facteur de transcription lié à Runt
 RXR : Récepteur rétinol X
 RORs: Retinoid-acid receptor related Orphan Receptors
 ROS: Reactive oxygen species
 RIA: Radioimmunos dosage
S
 SAA : Amyloïde sérique A
 SCID: déficit immunitaire combiné sévère
 SHBG: Sex hormone-binding globulin
 SI : Système immunitaire
 Siglec : Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins,
 SNC : système nerveux central
 SRC: Coactivateurs des récepteurs stéroïdiens
 STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription
 STING: Stimulator of Interferon gene

T

TAA : Antigènes spécifiques associés aux tumeurs
TAF: TATA box binding protein associated factor
TAM : Macrophages associés aux tumeurs
T-bet: Transcription factor T-box expressed in T cells
Tc: Lymphocyte cytotoxique
TCF: T cell factor, Facteur de transcription
TCR: Récepteur des Cellules T
Tfh: Lymphocytes Th folliculaires
TFIIB: Facteur de Transcription II B
TGF- β : Facteur de croissance transformant beta
Th : Lymphocyte auxiliaire (T helper)
TIL : Lymphocytes infiltrant les tumeurs
TIMP1 : Inhibiteur tissulaire de la MMP1
TLR: Toll-like receptor
TME: micro-environnement tumoral
TNBC : Triple negative breast cancer
TNF: Facteur de nécrose tumorale
TNF-R1: TNF Receptor 1
TRAIL: TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand
Tyk: Tyrosine kinase

V

VDRE : Élément de réponse à la VitD
VDRm/n: Récepteur membranaire/nucléaire de la VitD
VEGF: Vascular endothelial growth factor
VSE: Vitamin D stimulatory element

W

WAP: Whey acidic protein

Y

YY1: Yin Yang 1

ILLUSTRATIONS

<i>Liste des figures</i>	<i>Page</i>
Figure 1 : Structure chimique des différentes formes de la VitD	3
Figure 2 : Synthèse endogène de la VitD	4
Figure 3 : Métabolisme de la VitD	5
Figure 4 : Métabolisme de la vitamine D dans les tissus rénaux et extra-rénaux	10
Figure 5 : Récepteur de la vitamine D (VDR)	12
Figure 6 : Visualisation 3D complète du récepteur de la VitD	13
Figure 7 : Actions génomiques du VDR	14
Figure 8 : Les actions non génomiques de la 1,25D	15
Figure 9 : Chronologie de l'immunité innée et adaptative	19
Figure 10 : Vue intégrative de l'immunité innée	20
Figure 11 : Polarisation macrophagique	21
Figure 12 : Vue générale des fonctions effectrices du système immunitaire adaptatif	22
Figure 13 : Sélection clonale et Recombinaison V(D)J	23
Figure 14 : Réponse à médiation humorale	24
Figure 15 : Activation lymphocytaire T : la synapse immunologique	25
Figure 16 : Maturation des cellules dendritiques en réponse à l'agent pathogène	26
Figure 17 : Différenciation et fonctions des cellules CD4+	27
Figure 18 : Fonction cytotoxique des lymphocytes Tc	28
Figure 19 : Interactions entre le micro-environnement immunitaire et les cellules tumorales dans le cancer mammaire	30
Figure 20 : Réponse immunitaire au cancer (cancer immunoediting) : rôle du système immunitaire dans la suppression et la promotion du cancer	31
Figure 21 : Points de contrôle immunitaires	32
Figure 22 : Point de contrôle immunitaire, l'IDO	33
Figure 23 : Point de contrôle immunitaire, Siglec	33
Figure 24 : Rôle des TAM dans le développement des tumeurs <i>via</i> la coopération de l'angiogenèse, de l'inflammation chronique et de la suppression immunitaire	34
Figure 25 : Lymphocytes T infiltrant le cancer mammaire	35
Figure 26 : Vitamine D et immunité innée (anti-infection)	36
Figure 27 : Effets immunomodulateurs de la 1,25D sur les cellules T CD4+	37
Figure 28 : Mécanismes d'inflammation chronique associée à l'obésité	38
Figure 29 : Impact de la leptine et de PD-1 sur les cellules T CD8 intra-tumoraux	39
Figure 30 : Effet de l'obésité sur les LT CD8+ infiltrant la tumeur mammaire	40

Figure 31 : Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018	44
Figure 32 : Incidence et mortalité des cancers du sein par tranche d'âge en France en 2012	44
Figure 33 : Facteurs de risque du cancer de sein	45
Figure 34 : Classification des cancers du sein et algorithme décisionnel	46
Figure 35 : Marqueurs exprimés par les cellules EO771	46
Figure 36 : Voies de signalisation induites par la 1,25D3 impliquées dans la régulation de la prolifération cellulaire, de l'apoptose et de l'inflammation dans le cancer	47
Figure 37 : Inhibition de la synthèse et de la signalisation des œstrogènes par le calcitriol (1,25(OH) ₂ D)	46
Figure 38 : Voies de signalisation activées dans l'obésité et liées au cancer mammaire	49
Figure 39 : Mécanismes biologiques hypothétiques liant l'activité physique, l'excès de graisse corporelle et le comportement sédentaire au risque de cancer	50
Figure 40 : Rôles des protéines endocytiques dans la délivrance de la 25D et de la 1,25D dans la cellule cancéreuse	99
Figure 41 : Méthodes de fabrication des sphéroïdes	100
Figure 42 : Mobilisation des cellules NK par l'exercice physique : impact sur le développement tumoral	107
 Liste des tableaux	
Tableau 1 : Teneurs des aliments naturellement riches ou enrichis en VitD	3
Tableau 2 : Apports nutritionnels recommandés	4
Tableau 3 : Enzymes du métabolisme de la VitD	6
Tableau 4 : Types de cellules exprimant à la fois la CYP27B1 et le VDR	7
Tableau 5 : Principales caractéristiques des trousse de dosage par ELISA de la 25D murine	8
Tableau 6 : Comparaison des techniques de dosage des 25D et 1,25D par LC-MS /MS et immuno-essais (ELISA) : avantages et inconvénients	9
Tableau 7 : Statut en VitD	11
Tableau 8 : Effets de la VitD sur le système cardio-vasculaire	16
Tableau 9 : Effets de la VitD sur la santé neuronale	17
Tableau 10 : Effets indésirables sur la santé associés de manière significative à un faible taux sérique de 25D	18
Tableau 11 : Cellules immunitaires infiltrant les tumeurs: marqueurs moléculaires, sous-type, fonctions et points de contrôle auxquels elles sont associées	29
Tableau 12 : Etudes précliniques de l'effet de l'activité physique sur les composants immunitaires dans des modèles de cancer mammaire.	41-43

INTRODUCTION

La vitamine D (VitD) est une hormone de type stéroïde qui agit au niveau cellulaire en se liant à un récepteur spécifique de la VitD (VDR). Outre son rôle central dans le maintien du capital osseux, elle suscite depuis plusieurs années un intérêt grandissant pour ses capacités régulatrices dans plusieurs grands systèmes physiologiques dont le système immunitaire.

Les actions immunomodulatrices de la VitD sont connues depuis plus d'un quart de siècle, mais ce n'est que récemment que leur importance en santé humaine est devenue évidente. La VitD, de par son rôle régulateur dans la différenciation et la multiplication cellulaire, peut moduler les réponses immunitaires innées et adaptatives. De fait, il existe de plus en plus de données reliant le déficit en VitD et des problèmes de santé comme l'auto-immunité ou la sensibilité accrue aux infections.

Le cancer de la glande mammaire est au niveau mondial le plus fréquent chez la femme, avec pour la France une incidence parmi les plus élevées d'Europe : une femme sur huit à dix développe un cancer du sein au cours de sa vie. Plusieurs facteurs de risque de cancer du sein ont été identifiés parmi lesquels le surpoids, notamment après la ménopause, et l'insuffisance d'activité physique. Plusieurs études de cohorte ont établi une relation, encore controversée, entre le risque de cancer du sein et le taux circulant de VitD, suggérant que le déficit en VitD est un facteur d'aggravation.

Puisque que les cellules immunitaires et les cellules tumorales mammaires sont des cibles privilégiées de la VitD, nous avons émis l'hypothèse que la VitD peut moduler la réponse immunitaire en lien avec la prolifération tumorale. Pour cela, nous avons développé des approches de recherche complémentaires :

- *ex vivo* et *in vitro*, à partir de cellules immunocompétentes humaines/murines et de cellules d'adénocarcinome mammaire murin, afin d'évaluer l'impact de la VitD sur ces cellules et sur le dialogue intercellulaire ;
- *in vivo*, à partir d'un modèle de cancer mammaire syngénique immunocompétent chez la souris âgée ovariectomisée, sous régime obésogène en environnement enrichi, afin d'évaluer l'impact de la supplémentation en VitD et de l'activité physique imposée sur la croissance tumorale et la réponse immunitaire.

Ce mémoire de thèse présente en trois parties l'ensemble des travaux réalisés pour répondre au projet de recherche.

La première partie est une synthèse bibliographique divisée en 3 chapitres :

Le premier aborde l'historique et les caractéristiques de la VitD, son métabolisme, ses modes d'action cellulaire, son exploration, ses effets physiologiques et son implication dans différentes pathologies.

Le deuxième chapitre décrit le système immunitaire en détaillant les effecteurs des réponses innée et adaptative, la vigilance anti-tumorale et l'impact de la VitD, de l'obésité et de l'activité physique sur la surveillance anti-tumorale.

Le troisième chapitre traite le cancer mammaire en présentant différents modèles de cancer murin dont celui utilisé dans notre projet et détaillant l'impact de la VitD, de l'obésité et de l'activité physique sur le développement tumoral mammaire.

Découlant de ces données de la littérature, les objectifs de notre recherche sont présentés en trois approches complémentaires.

La deuxième partie du manuscrit présente l'ensemble du travail expérimental réalisé sous la forme de trois articles scientifiques, un publié (accepté le 19 octobre 2020 dans l'« *European Journal of Nutrition* »), un soumis (*Journal of Physiology and Biochemistry*) et le troisième en cours de finalisation....

Ces travaux ont également été présentés en congrès internationaux sous forme de deux communications affichées (Congrès virtuel ESPEN 19-22 septembre (Lyon) ; Journées Francophones de Nutrition 25-27 novembre).

La troisième partie du manuscrit consiste en une discussion générale de l'ensemble des résultats recueillis au cours de cette thèse et se termine par une conclusion dégageant des perspectives et de nouvelles interrogations de recherche.

Ces travaux de thèse s'inscrivent pleinement dans les thématiques scientifiques de l'équipe ECREIN, UMR 1019 INRA – UCA, focalisées sur la modulation nutritionnelle de la réponse immunitaire et inflammatoire associée aux pathologies chroniques comme le cancer et sur l'étude des interactions entre les cellules et leur micro-environnement.

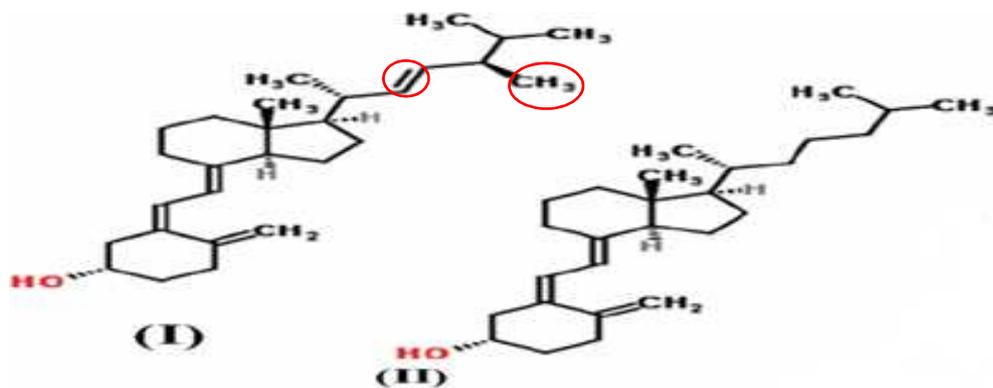


Figure 1. Structure chimique des différentes formes de la VitD

(I) ergocalciférol (VitD2) et (II) cholécalciférol (VitD3). La chaîne latérale de la VitD2 diffère de celle de la VitD3 par la présence d'une double liaison entre les carbones 22 et 23 et un groupe méthyl sur le carbone 24. (Dutau et al. 2012).

Tableau 1. Teneurs des aliments naturellement riches ou enrichis en VitD (d'après Souberbielle et al. 2013)

	SOURCE	QUANTITE OU VOLUME (en g ou mL)	TENEUR (en µg ou UI)
VITAMINE D2	Champignons séchés au soleil: Shiitake séché	100 g	20-25 µg (800-1000 UI)
	Huile de foie de morue	100 mL	500 µg (20 000 UI)
VITAMINE D3	Saumon, hareng, thon sauvage	100 g	15-25 µg (600-1000 UI)
	Saumon d'élevage	100 g	7-10 µg (280-400 UI)
	Sardines à l'huile	100 g	7,5 µg (300 UI)
	Huitres	100 g	10 µg (400 UI)
	Truite	100 g	5 µg (200 UI)
	Jaune d'œuf	100 g	2-3 µg (80-120 UI)
	Sole	100 g	2 µg (80 UI)
	Brochet	100 g	2 µg (80 UI)
	Foie de veau	100 g	0,5 µg (20 UI)
	Laitages ou céréales enrichis en vitamine D	100 g ou 100 mL	1,25 µg (50 UI)

I VITAMINE D

Au XXI^{ème} siècle, le déficit en vitamine D (VitD) est un problème mondial touchant 1 milliard de personnes. Une carence sévère en VitD provoque l'ostéomalacie chez l'adulte, le rachitisme chez l'enfant ou l'ostéoporose qui peut conduire à des fractures osseuses chez l'adulte, en raison de l'absorption réduite du calcium (*Holick 2017*).

Un regain d'intérêt scientifique et médical pour la VitD s'est développé puisque des études récentes ont établi que le déficit en VitD est un facteur de risque de nombreuses pathologies telles que le diabète de types 1 et 2, les maladies cardiovasculaires, l'obésité, les maladies inflammatoires de l'intestin, certaines maladies neurologiques et certains cancers comme le cancer du côlon, du sein, de la prostate et de l'ovaire (*Pinkas et al. 2017; Jeon and Shin 2018; Vranić, Mikolašević, and Milić 2019*).

Dans cette partie, nous détaillerons l'historique, les sources, le métabolisme ainsi que les méthodes de dosage de la VitD. Nous aborderons ensuite les conséquences d'un déficit en VitD, les effets génomiques et non génomiques de la VitD, ainsi que son implication dans différents processus physiologiques telles que la physiologie minérale, cutanée, glycémique, neuronale et cardiovasculaire.

I.1 Historique de la VitD

Le déficit en VitD était défini, autrefois, par les signes cliniques du rachitisme. Le rachitisme, maladie infantile due à un développement squelettique altéré, se caractérise par la distorsion des os, la formation de nodules osseux et par la fermeture retardée des fontanelles (*O'Riordan 2006*). C'est en Angleterre, en 1634, que le terme de rachitisme (terme dérivé de l'ancien anglais « wricken », « se plier » en français) est répertorié comme cause de décès dans le "Bill of Mortality" de Londres. En Europe, le rachitisme est dénommé la « maladie anglaise » puisqu'endémique dans les grandes villes britanniques à la fin du 18^{ème} siècle (*O'Riordan 2006*).

C'est au début du 19^{ème} siècle qu'il a été constaté en Europe que l'huile de foie de morue pouvait guérir le rachitisme (*Rajakumar 2003*) et qu'il existait une relation entre le rachitisme et le manque de lumière solaire. Ainsi, en 1822 il a été remarqué que le rachitisme est plus fréquent chez les enfants habitant dans la ville de Varsovie que chez ceux vivant à la campagne, et que la moindre exposition au soleil en est la raison sous-jacente (*Holick 1994*). Dès 1878 au Pays de Galles, les enfants atteints de rachitisme sont exposés au soleil sur les balcons des hôpitaux. Il est également noté que la prévalence du rachitisme est plus élevée dans les zones de latitude tempérée ou de forte pollution atmosphérique (*Holick 1994*). Après la Première Guerre mondiale, une étude réalisée dans un hôpital de Vienne a comparé chez des enfants atteints de rachitisme différents traitements: lampe à rayons

Tableau 2. Apports nutritionnels recommandés (ANSES 2019, consulté le 18/12/2020)

<https://www.anses.fr/fr/content/vitamine-d>

TRANCHE D'AGE	ANC (µg/jour)	ANC (UI/jour)
Enfants (1 à 3 ans)	10	400
4 à 19 ans	5	200
Adultes	5	200
Personnes âgées	10 à 15	400 à 600
Femmes enceintes et allaitantes	10	400

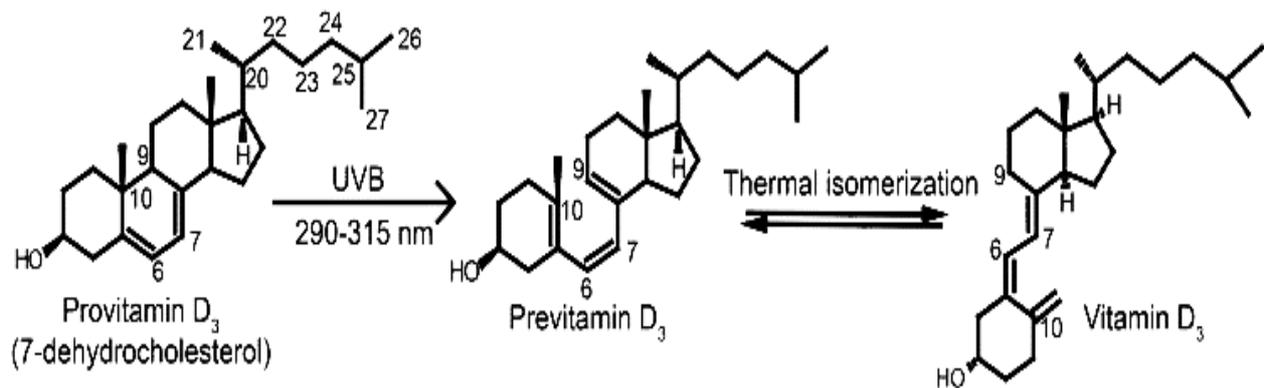


Figure 2. Synthèse endogène de la VitD (Borel et al. 2015)

ultraviolets B (UVB), lumière du soleil, huile de foie de morue ou combinaison de lampe UVB et d'huile de foie de morue. Les enfants qui ont reçu l'association huile de foie de morue et lampe UVB ont été guéris du rachitisme le plus rapidement. Une observation intéressante a montré que même l'exposition partielle du corps aux UVB permet une guérison complète de l'organisme (*O'Riordan. 2006*).

En 1921, il a été révélé la présence dans l'épiderme d'une substance qui devient « anti-rachitique » lorsqu'elle est exposée aux UV. La même année, après induction d'un rachitisme expérimental chez des rats, la guérison est obtenue par traitement des animaux avec de l'huile de foie de morue. Par la suite, le composé aux propriétés antirachitiques de l'huile de foie de morue a été défini comme une vitamine et, comme c'était la quatrième vitamine découverte, elle a été dénommée « Vitamine D » (*Holick MF 1994, Rajakumar K 2003*).

En 1952, la première synthèse de VitD3 a été réalisée. En 1958, la protéine plasmatique vectrice de la vitamine, la DBP (Vitamin D Binding Protein) a été décrite. Au cours des années soixante, le métabolite de la VitD, la 25-hydroxyvitamine D (25-OHD: 25D) a été découvert et il a été établi qu'il est produit dans le foie (*Holick MF 1994*). Le métabolite biologiquement actif de la VitD, la 1,25-dihydroxyvitamine D (1,25 (OH)₂D: 1,25D) a été découvert à la fin des années soixante et sa production a été initialement décrite dans les reins. La structure chimique de ce métabolite a été confirmée en 1971 (*Rajakumar K 2003*). En 1980, la synthèse de la VitD dans l'épiderme exposé aux UV a été démontrée. À la suite de ces travaux, la communauté scientifique a envisagé de définir la VitD en tant qu'hormone (*Rajakumar K 2003*). De nos jours, la définition du déficit en VitD n'est plus clinique mais basée sur le taux sanguin de 25D (*Herrmann M et al. 2017*).

I.2 Sources et apports nutritionnels conseillés

La VitD fait partie de la famille des sécostéroïdes liposolubles dérivés du cholestérol. Les sécostéroïdes se caractérisent par la présence d'un cycle ouvert. À ce jour, plus de 50 métabolites de la VitD avec des activités biologiques différentes ont été décrits. Les deux formes principales de la VitD sont la D3 (cholécalférol) et la D2 (ergocalciférol), qui se différencient par la structure de leurs chaînes latérales. La chaîne latérale de la VitD2 diffère de celle de la VitD3 par la présence d'une double liaison entre les carbones 22 et 23 et un groupe méthyl sur le carbone 24 (Figure 1) (*Horst RL et al. 2005*). La VitD3 est la forme synthétisée par l'homme. Les VitD2 et VitD3 exogènes peuvent être obtenues en faible quantité à partir de l'alimentation, et en quantité plus importante à partir d'aliments enrichis ou de compléments vitaminiques (*National Institutes of Health 2005*). La VitD apportée par l'alimentation, aussi bien VitD2 que VitD3, est lentement absorbée dans la partie proximale de l'intestin grêle (*Landrier et al. 2014*). Comme les vitamines A, E et K, c'est une vitamine liposoluble. De ce fait, après émulsion dans l'estomac résultant du brassage des aliments,

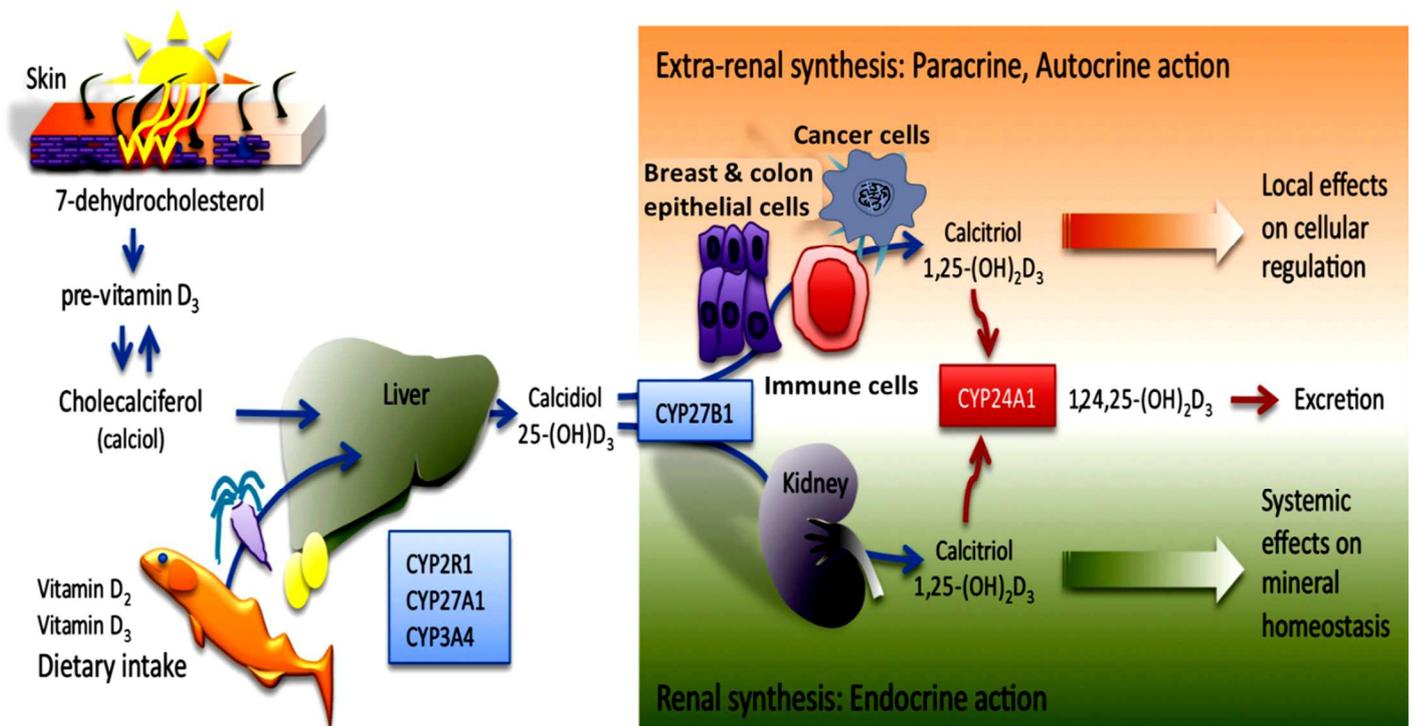


Figure 3. Métabolisme de la VitD

Les rayons UV-B agissent sur le 7-déhydrocholestérol dans le derme pour former la pré-VitD₃ qui, après isomérisation thermogénique, donne le cholécalciférol (calciferol). De plus, la VitD₂ et la VitD₃ peuvent être fournies par l'apport alimentaire. La VitD₃ active est formée par deux hydroxylations séquentielles dans le foie et les reins, pour produire respectivement 25-(OH) D₃ (calcidiol) et 1,25 (OH)₂ D₃ (calcitriol, forme active). En plus de la synthèse rénale, d'autres types de cellules, tels que les kératinocytes, les cellules épithéliales saines et cancéreuses de la glande mammaire et du colon et les cellules du système immunitaire, ont la capacité de produire la 1,25D. La 1,25D produite dans les tissus extra-rénaux agit localement de manière paracrine/autocrine et ne contribue généralement pas au pool de VitD circulant (*Fibla et Caruz 2010*).

elle est incorporée comme les acides gras et les monoglycérides, dans des micelles mixtes formées avec des sels biliaires, complexes hydrosolubles qui facilitent la diffusion de leurs constituants à travers la paroi des entérocytes. À l'intérieur de la cellule intestinale, la VitD est incorporée dans des chylomicrons, ce qui lui permet de quitter le pôle basal de la cellule pour gagner la circulation lymphatique, puis la circulation générale et le foie ([Holick, 2007](#)).

La VitD2 est présente dans certaines plantes, les champignons et la levure et la VitD3 (cholécalférol) provient de sources animales comme le poisson, la viande, le lait et les œufs ([Tableau 1](#)). L'enrichissement de certains aliments, tels que le lait et la margarine, peut également contribuer de manière significative à l'apport alimentaire en VitD ([Holick 2017](#)). L'apport alimentaire en VitD, de l'ordre de 100 à 200 UI/j (1 UI = 0,025 µg) couvre 10 à 20% des besoins quotidiens estimés selon les auteurs entre 400 et 2000 UI/j ([Bouvard et al. 2010](#)). D'après l'enquête INCA3 ([ANSES 2019](#)), les principaux aliments contributeurs pour les adultes français sont les poissons (38,3%), les œufs (9,9%) et les fromages (8,2%). En France, l'ANSES ([ANSES 2019](#)) a établi en 2019 les valeurs d'apports nutritionnels conseillés (ANC), pour la population adulte française. Ces valeurs s'échelonnent de 5 µg/jour (200 UI/j) par jour pour les enfants de plus de 4 ans jusqu'à 15 µg/j pour les personnes âgées ([Tableau 2](#)).

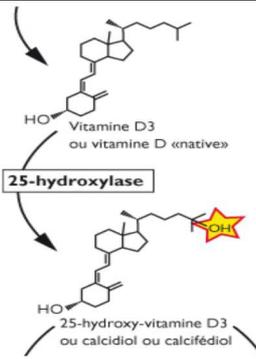
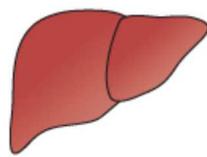
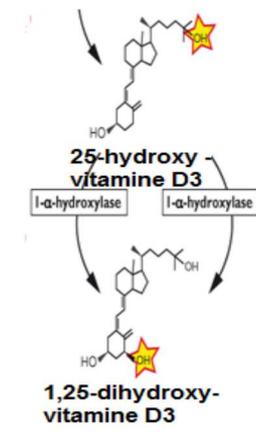
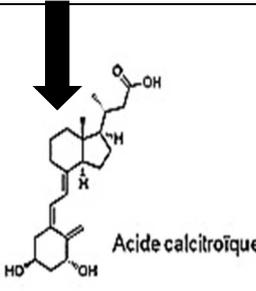
Pour les hommes et les femmes de +18 ans, le besoin nutritionnel moyen est 10 µg/j (400 UI/j) et la référence nutritionnelle pour la population est 15 µg/j (600 UI/j). Une modification de la limite supérieure de sécurité passe de 50 à 100 µg/j ([ANSES 2019, consulté le 18/12/2020](#)).

I.3 Métabolisme de la VitD

Le métabolisme de la VitD est un processus complexe impliquant l'action du rayonnement UV et des étapes d'hydroxylation enzymatique tant dans la synthèse que dans le catabolisme. La principale source de VitD chez l'homme est la production endogène par synthèse au niveau de l'épiderme à partir du 7-déhydrocholestérol sous l'action des UV. Le 7-déhydrocholestérol, également appelé pro-VitD3, est un intermédiaire dans la voie de synthèse du cholestérol, formé à l'avant-dernière étape de cette biosynthèse. Le cholestérol est essentiel au maintien de la fonction de barrière épidermique et joue également un rôle dans la régulation de la différenciation épidermique et de la desquamation ([Elias et al. 2014](#)). L'épiderme est donc un site actif de synthèse *de novo* du cholestérol, qui fournit une source de 7-déhydrocholestérol ([Glossmann 2010](#)). Le 7-déhydrocholestérol est présent dans la membrane plasmique des cellules du derme et de l'épiderme, les concentrations les plus élevées étant dans les cellules de la couche basale de l'épiderme ([Tsiaras and Weinstock 2011](#)).

La synthèse de la VitD dans l'épiderme débute quand le 7-déhydrocholestérol absorbe le rayonnement UV-B d'une longueur d'onde comprise entre 290 et 315 nm. L'absorption de cette énergie rompt la liaison entre les carbones 9 et 10 pour former un 9, 10 sécostéroïde instable, ou pré-VitD3 ([Chen et](#)

Tableau 3. Enzymes du métabolisme de la VitD

ENZYME	GENE CODANT	ROLE	REACTION CATALYSEE	LIEU DE LA REACTION
25-hydroxylase	CYP2R1 CYP27A1, CYP3A4 CYP2D5	Hydroxylation de la vitamine D en 25-OHD	 <p>Vitamine D3 ou vitamine D «native»</p> <p>25-hydroxylase</p> <p>25-hydroxy-vitamine D3 ou calcidiol ou calcifédiol</p>	<p>Foie</p> 
1- α hydroxylase	CYP27B1	Hydroxylation de la 25-OHD en 1,25 (OH) ₂ D	 <p>25-hydroxy vitamine D3</p> <p>1-α-hydroxylase</p> <p>1,25-dihydroxy-vitamine D3</p>	<p>Reins</p>  <p>et autres sites extra-rénaux: os, placenta, prostate, kératinocytes, macrophages, lymphocytes, cellules épithéliales du côlon, du sein, cellules des îlots du pancréas</p>
24- hydroxylase	CYP24A1	Oxydation de la forme active 1,25(OH) ₂ D en acide calcitroïque	 <p>Acide calcitroïque</p>	<p>Expression ubiquitaire</p>

al. 2013). Cette rupture permet une rotation spontanée autour de la liaison des carbones 5 et 6, ce qui conduit à la formation d'un isomère plus stable thermodynamiquement, la VitD3 (Figure 2). Les interactions moléculaires de la pré-VitD3 (demi-vie: 2,5h) avec la bicouche lipidique de la membrane cellulaire permettent de la maintenir dans une conformation (s-cis: une conformation où les deux doubles liaisons sont du même côté d'une liaison sigma) ce qui facilite le processus d'isomérisation (*Chen et al. 2013*). Ce processus supprime les interactions hydrophobes et hydrophiles qui retiennent la molécule dans la membrane cellulaire et permet alors l'expulsion de la VitD3 dans le liquide interstitiel. La présence de la protéine de liaison à la VitD (DBP) dans les capillaires du derme maintient un gradient de concentration de VitD plus important dans le liquide interstitiel, ce qui favorise la diffusion de la VitD du liquide interstitiel vers la circulation (*Whyte et al. 1979*).

Deux réactions d'hydroxylation sont nécessaires pour convertir la VitD en une forme biologiquement active. La première hydroxylation se produit dans le foie sur le carbone 25, principalement catalysée par l'enzyme CYP2R1 du cytochrome P450, bien que d'autres enzymes P450 peuvent aussi catalyser cette hydroxylation, notamment CYP27A1, CYP3A4 et CYP2D5 (Figure 3, Tableau 3) (*Lehmann 2005; Christakos et al. 2010*). La 25D ainsi produite peut alors subir une hydroxylation sur le carbone en position 1 dans les tubules proximaux du rein sous l'action de l'enzyme CYP27B1 du cytochrome P450 pour obtenir la 1,25D (Figure 3, Tableau 3). Cette 1 α -hydroxylation se produit également dans de nombreux tissus extra-rénaux, tels que les os, les kératinocytes, les macrophages, les lymphocytes T, les cellules épithéliales du côlon et du sein, les cellules des îlots pancréatiques, les cellules de la médullosurrénale, du cortex cérébral et cérébelleux, le placenta et la prostate (Tableau 4) (*Lehmann 2005*). La 1,25D produit par les tissus extra-rénaux agit localement comme un facteur de signalisation autocrine ou paracrine et ne contribue pas de manière significative au pool circulant de 1,25D (*Christakos et al. 2010*).

Le catabolisme de la VitD commence par une 24-hydroxylation et aboutit à la formation d'acide calcitroïque, qui est excrété ensuite dans la bile. Des études utilisant l'enzyme purifiée CYP24A1 ont montré que la 24-hydroxylation n'est que la première étape de cette voie d'oxydation du carbone 24, voie inductible qui transforme en cinq étapes les métabolites hydroxylés de la VitD en produits tronqués hydrosolubles, comme l'acide calcitroïque (Figure 3, Tableau 3). Contrairement aux enzymes CYP27A1, CYP2R1 et CYP27B1, localisées principalement dans le foie et le rein, CYP24A1 est exprimée dans tous les organes cibles de la VitD (intestin, rein, foie, peau, os, cerveau, macrophage, fibroblaste...) contrôlant ainsi le taux de VitD3 active. Le substrat préférentiel du CYP24A1 est la 1,25D mais l'enzyme catalyse également le catabolisme de la 25D en 24,25-(OH)₂D (*Bosworth et al. 2012*). Le taux de 24,25-(OH)₂D peut atteindre dans la circulation des valeurs allant jusqu'à 10 ng/mL et, bien qu'il s'agisse d'un catabolite, elle conserve une certaine activité biologique sur les chondrocytes, les plaques de croissance osseuse et la glande parathyroïde (*Bosworth et al.*

Tableau 4. Types de cellules exprimant à la fois la CYP27B1 et le VDR (*Chang et al. 2019*)

CELLULES CO-EXPRIMANT CYP27B1 ET VDR FONCTIONNELS	
Macrophage	Cellule dendritique
Lymphocyte	Entérocyte
Cellule parathyroïdienne	Trophoblaste fœtal
Ostéoblaste	Cellule épithéliale prostatique
Ostéoclaste	Cellule endothéliale vasculaire
Kératinocyte	Cellule β pancréatique
Cellule épithéliale mammaire	Cellule tubulaire rénale
Cellule du cortex cérébral et cérébelleux	Cellule stromale déciduale

2012). Il existe d'autres voies cataboliques de la VitD, certaines produisant des intermédiaires ayant une activité biologique. L'activité enzymatique de CYP24A1 peut s'exercer également sur le carbone 23 : chez l'homme, cela se produit dans environ 10% des hydroxylations (Jones, Prosser, and Kaufmann 2014). Cette 23-hydroxylation oriente la molécule de VitD vers une voie métabolique qui aboutit à la formation de 1,25-(OH)₂D-26,23-lactone (Figure 3). CYP24A1 peut également cataboliser les métabolites de la VitD2 par une série de réactions d'hydroxylation, y compris au niveau des carbones 26 et 28, ainsi que par un clivage direct de la liaison entre les carbones 24 et 25 (Jones, Prosser, and Kaufmann 2014).

Le transport sanguin des différentes formes de VitD est assuré par une protéine spécifique, la DBP. La DBP, structurellement apparentée à l'albumine (ALB), est synthétisée dans le foie (Laing et al. 2005). Sa concentration dans le plasma est de l'ordre de 5-6 mmol/L, environ vingt fois plus importante que celle de la VitD. Cet excès permet aux différents métabolites de la VitD d'être liés à hauteur de 88 % environ à la DBP. Leur accès aux cellules cibles s'en trouve limité, et leur élimination par voie biliaire, freinée. Leur liaison à la DBP rend donc les métabolites de la VitD plus stables et prolonge leur demi-vie dans la circulation sanguine. La DBP est une protéine de liaison de grande capacité transportant 95 à 99% de la 25D, le reste circulant lié à l'ALB et aux lipoprotéines par des liaisons non spécifiques de faible énergie (Bouillon 2011). Son affinité est forte pour les formes 25D, 24,25-OH₂D et 25,26-OH₂D que pour la 1,25D. Les métabolites de la VitD2 se lient à la DBP par des interactions similaires mais de manière légèrement moins efficace que leurs homologues D3. (Bouillon 2011).

I.4 Marqueurs biologiques du statut en VitD

La 25D, ayant une demi-vie relativement longue de 2 à 3 semaines, est actuellement reconnue comme biomarqueur du statut en VitD comparativement à la 1,25D qui a une demi-vie courte de 10-20 h (Holick 2017). La concentration sanguine est exprimée en nanomole par litre (nmol/L) ou en nanogramme par millilitre (ng/ml). Ces unités sont liées par la relation : 1 nmol/L = 0,4 ng/ml. Lorsque la concentration sérique de 25D est supérieur à 30 ng/ml (75 nmol/L), le statut vitaminique D peut être considéré comme optimal. Biologiquement, le métabolite le plus actif de la VitD, la 1,25D, ne convient pas à la mesure du statut de la VitD pour de nombreuses raisons. En effet, en cas d'hyperparathyroïdie secondaire due à un déficit léger ou modéré en VitD, la 1,25D du plasma est maintenu à un niveau normal voire légèrement élevé (Herrmann et al. 2017). De plus, le taux plasmatique de la 1,25D est de l'ordre de 100 fois moins élevé que celui de la 25D, celle-ci étant convertie localement dans les tissus périphériques en 1,25D pour couvrir les besoins locaux (Holick 2017).

Tableau 5. Principales caractéristiques des trousse de dosage par ELISA de la 25D murine

FOURNISSEUR	REFERENCE	RANGE (ng/mL)	SENSIBILITE (ng/mL)	PRECISION (%)
LifeSpan BioSciences	LS-F5643	2,47-200	0,91	<10
Biomatik	EKU02021	2,47-200	0,91	<10
Eagle Bioscience	VID21-K01	9 – 150	4,78	<10
MyBioSource,com	MBS263918	3,12- 200	0,6	8
Aviva Systems Biology	OKEH02569	1,25 - 80	1,27	4,3
Antibodies-online	ABIN2648855	1,56 - 100	0,95	<10

I.4.1 Dosage de la 25D

En biologie clinique, le dosage de la 25D sérique est réalisé pour le dépistage et le suivi de l'insuffisance ou la carence en VitD, pour la surveillance de la réponse à la supplémentation en VitD et éviter tout risque de toxicité par surcharge (*Zhang et al. 2017*).

Le dosage de la 25D présente quelques écueils qui s'avèrent délicats à surmonter malgré les progrès technologiques récents. Le dosage de 25D doit permettre de distinguer la 25D2 de la 25D3. De plus, comme la 25D est une molécule hydrophobe qui circule liée à la DBP, à l'ALB ou aux lipoprotéines, il est nécessaire de la dissocier de ses protéines porteuses avant quantification. Comme 25D2 et 25D3 ont des constantes d'affinité différentes pour ces protéines vectrices, l'étape de dissociation doit être très efficace pour obtenir une quantification précise de la 25D totale (*Zhang et al. 2017*).

Les méthodes courantes de dosage de la 25D sérique sont de trois types : immunodosage (ELISA, Enzyme-linked immunosorbent assay), LC-MS /MS (liquid chromatography coupled to tandem-mass spectrometry) et HPLC (High-performance liquid chromatography) (*Holick 2017*).

* L'immunodosage et le radio-immunodosage (RIA) sont largement reconnus comme des méthodes standards de détermination de la 25D en raison de leur simplicité et de leur coût réduit. L'immunodosage par ELISA ou RIA donne des résultats quantitatifs précis du taux de 25D totale. Par contre, ces dosages ne distinguent pas la 25D2 de la 25D3 du fait de la spécificité des anticorps utilisés. Comme ces anticorps ne se lient pas à la 25D2 de façon similaire à la 25D3, cela peut conduire à une sous-estimation ou à une sur-estimation de la 25D totale. Un autre problème de spécificité est la réactivité croisée avec d'autres métabolites de la VitD. Ainsi, la 24,25(OH)₂D₃, qui représente de l'ordre de 10 à 15% de la concentration de 25D, conduit à une surestimation du taux de 25D (*Herrmann et al. 2017*). L'épi-25D, résultant de l'épimérisation de 25D, dont le taux est élevé chez le nouveau-né jusqu'à l'âge d'un an et qui représente chez l'adulte environ 9% de 25D, n'influence pas les résultats d'immunodosage car les anticorps utilisés ne la reconnaissent. De nombreux kits d'immunodosage sont disponibles dans le commerce, rapide, automatisable et d'un coût modique (*Zhang et al. 2017*). Les caractéristiques de quelques kits commerciaux pour le dosage de la 25D murine sont présentés dans le **tableau 5**.

* La technique de LC-MS/MS est utilisée comme méthode de référence pour la validation des trousseaux d'immunodosages. La LC-MS /MS permet de différencier la 25D2 de la 25D3 et même de la 24,25(OH)₂D₃, du fait de leur différence de masse. Par contre, elle ne permet pas de distinguer les deux épimères de la 25D en raison de leur masse et de leur affinité similaire pour la plupart des colonnes LC, ce qui entraîne une surestimation de la 25OH (*Zhang et al. 2017*). Bien que la LC-MS /MS est considérée comme la technique la plus performante pour l'identification et la quantification des analytes, sa technicité et son coût élevés limitent son application en biologie de routine. La limite de

Tableau 6. Comparaison des techniques de dosage des 25D et 1,25D par LC-MS /MS et immuno-essais (ELISA) : avantages et inconvénients (d'après Dirks et al, 2018)

METABOLITE	LC-MS/MS		IMMUNO-ESSAI (ELISA)	
	Avantages	Inconvénients	Avantages	Inconvénients
25D	<ul style="list-style-type: none"> • Préparation d'échantillons adaptable • Spécificité 	<ul style="list-style-type: none"> • Complexité • Difficile de séparer l'épi-25D3 du 25D3 (même masse et même comportement chromatographique) 	<ul style="list-style-type: none"> • Rapide • Opération facile • Pas de réactivité croisée avec epi-25D 	<ul style="list-style-type: none"> • Pas de distinction entre 25D2 et 25D3 • Réactivité croisée avec métabolites de la VitD reconnus par l'anticorps, tels que 24,25(OH)2D
1,25D	<ul style="list-style-type: none"> • Préparation d'échantillons adaptable • Spécificité 	<ul style="list-style-type: none"> • Complexité • Sensibilité • Réactivité croisée possible des interférences isobares 	<ul style="list-style-type: none"> • Rapide • Opération facile • Sensibilité 	<ul style="list-style-type: none"> • Pas de distinction entre 1,25D2 et 1,25D3 • Réactivité croisée avec métabolites de la VitD reconnus par l'anticorps, tels que 25D3, 24,25(OH)2D

détection de cette technique est de 0,8 ng /ml et sa linéarité s'étend de 0 à 220 ng /ml, ce qui couvre bien la plage de variabilité des valeurs sériques de 25D (*Herrmann et al. 2017*). Les avantages et les inconvénients des deux techniques, immunodosage et LC-MS /MS, sont résumés dans le **tableau 6**.

* La séparation et la quantification de la 25D ont également été développées par HPLC, sur phase normale ou inversée ou une combinaison des deux, couplée à une détection UV. La préparation des échantillons et l'interprétation du chromatogramme sont délicates et longues, ce qui limite l'utilisation de cette technique en biologie clinique. Cependant, cette méthode HPLC, de grande sensibilité et forte sélectivité, permet de nombreux développements en recherche (*Dirks et al. 2018*).

I.4.2 Dosage de la 1,25D

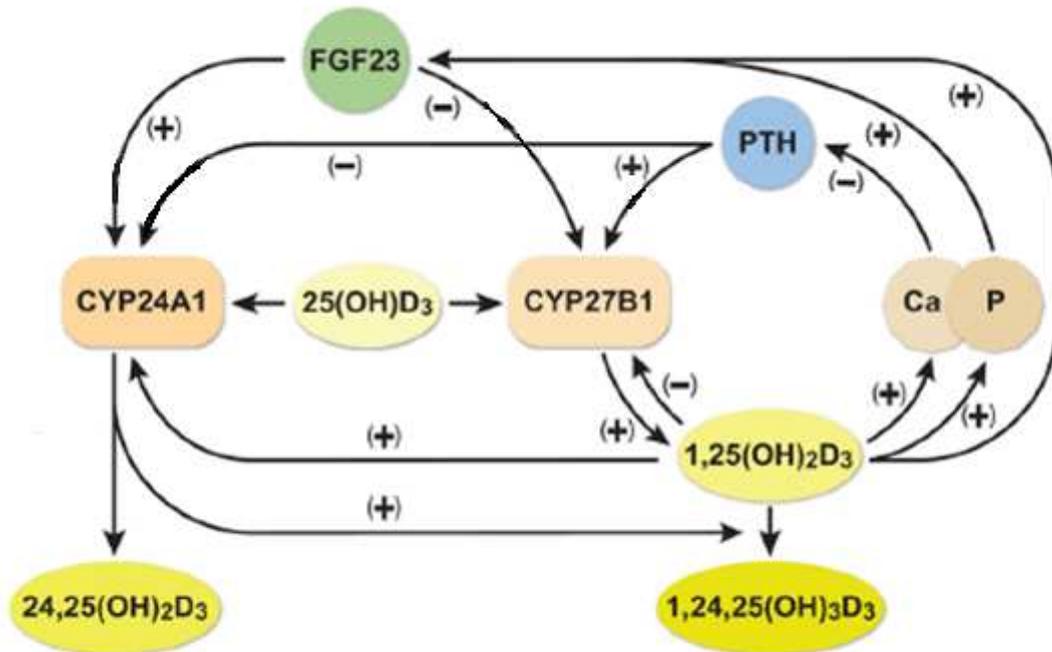
* L'immunodosage par ELISA est largement utilisé pour la quantification de la 1,25D. Le radio-immunodosage compétitif, couramment utilisé, consiste à ajouter un isotope radioactif de la 1,25D à l'échantillon à tester dans une plaque recouverte d'anticorps. Si l'échantillon ne contient pas de 1,25D, la forme liée sera uniquement de l'isotope radioactif. Au cas où de la 1,25D est présente dans l'échantillon, elle va entrer en compétition avec la 1,25D radioactive et inhiber sa liaison. Ainsi, la mesure de la radioactivité résiduelle permet le calcul du taux de 1,25D de l'échantillon. La spécificité de ces techniques d'immunodosage est limitée par la réactivité croisée avec les autres métabolites de la VitD (*Dirks et al. 2018*).

* La technique LC-MS/MS est aussi largement utilisée pour le dosage de la 1,25D. Cependant elle peut être en défaut de sensibilité pour mesurer avec précision les valeurs basses de la gamme des concentrations physiologiques de la 1,25D. Elle peut présenter également des interférences isobares comme avec la 1 β -25-dihydroxyvitamine D3. Lorsqu'une quantification différentielle de 1,25D3 et 1,25D2 est nécessaire, la LC-MS/MS est la seule option. (*Fraser et al. 2020*). Les avantages et les inconvénients des deux techniques pour le dosage de la 1,25D, immunodosage et LC-MS/MS, sont résumés dans le **tableau 6**.

I.5 Maintien de l'homéostasie de la VitD

Le point de contrôle crucial de l'homéostasie de la VitD est la production rénale de la 1,25D *via* la CYP27B1. En effet, la 1,25D régule sa propre production par plusieurs mécanismes directs et indirects. Au niveau du rein, elle agit directement par rétrocontrôle négatif sur l'expression de la CYP27B1. La 1,25D réduit également la synthèse de l'hormone parathyroïdienne (PTH) qui stimule la transcription de la 1 α -hydroxylase, ainsi la 1,25D diminue indirectement sa propre production (*Kim and Je 2014*). La 1,25D en concentration élevée augmente l'expression du facteur phosphaturique, le Facteur de croissance des Fibroblastes 23 (FGF23, Fibroblast Growth Factor). Ce FGF23 inhibe

Renal vitamin D metabolism



NRTC local vitamin D metabolism

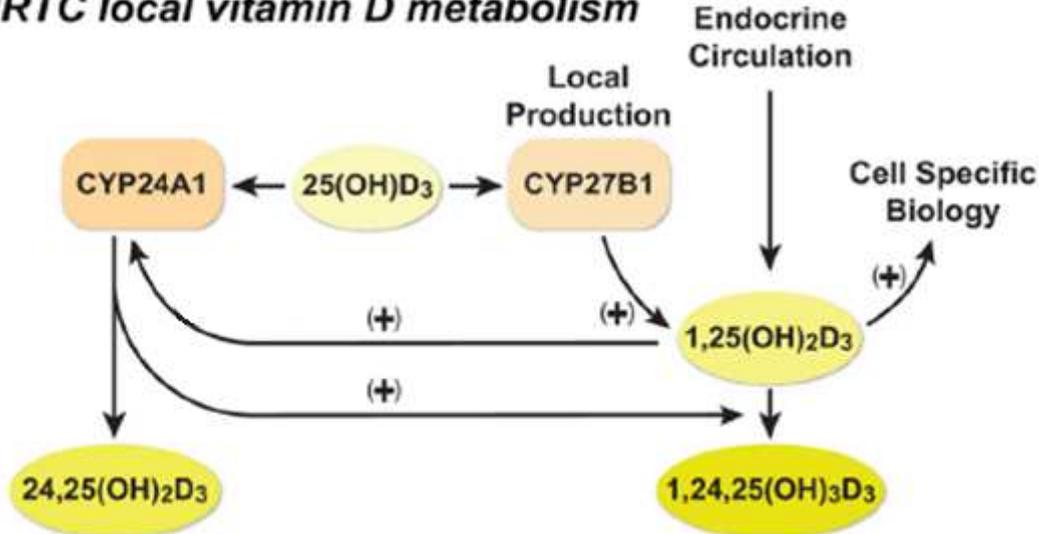


Figure 4. Métabolisme de la VitD dans les tissus rénaux et extra-rénaux.

Schéma récapitulatif de la régulation du métabolisme et de l'homéostasie de la vitamine D sérique dans les cellules cibles rénales (en haut) et extra-rénales (NRTC, Non renal target cells, en bas). La synthèse de la 1,25D au niveau extra-rénal ne contribue pas à sa concentration sérique, (+) : Stimulation, (-) : rétrocontrôle négatif (Meyer et al, 2020),

l'expression de la 1α -hydroxylase dans le rein, ce qui résulte en la diminution de la production de 1,25D (Figure 4) (Prié and Friedlander 2010). Un excès d'apport alimentaire en calcium et en phosphate réduit également l'activité de la 1α -hydroxylase. La régulation de l'expression de l'enzyme catabolique CYP24A1 dans le rein est une autre voie de contrôle de l'homéostasie de la VitD. La 1,25D et le FGF23 induisent une stimulation de l'expression de CYP24A1, tandis qu'une augmentation de la PTH et une faible teneur en calcium diminue son expression (Figure 4) (Prié and Friedlander 2010).

Contrairement à son expression dans les reins, la CYP27B1 des tissus extra-rénaux n'est pas influencée par des facteurs calciques, mais répond à des facteurs cellulaires spécifiques. Par exemple, l'expression de CYP27B1 dans les macrophages est augmentée par des facteurs inflammatoires telles que l'interféron- γ et le lipopolysaccharide (Stoffels et al. 2007). De même, l'expression de CYP27B1 dans les kératinocytes est majorée par des messagers de l'inflammation en fonction du stade de développement des cellules (Herrmann et al. 2017). Les tissus extra-rénaux sont également en mesure de cataboliser la 1,25D localement du fait de l'expression de la CYP24A1. L'exposition aux agonistes du VDR augmente l'expression de CYP24A1 dans ces tissus. Ce catabolisme permet de désactiver localement le signal autocrine/paracrine de la 1,25D et fait que la 1,25D produite dans ces tissus ne contribue pas au pool circulant (Figure 4) (Herrmann et al. 2017).

1.6 Déficience en VitD : focus sur l'obésité

Il n'existe pas actuellement de définition universelle du déficit en VitD basée sur la concentration sérique en 25D. Le statut vitaminique D est qualifié d'optimal pour un taux sérique de 25D compris entre 30 ng/ml (75 nmol/L) et 100 ng/ml (250 nmol/l). L'insuffisance est définie par un taux de 25D inférieur à 30 ng/ml considérée comme le seuil en dessous duquel apparaît une hyperparathyroïdie secondaire, impliquant un remodelage osseux accéléré et une diminution de la densité minérale osseuse en particulier au niveau de l'os cortical. Cette insuffisance se catégorise en déficience, définie par un taux de 25D compris entre 10 et 30 ng/ml et en carence, pour un taux inférieur à 10 ng/ml (25 nmol/L) (Tableau 7) (Holick 2017).

Plusieurs causes ou conséquences physio-pathologiques sont liées au statut en VitD : par exemple, les personnes souffrant de maladies inflammatoires chroniques, telles que l'asthme, la maladie inflammatoire de l'intestin (MICI) ou la maladie pulmonaire obstructive chronique (BPCO), ont une prévalence plus élevée de carence en VitD (Mousa et al. 2016). La question est de savoir si la 25D permet d'exercer un effet anti-inflammatoire ou si ces pathologies inflammatoires réduisent le pool circulant de 25D. Il est possible que ces deux mécanismes soient simultanément associés : la VitD peut réduire l'inflammation tandis que le stress oxydatif dû à l'inflammation peut interférer avec le métabolisme de la VitD et ainsi réduire la 25D circulante (Mousa et al. 2016).

Tableau 7. Statut en VitD : Valeurs de référence du taux sérique de 25D actuellement retenues (*Holick 2017*)

STATUT	CONCENTRATION SERIQUE EN 25 OH	
	ng/ml	nmol/l
Optimal	30-100	75-250
Insuffisance	10-30	25-75
Carence	<10	<25
Toxicité	>100	>250

Le taux sérique de 25D chez les personnes obèses est inférieur à celui des personnes de poids normal et inversement corrélé au poids corporel, à l'IMC et à la masse grasse. Plusieurs mécanismes peuvent participer à cette plus faible teneur sérique en 25D en situation d'obésité parmi lesquels :

- une exposition au soleil plus faible ou une synthèse cutanée réduite,
- une altération de la liaison à la DBP ou une clairance métabolique plus rapide,
- une répartition du pool dans un plus grand volume de tissus corporels, en particulier une séquestration accrue de la 25D dans le tissu adipeux (*Vranić, Mikolašević, and Milić 2019*).

Le mécanisme le plus contributif est probablement la dilution volumétrique puisque la 25D est distribuée en majorité dans le sérum, le tissu adipeux, les muscles, le foie et en petite quantité, dans d'autres tissus, tous ces compartiments ayant un volume majoré en situation d'obésité. La différence de taux sérique de 25D entre les personnes obèses et celles normopondérales est plus importante en été qu'en hiver car l'augmentation estivale de la 25D sérique est plus faible chez les personnes obèses. De fait, les personnes obèses reçoivent une exposition solaire similaire à celle des personnes de poids normal et produisent la même quantité de VitD endogène, mais qui est distribuée dans un plus grand volume de sorte que le taux sérique est moindre. Il existe une différence similaire entre les personnes obèses et les personnes normopondérales en réponse à un apport oral de VitD, avec une plus faible augmentation de la 25D sérique en cas d'obésité (*Walsh, Bowles, and Evans 2017; Holick 2017*).

I.7 Effets génomiques de la 1,25D

L'analyse de la séquence primaire du récepteur de la VitD (VDR) a montré que ce récepteur appartient à la superfamille des récepteurs nucléaires (NHR, Nuclear human receptor) qui comprend plus de 350 récepteurs différents. Une caractéristique commune à tous les NHR est qu'ils agissent en régulant l'expression des gènes (*Rachez et al. 2000*).

Les actions génomiques de la forme active 1,25D sont médiées par les VDR nucléaires qui agissent comme des facteurs transcriptionnels qui modulent l'expression des gènes d'une manière dépendante du ligand.

La protéine VDR se compose de trois régions principales (Figure 5):

- un double domaine de doigt de zinc N-terminal qui se lie à l'ADN,
- un domaine C-terminal qui se lie à la 1,25D,
- une région qui relie ces deux domaines fonctionnels.

Le doigt de zinc proximal (N-terminal) porte la spécificité de la liaison de l'ADN aux Eléments de Réponse à la VitD (VDRE) tandis que le second doigt de zinc et la région suivante fournissent au moins l'un des sites d'hétérodimérisation du VDR au Récepteur Rétinoïde X (RXR). La seconde moitié de la molécule est le domaine de liaison du ligand, région responsable de la liaison de la 1,25D,

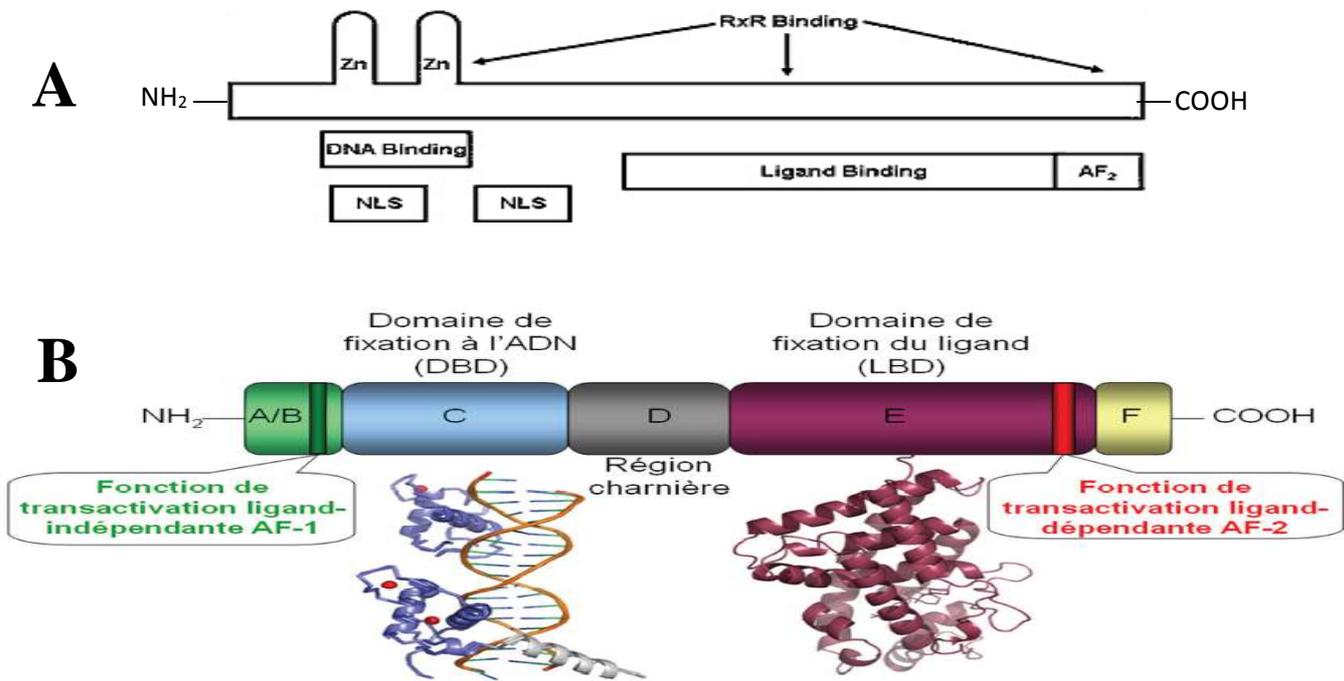


Figure 5. Récepteur de la vitamine D (VDR)

- A. **Modèle schématique du VDR** : La région N terminale est courte par rapport aux autres récepteurs des hormones stéroïdiques. Cette région est suivie de deux doigts de zinc qui constituent le principal domaine de liaison à l'ADN. Les signaux de localisation nucléaire (NLS) se trouvent à l'intérieur du côté C-terminal du domaine de liaison à l'ADN. Le domaine de liaison au ligand constitue la majeure partie de la région C-terminale de la molécule, Le domaine AF2 est en grande partie responsable de la liaison à des co-activateurs tels que la famille SRC et DRIP en présence de ligand. Les régions sur le deuxième doigt de zinc et dans le domaine de liaison du ligand facilitent l'hétérodimérisation avec RXR, La liaison du corépresseur est moins bien caractérisée mais semble contigüe à celle des coactivateurs dans les hélices 3 et 5, région bloquée par l'hélice 12 en présence de ligand.
- B. **Organisation modulaire du VDR** : Les différents modules sont représentés par des rectangles, Les structures cristallographiques du DBD (dimère des DBDs de VDR et RXR en présence d'ADN), de la région charnière et du LBD du VDR sont également représentées dans le même code couleur (PDB 1YNW et 1DB1), Les atomes de zinc sont indiqués par des sphères rouges (*d'après Bikle 2017*).

SRC: Récepteur des Stéroïdes-1; DRIP: VitD Receptor Interacting Proteins ; RXR : Récepteur Rétinoïde X ; DBD : Domaine de fixation à l'ADN ; LBD : Domaine de fixation du ligand ; PDB : Protein Data Bank ; DB : Décibel.

qui contient également des régions nécessaires à l'hétérodimérisation au RXR. À l'extrémité C-terminale se trouve le domaine d'activation majeur, AF-2, qui est essentiel pour la liaison aux co-activateurs tels que les coactivateurs des récepteurs stéroïdiens SRC et les protéines d'interaction avec les récepteurs de la VitD (DRIP) (Figures 5, 6) (Daniel et al. 2008).

Le processus d'activation de la transcription des gènes cibles est initié par la liaison du ligand 1,25D au VDR. Cela entraîne des changements conformationnels du récepteur qui conduisent à l'hétérodimérisation avec le récepteur RXR induisant une forte spécificité et une affinité de liaison au VDRE de l'ADN du gène cible. En plus de ces hétérodimères VDR/RXR, le VDR peut former des homodimères qui se lient à l'ADN et régulent l'expression de gènes cibles (Christakos et al. 2016).

Bien qu'une variabilité significative dans la séquence des VDRE a été rapportée, les séquences de VDRE ayant une forte affinité pour le VDR consistent en deux répétitions imparfaites d'hexanucléotides espacées de trois nucléotides. Suite à la liaison de l'hétérodimère VDR-RXR au VDRE, les changements d'expression génique sont médiés par la capacité du couple récepteur-ligand à recruter des co-activateurs transcriptionnels (Figure 7). Les co-activateurs p160, activateurs des récepteurs stéroïdiens 1, 2 et 3 (SRC-1, SRC-2 et SRC-3), qui ont une activité Histone Acétyltransférase (HAT), sont des co-activateurs primaires qui se lient au domaine AF2 du couple VDR-ligand. Les SRC contiennent des motifs LxxL (x : tout acide aminé) qui facilitent la liaison au VDR et à d'autres récepteurs nucléaires. Les membres de la famille p160 recrutent des protéines comme co-activateurs secondaires, tels que CBP/p300 (qui ont également une activité HAT), résultant en un complexe multi-sous-unités qui modifie la chromatine et déstabilise l'interaction histone/ADN (Christakos et al. 2010; Haussler et al. 2013; Pike and Meyer 2014). En plus de réactions d'acétylation, des méthylations se produisent également sur les histones centrales. Les méthyltransférases peuvent également jouer un rôle fondamental dans la transcription médiée par le VDR (Seth-Vollenweider et al. 2014). Le VDR interagit aussi directement ou indirectement avec des facteurs de transcription [TFIIB et plusieurs facteurs associés aux protéines de liaison à la boîte TATA (TAF, TATA box binding protein associated factor)], aboutissant à l'établissement d'un complexe de pré-initiation stable (Christakos 2016). La transcription médiée par VDR est facilitée par un médiateur, complexe multi-protéique, qui agit sur le recrutement de l'ARN polymérase II et favorise la formation du complexe de pré-initiation (Figure 7) (Yin and Wang 2014).

Il a été rapporté que d'autres facteurs de transcription affectent l'activité transcriptionnelle de VDR. Ainsi le facteur de transcription Ets (Erythroblast Transformation Specific) activé par Ras (Rat Sarcoma) a un rôle critique dans l'induction de Cyp24a1 (Figure 8). La transcription de Cyp24a1 et d'ostéocalcine (Bglap, bone gamma-carboxyglutamic acid-containing protein : gène codant pour l'ostéocalcine) induite par VDR est réprimée par YY1 (Yin Yang 1), un facteur de transcription multifonctionnel (Christakos et al. 2016). Les membres de la famille des protéines « CAAT enhancer

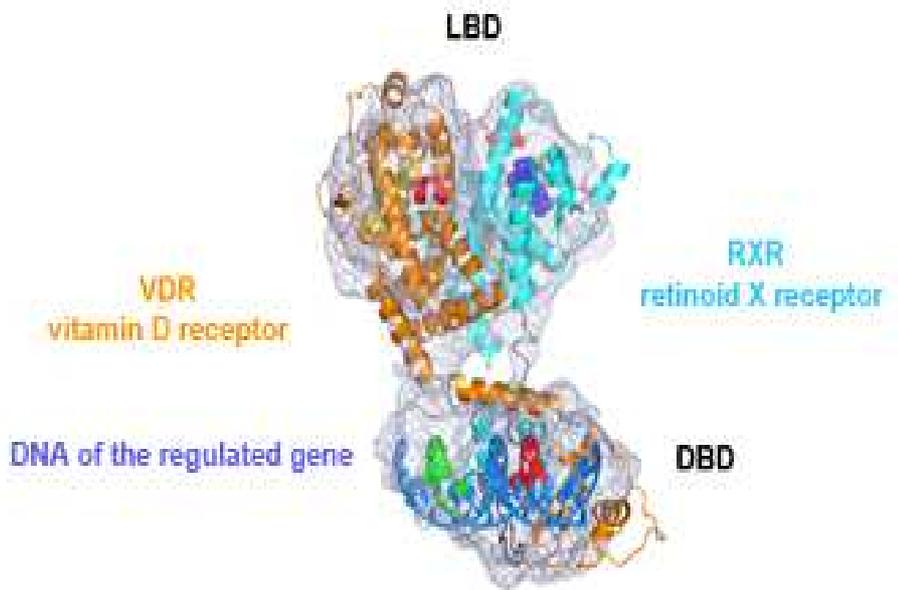


Figure 6. Visualisation 3D complète du récepteur de la vitamine D

Représentation de l'architecture 3D de deux récepteurs, le VDR (récepteur de la vitamine D) et son partenaire RXR (Retinoid X Receptor, un dérivé de la vitamine A). En mauve, la carte 3D expérimentale obtenue par cryo-EM. Les sites de liaison spécifiques sur le fragment d'ADN sont représentés en vert et en rouge. Le domaine de liaison à l'ADN (DBD) et le domaine de liaison au ligand (LBD) sont également indiqués. [Crédit: IGBMC \(CNRS / Inserm / Université de Strasbourg\)](#).

binding protein (C/EBP) » sont également des médiateurs clés de l'action de la 1,25D. L'expression de la C/EBP est induite par 1,25D dans les cellules rénales et coopère avec 1,25D et VDR pour stimuler la transcription de Cyp24a1 et Bglap. C/EBP et VDR coopèrent dans la régulation transcriptionnelle de la cathélicidine, peptide antimicrobien, dans les cellules épithéliales pulmonaires (Dhawan, Weider, and Christakos 2009).

1.8 Effets non génomiques de la 1,25D

Compte tenu de la complexité des événements de signalisation et des processus de transcription associés à la signalisation VDR, les fonctions génomiques de la VitD nécessitent du temps pour prendre effet. Cependant, il est maintenant connu que la VitD peut exercer des actions rapides au niveau cellulaire, indépendamment de l'expression des gènes, qualifiées d'effets non génomiques (Figure 8) (Hii and Ferrante 2016). Ce phénomène est observé pour de nombreuses hormones (œstrogènes, hormones thyroïdiennes...) agissant par l'intermédiaire de récepteurs nucléaires, dont les fonctions non génomiques incluent la modulation de l'activité des canaux ioniques et d'enzymes telles que des phosphatases, des protéines kinases et autres enzymes (Christakos et al. 2010). Un récepteur membranaire de la 1,25D (VDRm) a été initialement proposé du fait que certains analogues de la VitD, incapables de se lier au VDR nucléaire, pouvaient initier des réponses cellulaires rapides à la 1,25D. Une protéine de liaison spécifique pour la 1,25D, identifiée dans les membranes baso-latérales de l'épithélium intestinal de poulet, régule le transport du Ca²⁺ à travers ces membranes. Ce récepteur a été appelé « Protéine de liaison aux stéroïdes à réponse rapide associée à la membrane » (MARRS, Membrane-Associated Rapid Response Steroid-binding) (Doroudi, Schwartz, and Boyan 2015). Ce VDRm peut être visualisé à la surface membranaire pericellulaire et dans la zone périnucléaire mais non dans le noyau. Au niveau de la membrane plasmique, le récepteur est localisé au niveau des cavéoles où il se lie à la cavéoline-1 et à la phospholipase A2 (PLA2) (Figure 8) (Chen et al. 2013). Dans le cas de la VitD, les effets non génomiques, transmis en quelques secondes à quelques minutes, incluent l'ouverture des canaux ioniques Ca²⁺ et Cl⁻ voltage-dépendants, l'induction d'un second messager (Ca²⁺, AMP cyclique, acides gras, 3-phospho-inositides comme le phosphatidylinositol 3,4,5 trisphosphate) accompagnée de l'activation de protéines kinases, telles que la protéine kinase A, SRC, les protéines activées par un mitogène, MAP kinases, y compris ERK1/ERK2, ERK5 (extracellular signal-related kinase) et JNK1/JNK2 (c-Jun N-terminal kinases), protéine kinase C (PKC), Ca²⁺-calmoduline kinase II (CaMKII) et d'autres enzymes telles que la phospholipase C, la phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K), la phospholipase A2 (PLA2) et p21ras (Figure 8) (Hii and Ferrante 2016). Des études sur les effets anticancéreux de la 1,25D ont montré qu'elle induit la différenciation des lignées cellulaires de leucémie myéloïde aiguë en cellules plus matures de la lignée monocyttaire (Wang et al. 2013). Dans ces cellules, la 1,25D stimule l'activité de ERK1/ERK2

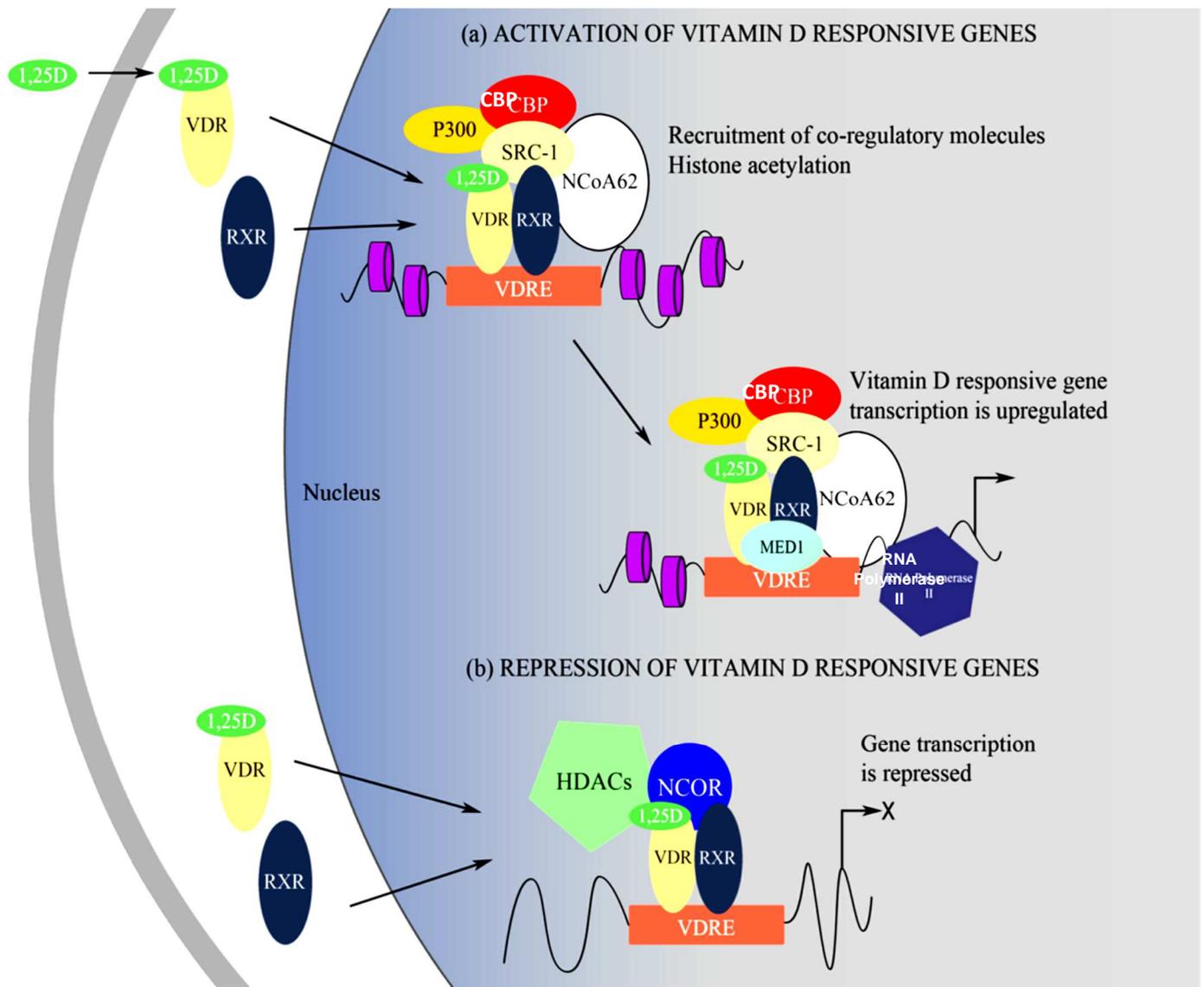


Figure 7. Actions génomiques du VDR

La 1,25D pénètre dans la cellule et se lie au VDR qui s'hétérodimérise avec RXR. Le complexe VDR-RXR se lie ensuite à un élément de réponse à la VitD dans le génome et dirige la formation d'un grand complexe transcriptionnel.

(a) Pour activer les gènes sensibles à la vitamine D, le complexe transcriptionnel (VDR-RXR-MED1) recrute des co-activateurs tels que NCoA62, le co-activateur du Récepteur des Stéroïdes-1 (SRC-1), la protéine de liaison à la CREB (CBP) et P300 pour initier l'acétylation des histones. Ensuite, VDR-RXR active l'ARN polymérase II pour déclencher la transcription génique.

(b) Le complexe VDR-RXR peut agir avec des co-répresseurs tels que le Co-Répresseur des Récepteurs Nucléaires (NCOR) et les Histones Déacétylases (HDAC) pour réprimer la transcription des gènes (Ryan et al, 2015),

MED1: Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 1, encore dénommée DRIP205.

ainsi que l'expression et l'activation de ERK5. Ces enzymes ERK1/ERK2 sont impliquées dans la régulation de la synthèse des protéoglycanes en réponse à la 1,25D. L'inhibition des ERK a peu ou pas d'effet sur l'augmentation de l'activité spécifique de la phosphatase alcaline ou sur l'inhibition de la prolifération cellulaire médiée par la 1,25D. Ces études ont montré que l'impact de la 1,25D est spécifique du type et du stade de maturation cellulaires. Dans les cellules rénales, site principal de l'inactivation de la 1,25D, les MAP kinases, telles que ERK1/ERK2, JNK1/JNK2 et ERK5, PKC, PI3K et p21ras, régulent l'activation du promoteur de CYP24A1 médiée par la 1,25D (*Dwivedi et al. 2010*). Certaines études ont démontré que la VitD module les effets des facteurs de croissance et des cytokines, tels que Wnt, TGF- β (Facteur de croissance transformant) et EGF (Facteur de croissance épidermique) en modifiant soit leurs voies de signalisation cytosoliques, soit l'activité de leurs facteurs de transcription cibles, voire même par action paracrine, en inhibant leur synthèse et leur sécrétion par des cellules voisines exprimant le VDR (*Trochoutsou et al. 2015*). Des données ont suggéré que, par la réponse non génomique, la 1,25D peut moduler la voie génomique *via* des effets médiés par le VDR nucléaire (VDRn) dans le noyau (*Christakos et al. 2010*). En effet, la 1,25D affecte certaines molécules de signalisation intracellulaire ou certains facteurs de transcription par interaction directe protéine-protéine entre le VDR et la protéine cible. Ces cibles sont la I- κ B kinase (IKK) β , l'un des régulateurs en amont de la voie canonique NF- κ B (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) (*Chen et al. 2013*), les transducteurs de signaux et activateurs de transcription (Stat)1, le facteur de transcription lié à Runt (RunX)1, c-jun, la β -caténine, la protéine de liaison aux éléments de réponse à l'AMPc (*Wei and Christakos 2015*). Ce mécanisme permet d'expliquer certains effets modulateurs que la 1,25D exerce sur l'immunité innée et adaptative, sur la réponse antivirale et la survie cellulaire. Par exemple, la 1,25D, en inhibant NF- κ B, diminue l'expression de facteurs immunomodulateurs tels que les interleukines IL-12 et IL-8, la MCP-1 (Protéine chimioattractrice de monocytes 1), le PAI-1 (Inhibiteur de l'activateur du plasminogène-1), l'angiotensinogène (impliqué dans l'hypertension associée à l'inflammation) et le microARN-155 (inhibiteur de l'expression du Suppresseur de la signalisation des cytokines-1) (**Figure 8**) (*Chen et al. 2013*). Il a été rapporté que le VDRn diminue la transcription de ces gènes en interagissant directement avec la molécule de signalisation clé IKK β . Une telle interaction empêche la phosphorylation de IKK β sur Ser177/181 nécessaire pour la formation du complexe de signalosome IKK et la phosphorylation et la dégradation en aval de I- κ B α , étape préalable à l'activation de NF- κ B (*Chen et al. 2013*). Les actions non génomiques de la 1,25D sont présentées dans la **Figure 8**.

Ainsi, les effets de la 1,25D ne dépendent pas seulement de ses actions génomiques médiées par VDRn, mais impliquent le VDRm qui participe à la régulation d'une large gamme d'actions non génomiques qui ont un impact sur des processus physiologiques généraux, y compris le remodelage

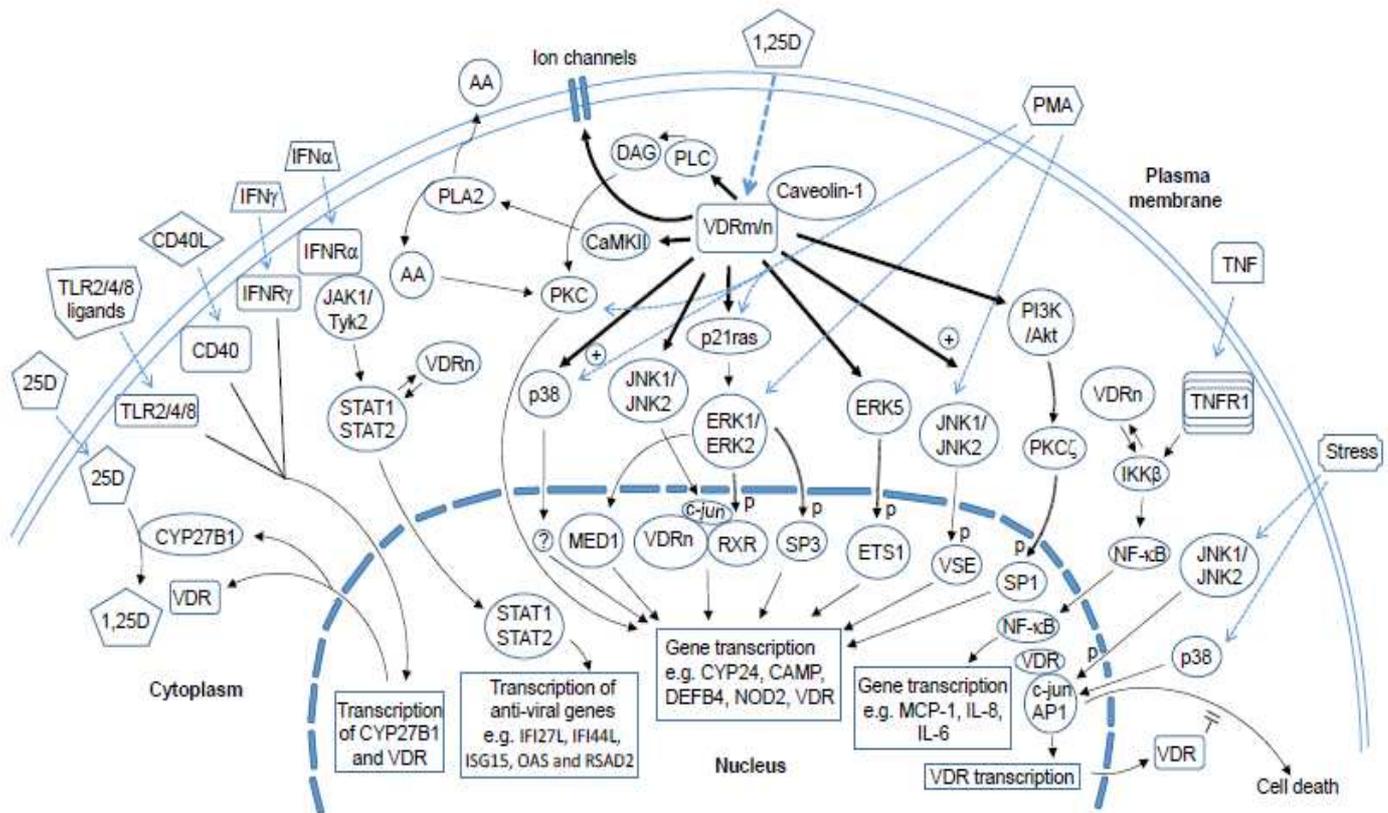


Figure 8. Les actions non génomiques de la 1,25D

Les mécanismes non génomiques, en aval de VDRn et/ou VRDM complexés à la cavéoline1, comprennent l'activation de molécules de signalisation intracellulaires, telles que PKC, PI3K, MAPkinases, CaMKII et PLA2. Les cibles de ces kinases sont les facteurs de transcription, par exemple, SP1, SP3 et RXR qui se lieent aux éléments de réponse sur les promoteurs des gènes sensibles à la vitamine D. Une autre action non génomique de la 1,25D implique la régulation de la liaison du VDR aux protéines cibles telles que STAT1 et IKKβ ce qui permet la modulation croisée par la 1,25D de l'expression génique médiée par des ligands non-VitD, y compris IFN-α et TNF-α. Ce mécanisme permet à la 1,25D de réguler directement les réponses immunitaires et les actions antivirales des cellules immunocompétentes. La liaison des récepteurs CD40, IFN-γ et TLR2/4/8 provoque une surexpression de VDR et CYP27B1 ce qui facilite, par un mécanisme autocrine, la disponibilité de la 1,25D et du VDR. La coopération avec les récepteurs immunitaires permet diverses réponses cellulaires, y compris l'activité antimicrobienne, tout en modulant l'expression des cytokines, des chimiokines et des interférons de type 1. Le VDR, indépendamment de la 1,25D, peut également par interaction directe avec des protéines telles que des facteurs de transcription ou des kinases moduler les réponses cellulaires, y compris la réponse immunitaire / antivirale et la mort cellulaire induite par le stress (Hii et al, 2016),

Les flèches en gras indiquent des actions directes de la 1,25D. Les flèches en pointillé indiquent la liaison du ligand à ses récepteurs. Les flèches réversibles indiquent une interaction protéine-protéine. Les flèches avec des lignes doubles indiquent la relation kinase-substrat.

Abréviations : 25D: 25-hydroxyvitamin D; 1,25D: 1,25 dihydroxyvitamin D; VDRm/n: membrane or nuclear vitamin D receptor; CYP27B1/CYP24: cytochromes P450C1/P450C24; PLA2: phospholipase A2; CaMKII: Calcium/ calmodulin protein kinase II; AA: arachidonic acid; DAG: diacylglycerol; PLC: phospholipase C; IFN: interferon; TLR: Toll-like receptor; PMA: phorbol 12-myristate 13-acetate; PKC: protein kinase C; PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase; Akt: protein kinase B; IKK: I_β kinase; MED1; Mediator Complex Subunit 1; RXR: retinoic acid X receptor; ETS 1: Avian Erythroblastosis Virus E26 Oncogene Homolog-1; VSE: Vitamin D stimulatory element; STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription; JAK: Janus kinase; Tyk: Tyrosine kinase; ERK: Extracellular signal Regulated protein Kinase; JNK: c-Jun N-terminal Kinase; MCP-1: Monocyte chemoattractant protein 1; CAMP: Cathelicidin Antimicrobial Peptide; IFI27L: Interferon, Alpha-Inducible Protein 27 like; IFI44L: Interferon-Induced Protein 44-Like; ISG15: Interferon-Stimulated Protein, 15 KDa; OAS: 21-51-Oligoadenylate Synthetase; RSAD2: Radical S-Adenosyl Methionine Domain Containing 2; «P» désigne la phosphorylation; «+» indique une amélioration,

osseux, la prolifération et la différenciation cellulaires, et d'autres processus tels que la régulation immunitaire et les activités antitumorale, antivirale et antibactérienne.

I.9 Rôles biologiques de la VitD

La 1,25D3 est une hormone hypercalcémiant qui joue un rôle majeur dans la **croissance et la minéralisation osseuses**. Elle agit essentiellement à trois niveaux:

- intestinal: elle permet une absorption intestinale accrue du calcium alimentaire et secondairement celle des phosphates. Au niveau de la bordure en brosse des cellules intestinales, elle augmente la synthèse du transporteur du calcium (CaT1, Calcium transport protein 1), acteur majeur de l'absorption intestinale du calcium. Dans les cellules intestinales, elle augmente la synthèse de la protéine calbindine qui favorise le transport du calcium contre un gradient de concentration entre les cellules intestinales et le plasma, entraînant aussi la diffusion passive des ions phosphates.
- osseux : en réponse à une hypocalcémie, la VitD active de façon directe la résorption osseuse en favorisant la différenciation et l'activation des cellules souches mésenchymateuses de l'os en ostéoclastes.
- rénal : l'hormone augmente la réabsorption tubulaire du calcium par action directe sur le canal épithélial calcique (ECaC). Son effet stimulant sur la réabsorption tubulaire des phosphates est secondaire à l'inhibition de la sécrétion de PTH provoquée par l'hypercalcémie associée à l'administration de VitD. Elle accélère également le transport du calcium et des phosphates par un mécanisme dépendant de la PTH ([Chun et al. 2019](#)).

À côté de son action endocrine bien établie dans la régulation de l'homéostasie phosphocalcique, la 1,25D synthétisée dans différents types cellulaires qui expriment la CYP27B1 et le VDR (se reporter au tableau 4), possède des actions autocrines et paracrines induisant des fonctions physiologiques telles que des effets immunomodulateurs (détaillés dans le paragraphe II.2), la sécrétion d'insuline et de rénine, la production d'interleukines et la bactéricidie ([Chang et al. 2019](#)).

Au niveau des muscles squelettiques, la VitD agit *via* le VDR et améliore la fonction, la force et la récupération musculaire et potentiellement les performances physiques et sportives. L'inactivation du Vdr chez des souris conduit à des fibres musculaires de taille plus petite et plus variable ainsi qu'à un poids corporel et un niveau de coordination inférieurs par rapport aux souris de type sauvage, même lorsque l'apport de calcium est maintenu par un régime spécial ([Abrams, Feldman, and Safran 2018](#)). Des études *in vitro* montrent que la 1,25D favorise la prolifération, la différenciation et la force contractile des cellules musculaires. Une étude portant sur près de 1 000 patients a mis en évidence une corrélation positive entre les taux sériques de 25D et l'activité physique et la force musculaire des sujets. La relation entre les faibles taux circulants de 25D et les troubles du métabolisme musculaire

Tableau 8. Effets de la Vitamine D sur le système cardio-vasculaire (<https://www.vitamined.net/vitamine-d-et-maladies/>)

EFFETS DE LA VIT D	CONSEQUENCES
Régulation du système rénine-angiotensine-aldostérone	La VitD régule indirectement la pression sanguine, inhibe la formation de plaques d'athérome et prévient ainsi le développement de maladies cardiaques.
Stabilisation et protection de l'endothélium vasculaire	L'endothélium est une fine couche des cellules endothéliales se situant sur la partie interne des vaisseaux sanguins. L'endothélium contribue au processus de régulation de la pression sanguine, de transfert de substances et de préservation de la fluidité sanguine. La VitD stabilise l'endothélium et module ses fonctions.
Diminution de l'inflammation	L'inflammation de la paroi vasculaire constitue le point de départ de nombreuses maladies vasculaires telles que l'athérosclérose
Inhibition de la formation des cellules spumeuses	Les cellules spumeuses sont responsables de l'obstruction des vaisseaux sanguins et participent à la formation de la plaque d'athérome.
Renouvellement de la musculature vasculaire lisse	La musculature lisse constitue une composante majeure des vaisseaux. La VitD contribue au renouvellement physiologique ainsi qu'à l'élasticité optimale des vaisseaux, Elle agit en prévention de la formation de thromboses par le biais de la régulation du facteur tissulaire.
Influence sur les cellules du muscle cardiaque	La VitD est impliquée dans le fonctionnement optimal du muscle cardiaque.

est documentée dans diverses situations, y compris la récupération musculaire, l'atrophie, la sarcopénie et la cachexie (*Abrams, Feldman, and Safran 2018*).

Des données épidémiologiques et expérimentales sont en faveur d'un **rôle protecteur de la VitD contre le cancer**. Le VDR est exprimé dans la plupart des tissus tumoraux et les résultats d'études expérimentales *in vivo* et *in vitro* montrent que la 1,25D inhibe la prolifération cellulaire, l'angiogenèse, l'invasion et favorise la différenciation et l'apoptose des cellules cancéreuses (*Christakos et al. 2016*).

La VitD joue aussi un **rôle régulateur de la physiologie cutanée**. La 1,25D et son récepteur sont exprimés par les kératinocytes de la couche basale de l'épithélium, et la signalisation 1,25D/VDR influence la prolifération, la différenciation et l'apoptose des kératinocytes et la réponse immunitaire cutanée (*Christakos et al. 2016*).

Des études ont montré qu'une supplémentation en VitD durant la grossesse et la petite enfance réduit le risque de développer un **diabète de type 1**. Concernant le **diabète de type 2**, la VitD augmente la sécrétion d'insuline et réduit la résistance à l'insuline (*Chun et al. 2019*).

La VitD joue un rôle important au niveau de la **santé cardiovasculaire** en réduisant l'inflammation, la calcification des vaisseaux et la tension artérielle (tableau 8). Des études expérimentales ont montré que la limitation de la signalisation 1,25D /VDR entraîne l'augmentation de l'activité rénine /angiotensine avec hypertension et hypertrophie cardiaque, la réduction de la biodisponibilité de l'oxyde nitrique vasodilatateur entraînant une moindre relaxation des vaisseaux sanguins, le dysfonctionnement des cellules endothéliales, une régulation positive des cytokines pro-inflammatoires et l'augmentation de la prolifération et de la migration des cellules musculaires lisses vasculaires (*Chun et al. 2019*).

La VitD est également un agent protecteur au niveau du **système nerveux central (SNC)** et des maladies neurodégénératives. Les propriétés neuroprotectrices de la VitD, décrites expérimentalement, permettent chez la personne âgée, après normalisation de la concentration sérique de VitD, à lutter contre le vieillissement cérébral, notamment le déclin cognitif et le risque de maladie d'Alzheimer. De plus, la VitD joue un rôle neuroprotecteur contre la sclérose en plaques et la maladie de Parkinson (*Gil, Plaza-Diaz, and Mesa 2018*). Dans ce domaine, la VitD exerce simultanément plusieurs effets qui sont récapitulés dans le tableau 9.

La carence en VitD induit des conséquences néfastes sur la santé et entraîne le développement de pathologies sévères. Les pathologies associées aux faibles taux sériques de 25D sont présentées dans le tableau 10. La VitD est ainsi considérée comme un facteur essentiel pour le maintien d'un bon état de santé. Elle affecte, au moins en partie, toutes les fonctions primordiales de l'organisme.

Tableau 9. Effets de la VitD sur la santé neuronale (<https://www.vitamed.net/vitamine-d-et-maladies/>)

EFFETS DE LA VITD	CONSEQUENCES
Régulation de la synthèse de neurotransmetteurs	Les neurotransmetteurs sont les messagers du système nerveux central. La VitD est essentielle à la diffusion de ces signaux qui influencent l'humeur et les capacités cognitives.
Régulation de l'homéostasie du calcium intracellulaire	Le calcium est un messenger cellulaire essentiel. La VitD joue un rôle prépondérant dans le processus de diffusion de ce signal cellulaire.
Régulation de la réponse anti-oxydante (glutathion)	La vitD participe à la protection des nerfs contre les dommages oxydatifs.
Réduction de l'inflammation des nerfs et du cerveau	La vitD contribue à la protection des nerfs et à la préservation de la santé nerveuse.
Régulation de la production de neurotrophines	Les neurotrophines préservent les connexions neuronales. La vitD est ainsi essentielle à la construction et à la préservation des connexions neuronales.

II LE SYSTEME IMMUNITAIRE

Le système immunitaire (SI) assure la défense de l'organisme face à de multiples situations d'agression telles que les maladies infectieuses, les transformations néoplasiques, les pathologies auto-immunes, les allergies.

Dans cette partie, nous détaillerons la physiologie du SI notamment la vigilance anti-tumorale. Nous aborderons ensuite l'impact de la VitD, l'obésité et l'activité physique sur l'immunité tumorale en se référant aux études épidémiologiques et expérimentales.

II.1 IMMUNITE INNEE ET IMMUNITE ADAPTATIVE

Le SI se différencie en deux composantes, l'immunité innée de réponse rapide et non spécifique et l'immunité adaptative de réponse plus lente mais spécifique, mettant en jeu des types cellulaires spécifiques (Figure 9) (Abbas *et al.* 2017). Ces deux composantes interagissent : le système inné recrute des effecteurs spécifiques de l'antigène du système adaptatif en les attirant vers le site d'infection/lésion et en transportant l'antigène vers les tissus lymphoïdes, induisant l'activation des cellules effectrices adaptatives.

II.1.1 L'immunité innée

Le SI inné est acquis dès le premier jour de la naissance. Ses composants sont constamment présents dans les organes et les tissus prêts à défendre l'organisme contre les agressions. Il répond très rapidement aux agents pathogènes et aux blessures (Figure 10). Cette réponse immunitaire innée s'avère spécifique de par la mise en jeu de récepteurs de reconnaissance spécifiques (PRR, Pattern recognition receptors) et par le développement d'une mémoire, conduisant à une augmentation des réponses aux infections ultérieures. Cette mémoire immunologique innée dépend principalement des cellules NK (Natural Killer) et des macrophages, qui protègent d'une ré-infection de manière indépendante des lymphocytes T/B (Riera Romo, Pérez-Martínez, and Castillo Ferrer 2016). Le développement de cette mémoire cellulaire implique des changements épigénétiques basés sur des méthylations et/ou acétylations qui conduisent à une reprogrammation fonctionnelle permettant la réactivation cellulaire lors d'une stimulation secondaire. Les PRR exprimés par les cellules du système inné reconnaissent des motifs moléculaires particuliers associés aux agents pathogènes (*Pathogen Associated Molecular Patterns* ou PAMPs) ou aux cellules endommagées (*Damage-Associated Molecular Patterns* ou DAMP) (Riera Romo, Pérez-Martínez, and Castillo Ferrer 2016). Les PRR, exprimés par la lignée germinale, sont hautement conservés et d'une diversité limitée. Ces PRR contribuent à plusieurs fonctions telles que la signalisation intracellulaire, l'opsonisation, la

Tableau 10. Effets indésirables sur la santé associés de manière significative à un faible taux sérique de 25 (OH) D (*Chang et al, 2019*)

PROBLEMES DE SANTE LIES AU STATUT DEFICIENT EN VIT 25D	
Faible densité osseuse	Obésité
Fracture de la hanche	Résistance à l'insuline
Fracture non vertébrale	Diabète de type 1 et 2
Crise cardiaque	Hypertension
Accouchement prématuré	Accident vasculaire cérébral
Dysfonctionnement neurocognitif	Faiblesse musculaire
Inflammation / infection	Maladies auto-immunes
Sclérose en plaques	Parkinson

chimiotaxie et l'endocytose (Figure 10). Trois classes de PRR sont identifiées à l'heure actuelle :

- les récepteurs de type Toll (TLR),
- les membres de la famille des RLR (*Retinoic acid-inducible gene (RIG)-I-Like Receptor*)
- les récepteurs de type NOD (NLR, *Nucleotide Oligomerization Domain Receptor*).

L'activation de ces récepteurs, par interaction avec des molécules du « non-soi », déclenche des voies de transduction intracellulaire qui conduisent à la production de cytokines tels que l'interféron (IFN), le facteur de nécrose tumorale (TNF) et l'interleukine-1 (IL-1) (Dempsey, Vaidya, and Cheng 2003). Une autre molécule récemment identifiée, dénommée STING (Stimulator of Interferon gene), joue un rôle central dans la détection de l'ADN double brin cytosolique. L'activation de STING induit également l'expression d'interférons de type I et de gènes co-régulés dans la réponse immunitaire innée contre les pathogènes (Abbas et al. 2017). L'immunité innée intègre une barrière chimique et mécanique et une barrière cellulaire détaillées ci-après.

II.1.1.i Barrière chimique et mécanique

Les barrières mécaniques superficielles, constituent le principal mécanisme de l'immunité innée qui empêche la propagation des pathogènes. La peau est la principale barrière protectrice composée de couches épithéliales stratifiées avec des jonctions serrées et des protéines structurales qui fournissent une protection mécanique, empêchant la perte d'eau et l'infiltration d'agents pathogènes, en plus de fonctions sensorielles et excrétrices. La peau contient deux zones multicouches : le derme (couche interne) et l'épiderme (couche externe) qui est en contact direct avec les facteurs environnementaux et les pathogènes. La peau est constamment lubrifiée par des sécrétions qui maintiennent l'intégrité épidermique et l'hydratation et qui ont des propriétés antimicrobiennes. Ces sécrétions sont enrichies en agents microbicides, telles que le lysozyme et les peptides antimicrobiens (AMP, antimicrobial peptides), qui sont des éléments importants de la défense immunitaire innée (Abbas et al. 2017).

II.1.1.ii Barrière cellulaire

La barrière cellulaire met en jeu plusieurs types de cellules immuno-compétentes :

* **Les phagocytes** peuvent reconnaître de manière non spécifique les agents pathogènes (à l'aide des PRR), et les détruire chimiquement. La destruction se produit par la fusion d'une vacuole d'endocytose contenant le pathogène avec des granules remplis de métabolites toxiques, de peptides antimicrobiens et/ou de protéases à sérine qui éliminent directement le microbe. Un autre mécanisme phagocytaire est la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS: Reactive Oxygen Species) et de l'azote (RNS: Reactive Nitrogen Species). Ces deux voies sont médiées respectivement par la NADPH oxydase générant l'anion superoxyde (O₂⁻) et par l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) générant l'oxyde nitrique (NO). Ces espèces réactives se recombinaient spontanément avec

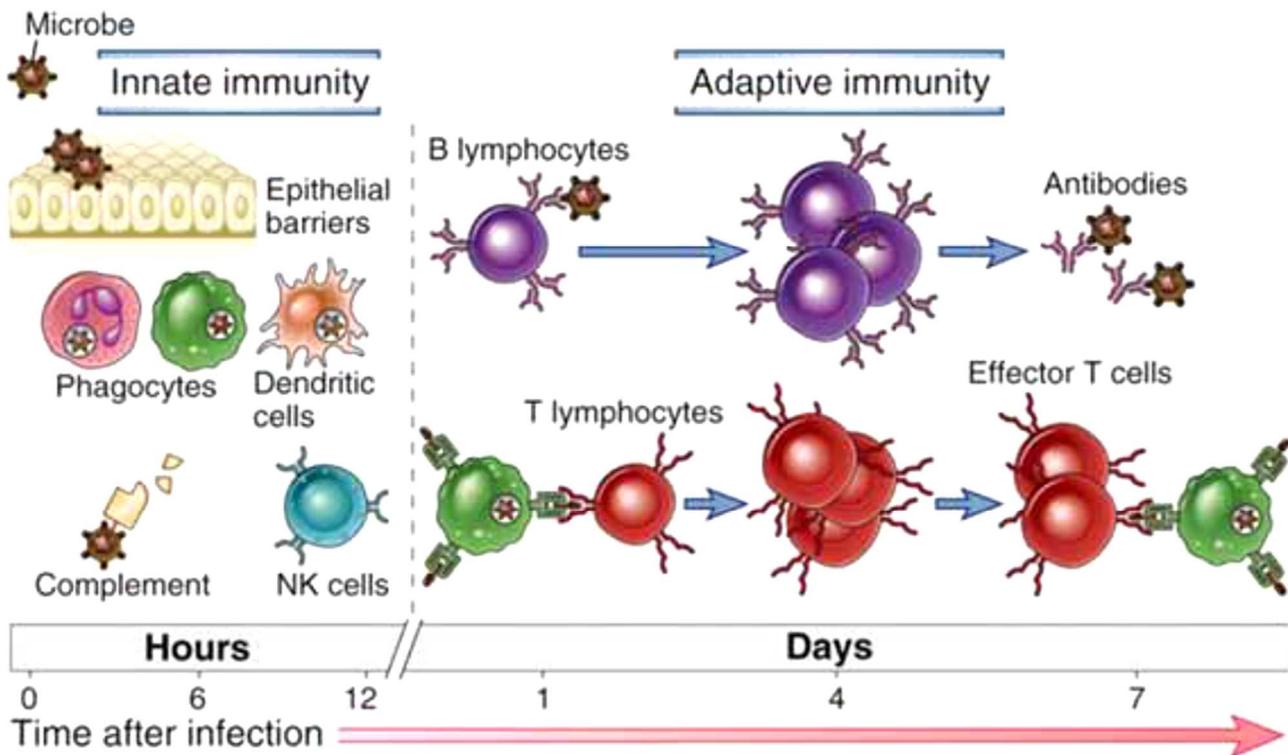


Figure 9. Chronologie de l'immunité innée et adaptative

L'immunité innée est la première ligne de défense et agit très rapidement contre l'infection et l'altération des cellules. Les effecteurs de l'immunité innée activent l'immunité adaptative qui se développe plus lentement mais fournit une réponse immunitaire plus spécifique. (*Abbas et al. Cellular and Molecular Immunology*).

d'autres molécules pour produire des radicaux libres réactifs attaquant et détruisant le pathogène ingéré. Cette phagocytose se déclenche lorsque le phagocyte reçoit des signaux d'activation d'autres cellules immunitaires (Cederlund, Gudmundsson, and Agerberth 2011). La phagocytose peut être renforcée par l'opsonisation d'anticorps ou du facteur C3b du complément qui, en se liant à la surface de l'agent pathogène, constituent un signal pour les cellules phagocytaires. Certains agents pathogènes échappent à la phagocytose en résidant à l'intérieur des cellules infectées. Ces pathogènes ne peuvent être tués que par l'apoptose des cellules infectées initiée par les cellules NK ou par des composants du SI adaptatif comme les lymphocytes cytotoxiques (Tc) (Abbas et al. 2017).

* Les **macrophages** sont des cellules phagocytaires présentatrices d'antigènes présentes dans l'organisme sous deux types: les macrophages résidant dans les tissus et ceux issus de la moelle osseuse circulant dans le sang (ou monocytes), qui sont recrutés dans les tissus en cas d'infection. Ces deux types de macrophages ont une origine, un développement et des fonctions distincts. Les macrophages résidant dans les tissus présentent des phénotypes spécifiques selon le site : par exemple, la microglie dans le cerveau, les cellules de Kupffer dans le foie, les macrophages alvéolaires dans le poumon et les macrophages péritonéaux dans l'intestin. Ces macrophages proviennent probablement de précurseurs embryonnaires et sont maintenus par auto-renouvellement (Manel 2019). En cas d'infection, les monocytes circulants sont recrutés et transformés en macrophages matures au niveau du tissu lésé en réponse aux cytokines et chimiokines libérées lors de l'inflammation (Abbas et al. 2017). Selon le micro-environnement, les macrophages sont différenciés en macrophages de phénotype M1 ou M2 (Figure 11).

Les **macrophages M1**, par leurs propriétés pro-inflammatoires participent à la résolution des infections et par leurs activités anti-tumorales, interviennent dans la vigilance anti-tumorale. En effet, ces macrophages reconnaissent les PAMPs *via* les TLR exprimés à leur surface, ce qui active des facteurs de transcription (par ex. l'IFN de type I et le facteur nucléaire kappa B (NF- κ B) et initie la réponse inflammatoire. Ces macrophages M1, par l'effet de cytokines sécrétées par les cellules T helper 1 (Th1) comme l'IFN- γ , libèrent des cytokines pro-inflammatoires (par ex. IL-1, IL-6, IL-12, IL-23 et TNF- α) et des chimiokines de type 1 [par ex. CXCL9 et CXCL10 (C-X-C motif) ligand 9 et 10)] qui favorisent le recrutement des macrophages et des Tc pour éliminer l'agent pathogène (Figure 11) (Sousa et al. 2015).

Les **macrophages M2** sont divisés en 3 sous-phénotypes : M2a, M2b et M2c. Les macrophages M2a résultent des stimuli IL-4 ou IL-13 et libèrent des cytokines de remodelage de la matrice. Les macrophages M2b, provenant de la reconnaissance de complexes immuns en combinaison avec des stimuli IL-1 β ou LPS (lipopolysaccharides), sont impliqués dans la cicatrisation des plaies et jouent un rôle pro-tumoral. Les macrophages M2c immunosuppresseurs découlent de stimuli variés : IL-10, TGF- β (transforming growth factor β), glucocorticoïdes ou environnement riche en complexes

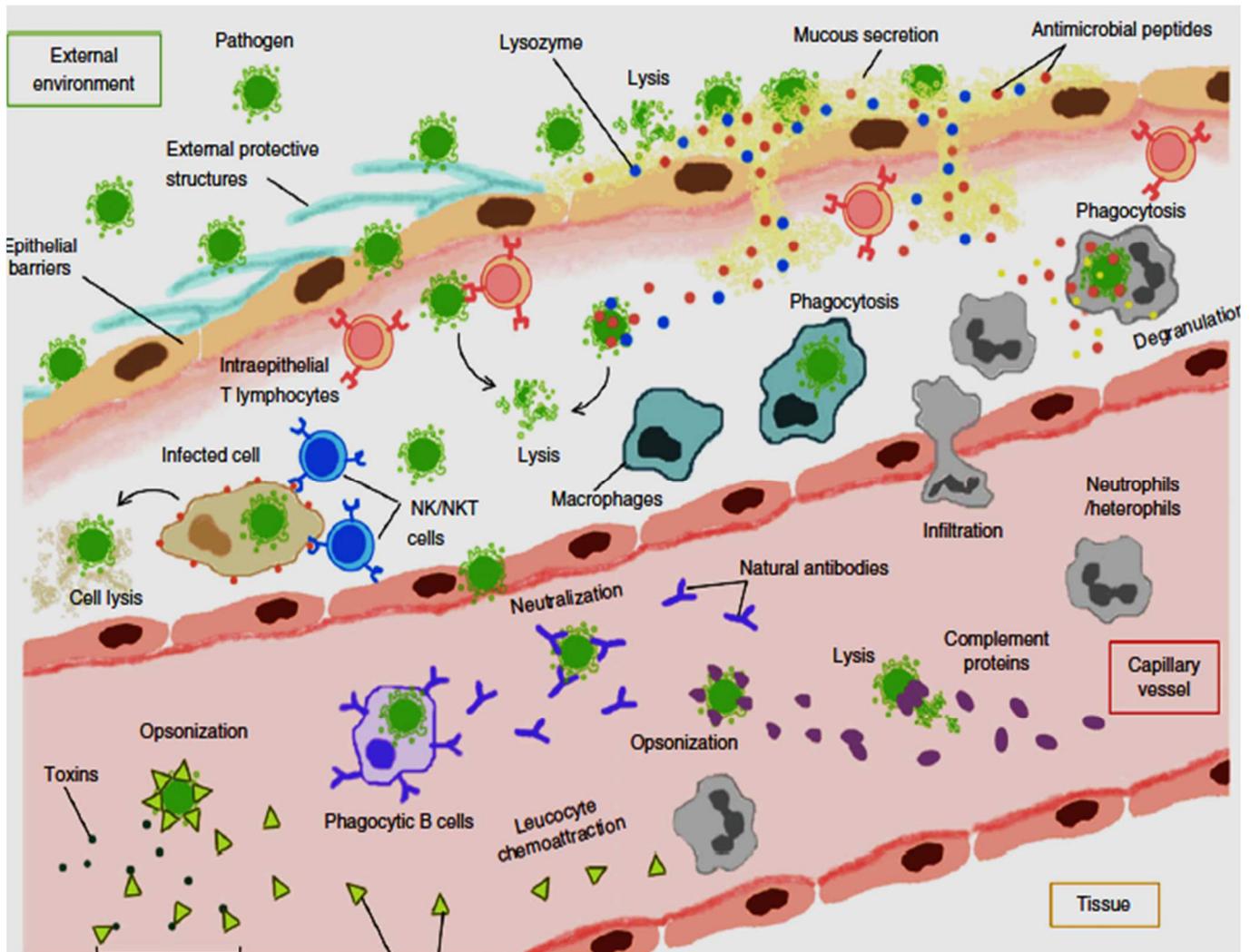


Figure 10. Vue intégrative de l'immunité innée

Illustration schématique des principaux systèmes de défense innés en situation physiologique (*Riera Romo et al. 2016*).

immuns (Figure 11). Ces macrophages M2c secrètent de l'IL-10 et d'autres facteurs de remodelage de la matrice tels que des métalloprotéinases (MMP). Les macrophages M2 produisent de grandes quantités de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et des chimiokines [CCL17, CCL22 et CCL24 (C-C Motif Chemokine Ligand)] (Sousa et al. 2015).

Par leur capacité sécrétoire, les macrophages contribuent à la différenciation et à l'activation d'autres cellules immunitaires. Comme les cellules dendritiques (DC), ce sont des cellules présentatrices d'antigène (CPA) qui interagissent avec les cellules T de la réponse immunitaire adaptative (Jin et al. 2011).

* Les **polynucléaires neutrophiles** circulants sont impliqués dans la phagocytose précoce. Ils quittent par diapédèse la circulation sanguine rapidement pour gagner le site de l'infection afin de phagocyter les agents pathogènes. Ils jouent également un rôle dans l'initiation de l'inflammation par la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-1 β , G-CSF (*granulocyte colony-stimulating factor*) et GM-CSF (*granulocyte/macrophage colony-stimulating factor*) (Abbas et al. 2017).

* Le **système du complément** joue un rôle essentiel dans la défense de l'hôte, dans le processus inflammatoire, dans la régénération des tissus et autres processus physiologiques. Il est constitué de plus de 30 protéines qui sont présentes soit sous forme soluble dans le sang, soit sous forme associées à la membrane ; la plupart sont des zymogènes inactifs qui sont par la suite clivés et activés séquentiellement. L'élément central de ces trois voies est la molécule C3, qui est la protéine du complément la plus abondante que l'on trouve dans le sang et dont l'activation engendre la formation des facteurs C3a, C3b, et C5a (Abbas et al. 2017). L'activation du complément s'effectue selon trois voies différentes en fonction de la nature de l'agent pathogène impliqué : la voie classique, la voie des lectines, et la voie alternative. Les anaphylatoxines C3a et C5a induisent une multitude de réponses cellulaires qui vont de la chimio-attraction à l'apoptose. L'activation du complément aboutit à l'opsonisation de l'agent pathogène, ce qui favorise l'attraction chimiotactique des phagocytes et conduit à l'élimination du pathogène par phagocytose. Elle conduit aussi à la formation du Complexe d'attaque terminal (MAC) qui entraîne la lyse osmotique de l'agent pathogène. Le système du complément contribue de plus au SI adaptatif et intervient dans la régulation de la réponse immunitaire des lymphocytes B et T.

* Les **cellules NK** sont des cellules qui reconnaissent les cellules « agressées » et sont capables de les lyser directement (cytolyse). Les cellules « agressées » sont soit des cellules infectées, soit des cellules dont l'ADN est endommagé ou modifié telles que les cellules néoplasiques. Ainsi, les cellules NK éliminent les cellules endommagées ou malignes ou infectées. Les cellules NK produisent de l'INF- γ , cytokine qui active les macrophages et les cellules du SI adaptatif (Riera Romo, Pérez-Martínez, and Castillo Ferrer 2016).

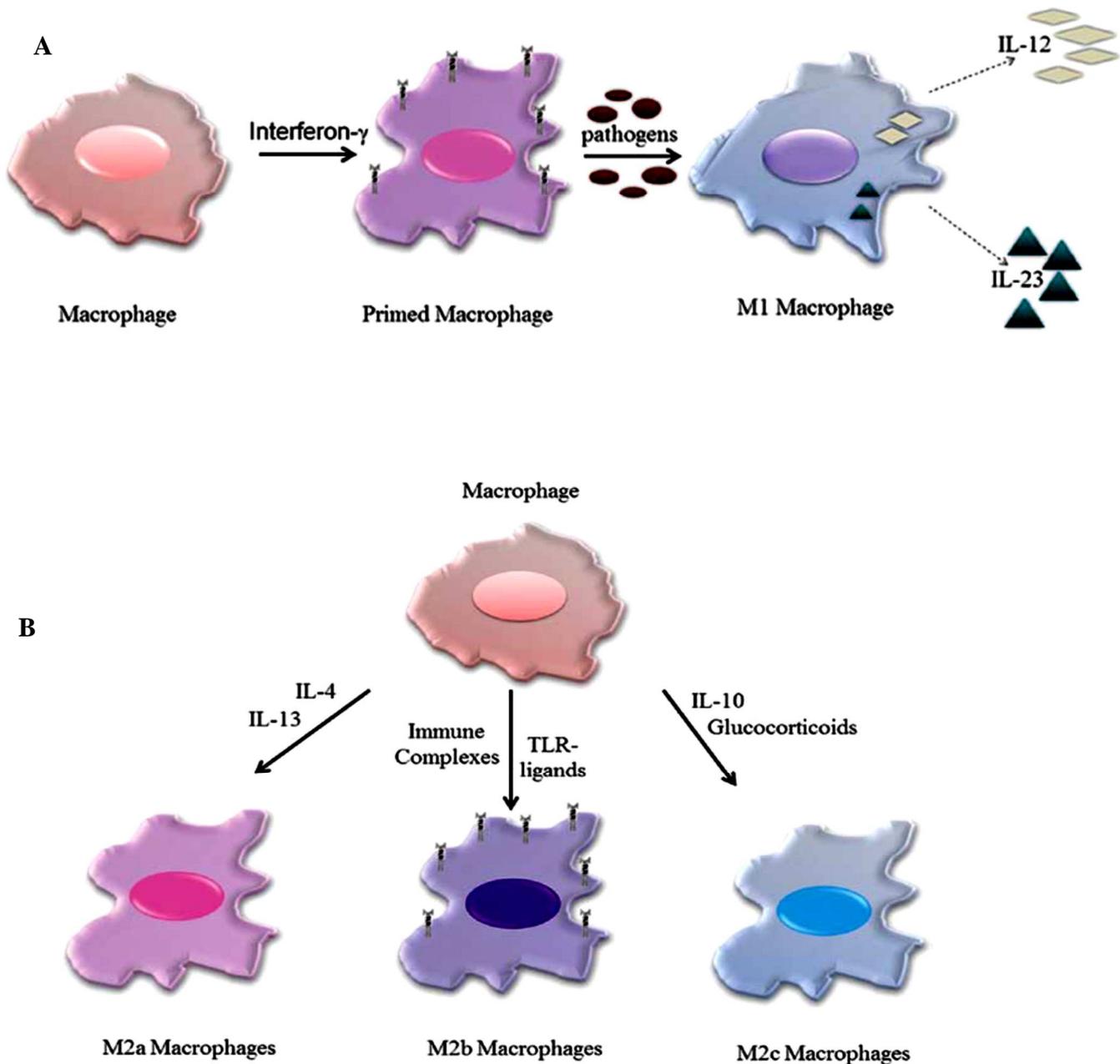


Figure 11. Polarisation macrophagique

A. La polarisation des macrophages en phénotype M1 (macrophages activés classiquement). L'INF- γ induit une augmentation de l'expression des récepteurs de type TOLL (TLR) de sorte qu'en présence d'agents pathogènes, ces macrophages acquièrent un phénotype M1 libérant des cytokines, en particulier l'IL-12 et IL-23.

B. Polarisation des macrophages M2 par leurs stimuli respectifs. Les macrophages M2a sont des macrophages activés par l'IL-4 et l'IL-13. En présence de complexes immuns et de ligands TLR, les macrophages sont polarisés en un phénotype M2b. Les phénotypes M2a et M2b ont une fonction anti-inflammatoire et des propriétés pro-tumorales. En présence de glucocorticoïdes et d'IL-10, les macrophages sont polarisés en macrophages M2c qui ont une activité immunosuppressive (*Obeid et al. 2013*).

II.1.2 L'immunité adaptative

Les acteurs cellulaires du SI adaptatif sont les lymphocytes T (LT) et B (LB). Selon le type de cellule impliquée, il existe deux types de réponse immunitaire : l'immunité humorale médiée par les cellules B et l'immunité cellulaire par les cellules T. C'est le système inné et la structure de l'antigène qui déterminent la nature et l'ampleur de la réponse immunitaire (Figure 12). (Abbas et al. 2017, Kumar 2018).

Si la réponse immunitaire innée ne réussit pas à éliminer le pathogène, la réponse adaptative entre en jeu. Les antigènes, qui déclenchent la réponse immunitaire adaptative, sont présentés aux lymphocytes B ou T par les macrophages ou les cellules dendritiques (DC), soit au site de l'infection, soit dans les organes lymphoïdes (Figure 12). Les cellules du système adaptatif, de par la grande diversité de leurs récepteurs, peuvent discriminer des antigènes très similaires sur le plan structural. Cette diversité est fournie par la recombinaison somatique V(D)J qui permet de créer une grande diversité de récepteurs des cellules T et d'immunoglobulines nécessaires à la reconnaissance de l'immense variété des antigènes étrangers (Figure 13). C'est un phénomène clé dans la défense contre les pathogènes bactériens, viraux et parasitaires.

Le SI adaptatif est de plus en mesure de faire la distinction entre le « soi », le « non soi » (agent pathogène) et le « soi altéré » (cellule transformée) d'une manière très spécifique. En effet, les lymphocytes passent par une étape de maturation, qui leur confère la capacité d'être rendus tolérants vis-à-vis du soi, accompagné de deux étapes de sélection avant leur libération dans la circulation :

- une **sélection positive** permet de conserver seulement les lymphocytes capables d'attaquer les antigènes du non soi et du soi altéré,
- une **sélection négative** permet la destruction des lymphocytes qui s'attaquent aux cellules de l'organisme.

Une autre caractéristique importante du système adaptatif est l'expansion clonale, qui permet la prolifération d'un clone de lymphocytes spécifiques d'un antigène donné, suivie de la contraction, c'est-à-dire la disparition d'une partie des cellules générées s'accompagnant de la persistance de lymphocytes mémoire. Le développement des cellules mémoire est crucial pour obtenir une protection durable après la première infection par un agent pathogène inconnu (Abbas et al. 2017, Kumar 2018).

II.1.2.i Immunité à médiation humorale

Les effecteurs de la réponse immunitaire humorale sont les LB qui secrètent des anticorps suite à leur activation et leur différenciation en plasmocytes. Les anticorps sont des immunoglobulines (IgM, IgG, IgA, IgE) qui circulent dans le plasma pour se lier aux agents pathogènes. Les anticorps inactivent les toxines microbiennes en bloquant leur liaison aux cellules hôtes (neutralisation). Ils se

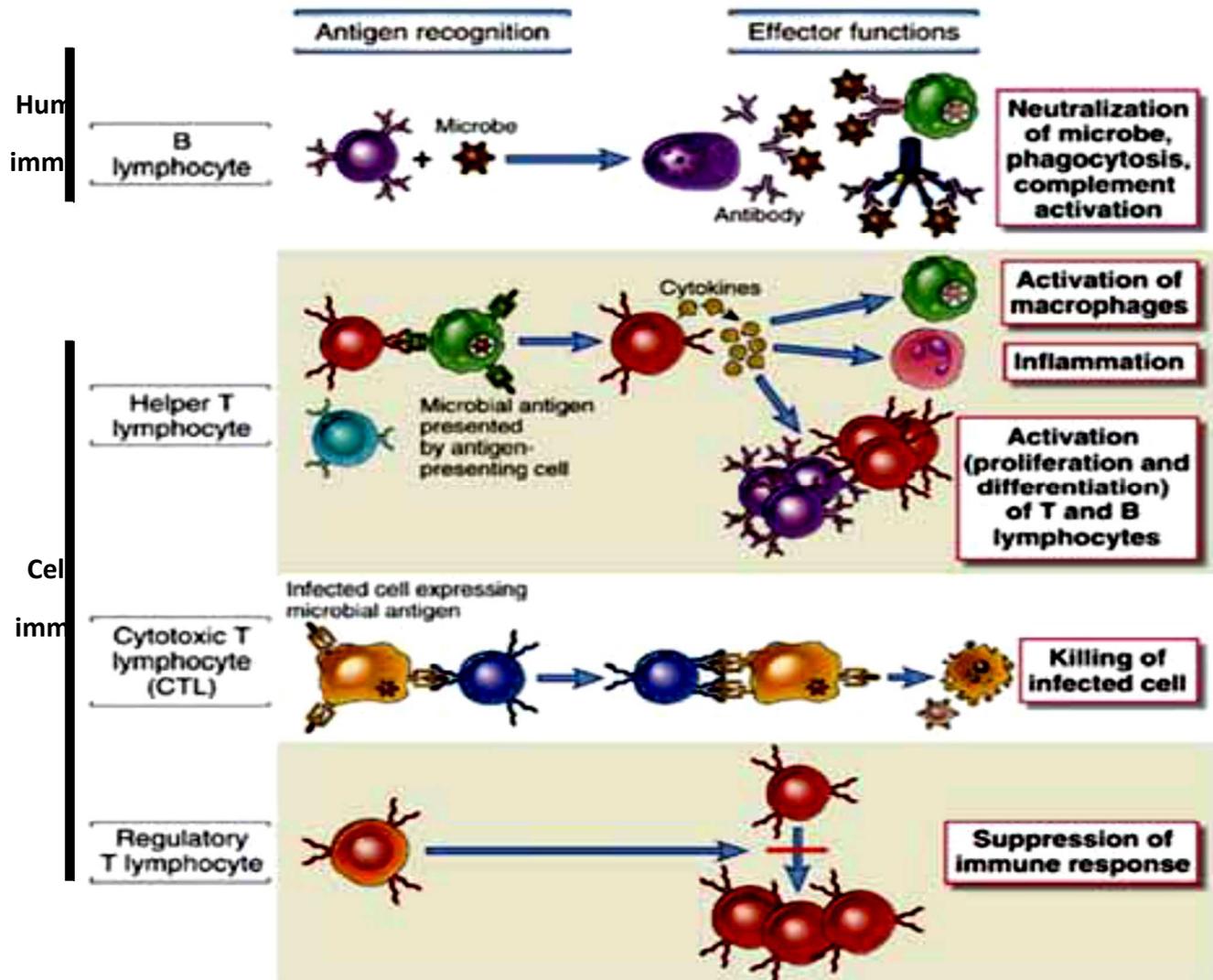


Figure 12. Vue générale des fonctions effectrices du système immunitaire adaptatif (*Abbas et al. Cellular and Molecular Immunology*).

lient également aux agents pathogènes pour servir de marqueurs pour les cellules immunitaires afin de déclencher la phagocytose (opsonisation) ou activer le système du complément (Figure 14).

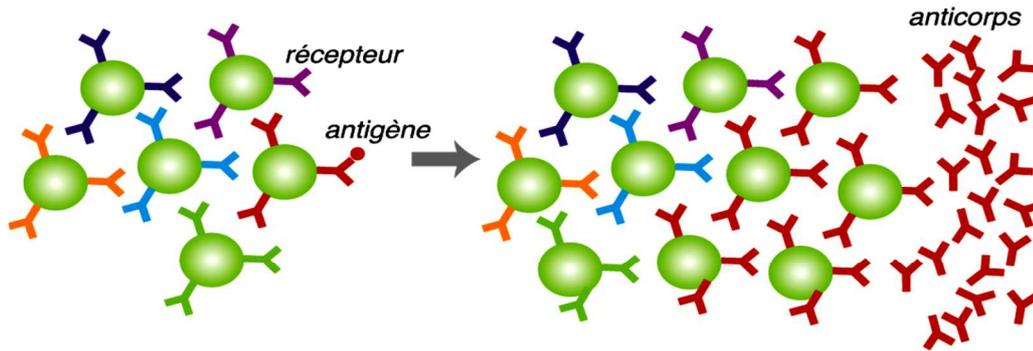
Pour activer les LB, la participation des cellules T auxiliaires (Th) est nécessaire. Les cellules Th contrôlent également le changement d'isotype via la recombinaison somatique. En conséquence, les cellules B produisent une autre classe d'anticorps. Ceci est nécessaire pour interagir avec différentes cellules immunitaires ou molécules effectrices sans perdre l'affinité / spécificité pour l'antigène. Les LB peuvent également servir de CPA pour les cellules T (Abbas et al. 2017).

II.1.2.ii Immunité à médiation cellulaire

Les lymphocytes T nécessitent plusieurs signaux de stimulation délivrés par les CPA, DC et macrophages pour être activés (Figure 15). Le premier signal implique un complexe peptide-CMH (Complexe majeur d'histocompatibilité) présent à la surface des CPA et le TCR. Ce premier signal est insuffisant pour assurer une activation complète des LT. Alors, un deuxième signal appelé « signal de co-stimulation » est nécessaire. Il implique l'interaction des molécules de la famille B7 : CD80 (B7-1) et CD86 (B7-2) exprimées par les CPA activées avec le récepteur CD28 exprimé par les LT. Cette interaction CD28/CD80 ou CD86 aboutit à la formation de la « synapse immunologique » au centre de laquelle se trouve le TCR lié au CMH et, en périphérie, les molécules de co-stimulation (CD80 et CD86) et d'adhésion (Intercellular Adhesion Molecule 1/Lymphocyte Function-Associated Antigen-1 [ICAM-1/LFA-1] et LFA-3/CD2) (Figure 15) (Galaine, Godet, and Adotévi 2016). Les DC se caractérisent par leur flexibilité fonctionnelle pour répondre aux « changements inflammatoires » de leur environnement. Le SI inné fournit des signaux (chimiokines et cytokines) pour attirer et maintenir un pool de DC sur le site inflammatoire qui ingèrent les antigènes étrangers, les transportent vers les ganglions lymphatiques et les y présentent aux cellules T spécifiques de l'antigène. Au cours de ce processus, les DC subissent des changements phénotypiques et fonctionnels tels que la diminution de l'internalisation de l'antigène, l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et II à la surface cellulaire, l'augmentation de l'expression des molécules co-stimulantes, l'expression des molécules d'adhésion et des récepteurs de chimiokines, la sécrétion de chimiokines, de cytokines et de protéases et des changements morphologiques comme la formation de dendrites (Figure 16). Ainsi, les DC évoluent d'une cellule immature capturant l'antigène à une cellule mature présentant l'antigène. Ce processus de maturation des cellules DC est essentiel pour la régulation et l'orientation de la réponse immunitaire vers la tolérance des lymphocytes T ou vers l'activation/différenciation des lymphocytes T en Th1 ou Th2 (Raphael 2015, Abbas et al. 2017).

Les cellules T sont les éléments clés de l'immunité adaptative. Les deux principales lignées de cellules T sont les $T\alpha^+$ et les $T\gamma\delta$. Les $T\alpha^+$ comprennent les cellules Th et Tc qui reconnaissent les antigènes

A. Sélection clonale



B. Recombinaison V(D)J

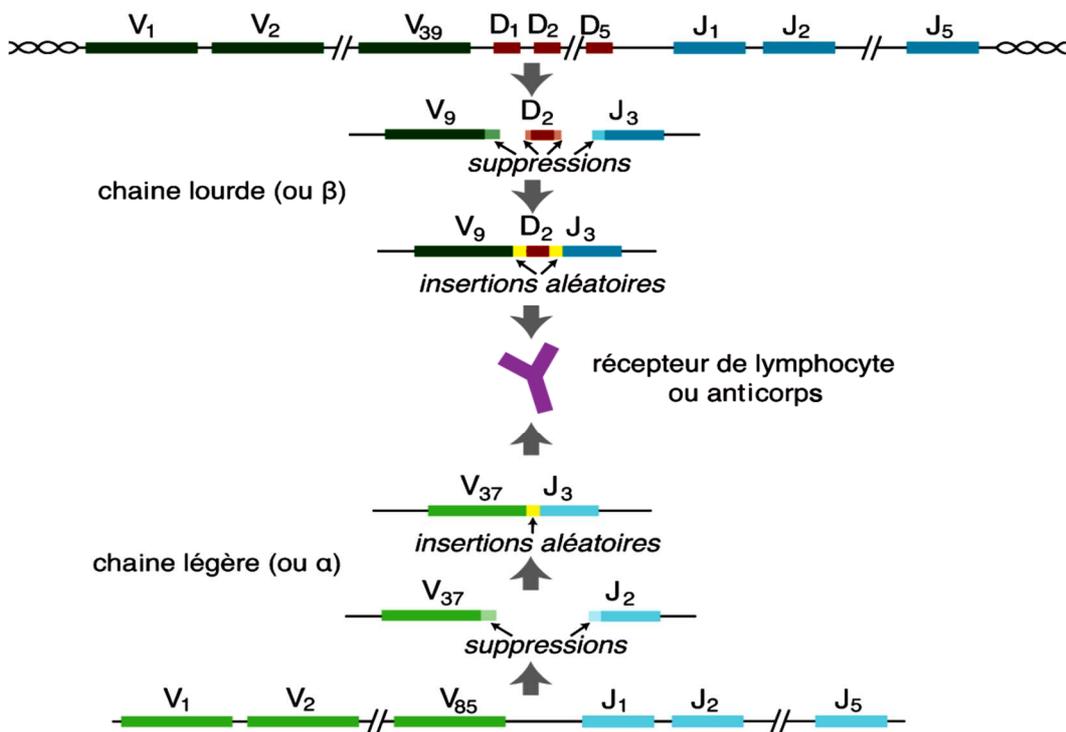


Figure 13. Sélection clonale et Recombinaison V(D)J

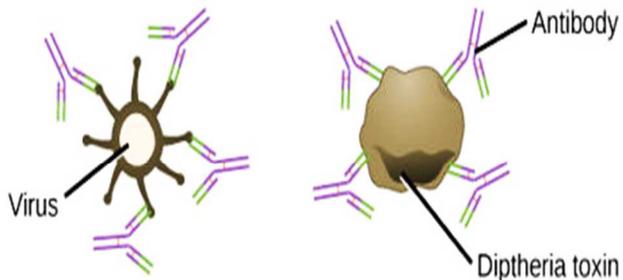
- A) Chaque lymphocyte exprime un récepteur unique, qui peut se lier spécifiquement à une fraction de morceaux de protéines étrangères, ou « antigènes ». Les lymphocytes reconnaissant des agents pathogènes prolifèrent, fournissant au corps un grand nombre de cellules et anticorps spécialisés dans la lutte contre l'infection et forment la base de l'immunité adaptative.
- B) Chaque récepteur unique résulte de l'édition aléatoire de l'ADN lors du développement des lymphocytes. Trois segments appelés V, D et J sont pris parmi une liste de modèles encodés dans la souche de l'ADN et collés ensemble. Des éliminations et ajouts de paires de bases aléatoires viennent compléter le processus ([Mora 2017](#)).

présentés par CMH et sont caractérisées par leurs co-récepteurs de surface CD4 ou CD8, respectivement. Les cellules T $\gamma\delta$ sont des cellules CD3⁺ qui ne reconnaissent pas les antigènes liés au CMH et expriment rarement les co-récepteurs CD4 et CD8 (*Abbas et al. 2017*). Les T $\gamma\delta$ expriment un TCR constitué de sous-unités γ et δ alors que les T $\alpha\beta$ construisent leur TCR avec des sous-unités α et β . Les TCR $\gamma\delta$ ne présentent pas autant de diversités que les TCR $\alpha\beta$. Néanmoins, les cellules T $\gamma\delta$ fournissent des spécificités antigéniques uniques et semblent être pré-activées, ce qui rend leurs réponses très rapides. Les T $\gamma\delta$ résident principalement dans la peau et les tissus épithéliaux (dans les poumons, l'intestin, etc.) et contribuent à la réponse immunitaire contre les infections, la transformation cellulaire (cancer) et les lésions tissulaires. Dans le sang et les organes lymphoïdes, ils ne représentent qu'un petit pourcentage du total des cellules T. La principale lignée de lymphocytes T est constituée de lymphocytes T $\alpha\beta$ (*Knochelmann 2018*).

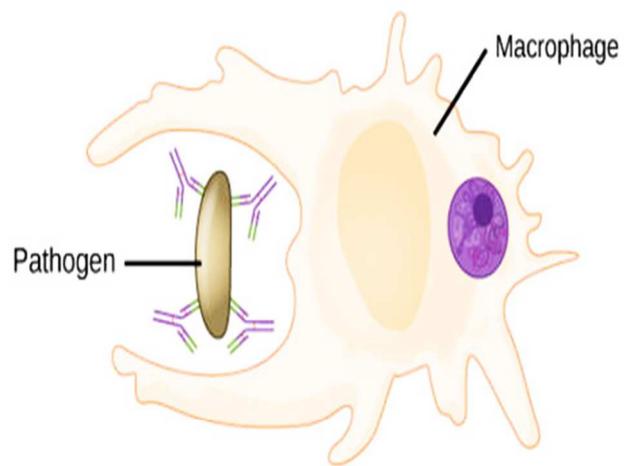
Les T CD4⁺ reconnaissent les antigènes présentés sur les molécules du CMH de classe II présentés par les CPA/DC. À partir de cellules T CD4⁺ naïves, plusieurs sous-types cellulaires fonctionnellement distincts peuvent se développer: cellules T auxiliaires Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, folliculaires (Tfh) et cellules T régulatrices induites/périphériques (iTreg/pTreg) (Figure 17). Les cellules Treg naturelles (nTreg ou tTreg) appartiennent également aux cellules T CD4⁺, mais ne se différencient pas des cellules T naïves périphériques et se développent indépendamment dans le thymus. Les LT CD4⁺ ont diverses fonctions et leurs sous-types diffèrent par l'expression des molécules de surface, leur signature moléculaire (facteurs de transcription) et la production de cytokines (*Riera Romo, Pérez-Martínez, and Castillo Ferrer 2016*).

Le rôle principal des **Th1** est d'aider à éliminer les agents pathogènes intracellulaires. L'IFN- γ produit par les Th1 est crucial pour activer les phagocytes tels que les macrophages mais aussi les cellules microgliales facilitant l'activité phagocytaire. Les Th1 sécrètent également de l'IL-2 qui favorise la survie et l'activation des nTreg mais aussi la prolifération des T CD8⁺ et leur différenciation en Tc. La réponse immunitaire médiée par les cellules Th2 est orientée vers les parasites extracellulaires. De plus, elles jouent un rôle dans les maladies allergiques et l'asthme (Figure 17) (*Knochelmann et al. 2018*). Les **Th2** produisent plusieurs cytokines avec des fonctions effectrices différentes telles que l'IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-10, IL-15 et l'amphiréguline. L'IL-4, par exemple, déclenche une inflammation allergique et accroît la production d'IL-6 et de GM-CSF, deux cytokines pro-inflammatoires. En revanche, l'IL-10 inhibe la réponse immunitaire Th1. (Figure 17) (*Kumar 2018*). L'immunité favorisée par les cellules **Th17** agit contre les bactéries extracellulaires et les champignons. Elles produisent l'IL-17 qui déclenche la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, comme l'IL-6, l'IL-1 et le TNF α , et des chimiokines qui recrutent d'autres cellules immunitaires sur le site inflammatoire. Les cellules Th17 sont vitales pour la défense de l'hôte contre les agents

(a) Neutralization Antibodies prevent a virus or toxic protein from binding their target.



(b) Opsonization A pathogen tagged by antibodies is consumed by a macrophage or neutrophil.



(c) Complement activation Antibodies attached to the surface of a pathogen cell activate the complement system.

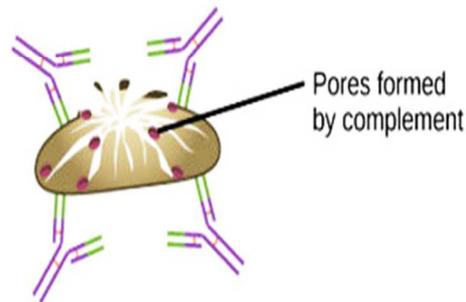


Figure 14. Réponse à médiation humorale

Les anticorps peuvent inhiber l'infection en (a) empêchant l'antigène de se lier à sa cible (neutralisation), (b) en marquant un pathogène pour la destruction par des macrophages ou des neutrophiles (opsonisation), ou (c) en activant la cascade du complément.

(<https://courses.lumenlearning.com/wm-biology2/chapter/antibody-functions/>)

pathogènes, mais sont également impliquées dans les maladies auto-immunes et le cancer (Figure 17) (*Knochermann et al. 2018*).

La principale caractéristique des cellules **Treg** est la suppression de la réponse immunitaire pour éviter des lésions tissulaires importantes et le maintien de la tolérance immunologique pour contrôler l'auto-immunité. Les Treg régulent les réponses immunitaires par quatre mécanismes majeurs: (i) la sécrétion de cytokines inhibitrices telles que l'IL-10, l'IL-35 et le TGF- β ; (ii) la cytolysse directe des cellules cibles par la sécrétion de granzyme-A, de granzyme-B et de perforine ; (iii) la privation d'IL-2 due à une forte affinité pour le CD25 (récepteur d'IL-2) ; (iv) la modulation de la maturation et/ou de la fonction de DC qui permet l'activation des lymphocytes T effecteurs. (*Knochermann 2018; Laplagne et al. 2019*).

Plus récemment, les cellules Th9, Th22 et Tfh ont été décrites comme des populations auxiliaires distinctes. La nature des cytokines de programmation et des facteurs de transcription de ces sous-populations est encore débattue. Les cellules **Th9** produisent de l'IL-9 qui recrute les lymphocytes et les mastocytes comme effecteurs. Les cellules **Th22** sont polarisées par IL-6 et TNF- α pour sécréter l'IL-22 et semblent aggraver le psoriasis chez les patients. Les cellules **Tfh** sécrètent de l'IL-21 pour le développement des cellules B dans les centres germinatifs, ainsi que de l'IFN- γ et de l'IL-4 pour faciliter le changement de classe des immunoglobulines des cellules B en IgG et IgE dans le follicule lymphoïde. Elles sécrètent également de l'IL-9 qui favorise la formation des cellules B mémoire et la différenciation des cellules plasmocytaires (Figure 17) (*Zhang et al. 2013; Abbas et al 2017; Knochermann 2018*). Ces cellules T CD4+ dites auxiliaires ou régulatrices peuvent pour certaines d'entre elles avoir une activité cytotoxique directe similaire à celle des Tc.

Ainsi, les cellules T CD4+ semblent coordonner la réponse immunitaire contre de nombreux agents pathogènes différents et réguler sa durée et son intensité. De plus, elles jouent un rôle dans la formation des cellules T mémoire. Il est évident que l'absence ou le dysfonctionnement des cellules T CD4+ conduit à diverses maladies infectieuses ou auto-immunes (*Abbas et al. 2017*).

Les cellules T CD8+ se différencient principalement en Tc après leur activation, ce sont les cellules tueuses les plus efficaces de la réponse immunitaire cellulaire (Figure 18). Les Tc reconnaissent les antigènes présentés sur les molécules du CMH de classe I exprimés par presque toutes les cellules nucléées en particulier lors d'une inflammation. La destruction par les Tc activés se fait directement par l'engagement des récepteurs de mort (Fas; TRAIL; TNF-R1) sur les ligands respectifs des cellules cibles, ou par la libération de granules cytotoxiques contenant des granzymes et de la perforine. Cela conduit à l'apoptose de la cellule infectée ou endommagée. Les Tc agissent également indirectement par la production de cytokines comme l'IFN- γ et le TNF α qui activent les phagocytes et stimulent leur capacité de phagocytose (*Taniuchi 2018*).

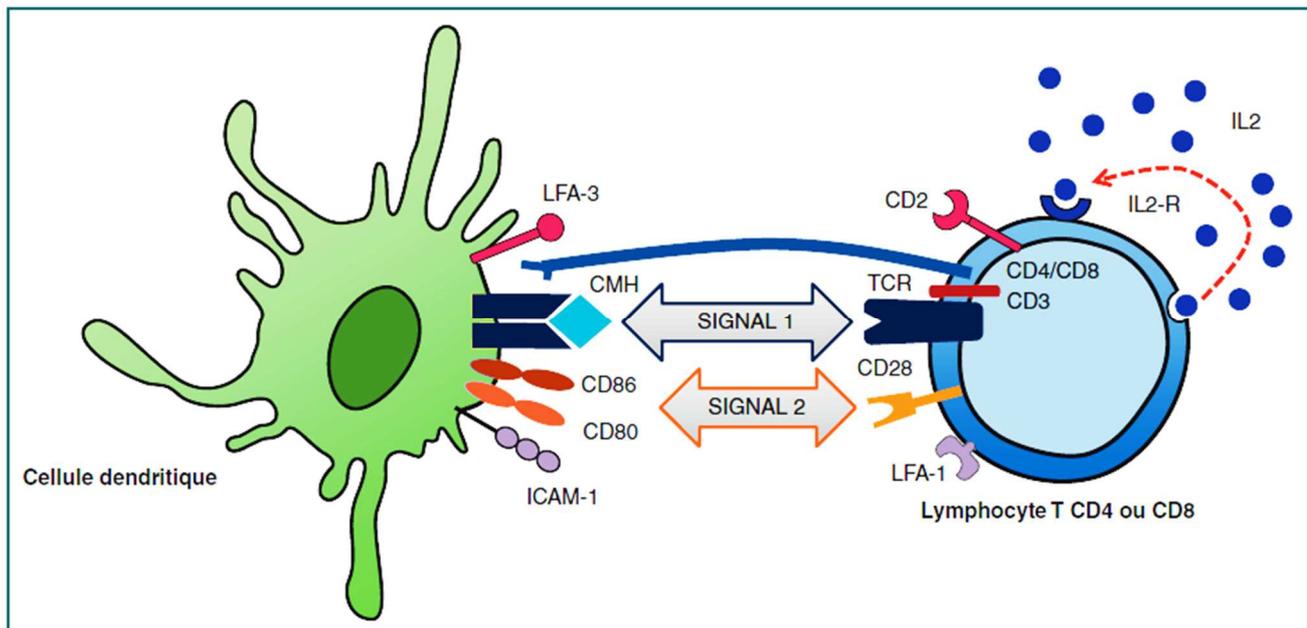


Figure 15. Activation lymphocytaire T : la synapse immunologique

L'activation des lymphocytes T (LT) nécessite plusieurs signaux transmis par les cellules dendritiques matures (CD). Le signal 1 correspond à l'interaction du récepteur des LT (TCR) avec les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) exprimées à la surface des DC. Le signal 2 dit de co-stimulation désigne l'interaction du récepteur CD28 présent sur les LT avec ses ligands CD80 et CD86 exprimés par les CD. Ces interactions entre CD-LT sont stabilisées à la périphérie de la synapse immunologique par des molécules d'adhésion comme LFA-3/CD2 et ICAM-1/LFA-1. (*Galaine et al. 2016*)

II.2 IMMUNITE TUMORALE

Le tissu tumoral est composé d'une population très hétérogène de cellules cancéreuses, ainsi que d'une grande variété de cellules hôtes résidentes et infiltrantes, de protéines de la matrice extracellulaire et de protéines sécrétées, le tout constituant le micro-environnement tumoral (TME). La composition cellulaire du TME est très variable et peut inclure presque tous les types de cellules immunitaires (Tableau 11) tels que lymphocytes Th et Tc, macrophages, cellules NK, cellules dendritiques (DC), lymphocytes B et mastocytes (Figure 19), ainsi que fibroblastes, adipocytes, cellules neuroendocrines, endothéliales et mésenchymateuses (B. Wang et al. 2020).

La réponse immunitaire au cancer (cancer immunoediting) est un processus par lequel le SI peut à la fois éradiquer ou favoriser le développement de la tumeur (Figure 20). Il existe trois phases essentielles dans ce processus : élimination, équilibre et évaison. Initialement les réponses immunitaires innées et adaptatives sont en mesure de contrôler la croissance tumorale. Dans cette phase d'élimination, la réponse inflammatoire aiguë déclenchée par les "signaux de danger" associés à la cellule transformée initie la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (notamment IL-12 et IFN- γ) et la reconnaissance et la destruction de ces cellules par le SI inné (NK, DC et macrophages) (Binnewies et al. 2018). Puis les DC présentent les antigènes tumoraux et activent les Th1 et Tc qui migrent alors vers le site tumoral pour favoriser la destruction. À ce stade, les cellules cancéreuses sont soit complètement éradiquées soit des variantes clonales résistantes se développent. Ces variantes clonales peuvent développer une résistance en réduisant leur immunogénicité et/ou en sécrétant des facteurs immunosuppresseurs. Au cours de cette phase d'équilibre, si les réponses immunitaires sont incapables d'éliminer les cellules nouvellement transformées, alors la phase d'évasion immunitaire est atteinte conduisant au développement tumoral (Barriga et al. 2019).

Au cours de la phase d'évasion, la composante immunitaire du TME est modifiée pour soutenir et favoriser le développement de la tumeur tout en supprimant la cytotoxicité médiée par les cellules immuno-compétentes. Ces cellules participent ainsi à la progression tumorale en favorisant la croissance et l'invasion tumorale (Laplagne et al. 2019).

Différents points de contrôle immunitaires sont exprimés à la fois sur les cellules immunitaires et sur les cellules tumorales [tels que Cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4), Programmed cell death protein 1/son récepteur (PD-1/PD-L1), Indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) et les membres de siglecs de type CD33 (Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins, siglec-7 et siglec-9)]. Plusieurs mécanismes peuvent inhiber la réponse immunitaire antitumorale par l'expression de ces points de contrôle immunitaires alors que leur expression sur les cellules tumorales peut être induite par des voies oncogènes, comme la voie JAK/STAT3. En activant ces voies inhibitrices, les cellules

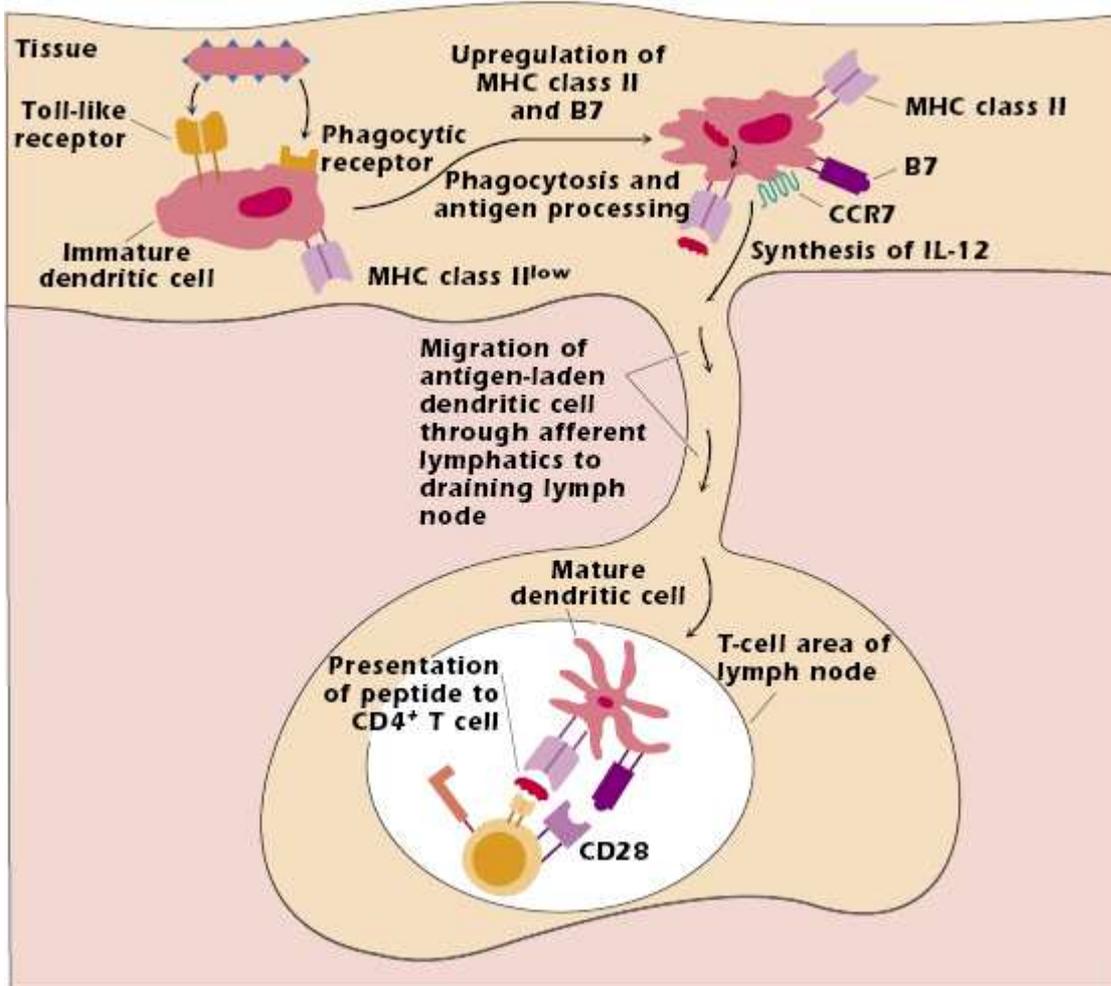


Figure 16. Maturation des cellules dendritiques en réponse à l'agent pathogène

La cellule dendritique immature interagit avec un antigène, traite les protéines antigéniques, augmente l'expression des molécules du CMH de classe II et des co-stimulateurs, modifie l'expression des récepteurs de chimiokines, puis migre vers la zone des lymphocytes T au niveau du ganglion lymphatique, et présente des peptides à la cellule T CD4 + avec le TCR approprié.

<https://oncohemakey.com/activation-and-function-of-t-cells/>

cancéreuses peuvent échapper à l'attaque des cellules immunitaires et induire l'anergie ou l'apoptose des lymphocytes Th1 et Tc ([Bertucci and Gonçalves 2017](#); [Laplagne et al. 2019](#)).

II.2.1 Points de contrôle immunitaires et cancer mammaire

Dans le cancer mammaire, les mécanismes d'échappement comprennent une expression réduite du CMH-I et/ou des molécules co-stimulantes et une expression accrue de facteurs immunosuppresseurs qui jouent un rôle majeur dans la progression du cancer. Les points de contrôle immunitaires des voies inhibitrices sont cruciaux pour que le SI maintienne sa tolérance et module les réponses immunitaires afin de minimiser les lésions. Les points de contrôle immunitaires (tels que CTLA4, PD-1/ PD-L1, IDO et Siglec-9) sont déclenchés par des interactions ligand-récepteur et peuvent être bloqués par des anticorps ou modulés par des formes recombinantes de ligands ou de récepteurs ([Emens 2018](#), [Nagarajan et al. 2019](#)).

* La **protéine 4**, associée aux Tc (CTLA-4 ou CD152) et exprimée à la surface des LT activés et d'une sous-population de Treg, fonctionne comme une molécule de point de contrôle immunitaire qui supprime l'activité des LT et inhibe la réponse anti-tumorale ([Figure 21](#)) ([Barriga et al. 2019](#)). CTLA-4 interagit avec les marqueurs de stimulation immunitaire CD80 et CD86 des DC ce qui entraîne l'activation des DC et des LTh/Tc. Les LTreg (CD4+ Foxp3+) sont capables de bloquer cette interaction entraînant une diminution de l'activation des DC, l'inhibition de la production de cytokines (IL-2), l'arrêt du cycle des LT et la suppression de la prolifération des Tc. Les cellules cancéreuses s'échappent également du SI *via* l'expression de CTLA-4 sur leur surface. *In vitro*, la co-culture de DC humaines et d'une lignée tumorale du sein CTLA-4+ a entraîné une diminution de l'expression du CMH de classe II et des molécules costimulatrices (CD40, CD80, CD83, CD86) sur la surface des DC qui sont devenues ainsi incapables d'activer les cellules T ([Rowshanravan, Halliday, and Sansom 2018](#)).

* La **protéine 1 de mort cellulaire programmée (PD-1, CD279)**, homologue au CD28, est une molécule inhibitrice de signalisation immunitaire. PD-1 est exprimée par les LT circulants une fois activés ([Figure 21](#)). PD-1 est également exprimée par les NK activées, les LB, les monocytes, les DC, les cellules myéloïdes et les thymocytes ([Bates et al. 2018](#)). Les ligands (L) de PD-1, PD-L1 (B7-H1, CD274) et PD-L2 (B7-DC, CD273), sont exprimés par les DC et les monocytes. L'interaction entre PD-1 et ses ligands PD-L1 ou PD-L2 conduit à une diminution de l'activité des LT et son expression est associée à un mauvais pronostic. Dans le cancer du sein, le PD-L1 est surexprimé, induisant la suppression de l'infiltration des LT dans la tumeur ce qui résulte en la surexpression de Ki-67+ (marqueur de prolifération) et favorise les métastases. De plus, l'analyse de l'expression de PD-L1 dans les lignées cellulaires du cancer du sein a montré une expression plus élevée dans les lignées cellulaires basales et mésenchymateuses que dans les lignées luminales. Les tumeurs du sein

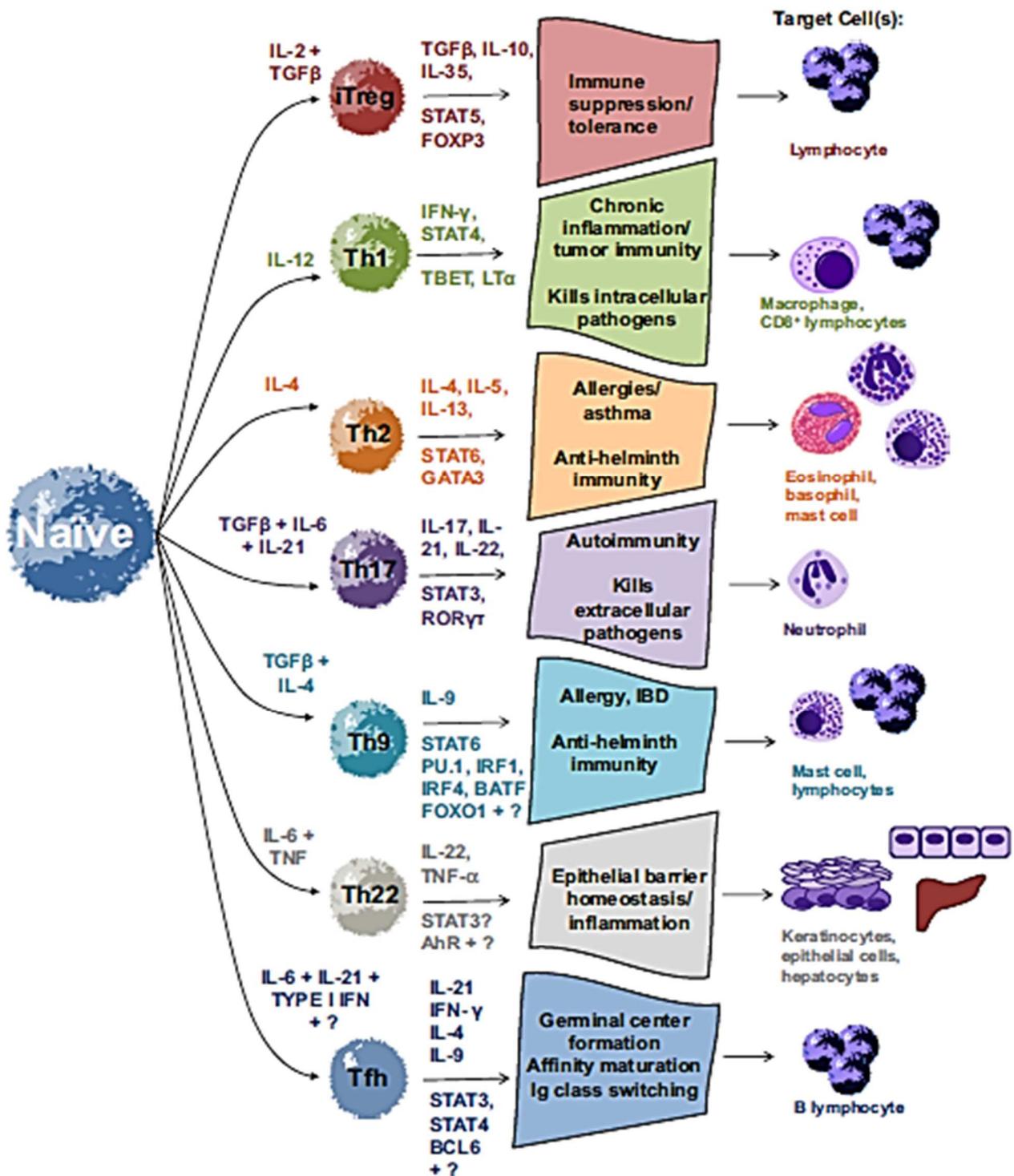


Figure 17. Différenciation et fonctions des cellules CD4+

Les cellules T CD4+ se différencient en fonction des cytokines présentes dans leur environnement. Sous l'influence de l'IL-2 et du TGF-β, les cellules Treg se développent et expriment les facteurs de transcription STAT5 et Foxp3 et les cytokines TGF-β et IL-10. L'IL-12 induit le développement des cellules Th1 et favorise la réponse immunitaire en présence d'IFN-γ, STAT4, T-bet et LTα. La différenciation des cellules Th2 est induite par l'IL-4 notamment en situation d'allergie ou d'asthme. La différenciation en Th17 se produit en présence du TGF-β, de l'IL-6 et de l'IL-21. L'IL-1β et l'IL-23 favorisent la stabilisation des cellules Th17 pendant l'expansion clonale. Lors de la différenciation, les cellules Th17 sont le plus souvent identifiées par leur expression de RORγt et STAT3. Les cellules Th9, Th22 et Tfh ont été récemment décrites, et les facteurs de transcription contrôlant leur différenciation restent discutés (Riera Romo et al. 2016).

présentant une expression accrue de PD-L1 sont de plus mauvais pronostic : grande taille de la tumeur, grade élevé, taux de prolifération élevé et sous-types moléculaires agressifs (basaux et enrichis en ERBB2) (*Schütz et al. 2017; Bertucci and Gonçalves 2017*).

* **L'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO)** est une enzyme qui catalyse la dégradation oxydative du tryptophane *via* la voie de la kynurénine en présence d'IFN, suite à l'interaction B7/CTLA-4 (Figure 22). Le tryptophane est un acide aminé essentiel pour la survie cellulaire, et un manque de tryptophane dans le TME conduit à une inhibition de la prolifération des LT et favorise la différenciation des LTreg. Ainsi, l'IDO exerce un effet immunosuppresseur permettant aux cellules tumorales d'échapper aux cellules immunitaires. La surexpression d'IDO par les cellules cancéreuses a été corrélée à un mauvais pronostic et une survie globale réduite chez les patientes atteintes de tumeurs solides, y compris le cancer du sein. Les microvésicules libérées par la tumeur maligne du sein surexpriment significativement l'IDO par rapport aux microvésicules de la tumeur bénigne ou du tissu mammaire sain. De plus, l'expression de l'IDO est plus élevée au stade avancé du cancer du sein (*Bates et al. 2018; Barriga et al. 2019*).

* **Les lectines de type immunoglobuline (Siglecs)** liant l'acide sialique sont exprimées à la surface des cellules immunitaires (Figure 23). Actuellement, 15 Siglecs différentes ont été identifiées. En particulier, Siglec-7 sur les NK et Siglec-9 sur les neutrophiles, les DC et les monocytes sont associées à l'immunité anti-tumorale. Siglec-9 interagit avec les groupements acide sialique de MUC1 (Mucin1), glycoprotéine de haut poids moléculaire exprimée par les cellules d'adénocarcinome mammaire, entraînant une immunosuppression (*Binnewies et al. 2018*). La barrière muqueuse qui protège les épithéliums contient des mucines sécrétées et transmembranaires. Les mucines liées à la membrane ont des rôles biologiques importants dans les interactions cellule-cellule et cellule-matrice. Les adénocarcinomes humains surexpriment les mucines transmembranaires associées aux tumeurs, telles que MUC1 et MUC4 qui favorisent la progression tumorale en augmentant la croissance et la survie des cellules. Des études ont montré que MUC1 fonctionne comme une oncoprotéine en interagissant avec le récepteur du Facteur de croissance épidermique (EGFR), ERBB2 et d'autres récepteurs de la tyrosine kinase. Les mucines sont ainsi identifiées comme des cibles pronostique et/ou thérapeutique potentielles du cancer du sein. Les stratégies immunothérapeutiques ciblant MUC1 se sont révélées prometteuses dans les modèles animaux et dans les essais cliniques humains par l'amélioration des réponses immunitaires et cliniques. Dans le cancer du sein, la surexpression de MUC1 est associée à un mauvais pronostic ce qui suggère que Siglec-9 joue un rôle important dans la progression du cancer du sein (*Barriga et al. 2019*).

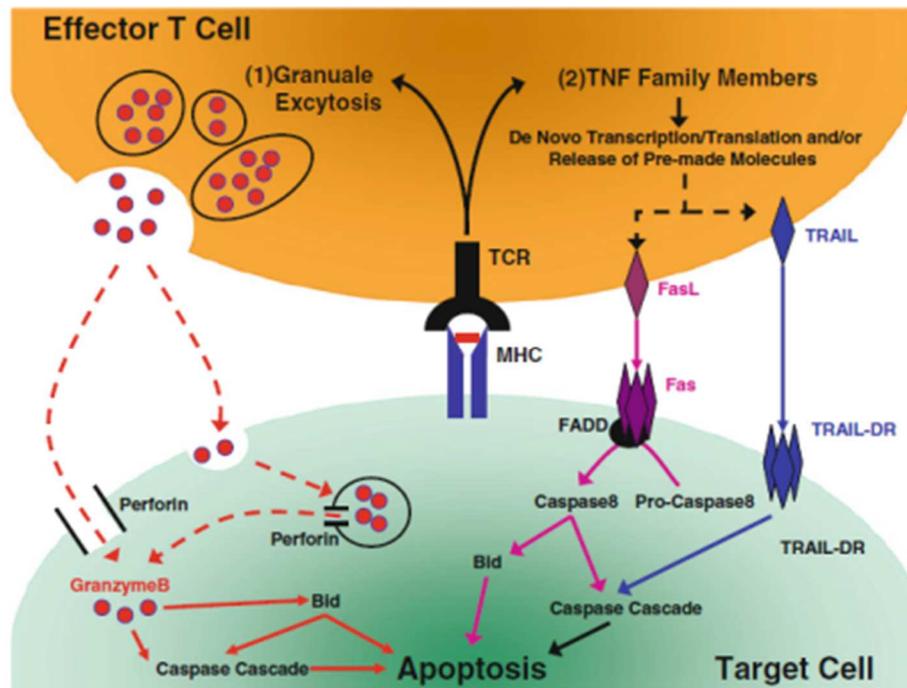


Figure 18. Fonction cytotoxique des lymphocytes Tc

- (1) L'exocytose est initiée suite à un stimulus TCR entraînant la libération de granules cytotoxiques envers les cellules cibles. La libération ultérieure de perforine et de protéases de sérine (granzymes) active les cascades de caspases entraînant l'apoptose des cellules cibles.
- (2) Les protéines de la famille TNF sont surexprimées lors du stimulus TCR, ce qui conduit à l'engagement des récepteurs de mort (Fas; TRAIL; TNF-R1) sur les ligands respectifs des cellules cibles résultant en l'activation des cascades de caspases provoquant l'apoptose des cellules cibles ([Abbas et al. Cellular and Molecular Immunology 2017](#)).

II.2.2 Cellules immunitaires associés à la tumeur

Une grande diversité de cellules immuno-compétentes infiltre le tissu tumoral en des proportions variables. On sait que LTh1, Tc, NK, macrophages M1 et DC inhibent la croissance tumorale tandis qu'inversement, Th2, Treg, macrophages M2 et cellules myéloïdes suppressives (MDSC) favorisent la croissance tumorale (*Barriga et al. 2019*). Ces différentes cellules interagissent entre elles de nombreuses manières, certains de ces mécanismes d'interaction sont illustrés dans la [figure 19](#). Dans le tissu tumoral, les cellules néoplasiques peuvent amoindrir les défenses immunitaires anti-tumorales de multiples façons, comme par la suppression directe des cellules immunitaires anti-tumorales, ou par le recrutement et la réactivation de cellules immunosuppressives (*Edechi et al. 2019*).

II.2.2.i Macrophages associés à la tumeur

Les macrophages infiltrent le microenvironnement tumoral pour initier une réponse inflammatoire, et se différencient en macrophages associés aux tumeurs (TAM) de type M2 qui favorisent la croissance tumorale et la suppression immunitaire ([Figure 24](#)). Les TAM sont reprogrammés pour inhiber les fonctions lymphocytaires par la sécrétion des cytokines inhibitrices, comme l'IL-10, des prostaglandines et des chimiokines tels que CXCL1/2 qui recrutent les Treg et induisent l'apoptose des LT CD8 (*Brady, Chuntova, and Schwertfeger 2016*). Dans un modèle murin de cancer mammaire, il a été démontré que les souris développent des LTh2 produisant de l'IL-4, qui polarisent les TAM en phénotype M2. Ces M2 produisent ensuite de l'EGF qui initie l'invasion, la migration métastatique des cellules tumorales (*DeNardo et al. 2009*). La co-culture *in vitro* de cellules tumorales mammaires triple négatives ou de type luminal avec des macrophages a induit la polarisation de ces derniers en phénotype M2, avec surexpression de PD-L1 (sur la surface des M2) par l'activation de la voie JAK2/STAT3. De même, les cellules cancéreuses mammaires peuvent orienter les macrophages vers le phénotype M2 par le Facteur 1 de stimulation des colonies de macrophages granulocytaires (GM-CSF1) (*Sousa et al. 2015; Jing et al. 2020*).

Les TAM produisent des enzymes de dégradation de la matrice extracellulaire telles que les métalloprotéinases (MMP). Le clivage protéolytique du TGF β du peptide stimule l'expression et l'activation de MMP2, MMP3, MMP9 et MMP13, qui facilitent la migration des cellules tumorales, la dégradation des membranes basales des vaisseaux sanguins et la diffusion métastatique. Le TGF β augmente la capacité immunosuppressive des TAM en différenciant les TAM en macrophages M2 et en stimulant l'expression de PD-L1 qui conduit à l'échappement de la tumeur. Les M2 expriment l'arginase 1 (ARG1), des cytokines anti-inflammatoires et des protéases qui soutiennent leurs fonctions pro-oncogènes (*Obeid et al. 2013*). Un nombre accru de macrophages M2 est associé à un pronostic défavorable pour les tumeurs de type luminal et basal. De plus, la sécrétion de VEGF par

Tableau 11. Cellules immunitaires infiltrant les tumeurs : marqueurs moléculaires, sous-type, fonctions et points de contrôle auxquels elles sont associées (Savas et al. 2016).

Cell	Markers	Subtypes	Normal function	Checkpoint markers	Known/suspected function in tumour microenvironment
Cytotoxic T cells	CD3, CD8	NA	Cytolysis of virally infected cells	PD-1, PD-L1, CTLA-4,	Cytolysis of tumour cells
Helper T cells	CD3, CD4	T _H 1	Response to intracellular pathogens	OX40	Support CD8 ⁺ T cells by secreting IFN γ
		T _H 2	Response to parasites	NA	Associated with ineffective antitumour immunity
		T _H 17	Response to fungi and extracellular bacteria	NA	Antitumour and protumour effects
		T _{FH}	B-cell help	NA	Role in tertiary lymphoid structures
		T _{REG}	Self-tolerance	CTLA-4	Tolerance of tumour antigens
B cells	CD19, CD20	NA	Antibody production	NA	Antitumour antibodies Possible direct cytotoxic action
Macrophages	CD14, CD11b, HLA-DR	M1	Inflammation and response to intracellular pathogens	IDO	Secretion of antitumour cytokines
		M2	Wound response, angiogenesis	NA	Immunosuppressive cytokines, angiogenesis
NK cells	CD16, CD56, NKG2D	NA	Innate immunity	IDO	Killing of tumour cells
Dendritic cells	CD135, Flt3, CD117, CD26, CD103	NA	Antigen presentation Co-stimulation	IDO	Cross presentation of tumour peptide antigens

CTLA-4 : cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 ; *IDO* : indoleamine 2,3-dioxygenase ; *NA* : not applicable ; *PD-1* : programmed cell-death protein 1 ; *PD-L1* : PD-1 ligand 1 ; *TIL* : tumour-infiltrating lymphocyte ; *TIM3* : T-cell membrane protein 3.

les TAM stimule l'angiogenèse, favorisant le caractère invasif et le potentiel métastatique. Les TAM peuvent également transformer les cellules cancéreuses mammaires par la Transition épithéliale-mésenchymateuse (EMT), ce qui favorise l'invasion et la migration métastatique des cellules. Les TAM contribuent aussi à la régulation du récepteur de mort PD-1 et de son ligand PD-L1 dans le micro-environnement tumoral mammaire ([Barriga et al. 2019](#)).

II.2.2.ii Cellules Natural Killer associées à la tumeur

Les cellules NK, intégrées au SI inné, jouent un rôle dans la réponse immunitaire précoce anti-tumorale. Outre la destruction directe des cellules tumorales, les NK peuvent indirectement stimuler la destruction de ces cellules en libérant des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- γ , le TNF α , le GM-CSF et des chimiokines (CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 et CXCL8) qui modulent la fonction d'autres cellules immunitaires des SI inné et adaptatif. L'activité des NK dépend des interactions de leurs récepteurs activateurs et inhibiteurs avec une grande variété de ligands. L'activité et la cytotoxicité des NK sont contrôlées par différentes cytokines telles que l'IL-2, l'IL-12, l'IL-18 et l'IL-1 ([Shihab et al. 2020](#)).

Le rôle des cellules NK a été décrit pour la première fois chez la souris où la déplétion de ces cellules a entraîné une croissance tumorale plus rapide après la transplantation de différentes lignées cancéreuses mammaires (MDA-321, MCF-7 et T47) ([Dewan et al. 2007](#)). Une autre étude a montré qu'un nombre réduit de NK au niveau du sang périphérique est associé à une incidence importante de différentes tumeurs solides, y compris la tumeur mammaire, chez les patients présentant une immunodéficience, suggérant une fonction protectrice des cellules NK dans certains types de tumeurs ([Grebic et al. 2020](#)). Les cellules NK cytotoxiques et T CD8 expriment un récepteur d'activation crucial, le NKG2D (NK groupe 2 membre D) qui, suite à son activation, déclenche la libération de molécules cytotoxiques afin de tuer les cellules tumorales et infectées. Le NKG2D peut se lier à deux types de ligands, la protéine A (MICA) et la protéine B (MICB) liées à la chaîne de classe I du CMH. Lors de la transformation néoplasique, les cellules tumorales réduisent généralement l'expression des molécules du CMH I pour échapper aux attaques des Tc et NK ([Shihab et al. 2020](#), [Grebic et al. 2020](#)). Par contre, il a été démontré que les NK de tumeurs non invasives et invasives diminuent l'expression des récepteurs activateurs (NKG2D) et augmentent l'expression des récepteurs inhibiteurs (NKG2A, CD94/NK groupe 2 membre A), induite par de multiples cytokines immunosuppressives (par ex, TGF- β et IDO) dans le micro-environnement tumoral ([Bates et al. 2018](#)). En plus, l'IL-18 dérivée de la tumeur augmente les propriétés immunosuppressives sur les cellules NK (par d'autres cellules immunitaires) induisant leur expression de PD-1 qui est corrélée avec un mauvais pronostic des patients TNBC ([Park et al. 2017](#)).

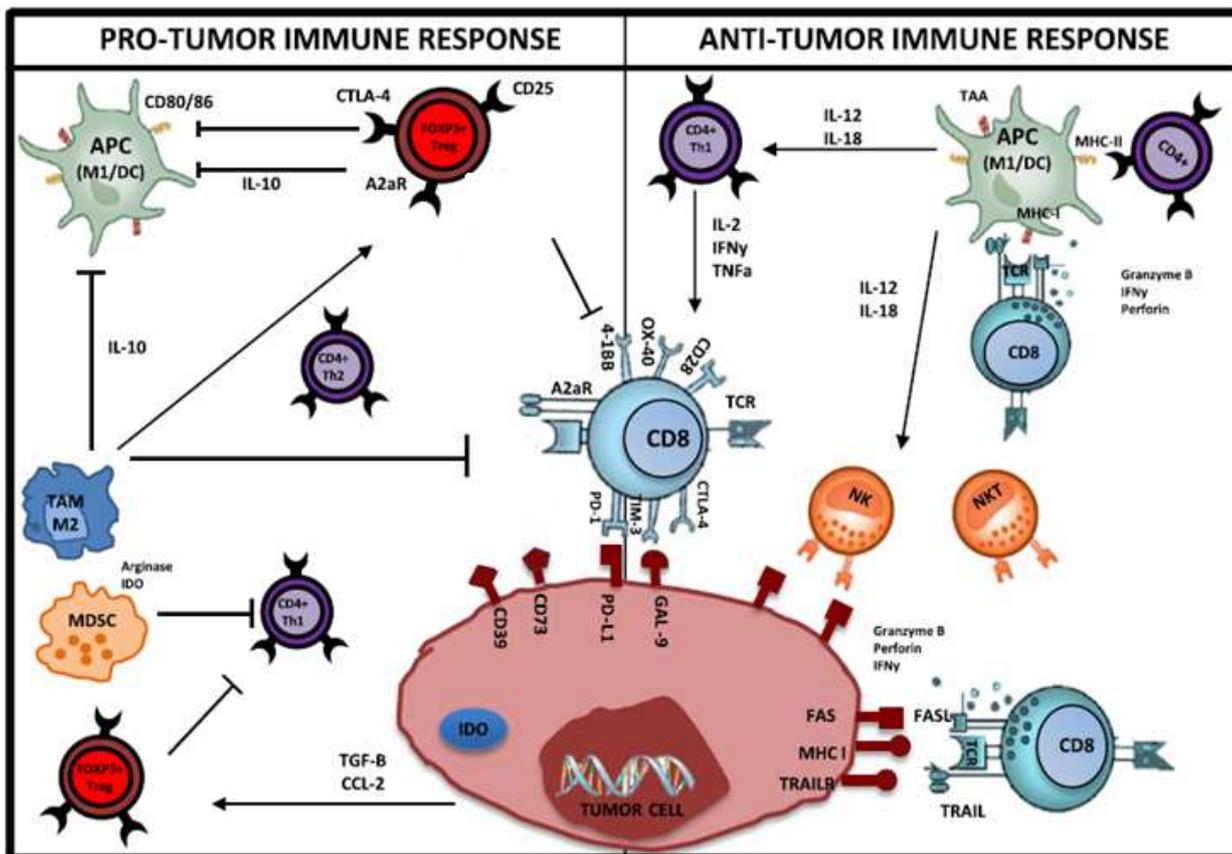


Figure 19. Interactions entre le micro-environnement immunitaire et les cellules tumorales dans le cancer mammaire

La réponse immunitaire antitumorale dépend de l'activation des Th1 et de leur production d'IFN γ , qui à son tour induit l'expansion, la différenciation et l'activation de T CD8 spécifiques de la tumeur. Les T CD8, différenciés en Tc, favorisent la lyse cellulaire *via* la reconnaissance de TAA spécifiques (CMH, FAS, TRAILR) à la surface des cellules cancéreuses/APC. Les T CD4 peuvent également reconnaître le CMH II sur les APC. Après formation du complexe (TCR-CMH / peptide), les granzymes, IFN γ et perforine sont libérés par les Tc entraînant une exocytose des granules et la mort des cellules tumorales par apoptose. Les cellules NK à l'aide des APC (DC/M1) et Th1 peuvent reconnaître et éliminer les cellules tumorales. Dans l'environnement pro-tumoral, CTLA-4 et PD-1 délivrent des signaux inhibiteurs à la suite de l'épuisement / anergie des LT provoqués par l'activation prolongée. CTLA-4 régule négativement l'activation des LT pendant la phase d'évasion. PD-1 exprimé par les LT se lie à son ligand PD-L1, présent dans le microenvironnement tumoral, ce qui entraîne l'inhibition des LT (apoptose). Les cellules Treg FOXP3 jouent un rôle essentiel lors de la sélection des LT CD8 en réduisant leur fonctionnalité. Les Treg ont aussi une action inhibitrice sur les APC, LT CD8, NK et LTh1. Les cellules tumorales peuvent sécréter des cytokines et des chimiokines (ex. TGF- β , CCL2) qui recrutent et stimulent les cellules suppressives comme Treg, MDSC et macrophages M2. M2 et MDSC inhibent les capacités des LT *via* l'expression d'arginase. La surexpression des enzymes immunosuppressives telles que l'IDO et l'arginase permet l'élimination de métabolites essentiels à l'activation des cellules effectrices. Les cellules tumorales sous-expriment les molécules du CMH et les antigènes et surexpriment les molécules inhibitrices telles que PD-L1, provoquant l'inhibition de la reconnaissance immunitaire et permettant ainsi l'échappement immunitaire et la progression du cancer ([Dushyanthen et al. 2015](#)).

APC : antigen-presenting cell ; CCL-2 : chemokine ligand-2 ; CTL : cytotoxic T lymphocyte ; CTLA-4 : cytotoxic T lymphocyte-associated protein ; DC : dendritic cell ; IDO : indolamine 2,3-dioxygenase ; IFN γ : interferon gamma ; IL : interleukin ; M1/M2 : TAM tumor-associated macrophage ; MDSC : myeloid-derived suppressor cell ; MHC : major histocompatibility complex ; NK : natural killer ; PD-1 : programmed death ; TAA : tumor-associated antigen ; TCR : T-cell receptor ; TGF- β : transforming growth factor beta ; TNF α : tumor necrosis factor alpha ; TRAIL : TNF-related apoptosis-inducing ligand ; Treg : T regulatory cell.

II.2.2.iii *Lymphocytes infiltrant les tumeurs*

La tumeur mammaire se caractérise par une infiltration lymphocytaire importante. En effet, une étude a estimé que les lymphocytes représentent entre 1% et 45% de la masse tumorale cellulaire avec prédominance des Tc, des Th et des Treg ([Barriga et al. 2019](#)).

Les LT CD4+ naïves peuvent se différencier en sous-populations d'effecteurs spécifiques, y compris, les Th1, les Th2, les Th17 et les cellules Treg ([Figure 25](#)). Les Th1 sécrètent IL-2, IFN- γ et TNF α , qui favorisent les activités cytolytique et anti-tumorale des macrophages. Les Th2 sécrètent de l'IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 et IL-13 qui induisent une anergie des cellules T et renforcent l'activité des TAM de type M2 ([Edechi et al. 2019](#)). Dans une étude *in vivo*, l'IL-17A produite par les Th17, favorise la croissance tumorale en modifiant l'activité et le profil d'expression génique des cellules tumorales, témoignant du rôle pro-tumoral de cette IL. De plus, une expression élevée de l'IL-17A est corrélée à un mauvais pronostic chez les patientes atteintes d'un carcinome canalaire invasif du sein ([Benevides et al. 2015](#)).

Les LTreg favorisent la progression tumorale mammaire en inhibant l'activité et la prolifération des Tc et des Th1 présents dans le microenvironnement par contact direct ou par la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires (IL-10 et TGF) ([Varn et al. 2017](#)). De plus, l'expression intra-tumorale de FoxP3, marqueur des Treg, est linéairement associée à l'invasion, la taille et la vascularisation de la tumeur ([Slaney, Rautela, and Parker 2013](#)).

Les LT CD8+ se différencient en Tc, qui sont les principales cellules effectrices contre le développement tumoral. Les Tc ont la capacité de tuer les cellules cancéreuses par la sécrétion d'un complexe pro-inflammatoire IFN et granzyme-perforine. L'activation et la maturation des Tc sont modulées par l'IFN sécrété par les LTh1 et par les antigènes spécifiques associés aux tumeurs (TAA) captés par les DC. La présence de LT CD8+ est corrélée à un bon pronostic dans le cancer du sein triple négatif et HER2+, tandis qu'une forte infiltration des LT CD8+ dans les tumeurs mammaires de type luminal (ER+, PR+) semble associée à un pronostic défavorable ([Sobral-Leite et al. 2019](#)).

En ce qui concerne les sous-types de cancer mammaire, les tumeurs ER- présentent un nombre plus élevé de TIL par rapport aux tumeurs ER+. De plus, le nombre total de LT, LB, macrophages et de MDSC est également plus élevé dans les tumeurs du sein ER- que dans les ER+. Ainsi, le nombre de TIL dans le micro-environnement tumoral peut, non seulement aider à distinguer le sous-type de cancer, mais permettre d'identifier les marqueurs associés à la progression et à la diffusion métastatique de la tumeur primaire ([Barriga et al. 2019](#)).

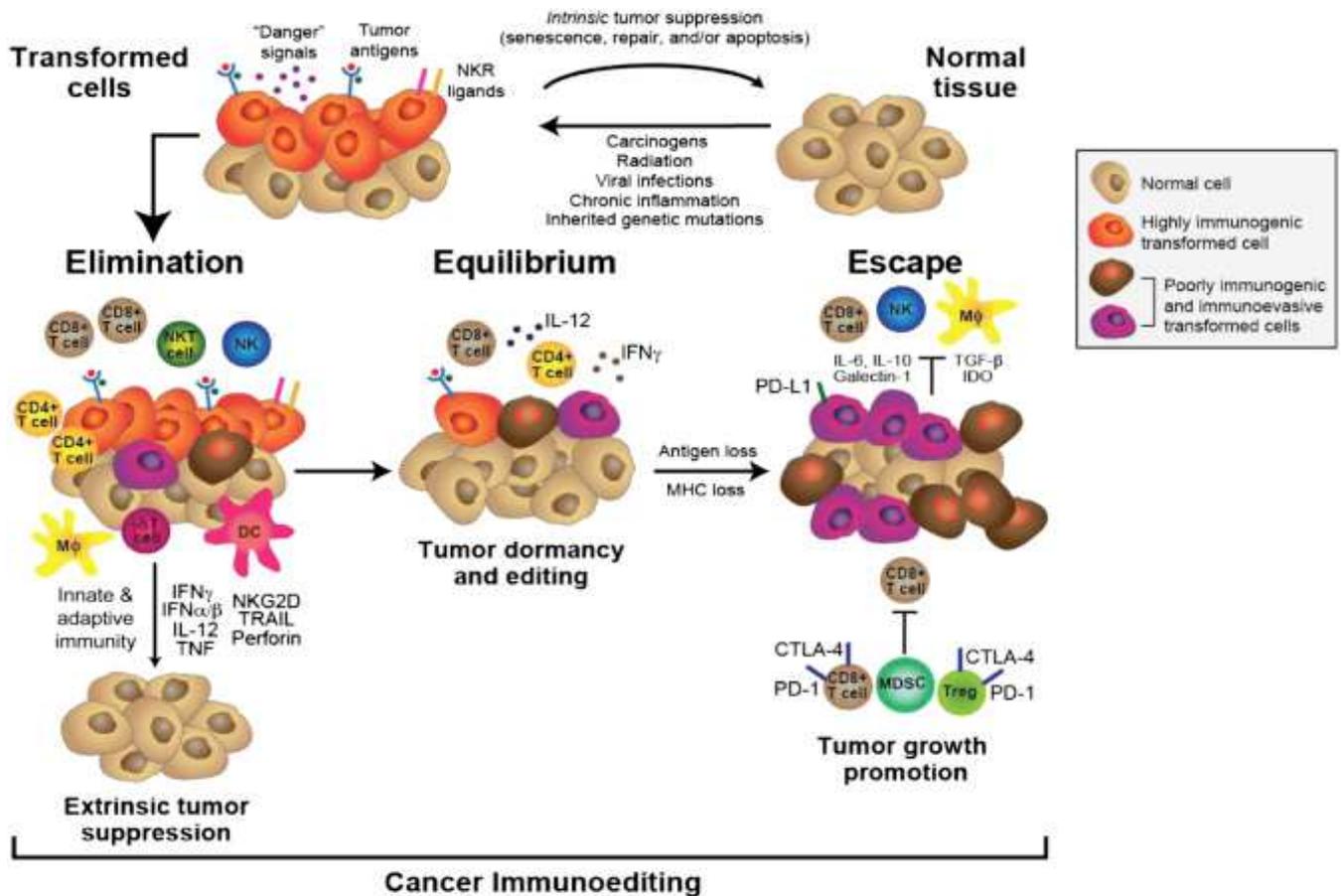


Figure 20. Réponse immunitaire au cancer (cancer immunoeediting) : rôle du système immunitaire dans la suppression et la promotion du cancer

A un stade précoce du développement tumoral, des signaux de danger comme les IFN de type I, les "DAMPs" (Damage-associated molecular patterns) ou molécules de surface, vont activer les SI inné et adaptatif pour détecter et détruire les cellules transformées avant que la tumeur ne devienne cliniquement décelable. Des variants cellulaires ayant survécu à la phase d'élimination vont s'engager dans la phase d'équilibre durant laquelle l'immunité adaptative impliquant cellules T, IL-12 et IFN- γ s'avère indispensable à leur maintien en état de dormance. Sous pression de sélection constante, ces variants génétiquement instable, peuvent ne plus être reconnus par l'immunité adaptative, devenir insensibles aux effets des effecteurs immunitaires et/ou induire un état immunosuppresseif au niveau du microenvironnement tumoral. Ces cellules transformées vont alors entrer dans la phase d'échappement et promouvoir une croissance tumorale jusqu'à l'apparition clinique de la pathologie.

[Schreiber, Old LJ, Smyth MJ. Science. 2011](#)

II.3 VITAMINE D ET IMMUNITÉ

La fonction initialement identifiée de la VitD est de réguler l'homéostasie phosphocalcique et de contrôler le métabolisme osseux. Cependant, le déficit en VitD est rapporté dans plusieurs affections chroniques associées à une inflammation et à une dérégulation du SI, telles que le cancer, le diabète, l'asthme et la polyarthrite rhumatoïde (*Bishop et al. 2020*). Ces observations témoignent du rôle de la VitD dans la modulation de la fonction immunitaire et suggère l'hypothèse d'une altération de son métabolisme spécifique de la maladie. Deux constatations confortent cette hypothèse : premièrement, le récepteur de la vitamine D (VDR) est exprimé par la majorité des cellules immunitaires ; deuxièmement, il existe un métabolisme actif de la VitD dans les cellules immunitaires qui peuvent convertir localement la 25D en 1,25D, sa forme active grâce à l'expression de l'enzyme CYP27B1. Les signaux régulant l'expression du CYP27B1 dans les cellules immunitaires sont différents de ceux régulant la production rénale de la 1,25D (*Sassi, Tamone, and D'Amelio 2018*). Les signaux inflammatoires, tels que le lipopolysaccharide (LPS) et les cytokines tels que l'IL-15 et l'IFN- γ sécrétés par les Th1, induisent la production de CYP27B1 au niveau des monocytes et des macrophages. Ces spécificités dans la régulation de la production de la 1,25D indiquent que l'action immunomodulatrice de la 1,25D s'exerce par voie autocrine ou/et paracrine. Ainsi, la VitD *via* le VDR favorise l'immunité innée, mais joue aussi un rôle suppresseur de l'immunité adaptative et un effet anti-inflammatoire, en favorisant la différenciation des DC et Treg et en réduisant la réponse des LTh1 et LTh 17 et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (*Ros-Soto et al. 2019*).

II.3.1 Vitamine D et monocytes/macrophages

Comme précédemment évoqué, les cellules immunitaires telles que les macrophages produisent de la 1,25D lors de la réponse contre un pathogène. La 1,25D en se liant au VDR, à son tour, régule la réponse innée en activant la transcription des gènes et en favorisant la différenciation des monocytes en macrophages matures et en stimulant les capacités chimiotactique et phagocytaire des macrophages (*Liu et al. 2015*). La 1,25D induit la surexpression du CD14 (corécepteur de TLR4) par les monocytes alors qu'elle inhibe l'expression des TLR2 et TLR4, de façon temporaire et dose-dépendante. Sadeghi K et al. ont émis l'hypothèse que la suppression de l'expression des PRR par la VitD dans les cellules présentatrices d'antigène permettrait de réduire la réponse inflammatoire excessive médiée par les Th1 conduisant à l'auto-immunité (*Sadeghi et al. 2006*). La régulation directe de la réponse immunitaire innée antimicrobienne par la 1,25D est étayée par l'identification d'éléments de réponse à la vitamine D (VDRE) adjacents aux sites promoteurs de deux gènes codant pour deux peptides antimicrobiens (AMP), la cathélicidine (CAMP /LL37 /CAP18 /FALL39) et la β -défensine 2 (DEFB2/HBD2). Ces deux peptides déstructurent les membranes microbiennes et

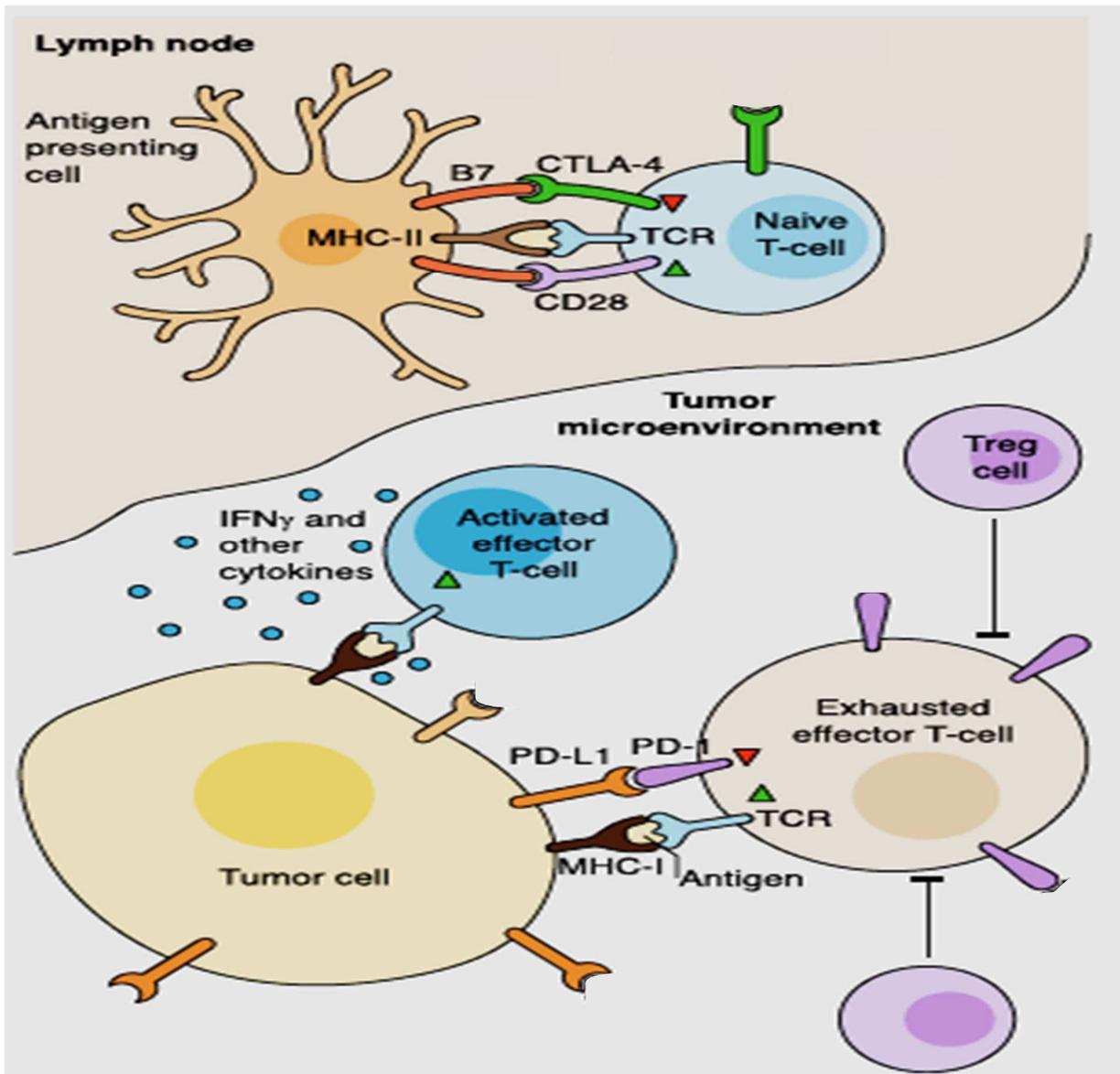


Figure 21. Points de contrôle immunitaires

Les CPA activent les cellules T naïves par le biais du complexe CMH-II/TCR et de la liaison co-stimulatrice B7 (CD80/86) /CD28. Les cellules T effectrices activées détruisent les cellules tumorales en libérant de l'IFN- γ et d'autres cytokines qui stimulent la réponse immunitaire anti-tumorale. Le CTLA-4 entre en liaison compétitive avec le ligand B7 pour délivrer un signal inhibiteur de la réponse effectuée par les lymphocytes T. Les cellules tumorales expriment PD-L1, qui inhibe l'activité immunitaire en se liant aux récepteurs PD-1 des cellules T, malgré la reconnaissance par TCR des antigènes tumoraux cibles présentés sur le complexe CMH-I des cellules tumorales. Les cellules Treg inhibent également l'activité des autres cellules T et conduisent à un phénotype de cellule T « épuisé » (Conway et al. 2018).

CTLA-4: cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4; MHC: major histocompatibility complex; PD-1: programmed cell death protein 1; PD-L1: programmed death ligand 1; TCR: Tcell receptor.

contribuent ainsi à l'élimination des agents infectieux tels que bactéries, virus et champignons (Figure 26).

L'activation du TLR des monocytes /macrophages (mais pas des DC) entraîne l'expression du VDR et d'autres gènes cibles du VDR et conduit à l'induction de la cathélicidine (Sassi et al. 2018). L'étude de Wang T-T et al. a révélé une forte induction de la cathélicidine par la 1,25D avec augmentation de l'activité de NF- κ B dans plusieurs modèles cellulaires (kératinocytes, neutrophiles, monocytes/macrophages) (Wang et al. 2004). Ces observations ont été confirmées dans des études ultérieures *in vitro* et *in vivo* (Gombart, Borregaard, and Koeffler 2005). En présence d'un taux accru de cathélicidine, les cellules immunitaires induisent l'activité de la NOD2- β -défensine 2, de la protéine 5 liée à l'autophagie (ATG5) et de la Beclin 1 (protéine impliquée dans l'autophagie), ce qui favorise l'autophagie par la formation des autophagosomes (Figure 26) (Liu et al. 2015).

La liaison de la VitD au VDR peut stimuler l'expression du gène β -défensine 4A (DEFB4A) qui code pour la β -défensine 2. Par rapport à la cathélicidine, la VitD a moins d'influence sur l'expression de DEFB4 car d'autres stimuli sont nécessaires pour augmenter l'activité transcriptionnelle du DEFB4-VDRE. L'IL-1 β gastro-intestinale augmente l'expression de DEFB4. De plus, le DEFB4 est induit par la 1,25D *via* le domaine NOD2 qui se lie au muramyl dipeptide, produit de la membrane bactérienne. L'activation des cellules immunitaires stimule l'expression d'IL-1 et supprime l'expression de l'antagoniste IL-1RA, améliorant ainsi la signalisation intracrine d'IL-1 et augmentant l'activité de NF- κ B. La voie NF- κ B stimule également les signaux NOD2 favorisant ainsi l'activité DEFB4. Par conséquent, la VitD favorise la synthèse de β -défensine 2 par l'activation de NOD2 et la stimulation de NF- κ B (Figure 27) (Liu et al. 2015; Charoenngam and Holick 2020).

Certains composants de la signalisation de la VitD dans l'immunité innée semblent spécifiques à l'espèce. Par exemple, la régulation de l'expression des AMP par la VitD n'est conservée que chez les primates, du fait que le VDRE dans le gène CAMP est présent dans une répétition Alu trouvée exclusivement chez les primates et non chez les rongeurs. En outre, bien que les gènes HBD2, CAMP et NOD2 soient induits par la 1,25D dans les cellules humaines d'origine épithéliale ou myéloïde, ils ne sont pas régulés de la même manière dans les cellules murines (Bishop et al. 2020).

II.3.2 Vitamine D et Natural Killer

Tandis que certaines études ne montrent aucun effet de la 1,25D sur l'activité des NK, d'autres suggèrent un rôle important de la 1,25D sur les fonctions de ces cellules. Ainsi les patients souffrant de pathologies affectant le métabolisme de la VitD, comme l'insuffisance rénale chronique ou le rachitisme résistant à la VitD, présentent une activité altérée des cellules NK. De plus, chez ces patients, la supplémentation en VitD permet d'améliorer voire même de normaliser l'activité des NK (Xu et al. 2020). Dans une population âgée en bonne santé, il a été établi que la fonction cytolytique

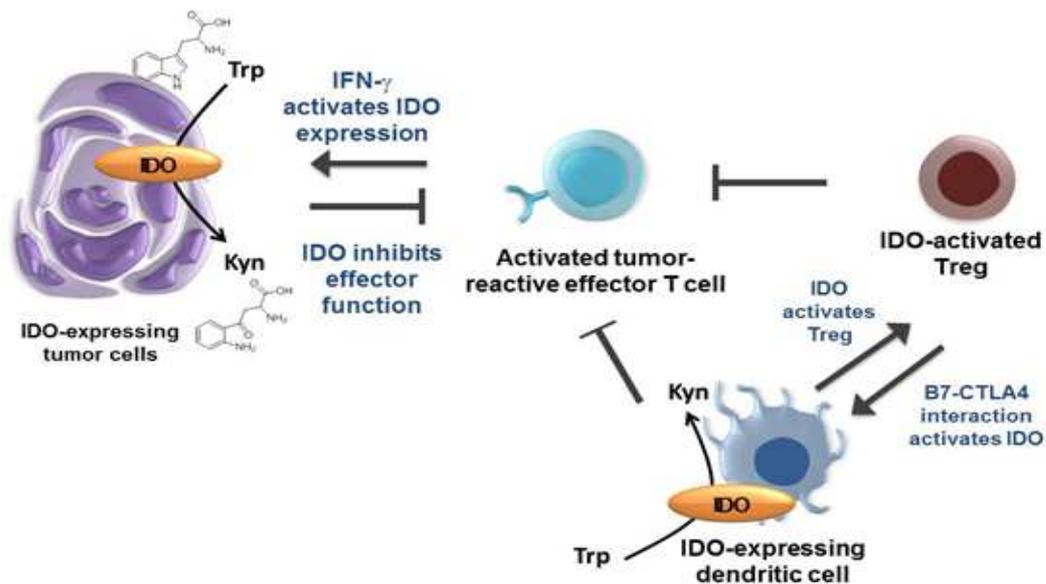


Figure 22. Point de contrôle immunitaire, l'IDO

L'activité IDO, exprimée par les cellules tumorales et les DC infiltrant la tumeur, induit une déplétion en tryptophane, entraînant une anergie des lymphocytes T effecteurs. L'activité IDO entraîne également l'accumulation de kynurénine et de ses métabolites en aval qui induit la différenciation des Treg. (<https://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/tansaku/English/custom.html>)

IDO: indoleamine 2,3-dioxygénase 1 ; Trp : tryptophane ; Krn : kynurenine.

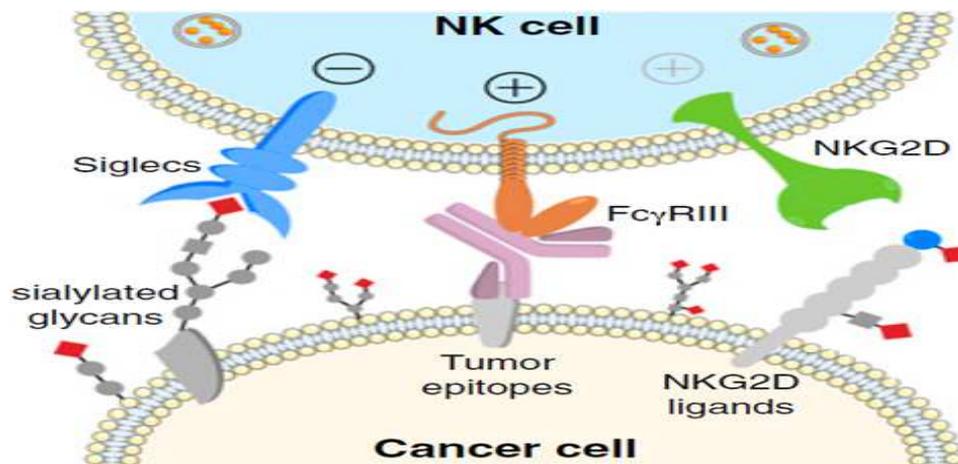


Figure 23. Point de contrôle immunitaire, Siglec

Au niveau des cellules cancéreuses, les glycanes hypersialylés interagissent avec les récepteurs inhibiteurs de NK (Siglec), ce qui empêche la fixation du récepteur activateur du NK (NKG2D) à son ligand conduisant à l'inhibition de l'activation des cellules NK (*Xiao et al. 2016*).

Siglecs: acid-binding Ig-like lectins

des cellules NK est associée au taux sérique de 25D. Cela a été confirmé par la suite dans des études *in vitro*, dans lesquelles le traitement par la 1,25D améliorait de manière dose-dépendante l'activité des cellules NK, en augmentant leur teneur en granules et en réduisant le délai de sécrétion de granzyme A, sans modifier leur capacité de prolifération (Xu et al. 2020). Des effets similaires de la 1,25D conduisant à l'amélioration des fonctions des NK ont été décrits à partir de cellules NK dysfonctionnelles provenant de femmes ayant des antécédents de fausse-couches répétées et carencées en VitD (Ota et al. 2015). En outre, la 1,25D en combinaison avec la dexaméthasone (glucocorticoïde de synthèse) induit l'expression de l'ARNm de l'IL-10 dans les NK, ce qui implique que la VitD peut indirectement freiner la réponse lymphocytaire T à l'antigène (Deniz et al. 2008).

II.3.3 Vitamine D et lymphocytes

Les LT au repos n'expriment pas le VDR. C'est après activation par la phytohématagglutinine qu'ils expriment le VDR ainsi que l'enzyme CYP27B1 qui catalyse la conversion locale de la 25D en 1,25D (Kongsbak et al. 2014; Charoenngam and Holick 2020).

La 1,25D inhibe la prolifération des lymphocytes T et module la production des cytokines avec des effets divers sur la différenciation de différents types de lymphocytes T (Kongsbak et al. 2014). Dans des études réalisées chez l'homme et la souris il a été démontré que la 1,25D inhibe la différenciation Th1 et favorise la différenciation Th2 (Daniel et al. 2008; Sloka et al. 2011). Ceci se traduit par une modification du profil cytokinique avec une sous-expression des cytokines Th1 (IL-2, IFN- γ , TNF- α) et une surexpression des cytokines Th2 (IL-4, IL-5, IL-9, IL-13). Les changements dans l'expression de facteurs de transcription semblent moins systématiquement présents, bien que des modifications de T-bet (Tbx21) et de GATA3 ont été retrouvés (Figure 27) (Daniel et al. 2008, Sloka et al. 2011). Il a été suggéré que l'augmentation de GATA-3 résulte de l'activation du STAT-6, médiée par la 1,25D. Les Th2 sont uniques en ce qu'ils sont à la fois induits par IL-4 et producteurs d'IL-4. L'IL-4 est capable d'induire STAT-6, qui induit ensuite GATA-3 et la production d'IL-4 (Daniel, et al. 2008, Sloka et al. 2011, Charoenngam et al. 2020).

Les Th17 se caractérisent par leur capacité à produire de l'IL-17 et de l'IL-22 et à exprimer le facteur de transcription ROR γ t. La VitD inhibe l'expression d'IL-17, IL-22, TNF- α , IFN- γ et le récepteur de chimiokine CCR6, empêchant ainsi la migration des Th17 vers les tissus inflammés (Figure 27). Des études *in vivo* et *in vitro* ont montré une réduction de l'ARNm de ROR γ t, suggérant que la 1,25D a une plus grande influence sur les facteurs de transcription au cours de la polarisation cellulaire, lorsque les LT ont un phénotype moins stable (Chang, Chung, and Dong 2010; Bishop et al. 2020). Il a été décrit qu'une réduction des Th17 se produit souvent en parallèle de l'augmentation des Treg, dans le cadre d'un mouvement de va-et-vient Th17 /Treg. De nombreuses études analysant l'effet de la 1,25D sur les cellules Th17 ont rapporté l'augmentation de l'expression de marqueurs des Treg tels

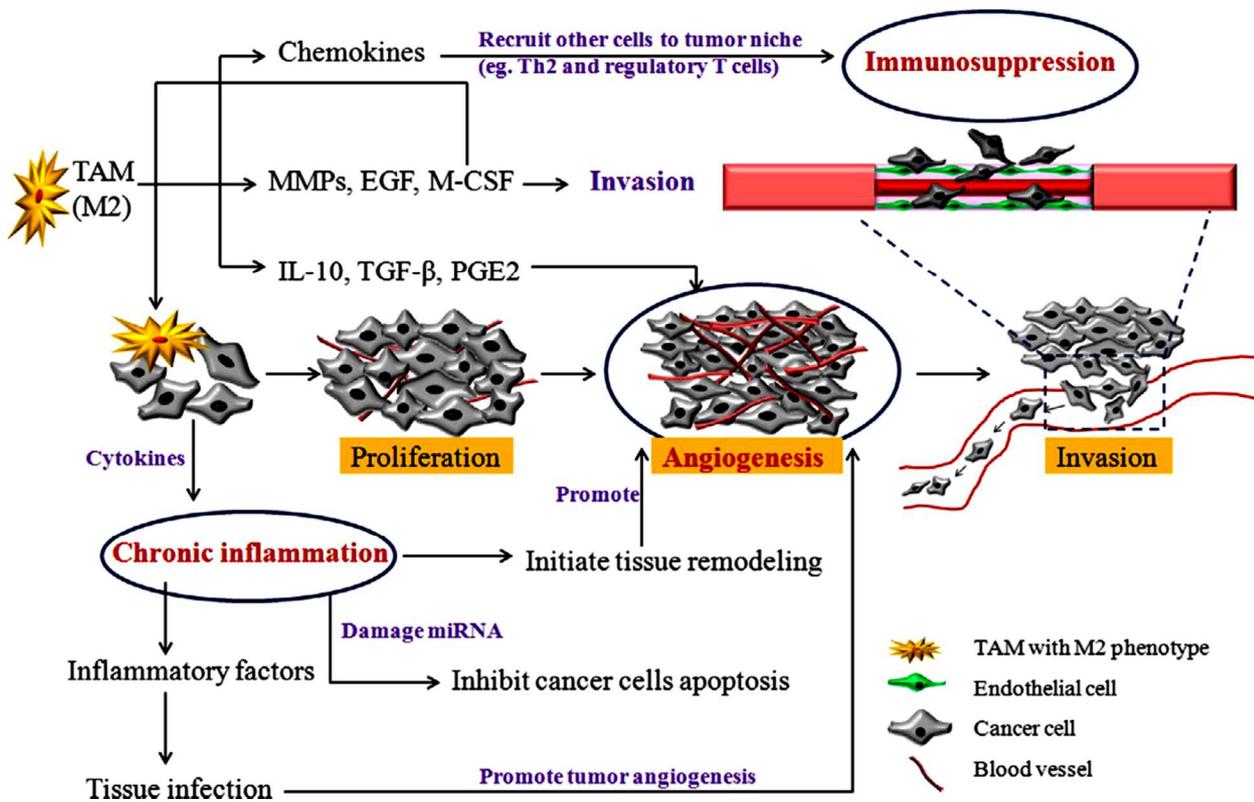


Figure 24. Rôle des TAM dans le développement des tumeurs via la coopération de l'angiogénèse, de l'inflammation chronique et de la suppression immunitaire (Wang et al. 2019)

EGF : epidermal growth factor ; IL-10 : interleukin-10 ; M-CSF : macrophage colony-stimulating factor ; MMP : matrix metalloproteinase ; PGE2 : prostaglandin E2 ; TAM : tumor-associated macrophage ; TGF- β : transforming growth factor-beta.

que CTLA-4, CD25, FoxP3 et la production de cytokines Treg comme l'IL-10 (*Chang, Chung, and Dong 2010, Xu et al. 2020*). L'expression de FOXP3 est directement stimulée par la 1,25D via la liaison du VDR au VDRE au niveau du gène *FOXP3*, qui une fois exprimé, supprime l'expression de ROR γ t dans les cellules naïves T CD4+, et par conséquent empêche la différenciation Th17. De plus, l'inhibition médiée par 1,25D de la voie NFAT bloque la production d'IL-17 et induit la production de TGF- β , favorisant davantage la différenciation Treg (Figure 27) (*Joshi et al. 2011; Kang et al. 2012*).

Comme les Th, les Tc expriment à la fois la CYP27B1 et le VDR, et une régulation positive du VDR peut être observée en réponse à une infection ainsi qu'à une stimulation mitogène, suggérant une régulation coordonnée de la voie de signalisation VDR et des réponses des Tc (*Sarkar et al. 2016*). Des études ont montré qu'une diminution du rapport CD4/CD8, indicateur d'une activation immunitaire accrue, est associée à un faible taux de 25D et que l'administration de 5 000 à 10 000 UI de VitD3 entraîne une augmentation du rapport CD4/CD8 reflétant la suppression immunitaire. Les effets de la 1,25D sur la différenciation, la prolifération et les fonctions des Tc sont probablement médiés à la fois par l'activation intracrine directe du VDR et par l'altération de la signalisation des cytokines via les cellules Th et les CPA (*Sarkar et al. 2016; Charoenngam and Holick 2020*).

II.4 VITAMINE D ET IMMUNITÉ TUMORALE MAMMAIRE

Les études observationnelles montrent une corrélation inverse entre le niveau sérique de la 25D et le risque du cancer de sein. Des études suggèrent également que la VitD est un immunomodulateur qui exerce des effets positifs dans la prévention et le traitement du cancer (*Pandolfi et al. 2017*). Bien que de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ont analysé les effets de la VitD sur le SI, il n'existe que peu de travaux concernant l'impact de la VitD sur la réponse immunitaire au cours du développement et de la diffusion métastatique des tumeurs solides. Une étude réalisée par Zhang et al. a identifié le rôle du VDR dans les métastases et dans la relation entre les TAM et l'EMT. Ainsi, dans leur modèle de co-culture, la surexpression du VDR par les cellules cancéreuses mammaires murines triple négatives 4T1 atténue l'effet métastatique induit par les macrophages. En effet, la surexpression du VDR supprime l'induction de l'EMT des cellules cancéreuses mammaires par les macrophages cocultivées, suite à la perte de l'expression de E-cadhérine (CDH1) et l'induction de l'actine musculaire lisse. Le TNF α et le TGF β présent dans le milieu conditionné par les macrophages inhibe l'expression de VDR par les cellules cancéreuses ce qui favorise leur EMT (*Zhang et al. 2013*).

L'expression de cathélicidine (LL-37) dans le tissu tumoral mammaire est induite par la VitD. Le récepteur cible de la cathélicidine, ErbB2, est amplifié dans les cellules cancéreuses mammaires, ce qui facilite la migration et l'invasion tissulaire et s'avère de mauvais pronostic. La régulation positive

T cell subsets in breast cancer

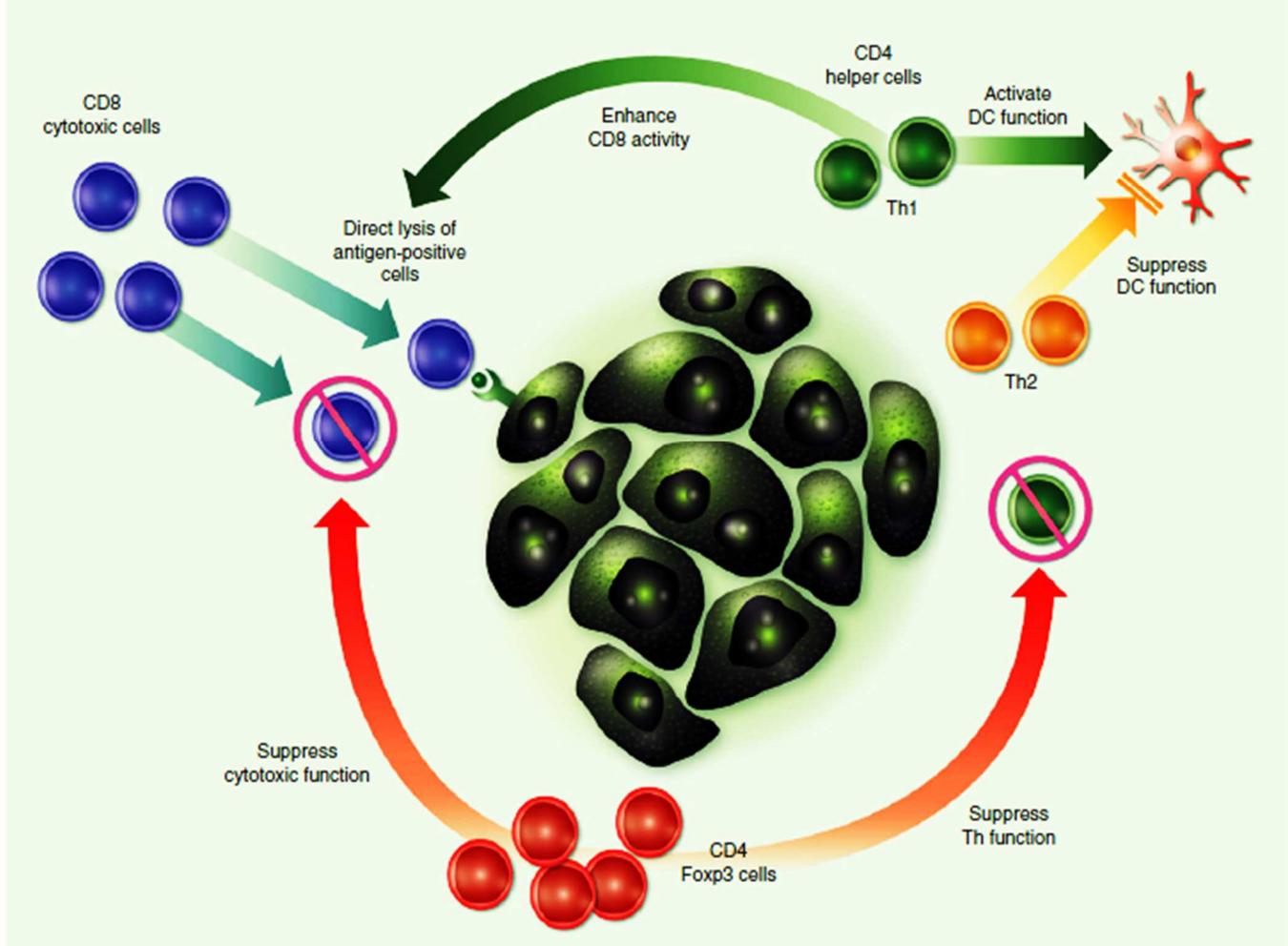


Figure 25. Lymphocytes T infiltrant le cancer mammaire

Les lymphocytes T dans la tumeur mammaire peuvent globalement être divisés en sous-populations :

- les LTc CD8+ impliqués dans la lyse directe des cellules tumorales ;
- les LT auxiliaires CD4+ polarisés en Th1 qui peuvent activer Les LTc et les DC présentant l'antigène, conduisant à une immunité anti-tumorale accrue ;
- les LTh2 qui inhibent l'activité des LTc et des DC.
- les LT régulateurs CD4+ FOXP3+ qui inhibent l'activité des LTc, contribuant ainsi à l'évasion immunitaire par la tumeur. Ils peuvent également réduire l'activité des Th1, renforçant ainsi l'inhibition des Tc ([Varn et al. 2017](#)).

d'ErbB2 par LL-37 active la voie de signalisation MAPK entraînant non seulement une migration cellulaire accrue mais également une croissance indépendante de l'ancrage. La surexpression de la cathélicidine dans la lignée humaine MCF-7 (luminal A) favorise le développement de métastases chez des souris, ayant un déficit immunitaire combiné sévère (SCID), résultant de l'activation de la signalisation MAPK ([Chen et al. 2018](#)).

Dans le modèle syngénique d'adénome mammaire murin EO771 transplanté par voie sous-cutanée, Karkeni et al. ont montré que la supplémentation en VitD (40 UI/jour) diminue la croissance des tumeurs mammaires, suite au recrutement accru de cellules T CD8 + infiltrant la tumeur et à l'augmentation de leur cytotoxicité ([Karkeni et al. 2019](#)). Cependant, en condition de régime obésogène riche en graisses, un effet opposé de la supplémentation en VitD sur la croissance tumorale est observé avec une réduction de l'infiltration des lymphocytes T CD8+ ([Karkeni et al. 2019](#)). Dans un modèle de cancer mammaire murin 4T1, la supplémentation en VitD (5 µg/kg/jour) favorise la croissance des tumeurs primaires et réduit le temps de survie des souris associé à une réduction de l'infiltration des Th1 et TCD8+ et un recrutement accru de MDSC dans la tumeur ([Cao et al. 2018](#)). De même, Pawlick et al. ont montré que le calcitriol et ses analogues PRI-2191 et PRI-2205 stimulent la migration métastatique des tumeurs mammaires murines 4T1 résultant de la prévalence de la réponse des lymphocytes Th2 et Treg ([Pawlik et al. 2018](#)). Ils observent une augmentation du nombre de granulocytes matures et une diminution du nombre de Th1, TCD8+ et des NK au niveau de la rate et des ganglions lymphatiques des souris. Ils constatent au niveau plasmatique une diminution des taux d'IL-1 et IL-10 et une augmentation de l'IFN-γ et, au niveau du tissu tumoral, une augmentation du taux d'IL-10. ([Pawlik et al. 2018](#)).

II.5 OBESITE ET IMMUNITE TUMORALE MAMMAIRE

Les liens entre l'obésité et le cancer mammaire ont été largement reliés aux effets de la résistance à l'insuline, de l'augmentation de la production d'hormones sexuelles (œstrogènes), de la modulation de la sécrétion d'adipokines et de la surexpression de PD-1. L'obésité affecte le SI d'une manière qui facilite la progression du cancer ([Woodall et al. 2020](#)).

L'excès du tissu adipeux contribue à un état d'inflammation chronique *via* plusieurs mécanismes, tels que l'hypertrophie des adipocytes, le recrutement et la polarisation des macrophages en M1 et la production accrue de médiateurs pro-inflammatoires ([Figure 28](#)). Les adipocytes hypertrophiques induisent une contrainte mécanique sur l'environnement extracellulaire et activent les réponses de stress mitochondrial qui se traduisent par un état pro-inflammatoire *in situ*. Cet état résulte en une surexpression des protéines pro-apoptotiques, en particulier Fas et son ligand, entraînant la mort des cellules adipocytaires. Les macrophages s'infiltrent alors dans le tissu adipeux et encerclent les

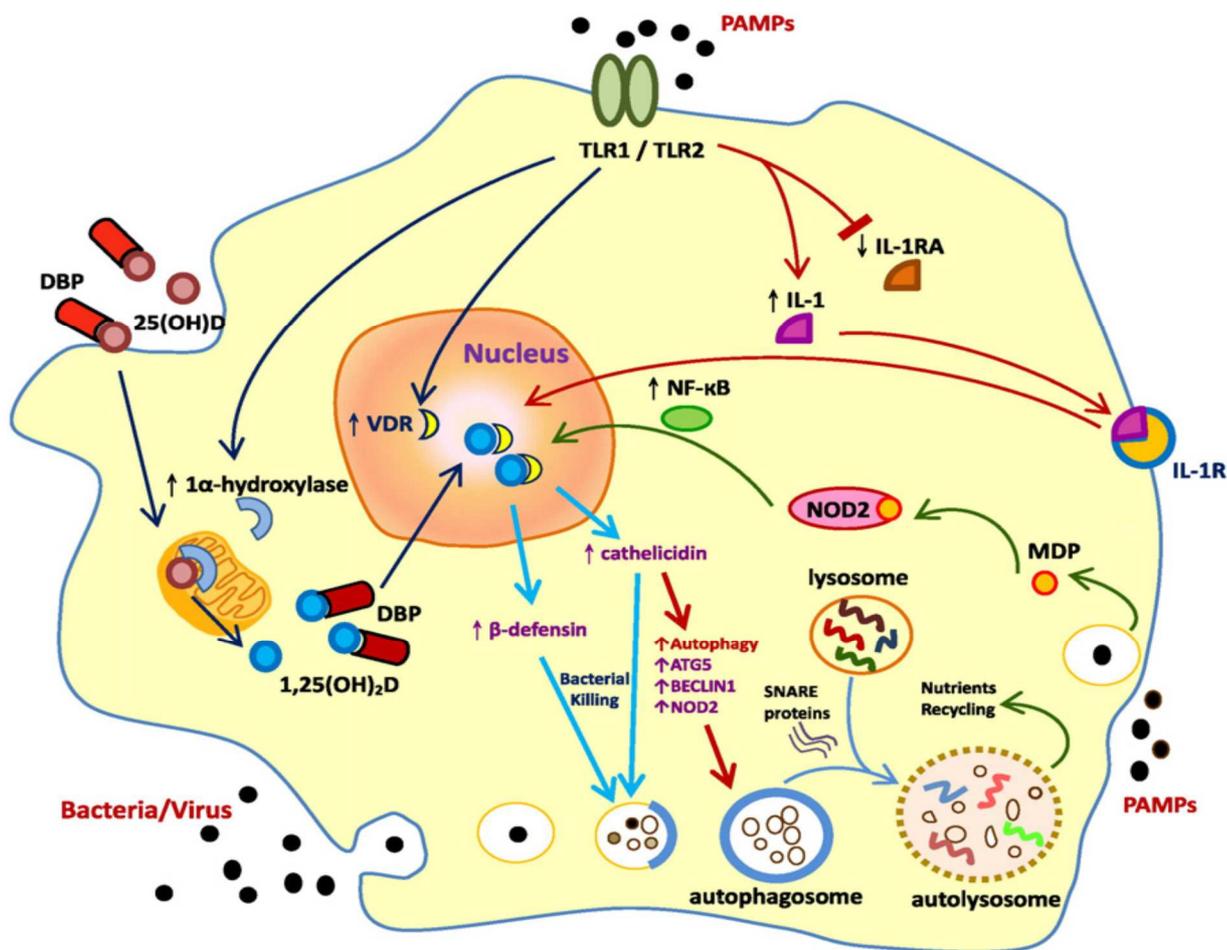


Figure 26. Vitamine D et immunité innée (anti-infection)

L'activation des récepteurs toll-like (TLR1/TLR2) par des PAMPs induit l'expression de l'IL-1 et supprime l'expression de son antagoniste IL-1RA, améliorant ainsi la signalisation intracrine d'IL-1 et augmentant l'activité du NF-κB. La phagocytose des agents pathogènes augmente la concentration intracellulaire de muramyl dipeptide (MDP), qui peut alors se lier au récepteur de reconnaissance intracellulaire des agents pathogènes NOD2 ce qui augmente l'activité NF-κB. De plus, l'activation de TLR1 /TLR2 par PAMP induit l'expression du VDR et de la 1α-hydroxylase. La 25D circulante liée à la DBP pénètre dans les monocytes/macrophages sous sa forme libre et est convertie en 1,25D active par la 1α-hydroxylase mitochondriale, puis se lie au VDR. Le complexe 1,25D - VDR agit alors comme un facteur de transcription, induisant l'expression de la cathélicidine et de la β-défensine 4A et la promotion de l'autophagie par la formation des autophagosomes. Le NF-κB stimule également l'expression de la cathélicidine et de la β-défensine 4A. L'augmentation de taux de la cathélicidine stimule les activités de NOD2 CARD15-β-défensine 2, de la protéine 5 liée à l'autophagie (ATG5), de BECLIN1 et l'autophagie. La cathélicidine antibactérienne, la β-défensine 4A et la maturation des autophagosomes coopèrent ainsi pour améliorer la destruction bactérienne. Les protéines SNARE (SNAP REceptor) du cytoplasme facilitent la fusion entre les autophagosomes et les lysosomes, et diverses hydrolases lysosomales catabolisent les protéines, lipides et acides nucléiques. Les produits du catabolisme peuvent être recyclés et utilisés par les cellules. L'efficacité de cette réponse antimicrobienne dépend fortement du statut en VitD, de la disponibilité de la 25D circulante et du taux de conversion en 1,25D active par l'enzyme 1α-hydroxylase ([Liu et al. 2015](#)).

adipocytes morts pour former des structures en forme de couronne (CLS, *Crown-like structure*). La formation de CLS active les TLR au niveau des macrophages qui sont ainsi polarisés vers un phénotype pro-inflammatoire M1 ([Quail and Dannenberg 2019](#)).

En situation d'obésité, l'activité des cellules NK est fortement réduite. Les marqueurs de cytotoxicité des NK tels que TRAIL et le CD107a sont sous-exprimés. De plus, le taux accru de leptine désensibilise le récepteur de la leptine Ob-R des cellules NK, réduisant leur activité par la diminution de la phosphorylation de la voie JAK2 et de la production d'IFN- γ ([Naik, Monjazebl, and Decock 2019](#)).

De plus, l'hypertrophie du tissu adipeux s'accompagne d'une réduction du nombre de Treg et d'une augmentation des proportions de neutrophiles, DC, NK, mastocytes, LB, Th1, Th17, LT CD8+ dans le tissu adipeux ([Figure 28](#)). Ces cellules T présentent un phénotype « épuisé » en raison de l'inflammation chronique due à la stimulation prolongée des TLR par les acides gras libres, les réponses au stress activées, l'hypoxie et les CLS. Les Treg associés à l'obésité et à l'hyperinsulinémie sont dérégulés avec une production réduite d'IL-10 et une production accrue d'IFN- γ exacerbant l'inflammation ([Aguilar and Murphy 2018](#)). Les macrophages et les adipocytes hypertrophiques « stressés » stimulent la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires telles que TNF α , IL-1, IL-6, IFN- γ , MCP1. Ces cytokines, également pro-angiogéniques, favorisent le développement tumoral et bloquent simultanément la production d'adiponectine et de cytokines anti-inflammatoires telles que IL-3, IL-4, IL-10 et IL-1RA ([Woodall et al. 2020](#)).

La mobilisation des réserves de graisse suite à la lipolyse accrue et l'altération du stockage des lipides dans le tissu adipeux provoquent une accumulation de lipides dans les tissus non adipeux, y compris les tissus lymphoïdes comme la moëlle osseuse et le thymus ce qui contribue à altérer leur intégrité et la maturation des lignées leucocytaires. Au niveau de la moëlle osseuse, l'hématopoïèse est réduite et les populations progénitrices génèrent plus de progéniteurs myéloïdes que de progéniteurs lymphoïdes ([Naveiras et al. 2009](#)). Dans le thymus, des changements similaires au processus naturel d'involution thymique observé avec le vieillissement se produisent comme la perte de jonctions cortico-médullaires, l'augmentation de l'adiposité périthymique et la réduction des précurseurs lymphocytaires. Ces changements entraînent une moindre production de LT naïfs, susceptible d'affecter négativement la surveillance immunitaire et ainsi d'augmenter le risque d'échappement immunitaire des agents pathogènes ou des cellules transformées ([Yang et al. 2009](#)).

Dans un modèle de cancer mammaire murin Py8119 (dérivées de tumeurs PyMT chez des souris femelles transgéniques C57BL/6), il a été démontré que l'obésité induite par un régime riche en graisses est associée à une surexpression de la leptine et de PD-1, impliqués tous les deux dans l'activation de l'axe STAT3 dans les cellules effectrices TCD8 +, stimulant ainsi l'oxydation des acides gras (FAO, Fatty-acid oxidation) tout en inhibant la glycolyse et l'expression de l'IFN- γ . Ce

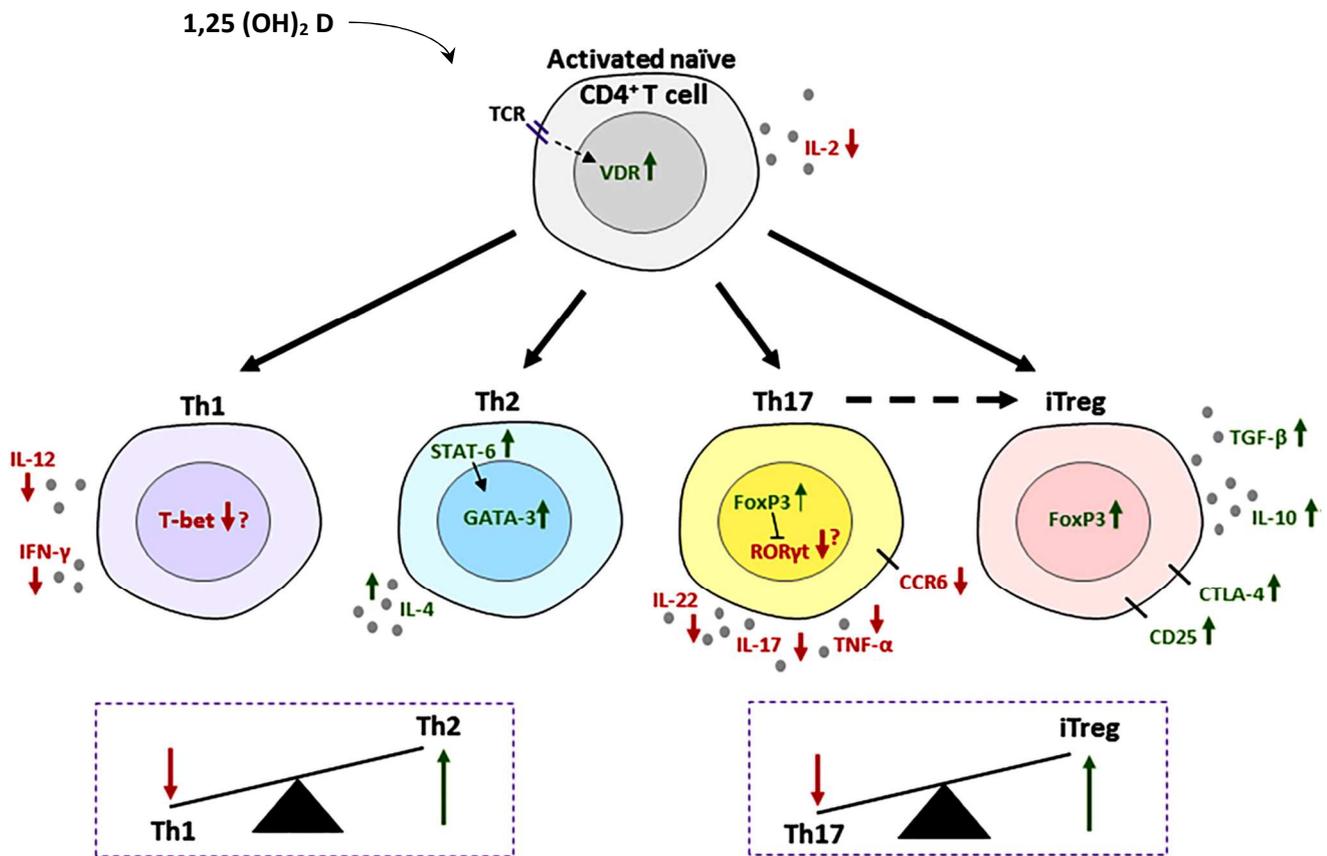


Figure 27. Effets immunomodulateurs de la 1,25D sur les cellules T CD4⁺

La signalisation du TCR induit une surexpression du VDR, qui est stabilisé par la liaison de la 1,25D. La production d'IL-2 est supprimée par la signalisation 1,25D après l'activation des LT. La 1,25D inhibe la différenciation des Th1 et Th17 ainsi que la production de cytokines inflammatoires caractéristiques. Le CCR6 exprimé par les Th17 est également inhibé empêchant la migration vers les tissus. La diminution de l'expression des facteurs de transcription T-bet et RORγt est moins systématiquement rapportée. La différenciation des Th2 est induite par la 1,25D en favorisant l'expression de l'IL-4 et de STAT-6, ce qui augmente l'expression GATA-3. Globalement, l'équilibre Th1/Th2 est en faveur des Th2. De même, l'équilibre Th17 /iTreg est en faveur des Treg, d'autant que les Th17 sont reprimés par l'expression de FoxP3 et peuvent se convertir en un phénotype Treg. La 1,25D augmente l'expression de l'IL-10, du TGF-β et des marqueurs inhibiteurs CTLA-4 et CD25 pour promouvoir un phénotype anti-inflammatoire ([Bishop et al. 2020](#)).

processus contribue à l'épuisement des TCD8+ et favorise la progression de la tumeur mammaire. Le blocage de la voie de la leptine-STAT3-FAO réactive les cellules TCD8+ présents dans la tumeur mammaire (Figure 29) (Zhang et al. 2020). Les mêmes observations sont obtenues dans le modèle de cancer mammaire murin PyMT (Kado et al. 2019).

Une autre étude a rapporté que l'obésité augmente la concentration de CXCL1 dans le TME, favorisant le chimiotactisme médié par son récepteur, CXCR2, et l'accumulation de cellules granulocytaires myéloïdes suppressives (G-MDSC) exprimant le ligand Fas (FasL) (Gibson et al. 2020). L'obésité favorise simultanément l'épuisement des LT CD8+ infiltrant la tumeur, qui présentent alors une expression accrue de CD44, PD-1, Ki-67 (marqueur de prolifération), IFN- γ et le récepteur de la mort Fas. En conséquence, les G-MDSC induisent l'apoptose médiée par Fas /FasL des LT CD8+ *ex vivo* et *in vivo* dans le modèle de tumeur mammaire EO771 (Figure 30) (Gibson et al. 2020). Des résultats similaires sont rapportés dans le modèle de cancer orthotopique 4T1 implanté dans la glande mammaire des souris BALB/c et C57BL/6 (Clements et al. 2018).

Dans un autre modèle de cancer mammaire murin induit par le DMBA (7,12-dimethylbenz(a) anthracène), l'apport d'un régime en graisse durant trois semaines a induit un afflux transitoire de polynucléaires éosinophiles dans la glande mammaire, associé avec une surexpression de facteurs inflammatoires. Après 10 semaines, avant l'apparition de tumeurs palpables, il est observé des lésions épithéliales mammaires anormales, une prolifération cellulaire accrue, une augmentation des facteurs de croissance, des cytokines (TGF β) et des chimiokines (CCL1, CCL17, and CCL22) associées à des Treg immunosuppresseurs, des macrophages M2, et une vascularisation accrue. Dans les tumeurs précoces, il est noté également une augmentation de la vascularisation et du nombre de macrophages M2 (Zhao et al. 2012).

II.6 ACTIVITE PHYSIQUE ET IMMUNITE TUMORALE MAMMAIRE

Chez les animaux et les êtres humains en bonne santé, l'activité physique (AP) aérobie régulière réduit le taux d'infections, l'inflammation chronique, l'immunosénescence liée à l'âge et améliore les fonctions des lymphocytes T et des cellules NK et (Xu et Rogers 2020). Des études récentes portant sur des modèles animaux de cancer mammaire suggèrent que l'AP entraîne une augmentation du nombre et de la fonction des cellules effectrices, une réduction des cellules immunosuppresseives et une modification du profil cytokinique.

Nous avons répertorié une vingtaine d'études s'intéressant aux effets de l'AP sur la réponse immunitaire tumorale à l'aide de modèles précliniques de cancer de la glande mammaire (Tableau 12). Des modèles de lignées néoplasiques transplantables ont été utilisés dans 15 études, parmi lesquelles six ont utilisé la lignée murine triple négatif 4T1 (ou son sous-clone 4T1.2) et une, la lignée murine EO771 (notre équipe, Le Guennec et al. 2020). D'autres modèles de tumeurs induites par des

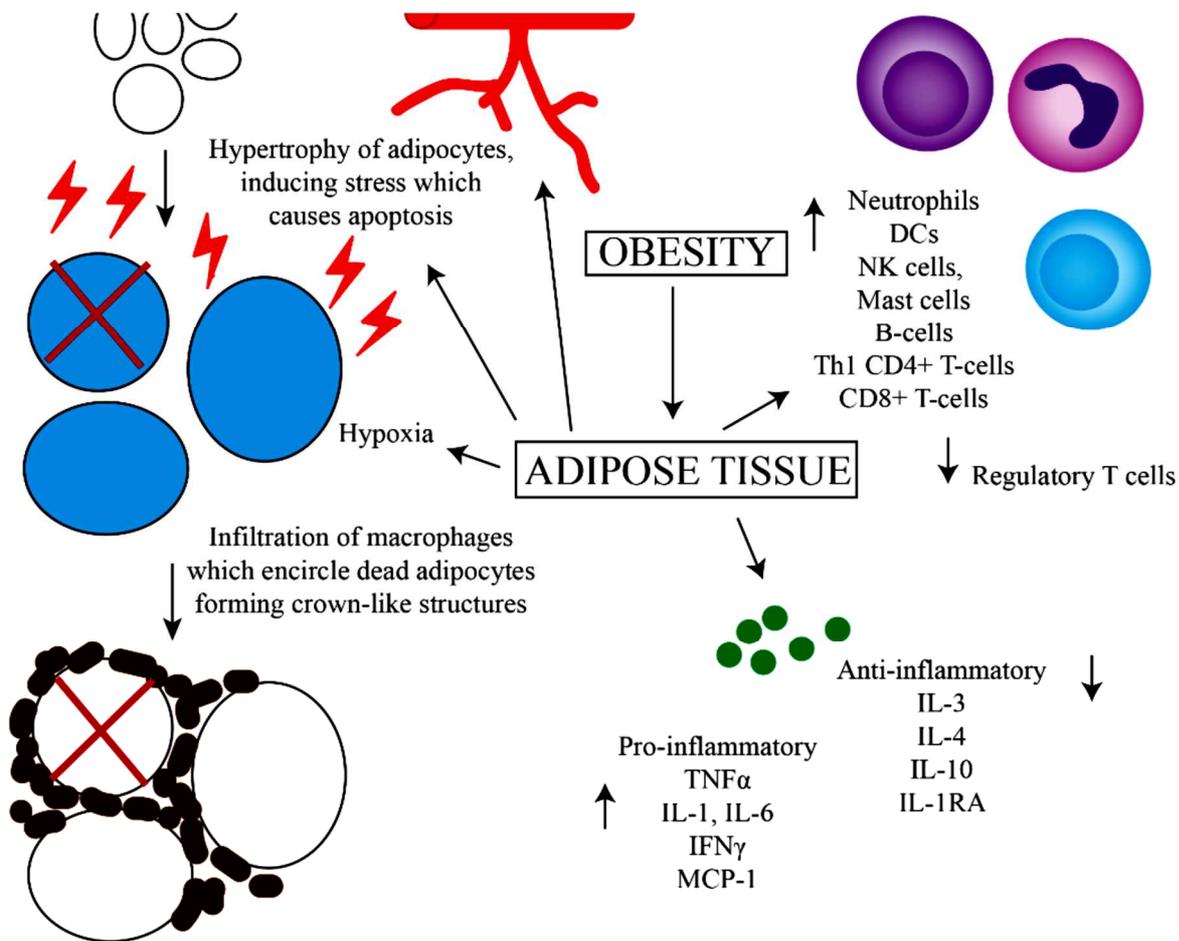


Figure 28. Mécanismes d'inflammation chronique associée à l'obésité

L'excès d'apport de nutriments conduit à un stockage plus important de graisses et donc à une hypertrophie des adipocytes. Cela entraîne une augmentation du stress intracellulaire et de l'expression de gènes apoptotiques conduisant à l'apoptose. L'augmentation de la vascularisation, de l'hypoxie, de la mort cellulaire et de l'expression du CMH-II sur les adipocytes conduit à l'afflux de macrophages, qui entourent les adipocytes morts formant des structures en forme de couronne. Ce phénomène est accompagné par une sécrétion accrue de cytokines pro-inflammatoires ($TNF-\alpha$, IL-1, IL-6, $IFN-\gamma$ et MCP-1) et une diminution de la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires (IL-3, IL-4, IL-10, IL-1RA). Ce statut inflammatoire est associé à une réduction du taux de Treg, une augmentation des proportions de neutrophiles, DC, NK, mastocytes, lymphocytes B, Th1, Th17 et TCD8+ dans le tissu adipeux hypertrophié (Woodall et al. 2020).

carcinogènes (n=3) ou génétiquement modifiés/spontanés (n=2) ont également été étudiés (Tableau 12). La course sur tapis roulant (n=11) est la modalité d'AP la plus couramment utilisée, suivie par l'environnement enrichi avec course volontaire sur roue (n=6), la natation (n=3) et les roues motorisées (n=2). Parmi ces études, deux ont comparé l'effet de différentes modalités d'AP sur les réactions immunitaires (Tableau 12).

Ces études sont très hétérogènes en ce qui concerne la fréquence, la durée et l'intensité de l'intervention d'AP, ainsi que la durée et le calendrier de la période d'intervention. Pour évaluer si l'AP réalisée avant ou après l'initiation de la tumeur ont des effets différents sur l'immunité, nous avons classé les études en trois catégories: intervention d'AP pré- (n=2), de pré- à post- (n=10) et post-initiation de la tumeur (n=7) (Tableau 12). Malgré l'hétérogénéité des plans d'étude, la plupart de ces travaux rapportent des effets positifs de l'AP sur la progression tumorale et les réponses immunitaires systémiques ou intra-tumorales.

L'incidence et/ou la multiplicité des tumeurs sont réduites dans trois études (*Thompson et al. 2010*, *Murphy et al. 2011*; *Faustino-Rocha et al. 2017*) et inchangées dans deux autres (*McTiernan et al. 2004*; *Sáez et al. 2007*). La croissance tumorale est réduite dans 11 études, inchangée dans trois études (*McTiernan et al. 2004*; *Buss and Dachs 2018*; *Molanouri Shamsi et al. 2019*), et augmentée dans une étude (*Sáez et al. 2007*). Les métastases spontanées sont réduites dans deux études (*Buss and Dachs 2018*; *Turbitt et al. 2019*) et inchangées dans deux études (*Hoffman-Goetz et al. 1994*, *Wennerberg et al. 2020*).

Les paramètres immunitaires fréquemment évalués comprennent le nombre et la fonction des cellules immunitaires spléniques, les cytokines inflammatoires circulantes, les cellules immunitaires et les cytokines intra-tumorales. Parmi les cellules effectrices spléniques, une étude n'a pas rapporté de changement du nombre total de LT et de NK, mais indique une augmentation des NK prolifératives (Ki-67+) et activées (CD69+) (*Wennerberg et al. 2020*). Trois autres études décrivent une augmentation du nombre de NK (*Wang et al. 2019*) et une polarisation de l'équilibre Th1/Th2 vers la réponse Th1 (*Bianco et al. 2017*; *Molanouri Shamsi et al. 2017*). Une augmentation de la prolifération des lymphocytes T CD4+ spléniques (*Turbitt et al. 2019*), de la cytotoxicité des NK (*Molanouri Shamsi et al. 2019*) et de l'activité cytotoxique activée par un lymphokine (LAK, Lymphokine Activated Killer) (*Hoffman-Goetz et al. 1994*) est rapportée chacune dans une étude. Pour les cellules immunosuppressives spléniques, une étude montre une réduction du nombre de MDSC sans changement de Treg (*Turbitt et al. 2019*), et deux autres études rapportent une réduction du pourcentage de MDSC (*Wennerberg et al. 2020*) et du nombre de Treg (*Bianco et al. 2017*).

L'exploration des cytokines inflammatoires circulantes donne des résultats très hétérogènes selon les modèles expérimentaux. Les concentrations de TNF α et l'IL-1 β sont réduites dans une étude (*Thompson et al. 2010*) et augmentées dans une autre (*Bacurau et al. 2007*). Le taux de MCP-1 est

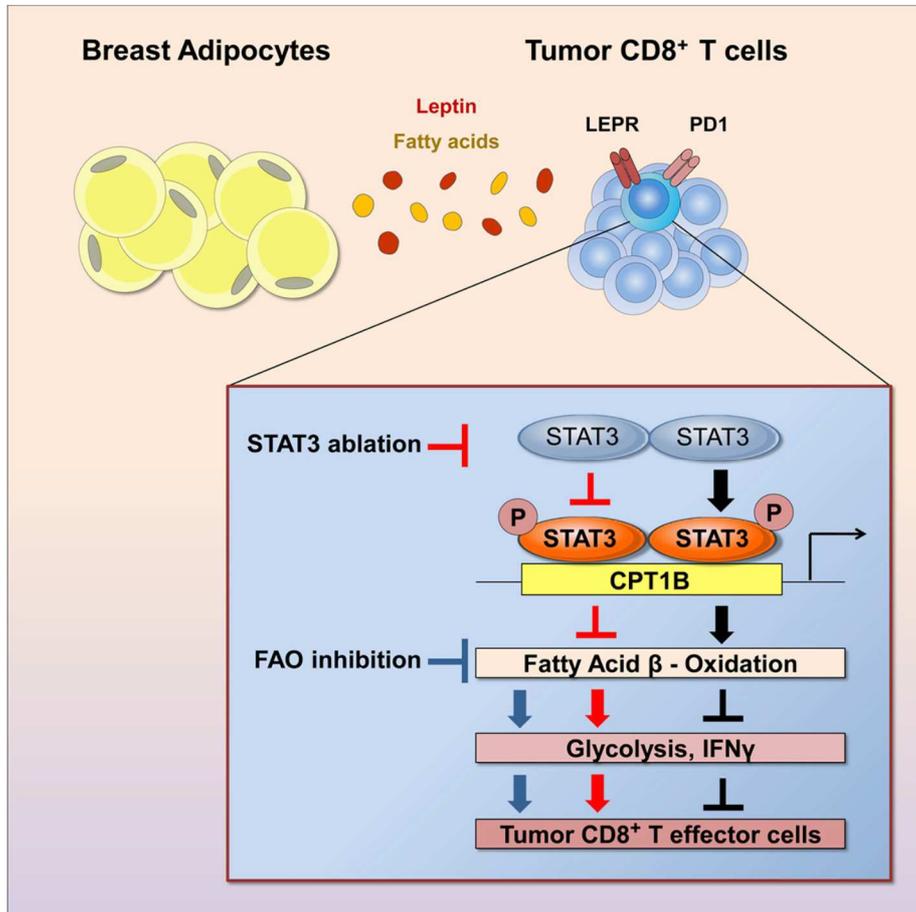


Figure 29. Impact de la leptine et de PD-1 sur les cellules T CD8 intra-tumoraux

L'obésité est liée à une surexpression de la leptine et de PD-1 qui, en activant l'axe STAT3, induit l'augmentation de l'oxydation des acides gras et la réduction de la glycolyse et de l'expression de l'IFN- γ dans les cellules T CD8 + intra-tumoraux, entraînant la diminution de leur cytotoxicité. Le blocage de STAT3 ou de l'oxydation des acides gras augmente la glycolyse des LT CD8 + et restaure leur capacité antitumorale. (Zhang et al. 2020)

réduit dans une étude ([Murphy et al. 2011](#)) et inchangé dans une autre ([Buss and Dachs 2018](#)). Pour l'IL-6, sa concentration est réduite ([Murphy et al. 2011](#)), augmentée ([Thompson et al. 2010](#)) ou inchangée ([Faustino-Rocha et al. 2017](#)) selon trois études différentes. De même, les taux des cytokines circulantes reliées aux fonctions effectrices, moins fréquemment déterminés, varient selon les modèles comme l'IL-2 et l'IFN- γ qui sont augmentés dans une étude ([Thompson et al. 2010](#)) alors que l'IL-2 est inchangée dans une autre ([Bacurau et al. 2007](#)).

Au sein du TME, il est rapporté une augmentation du pourcentage de T CD4+ et CD8+ infiltrantes ([Turbitt et al. 2019](#)), de cellules TCD8+/CD69+ activées ([Wennerberg et al. 2020](#)) ou de cellules NK ([Wang et al. 2020](#)). Pourtant, trois études ne montrent aucun changement dans le pourcentage ou le nombre de cellules T CD4+ ou CD8+ ([Bianco et al. 2017](#), [Buss et al. 2018](#), [Hagar et al. 2019](#)). Au niveau des ganglions lymphatiques non drainants (mésentériques), deux études ont décrit une augmentation de la prolifération des lymphocytes. Pour les cellules immunosuppressives, le pourcentage de MDSC est réduit dans deux études ([Turbitt et al. 2019](#); [Wenneberg et al. 2020](#)) et le nombre de Treg ou l'expression du gène Foxp3 sont diminués dans deux études ([Hagar et al. 2019](#); [Turbitt et al. 2019](#)). De plus, deux études rapportent une réduction du pourcentage ou du nombre de macrophages infiltrant les tumeurs ([Almeida et al. 2009](#), [Bianco et al. 2017](#)), tandis qu'une autre étude indique une augmentation de l'activité phagocytaire des macrophages ([Woods et al. 1994](#)).

Les cytokines inflammatoires intratumorales ont également été évaluées dans plusieurs études. Une étude ne rapporte pas de changement de taux de TNF α , de l'IL-6 ou de l'IFN- γ dans la tumeur ([Molanouri Shamsi et al. 2019](#)), tandis que d'autres études montrent une réduction de l'expression du gène de l'IL-6 ([Shalamzari et al. 2014](#); [Khorri et al. 2015](#)) ou de l'IFN- γ ([Turbitt et al. 2019](#)). Il convient de noter les travaux de Turbitt WJ et al. qui ont déterminé le profil d'expression génique du TME et identifié une répression globale de l'expression des gènes codant pour des acteurs des points de contrôle immunitaire (PD-1 et IDO), pour des chimiokines associées au recrutement de MDSC et de Treg et des facteurs de l'invasion métastatique ([Turbitt et al. 2019](#)).

Au niveau des ganglions lymphatiques mésentériques, deux études ont décrit une augmentation de la prolifération des lymphocytes ([Bacurau et al. 2000](#); [Bacurau et al. 2007](#)). Enfin, de travaux de notre équipe ont montré, chez des souris C57BL/6 âgées ovariectomisées, rendues obèses et développant un adénome mammaire E0771, que l'activité physique spontanée modérée stimule la voie inflammatoire Stat3/ NF- κ B dans le muscle gastrocnémien et dans le tissu adipeux inguinal avec une production accrue d'IL-6 dans ce tissu ([Le Guennec et al. 2020](#)). Ces données témoignent des coopérations inter-organe et inter-cellulaire pouvant contribuer à l'adaptation de la réponse immunitaire.

Pris dans leur ensemble, ces études précliniques démontrent un effet bénéfique de l'AP limitant l'incidence, la croissance et la diffusion métastatique du cancer mammaire chez la souris. Cet effet

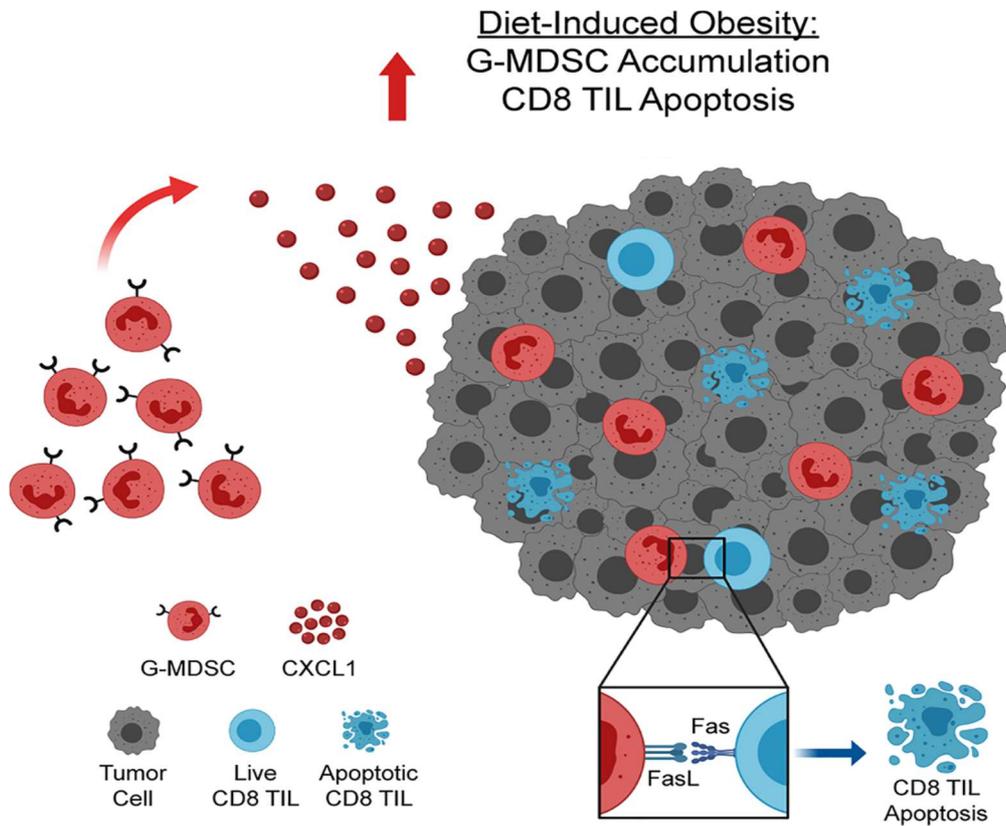


Figure 30. Effet de l'obésité sur les LT CD8+ infiltrant la tumeur mammaire

L'obésité augmente la concentration de CXCL1 dans le TEM mammaire entraînant l'accumulation médiée par CXCL1/CXCR2 de cellules myéloïdes suppressives dérivées des granulocytes FasL+ (G-MDSC FasL+), qui à leur tour interagissent avec les LT CD8+ infiltrant la tumeur (CD8 TIL) en se liant au récepteur FAS pour induire leur apoptose ([Gibson et al. 2020](#)).

peut passer par l'amélioration de la vigilance immunitaire résultant d'une part, de l'augmentation de l'expression des médiateurs inflammatoires, de la prolifération des lymphocytes T, de la polarisation des Th vers le profil Th1, de l'augmentation du nombre de cellules NK et de leur cytotoxicité et, d'autre part, de la réduction des populations immunosuppressives induites par les tumeurs, y compris les MDSC et les Treg que ce soit au niveau splénique ou tumoral.

III CANCER DE LA GLANDE MAMMAIRE

Le cancer mammaire est au niveau mondial la localisation la plus fréquente chez la femme. En 2012, près de 1,7 million de personnes ont été diagnostiquées monde et environ un demi-million de personnes sont décédées de cette maladie. Une femme sur huit/dix développe un cancer du sein au cours de sa vie. En 2016, la mortalité par cancer du sein en Amérique du Nord et dans l'Union européenne (UE) a baissé de 8%, et cette diminution est principalement attribuable à la détection précoce et à l'efficacité de la prise en charge thérapeutique.

En France, le cancer du sein se situe au 1^{er} rang des cancers chez la femme avec 58 459 nouveaux cas en 2018, nettement devant les cancers du côlon-rectum et du poumon. Entre 1990 et 2018 (Figure 31), le nombre annuel de nouveaux cas a presque doublé soit +1,1 % par an en moyenne. C'est aussi la deuxième cause de mortalité par cancer chez la femme avec 12 146 décès en 2018. Le taux d'incidence du cancer du sein varie en fonction de l'âge avec 3 pics, vers 45 ans, 70 ans et 85 ans (Figure 32). Parallèlement, le taux de mortalité augmente régulièrement à partir de l'âge de 30 ans jusqu'à 90 ans (*Sancho-Garnier and Colonna 2019*).

De nombreux facteurs de risque de cancer du sein ont été identifiés tels que : les prédispositions génétiques, comme la mutation des gènes BRCA1/2, des facteurs démographiques comme l'âge, les antécédents personnels de maladie (par ex. cancer du sein, de l'ovaire et/ou de l'endomètre), les antécédents familiaux de cancers (sein, ovaire, ...), la mode de vie, telle que la consommation de tabac, la consommation d'alcool, le surpoids (Figure 33) ainsi que le manque d'activité physique (*Büyükkavcu, Albayrak, and Göker 2016*).

Plusieurs classifications, clinique, histopathologique ou moléculaire des tumeurs ont été élaborées afin de permettre l'identification précise du type et grade du cancer et l'adaptation thérapeutique qui en découle (Figure 34). L'une des classifications est basée sur l'expression des récepteurs des œstrogènes (RE) et de la progestérone (RP). Les tumeurs RE+ et RE- se différencient en terme de signature moléculaire, d'évolution clinique et de réponse au traitement. Les tumeurs RE- sont de haut grade histologique, avec un grand nombre d'altérations moléculaires, plus agressives, en comparaison avec les tumeurs RE+. D'autres marqueurs contribuent à caractériser les phénotypes tumoraux

Tableau 12. Etudes précliniques de l'effet de l'activité physique sur les composants immunitaires dans des modèles de cancer mammaire

Les études sont classées selon la durée totale de l'intervention d'AP (longue à moins longue). Pour chaque étude, l'augmentation ou la diminution est qualifiée pour le groupe interventionnel par rapport au groupe témoin.

Référence	Modèle tumorale	Type d'AP	Protocole de l'AP	Chronologie AP/ tumeur	Effet sur la croissance tumorale	Effets sur l'immunité
<i>1. AP avant le début de la tumeur (n = 2)</i>						
Hagar et al. 2019	Souris F Balb/c, Tumeur 4T1 (Inoculation ortho)	Course sur roue motorisée	De 4 m/min, 10 min/j à 10 m/min, 26 min/j, 5 j/sem	De 8 semaines jusqu'à 72h avant l'inoculation	↓ Taille et temps de doublement de la tumeur ↑ Survie	↑ Monocytes, neutrophiles, leucocytes circulants ↓ Tregs tumoral Ratio CD8+/FoxP3+ tumoral
Wang B et al. 2020	Souris F Balb/c, Tumeur 4T1 (Inoculation ortho)	Course sur tapis roulant	15 m/min, 60 min/j	Durant les 20 jours qui précèdent l'inoculation	↓ Volume et poids tumoraux	↑ IL-6 sérique NK spléniques et tumorales
<i>2. AP débute avant et continue après l'initiation tumorale (n=10)</i>						
Shalamzari et al. 2014	Souris F Balb/c, Tumeur MC4-L2 (Inoculation s.c)	Course sur Tapis roulant	De 14 m/min, 25 min/j à 20 m/min, 40 min/j, 5 j/sem	De la sem 8 avant jusqu'à sem 6 après l'inoculation	↓ Croissance tumorale	IL-6 intra-tumorale
Turbitt et al. 2019	Souris F Balb/c, tumeur 4T1.2 (Inoculation ortho)	Course volontaire en roue	Accès libre aux roues	De la sem 8 avant jusqu'à sem 5 après l'inoculation	↓ Croissance tumorale ↓ Métastases pulmonaires et fémorales ↑ Survie	↓ Accumulation MDSC, ↑ Prolifération des TCD4+ spléniques ↓ MDSC tumorales, ↑ TCD8+, rapport CD8+/MDSC; Altération des voies inflammatoires et immunitaires dans la tumeur
Hoffman-Goetz et al. 1994	Souris F BALB/c, tumeur MMT 66 (inoculation i.v.)	Course sur tapis roulant vs course volontaire en roue	18 m/min, 30 min/j (tapis) ou accès libre aux roues	De la sem 8 avant jusqu'à 3 sem après l'inoculation	Pas de changement de métastases pulmonaires	NKCC splénique, activité LAK (amplitude variable selon l'intervention EX)

parmi lesquels le récepteur HER2 (human epidermal growth factor receptor 2, dénommé aussi ERBB2), Cytokeratin 5/6 (CK5/6). (Figure 34) (*Franchet, Duprez-Paumier, and Lacroix-Triki 2015*).

III.1 MODELES DE CANCER MAMMAIRE MURIN

Il existe de nombreux modèles de cancer mammaire chez les animaux qui découlent essentiellement de trois procédés de cancérogenèse : chimique, génétique ou par implantation (*El-Abd et al. 2014*).

- Chimique :

Les cancérogènes chimiques, qui généralement endommagent directement l'ADN, comprennent les hydrocarbures aromatiques polycycliques, les amines aromatiques, les nitrosamines, les agents alkylants. La N-méthyl-N-nitrosourée (MNU, *N*-Nitroso-*N*-methylurea) et le 7,12-diméthylbenz (a) anthracène (DMBA) sont les agents les plus couramment utilisés pour induire le cancer mammaire en raison de leur reproductibilité. Ces modèles permettent d'étudier l'initiation et la croissance tumorale chez des souris et des rats immunocompétents. Le traitement par MNU ou DMBA conduit à des tumeurs hormono-dépendantes, type adénocarcinome avec le MNU et fibro-adénome bénin pour le DMBA (*Holen et al. 2017*).

- Génétique :

Les modèles de souris génétiquement modifiées, tels que transposon, transgénique, knock-in, knock-out et inductible, permettent d'étudier les effets de gènes/mutations spécifiques au cours des événements précoces de la carcinogenèse. Des promoteurs géniques, tels que le virus de la tumeur mammaire murine (MMTV), la protéine acide du lactosérum (WAP, whey acidic protein), C3 et β -lactoglobuline, peuvent être utilisés pour moduler l'expression des oncogènes dans le tissu mammaire. Cependant, une caractérisation incomplète des promoteurs et les mutations des oncogènes peuvent conduire à des modèles de tumeur mammaire qui ne représentent pas complètement la tumeur humaine. De plus, l'étude de la maladie métastatique dans ces modèles s'avère délicate car la pénétrance des métastases est faible et nécessite un temps relativement long pour se développer (*Swiatnicki and Andrechek 2019*).

- Implantation :

Ce sont les modèles les plus couramment utilisés. Il existe trois modalités d'implantation par :

- xélogreffe dérivée d'une lignée cellulaire isolée d'un patient (CDX, patient-derived cell-line xenograft),
- xélogreffe dérivée d'un patient (PDX)
- lignée cellulaire syngénique dérivée de souris.

Ces modèles sont utilisés pour étudier la génétique tumorale, la réponse biologique et la diffusion métastatique. En fonction du site d'implantation, différentes étapes et métastases spécifiques à un

Référence	Modèle tumorale	Type d'AP	Protocole de l'AP	Chronologie AP/ tumeur	Effet sur la croissance tumorale	Effets sur l'immunité
Bacurau et al. 2007	Rats M Wistar, tumeur Walker 256 (inoculation s.c)	Course sur tapis roulant (haute intensité)	30 min/j à 85% de VO2max, 5 j/sem	De sem 8 avant jusqu'au j15 après l'inoculation	↓ Rapport masse tumorale/poids corporel ↑ Survie	↑ IL-1, TNF α plasmatiques Prolifération des lymphocytes de LN mésentériques
Bacurau et al. 2000	Rats M Wistar, tumeur Walker 256 (inoculation s.c)	Course sur tapis roulant (intensité modérée)	1h/j à 60% de VO2max, 5j/sem	De la sem 8 avant jusqu'au j15 après l'inoculation	↓ Survie	↑ Prolifération des lymphocytes des LN mésentériques ↑ Phagocytose des macrophages péritonéaux
Molanouri et al. 2019	Souris F Balb/c, tumeur 4T1(Inoculation s.c)	Course sur tapis roulant	50 min/j à 50–70% VO2max, 5 j / sem	De la sem 6 avant jusqu'à sem 6 après l'inoculation	Pas de changement du volume tumoral	↓ IL-4 tumorale ↓ IL-4, ↑ IFN γ , rapport IFN γ /IL-4 produit par les splénocytes stimulés
Almeida et al. 2009	Souris M suisses, tumeur d'Ehrlich (inoculation s.c.)	Natation (intensité modérée vs élevée)	1 h/j à 50 ou 80% de la capacité maximale, 5 j/sem	De la sem 4 avant jusqu'à sem 2 après l'inoculation	↓ Volume et poids tumoraux (intensité modérée)	↓ Infiltration des macrophages et des neutrophiles tumorales (intensité modérée)
Le Guennec et al. 2020	Souris F C57BL/6, tumeur EO771 (Inoculation ortho)	Environnement enrichi doté d'une roue	Accès libre	De la sem 4 avant inoculation jusqu'au sacrifice	↓ Croissance tumorale	↑ Voie inflammatoire Stat3/NF- κ B et IL-6 dans le tissu adipeux inguinal
Woods et al.1994	Souris C3H/HeN, tumeur SCA-1 (inoculation s.c.)	Course sur tapis(modérée vs exhaustive)	18 m/min, pente 5%, 30 min /j ou vitesse croissante jusqu'à épuisement (2–3 h)/j	De jour 3 avant jusqu'au jour 14 après l'inoculation	Pas de changement de l'incidence tumorale ou de la progression tumorales	↑ Activité phagocytaire des macrophages infiltrant la tumeur (intensité modérée)
Murphy et al.2011	Souris F C3 (1) SV40Tag, tumeur mammaire spontanée	Course sur tapis roulant	20 m/min, pente 5%, 60 min/j à 70% VO2max, 6 j/sem	AP débutée à l'âge de 4 sem et a duré 20 sem	↓ Nombre de tumeurs spontanées ↓ Volume tumoral	↓ MCP-1 et IL-6 plasmatiques
Goh et al. 2013	Souris F PyMT transgéniques, tumeur spontanée	Course volontaire en roues	Accès libre aux roues	AP débutée à l'âge de 42 j et a duré 10 sem	↓ Croissance tumorale	↓ CCL22 ↓ Expression génique de CXCR4 dans la tumeur
<i>3. AP débute après l'initiation tumorale</i>						
Khori et al. 2015	Souris F BALB/c, tumeur MC4-L2 (inoculation s.c.)	Course sur tapis roulant	16-18 m/min, 10-14 min/j, 5 j/sem	AP débutée à l'inoculation et a duré 5 sem	↓ Taille tumorale	↓ IL-6 dans la tumeur

organe peuvent être évaluées, par exemple l'implantation directe par voie orthotopique ou ectopique ou l'injection dans le système circulatoire pour tester différentes localisations tissulaires tels que les poumons, le foie et les os selon la voie d'abord choisie, veine caudale, veine porte ou perfusion intracardiaque (*Fantozzi and Christofori 2006*).

Le CDX provient de tumeurs hautement malignes et métastatiques et doit être transplanté dans un modèle de souris immunodéficiente, ce qui le rend incompatible pour l'évaluation de la réponse immunitaire, de l'efficacité thérapeutique et du risque métastatique.

Le PDX, qui implique la transplantation de morceaux de tumeur provenant du patient est plus efficace à la modélisation des métastases. Les morceaux de tumeur contiennent des cellules stromales permettant la progression tumorale. Néanmoins, la mise en place de PDX est relativement lente et son application est limitée dans la sélection des thérapies personnalisées (*Holen et al. 2017*).

Les lignées cellulaires de tumeur mammaire spontanée dérivée de la souris permettent des implantations dans des animaux immunocompétents syngéniques. Il existe un nombre restreint de lignées disponibles tels que EMT-6, HCC70, 4T1 et E0771, la seule hormonodépendante (*Yang et al. 2017*). La limite de ces modèles est leur transposabilité au cancer mammaire humain.

Le modèle d'adénocarcinome mammaire syngénique E0771 :

La lignée E0771 a pour origine un adénocarcinome mammaire spontané isolé d'une souris femelle C57BL/6 à la fin des années quarante. Cette lignée est décrite comme très agressive et colonise facilement d'autres tissus éloignés tels que les poumons, le mésentère intestinal et le pancréas, ce qui en fait un modèle approprié pour l'étude des différents stades de la progression tumorale (*Ewens, Mihich, and Ehrke 2005*). Les E0771 sont des cellules ER α -, ER α +, PR+, ErbB2+, ce qui correspond au type luminal B, fréquemment rencontré chez les patientes et associé à un mauvais pronostic (Figure 35), (*Le Naour et al. 2019*). Les E0771 expriment aussi d'autres marqueurs comme claudine 1, 7 et 10, p53 (muté), récepteurs et ligand Notch, EGFR, PD1, PDL1 et PLAC1 (Placental-specific protein 1) etc. (Figure 35) (*Le Naour, Rossary, and Vasson 2020*). Elles répondent au traitement anti-estrogène tels que tamoxifène, 4-hydroxy-tamoxifène, endoxifène et fulvestrant.

Ce modèle E0771- souris C57BL/6 présente l'avantage d'avoir une prise tumorale proche de 100%, en particulier en implantation mammaire orthotopique et d'être très proche du cancer du sein humain. Il conduit à la formation de tumeurs volumineuses en quelques semaines bénéficiant d'un microenvironnement mammaire complet favorisant le dialogue intercellulaire (*Le Naour, Rossary, et Vasson 2020*).

La prolifération tumorale des cellules E0771 semble être similaire à celle d'autres tumeurs murines et humaines transplantables, notamment en relation avec la durée de la phase S. La taille de la tumeur E0771 est corrélée à sa densité cellulaire mais aussi à la proportion de tissu nécrotique. La croissance

Référence	Modèle tumorale	Type d'AP	Protocole de l'AP	Chronologie AP/ tumeur	Effet sur la croissance tumorale	Effets sur l'immunité
Bianco et al. 2017	Souris F Balb/c, tumeur 4T1 (Inoculation ortho)	Natation	15–45 min/j, 5 j/sem	AP débutée à l'inoculation et a duré 8 sem	Volume tumoral	↑ Marqueurs Th1 ↓ Marqueurs Th2 ↓ % Des Treg dans la rate, % CD ↑ % BMDC, Production d'IL-10 par les BMDC
Wennerberg et al. 2020	Souris F Balb/c, tumeur 4T1 (Inoculation s.c)	Course sur tapis roulant	18 m/min, 30 min/j, 5j/sem	AP débutée 8j après l'inoculation et a duré 3 sem	↓ Croissance tumorale; Pas de changement de métastases pulmonaires	↓ MDSC ↑ NK Ki-67 + et CD69 + dans la rate ↓ MDSC infiltrant les tumeurs ↑ T CD8+ infiltrant les tumeurs
Buss et al. 2018	Souris F C57BL/6 ApoE-/-, tumeur EO771 (inoculation ortho)	Course volontaire en roux	Accès libre aux roues	AP débutée à l'inoculation de la tumeur et a duré 16 j	↓ métastases abdominales; Pas de changement de croissance tumorale	Pas de changement de nombre de TILs, %Tc ou % Treg de lymphocytes T totaux; MCP-1 sérique
Faustino-Rocha et al. 2017	Rats F Sprague-Dawley, tumeur induite par MNU	Course sur tapis roulant	20 m/min, 60 min/j, 5 j/sem	AP initiée après l'induction de la tumeur et a duré 35 sem	↓ Nombre de tumeurs; Pas de changement du poids tumoral	Pas de changement de CRP et IL-6 sérique
Thompson et al. 2010	Rats F Sprague-Dawley, tumeur induite par MNU	Course en roue libre vs motorisé	Accès aux roues motorisées (vitesse constante à 40 m/min) ou non motorisées	AP initiée après une sem de l'induction de la tumeur	↓ Incidence et multiplicité des tumeurs	↓ IL-1 α , IL-1 β , TNF α plasmatiques; ↑ IL-2, GM-CSF, IFN γ , IL-4, IL-6, IL-10 plasmatiques
Saez et al. 2007	Rats F Sprague-Dawley, tumeur induite par le DMBA	Natation	30 min/j, 5j/semaine	AP débutée après l'apparition de la 1ère tumeur et a duré 1 à 2 mois	↑ Croissance tumorale; Pas de changement de la multiplicité tumorale	Pas de changements de % NK circulants

IFN: interféron; IL: Interleukine; TNF: Facteur de nécrose tumorale; CRP: Protéine C-réactive; MCP: Protéine chimioattractrice des monocyte; GM-CSF: facteur de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages; CCL: ligand de chimiokine CC; CXCR: récepteur de chimiokine CXC; BMDC: cellule dendritique dérivée de la moelle osseuse; DC: cellule dendritique infiltrant la tumeur; NK : Natural Killer; NKCC: cytotoxicité des cellules NK; LAK: Lymphokine activated killer; Tc: lymphocyte T cytotoxique; Th: T helper; Treg: lymphocyte T régulateur; TILs: Lymphocytes infiltrant la tumeur; MDSC: cellule suppresseur dérivée de myéloïdes; LN: ganglion lymphatique; VO2max: taux de consommation maximale d'oxygène; DMBA: 7,12-diméthylbenz (a) anthracène; MNU: N-méthyl-N-nitrosourée; ortho: orthotopique; sc, sous-cutanée; iv intraveineuse; EX, exercice; AP: Activité physique ; sem: semaine ; j: jour ; F: Femelle; M: Male

tumorale peut également être influencée par les caractéristiques de l'hôte. Ainsi, la croissance tumorale est liée au poids de la souris avec un taux de croissance initial élevé suivi d'une phase de décélération de croissance plus rapide chez les souris de poids corporel élevé par rapport à celles de poids faible (*Le Naour, Rossary, et Vasson 2020*).

Les tumeurs EO771 présentent une faible infiltration lymphocytaire (LTCD4, LTCD8) accompagnée d'une forte infiltration de MDSC et une polarisation M2 des macrophages. Ce profil leucocytaire est connu pour favoriser la croissance tumorale associée à un mauvais pronostic. Cependant, le rapport CD4/CD8 diffère au cours du développement de la tumeur avec une prédominance des LT CD8 au stade précoce alors que les LTCD4 prédominent au stade tardif. La proportion des sous-populations de LTCD4 évolue au cours du développement tumoral avec, au stade précoce, une population LTh1 prédominante qui évolue en Treg et en Th17 au stade plus avancé (*García-Quiroz et al. 2016*).

Toutes ces caractéristiques font du modèle EO771- souris C57BL/6 un modèle de choix pour évaluer le retentissement d'interventions spécifiques (nutrition, activité physique ...) et/ou de thérapies sur le développement tumoral en regard de l'adaptation physio-pathologique de l'hôte.

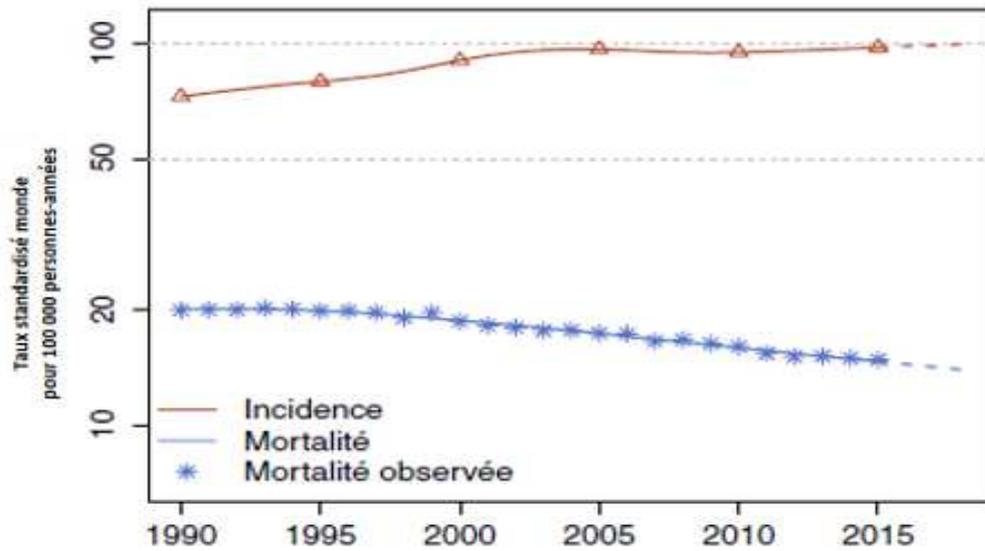
III.2 VITAMINE D ET CANCER MAMMAIRE

- **Données épidémiologiques :**

Certaines données épidémiologiques semblent démontrer un effet direct, quoique controversé, entre le déficit en 25D sérique et le risque de cancer mammaire. Une étude cas-témoins nichée dans la cohorte française E3N a montré une diminution du risque de cancer du sein avec l'augmentation de la concentration sérique de 25D (OR odds ratio 0,73; IC intervalle de confiance à 95%, 0,55-0,96; tendance (p=0,02) pour les femmes du tertile le plus élevé. Cette étude a également établi une association inverse significative limitée aux femmes de moins de 53 ans lors du prélèvement sanguin [(OR (T3vsT1) 0,60; IC à 95%, 0,37-0,98; tendance p=0,04]. Chez les femmes pré-ménopausées, le risque est également réduit mais de façon non significative (Engel et al. 2010). Une autre étude cas-témoins récente montre que le risque de cancer de sein est inférieur de 67% (OR: 0,33; 95% CI: 0,11-0,97; p <0,05) pour un niveau sérique de 25 D \geq 24,6 ng/mL chez les femmes ménopausées (40-79 ans) (*Krusinska et al. 2019*).

De façon similaire, Wang et al. décrivent une association inverse significative entre taux de 25D et cancer du sein chez les femmes ménopausées, mais non chez les femmes en pré-ménopause (*Wang et al. 2013*).

Une méta-analyse de neuf études prospectives ne trouve aucune relation entre le taux de 25D circulant et le risque de cancer du sein. Cependant chez les femmes ménopausées, une corrélation inverse est observée dans une plage étroite de concentration de 25D, entre 27 et 35 ng/ml (*Bauer et al. 2013*).



Source : Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018 - Volume 1 – Tumeurs solides.

Figure 31. Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018. *Référence, INCA 2019*

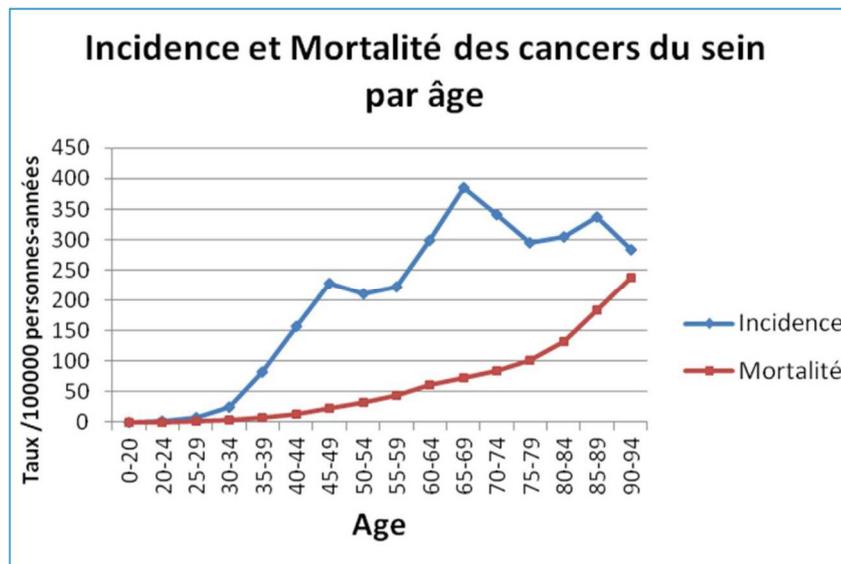


Figure 32. Incidence et mortalité des cancers du sein par tranche d'âge en France en 2012 (*Sancho-Garnier et Colonna 2019*).

Une autre méta-analyse de 14 études prospectives démontre une association inverse significative entre le taux sérique de 25D et le risque de cancer du sein ([Wang et al. 2013](#)). Sachant qu'il existe un effet protecteur de 25D chez les Américains, aucune association statistiquement significative n'est observée dans les études européennes, ce qui suggère que les différences ethniques, le milieu de vie et les habitudes alimentaires peuvent influencer l'association ([Wang et al. 2013](#)).

- **Etudes expérimentales *in vitro* :**

Les études expérimentales *in vitro* montrent que la VitD stimule la différenciation et l'apoptose cellulaire et inhibe la prolifération et la diffusion métastatique des cellules tumorales mammaires ([Christakos et al. 2016](#)). Pour la majorité des cellules cancéreuses exprimant un VDR fonctionnel, l'incubation avec 1,25D3 conduit à l'accumulation de cellules en phase G0/G1 du cycle cellulaire. En présence de 1,25D3 il est observé une diminution de l'expression des cyclines et des kinases dépendantes des cyclines (CDK) et/ou une augmentation de l'expression de inhibiteurs de ces CDK, tels que p21 et p27, qui entraînent une activité CDK réduite, la formation d'un complexe Rb-E2F (rétinoblastome-E2 transcription factor), la diminution de l'expression d'E2F et de ses gènes cibles ce qui conduit à l'inhibition de la croissance cellulaire ([Christakos et al. 2016](#)) (Figure 36). En outre, l'induction de C/EBP α par 1,25D3 et l'amélioration de la transcription VDR par C/EBP α ont été suggérées comme un mécanisme impliqué dans l'inhibition de la prolifération des cellules tumorales mammaires humaines MDA-MB-231 et MCF-7 médiée par la 1,25D3 ([Dhawan, Weider, and Christakos 2009](#)). De plus, la 1,25D3 antagonise la signalisation Wnt/ β -caténine, ce qui réduit la prolifération cellulaire ([Singh and Adams 2017](#)). La 1,25D3 diminue l'interaction entre la β -caténine et le facteur de transcription TCF (T cell factor) en faveur d'une interaction accrue entre VDR et β -caténine. La 1,25D3 améliore l'expression de la E-cadhérine conduisant à l'exportation nucléaire de β -caténine. En conséquence, la transcription des gènes cibles du TCF diminue, dont celle du c-myc, un régulateur clé de la progression du cycle cellulaire ([Singh et Adams 2017](#)). La 1,25D3 interfère également avec d'autres voies de régulation de la croissance initiées par le TGF- β , le facteur de croissance épidermique (EGF), le facteur de croissance insulinique (IGF), et FGF2. De plus, elle intervient dans d'autres voies de signalisation mitogéniques (par ex. voie ERK/ MAPk et c-myc) ([Christakos et al. 2016](#)). Dans les cellules cancéreuses mammaires qui expriment le BRCA1, le VDR lié au calcitriol ou à son analogue (EB1089) s'associe à BRCA1, et ce complexe occupe les VDRE dans le promoteur du p21 pour améliorer l'acétylation de ce promoteur et l'expression de p21 ([Pickholtz et al. 2014](#)).

La 1,25D3 induit l'apoptose par des mécanismes qui semblent spécifiques du type de cellule cancéreuse considéré. Plusieurs études ont indiqué que le VDR nucléaire est impliqué dans ces effets pro-apoptotiques de la 1,25D3 ([Zinser, McEleney, and Welsh 2003](#); [Bijian et al. 2018](#)). D'autres études ont mis en évidence une activation par 1,25D3 de l'apoptose par la suppression des protéines

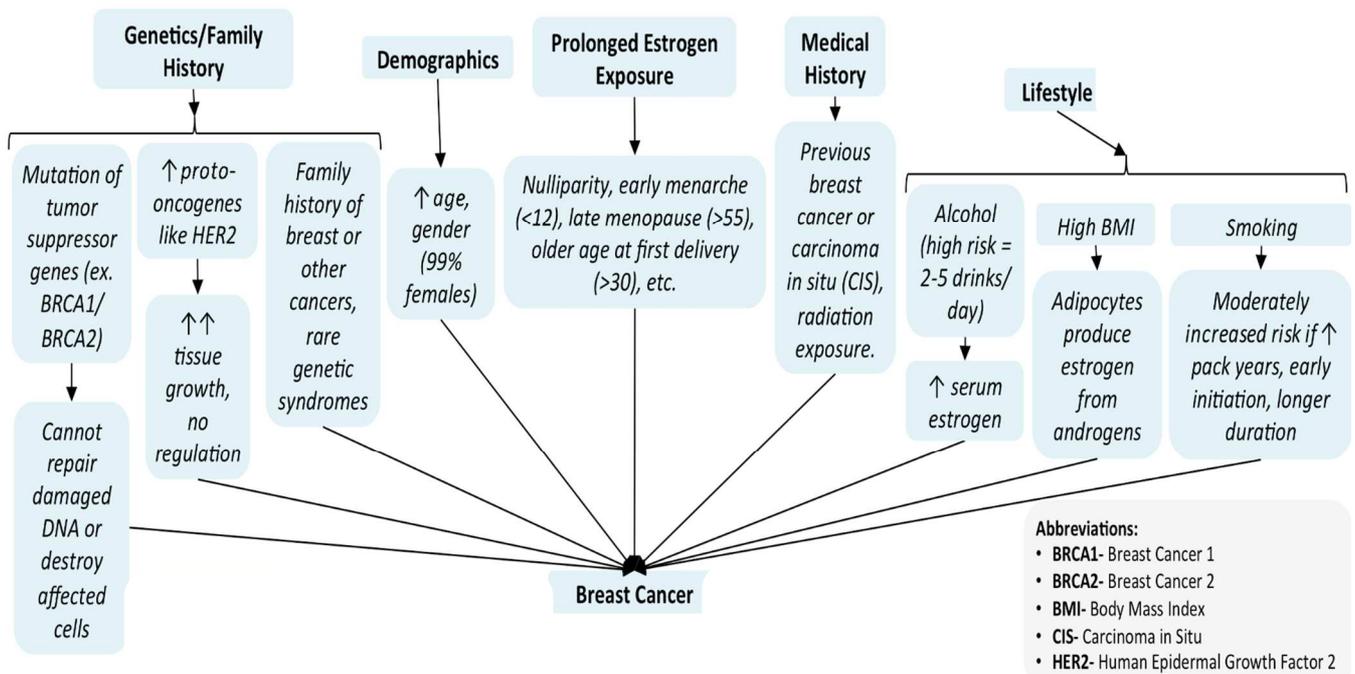


Figure 33. Facteurs de risque du cancer de sein. (Büyükavcu et al. 2016)

anti-apoptotiques Bcl2 (B-cell lymphoma 2) et Bcl-xl (B-cell lymphomaextra Large) et l'activation de la protéine pro-apoptotique Bax (BCL2 Associated X). Ceci conduit ensuite à la libération du cytochrome c des mitochondries et à l'activation des caspases notamment 3 et 9 (*Christakos et al. 2016*). La 1,25D3 peut, de plus, induire l'apoptose en interférant avec d'autres voies de signalisation telles que le TNF- α . Dans les cellules MCF-7, l'induction de l'apoptose par la 1,25D3 et son analogue synthétique EB1089 semble impliquer la voie de l'autophagie dépendante de Beclin 1 (*Høyer-Hansen et al. 2005*). Dans ces MCF-7, le gène de la PDLIM2 (PDZ-LIM domain-containing protein 2), protéine adaptatrice qui relie différents composants du cytosquelette, est identifié comme un gène cible de 1,25D3. L'induction de PDLIM2 par 1,25D3 stimule l'adhésion et inhibe la migration métastatique de ces cellules (*Vanoirbeek et al. 2014*).

Différentes protéases telles que les métalloprotéinases matricielles (MMP), les activateurs du plasminogène (PA) et les cathepsines (CP) sont impliquées dans l'invasion tumorale en raison de leurs capacités à dégrader la matrice extracellulaire. La 1,25D3 réduit non seulement l'expression et la sécrétion des métalloprotéinases (MMP) 2 et 9, mais également l'activité de la cathepsine K, augmente l'inhibiteur tissulaire de la MMP1 (TIMP1) et régule différents composants du système activateur du plasminogène. De plus, dans plusieurs types de cellules, le traitement avec 1,25D3 conduit à une expression altérée des molécules d'adhésion. L'expression de la E-cadhérine, un suppresseur de tumeur qui est inversement corrélé aux métastases, est induite par 1,25D3 et cette induction peut conduire à la suppression de la motilité cellulaire (*Christakos et al. 2016*).

Étant donné que l'inflammation chronique est considérée comme un facteur de risque de développement du cancer mammaire, la suppression de l'inflammation par 1,25D3 peut contribuer à son activité antinéoplasique. Dans le cancer du sein, la 1,25D3 inhibe l'expression de la cyclooxygénase-2 (COX-2) et augmente celle de la 15-hydroxyprostaglandine déshydrogénase (15-PGDH) entraînant une synthèse réduite de prostaglandines (PGE2) (*Figure 37*), dérivées de l'acide arachidonique qui jouent un rôle clé dans le déclenchement de la réponse inflammatoire. Des études *in vitro* et *in vivo* montrent que le calcitriol diminue l'expression de l'aromatase, enzyme qui catalyse la synthèse des œstrogènes dans les cellules tumorales mammaires et dans le tissu adipeux entourant la tumeur mammaire, soit par la répression directe de la transcription de l'aromatase *via* le promoteur II, soit par la réduction du taux de PGE2, qui est l'activateur majeur de l'aromatase *via* le promoteur II. La 1,25D3 diminue l'expression du récepteur des œstrogènes (ER α) et atténue ainsi le stimulus prolifératif des œstrogènes dans les tumeurs mammaires (*Figure 37*). Ainsi, l'inhibition de la synthèse et de la signalisation des œstrogènes par la 1,25D3 et ses actions anti-inflammatoires jouent un rôle important dans l'inhibition du cancer ER+ (*Krishnan, Swami, and Feldman 2012*).

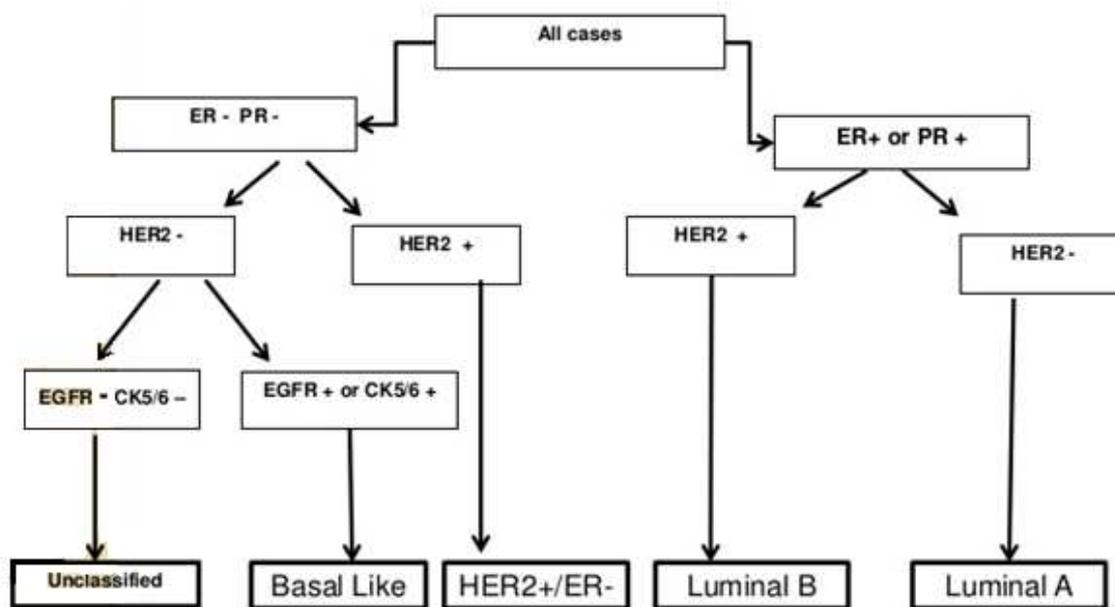


Figure 34. Classification des cancers du sein et algorithme décisionnel (Franchet et al. 2015).

Les cancers du sein sont classés en deux grandes familles : les tumeurs exprimant le récepteur des oestrogènes (RE+) et les tumeurs (RE-). Le groupe des tumeurs RE- est globalement de pronostic plus péjoratif.

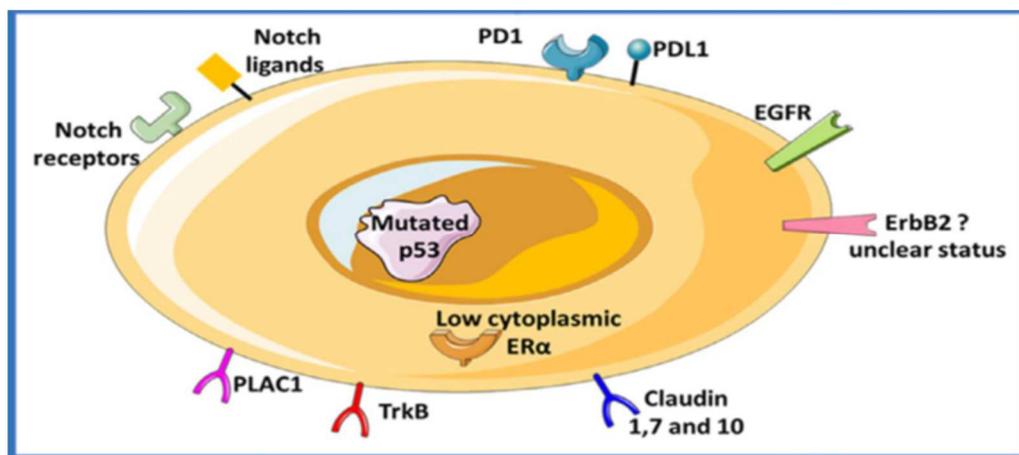


Figure 35. Marqueurs exprimés par les cellules EO771 (Le Naour et al. 2020).

PD1, Programmed cell death protein 1; *PD-L1*, Programmed death-ligand 1; *EGFR*, epidermal growth factor receptor ; *ErbB2*, Human Epidermal growth factor Receptor 2; *Plac1*, Placental-specific protein 1; *TrkB*, Tropomyosin receptor kinase B

- **Etudes expérimentales *in vivo* :**

Les études *in vivo* montrent également que la 1,25D et ses analogues inhibent la croissance des lignées ER+ telles que les cellules MCF-7 (Vanweelden et al. 1998; Swami et al. 2016a) et ER- les plus agressives comme MDA-MB-231 (So et al. 2011). Dans le cas des xénogreffes ER+, les effets antitumoraux de la 1,25D et de ses analogues sont dus à la fois à une expression accrue des médiateurs de l'arrêt de croissance tels que l'inhibiteur CDK p21 et IGFBP-3 (Insulin-like growth factor-binding protein 3) et à la perturbation des signaux de survie médiés par les œstrogènes suite à la suppression de la synthèse et de la signalisation des œstrogènes (Swami S et al. 2016). L'inhibition des tumeurs ER- par les analogues de la 1,25D est associée à une diminution de la prolifération et de l'apoptose due à l'augmentation de la fragmentation de l'ADN (So et al. 2011). Par rapport au calcitriol, les analogues semblent exercer une activité antitumorale similaire tout en provoquant moins d'hypercalcémie (So et al. 2011; Swami S et al. 2016).

Chez des souris transgéniques MMTV-neu nourries avec un régime supplémenté en VitD, il est observé dans le tissu mammaire l'induction de la signalisation des gènes régulés par la VitD et impliqués dans les voies de différenciation, de modification du métabolisme, de remodelage de la matrice extracellulaire et de déclenchement de l'immunité innée (Matthews et al. 2010). Dans le modèle syngénique 4T1, la 1,25D favorise la diffusion métastatique de la tumeur en générant un microenvironnement immunosuppresseur (Pawlik et al. 2018), ou en induisant la sécrétion d'ostéopontine probablement par les cellules tumorales (Anisiewicz et al. 2019). Par contre, la 1,25D et ses analogues PRI-2191 and PRI-2205 inhibent la formation de métastases dans les poumons chez des souris C57BL/6 âgées ovariectomisées (Anisiewicz et al. 2019). Dans le modèle syngénique de souris C57BL/6 ovariectomisée implantée avec la lignée Mmtv-wnt1 ER+, le traitement par la 1,25D ou un apport alimentaire de VitD ont réduit les effets indésirables de l'obésité et induit un retard dans l'apparition de la tumeur et une inhibition de sa croissance. Ces effets s'exercent sur la tumeur et le tissu adipeux environnant par de multiples processus : sous-expression des récepteurs ER, de l'aromatase et de Cox-2, diminution de la production d'œstrogènes et de PGE2, réduction de l'expression des récepteurs de la leptine et augmentation de ceux de l'adiponectine, réduction de la résistance à l'insuline et augmentation de la signalisation de l'adiponectine (Swami et al. 2016) (Figure 37). Une étude du modèle syngénique EO771 chez les souris C57BL/6 soumises à un régime standard a montré que la supplémentation en VitD diminue la croissance des tumeurs mammaires en augmentant l'infiltration des cellules T CD8+. L'effet opposé est observé chez les souris soumises à un régime obésogène pour lesquelles la VitD favorise la croissance tumorale avec réduction de l'infiltration des lymphocytes T CD8+ (Karkeni et al. 2019).

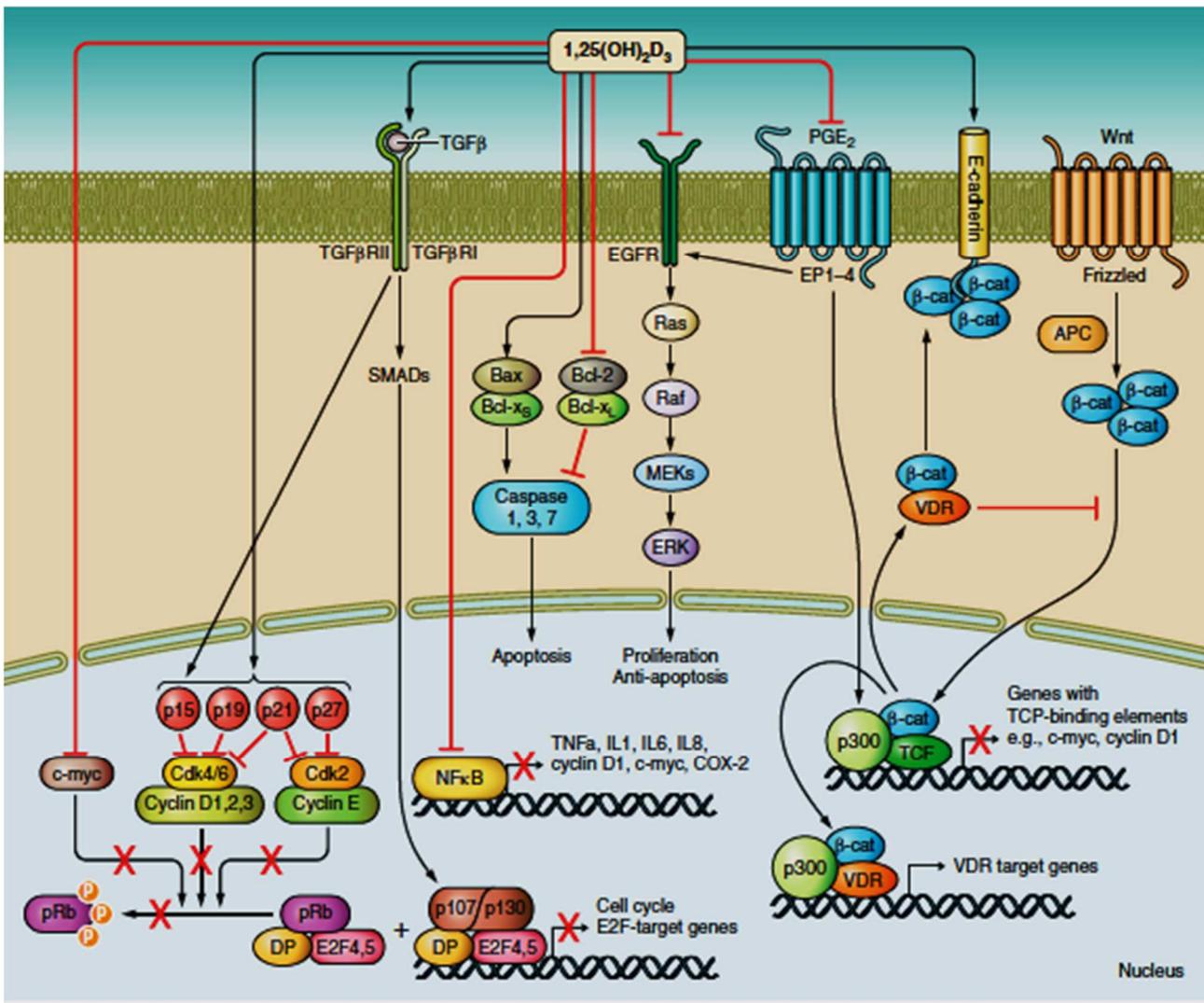


Figure 36. Voies de signalisation induites par la 1,25D3 impliquées dans la régulation de la prolifération cellulaire, de l'apoptose et de l'inflammation dans le cancer (Christakos et al. 2016).

La 1,25D3 empêche la transition de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire soit directement, par la stimulation de l'expression de différents inhibiteurs de kinases dépendant de la cycline (CDKi), soit indirectement par l'induction d'autres facteurs de croissance (par ex. TGF- β). De plus, la 1,25D3 induit l'apoptose par l'activation de la voie apoptotique intrinsèque ou par interférence avec d'autres voies de signalisation telles que TNF α , EGF, caténine et prostaglandines. La 1,25D3 a également une activité immunosuppressive, comme indiqué par la répression de la transcription génique à médiation NF- κ B, qui se traduit par l'inhibition de la production de cytokines inflammatoires, comme IL-1, IL-6, IL-8 et TNF α .

L'ensemble de ces études épidémiologiques et précliniques démontrent l'impact de la 1,25D et de la VitD sur le cancer mammaire impliquant de multiples voies interdépendantes régulant la croissance tumorale.

III.3 OBESITE ET CANCER MAMMAIRE

L'obésité est au niveau mondial considérée comme une pathologie émergente qui impacte la prévalence et la progression du cancer mammaire. L'obésité correspond à une augmentation de la masse du tissu adipeux due à un bilan énergétique positif, c'est-à-dire que l'apport calorique a surpassé au fil du temps la dépense énergétique. Selon l'Organisation mondiale de la santé, la prévalence estimée de l'obésité a triplé depuis 1975. En 2016, plus de 1,9 milliard d'adultes dans le monde, tant dans les pays en développement que dans les pays développés, sont en surpoids et 650 millions sont obèses (*Engin 2017*).

Le tissu adipeux est non seulement, le principal réservoir énergétique du corps, mais aussi, un site majeur de production de stéroïdes sexuels et d'adipokines, ce qui en fait un organe endocrinien à part entière (*Kershaw et al. 2004*). Une fonction endocrinienne altérée est souvent observée chez les personnes obèses favorisant l'apparition de signes clinico-biologiques comme l'insulinorésistance, l'hyperglycémie, l'hyperlipémie, l'hypertension et un état prothrombotique et/ou proinflammatoire, qui constituent le syndrome métabolique (*Grundy et al. 2004*). Ce syndrome augmente le risque de diabète de type 2 et de maladies cardiovasculaires, mais aussi de certains cancers dont le cancer de l'endomètre, du côlon et du sein. En fait, plusieurs études épidémiologiques montrent une corrélation entre l'obésité/syndrome métabolique et le risque de cancer du sein (*Engin 2017*). Ce lien entre obésité et risque accru de cancer est consécutif à des altérations des régulations endocrinienne et métabolique favorisant l'hyperleptinémie, l'hypercholestérolémie, l'augmentation de l'insulinémie, de l'IGF-1 (Insulin-like growth factor), de l'activité aromatasé ce qui aboutit à l'insulinorésistance et à la leptinorésistance (*Engin 2017*).

* **La leptine**, codée par le gène Ob, participe au maintien de l'homéostasie énergétique par un mécanisme de rétrocontrôle central au niveau de l'hypothalamus. Elle contrôle la croissance du tissu adipeux et la prolifération cellulaire, y compris au niveau mammaire (*Park et al. 2017*). Le taux de leptine sérique semble lié à l'agressivité du cancer du sein et peut refléter le type, le grade du cancer, l'envahissement des ganglions lymphatiques, l'expression des récepteurs hormonaux et le risque de récurrence du cancer (*Gu et al. 2011*). La liaison de la leptine à son récepteur active les voies de signalisation JAK2/STAT3, MAPK-ERK1/2, et PI3K/AKT (*Figure 38*) qui augmentent la prolifération cellulaire (*Atoum, Alzoughool, and Al-Hourani 2020*). La signalisation de la leptine favorise la progression du cancer mammaire grâce à son rôle dans l'EMT et contrôle de nombreux médiateurs impliqués dans la prolifération cellulaire, l'adhésion, l'invasion, la migration,

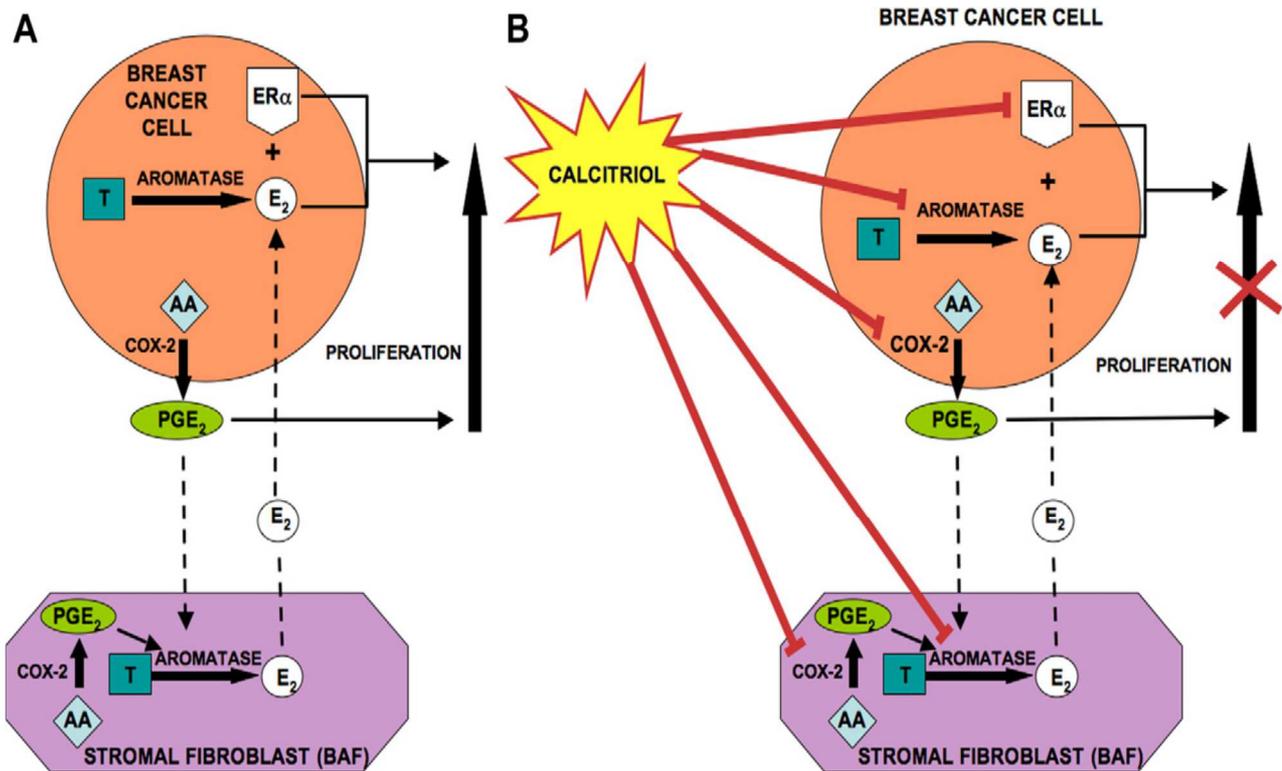


Figure 37. Inhibition de la synthèse et de la signalisation des œstrogènes par le calcitriol (1,25(OH)₂D) (Krishnan et al. 2012).

A. La régulation de la synthèse et de la signalisation des œstrogènes par l'aromatase, Cox-2 et les prostaglandines (PGE₂) dans le microenvironnement mammaire conduisant à une prolifération accrue de cellules tumorales.

B. Le calcitriol diminue l'expression de l'aromatase, enzyme qui convertit les précurseurs androgènes en œstrogènes à la fois dans les cellules cancéreuses mammaires et dans les fibroblastes adipeux mammaires (FAM) dans le stroma entourant la tumeur par une répression transcriptionnelle directe du promoteur II de l'aromatase. Le calcitriol supprime également l'expression de COX-2 dans les cellules tumorales mammaires et les FAM, réduisant ainsi le niveau de PGE₂. La PGE₂ stimule la prolifération, l'angiogenèse et inhibe l'apoptose. La PGE₂ est également un stimulateur majeur de la transcription de l'aromatase *via* le promoteur II. La diminution de PGE₂ est un second mécanisme indirect de répression de l'aromatase par le calcitriol conduisant à une diminution de la synthèse des œstrogènes dans le microenvironnement tumoral mammaire. Le calcitriol réduit l'expression de récepteurs d'œstrogènes (ERα) par la répression transcriptionnelle directe du promoteur ERα. La suppression d'expression des œstrogènes et de ERα par le calcitriol réduit significativement l'important stimulus prolifératif des œstrogènes sur les tumeurs ER+.

AA : acide arachidonique, ERα : récepteur des œstrogènes α, PGE₂ : prostaglandine E₂, FAM : fibroblaste adipeux mammaire (ou cellule stromale adipeuse).

l'inflammation et l'angiogénèse tels que le VEGF, l'E-cadhérine et la CDK1 (*Atoum, Alzoughool, and Al-Hourani 2020*). Dans des travaux antérieurs, notre équipe a montré le rôle de la leptine dans l'activation des voies de signalisation impliquées dans la prolifération cellulaire ainsi que son rôle dans la suppression de la réponse apoptotique des cellules tumorales mammaires (*Thierry Jardé et al. 2011*). De plus, notre équipe a établi que la leptine active la production de ROS (Reactive oxygen species) dans les cellules mammaires épithéliales humaines saines et néoplasiques (*Mahbouli et al. 2018*). Cette production excessive de ROS conduit au stress oxydatif qui contribue à l'inflammation et à la carcinogénèse.

* Les **œstrogènes** en excès jouent un rôle important dans le développement, l'invasion et la progression de la tumeur en situation d'obésité (**Figure 38**). Suite au déclin de la fonction ovarienne, la production d'œstrogènes en post-ménopause se fait à partir des précurseurs androgéniques dans des sites extra-gonadaux, principalement le tissu adipeux, grâce à l'enzyme aromatase codée par le gène CYP19. L'incidence du cancer du sein augmente avec l'âge ce qui est partiellement dû à l'augmentation du tissu adipeux et à l'expression accrue de l'aromatase dans le tissu adipeux (*Simone and Silvestris 2016*).

Pour étudier *in vivo* l'effet de l'obésité sur la croissance tumorale mammaire, notre équipe a développé le modèle syngénique orthotopique de la souris C57BL/6 porteuse de tumeurs EO771 (*Nachat-Kappes et al. 2012*). Dans ce modèle, l'induction d'une prise de poids excessive par un régime obésogène hyperlipidique conduit à un effet pro-tumoral, augmentant la croissance tumorale, favorisant l'angiogénèse, modulant la réponse immunitaire et activant des voies pro-tumorales telles que l'AKT/Mtor (*Gu et al. 2011; Fuentes-Mattei et al. 2014; Scully et al. 2016; Bousquenaud 2018; Le Guennec et al. 2020*). Les voies de signalisation impliquées dans la cancérogénèse mammaire induite par l'obésité sont détaillées dans **la figure 38**.

III.4 ACTIVITE PHYSIQUE ET CANCER MAMMAIRE

L'activité physique, y compris les exercices d'aérobic et de résistance, a des effets protecteurs sur le risque de cancer. Les études épidémiologiques montrent que l'activité physique réduit le risque de cancer de sein de 27% chez les femmes préménopausées et de 31% chez les femmes en post-ménopause. Des études ont montré une relation dose-réponse entre l'activité physique et le risque de cancer de sein (*Brown et al. 2012*). L'impact de l'activité physique dans la carcinogénèse s'exerce sur la réaction inflammatoire, la réponse immunitaire, les régulations hormonale (stéroïdes) et métabolique (insuline, IGF-1), la production adipokinique (leptine et adiponectine) (**Figure 39**) (*Le Guennec et al. 2020*).

Chez les femmes en post-ménopause, un niveau modéré d'exercice régulier est associé à une diminution des taux d'œstrogènes, entraînant un effet antiprolifératif. Cet effet a été démontré sur

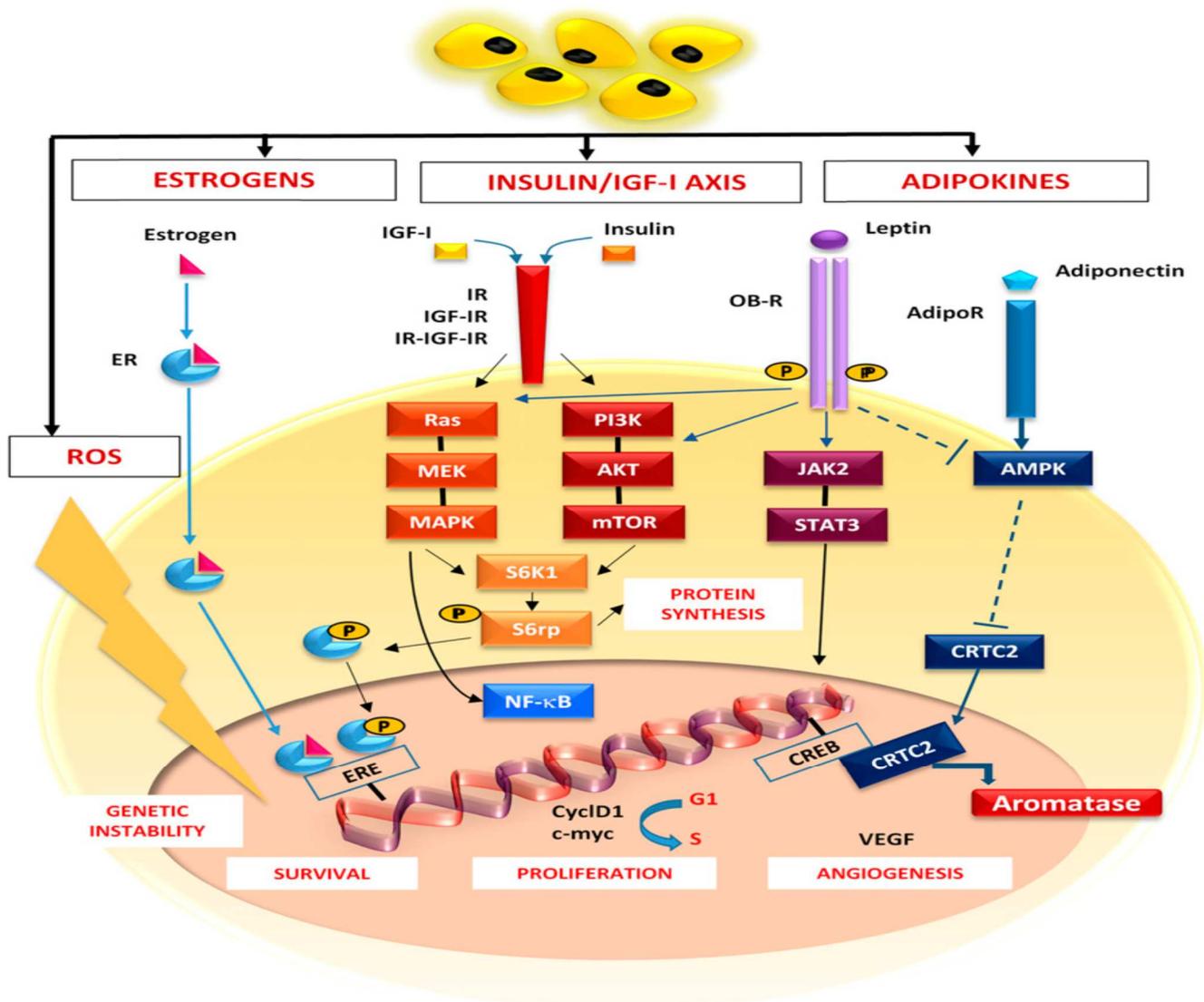


Figure 38. Voies de signalisation activées dans l'obésité et liées au cancer mammaire

L'obésité entraîne une augmentation des niveaux d'insuline, d'IGF-I et d'IGF-II qui se lient à l'IR, à l'IGF-IR et à une forme hybride (IR-IGF-IR), et activent ainsi à la fois le RAS/MEK/MAPK et le PI3K/Akt/mTOR qui activent le S6K1. La phosphorylation de S6rp par S6K1 favorise à la fois la synthèse des protéines et la prolifération cellulaire. La leptine active la signalisation JAK/STAT par son récepteur (OB-R). L'adiponectine déclenche la phosphorylation de l'AMPK *via* son récepteur AdipoR. L'AMPK diminue la translocation nucléaire du CRTC2 qui lie CREB, augmentant ainsi l'activité aromatase. Ces voies convergeant vers NF-κB, conduisent à l'expression de Cyclin D1 et c-Myc, qui favorisent la survie et la prolifération cellulaire, ainsi que la sécrétion du VEGF et l'angiogenèse tumorale. Les ROS contribuent à la progression tumorale en favorisant l'instabilité génomique (*Simone et al. 2016*).

AdipoR, récepteur de l'adiponectine; AMPK, protéine kinase activée par l'AMP; CREB, protéine de liaison aux éléments de réponse à l'AMPc; CRTC2, coactivateur de transcription 2 régulé par CREB; Cyclin D1, cycline D1; ERE, éléments de réponse aux œstrogènes; IGF, facteur de croissance analogue à l'insuline; IGF-IR, récepteur IGF-I; IR, récepteur d'insuline; JAK2/STAT3, janus kinase 2/transducteur de signal et activateur de transcription 3; NF-κB, facteur nucléaire κB; PI3K, phosphatidylinositol-3-phosphate; ROS, espèces réactives de l'oxygène; S6K1, S6 kinase-1; S6rp, protéine ribosomale S6; VEGF, facteur de croissance endothéliale vasculaire.

l'estradiol total et libre, indépendamment de l'IMC et du statut ménopausique. Le taux circulant de SHBG (sex hormone-binding globulin), protéine de transport des stéroïdes sexuels, augmente suite à la pratique d'exercices physiques, ce qui diminue les taux d'œstrogènes et d'androgènes libres (Figure 39) (Ennour-Idrissi, Maunsell, and Diorio 2015).

Différents modèles précliniques ont démontré la modulation des adipokines circulantes par l'activité physique. La production accrue de l'adiponectine par le tissu adipeux associée à une réduction de la masse grasse totale et viscérale a été démontrée (Barb, Pazaitou-Panayiotou, and Mantzoros 2006). L'adiponectine module des réponses biologiques importantes telles que l'activation des voies de survie, la stimulation de l'angiogenèse et la production de cytokines anti-inflammatoires, ayant ainsi un rôle antitumoral. L'adiponectine peut agir directement sur les cellules tumorales en se liant et en activant ses récepteurs et les voies de signalisation en aval (Barb, Pazaitou-Panayiotou, and Mantzoros 2006). Notre équipe a déterminé que le traitement par l'adiponectine (10 mg/ml) des cellules néoplasiques MCF-7 inhibe leur prolifération en réduisant l'expression des ARNm de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire (MAPK3, ATM) et de l'apoptose (BAG1, BAG3, P53) (Jardé et al. 2009). De plus, l'adiponectine inhibe la prolifération cellulaire induite par la leptine en inhibant NF- κ B, facteur de transcription qui régule positivement le VEGF dans les cellules tumorales mammaires (Jardé et al. 2009). Chez le rat, l'exercice aérobie à long terme a réduit les taux sériques de leptine par rapport aux témoins sédentaires (Zheng and Niu 2018). Néanmoins, quel que soit le modèle, l'activité physique exerce un effet protecteur sur la carcinogenèse mammaire avec réduction de la leptinémie.

L'activité physique augmente l'absorption du glucose via l'expression de GLUT4 et la sensibilité à l'insuline par l'activation des voies AMPK et PI3K/AKT (Le Guennec et al. 2020). De plus, l'activité physique elle réduit la production d'insuline et d'IGF-I et augmente l'expression de leurs protéines de transport IGFBP-3, ce qui contribue à la diminution des fractions libres d'insuline et de IGF-1 (Friedenreich, Ryder, Burbidge, and McNeil 2020).

Des études cliniques et précliniques ont démontré que les interventions d'activité physique à long terme d'une part, réduisent les marqueurs sériques pro-inflammatoires (IL-6, IL-1 β , TNF α) ainsi que la protéine C-réactive (CRP) et l'amyloïde sérique A (SAA) qui contribuent à la tumorigenèse et d'autre part, augmentent les biomarqueurs anti-inflammatoires, en lien avec la réduction de la masse grasse (Figure 39). De plus, les contractions musculaires au cours de l'exercice libèrent des récepteurs solubles du TNF α qui contribuent à la réponse anti-inflammatoire (Friedenreich, Ryder, Burbidge, and McNeil 2020).

L'exercice physique permet de réduire l'hypoxie due à l'hypertrophie des adipocytes par la stimulation de l'angiogenèse dans le tissu adipeux augmentant ainsi le flux sanguin tissulaire inflammatoire (Friedenreich, Ryder, Burbidge, and McNeil 2020). Notre équipe a développé

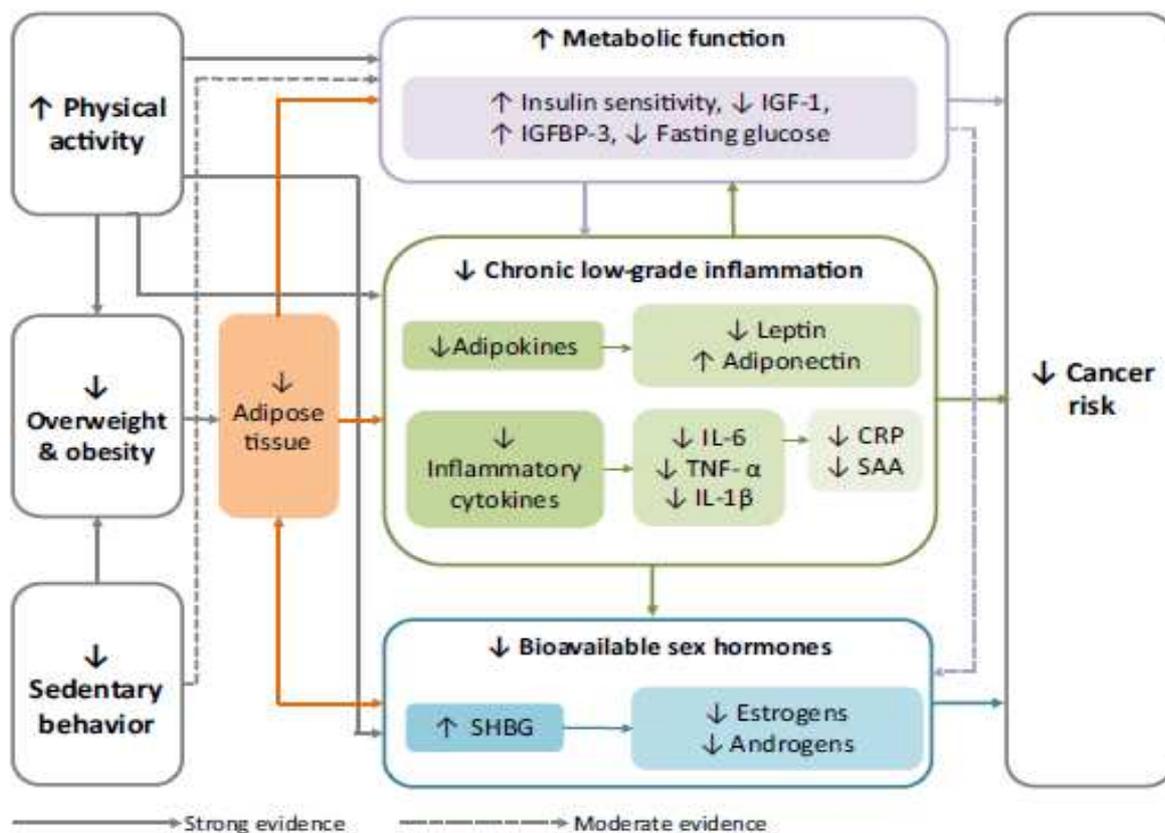


Figure 39. Mécanismes biologiques hypothétiques liant l'activité physique, l'excès de graisse corporelle et le comportement sédentaire au risque de cancer.

IGF-1, facteur de croissance analogue à l'insuline-1; IGFBP-3, protéine 3 de liaison au facteur de croissance de l'insuline; IL-6, interleukine-6; TNF- α , facteur de nécrose tumorale- α ; IL-1 β , interleukine-1 β ; CRP, protéine C-réactive; SAA, amyloïde sérique A; SHBG, globuline liant les hormones sexuelles ([Friedenreich et al. 2020](#)).

l'hébergement des animaux en environnement enrichi ce qui favorise l'activité physique spontanée et les interactions sociales des souris (*Nachat-Kappes et al.2012*). Ces conditions d'hébergement ont entraîné, dans notre modèle de tumeur mammaire EO771 développée par la souris C57BL/6, une diminution au niveau tumoral de l'expression de la COX-2 et du marqueur de prolifération Ki67, associée à une réduction de l'inflammation et du volume de la tumeur (*Nachat-Kappes et al.2012*). Les travaux récents de Adraskela et al. démontrent que l'exercice peut influencer positivement le maintien des télomères chromosomiques en protégeant contre le stress oxydatif et en favorisant l'expression des protéines de stabilisation des télomères (*Adraskela et al. 2017*). Le dysfonctionnement des télomères et la réactivité de la télomérase sont en effet associés à un risque plus élevé de cancer mammaire. Le stress oxydatif peut altérer les télomères, provoquant ainsi l'instabilité chromosomique. De même, l'excès de poids a été associé à des télomères raccourcis du fait de l'inflammation chronique induite par l'obésité et le stress oxydatif (*Friedenreich, Ryder, Burbidge, and McNeil 2020*).

OBJECTIFS DE LA THESE

Les travaux expérimentaux publiés montrent que la VitD est impliquée dans la modulation de la réponse immunitaire. La VitD favorise l'activation des réponses de l'immunité innée, en particulier la sécrétion de peptides antimicrobiens comme la cathélicidine. De plus, elle polarise l'immunité adaptative vers une réponse anti-inflammatoire. Cependant ces observations restent mal étayées et parfois contradictoires, notamment en raison de la variabilité des modèles et des conditions expérimentales comme par exemple les doses administrées, le temps d'incubation et la forme de VitD utilisée.

Par ailleurs, les études épidémiologiques démontrent un risque accru de développer un cancer du sein associé à la carence en VitD. Des travaux expérimentaux *in vitro* confirment l'effet cytotoxique de la VitD sur les cellules tumorales mammaires, effet qui n'est cependant pas retrouvé dans certains modèles cellulaires comme les cellules murines 4T1. De même, des études *in vivo* chez les rongeurs donnent des résultats contradictoires quant à l'impact de la VitD sur la croissance de tumeurs mammaires induites.

Comme les cellules immunitaires et les cellules tumorales mammaires semblent être des cibles privilégiées de la VitD, ceci laisse envisager une action régulatrice clé de cette vitamine dans le dialogue inter-cellulaire et la surveillance anti-tumorale.

Partant de ces données de la littérature et des travaux antérieurs de l'équipe de recherche, l'objectif général de la thèse était de définir l'impact de la VitD sur les capacités de réponse des cellules immunocompétentes en lien avec la prolifération et la croissance de cellules tumorales mammaires dans des modèles expérimentaux *in vitro* et *in vivo*.

Pour répondre à cet objectif, trois approches ont été développées :

- La première approche a pour objectif d'évaluer *ex vivo* l'impact de la supplémentation en 25(OH)D (25D) sur l'expression intracellulaire du gène CAMP qui code pour la cathélicidine, et sur la production extracellulaire de LL-37 (cathélicidine humaine) dans un modèle *ex vivo* de cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC).

Dans ce but, des cellules PBMC isolées de donneurs sains sont mises en culture, incubées ou non avec la 25D, et stimulées ou non par le lipopolysaccharide (LPS) ou par l'ARN double brin synthétique Poly (I:C) (PIC) pour mimer une situation d'agression bactérienne ou virale, respectivement. Les expressions du gène CAMP et du peptide hCAP18 sont mesurées après respectivement 24h et 48h d'incubation. Les concentrations de LL-37 sont déterminées dans le milieu de culture après 48h d'incubation.

Ce travail est en cours de soumission dans « Journal of Physiology and Biochemistry » (article 1).

➤ La deuxième approche compare *in vitro* l'impact de deux formes de la VitD, 25D et 1,25(OH)₂D (1,25D), sur les lignées murines d'adénocarcinome mammaire EO771 et de macrophages IC-21.

Cette approche a quatre objectifs :

- ❖ Caractériser le VDR et les acteurs du métabolisme de la VitD dans les EO771 et les IC-21 et étudier l'effet de la 25D et de la 1,25D sur leurs expressions génique et protéique.
- ❖ Evaluer l'effet de la 25D et de la 1,25D sur la viabilité des EO771 et sur la polarisation M1/M2 des macrophages IC-21.
- ❖ Etudier l'effet de la 25D et de la 1,25D sur l'expression génique et protéique de la cathélicidine par les EO771 et les IC-21 et déterminer si la cathélicidine a un effet cytotoxique sur les cellules EO771.
- ❖ Etudier l'effet de la 25D et de la 1,25D sur le dialogue entre les EO771 et les IC-21 en co-culture.

Pour cela, dans un premier temps, nous incubons des cellules EO771 et IC-21 avec la 25D ou la 1,25D. Les expressions géniques et protéiques des Vdr, Cyp27b1, Cyp24a1 et CRAMP (cathélicidine murine) sont étudiées après 24h et 48h d'incubation respectivement. La viabilité, l'apoptose et le cycle cellulaire des EO771 sont évalués après 24h, 48h d'incubation, et la polarisation des IC-21 est déterminée après 48h.

Dans un deuxième temps, les cellules EO771 et EO771 marqués à la protéine fluorescente verte (EO771eGFP) sont mises en culture 3D (sphéroïdes) puis co-cultivées ou non avec des IC-21, en présence ou en absence de 25D ou 1,25D. Ceci nous permet d'étudier l'effet de la VitD sur le dialogue entre les deux lignées en évaluant simultanément la viabilité des EO après 24h, 48h et 72h d'incubation et la polarisation des IC-21.

Ce travail fait l'objet d'un article en cours de rédaction (article 2).

➤ Dans la troisième approche, nous souhaitons confirmer nos observations de l'étude *in vitro* à l'aide d'un modèle *in vivo*. L'objectif de cette approche est d'étudier, chez la souris C57BL/6 âgée en situation d'obésité post-ménopausique, l'effet de la VitD, associé ou non à l'activité physique, sur la croissance tumorale mammaire et la réponse immunitaire du microenvironnement tumoral.

Pour cela, des souris C57BL/6 âgées sont ovariectomisées et soumises à un régime obésogène en microenvironnement enrichi. Les souris sont réparties aléatoirement en 4 groupes, recevant ou non une supplémentation en VitD, et soumises ou non à un exercice physique d'intensité modérée (course sur tapis) jusqu'à la fin du protocole. Après 8 semaines, les souris reçoivent une

implantation orthotopique des cellules d'adénocarcinome mammaire syngénique EO771. Le poids, la prise alimentaire et l'activité physique spontanée sont évalués tout au long du protocole. La croissance de la tumeur est estimée à partir du 9^{ème} jour post-implantation jusqu'au sacrifice (volume tumoral < 2,5 cm³). Au sacrifice, la tumeur, les tissus adipeux, les muscles et les organes immunitaires sont recueillis, pesés et congelés. L'infiltration des cellules immunitaires dans la tumeur est caractérisée.

Ce travail a fait l'objet d'un article original publié en octobre 2020 dans l' « European Journal of Nutrition » (<https://doi.org/10.1007/s00394-020-02420-z>) (article 3).

Les trois articles insérés dans la suite de ce manuscrit présentent les résultats obtenus à partir de ces trois approches *ex vivo*, *in vitro* et *in vivo*.

Publication n°1

25-hydroxyvitamin D potentializes extracellular cathelicidin release from human PBMC stimulated ex vivo with either bacterial (LPS) or viral (P: IC) mimetics.

Article soumis 9 le décembre 2020 à « Journal of Physiology and Biochemistry »

La 25-hydroxyvitamine D potentialise l'excrétion de la cathélicidine à partir de PBMC stimulées ex vivo par des agents mimétiques bactérien (LPS) ou viral (P: IC)

Introduction

La cathélicidine humaine LL-37 est un peptide antimicrobien qui joue un rôle crucial dans la défense immunitaire innée de l'hôte contre les bactéries, les virus, les champignons et les parasites. L'effet microbicide de LL-37 est principalement dû à ses propriétés cationiques permettant la perméabilisation de la membrane du micro-organisme.

Le clivage de l'extrémité C-terminale du peptide hCAP18 par la sérine protéinase 3 dans les cellules immunitaires génère la forme active de la cathélicidine, LL-37, et un peptide inactif, la cathéline.

Le peptide hCAP18 est codé par le gène *CAMP* dont l'expression est régulée par la VitD. Plus précisément, la forme active de la VitD, la 1,25 (OH)₂ D se lie à son récepteur VDR, ensuite le complexe VDR-1,25D migre vers le noyau où il se lie à un élément de réponse consensuel à la VitD (VDRE) dans le promoteur du gène *CAMP*, induisant ainsi l'expression de hCAP18. Les récepteurs Toll-like (TLR) 1, 2 et 4 activés, induits par les pathogènes, stimulent l'expression génique du VDR et de l'1 α -hydroxylase, ce qui favorise l'expression de la cathélicidine.

Si une corrélation positive entre la supplémentation en 25 (OH) D et l'expression intracellulaire de *CAMP* a été clairement établie, le lien entre la 25 (OH) D circulante et le relargage extracellulaire des peptides hCAP18 et/ou LL-37 reste controversé tant chez les sujets sains que malades.

Objectifs

Préciser le processus de conversion *ex vivo* de hCAP18 en LL-37 dans les cellules immunitaires mononucléées du sang périphérique (PBMC) et évaluer si une supplémentation en 25 (OH) D peut améliorer la libération de LL-37 dans le compartiment extracellulaire.

Matériel et méthodes

Des cellules PBMC fraîchement isolées à partir de prélèvements sanguins de donneurs sains ont été incubées avec différentes doses, infra-physiologique, physiologique et supra-physiologique de 25 (OH) D afin d'évaluer l'expression du gène *CAMP* après 24h, l'expression du peptide hCAP18 et la concentration de LL-37 dans le milieu de culture après 48h d'incubation. Les PBMC ont été stimulées ou non par des agents mimétiques bactérien ou viral, respectivement, le lipopolysaccharide (LPS) connu pour induire une surexpression de *CAMP* via l'induction du TLR4, et l'acide cytidylique

polyinosinique (PIC), activateur de TLR3. Simultanément, nous avons exploré les acteurs du métabolisme de la VitD, par l'évaluation de l'expression des gènes des enzymes CYP27B1 et CYP24A1 ainsi que du VDR en présence ou en absence de la 25(OH)D et/ou des immunostimulants.

Résultats

Les ARNm du VDR et des enzymes CYP27B1 et CYP24A1 sont exprimés de manière constitutive dans les PBMC dans des conditions non stimulées.

Après 24 h d'incubation avec 25(OH)D, nous n'avons détecté aucun effet significatif sur l'expression génique de *VDR*, *CYP24A1* et *CYP27B1* que ce soit dans les conditions stimulées ou non par LPS ou PIC. Fait intéressant, la 25 (OH) D tend à induire une surexpression du *CYP27B1* en présence de LPS, mais non significative, probablement en raison de l'importance des écart-types. De plus, la dose supra-physiologique de 25(OH)D tend à augmenter l'expression de *CYP24A1* à la fois dans des conditions non stimulées et stimulées par LPS ou PIC.

La 25(OH)D a induit une surexpression dose-dépendante du gène CAMP, indépendamment des stimulants ($p=0,0056$). L'expression du peptide hCAP18 est augmentée à la fois par la 25 (OH) D de façon dose-dépendante ($p < 0,001$) et par les deux stimulants LPS et PIC ($p = 0,0032$), démontrant l'importance de la présence de ces agents microbiens.

L'incubation des cellules pendant 48h avec 25 (OH) D a induit la sécrétion extracellulaire de LL-37 uniquement chez les PBMC stimulées par LPS ou PIC (effet interaction, $p=0,022$). En présence de LPS, une surproduction de LL-37 est observée pour toutes les doses de 25 (OH) D alors qu'en présence de PIC, l'augmentation de l'excrétion de LL-37 n'est obtenue qu'avec la dose 125 ng/ml de 25 (OH) D.

Conclusion

Dans les PBMC, l'expression intracellulaire de la cathélicidine est induite par 25(OH)D à la fois dans les cellules non stimulées et stimulées. La production extracellulaire de LL-37 semble dépendante de 25(OH)D uniquement lorsque les PBMC sont stimulées par des agents mimétiques bactérien ou viral. Ces données suggèrent que la libération de LL-37 dans le compartiment extracellulaire est finement régulée pour éviter le risque d'une destruction non spécifique du microbiote hôte puisque les propriétés bactéricides de ce peptide cationique ne sont pas strictement spécifiques.

25-hydroxyvitamin D potentializes extracellular cathelicidin release from human PBMC stimulated *ex vivo* with either bacterial (LPS) or viral (P: IC) mimetics.

Sahar Al Dekwer¹, Nicolas Goncalves-Mendes¹, Réa Bingula¹, Guillaume Martinroche¹, Cassandra Lanchais¹, Stéphanie Rouge¹, Marie-Chantal Farges¹, Adrien Rossary¹, Mona Diab-Assaf², Marie-Paule Vasson^{1,3}, Jérémie Talvas¹

¹University of Clermont Auvergne, INRA, UMR 1019 Human Nutrition Unit, CRNH Auvergne F-63000 Clermont-Ferrand, France.

²Lebanese University, Faculty of Sciences II, Fanar, Lebanon

³CHU, Centre Jean Perrin, Nutrition Unit, F-63000 Clermont-Ferrand, France.

* Correspondence should be addressed to Jérémie Talvas.

Email: Jeremie.talvas@uca.fr telephone: +33 4 73 17 80 46.

ABSTRACT

Human cathelicidin refers to the cationic antimicrobial peptide hCAP18/LL-37. LL-37 is formed by cleavage of the propeptide hCAP18 coded with *CAMP* gene. The active form of vitamin D, 1,25-dihydroxyvitamin D (1,25(OH)D) has been shown to induce the *CAMP* gene expression through promoter activation. We previously failed to demonstrate in a clinical trial that supplementation of 25-hydroxyvitamin D (25(OH)D) improves LL-37 serum levels. The aim of this work was to evaluate the impact of 25(OH)D supplementation on intracellular expression of *CAMP* and secretion of LL-37 in an *ex vivo* model using the peripheral blood mononuclear cells (PBMC).

PBMC collected from healthy donors and incubated with different concentrations of 25(OH)D (0 ng/ml: control (D0); 25 ng/ml: deficient (D25); 75 ng/ml: physiological (D75); 125 ng/ml : supraphysiological (D125)) were stimulated or not with lipopolysaccharide (LPS, 100 ng/ml) or synthetic double-stranded RNA Poly (I: C) (PIC, 10 µg/ml). The intracellular expressions of the *CAMP* gene and the hCAP18 peptide were measured respectively after 24h and 48h incubation period. The concentration of LL-37 was determined in the culture medium after 48h incubation.

25(OH)D significantly induced *CAMP* gene expression at 24h with a maximum effect at a dose of D125 in either unstimulated (10-fold expression) or stimulated (LPS: 100-fold expression; PIC: 15-fold expression) conditions. Intracellular hCAP18 peptide was overexpressed at 48h under unstimulated (1.5-fold, D125) and stimulated-conditions, LPS (2-fold, D125) and PIC (2,5-fold, D125). The secretion of LL-37 in the culture medium was significantly induced by 25(OH)D only in both stimulated (LPS and PIC) conditions in dose dependent manner.

Our results demonstrate that 25(OH)D incubation increases intracellular expression of *CAMP* and hCAP18, but extracellular secretion of LL-37 antimicrobial peptide is increased by 25(OH)D only when PBMC from healthy donors were stimulated with bacterial or viral immune mimetic.

Key words: Vitamin D; cathelicidin; antimicrobial peptide; infectious disease

1. Introduction

Cathelicidin is a generic name that can refer to the *CAMP* gene (cationic antimicrobial peptide), hCAP18 peptide (human cationic antimicrobial peptide 18 kDa), but also to LL-37 peptide (37 amino acid residues with diLeucine at the N-terminus, 4,5 kDa). hCAP18 peptide is coded by *CAMP* gene whose expression is regulated by vitamin D. More precisely, the active form of vitamin D 1,25-dihydroxyvitamin D (1,25(OH)D) binds to the vitamin D nuclear receptor (VDR) (P. T. Liu et al. 2006b), enabling dimerization with retinol X receptor (RXR). This complex enters nucleus to bind to a consensus vitamin D response element (VDRE) in the *CAMP* gene promoter, thus enhancing hCAP18 expression (Vandamme et al. 2012). hCAP18 is widely expressed especially in the monocyte/macrophage lineage in which it is stored in lysosomes or vacuoles (X. Chen et al. 2018b). Cleavage of the C-terminal end of hCAP18 by serine proteinase 3 in immune cells generates the active form of the cathelicidin, LL-37, and an inactive peptide, cathelin (Sorensen 2001). The two peptides, active form LL-37 and hCAP18, could be released, but LL-37 is considered as the major form present into the bloodstream. LL-37 plays a prominent role in innate host defense against bacteria and certain viruses, fungi and parasites. The LL-37 microbicidal effect is principally due to its cationic properties allowing permeabilization of microorganism's membrane (Vandamme et al. 2012). Toll-like receptors (TLRs) 1, 2 and 4, induced by pathogen immune stimulators, were also reported to up-regulate the expression of *VDR* and vitamin D hydroxylase genes, leading to the induction of cathelicidin production and eradication of intracellular *Mycobacterium (M.) tuberculosis* (P. T. Liu et al. 2006).

While a positive correlation between 25(OH)D supplementation and *CAMP* expression has been established (Chun et al. 2015), the link between circulating 25(OH)D and the hCAP18 and/or LL-37 blood peptides remains unclear both in healthy and diseased subjects. In volunteers presenting health issues, Kanda *et al.* (2012) have reported a positive correlation in atopic dermatitis patients (Kanda et al. 2012). In healthy volunteers, Bhan *et al.* (2011) (Bhan et al. 2011) and Dixon *et al.* (2012) (Dixon et al. 2012) also reported a significant positive correlation but only when serum concentration of 25(OH)D was under the threshold value of 32 ng/mL. In contrast, Stukes *et al.* (2016) were unable to confirm the correlation between 25(OH)D and LL-37 circulating levels in a cohort of healthy children (Stukes et al. 2016). Our team observed the same absence of correlation in a placebo-controlled clinical trial with vitamin D supplementation in elderly volunteers (Goncalves-Mendes et al. 2019). Despite a strong improvement in serum 25(OH)D concentrations, we found no variation in LL-37 serum concentrations.

In view of these conflicting results, our objective was to clarify the *ex vivo* conversion process of hCAP18 to LL-37 in blood immune cells and to evaluate if 25(OH)D supplementation could enhance the LL-37 release to the extracellular compartment. Therefore, we established an *ex vivo*

culture of freshly isolated peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from healthy donors. The cells were incubated with several doses of 25(OH)D to assess intracellular *CAMP* gene expression, hCAP18 peptide expression, and LL-37-secreted concentrations in the culture medium. In addition to 25(OH)D, certain PBMCs were stimulated with bacterial or viral mimetics, respectively. Lipopolysaccharide (LPS) is known to induce *CAMP* over-expression *via* toll like receptor 4 (TLR4) induction (Li et al. 2009), as well polyinosinic cytidylic acid (PIC), a well-known activator of TLR3 (Sokolova et al. 2014). Concomitantly, we explored the vitamin D's metabolic actors: expression of *CYP27B1* and *CYP24A1* enzyme genes as well as *VDR* gene.

2. Materials and Methods

2.1. Cell Culture

The human blood samples were obtained from healthy volunteers of the local French blood agency (Etablissement Français du Sang, EFS, Auvergne-Rhône-Alpes). After full pertinent information, written informed consents were obtained from all blood donors involved in the study as statutory required (article R.1221-5 of the Public Health Code, 12/01/2009 and 11/06/2006 decrees). Ethical review and approval were not required for this study in accordance with the local legislation and institutional requirements.

PBMC were isolated from the buffy-coats by Ficoll-Histopaque (Sigma) density gradient centrifugation. After isolation, PBMC (10^6 cells/ml) were cultured for 24 h or 48 h in RPMI-1640 complete medium (37 °C, 5% CO₂) with several doses of 25(OH)D (Sigma Aldrich, ref 739650) (0 ng/ml: control (D0); 25 ng/ml: deficient (D25); 75 ng/ml: physiological (D75); 125 ng/ml : supraphysiological (D125)), stimulated or not by a bacterial agent (extract of *Escherichia coli* lipopolysaccharides 055B5 (LPS): 100 ng / ml) ref. L6529 (Sigma-Aldrich); or a viral mimetic agent (synthetic double-stranded RNA Poly (I: C) (PIC): 10 µg / ml) ref. P1038 (Sigma-Aldrich).

2.2. RT-Q-PCR

RT-QPCR was performed as described in (Mahbouli et al. 2018b) after 24h of cell incubation. The expression of *CAMP* (F-GCTAACCTCTACCGCCTCCT, R-GGTCACTGTCCCCATACACC), *CYP27B1* (F-CGAGAAGGACCTGGAGTCTG, R-TCTGGGACACGAGAATTTCC), *CYP24A1* (F-ATGAGCACGTTTGGGAGGAT, R-TGCCAGACCTTGGTGTGAG), *VDR* (F-CTGACCCTGGAGACTTTGA, R-TTCCTCTGCACTTCCTCATC) target genes was assessed using *18S* mRNA (F-AGCTTATGACCCGCACTTAC, R-GTCTGTGATGCCCTTAGATG) as the housekeeping gene for normalization. The comparative cycle threshold (CT) method ($2^{-\Delta\Delta CT}$) was used to calculate the relative gene expression of a given sample, normalized within the sample to the housekeeping gene, and relative to the expression of the same gene in another sample: $2^{-\Delta\Delta CT}$ method with $\Delta\Delta CT = [\Delta CT$

(sample1) - Δ CT (sample2)] and Δ CT = [CT(target gene) - geometric mean CT (housekeeping gene)] as described in (Livak and Schmittgen 2001).

2.3. Western blotting

Western blots were performed as previously described (Talvas et al. 2010) after 48h of cell incubation. The membranes were exposed to primary antibodies (CAMP, sigma Aldrich, ref. SAB5300171, dilution 1/1000; and GAPDH, Cell Signaling Technology #5174, dilution 1/2000). The relative expression was obtained by normalization with GAPDH expression levels.

2.4. ELISA

LL-37 was quantified in the PBMC culture media after 48h of cell incubation using a double-sandwich ELISA, following the manufacturer's guidelines (Hycult Biotechnology, ref: HK321). The HK321 LL-37 ELISA does not discriminate between LL-37 peptide and the full-length precleaved hCAP18 protein. The concentrations of LL-37 were normalized with protein content of culture media.

2.5. Statistical analysis

Data are presented as mean \pm sem and were analyzed using GraphPad Prism5. Two-way ANOVA (Dose: 25(OH)D and Treatment: immune stimuli) with Bonferroni post-hoc test was used to evaluate the 25(OH)D dose response in unstimulated, LPS- and PIC- stimulated conditions. Test result was considered significant when $P < 0.05$.

When working with relative expression data, the value of control condition (i.e. unstimulated D0 condition) was set to “1”, and other values were normalized accordingly to facilitate interpretation.

3. Results

3.1. PBMC express *CYP27B1*, *CYP24A1* and *VDR*

To accomplish 25(OH)D metabolism *in situ*, circulating immune cells must express *CYP27B1* (coding for 1 α -hydroxylase) for activation of 1,25(OH)D and *CYP24A1* (coding for 24 hydroxylase) which inactivates all forms of vitamin D by hydroxylation at carbon position 24. Both enzymes are expressed constitutively in PBMC in unstimulated conditions (**Figure 1a, b, and c: “Unstimulated D0”**).

Further, we explored the effect of 25(OH)D with or without LPS or PIC stimuli on the enzyme gene expressions in PBMC. After 24 h, we observed no statistically significant dose effect on *CYP24A1*, *CYP27B1* and *VDR* expression with 25(OH)D in unstimulated or LPS- or PIC- stimulated conditions (**Figure 1a, 1b, 1c**).

Interestingly, 25(OH)D seemed to induce an overexpression of *CYP27B1* in presence of LPS (**Figure 1b**), but insignificant, probably due to the large variation in data. Moreover, the highest dose

of 25(OH)D seemed to enhance the expression of *CYP24A1* in both unstimulated and LPS or PIC stimulated conditions (**Figure 1c**).

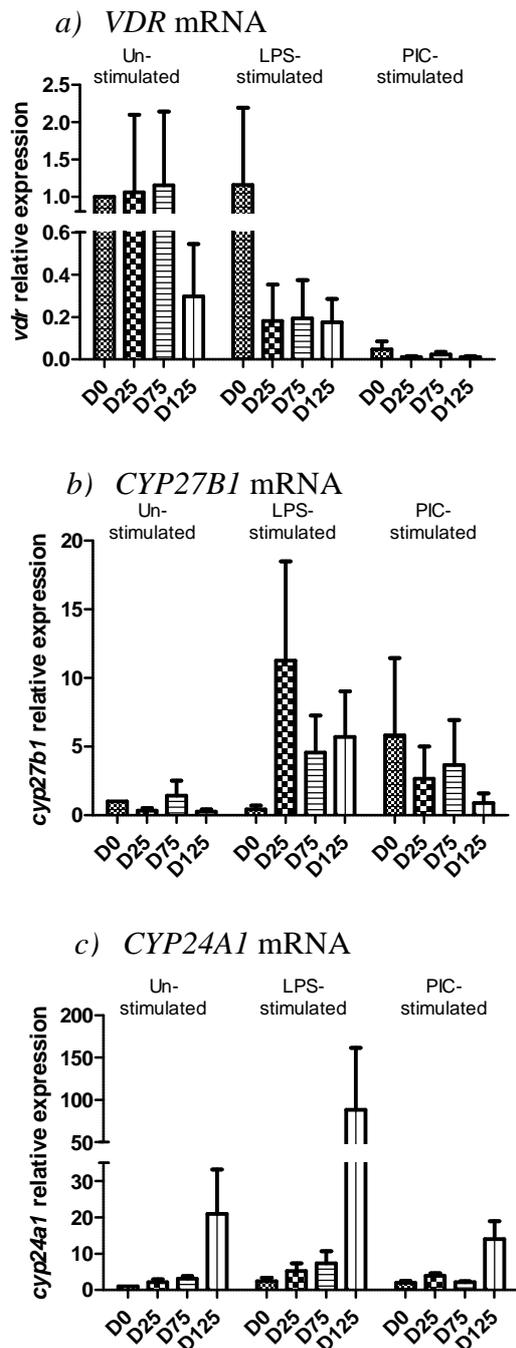


Figure 1: Vitamin D enzyme machinery and VDR mRNA expressions are present in healthy donors' PBMCs

Cells were incubated for 24 h with 25(OH)D (D0: 0 ng / ml, D25: 25 ng / ml, D75: 75 ng / ml, D125: 125 ng / ml) in either unstimulated or stimulated (LPS: lipopolysaccharide, 100 ng / ml; PIC: polyinosinic-polycytidylic acid, 10 μ g / ml) condition. Results are expressed as means \pm sem of fold change relative to control i.e. D0 unstimulated condition. Data were analyzed by two-ways ANOVA followed by Bonferroni post-test.

a) *VDR* expression (n=4). Two-way ANOVA: ns (not significant)

b) *CYP27B1* expression (n=4). Two-way ANOVA: ns

c) *CYP24A1* expression (n=5). Two-way ANOVA: ns

3.2. 25(OH)D induces intracellular overexpression of *CAMP* mRNA and hCAP18 peptide.

We evaluated the expression of the *CAMP* gene after 24h incubation and its protein product, hCAP18 peptide, after 48h incubation with 25(OH)D. We observed a significant dose-dependent effect of 25(OH)D on the overexpression of the *CAMP* gene, with the highest effect for the dose of 125 ng/ml, regardless of the presence of stimulants (**Figure 2a**).

On the contrary, hCAP18 peptide expression was both significantly 25(OH)D dose-dependent ($p < 0.001$) and stimulus-dependent ($p = 0.0032$), indicating the importance of the presence of microbial patterns (**Figure 2b**).

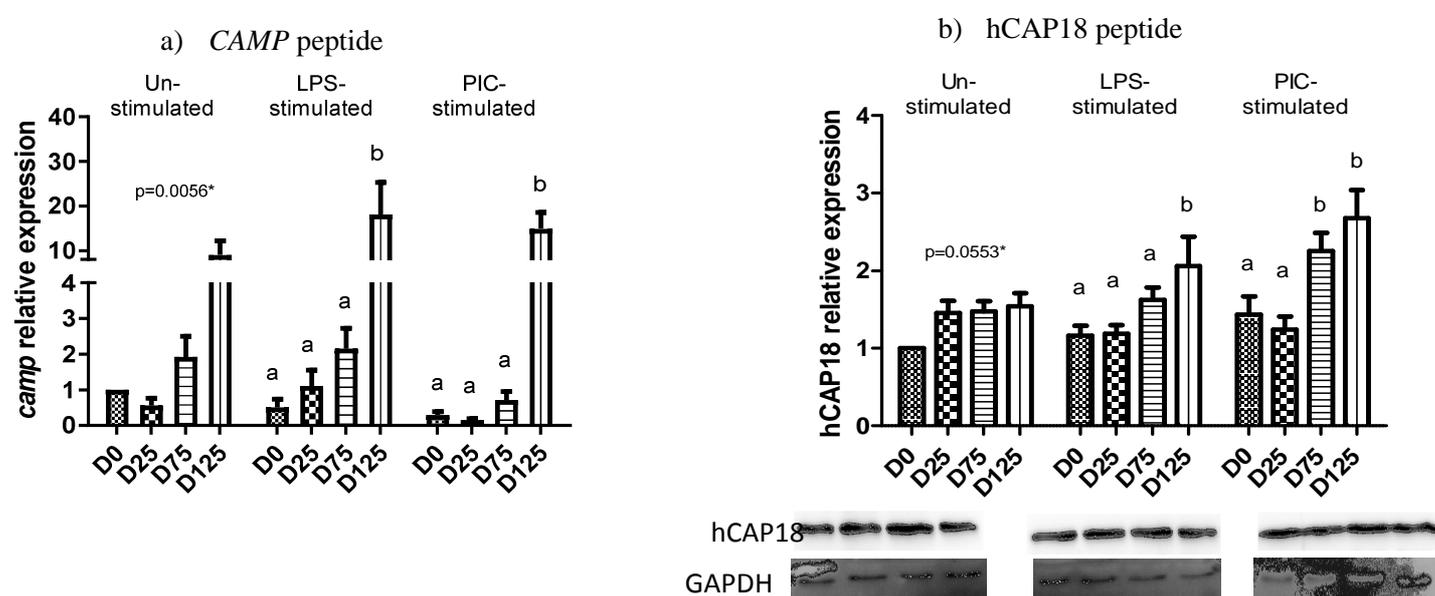


Figure 2: 25(OH)D induces dose-dependent intracellular *CAMP* gene and hCAP18 peptide expression

Cells were incubated with 25(OH)D (D0: 0 ng / ml, D25: 25 ng/ml, D75: 75 ng / ml, D125: 125 ng / ml) in unstimulated and stimulated (LPS: lipopolysaccharide, 100 ng / ml; PIC: polyinosinic-polycytidylic acid, 10 μ g / ml) conditions. Results are expressed as means \pm sem of fold change relative to control i.e. D0 unstimulated condition. Data were analyzed by two-ways ANOVA followed by Bonferroni post-test.

a) *CAMP* mRNA expression by RT Q-PCR after 24 h incubation (n=5). Two-ways ANOVA 25(OH)D effect: $p < 0.001$

b) hCAP18 expression by western blot after 48 h incubation (n=4). Two-ways ANOVA 25(OH)D effect: $p < 0.001$. Two-way ANOVA stimuli effect $p = 0.0032$.

Letters indicate significant differences ($p < 0.05$) after two-ways ANOVA Bonferroni post-test of 25(OH)D effect. Asterisks * indicate p-value of one-way ANOVA.

3.3. 25(OH)D induces LL-37 secretion only in LPS- or PIC-stimulated PBMC

The concentration of LL-37 in the culture medium of PBMC was quantified after 48h incubation with 25(OH)D. Two-way ANOVA returned significant interaction effect of 25(OH)D and different stimuli of $p = 0.022$. Both presence of PIC and LPS stimuli induced higher LL-37 secretion in response to 25(OH)D presence, while no effect was observed on the unstimulated condition (**Figure 3**). In LPS condition, overproduction of LL-37 is observed with all doses of 25(OH)D while in PIC condition the stimulation of LL-37 production is only obtained with 125 ng/ml of 25(OH)D.

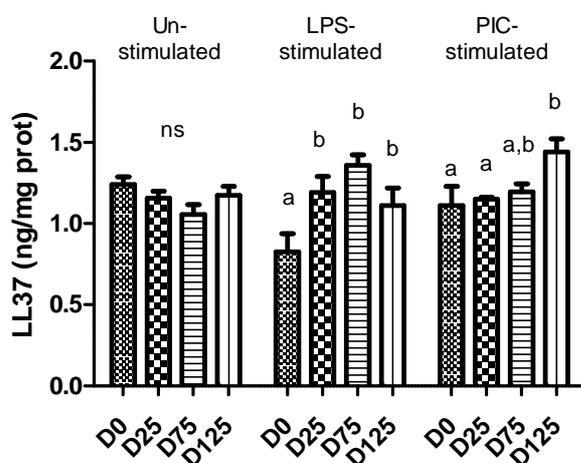


Figure 3: Extracellular LL-37 peptide concentration conditioned by 25(OH)D only when combined with microbial mimetics.

Cells were incubated with 25(OH)D (D0: 0 ng / ml, D25: 25 ng/ml, D75: 75 ng / ml, D125: 125 ng / ml) in unstimulated and stimulated (LPS: lipopolysaccharide, 100 ng / ml; PIC: polyinosinic-polycytidylic acid, 10 μ g / ml) conditions. Supernatant LL37 concentrations normalized by total protein concentrations are expressed as means \pm sem, (n=3). Letters indicate significant differences ($p < 0.05$) of two-ways ANOVA followed by Bonferroni post-test.

Two-way ANOVA: 25(OH)D effect, $p = 0.0475$; interaction term 25(OH)D x stimuli, $p = 0.022$.

4. Discussion

We have previously conducted a clinical trial where we failed to evidence the increase in circulating concentrations of LL-37 following the vitamin D supplementation in healthy volunteers (Goncalves-Mendes et al. 2019). Following discrepancies on the efficiency of oral vitamin D supplementation as an inductor of LL-37 secretion, we decided to determine the *ex vivo* effect of vitamin D on LL-37 production from human PBMC. Therefore, we exposed PBMC to four different doses of 25(OH)D to mimic depletion, deficiency, optimal and supra-physiological blood concentrations. In addition, PBMC were incubated in unstimulated condition or with either bacterial

LPS, known to stimulate *CAMP* expression *via* toll like receptor 4 (TLR4) induction (Li et al. 2009), or PIC, a well-known activator of TLR3 simulating viral infection (Sokolova et al. 2014).

We confirm that PBMC express the *VDR* gene and that therefore they may be reactive to the genomic effects of vitamin D. Moreover, we confirm that PBMC can metabolize 25(OH)D since they express *CYP27B1* (coding for 1 α -hydroxylase) which hydroxylates 25(OH)D at carbon 1 α to form 1,25(OH)D, the active metabolite of vitamin D, and *CYP24A1* (coding for 24-hydroxylase) which inactivates all forms of vitamin D by hydroxylation at carbon 24 position.

We do not report any significant variation of *CYP24A1*, *CYP27B1* and *VDR* expression following 25(OH)D incubation even if *CYP24A1* seemed to be overexpressed in unstimulated and LPS-stimulated conditions and *CYP27B1* only in LPS-stimulated condition. In the kidneys, it has been shown that high levels of circulating 1,25(OH)D stimulate *CYP24A1* activity and impair *CYP27B1* activity as a negative feedback loop (Bikle 2014). In macrophages, a slight *CYP27B1* inhibition was observed in presence of 25(OH)D (but not with 1,25(OH)D) after 24 hours of incubation (Rafique et al. 2019). In accordance with our results, the ability of 1,25(OH)D to enhance *CYP24A1* activity has been previously reported in monocytes after 24h incubation (Kreutz et al. 1993). The same authors reported that 1,25(OH)D supplementation induced overexpression of *VDR* (Kreutz et al. 1993). In contrast, Shirvani-Farsani *et al.* (2017) reported a *VDR* underexpression after vitamin D treatment in PBMC of multiple sclerosis patients suggesting that inflammatory state of cells is a key determinant for *VDR* expression (Shirvani-Farsani et al. 2017). Nevertheless, the lack of significance of our results could be due to variability in response and composition of PBMC (lymphocytes/monocytes distribution) from different volunteers.

Similarly to previously described, 25(OH)D exposition results in an overexpression of the *CAMP* gene and the hCAP18 peptide in PBMC cultures under 24-hour. This effect is stronger on gene expression than peptide expression suggesting a post-transcriptional regulation. This kind of regulation was previously described in mouse promyelocytic cell line in which the overexpression of the miRNA “miR-130a” downregulated hCAP18 peptide expression (Larsen et al. 2014).

Confirming our clinical trial results, PBMC incubated in unstimulated condition *i.e.* without microbial mimetics, showed secreted LL-37 concentration unchanged regardless of the 25(OH)D dose. Interestingly, we found a significant increase of LL-37 production in presence of 25(OH)D when PBMC were stimulated with bacterial mimetic LPS (TLR4 agonist) or viral mimetic PIC (TLR3 agonist). TLR activators are known to interfere with *VDR* signaling and to modulate the release of LL-37 (P. T. Liu et al. 2006b; Siswanto et al. 2015). Liu *et al* reported that the TLR (1-2-4) activation of monocytes/macrophages by pathogen stimulators up-regulated the expression of *VDR* and vitamin D hydroxylase genes, leading to the induction of cathelicidin production and the killing of intracellular *M. tuberculosis* (P. T. Liu et al. 2006b).

In the THP-1 human blood monocytic cell line, LPS and 1,25(OH)D both increased *VDR* mRNA levels 20 h after treatment (Pramanik et al. 2004). Others have shown that exposure of keratinocytes to PIC increased the rate of 1,25(OH)D production and the expression of *CYP27B1* (Miodovnik et al. 2012). These results suggest that TLR agonists activate vitamin D metabolism and signaling *in situ*. In keratinocytes, the *in situ* production of vitamin D which is known to have anti-inflammatory properties would permit to control the inflammatory process due to TLR inducers such as PIC, TNF, or LPS and to stimulate cathelicidin production (Schauber et al. 2007).

How LPS and PIC trigger VDR signaling is still a matter of debate. Zhao *et al.* (2018) reported evidence that LPS down-regulates VDR expression in oral mucosal epithelia dependent on TNF α -miR346 signaling, and further suggested that vitamin D/VDR can suppress LPS-induced keratinocytes apoptosis by regulating NF- κ B pathway (B. Zhao et al. 2018). Conversely, 1,25(OH)D is known to up-regulate TLR10 and to down-regulate TLR 2, 4, and 5 in human monocyte THP-1 suggesting possible crosstalk between VDR and TLR signaling (Verma, Jung, and Kim 2014). This crosstalk between VDR and TLR signaling pathways could explain why release of LL-37 is dependent of vitamin D concentration only when PBMC are stimulated by LPS or PIC. Actually, the TLR4-inducer LPS is known to be a key regulator of the expression and the activity of serine proteinase 3 that cleaves hCAP18 into LL-37 and cathelin (Y. Chen et al. 2018). Induction of TLR pathways would potentialize VDR signaling so that we observed a higher concentration of LL-37 with high doses of 25(OH)D only in stimulated conditions which allowed to strongly activate serine proteinase 3.

Whether the processing of LL-37 occurs inside the cell granules or it involves extracellular compartment is still debated. Pioneer studies reported that hCAP18 is excreted and then processed to LL-37 extracellularly in a reaction catalyzed by serine proteinase 3 (Sorensen 2001). More recent works advanced that neutrophils and monocytes express serine proteinase 3 so that the processing could occur in vacuoles before exocytosis (Zhou, Richard, and Ménard 2000). Nevertheless, this control of processing and externalization could occur *in vivo* both inside the cells (to release adequate amounts of the antimicrobial peptide in case of infection by bacteria, virus and fungi) and/or outside the cells (if LL-37 concentration is too high in the bloodstream). This regulation is crucial because the LL-37 killing mechanisms are not specific so that in excess it can become a cytotoxic agent towards commensal bacteria and/or host cells (Sancho-Vaello et al. 2020).

To consolidate our data, it could be necessary to increase the number of donors' PBMC samples and to determine the cathelicidin expression after longer incubation time in order to distinguish between genomic and non-genomic regulation process. Moreover, we cannot affirm undoubtedly that LL-37 is the only peptide present in the culture media since the LL-37 ELISA kit used does not discriminate between the LL-37 and hCAP18 forms. It would be of great interest to

develop a well-calibrated reference method to discriminate LL-37 and hCAP18 quantification in biological samples. For the moment this is only possible by using SELDI-TOF mass spectrometry, as previously used to detect LL-37 in pellets of 1,25(OH)D-stimulated primary human monocytes (P. T. Liu et al. 2006b).

5. Conclusion

In circulating PBMC, intracellular expression of human cathelicidin is induced by 25(OH)D both in unstimulated and stimulated cells. However, extracellular production of LL-37 appears dependent on 25(OH)D only when PBMC are stimulated by bacterial or viral pathogen mimetics. These data suggest that release of LL-37 in extracellular compartment is finally regulated to avoid non-specific killing of host microbiota since bactericidal properties of this cationic peptide are not strictly specific. Further studies should be encouraged to clarify the process of cleavage and externalization/degranulation of LL-37 given that this antibacterial and antiviral peptide could be a key factor in the reduced risk of influenza and COVID-19 infections associated to vitamin D supplementation as recently suggested (Grant et al. 2020; Crane-Godreau et al. 2020).

Compliance with Ethical Standards

Funding: This work was supported by the 2014 Bernard Beaufrère research prize from the French Society of Clinical Nutrition and Metabolism (SFNEP).

Disclosure of potential conflicts of interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Research involving Human Participants and/or Animals: Ethical review and approval were not required for this study in accordance with the local legislation and institutional requirements.

Informed consent: The human blood samples were obtained from healthy volunteers of the local French blood agency (Etablissement Français du Sang, EFS, Auvergne-Rhône-Alpes). After full pertinent information, written informed consents were obtained from all blood donors involved in the study as statutory required (article R.1221-5 of the Public Health Code, 12/01/2009 and 11/06/2006 decrees).

Author Contributions: The authors' responsibilities were as follows- NGM, MCF, AR, MPV and JT: designed the protocol; SAD, GM, KL, SR, NGM, RB, MPV and JT: performed the experiments, analyzed the data and wrote the manuscript; and all authors: read and approved the manuscript.

References

- Bhan I CA, Wenger J, et al (2011) Circulating levels of 25-hydroxyvitamin D and human cathelicidin in healthy adults. *J Allergy Clin Immunol* 127:1302-1304.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.12.1097>
- Bikle DD (2014) Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications. *Chem Biol* 21:319–329. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.12.016>
- Chen X, Zou X, Qi G, et al (2018) Roles and Mechanisms of Human Cathelicidin LL-37 in Cancer. *Cell Physiol Biochem* 47:1060–1073. <https://doi.org/10.1159/000490183>
- Chen Y, Liu Z, Pan T, et al (2018) JMJD3 is involved in neutrophil membrane proteinase 3 overexpression during the hyperinflammatory response in early sepsis. *International Immunopharmacology* 59:40–46. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.03.027>
- Chun RF, Liu NQ, Lee T, et al (2015) Vitamin D supplementation and antibacterial immune responses in adolescents and young adults with HIV/AIDS. *J Steroid Biochem Mol Biol* 148:290–297. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.07.013>
- Crane-Godreau MA, Clem KJ, Payne P, Fiering S (2020) Vitamin D Deficiency and Air Pollution Exacerbate COVID-19 Through Suppression of Antiviral Peptide LL37. *Front Public Health* 8:. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.00232>
- Dixon BM, Barker T, McKinnon T, et al (2012) Positive correlation between circulating cathelicidin antimicrobial peptide (hCAP18/LL-37) and 25-hydroxyvitamin D levels in healthy adults. *BMC Res Notes* 5:575. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-575>
- Goncalves-Mendes N, Talvas J, Dualé C, et al (2019) Impact of Vitamin D Supplementation on Influenza Vaccine Response and Immune Functions in Deficient Elderly Persons: A Randomized Placebo-Controlled Trial. *Front Immunol* 10:65. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00065>
- Grant WB, Lahore H, McDonnell SL, et al (2020) Evidence that Vitamin D Supplementation Could Reduce Risk of Influenza and COVID-19 Infections and Deaths. *Nutrients* 12:. <https://doi.org/10.3390/nu12040988>
- Kanda N, Hau CS, Tada Y, et al (2012) Decreased serum LL-37 and vitamin D3 levels in atopic dermatitis: relationship between IL-31 and oncostatin M. *Allergy* 67:804–812. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2012.02824.x>
- Kreutz M, Andreesen R, Krause SW, et al (1993) 1,25-dihydroxyvitamin D3 production and vitamin D3 receptor expression are developmentally regulated during differentiation of human monocytes into macrophages. *Blood* 82:1300–1307
- Larsen MT, Häger M, Glenthøj A, et al (2014) miRNA-130a regulates C/EBP-ε expression during granulopoiesis. *Blood* 123:1079–1089. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-08-523233>
- Li G, Domenico J, Jia Y, et al (2009) NF-kappaB-dependent induction of cathelicidin-related antimicrobial peptide in murine mast cells by lipopolysaccharide. *Int Arch Allergy Immunol* 150:122–132. <https://doi.org/10.1159/000218115>
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

Publication n°2

Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D and 25-hydroxyvitamin on murine mammary tumor EO771 and macrophagic IC-21 lines : In vitro study

Sahar Al Dekwer, Augustin Le Naour, Stéphanie Rougé, Adrien Rossary, Mona Diab- Assaf,
Marie-Paule Vasson, Jeremie Talvas

Article en cours de rédaction

Effets in vitro de la 1,25-dihydroxyvitamine D et de la 25-hydroxyvitamine sur les lignées murines tumorales mammaires EO771 et macrophagiques IC-21

Introduction

La vitamine D (VitD) est une hormone stéroïde dont les sources d'apport chez l'homme sont i) la synthèse cutanée après exposition aux rayons UVB, en métabolisant le 7-déhydrocholestérol en VitD et ii) l'apport alimentaire sous forme de cholécalciférol (VitD3) et ergocalciférol (VitD2). Ces deux formes de VitD subissent une première hydroxylation pour générer la 25 hydroxyVitD (25D), qui est convertie en 1,25 dihydroxyVitD (1,25D) par une deuxième hydroxylation catalysée par Cyp27b1 (1 α -hydroxylase). La 25D et la 1,25D sont métabolisées par la Cyp24a1 (24-hydroxylase) en 24,25 dihydroxyVitD, un métabolite biologiquement inactif et éliminé dans les urines. Dans les cellules tumorales mammaires, l'interaction entre la 1,25D et son récepteur VDR induit des effets antiprolifératifs et pro-apoptotiques. De plus, la VitD jouerait un rôle important dans la modulation de la réponse immunitaire et la surveillance anti-tumorale en stimulant la sécrétion de la cathélicidine humaine, un peptide antimicrobien. Certaines études ont montré pour la cathélicidine des effets cytotoxiques, antiprolifératifs et pro-apoptotiques, tandis que d'autres ont rapporté des effets protumoraux, proangiogéniques et prométastatiques dans différents types de cancers humains, dont le cancer de sein.

Objectifs

i) Détecter la présence du VDR et des acteurs du métabolisme de la VitD dans les cellules tumorales mammaires EO771 et les macrophages murins IC-21 et étudier l'effet de la 25D et de la 1,25D sur leurs expressions génique et protéique. ii) Evaluer l'effet de la 25D et de la 1,25D sur la viabilité des EO771 et sur la polarisation M1/M2 des macrophages IC-21. iii) Etudier l'effet de la 25D et de la 1,25D sur l'expression génique et protéique de la cathélicidine par les EO771 et les IC-21 et déterminer si la cathélicidine a un effet cytotoxique sur les cellules EO771. iv) Etudier l'effet de la 25D et de la 1,25D sur le dialogue entre les EO771 et les IC-21 en co-culture.

Matériel et méthodes

Des monocultures des EO771 et des IC-21 ont été traités ou non avec différentes doses, infra-physiologique, physiologiques et supra-physiologiques, de 1,25D et de 25D. Après 24h et 48h les expressions génique et protéique, respectivement, du Vdr, Cyp27b1, Cyp24a1 et de Cramp ont été évaluées par qPCR et Western blot. La viabilité, l'apoptose et le cycle cellulaire des EO771 ont été caractérisées après 24h et 48h d'incubation. La viabilité des IC-21 a été testée après 24h, 48h et 72h, et leur polarisation M1/M2 après 48h d'incubation. Les EO771 cultivées en sphéroïdes sont mises ou non en co-culture avec les IC-21 en présence ou en absence de la 1,25D ou de la 25D. La viabilité des EO771 et la polarisation des IC-21 sont ainsi évaluées après 24h, 48h et 72h.

Résultats

Les EO771 et les IC-21 expriment à l'état basal les ARNm et les protéines de Vdr, Cyp27b1, Cyp24a1 et Cramp. La 25D n'a pas influencé l'expression génique de Vdr dans les deux lignées, mais elle a stimulé son expression protéique chez IC-21 ($p=0.0002$).

Dans la lignée EO771, l'expression génique de *Vdr* est atténuée par la dose supra-physiologique de 1,25D chez les EO771 ($p=0.05$) et les IC-21, alors que son expression protéique est augmentée de façon dose-dépendante. La 1,25D n'a pas influencé l'expression génique et protéique de Cyp24a1 et Cyp27b1. La 25D a stimulé l'expression génique de *Cyp27b1* d'une manière dose-dépendante ($p=0,0007$) et protéique avec la dose physiologique ($p=0,02$). La 25D a stimulé l'expression génique de *Cyp24a1* d'une manière dose-dépendante ($p=0,0002$), et l'expression protéique avec la dose supra-physiologique ($p=0,01$). La 1,25D et la 25D n'ont pas modifié l'expression génique de Cramp. L'expression protéique de Cramp a été stimulée par la dose physiologique ($p=0,004$) et supra-physiologique ($p=0,0008$) de 25D alors qu'aucune modification n'a été observée avec la 1,25D.

Dans la lignée IC-21, l'expression génique et protéique de Cyp27b1 n'a pas été influencée par 1,25D et 25D. La dose supra-physiologique de 1,25D a stimulé l'expression génique de *Cyp24a1* ($p=0,05$), alors que la 25D ne l'a pas influencée. Au contraire, l'expression protéique de Cyp24a1 n'a pas été affectée par la 1,25D mais stimulée par la dose supra-physiologique de 25D ($p=0,01$). La 1,25D a réprimée l'expression génique de *Cramp* à la dose supra-physiologique ($p=0,04$). L'expression protéique de Cramp a été augmentée par les doses physiologiques de 1,25D ($p=0,01$) et de 25D ($p=0,04$).

La 1,25D a réduit la viabilité des EO771 après 24h et 48h à la dose supra-physiologique ($p<0,05$) et aux doses physiologiques, en induisant l'apoptose ($p<0,05$) et la nécrose, ($p<0,005$). La 25D n'a pas eu d'effet sur la viabilité des EO771. La VitD n'a pas eu d'effet sur la viabilité des EO771 dans les co-cultures des EO771 et IC-21. La mise en culture des EO771 avec les IC21 semble orienter les IC21 vers le phénotype M2

Conclusion

Les EO771 et les IC-21 expriment le récepteur VDR et disposent des enzymes nécessaires au métabolisme de la VitD. Dans nos conditions expérimentales, les effets induits par la 1,25D et la 25D sont différents : la 1,25D, forme active de la VitD, a des propriétés antiprolifératives et pro-apoptotiques sur la lignée d'adénocarcinome mammaire murine EO771, ce qui est à relier avec la surexpression protéique de Vdr. Les EO771 favorisent un environnement immunosuppresseur en polarisant les macrophages en type M2 anti-inflammatoire. La VitD favorise l'immunité innée en stimulant *in vitro* la sécrétion de la cathélicidine murine par des voies non génomiques qui restent à définir.

Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D and 25-hydroxyvitamin on murine mammary tumor

EO771 and macrophagic IC-21 lines : *In vitro* study

Sahar Al Dekwer¹, Augustin Le Naour¹, Stéphanie Rougé¹, Adrien Rossary¹, Mona Diab-Assaf², Marie-Paule Vasson^{1,3}, Jérémie Talvas¹

¹University of Clermont Auvergne, INRA, UMR 1019 Human Nutrition Unit, CRNH Auvergne F-63000 Clermont-Ferrand, France.

²Lebanese University, Faculty of Sciences II, Fanar, Lebanon

³CHU, Centre Jean Perrin, Nutrition Unit, F-63000 Clermont-Ferrand, France.

1. Introduction

The vitamin D (VitD) is a steroid hormone, which can be obtained from nutritional origin, or it can be produced in skin exposed to UVB radiation by metabolizing the 7-dehydrocholesterol to VitD. The VitD joins the liver through the bloodstream and undergoes the first hydroxylation to generate the 25(OH)D (25D), circulating metabolite present in the ng/ml (nmol/l) range and correlates with VitD status. The 25D is converted to 1,25(OH)₂D (1,25D) by a second hydroxylation accomplished by Cyp27b1 (1 α -hydroxylase), a mitochondrial cytochrome present in renal proximal tubules (1) and recently identified in skin, colon, breast and immune cells (2). The 25D and 1,25D are metabolized by Cyp24a1 (24-hydroxylase) to 24, 25-dihydroxyVitD, a biologically inactive metabolite that is finally converted to calcitric acid and excreted (1).

The 1,25D, the bioactive form of VitD, interacts with its receptor (VitD receptor, human VDR; murine Vdr) to mediate its classic function in calcium and bone metabolism, and to regulate cellular growth and differentiation, immunity and cardiovascular function (1). In mammary tumour, the interaction between 1,25D and VDR induces, by genomic and non-genomic pathways, cell cycle arrest, differentiation, arrest of cells in G0/G1, apoptosis, autophagy, and inhibition of invasion, metastasis and angiogenesis (3,4). Furthermore, the VitD plays a crucial role in immune, adaptive and innate, modulation (5). It activates antitumour activity of tumour associated macrophages (TAM) that induce apoptosis of cancer cells by turn attack (6) or by upregulation of human antimicrobial peptides expression like cathelicidin (7,8). Recent *in vitro* study demonstrated that normal and human tumour breast cells express also the cathelicidin, which is stimulated by 1,25D (9). Human cathelicidin LL-37 is coded by *Camp*, its homologous gene in mice codes for the peptide cathelicidin-related AMP (*Cramp*), which show several close structural and functional similarities, including an α -helical structure, antimicrobial function and analogous tissue distribution (10). Cathelicidin possess

a wide range of pleiotropic properties including antimicrobial activities against bacteria, viruses, fungi and parasites. Some studies have shown cytotoxic, antiproliferative and pro-apoptotic effects, whereas others reported growth-promoting, proangiogenic, prometastatic and invasive-inductive effects of CAMP in different malignant type cells (11). LL-37 is overexpressed in human breast cancer cells and is considered to be a growth factor for epithelial cells (12). The role of cathelicidin in regulation of tumour cell growth is still unclear and under debate.

In this study, we investigate the antitumour and the immunomodulatory effects of VitD metabolites, 1,25D and 25D, on two syngenic cell lines derivatives from C57BL/6 mice: EO771 mammary cancer cells and IC-21 macrophages. The EO771 is spontaneous mammary adenocarcinoma cell line of luminal B type, express the estrogen receptor- α and the epidermal growth factor receptor (ER α -, ER β +, ErbB2+) and responds to anti-estrogen treatments like tamoxifen (13). The SV40 transformed murine macrophage cells IC-21 bound murine tumour cells with high avidity (14), exhibit high phagocytic ability and behave like M2 macrophages by secreting a pannel of cytokines such as tumour-necrosis α (TNF α), interleukin I (IL-1), prostaglandins (PGE2), nitric oxide (NO), vascular endothelial growth factor (VEGF) and transforming growth factor (TGF β) (15). A co-culture of these two cell lines, in three-dimensional spheroids culture model allowed us to better understand the cross talk between them as well as to characterise the effect of VitD metabolites on such cross talk. Indeed, 3D cell culture methods confer a high degree of biological and clinical relevance to *in vitro* models. Cells in spheroids exhibit the physiological gradients of the hypoxic tumour microenvironment and make excellent tools for probing cell–cell (co-culture) and cell–matrix interactions as well as for tissue-based mechanistic assays and they can simulate avascular tumour as comprising proliferative and necrotic cells because of their 3D organization (16).

The objectives of this study: i) Characterisation of Vdr, enzymatic equipment of VitD (Cyp27b1 and Cyp24a1) and cathelicidin in EO771 and IC-21 cells, and comparison of 1,25D and 25D effects on their gene and protein expression. ii) Comparison of 1,25D and 25D effects on EO771 cells viability and on M1/M2 polarisation of IC-21 macrophages in mono and co-culture.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture

Mouse mammary adenocarcinoma cell line EO771 (CH3 BioSystems), EO771-GFP (kindly given by Mr. Jackey Goetz) and SV4O transformed mouse peritoneal macrophage IC-21 (ATCC® TIB-186™) were grown in RPMI-1640 supplemented with fetal calf serum (10%), L-Glutamine (1%) and penicillin / streptomycin (1%) at 37°C in humid atmosphere and 5% CO₂.

2.2. Reagents

25-Hydroxyvitamin D3 (25D) solution (ref: 739650, 100µg/ml) and 1α,25-Dihydroxyvitamin D3 (1,25D, ref : D1530, 100µg/ml) were purchased from Sigma-Aldrich.

2.3. Treatment of EO771 and IC-21 cells

Incubation time and cell number were optimized prior to start experiments in order to determine optimal cell seeding density. EO771 and IC-21 cells were plated at a density of 5×10^5 cells in 25cm² flasks in a complete RPMI medium, and were allowed to adhere in an incubator. After 24 h, they were treated or not by different concentrations infraphysiological, physiological and supraphysiological of 25D (25, 75 and 125 ng/ml) and of 1,25D (50, 150 and 300 pg/ml). EO771 cells were harvested, after 24 and 48h of treatments for apoptosis and cell cycle exploration. IC21 were harvested after 48h for evaluation of M1or M2 polarisation. RNA were extracted after 12h and 24h for IC-21 cells and after 24h for EO771 cells. Proteins were extracted after 48h of treatments.

2.4. Cell viability assay

Viability was assessed using two methods, resazurin assay and Trypan Blue (TB) stain.

- Resazurin assay: EO771 and IC-21 cells were plated at a density of 2×10^3 cells in 96-well plates in a complete medium, and were allowed to adhere in an incubator. 24h later, cells were treated or not by the aforementioned concentrations of 1,25D and 25D. After 24, 48 and 72h, cells were washed with PBS and 100 µl of solution resazurin (25 µg/ml) in PBS were added to each well. The plates were incubated for 2 h at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Fluorescence intensity was then measured on an automated 96-well plate reader (Fluoroskan Ascent FL, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) using an excitation wavelength of 530 nm and an emission wavelength of 590 nm. Under these conditions, fluorescence is proportional to the metabolic activity of cells in the well.
- Trypan Blue staining: EO771 cells were plated at a density of $2,5 \times 10^5$ in 6-well plates in a complete medium, and were allowed to adhere in an incubator. 24h later, cells were treated or not by 1,25D and 25D. After 24 and 48h, EO771 cells were trypsinized, treated with TB (Sigma T-8154; 0,4%) and counted using a Malassez cell counter under light microscopy. TB is a vital stain that colors only dead cells. Living cells have a white color under light microscopy while dead cells exhibit a blue color.

2.5. Cell cycle analysis

In order to synchronise the cell cycle, EO771 cells were treated, at 60-70% of confluence, with 2 mM of thymidine (Sigma-Aldrich, Lyon, France) added to the culture media for 20 hours. Fresh complete media was added for 6 hours after washing twice by PBS. The last blockade was obtained by adding 2 mM of thymidine for 14 hours as previously described (MG 2020).

EO771 cells were harvested, washed with PBS and fixed with 1ml of 80% ethanol in PBS at 4°C during 2 hours. After fixation, cells were pelleted, washed twice in PBS, resuspended in 1 ml of cold PBS containing 10 µl RNase A (10 mg/ml; Thermo Scientific, Waltham, MA) and 10 µl of propidium iodide (PI, 250 µg/ml; Sigma-Aldrich, Lyon, France) then incubated in the dark for 30 min at 4°C before adding 400 µl of PBS. The distribution of the cell cycle was determined by use of flow cytometer (LSRII, BD Biosciences, San Jose, CA).

2.6. Apoptosis analysis

EO771 cells were harvested, washed with PBS, loaded with 5 µl of Annexin-V FITC and 10 µl of PI (10µg/ml) in 100 µl of PBS and placed in the dark at 4°C for 15 min before adding 400 µl of PBS. The quantification of the apoptotic rate was done by flow cytometry.

2.7. IC-21 polarisation analysis

IC-21 macrophages were harvested, washed with PBS and labelled with monoclonal antibodies conjugated to fluorochromes (F4/80+ CD11b- as macrophage marker, CD86-PE+ as M1 marker and CD206+ as M2 marker) according to the supplier's recommendations. The compensations and controls were carried out using the Fluorescence Minus One (FMO) procedure with the isotypes of corresponding antibodies. Data were analysed by Kaluza 1.2 software (Beckman-Coulter, Hialeah, FL, USA).

2.8. RNA extractions

Total RNA from EO771 and IC-21 cells was extracted by TRIzol® reagent (Invitrogen, Saint Aubin, France) according to the manufacturer's instructions, and quantified using a NanoDrop spectrophotometer (NanoDrop®2000, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Reverse transcription was carried out in a thermocycler (Mastercycler® gradient; Eppendorf, Montesson, France) on 1 µg of total RNA for each condition using a high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Saint Aubin, France) with random hexamer pdN6 primers.

2.9. Quantitative real-time PCR (q-PCR)

q-PCR was carried out using SYBR®Green reagents according to the manufacturer's protocol on a StepOne system (Applied Biosystems). Each condition was assayed in triplicate. Relative quantification was obtained by the comparative Ct method, based on the formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. *Cramp*, *Vdr*, *Cyp27b1*, *Cyp24a1* genes expression were analysed. Expression levels were normalized to the housekeeping gene (*Rpl19*) for each time point. Sequences and fragment sizes of the murine-specific primers used are reported in Table 1.

Table 1 : Murine primers sequences

Gene	Species	Forward primer	Reverse primer
<i>Vdr</i>	mouse	TTGGAACCCTGGTCTCATTC	CCCTCTATTGGTGCTTCCAG
<i>Cyp24a1</i>	mouse	CCCTTCTGCAAGAAAACCTGC	CTCTTGAGGGCTCTGATTGG
<i>Cyp27b1</i>	mouse	GGCTGCATCTCTACCTGACC	CAGCTGGAAGTGGTAGCTCA
<i>Cramp</i>	mouse	CTTCAACCAGCAGTCCCTAGACA	TCCAGGTCCAGGAGACGGTA
<i>Rpl19</i>	mouse	GGTCAGCCAGGAGCTTCTTG	GCGGATTCTCATGGAACACA

2.10. Western blot analysis

Protein extractions were executed by RIPA buffer (ThermoFisher Scientific) supplemented by protease (Thermo Scientific Halt Protease Inhibitor Cocktail) and phosphatase (Halt Phosphatase Inhibitor Cocktail) inhibitors. 30 µg of extracted proteins were separated by SDS-PAGE and revealed by antibodies directed against GAPDH (1: 2000, Cell Signaling Technology #5174), VDR (1:2000, Abcam # ab109234), CYP27B1 (1:2000, Abcam # ab206655), CYP24A1(1:2000, Abcam # ab175976), cathelicidin (1:2000, Abcam # ab93357) and the use of HRP Goat Anti-Rabbit (IgG) secondary antibody (1:5000, Abcam #ab6721).

2.11. 3D cell mono and co-culture

EO771 and EO771-GFP were seeded with the density of 5×10^5 in 6-well plates precoated with agarose solution (1%) in order to inhibit the cell adhesion. After 72h, when the cells were arranged in spheroids, they co-cultured or not with IC-21 cells in a ratio 5:1 (EO: IC-21) for 24, 48 and 72h with or without 25D (75, 125 ng/ml) or 1,25D (150, 300 pg/ml).

2.12. Assay of EO771, EO771-GFP viability and IC-21 polarisation after separation by flow cytometry

After 24, 48 and 72h of mono and co-culture, spheroids were dissociated by careful and gentle pipetting. Cells were washed by PBS. EO771 cells of monoculture were labelled by PI while EO771-GFP cells were labelled by Viability 405/520 fixable dye (MACS, France) for viability assay by flow cytometry. Co-culture samples were divided into two parts, one part directed for the evaluation of tumour cells viability while the other was labelled for polarisation assessment by flow cytometry.

2.13. Statistics

For viability, apoptosis and cell-cycle tests the results were analysed by two-ways analysis of variance ANOVA followed by Tukey test. For the other experiments, the comparison between groups was evaluated by one-way analysis of variance ANOVA followed by Tukey test. P-values <0.05 indicate a significant difference. Statistical analyses were performed Prism 8.0.2 software for Windows (GraphPad Software Inc., San Diego, California, United States).

3. Results

3.1 Mammary adenocarcinoma cell line

3.1.1. Effect of 1,25D and 25D on gene and protein expression of the VitD metabolic equipment and Cramp in EO771 cells

Our results revealed that EO771 express *Vdr*, *Cyp27b1*, *Cyp24a1* and *Cramp* mRNA and proteins (Fig. 1). *Vdr* gene expression (Fig. 1A) was repressed 0.5 fold by the dose 300 pg/ml of 1,25D ($p=0.05$) while the protein (Fig. 1B) was overexpressed 2.57 fold with the dose 50, 4.07 fold with the dose 150 and 3.77 fold with the dose 300 pg/ml compared to the ctrl ($p=0.0002$). 25D did not influence the gene and protein expression of *Vdr* (Fig. 1A,B).

The 1,25D did not significantly influence either the gene or the protein expression of *Cyp27b1* (Fig. 1C,D) and *Cyp24a1* (Fig. 1E,F). The 25D stimulated *Cyp27b1* gene expression (Fig. 1C) in a dose-dependent manner up to 1.4 fold with the dose 25 ng/ml, 3.5 fold with the dose 75 ng/ml and 4.6 fold with the dose 125 ng/ml compared to the ctrl ($p=0.0007$). The *Cyp27b1* protein (Fig. 1D) was overexpressed with the dose 75 ng/ml of 25D ($p=0.02$).

Cyp24a1 gene expression (Fig. 1E) was upregulated by 25D in a dose-dependent manner up to 1.6 fold with the dose 25 ng/ml, 3.1 fold with the dose 75 ng/ml and 5.5 fold with the dose 125 ng/ml compared to the ctrl ($p=0.0002$). The 25D upregulated *Cyp24a1* protein expression (Fig. 1F) 2 fold with the dose 125 ng/ml compared to the ctrl ($p=0.01$).

The 1,25D and 25D did not significantly affect the mRNA expression of *Cramp* (Fig. 1G). *Cramp* protein expression was not affected by the treatment with 1,25D, but upregulated by the dose 75ng/ml (2.3 fold, $p=0.004$) and 125 ng/ml (2.6 fold, $p=0.0008$) of 25D compared to the ctrl (Fig. 1H).

■ 1, 25 (OH)₂D (pg/ml)

□ 25 OH D (ng/ml)

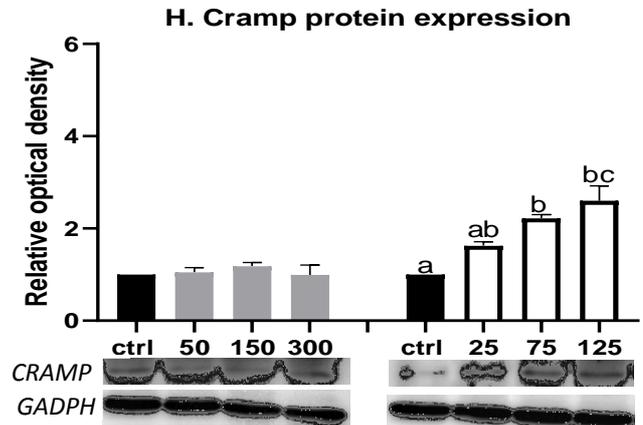
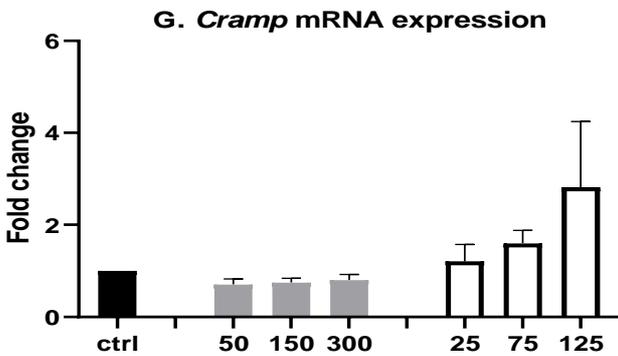
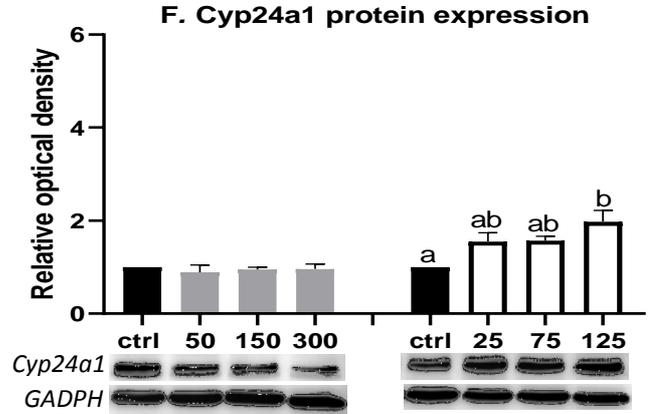
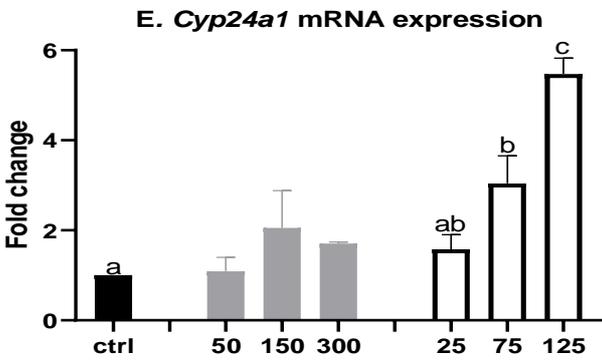
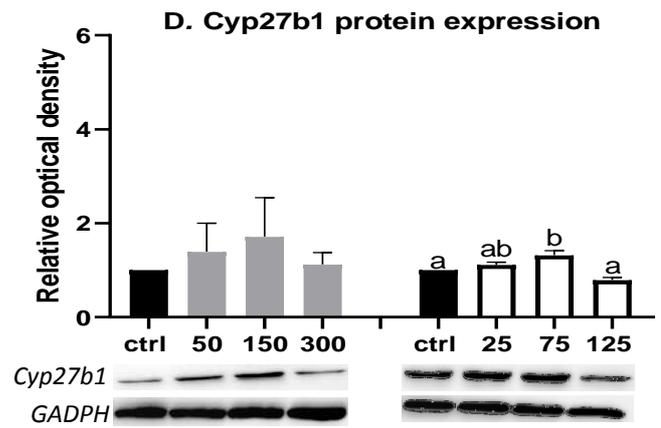
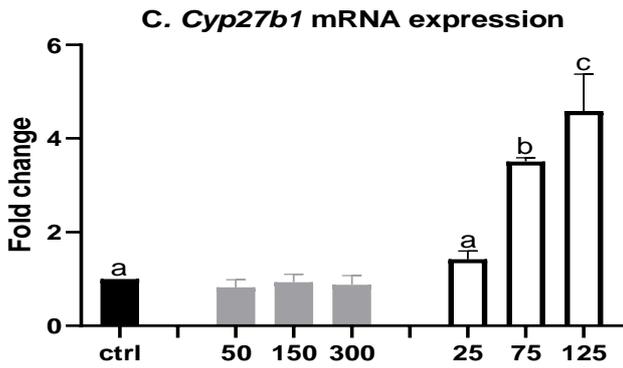
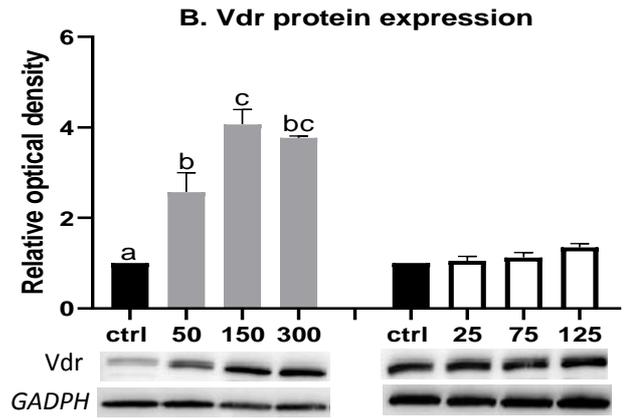
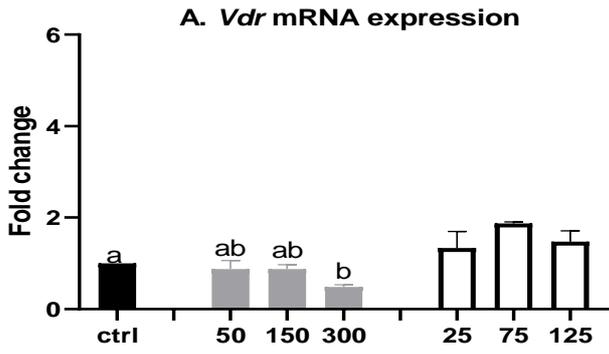


Fig.1. Effect of 1,25D and 25D treatment on *Vdr*, *Cyp27b1*, *Cyp24a1* and *Cramp* mRNA (A,C,E,G) and protein (B,D,F,H) expression in EO771 cells. Mean values of three different experiments are reported. Statistical differences were tested using one-way ANOVA followed by Tukey test. a,b: $p < 0.05$, b,c: $p < 0.005$; a,c: $p < 0.0005$

3.1.2. 1,25D, but not 25D, reduced EO771 cells viability

The density of the cells in ctrl condition, which was 2.5×10^5 at 0h, was significantly increased after 24h ($p = 0.02$) and 48h ($6.32 \pm 0.8 \times 10^5$ cells; $p = 0.02$) (Fig. 2A, B). The 1,25D significantly reduced EO771 cells proliferation with the dose 300 pg/ml (1.09 ± 0.2) $p < 0.05$ after 24h, 150 pg/ml ($2.95 \pm 0.1 \times 10^5$ cells, $p < 0.05$) and 300 pg/ml ($1.8 \pm 0.13 \times 10^5$ cells, $p < 0.005$) after 48 h compared to ctrl (Fig. 2A). Treatment with 25D had no effect on the proliferation of EO771 cells compared to ctrl at 24 and 48h (Fig. 2B).

The metabolic activity of EO771 cells was not influenced by 25D or 1,25D compared to ctrl, even if incubation time was prolonged during 72h (Fig. 2C, D).

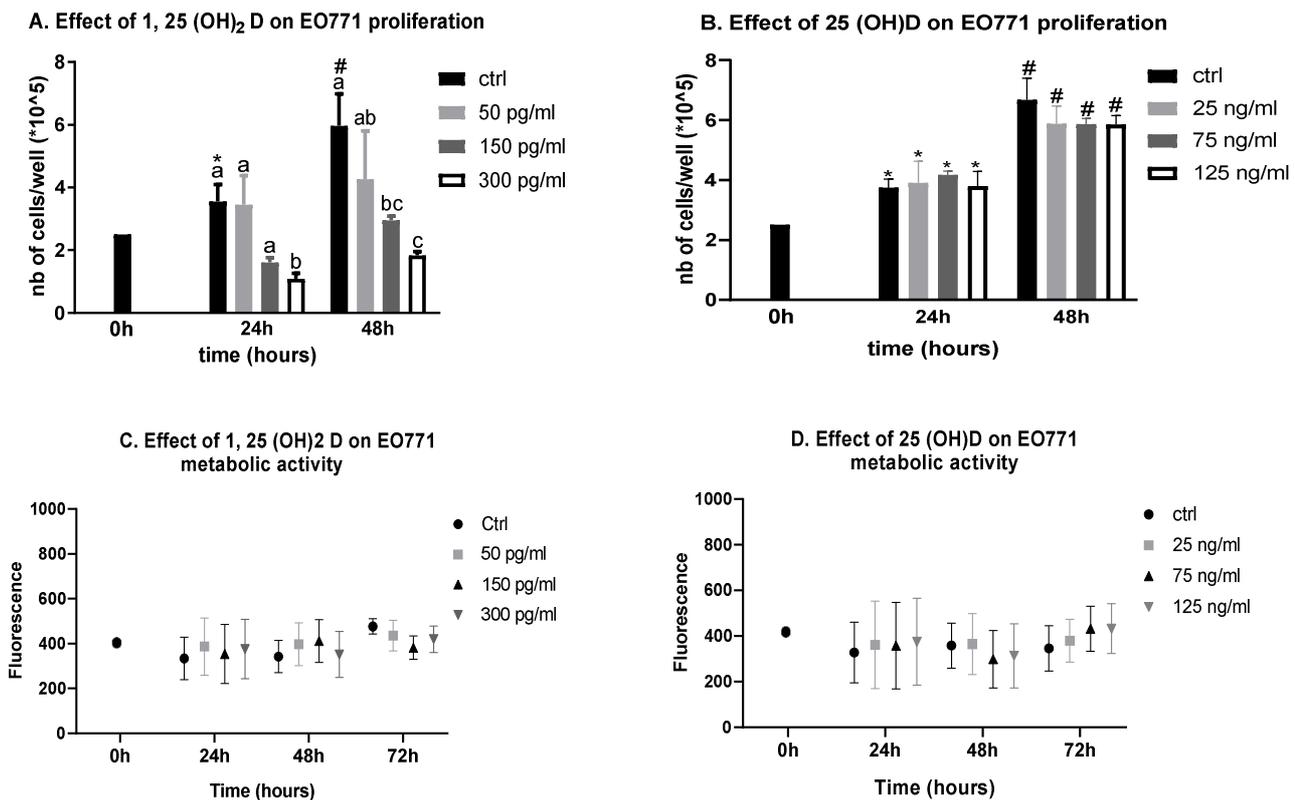


Fig. 2. Effect of 1,25D and 25D on the viability of EO771 cells.

The cells were grown under standard conditions and treated with graded concentrations of 1,25D (A, C) and 25D (B, D). Cells proliferation was measured by Trypan blue after 24h and 48h of treatment (A,B) and the metabolic activity was evaluated by resazurin after 24h, 48h and 72h (C, D) compared to the group control. Mean values of three different experiments are reported. The comparison between groups was carried out by two-ways ANOVA (treatment \times time) followed by Tukey test. A, B: *: $p = 0.02$, 0h vs 24h; #: $p < 0.01$, 0h vs 48h; a,b: $p < 0.05$; a,c: $p < 0.001$.

3.1.3. 1,25D, but not 25D, induced apoptosis and necrosis of EO771 cells

After 24h of incubation with 1,25D, the viability rate of EO771 was reduced with the dose 300 pg/ml ($p < 0.05$, Fig. 3A). After 48h, the 1,25D induced apoptosis (Fig. 3C) with the dose 150 pg/ml where $19.95 \pm 3.66\%$ of cells were in late apoptosis while in ctrl the rate was $3.76 \pm 1.25\%$ of cells were at this phase ($p < 0.01$). The dose 300 pg/ml induced necrosis with $25.6 \pm 0.57\%$ vs ctrl $11.1 \pm 2.05\%$ of necrotic cells ($p < 0.01$). The viability rate, at 48h, was reduced by 150 ($p < 0.001$) and 300 pg/ml ($p < 0.0001$) of 1,25D (Fig. 3C). No effect was detected of 25D on apoptosis rate of EO771 after 24 (Fig. 3B) and 48h (Fig. 3D).

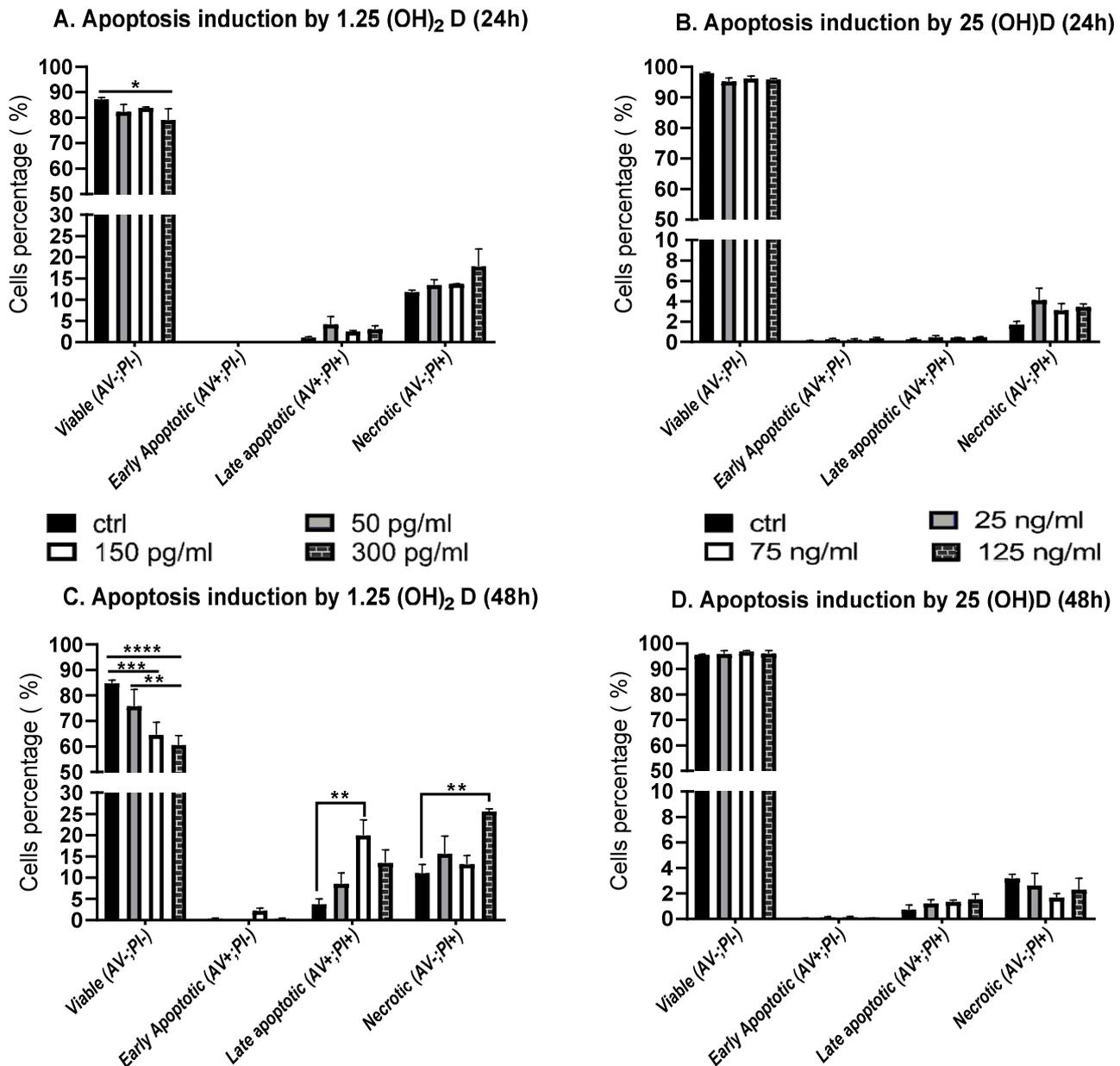


Fig. 3. Effect of VitD on apoptosis rate in EO771 cells. The cells were treated with 1,25D (A,C) and 25D (B,D). After 24h (A, B) and 48h (C, D), cells were stained with annexin V-FITC (AV) and propidium iodide (PI) analysed by FACS. Mean values of three different experiments are reported. Statistical differences were tested using one-way ANOVA followed by Tukey test. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; ****: $p < 0.0001$

3.1.4. No effect detected on cell cycle

The Fig. 4 shows that the majority of EO771 cells were in G0/G1 phase whether after 24 or 48h of incubation. The 1,25D and 25D had no significant effect on cell cycle distribution at any time of incubation.

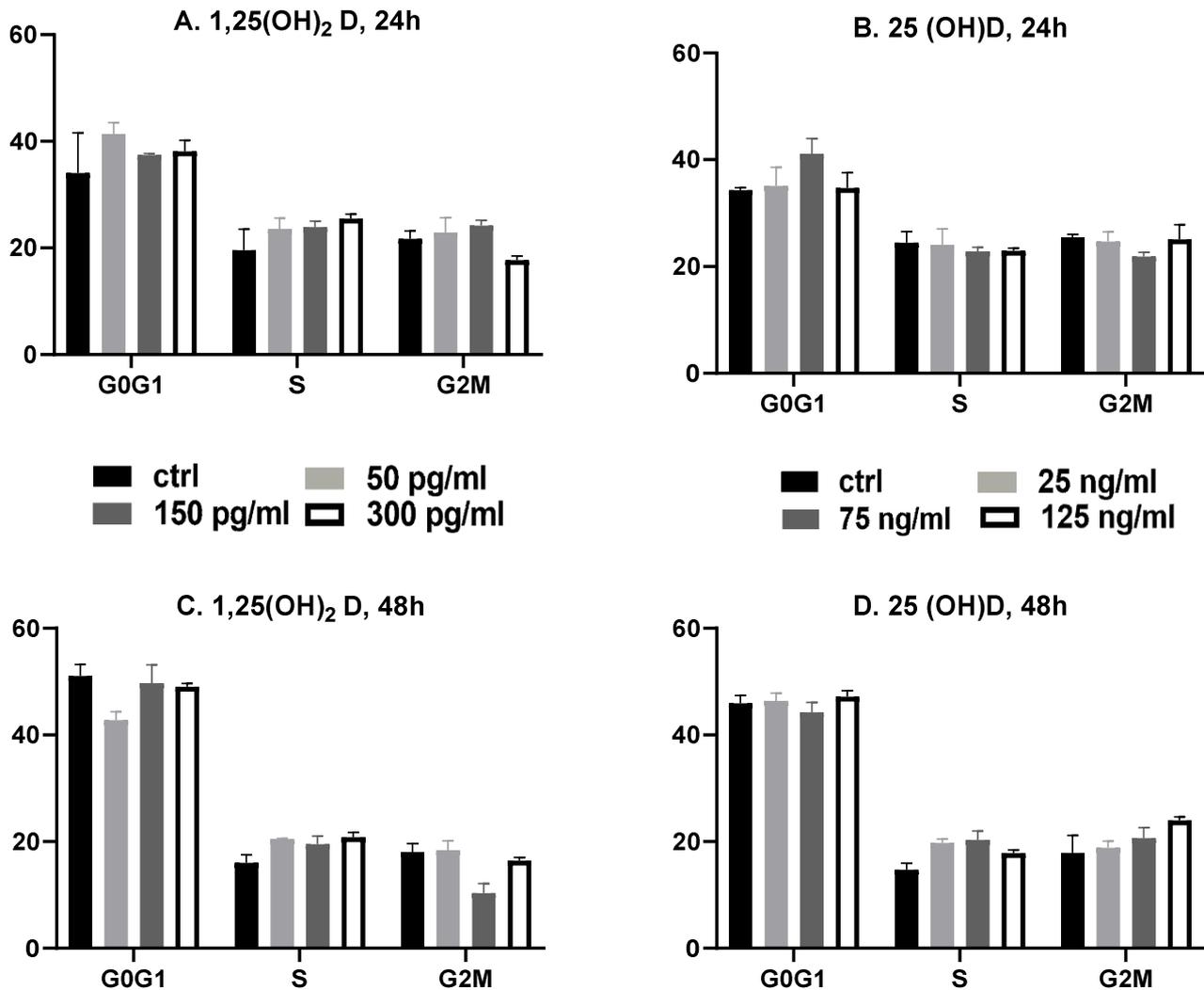


Fig. 4. Effect of 1,25D and 25D on the distribution of EO771 through the cell cycle. Mean values of three different experiments are reported. The comparison between groups was carried out by one-way ANOVA

3.2. Murine peritoneal macrophages

3.2.1. Effect of 1,25D and 25D on gene and protein expression of the VitD metabolic equipment and *Cramp* in IC-21 cells

Our results revealed that IC-21 cells express basally the *Vdr*, *Cyp27b1*, *Cyp24a1* and *Cramp* mRNA and proteins (Fig. 5). *Vdr* gene expression was repressed after 12h (0.4 fold, $p=0.03$, data not shown) and 24h (0.5 fold, $p=0.005$) of incubation with the dose 300 pg/ml of 1,25D while it was not significantly affected by 25D (Fig. 5A). The 1,25D overexpressed the *Vdr* protein (Fig. 5B) in a dose-dependent manner up to 2.2 fold with the dose 50 pg/ml, 3.2 with the dose 150 pg/ml and 4.1 fold with the dose 300 pg/ml compared to the ctrl ($p<0.0001$). 25D stimulated similarly the *Vdr* protein expression (Fig. 5B) by 1.4 fold with the dose 75ng/ml and 1.7 fold with the dose 125 ng/ml ($p=0.0002$).

Cyp27b1 gene expression at 12h (data not shown) and 24h (Fig. 5C), and protein expression (Fig. 5D) were not significantly influenced by either 1,25 or 25D.

The *Cyp24a1* mRNA was overexpressed by the dose 300 pg/ml of 1,25D after 12h (2 fold, $p=0.01$, data not shown) and 24h (15.1 fold, $p=0.05$) of incubation, but not significantly affect by the 25D (Fig. 5E). Inversely, the *Cyp24a1* protein expression (Fig. 5F) was not affected by 1,25D but upregulated by the dose 125 ng/ml of 25D (2 fold, $p=0.01$).

The treatment with 1,25D for 24h repressed *Cramp* gene transcription with the dose 300 pg/ml (0.5 fold, $p=0.04$, Fig. 5G). *Cramp* protein expression was increased by the physiological doses of 1,25D and 25D (150 pg/ml: 2.1 fold, $p=0.01$; 75ng/ml: 3.1 fold, $p=0.04$, Fig. 5H) compared to the ctrl.

■ 1, 25 (OH)₂D (pg/ml)

□ 25 OH D (ng/ml)

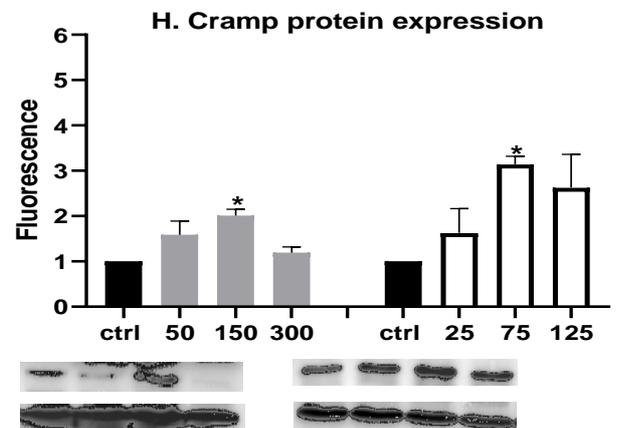
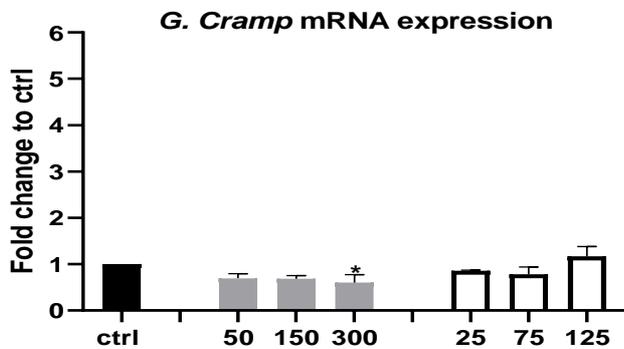
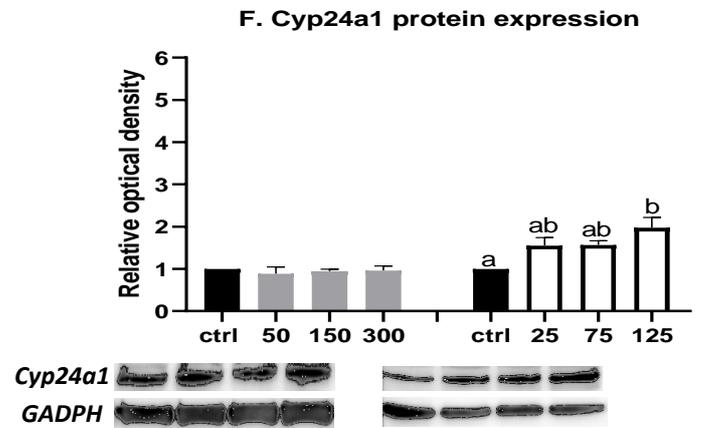
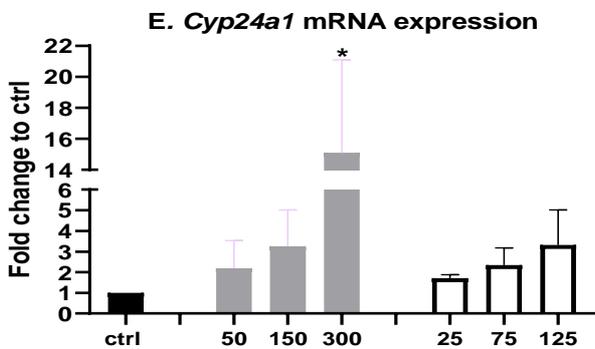
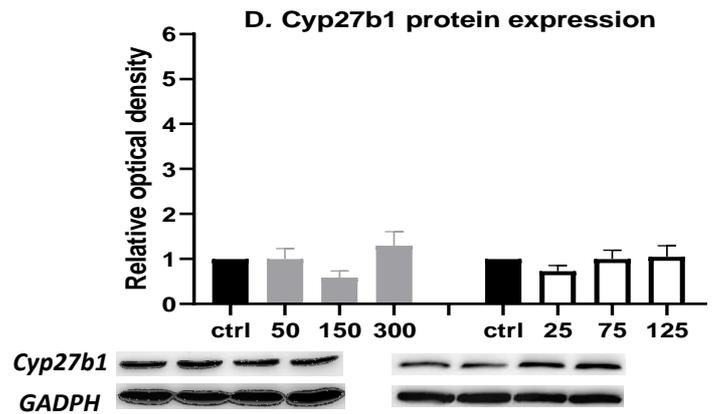
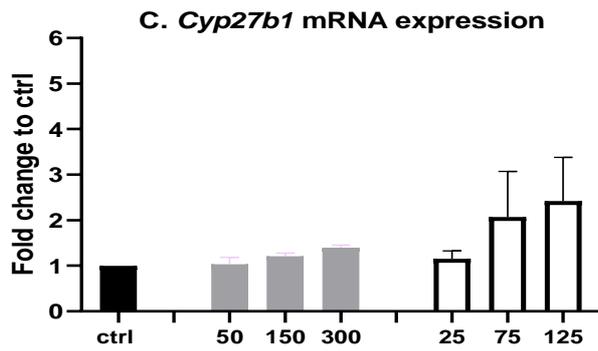
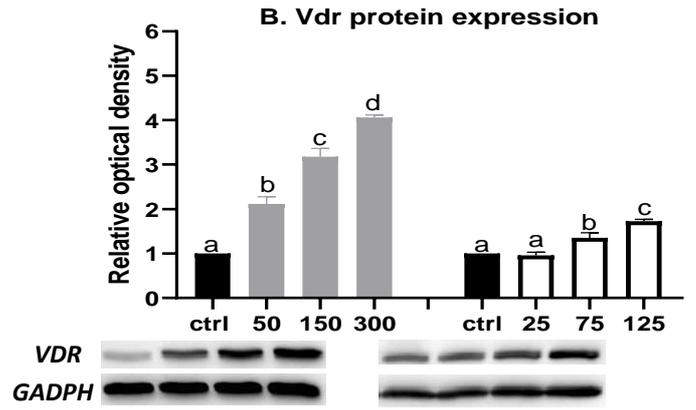
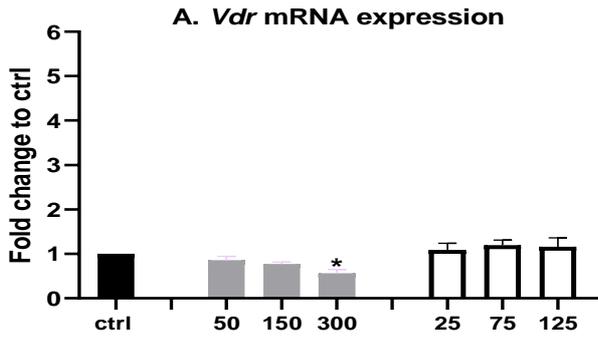


Fig. 5. Effect of 1,25D and 25D treatment on *Vdr*, *Cyp27b1*, *Cyp24a1* and *Cramp* mRNA (A,C,E,G) and protein (B,D, F,H) expression in IC-21 cells. Mean values of three different experiments are reported. Statistical differences were tested using one-way ANOVA followed by Tukey test. *: $p < 0.05$ compared to ctrl; #: $p < 0.005$; a,b: $p < 0.05$, b,c: $p < 0.005$; a,c: $p < 0.0005$; a,d: $p < 0.0001$

3.2.2. No effect detected of 1,25D and 25D on IC-21 viability and polarization

The metabolic activity of IC-21 cells was duplicated after 24h independently of treatment, this activity did not change after 48 and 72h under all conditions (Fig. 6). The evaluation of IC-21 polarization showed that these cells expressed the M2 marker (CD206+) more than the M1 (CD86-PE+). The expression of these markers and the M1/M2 ratio were not affected neither by 1,25D nor by 25D (Table 1).

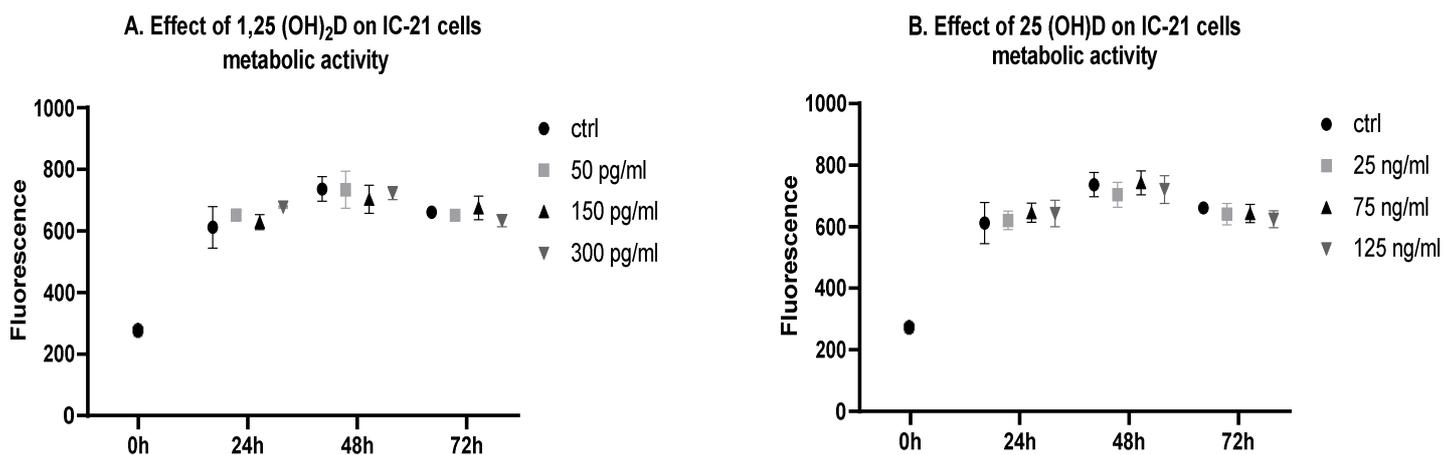


Fig. 6. Effect of 1,25D and 25D on IC-21 cells metabolic activity.

The cells were grown under standard conditions and treated with graded concentrations of 1,25D (A) and 25D (B). The metabolic activity was detected by resazurin after 24h, 48h and 72h and compared to the group control.

Mean values of three different experiments are reported. The comparison between groups was carried out by two-ways ANOVA (treatment x time).

Table 1
Effect of 1,25D and 25D on IC-21 polarisation (M1/M2)

Treatment Phenotype (%)	ctrl	1,25 (OH) ₂ D (pg/ml)				25 (OH)D (ng/ml)			
		50	150	300	<i>p</i> value	25	75	125	<i>p</i> value
M1 (CD86-PE+)	8.2±0.8	6.2±0.8	6.2±0.7	5.8±0.9	0.2	6.0±0.8	8.1±0.9	7.6±0.6	0.2
M2 (CD206+)	18.2±1.6	15.3±1.3	15.3±1.1	12.8±2.6	0.2	15.4±1.2	19.2±1.1	18.4±2.1	0.4
Ratio M1/M2	0.5±0.1	0.4±0.1	0.4±0.1	0.5±0.1	0.5	0.4±0.1	0.4±0.1	0.4±0.1	0.5

IC-21 mono-culture cells treated with graded concentrations of 1,25D and 25D. The polarisation was evaluated by flow cytometry after 48h and compared to the group control. Mean values of three different experiments are reported. The comparison between groups was carried out by two-ways ANOVA (treatment x time)

3.3 EO771 spheroids - IC-21 co-culture

3.3.1. 1,25D, but not 25D, reduced the viability of EO771 cells spheroids

The incubation of EO771 spheroids monocultures with 1,25D reduced the cellular density of EO771 cells after 24h with the dose 150 (-14%) and 300 pg/ml (-16%), after 48h with 150 (-18%) and 300 pg/ml (-27%) and after 72h only with 300 pg/ml (-16%) compared to the ctrl (Fig. 7A). The treatment with 1,25D had the same antiproliferative effect on EO771egfp cells (data not shown). The 25D had no effect on the cellular density of EO771 (Fig. 7B) and EO771egfp (data not shown) spheroids.

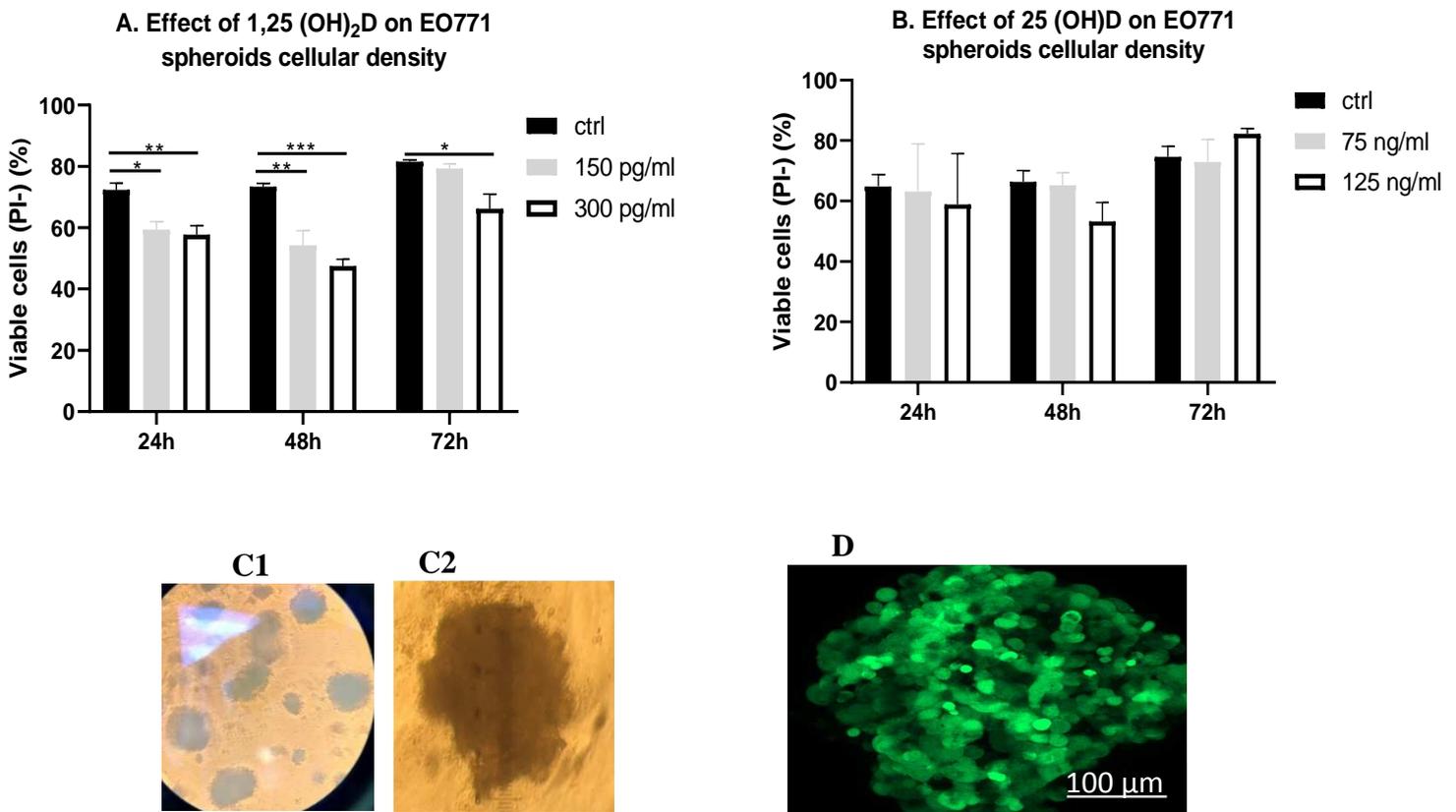


Fig.7. Effect of 1,25D and 25D on EO771 spheroids viability.

A, B : EO771 spheroids mono-culture treated with graded concentrations of 1,25D (A) and 25D (B). The cellular density was detected by flow cytometry after 24h, 48h and 72h of treatment and compared to the group control.

Mean values of three different experiments are reported. The comparison between groups was carried out by two-ways ANOVA (treatment x time) followed by Tukey test. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; *** : $p < 0.005$ compared to ctrl

C : EO771 spheroids observed under inverted microscope after 5 days. C1 : 10x magnification ; C2 : 20x magnification

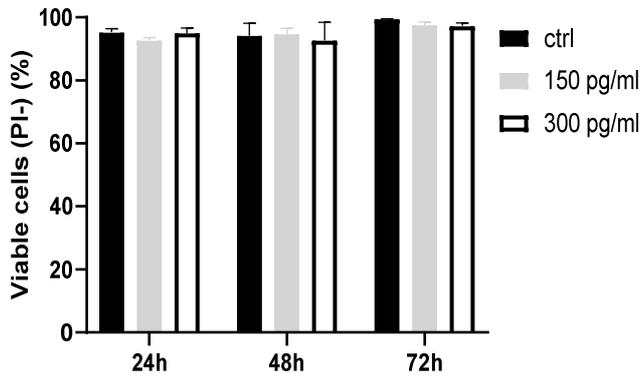
D : EO771egfp observed under confocal microscopy after 5 days

3.3.2. The co-culture abrogated the antiproliferative effect induced by 1,25D on EO771 spheroids and increased the immunosuppressive phenotype of IC-21

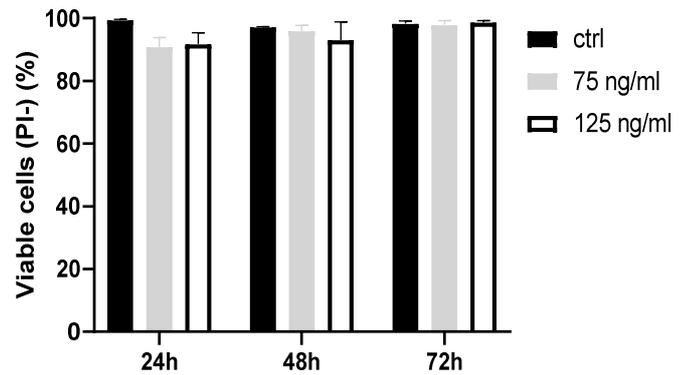
The co-culture of EO771 (Fig. 8A) or EO771-egfp cells (data not shown), with IC-21 cells, with or without treatment with 1,25D or 25D showed no significant effect on the cellular density of EO771 cells compared to the ctrl.

The M2 marker (CD206+) expression by IC-21 cells was reinforced after 72h of co-culture with EO771 (Fig. 8B) or with EO771egfp (data not shown) without effect detected of 1,25D or 25D at any time of treatment.

A. Effect of 1,25 (OH)₂ D on cellular density of EO771 spheroids co-cultured with IC-21



B. Effect of 25 (OH)D on cellular density of EO771 spheroids co-cultured with IC-21



C. Effect of VitD on IC-21 polarisation (in co-culture with EO771)

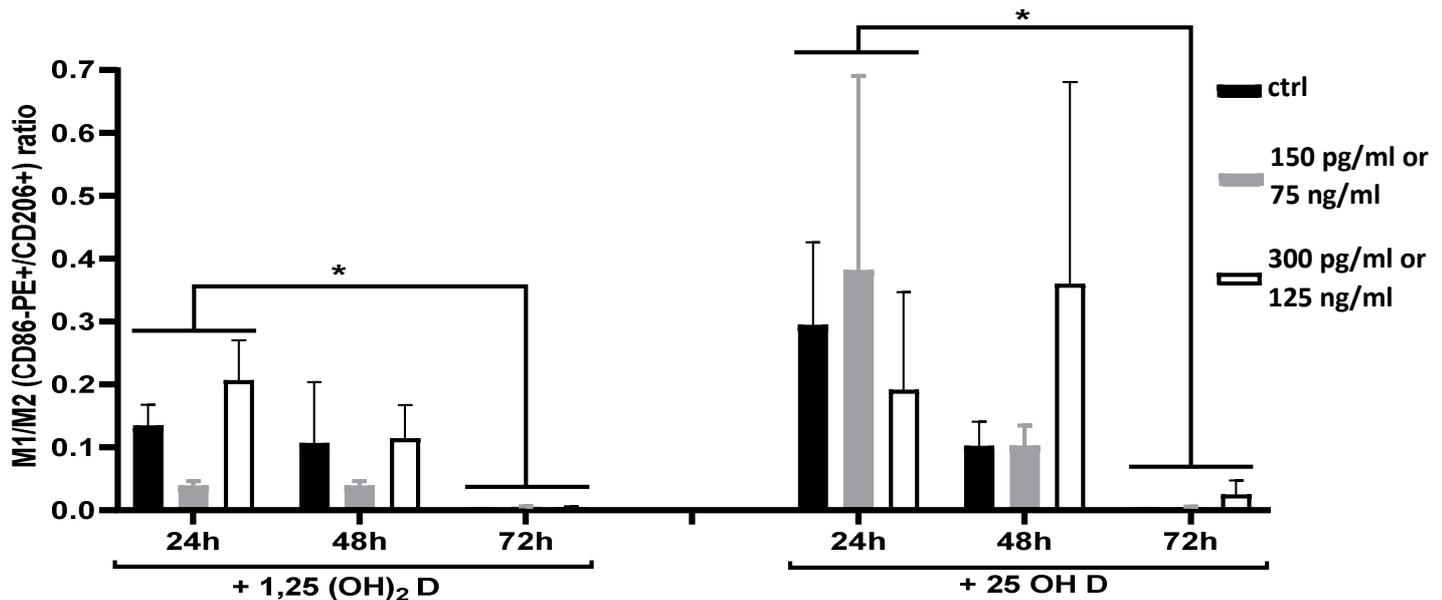


Fig.8. Effect of 1,25D and 25D on EO771 viability and IC-21 polarisation (M1/M2) in co-culture
A, B : EO771 spheroids-IC-21 co-culture treated with graded concentrations of 1,25D (A) and 25D (B). EO771 cellular density was detected by flow cytometry after 24h, 48h and 72h of treatment and compared to the group control.

C : IC-21 cells co-cultured with EO771 treated with graded concentrations of 1,25D and 25D. IC-21 polarisation was evaluated by flow cytometry after 24h, 48h and 72h and compared to the group control.

Mean values of three different experiments are reported. The comparison between groups was carried out by two-ways ANOVA (treatment x time) followed by Tukey test. *: p<0.05

4. Discussion

The VitD is known to have antiproliferative effects on cancer cells. The EO771 is a highly invasive mammary adenocarcinoma cell line (17). It is noteworthy that there are only three studies that investigated the effect of VitD on EO771 cells growth, among which two studies are *in vivo* (18,19), and the third investigated this effect *in vivo* and *in vitro* (20). Nevertheless, none of these studies had characterized the enzymatic equipment of VitD in this cancer cell line.

For the first time, we investigated the effect of VitD metabolites on Vdr and on its enzymatic machinery in EO771 cell line. We report that these cells express constitutively the mRNA and proteins of Vdr, Cyp27b1 and Cyp24a1. We observed that the incubation with 25D had no significant effect on Vdr expression at mRNA or at protein level, while 1,25D reduced the *Vdr* mRNA expression. Regarding the previous studies, *Vdr* mRNA expression is upregulated in Hs578T breast carcinosarcoma cells treated for 24h with 100 nM (40 ng/ml) of 1,25D (21), but not influenced in human mammary cancer cells MCF-7 treated for 24h (21), or 48h (22) with 100 nM (40 ng/ml) of 1,25D. These data indicate that Vdr expression is cell-type specific. However, we showed that Vdr protein expression was significantly induced by 1,25D, which may be due to post-transcriptional modifications (23). These findings are in accordance with two studies realised by Keith et al (24) and Trivedi et al (25), who have demonstrated that 1,25D mediated an upregulation of Vdr protein expression in WT145 murine triple negative mammary cancer (TNBC) cells (24) and in MCF-7 (25) treated by 100 nM (24) an 10 nM (25) consecutively for 48h.

Then, we observed that Cyp27b1 mRNA and protein expressions were not affected by 1,25D. Our results are in accordance with other studies where *Cyp27b1* mRNA expression was detected in MCF-7 and in TNBC cells but the incubation with 100-200 nmol/l (40-80 ng/ml) of 1,25D did not influence *Cyp27b1* expression (2). However, *Cyp27b1* mRNA expression was upregulated by 25D in a dose dependent manner; these results disagreed with Richard S et al. who found that the treatment with 80 ng/ml of 25D for 72h did not affect *Cyp27b1* transcription in TNBC and MCF-7 cells (26).

In our experiment, 1,25D did not influence the transcription and traduction of *Cyp24a1*, wich is inconsistent with previous studies where the mRNA expression in MCF-7 and TNBC cells is significantly enhanced by 40 and 80 ng/ml of 1,25D treated for 24h (2), 48h (21) or 72h (24). In contrast, we observed that the 25D upregulated *Cyp24a1* mRNA and proteins expressions, which is consistent with other studies (26). We hypothesize that the absence of antiproliferative effect of 25D on EO771 cells, may result from this Cyp24a1 overexpression, which predominate the activity of Cyp27b1, resulting in limitation of Vdr pro-apoptotic actions.

Next, we assessed the effects of 25D and 1,25D on EO771 cells viability. We found that 1,25D reduced viability and proliferation of EO771 cells after 24h and 48h by inducing apoptosis at the

physiological dose (150 pg/ml) and necrosis at the supraphysiological dose (300 pg/ml). Our results are in agreement with Kemmis et al. and Murray et al. studies (2,27), in which the treatment with 1,25D (0.1-20 μ M (40.10³-8.10⁶ pg/ml)), for 5 days inhibited the growth of both ER+ and ER- human mammary cancer cell lines, but the ER+ cells such as MCF-7, T47, CAMA 1 were the most sensitive to the treatment (2, 27). While, these results disagreed with Bijan et al. (28) who found that the 1,25D treatment (40- 4.10⁵ pg/ml) for 5 days had no effect on 4T1 (TNBC, triple negative) mammary cancer cell line proliferation, and with Richard S et al. who established stimulatory effect of different concentrations of 25D and 1,25D on the growth of human TNBC cells. Since 1,25D is believed to mediate its actions via its specific receptor Vdr that plays transcription factor role for different genes implicated in cell differentiation and proliferation, we think that the cytotoxic effect of 1,25D in our study is associated with the upregulation of VDR expression.

In contrast, 25D did not reduce the proliferation of EO771 cells. In previous study carried out by Mahmood N et al, the EO771 cells were treated with 40 ng/ml of 25D for 5 days, with renewal of the treatment every day, the EO771 cell proliferation was reduced only on the fifth day of treatment (29). Therefore, in such case, perhaps our experiment requires a longer kinetic study to detect the antiproliferative effect of 25D.

To our knowledge, there are no studies that addressed the impact of VitD on IC-21 cells, even the enzyme equipment of VitD is not studied in this macrophage line.

We report that IC-21 cells express constitutively the mRNA and proteins of Vdr, Cyp27b1 and Cyp24a1. The *Vdr* mRNA expression in IC-21 cells was downregulated by 1,25D. We hypothesize that this downregulation by the supraphysiologic dose of 1,25D may be related to negative feedback of Vdr over its proper genomic expression. Our results are not in agreement with previous studies carried out by Uchida et al. who demonstrated a tendency to increase *Vdr* mRNA expression by incubation the THP1 (human monocytic cells) for 72h with 40 ng/ml of 1,25D (8).

In contrast, we showed that IC-21 cells responded to 1,25D and 25D treatment by upregulation of Vdr protein synthesis. Our findings are in accordance with previous studies that reported an induction of Vdr expression in different macrophage lines by 40 ng/ml of 1,25D which was more important in M1 line than M2 line (8,30,31).

In IC-21 cells, *Cyp27b1* mRNA and protein expression was not significantly changed under any treatment which is consistent with previous studies reporting that treatment of THP-1 (7) and murine macrophages (32) with 10 nM (4 ng/ml) for 48h of 1.25D did not affect *Cyp27b1* mRNA (7,32) and protein (7) expression.

In our study, the mRNA, but not the protein expression of *Cyp24a1* was induced by 1,25D. The induction of mRNA expression is in concordance with previous studies (7,8,33) and can be explained

by a negative feedback of 1,25D over its proper synthesis. In contrast, 25D upregulated Cyp24a1 protein expression but not the mRNA. The absence of 25D effect on mRNA in murine macrophage is reported in previous study (34). The differences of results between mRNA and protein expressions may be related to a difference in expression kinetics or to post-transcriptional modifications induced by VitD metabolites.

In our experimental conditions, the effects induced by 1,25D and 25D in the two cell lines tested were different. The difference of actions of the two metabolites open the question about their mode of cells entry, their mode of action and the kinetics of Vdr, Cyp27b1 and Cyp24a1 expressions.

One of the earliest and best-described effects of 1,25D includes its prodifferentiation effects. Indeed, differentiation along the macrophage lineage of HL60 cells is accompanied by a reduction in cell proliferation (33,35). Therefore, we investigated the effect of 1,25D and 25D on IC-21 cells proliferation, we did not detect an effect of the two metabolites. This finding is inconsistent with that of Ma D et al. (30) who found that 1,25D (40 ng/ml) reduced murine RAW264.7 macrophages proliferation by direct interaction between Vdr and nuclear factor κ B (NF- κ B). Besides, we demonstrated that IC-21 have a basal M2 anti-inflammatory phenotype. VitD, known to polarise the macrophages to M2 anti-inflammatory phenotype, did not affect that of IC-21 cells.

Given that 1,25D is the most known robust inducer of CAMP expression in humans, herein we studied the regulatory actions of 1,25D and 25D on Cramp expression *in vitro*. Our findings demonstrated that the 1,25D repressed *Cramp* mRNA expression at high dose only in IC-21 and 25D failed to change the gene expression in E0771 and IC-21, but upregulated its protein expression. On one hand, Dimitrov et al. showed that a 24h treatment with 40 ng/ml of 1,25D failed to induce *Cramp* gene expression in primary mouse monocytes and macrophages, but it induced strongly the CAMP gene in primary human monocytes and macrophages (36). These findings can be justified by that VDRE located upstream to human CAMP is not conserved in mouse (36). These data provide evidence that a part of immunomodulatory role of VitD concerning the direct regulation of CAMP gene expression, which is active in human cells, is not active in mouse. On the other hand, there is some evidence that a non-genomic-action is involved in the induction of cathelicidin by the activation of ERK1/ERK2 signal pathway (37). In our study, regarding the absence of VitD response element in Cramp promoter, we confirm that VitD regulate the cathelicidin expression by non-genomic actions to be determined in further studies.

After characterising the effects of VitD metabolites on 2D monolayer cells, we investigated their effects in 3D cells model by generating spheroids from E0771 and E0771-GFP cells.

We found no difference in the effect of 1,25D and 25D on E0771 viability between 2D and 3D spheroid cultures.

In our experiment, the cytotoxic effect of 1,25D on EO771 was abrogated by the co-culture with IC-21. It is noteworthy that the M2 phenotype of IC-21 is associated with fast proliferation of different lines of ER+ and TNBC mammary cancer cells (38). However, despite promoting this pro-tumoral phenotype by EO771 and EO771 egfp cells after 72h of co-culture, their proliferation was not accelerated compared to the ctrl. These findings suggest that there is probably a balance between the pro-apoptotic effect of 1,25D and the proliferative effect induced by the macrophages. Therefore, we conclude that the 1,25D limited the proliferative signal delivered by macrophages. Further studies are necessary to understand the cross talk between these cells and the effect of VitD on this cross talk. The immunosuppressive effect induced by EO771 cells resulting in favored M2 phenotype is established in previous studies with human mammary cancer cell lines (38).

1. Mehta RG, Peng X, Alimirah F, Murillo G, Mehta R. Vitamin D and breast cancer: Emerging concepts. *Cancer Lett.* 2013;334(1):95–100. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304383512006398>
2. Kemmis CM, Salvador SM, Smith KM, Welsh J. Human Mammary Epithelial Cells Express CYP27B1 and Are Growth Inhibited by 25-Hydroxyvitamin D-3, the Major Circulating Form of Vitamin D-3. *J Nutr.* 2006;136(4):887–92. <https://academic.oup.com/jn/article/136/4/887/4664260>
3. De La Puente-Yagüe M, Cuadrado-Cenzual MA, Ciudad-Cabañas MJ, Hernández-Cabria M, Collado-Yurrita L. Vitamin D: And its role in breast cancer. *J Med Sci.* 2018;34(8):423–7. <http://doi.wiley.com/10.1016/j.kjms.2018.03.004>
4. Welsh J. Vitamin D and breast cancer: Past and present. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2018;177:15–20. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960076017301905>
5. Thyer L, Ward E, Smith R, Fiore M, Magherini S et al. A Novel Role for a Major Component of the Vitamin D Axis: Vitamin D Binding Protein-Derived Macrophage Activating Factor Induces Human Breast Cancer Cell Apoptosis through Stimulation of Macrophages. *Nutrients.* 2013;5(7):2577–89. <http://www.mdpi.com/2072-6643/5/7/2577>
6. Amler RW, Dull HB, Emory University, editors. *Closing the gap: the burden of unnecessary illness.* New York: Oxford University Press; 1987. 210 p.
7. Monkawa T, Yoshida T, Hayashi M, Saruta T. Identification of 25-hydroxyvitamin D3 1 α -hydroxylase gene expression in macrophages. *Kidney Int.* 2000;58(2):559–68. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0085253815471364>
8. Uchida H, Hasegawa Y, Takahashi H, Makishima M. 1 α -Dihydroxyvitamin D3 and Retinoic Acid Increase Nuclear Vitamin D Receptor Expression in Monocytic THP-1 Cells. *Anticancer Res.* 2016;36(12):6297–302. <http://ar.iiarjournals.org/content/36/12/6297.abstract>
9. García-Tejido P, Cabal ML, Fernández IP, Pérez YF. Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Triple Negative Breast Cancer: The Future of Immune Targeting. *Clin Med Insights Oncol.* 2016; 10(S1) 31–39. <http://journals.sagepub.com/doi/10.4137/CMO.S34540>
10. Li D, Beisswenger C, Herr C, Schmid RM, Gallo RL et al. Expression of the antimicrobial peptide cathelicidin in myeloid cells is required for lung tumor growth. *Oncogene.* 2014;33(21):2709–16. <http://www.nature.com/articles/onc2013248>
11. Piktel E, Prokop I, Wnorowska U, Król G, Cieśluk M et al. Ceragenin CSA-13 as free molecules and attached to magnetic nanoparticle surfaces induce caspase-dependent apoptosis in human breast cancer cells via disruption of cell oxidative balance. *Oncotarget.* 2018;9(31). <http://www.oncotarget.com/fulltext/25105>
12. Chen X, Zou X, Qi G, Tang Y, Guo Y et al. Roles and Mechanisms of Human Cathelicidin LL-37 in Cancer. *Cell Physiol Biochem.* 2018;47(3):1060–73. <https://www.karger.com/Article/FullText/490183>
13. Le Naour A, Koffi Y, Diab M, Le Guennec D, Rougé S et al. EO771, the first luminal B mammary cancer cell line from C57BL/6 mice. *Cancer Cell Int.* 2020;20(328)1–13. <https://cancerbiomedcentral.com/articles/10.1186/s12935-020-01418-1>
14. Crawford EK, Latham PS, Shah EM, Hasday JD. Characterization of Tumor Binding by the IC-21 Macrophage Cell Line. 1990; 50 (7) 4578-4583
15. Yagnik DR, Hillyer P, Marshall D, Smythe CDW, Krausz T et al. Noninflammatory phagocytosis of monosodium urate monohydrate crystals by mouse macrophages: Implications for the control of joint inflammation in gout. *Arthritis Rheumatol.* 2000; 43(11)1779–1789.
16. Leek R, Grimes DR, Harris AL, McIntyre A. *Methods: Using Three-Dimensional Culture (Spheroids) as an In Vitro Model of Tumour Hypoxia. Tumor Microenvironment.* Cham: Springer International Publishing; 2016. p. 167–

96. (Advances in Experimental Medicine and Biology; vol. 899; Chapter 10). http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-26666-4_10
17. Le Naour A, Rossary A, Vasson M. EO771, is it a well characterized cell line for mouse mammary cancer model? Limit and uncertainty. *Cancer Med.* 2020;9(21):8074–85. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cam4.3295>
18. Karkeni E, Morin SO, Bou Tayeh B, Goubard A, Josselin E et al. VitD controls tumour growth and CD8+ T cell infiltration in breast cancer. *Front Immunol.* 2019 10(12) 1-12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01307>
19. Aldekwer S, Desiderio A, Farges M-C, Rougé S, Le Naour A et al. Vitamin D supplementation associated with physical exercise promotes a tolerogenic immune environment without effect on mammary tumour growth in C57BL/6 mice. *Eur J Nutr.* 2020. <https://doi.org/10.1007/s00394-020-02420-z>
20. Anisiewicz A, Filip-Psurska B, Pawlik A, Nasulewicz-Goldeman A, Piasecki T et al. Calcitriol Analogues Decrease Lung Metastasis but Impair Bone Metabolism in Aged Ovariectomized Mice Bearing 4T1 Mammary Gland Tumours. *Aging Dis.* 2019. <http://www.aginganddisease.org/EN/10.14336/AD.2018.0921>
21. Beaudin SG, Robilotto S, Welsh J. Comparative regulation of gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in cells derived from normal mammary tissue and breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*;148:96–102. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960076014002131>
22. Anderson MG, Nakane M, Ruan X, Kroeger PE, Wu-Wong JR. Expression of VDR and CYP24A1 mRNA in human tumors. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2006;57(2):234–40. <http://link.springer.com/10.1007/s00280-005-00597>
23. Zenata O, Vrzal R. Fine tuning of vitamin D receptor (VDR) activity by post-transcriptional and post-translational modifications. *Oncotarget.* 2017;8(21):35390–402. <https://www.oncotarget.com/lookup/doi/10.18632/oncotarget.15697>
24. Keith ME, LaPorta E, Welsh J. Stable expression of human VDR in murine VDR-null cells recapitulates vitamin D mediated anti-cancer signaling: Ectopic VDR mediates anti-cancer actions. *Mol Carcinog.* 2014;53(4):286–99. <http://doi.wiley.com/10.1002/mc.21975>
25. Trivedi T, Zheng Y, Fournier PGJ, Murthy S, John S et al. The vitamin D receptor is involved in the regulation of human breast cancer cell growth via a ligand-independent function in cytoplasm. *Oncotarget.* 2017;8(16). <http://www.oncotarget.com/fulltext/15803>
26. Richards SE, Weierstahl KA, Kelts JL. Vitamin D Effect on Growth and Vitamin D Metabolizing Enzymes in Triple-negative Breast Cancer. *ANTICANCER Res.* 2015; 35 (6) 805-810; PMID: 25667460
27. Murray A, Madden SF, Synnott NC, Klinger R, O'Connor D et al. Vitamin D receptor as a target for breast cancer therapy. *Endocr Relat Cancer.* 2017;24(4):181–95. <https://erc.bioscientifica.com/view/journals/erc/24/4/181.xml>
28. Bijian K, Kaldre D, Wang T-T, Su J, Bouttier M et al. Efficacy of hybrid vitamin D receptor agonist/histone deacetylase inhibitors in vitamin D-resistant triple-negative 4T1 breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2018; 177:135–9. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096007601730225X>
29. Mahmood N, Arakelian A, Muller WJ, Szyf M, Rabbani SA. An enhanced chemopreventive effect of methyl donor S-adenosylmethionine in combination with 25-hydroxyvitamin D in blocking mammary tumor growth and metastasis. *Bone Res.* 2020;8(1):28. <http://www.nature.com/articles/s41413-020-0103-6>
30. Ma D, Zhang R, Wen Y, Yin W, Bai D et al. 1, 25(OH)2D3-induced interaction of vitamin D receptor with p50 subunit of NF- κ B suppresses the interaction between KLF5 and p50, contributing to inhibition of LPS-induced macrophage proliferation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;482 (9) 366-374. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.11.069>
31. Carbone F, Satta N, Burger F, Roth A, Lenglet S, Pagano S, et al. Vitamin D receptor is expressed within human carotid plaques and correlates with pro-inflammatory M1 macrophages. *Vascul Pharmacol.* 2016;85:57–65. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1537189116300544>
32. Overbergh L, Decallonne B, Valckx D, Verstuyf A, Depovere J et al. Identification and immune regulation of 25-hydroxyvitamin D-1- α -hydroxylase in murine macrophages. *Clin Exp Immunol.* 2000; 120(8)139-146
33. Amano Y, Cho Y, Matsunawa M, Komiyama K, Makishima M. Increased nuclear expression and transactivation of vitamin D receptor by the cardiotoxic steroid bufalin in human myeloid leukemia cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2009;114(3–5):144–51. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960076009000491>
34. Merriman KE, Powell JL, Santos JEP, Nelson CD. Intramammary 25-hydroxyvitamin D3 treatment modulates innate immune responses to endotoxin-induced mastitis. *J Dairy Sci.* 2018;101(8):7593–607. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030218304211>
35. Abe E, Miyaura C, Sakagami H, Takeda M, Konnot K et al. Differentiation of mouse myeloid leukemia cells induced by 1 α ,25-dihydroxyvitamin' D3. 1981;78(8)4990-4994,.
36. Dimitrov V, White JH. Species-specific regulation of innate immunity by vitamin D signaling. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2016;164:246–53. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960076015300753>
37. Hii C, Ferrante A. The Non-Genomic Actions of Vitamin D. *Nutrients* [Internet]. 2016 Mar 2 [cited 2020 Oct 19];8(3):135. Available from: <http://www.mdpi.com/2072-6643/8/3/135>
38. Sousa S, Brion R, Lintunen M, Kronqvist P, Sandholm J, Mönkkönen J, et al. Human breast cancer cells educate macrophages toward the M2 activation status. *Breast Cancer Res.* 2015;17(1):101. <http://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13058-015-0621-0>

Publication n°3

Vitamin D supplementation associated with physical exercise promotes a tolerogenic immune environment without effect on mammary tumour growth in C57BL/6 mice

Article accepté le 19 octobre 2020 dans l'« European Journal of Nutrition »

La supplémentation en vitamine D associée à l'exercice physique favorise un environnement immunitaire tolérogène sans effet sur la croissance tumorale mammaire chez la souris C57BL/6

Référence : <https://doi.org/10.1007/s00394-020-02420-z>

Introduction

L'excès de poids corporel, l'inactivité physique et la carence en vitamine D (VitD) sont considérés comme des facteurs de risque d'incidence du cancer du sein. Plusieurs études cliniques et modèles précliniques ont corrélé l'obésité avec l'augmentation de la fréquence et de la mortalité de différents types de cancer dont le cancer du sein post-ménopausique. L'apport de VitD et l'activité physique font partie des stratégies qui peuvent être proposées pour atténuer l'effet de l'obésité sur l'incidence et la gravité du cancer du sein. D'une part, la VitD a été associée à une réduction à la fois de l'obésité et du risque de cancer du sein, en contrôlant l'expression de différents gènes qui régulent la thermogénèse, la prolifération cellulaire, la différenciation et l'apoptose. D'autre part, l'exercice physique d'intensité modérée est lié à une amélioration du métabolisme des graisses contribuant à une réduction de la prise de poids associée à une atténuation de l'inflammation chronique induite par l'excès de tissu adipeux.

Objectifs

Le but de notre étude était d'étudier l'impact de la supplémentation en VitD, de l'exercice physique imposé d'intensité modérée et de leur combinaison sur le développement de la lignée d'adénocarcinome mammaire EO771 chez des souris C57BL/6 femelles soumises à un régime riche en lipides (HF) dans un environnement enrichi (EE avec roue, nids et jouets), après ovariectomie afin de mimer l'arrêt post-ménopausique des sécrétions ovariennes.

Matériel et méthodes

60 souris femelles C57BL/6 âgées de 33 semaines ont été réparties aléatoirement dans des cages EE avec un accès *ad libitum* à la nourriture et à l'eau. Au cours de l'expérimentation les souris ont été nourries avec un régime HF (450 kcal/100g, 42,1% de lipides). A S-3, les souris ont été ovariectomisées afin de mimer la ménopause. A S0, les souris randomisées en 4 groupes ont été nourries avec le régime HF supplémenté ou non en cholécalciférol (VitD3) (groupes HF et HF+D: 125/1225 IU/100g) et soumises ou non à un exercice imposé modéré sur tapis roulant (groupes : HF+Ex et HF+D+Ex). A S8, les souris ont reçu une injection orthotopique de cellules néoplasiques mammaires syngéniques EO711. La prise alimentaire, le poids et l'activité physique spontanée (SPA) ont été évalués tout au long du protocole. Des tests d'exploration fonctionnelle ont été réalisés afin d'évaluer la vitesse maximale (MS, Maximal speed) (S-1, S7 et S11) et le pic de force maximale développée par la souris par le test d'agrippement (GS, Grip strength) (S3 et S7). La mesure de la croissance tumorale a été réalisée à partir du 9^{ème} jour post-implantation et le sacrifice des animaux a été déclenché lorsque le volume tumoral avoisinait 2,5 cm³. Lors du sacrifice, la collecte du sang, du tissu adipeux (viscéral, péri-rénal, inguinal, sous-cutané), et des muscles des pattes postérieures a été réalisée. La

25D sérique a été dosée. La tumeur mammaire a été en partie utilisée pour le phénotypage des populations immunitaires par cytométrie en flux et en partie, congelée en vue d'analyses ultérieures. Les résultats ont été analysés par Anova une ou 2 voies, suivi du test de Tukey.

Résultats

Le poids corporel des souris a augmenté de manière significative à partir de la 4^{ème} semaine de régime HF (+7,5±4,2% pour le groupe HF). La supplémentation en VitD (p=0,05) et l'exercice physique imposé (p = 0,01) ont réduit le gain de poids corporel. L'exercice a diminué la masse grasse viscérale (g: 1,5±0,8 (HF); 1,2±0,65 (HF+Ex); 0,9±0,6 (HF+D+Ex); p=0,03). La SPA (p<0,0001) et GS (p=0,01) ont été plus importantes chez les souris HF+D+Ex par rapport aux autres groupes. Les souris soumises à l'Ex ont parcouru en moyenne 0,273 km/jour ce qui correspond de 16% (HF+D+Ex) à 27% (HF + Ex) de leur SPA. La MS et la masse des muscles postérieurs n'ont pas été influencées par l'Ex ou la VitD. Aucun effet de l'Ex ou de la VitD sur la croissance tumorale et la durée de vie des souris n'a été détecté. Dans la tumeur, des effets opposés de la VitD et l'Ex sur le recrutement des cellules immunitaires ont été détectés. La VitD a diminué la proportion de cellules NK (p=0,03), tandis que l'Ex l'a augmentée (p=0,03). Le rapport Th1 / Th2 est abaissé par la VitD (p=0,05), tandis que le rapport Tc/Treg n'a été affecté ni par l'exercice ni par la VitD.

Conclusion

Dans nos conditions expérimentales, la supplémentation en VitD et l'exercice physique imposé ont eu des effets synergiques réduisant la prise de poids sous régime HF et améliorant les capacités physiques des souris. Cependant, l'exercice physique imposé, s'il a amélioré la vigilance immunitaire, n'a pas réduit la croissance tumorale. Ceci peut s'expliquer par le niveau élevé de l'activité spontanée par rapport à l'exercice imposé dans notre modèle. La supplémentation en VitD n'a pas eu d'effet détectable sur la croissance tumorale, ce qui peut résulter de l'équilibre entre son effet cytotoxique apoptotique direct sur les cellules tumorales et son effet protumoral immunosuppresseur. La supplémentation en VitD et l'exercice physique ensemble ont favorisé un environnement immunitaire tolérogène sans effet sur la croissance de la tumeur mammaire.



Vitamin D supplementation associated with physical exercise promotes a tolerogenic immune environment without effect on mammary tumour growth in C57BL/6 mice

Sahar Aldekwer¹ · Adrien Desiderio¹ · Marie-Chantal Farges¹ · Stéphanie Rougé¹ · Augustin Le Naour¹ · Delphine Le Guennec¹ · Nicolas Goncalves-Mendès¹ · Laurence Mille-Hamard² · Iman Momken^{2,3} · Adrien Rossary¹ · Mona Diab-Assaf⁴ · Marie-Paule Vasson¹ · Jérémie Talvas¹

Received: 29 July 2020 / Accepted: 19 October 2020
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

Abstract

Purpose High plasma vitamin D (VitD) level and regular exercise (Ex) are known to have anti-cancer and immunomodulatory effects. This study aimed to evaluate the impact of VitD supplementation and imposed physical Ex on mammary tumour growth and immune response in ovariectomised mice fed high-fat (HF) diet.

Methods Ovariectomised 33-week-old mice C57BL/6 ($n=60$), housed in enriched environment (EE), were fed HF diet (450 kcal/100 g) supplemented or not with VitD (HF/HF+D: 125/1225 IU/100 g) for 12 weeks and submitted or not to Ex (HF+Ex; HF+D+Ex) on treadmill (45 min/day, 5 days/week). At w8, syngeneic tumour cells EO771 were orthotopically injected into the 4th mammary gland. Spontaneous activity (SPA), maximal speed (MS) and forelimb grip strength (GS) were measured. Tumour immune cells infiltrate was phenotyped by FACS. Data (mean \pm SEM) were analysed by two-way ANOVA + Tukey post-test.

Results Ex ($p=0.01$) and VitD ($p=0.05$) reduced body weight gain. Exercise decreased visceral fat mass [g: 1.5 ± 0.8 (HF); 1.2 ± 0.65 (HF+Ex); 0.9 ± 0.6 (HF+D+Ex); $p=0.03$]. SPA ($p<0.0001$) and GS ($p=0.01$) were higher in HF+D+Ex mice vs others. No effect of Ex or VitD on tumour growth was detected. In tumour, VitD decreased the proportion of NK ($p=0.03$), while Ex increased it ($p=0.03$). The Th1/Th2 ratio is lowered by VitD ($p=0.05$), while Tc/Treg ratio was not affected either by Exercise or VitD.

Conclusion In our experimental conditions, VitD supplementation and physical exercise have synergetic effects reducing the weight gain under HF diet and improving the physical capacities of mice. VitD coupled with exercise induces an immunosuppressive response without effect on tumour growth.

Keywords Breast cancer · Obesity · Vitamin D · Physical exercise

Introduction

Excess body weight, physical inactivity and vitamin D (VitD) deficiency may be considered as risk factors for breast cancer incidence [1, 2].

Several preclinical models and clinical studies correlated the obesity with increased frequency and mortality of different types of cancer including postmenopausal breast cancer with incidence risk estimated between 20 and 40% [3]. This correlation can be explained by different main mechanisms: the elevation of plasma oestrogen levels, the increase in glycaemia, insulinaemia and insulin-like growth factor (IGF) synthesis which promote the growth of epithelial breast cells and chronic inflammation resulting from an up-regulation of pro-inflammatory adipokines such as leptin and tumour necrosis factor alpha (TNF- α) and down-regulation of adiponectin. Noting that, a cross-talk linking these different mechanisms and their signalling pathways leads to DNA

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00394-020-02420-z>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Jérémie Talvas
jeremie.talvas@uca.fr

Extended author information available on the last page of the article

damage, mutagenesis, cell proliferation and angiogenesis promoting thereby epithelial cell tumourigenesis [2, 4].

Various strategies can be proposed to mitigate the effect of obesity on the incidence and severity of breast cancer such as physical activity and VitD intake.

On one hand, moderate physical exercise is associated with an enhancement in fat metabolism contributing to a reduction in weight gain that results in a decrease of leptin and oestrogen plasma concentrations, an increase of adiponectin plasma level, reducing circulating insulin levels and increasing glucose uptake by skeletal muscle. Physical activity has been observed to mitigate the chronic adipose inflammation by decreasing the secretion of pro-inflammatory cytokines IL-8 and IL-15 [4, 5].

Housing rodents in an enriched environment (EE) is a new model of housing filled with inanimate objects like toys, nests and wheels and extensively used to stimulate social interactions and increase spontaneous physical activity [6, 7]. In previous studies [7, 8], our team evaluated the effect of EE of female C57BL/6 mice on the development of mammary cancer using the syngeneic model of EO771 cells, a mammary gland medullary adenocarcinoma cell line, transplanted orthotopically. We established the effectiveness of the EE housing in reducing the development of EO771 mammary tumour. In a study carried out by Betof et al. on BALB/c mice, the practice of voluntary exercise decreased the mammary tumour growth by inducing apoptosis, normalising the vascularisation in tumour and increasing the vessel density which reduced intra-tumour hypoxia and thereby the malignant character of cells. The vascular normalising effects were in association with inhibition of tumour growth, resulting in activation of the proapoptotic Fas pathway [9].

Among the different endurance exercise modalities, treadmill running is the most widely used in experimental studies. Goh et al. showed that 10 weeks of treadmill running induced a lower mammary tumour progression in PyMT transgenic mice, with gene down-expression of C-C motif chemokine ligand 22, a cytokine involved in the recruitment of immunosuppressive T regulatory cells [10]. In a syngeneic BALB/c mammary cancer mouse model, treadmill running, started 8 days after tumour inoculation, slowed tumour progression and decreased the tumour-induced accumulation of myeloid-derived suppressor cells, accompanied by a relative increase in natural killer (NK) and cytotoxic T (Tc) lymphocytes activation [11].

On the other hand, the VitD has been associated with a reduction in both obesity and risk of breast cancer. VitD can be synthesised endogenously in the epidermis under the effect of UVB or provided through consumption of animal (VitD3 or cholecalciferol) and/or vegetable (VitD2, ergocalciferol) diet. VitD is converted in the liver into 25 hydroxy-VitD (25-OH D), the circulating form used as marker for

VitD status [12]. 25-OH D is transformed into its active form 1,25 dihydroxyVitD (1,25 (OH)₂ D) in the kidneys and other tissues such as the skin, colon, breast and immune cells [13]. The effects of 1,25 (OH)₂ D are mediated by its NUCLEAR receptor (VitD receptor), which acts as transcription factor in controlling the expression of various genes that regulate thermogenesis, cell proliferation, differentiation, apoptosis... [14, 15]

The epidemiological studies showed contradictory results on the association between VitD status and obesity [16]. However, high plasma concentration of VitD is associated with an important adiponectin synthesis, a decrease of leptin and insulin plasma levels and an improvement of obesity-associated insulin resistance [1, 16, 17]. In vivo studies showed that VitD supplementation (1500 IU/100 g) protected C57BL/6J mice against diet-induced obesity by increasing fatty acid oxidation mainly in the liver, adipose tissue (AT) and skeletal muscles [15]. In vitro studies demonstrated that 1,25 (OH)₂ D could inhibit adipogenesis, reduce the accumulation of triglyceride mass, inhibit the differentiation and stimulate apoptosis of 3T3-L1 pre-adipocytes [17]. Furthermore, the VitD exerts anti-inflammatory actions on AT by decreasing the chemokine and cytokine release from adipocytes by inhibition of the nuclear factor-kappa B (NF-κB) and the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signalling pathways and decreasing toll-like receptor (TLR) expression [18]. In addition, Swami et al. described that in vivo model of VitD supplementation, enhanced AMP-activated protein kinase (AMPK) pathway that suppress local oestrogen synthesis in the breast micro-environment [19]. Such actions of VitD can mitigate the adverse effects of obesity on breast cancer development. It is noteworthy that some studies reported a severe VitD deficiency in women diagnosed with breast cancer [20–26]. In the same way, ex vivo studies showed a role of VitD mediated by its receptor, VDR, in up-regulating the expression of genes that inhibit cell proliferation, induce angiogenesis both in the normal and malignant mammary tissue [14, 27]. In contrast, a supplementation with VitD (500 ng/100 g) in a syngeneic breast cancer model BALB/c worsened tumour growth by inducing immunosuppression [28].

Based on these data, the aim of our study was to investigate the impact of VitD supplementation, imposed physical exercise of moderate intensity and the combination between them on EO771 mammary tumour development in female C57BL/6 mice under high fat diet in EE housing, after being ovariectomised to mimic the post-menopausal suppression of ovarian secretions. Weight course, physical performance and tumour immune phenotype were characterised.

Materials and methods

Animal model and experimental design

This experiment was carried out in accordance with European directives on animal ethics (Referral no. 0109502, Regional Ethics Committee on Animal Experimentation, Clermont Auvergne University). The experimental protocol is summarised in Fig. 1. Thirty three-week-old female C57BL/6 mice ($n = 50$; Janvier Labs, Le Genest-St-Isle, France) placed in a box equipped with 12:12 inverted light cycle at 22 ± 2 °C, were distributed in enriched cages with toys, nest and wheel (6–7 mice/cage), with ad libitum access to food and water.

Diet, food and weight monitoring

During the acclimatisation phase [7 days, week-5 (W-5), Fig. 1], a standard diet was provided (Safe U8958 version 131, Augy, France). After that, all mice received a high-fat (HF) diet for 1 month (from W-4 to W0). The HF diet, designed in collaboration with laboratory ‘Safe’, contains

450 kcal/100 g of food and is composed of 42.1% lipids (ratio $\omega 6/\omega 3 = 6.2$; $\omega 6$ intake: 2.46 mg/100 g), 37.4% carbohydrates and 20.5% proteins (Table 1). It is also composed of minerals and vitamins in optimal quantities that meet the nutritional recommendations for laboratory animals. The VitD-enriched diet contains VitD concentration ten times higher than a non-enriched diet (1225 IU/100 g or 30.6 $\mu\text{g}/100$ g vs 125 IU/100 g or 3.2 $\mu\text{g}/100$ g) providing an average of 37.5 IU or 1 $\mu\text{g}/\text{day}/\text{mouse}$. The two diets are isocaloric and iso-nitrogenous. Body weight (BW) and food intake were checked once and twice a week, respectively throughout the protocol.

Orthotopic injection of EO771 mammary adenocarcinoma cells and tumour monitoring

Syngeneic cell line of spontaneous mammary adenocarcinoma EO771 was cultured in complete RPMI 1640 medium (Biowest, Nuaille, France) supplemented with 10% foetal calf serum (Biowest), 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of streptomycin (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), 100 U/ml of penicillin (Sigma-Aldrich), 2 mM glutamine (Sigma-Aldrich) at 37 °C in a 5% CO_2 humidified atmosphere. The EO771

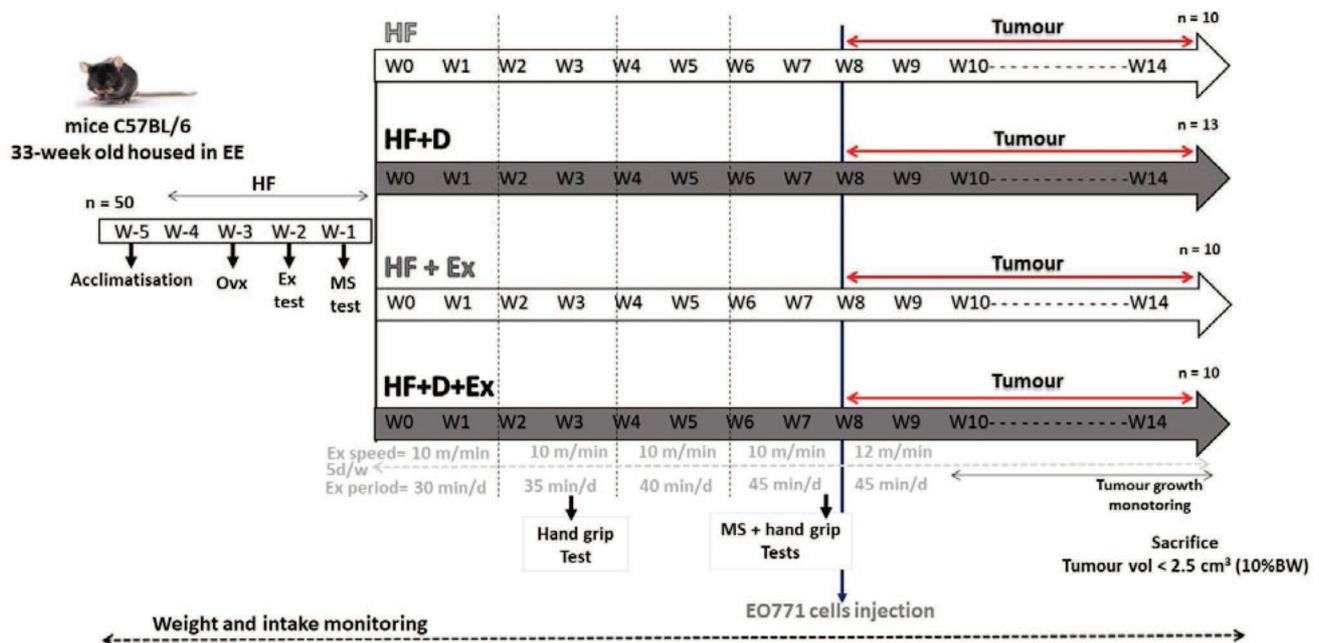


Fig. 1 Experimental design. 50 female C57BL/6 mice aged 33 weeks (W) were randomly distributed in enriched environment (EE) equipped with wheels, nests and toys. At W-3, all mice were ovariectomised in order to mimic menopause. At W0, the mice were randomised into 4 groups and fed with the HF diet supplemented or not with cholecalciferol (VitD3) (HF and HF+D groups) and whether or not trained by imposed physical exercise (Ex) on a motorised treadmill at moderate intensity (HF+Ex and HF+D+Ex groups). These two interventions (diet and imposed exercise) were maintained until

mice sacrifice. At W8, all mice received an orthotopic injection of EO771 syngeneic mammary tumour cells by ‘fat pad’ technique into the fourth pair of mammary glands. Functional exploration tests [maximal speed (MS) and handgrip] were carried out. The tumour growth was evaluated from 9th days after EO771 cell injection with a caliper and calculated by the formula $0.52 \times \text{width}^2 \times \text{length}$. The mice’s sacrifice was started when the tumour volume was close to 2.5 cm^3 . Body weight and food intake were checked once and twice a week, respectively

Table 1 Diet composition (Safe U8958 version 131, Augy, France)

High fat diet composition (in 100 g)	
Energy supply (Kcal) ^a	450
% Total energy intake	
Proteins	20.5
Carbohydrates	37.4
Lipids	42.1
Mineral mixture ^b (AIN-93 M) (g)	5
Vitamin mixture ^c (AIN-93 M) (g)	1
Cholecalciferol (vitD3) (IU)	No supplemented diet: 125 Supplemented diet: 1225

^aValues of each macronutrient are expressed in percentage of total energy content

^bAIN-93M mineral mixture (g/100 g): calcium phosphate 50, sodium chloride 7.4, potassium citrate 222, potassium sulfate 5.2, magnesium oxide 2.4, manganous carbonate 0.35, ferric citrate 0.6, zinc carbonate 0.16, cupric carbonate 0.03, potassium iodate 1×10^{-3} , sodium selenite 1×10^{-3} , chromium potassium sulfate 55×10^{-3} , sucrose 11.8

^cAIN-93M vitamin mixture (g/100 g): thiamin HCl 0.06, riboflavin 0.06, pyridoxine HCl 0.07, niacin 0.3, calcium pantothenate 0.16, folic acid 0.02, biotin 2×10^{-3} , menadione sodium bisulfite 8×10^{-3} , sucrose 98.2, vitamin B12 0.1, vitamin A (500,000 U/gm) 0.8, vitamin D3 (400,000 U/gm) 25×10^{-3} , vitamin E acetate (50 U/gm) 1. gm: gram of matter

cells at 80% of confluence were trypsinised, filtered and counted. The cells (5×10^5 /100 μ l of matrigel (Growth Factor Reduced BD Matrigel TM Matrix, BD Biosciences, Bedford, MA, USA) were implanted by “fat pad” technique into the fourth pair of mammary glands in all mice under anaesthesia at W8. The tumour growth was monitored by measuring its width and length using a calliper evolution on the 9th, 14th and 16th day and then daily from the 20th day post-injection until sacrifice (W14). The tumour volume (mm^3) was calculated by the formula $0.52 \times \text{width}^2 \times \text{length}$. When it reached a value around 2.5 cm^3 ($< 10\%$ BW), the mice were sacrificed.

Spontaneous physical activity, physical exercise and functional tests

Spontaneous physical activity (SPA) was assessed using a wheel counter in each cage. The distance travelled per cage, relative to the number of mice, was recorded daily. The moderate-intensity physical exercise was performed on a treadmill with six lanes (Columbus Instruments, Columbus, OH, USA). The mice were trained 5 days/week at a speed of 12 m/min for the sacrifice over a period ranging from 30–45 min (increment of 5 min every 15 days for 8 weeks). The maximum speed (MS) measurement test performed on the treadmill, began at a speed of 3 m/min and then increased each 1 min at an acceleration of 3 m/min. MS was reached when the mouse stopped running and remained immobile for

5 consecutive seconds on an electrical grid [29]. Each MS determination session took place over 2 consecutive days, one session/day and retaining the maximum value of the two tests. The strength of the forelimbs was assessed at W3 and W7 by handgrip test. It allowed the determination of the maximum force peak expressed in Newton (N: 1 kg m/s^2) developed by the mouse when the operator tried to move it away from a grid specially designed for this purpose (Handgrip, Bioseb, USA, Canada). For each test, three series of three values were collected and compiled to compare the amplitude of the force exerted according to the group.

Sacrifice, blood and tissue sampling

The mice were anaesthetised with a ketamine/xylazine mixture (i.p., 100/10 mg/kg). The blood was collected by cardiac puncture in heparinised tubes. Plasma samples were separated by centrifugation at 1000 g during 5 min, aliquoted and stored at -80°C . The tumours were excised, weighed, and frozen. The white visceral, perirenal, inguinal, subcutaneous ATs, the interscapular brown AT and the skeletal muscles of the hind legs were taken, weighed, immersed in liquid nitrogen and stored at -80°C .

Note that 2 mice were dead after the tumour injection (1 HF and 1 HF + Ex groups respectively), and one in HF + D + Ex group by accident (during MS test). Three HF group mice did not develop a tumour probably because of mishandling during orthotopic injection. Thus, we finally analysed the results of weight and tumour monitoring for 10 HF, 13 HF + D, 10 HF + Ex and 10 HF + D + Ex mice.

Plasma analysis

Plasma 25-OH D concentrations were measured using a mouse/rat ELISA kit (VID21-K01, EAGLE BIOSCIENCES) according to the manufacturer’s instructions. The detection limit was 4.781 ng/ml. Plasma VitD concentrations were calculated using 4-parameter calibration curve.

Immune cell phenotyping

At sacrifice, mammary tumours were crushed in PBS $1 \times$ -BSA (Bovine serum albumin) 0.5%, filtered using a 40 μ m pore filter (Falcon® 40 μ m Cell Strainer), centrifuged to pellet tissue debris then resuspended in staining buffer (PBS $1 \times$ -BSA 0.5%-EDTA 2 mM). The samples were then directed to the analysis of immune populations which were counted and characterised after separation based on their size and granularity by flow cytometry (Beckman Coulter EPICS XL FC500, Villepinte, France). Immune cells were labelled by monoclonal antibodies conjugated to fluorochromes, F4/80-CD11b (TAMs), DX5-NK 1.1 (NK), CD119 (Th1), ROR- γ - δ (Th17), CD124 (Th2) and

CD25-FoxP3 (Treg) (supplemental Table 1) according to the supplier's recommendations. The compensations and controls were carried out using the fluorescence minus one (FMO) procedure with the isotypes of corresponding antibodies. Data were analysed by Kaluza 1.2 software (Beckman-Coulter, Hialeah, FL, USA).

Statistical analysis

All results were expressed as mean \pm SEM and analysed statistically with Prism 8.0.2 software for Windows (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). The effect of VitD supplementation, exercise (Ex), or both combined (D \times Ex) were analysed by a two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. The overall treatment (D, Ex) was examined by a 1-factor ANOVA followed by Tukey's post hoc test. The differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Results

Imposed exercise and VitD supplementation reduced body and tissue weight gain under high fat diet

The total energy intake throughout the whole protocol from W0 to W11 at the start of mouse sacrifice (W0–W11) was similar between the different groups ($p = 0.35$; Table 2).

The total VitD intake during the protocol (11 weeks) was ten times more important in the two groups fed with VitD-supplemented diet (Table 2). At sacrifice, the plasma 25-OH D concentrations were higher in the two groups supplemented [HF + D (106 ± 7.05 ng/ml); HF + D + Ex (95.6 ± 3.8 ng/ml)] vs [HF (63.3 ± 10.9 ng/ml); HF + Ex (63.5 ± 8.1 ng/ml)] ($p = 0.01$).

The total body weight increased significantly from the 4th week ($+7.5 \pm 4.2\%$ for HF group) and peaked at the 7th week ($+20.7 \pm 8.6\%$ for HF group) (Fig. 2A).

Before EO771 cells injection (W7), the two groups subjected to exercise showed a lower total body weight than the two others (W4, 5, 6, 7; Ex effect: $p = 0.04$). Interestingly, the group HF + D + Ex had less body weight compared to

the three other groups at the weeks 6, 7, 8 and 12 ($p < 0.05$) (Fig. 2A).

The weight gain (Fig. 2B) in the phase preceding the cell injection (W0–W7) was limited by VitD ($p = 0.04$, two-way ANOVA) and imposed exercise ($p = 0.008$, two-way ANOVA). Weight gain was less important in the group HF + D + Ex ($+1.59 \pm 0.8$ g) when compared to HF ($+5.9 \pm 1.12$ g) and HF + D groups ($+5.1 \pm 0.7$ g) ($p = 0.03$).

At week 8 (Fig. 2C), all mice lost weight whatever the group, due to the overnight fasting period before the injection of EO771 cancer cells and the surgery itself. The weight loss was higher in the HF group (-3 g) compared to HF + D + Ex group (-0.82 g) ($p = 0.001$, Fig. 2C). This loss was partially compensated in one week.

In the post-injection phase (Fig. 2D), when body weight is considered without tumour mass, all groups lost weight without significant difference between each other ($p = 0.2$). Regarding the whole weight changes between the start and the end of the experiment (Fig. 2E), a weight loss in all groups occurred, mostly in the group HF + D + Ex (-3 ± 1.4 g), when compared to the three others (HF: -0.2 ± 1.83 ; HF + D: 0.0 ± 1.31 ; HF + Ex: -0.2 ± 1.83 g; a, b: $p = 0.01$). Throughout the experimentation, the VitD ($p = 0.05$, two-way ANOVA) and the imposed exercise ($p = 0.03$, two-way ANOVA) limited the weight gain.

At sacrifice, the total and visceral AT were lighter in the two groups following the imposed exercise ($p = 0.03$; Fig. 3A). The HF + D + Ex group had 50% of visceral fat mass less than HF group ($p = 0.03$). The subcutaneous, inguinal, and perirenal white AT as well as interscapular brown AT were not significantly different between groups. By relating the mass of AT to the mouse body weight (tumour weight subtracted), the HF + D + Ex group showed the lowest ratio compared to HF and HF + D groups ($p = 0.03$; Fig. 3B).

Cooperation between VitD and exercise enhanced the SPA and handgrip strength without improvement of MS and muscle mass

The SPA was followed throughout the protocol by evaluating the distance travelled by mice every day (Fig. 4A). The HF + D + Ex group was more active than the other groups in the pre-injection phase ($p < 0.03$), whereas the activity

Table 2 Cumulative caloric and cholecalciferol intakes

Intake/mouse	Period	Group	HF	HF + D	HF + Ex	HF + D + Ex	<i>p</i> value
Energy (Kcal)	W0–W11 (74 days)	Daily	3.9 ± 0.13	3.9 ± 0.03	4.1 ± 0.09	4 ± 0.02	0.35
		Cumulative	287 ± 9.6	294 ± 1.9	305 ± 6.6	293 ± 1.4	0.35
Cholecalciferol VitD3 (IU)	W0–W11 (74 days)	Daily	1.1 ± 0.04	10.8 ± 0.06	1.1 ± 0.02	10.7 ± 0.05	$p < 0.0001$
		Cumulative	79.9 ± 2.7	802 ± 4.9	84.8 ± 1.8	797 ± 3.5	$p < 0.0001$

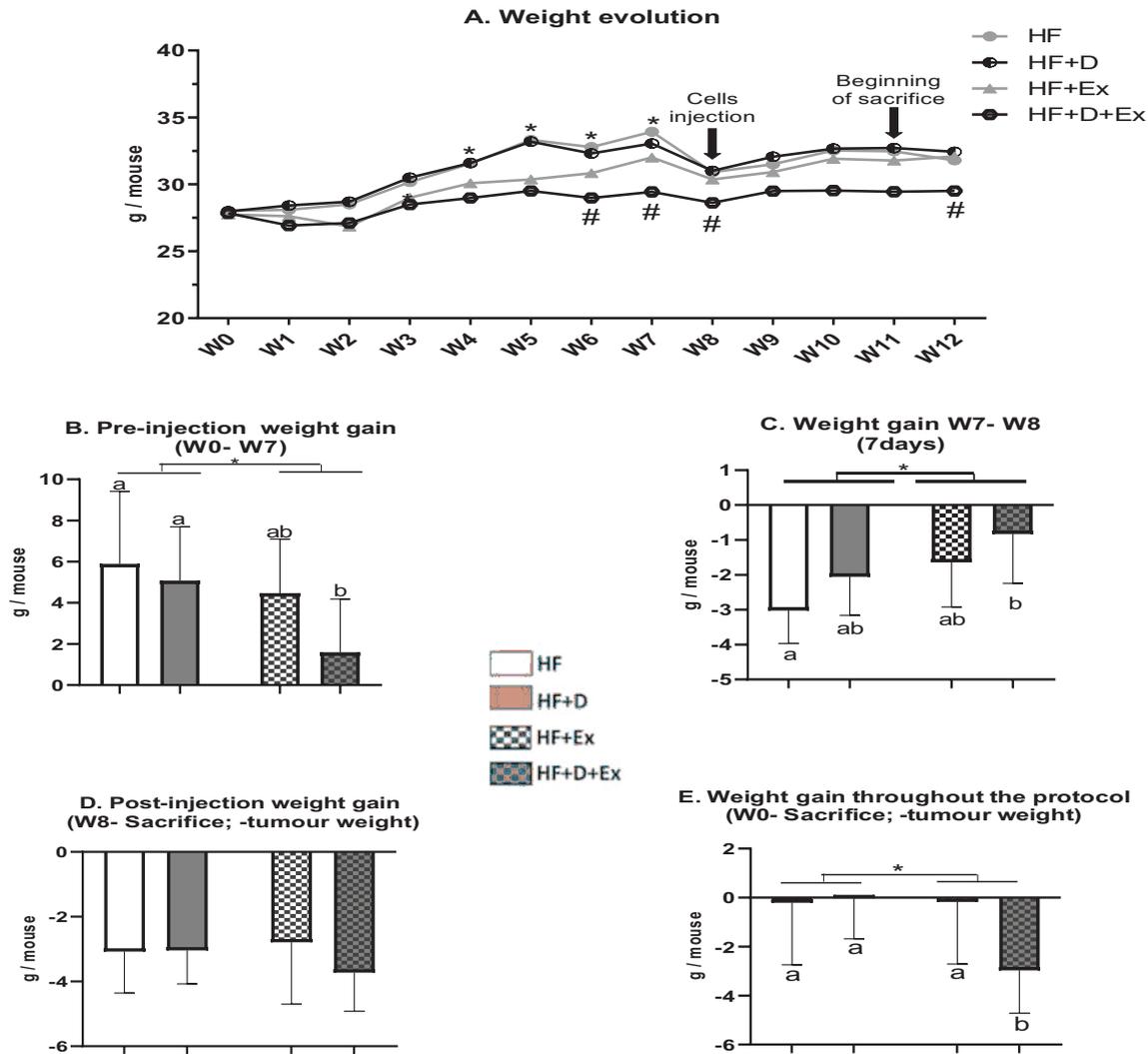


Fig. 2 Weight evolution kinetic and weight gain during the protocol. For all figures, results are shown as mean \pm SEM ($n=10$ by all groups except HF + D group $n=13$ mice). Statistical differences were tested using 2-ways ANOVA followed by Tukey post-test. *Represents the Ex effect according to 2-ways ANOVA. #A and letters C, D, E represent the difference between groups according to Tukey post-test. **A** Body weight evolution during the protocol. Ex effect limiting the weight gain ($*p=0.04$); $#p<0.05$, HF+Ex+D vs HF and HF+D groups. **B** Weight gain before EO771 cells injection. The vitD

($p=0.04$) and Ex ($*p=0.008$) limited the weight gain; a, b: $p<0.05$, HF+Ex+D vs HF and HF+D. Weight gain during the week of EO771 cell injection (W8, 7 days). All groups lost weight. The vitD ($p=0.01$) and Ex ($p=0.001$) reduced the weight loss; a, b: $p=0.001$, HF+Ex+D vs HF. **D** Weight gain from EO771 cells injection (W8) until sacrifice (tumour weight subtracted at sacrifice). **E** Weight gain throughout the whole protocol (tumour weight subtracted at sacrifice). Ex limited the weight gain ($*p=0.03$); a, b: $p=0.01$, HF+Ex+D vs the other groups

of this group fell after tumour cell injection. Furthermore, spontaneous activity also decreased after cell injection for HF + D and HF + Ex (time effect $p=0.02$), whereas HF group kept the same level of activity (Fig. 4A, B).

To clarify the effects of VitD and imposed exercise on spontaneous activity, the spontaneous average distance (SPA) travelled per day per mouse in each group was calculated before (W2–W7) and after tumour cell implantation (W8–W11) (Fig. 4B). We observed SPA travelled before cell injection was significantly greater for HF + D + Ex group (1.7 ± 0.1 km/d/mouse) compared

to the other groups (HF: 1.0 ± 0.07 ; HF + D: 1.13 ± 0.07 ; HF + Ex: 1.2 ± 0.09 km/d/mouse; $p=0.0001$). No difference was observed after the cell injection (W8–W11, Fig. 4B).

The mice subjected to the imposed exercise, ran throughout the protocol on average 0.273 km/day that corresponded from 16% (HF + D + Ex) to 27% (HF + Ex) of their SPA (Fig. 4B).

The maximal speed (MS) of mice was significantly improved between W1 and W7 (W7 vs W-1: $p=0.01$) without significant difference detected between groups whatever

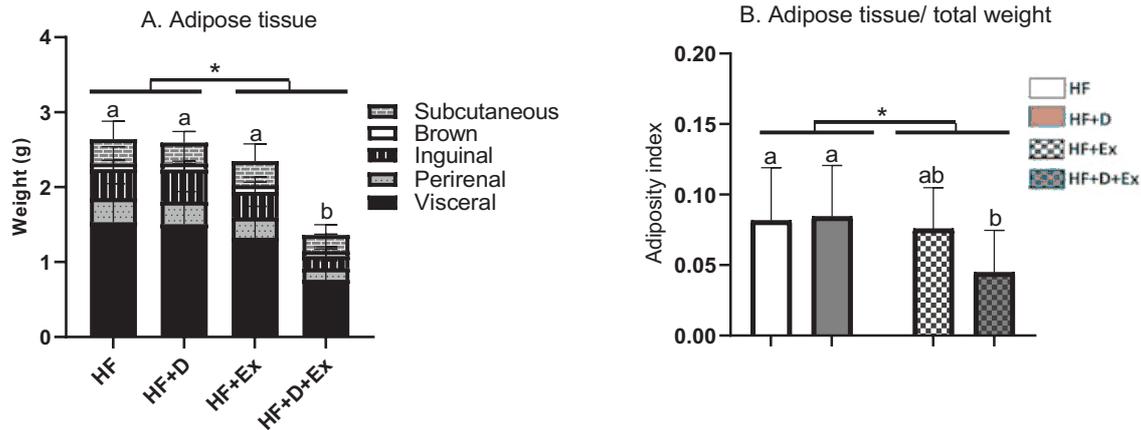


Fig. 3 AT weight and adiposity index at sacrifice. For all figures, results are shown as mean \pm SEM ($n=10$ by all groups except HF + D group $n=13$ mice). Statistical differences were tested using 2-ways ANOVA and Tukey post-test. (*) represents the Ex effect according to 2-ways ANOVA. The letters a and b represent the difference between groups according to Tukey post-test. **A** Distribution and

weight mean of different ATs expressed for one mouse. Ex reduced total and visceral AT ($*p=0.03$); a, b: $p<0.0001$, HF + D + Ex vs other groups. **B** Adiposity index obtained by calculating the ratio between total AT and body weight of animal (tumour weight included). Ex reduced adiposity index ($*p=0.03$); a, b: $p=0.04$, HF + D + Ex vs HF and HF + D

the period (Fig. 4C). MS of all groups was maintained between W7 and W9 (W9 data not shown).

The handgrip max test done at W3 and W7 (Fig. 4D) showed that mice supplemented with VitD enhanced their gripping force ($p=0.001$). HF + D + Ex group showed higher gripping force significantly than the three others ($p=0.01$; Fig. 4D). Globally, the handgrip for all groups at W7 was reduced compared to W3 (time effect $p=0.003$).

The mass of five hindlimbs muscles, dissected and weighed at sacrifice, were similar whatever the groups considered (Table 3).

No effect detected of imposed exercise on tumour growth

The kinetic of tumour growth, regardless of the group considered, was tri-phasic (Fig. 5a). The evolution started slowly and was equivalent whatever the group. Then, an exponential growth phase started from the 16th day and finished the 20th day post-injection for all groups. In the third phase, tumour growth slowed down. Based on the tumour volume limit point, less than 2.5 cm^3 ($\approx 10\%$ BW), the sacrifice began on the 20th day and ended on the 26th day for the HF group mice and the 27th day for HF + Ex, while the end of sacrifice of the two groups supplemented with VitD was delayed 10 days later. Despite this delay, no significant effect of exercise or VitD supplementation on tumour progression and on mouse survival was found (Fig. 5b).

On the 20th day post-injection, corresponding to the 1st day of sacrifice, there was no significant difference in tumour volumes between the different groups (Fig. 5c). In all groups, tumours were found to be necrotic and haemorrhagic. The

imposed exercise raised the final tumour weight ($p=0.008$) and relative tumour weight to body weight at sacrifice (Table 4, $p=0.001$). HF + D + Ex group had significantly greater relative tumour weight (0.087 ± 0.018) than HF (0.068 ± 0.008) and HF + D (0.07 ± 0.01) groups ($p=0.02$). While there was no significant difference either in the volume or in the tumour density between the different groups (Table 4).

VitD abrogated the anti-tumoural immune response induced by exercise

The immune cells infiltration proportion into the tumour was similar whatever the group ($p=0.4$). Noting that the tumour immune infiltrate, identified by flow cytometry from the tumour extract comprising blood, epithelial and tumour cells, was mainly composed of lymphocytes (31–39%), myeloid cells and (3–3.4%) and polynuclear neutrophils (1.6–2.5%) (Table 5). No effect of VitD and/or Ex was observed in the proportion of TAM (CD11b+F4/80+) (Fig. 6A). Opposite effects of exercise and VitD supplementation were observed on the recruitment of Natural Killer (NK: CD49b⁺ DX5⁺ cells) (Fig. 6B). The imposed exercise increased the proportion of NK cells recruited into the tumour (Ex effect $p=0.03$, two-way ANOVA), whereas the VitD supplementation significantly reduced this population (VitD effect $p=0.03$; two-way ANOVA) (Fig. 6B). For HF + D + Ex group, the inhibitory effect of NK recruitment proportion by VitD was dominant (HF: 0.99 ± 0.4 ; HF + D: 0.74 ± 0.4 ; HF + Ex: 6.66 ± 6.03 ; HF + D + Ex: $1.06 \pm 0.5\%$; $p=0.02$).

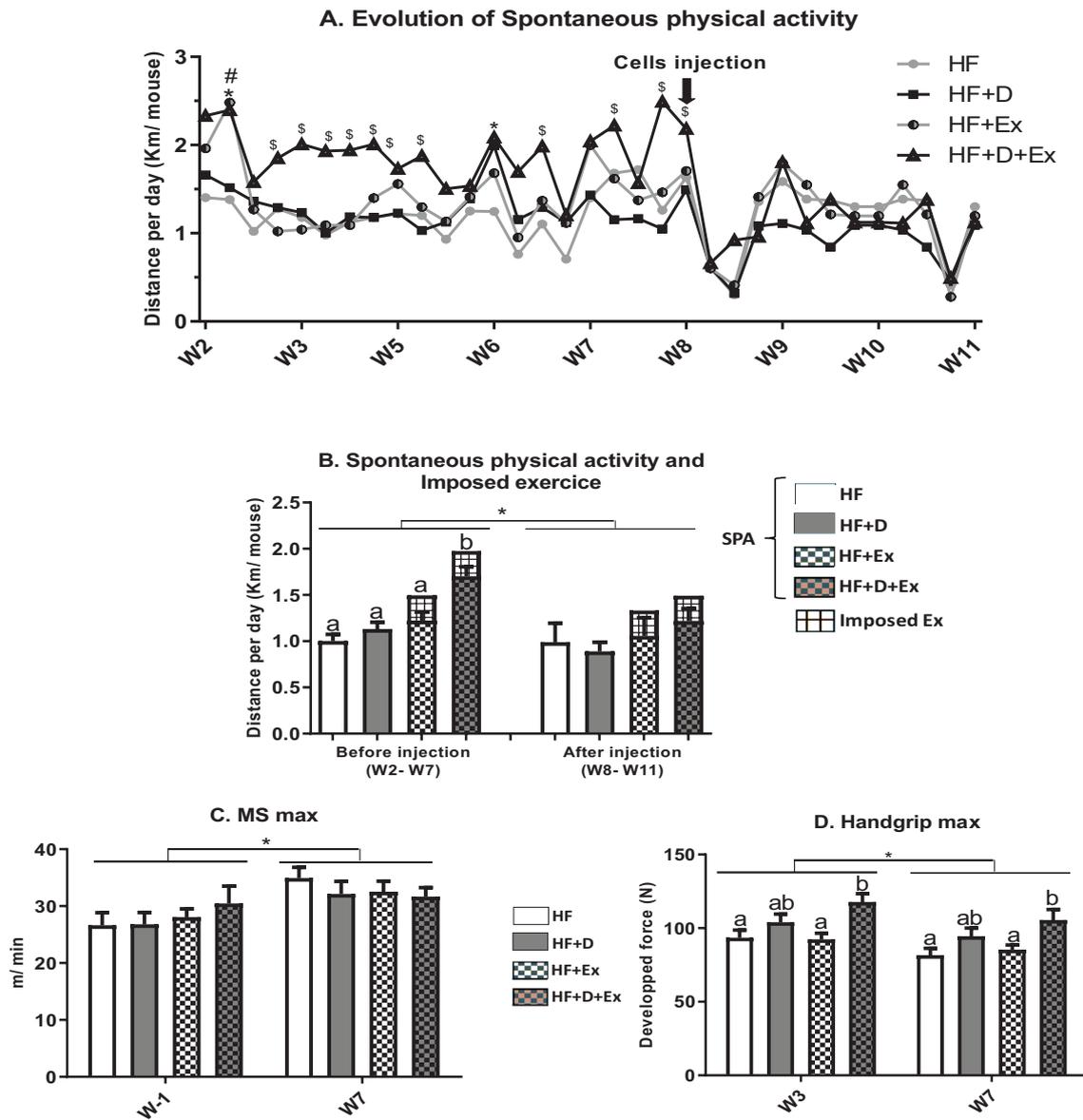


Fig. 4 SPA evolution and functional capacities of mice. For all figures, results are shown as mean \pm SEM ($n=13$ by HF and HF+D, $n=11$ by HF+Ex and HF+D+Ex groups). Statistical differences were tested with 2-ways ANOVA followed by Tukey post-test. (*) represents the Ex effect according to 2-ways ANOVA. [#]A and letters **B**, **D** represent the difference between groups according to Tukey post-test. **A** The evolution of SPA throughout the experimentation until the start of mice's sacrifice. * $p < 0.01$, HF vs HF+D+Ex; [#] $p < 0.05$, HF vs HF+Ex; [§] $p < 0.05$, HF+D+Ex vs other groups. **B** The daily mean distance (Km) traveled by each mouse during spontaneous and imposed physical activity, before and after EO771 cells injection. Before injection (W2–W7) a, b: $p = 0.0001$, HF+D+Ex vs

other groups. Time effect (before vs after cells injection) * $p = 0.02$. The groups involved in imposed exercise travelled the same distance (0.273 km/day/mouse). **C** The maximal speed MS (m/min) of each mouse, measured by running protocol on treadmill with a starting speed of 3 m/min and an acceleration of 3 m/min. MS was evaluated 3 times, at W-1 (before randomization), W7 (before cells injection) and at W9 (data not shown because no difference compared to W7). Time effect (W7 vs. W3) * $p = 0.001$. **D** Handgrip max (N) of mice determined by the forelimb grip test, at W3 and W7 before cells injection. VitD effect improving the handgrip max $p = 0.001$; a, b: $p = 0.01$ HF+D+Ex vs HF and HF+D groups. Time effect (W7 vs. W3) * $p = 0.003$

In response to VitD supplementation, the percentage of T helper 1 lymphocytes (Th1: CD4⁺ CD119⁺ lymphocytes) infiltrated into the tumour decreased significantly ($p = 0.01$, Fig. 6C) while the percentage of T helper 2 (Th2: CD4⁺, CD124⁺ lymphocytes) was not significantly

modified (DxEx interaction $p = 0.07$, Fig. 6D). The lower recruited Th1 resulted in a tendency of reduction of Th1/Th2 ratio ($p = 0.06$, Fig. 6E). T cytotoxic (Tc: CD8⁺) and T regulatory (Treg: CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺) lymphocytes

Table 3 Mass of hindlimb muscles

Muscle weight/mouse (mg)	HF (n=9)	HF+D (n=13)	HF+Ex (n=10)	HF+D+Ex (n=9)	VitD effect <i>p</i> value	Ex effect <i>p</i> value	Interaction <i>p</i> value
Gastrocnemius	233 ± 17.6	236 ± 14.2	229 ± 18.5	224 ± 13.1	0.7	0.1	0.44
Plantaris	29 ± 3.6	30 ± 4.5	30 ± 4.8	27 ± 3.9	0.5	0.7	0.41
Soleus	20 ± 1.7	19 ± 2.1	18 ± 3.8	17 ± 2.4	0.8	0.2	0.5
Tibialis	84 ± 6.4	87 ± 10	79 ± 10.4	84 ± 10.5	0.1	0.1	0.92
Extensor digitorum longus	18 ± 2.6	18 ± 2	18 ± 1.9	18.3 ± 3.5	0.3	0.5	0.66
Total	384 ± 31.9	390 ± 32.8	374 ± 39.4	371 ± 33.4	0.7	0.3	0.4

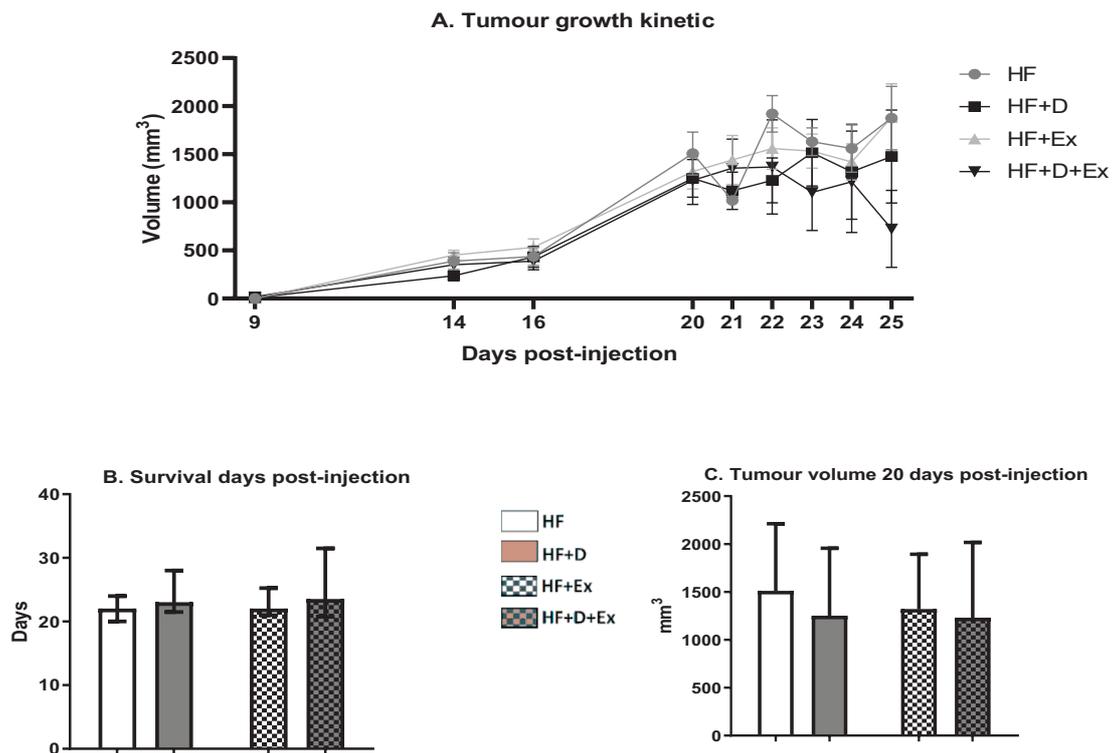


Fig. 5 EO771 tumour growth characteristics. For all figures, *n*=10 by all groups except HF+D group *n*=13 mice. Data was analysed by 2-ways ANOVA. **A** The tumour volume evolution was measured on the 9th, 14th and 16th day and daily from the 20th day post-injection when the sacrifice of the mice having tumour volumes close to 2.5 cm³ was started. the number of mice decreased from the 20th day.

Results are shown as mean ± SEM. **B** Number of survival days of mice after EO771 injection until sacrifice (tumour volume < 2.5 cm³). Results are shown as median with interquartile range. **C** Tumour volume (mm³) 20 days after EO771 cell injection. Results are shown as the means ± SD

proportions and the Tc/Treg ratio were not influenced either by exercise or by VitD (Fig. 6F, G, H).

Discussion

Obesity is associated with an increased risk of breast cancer in the post-menopausal phase. This risk results from a dysregulation of hormonal secretions, a chronic inflammatory environment induced by adipocytes and immune

cells recruited into the AT [1]. Several studies addressed the effect of physical exercise on breast carcinogenesis in mice. Among them, just two studies treated the effect of exercise on breast carcinogenesis under obesogenic diet [30, 31]. However, they were driven with chemically induced tumours in young non-ovariectomised rodents. These models are hardly comparable to ours given that we used a syngeneic tumour model of old ovariectomised mice mimicking a post-menopausal situation.

Table 4 Morphological characteristics of mammary tumours at sacrifice

At sacrifice	HF (n=10)	HF+D (n=13)	HF+Ex (n=10)	HF+D+Ex (n=10)	VitD effect p value	Ex effect p value	Interaction p value	Post-test sig- nificance
Tumour weight W (g)	1.98±0.15	2.11±0.41	2.40±0.15	2.37±0.52	0.6	0.008	0.47	
Total weight (g)	29.8±2.6	30.1±1.7	30.0±2.3	27.3±1.9	0.09	0.1	0.1	
Tumour weight/ total weight	0.068±0.01	0.070±0.01	0.081±0.01	0.087±0.02	0.3	0.001	0.7	HF+D vs HF+D+Ex p=0.02
Tumour volume V (cm ³)	2.33±0.69	2.36±0.63	2.65±0.57	2.36±0.56	0.5	0.4	0.39	
Tumour density V/W (g/cm ³)	0.87±0.07	0.93±0.15	0.95±0.16	1.03±0.19	0.5	0.4	0.7	

Table 5 Tumour immune cells infiltrate proportion

Groups Immune cells (%)	HF (n=4)	HF+D (n=5)	HF+Ex (n=3)	HF+D+Ex (n=5)	VitD effect p value	Ex effect p value	Interaction p value
Total leucocytes	36.3±8.9	42.7±11.5	44.9±17.0	38.2±13.6	0.9	0.8	0.4
Subpopulations (%)							
Lymphocytes	31.7±10.5	38.6±12.4	38.0±21.6	31.6±11.8	0.9	0.9	0.4
Myeloid cells	3.0±1.3	2.6±0.6	4.4±2.6	3.4±1.5	0.4	0.3	0.6
Polynuclear cells	1.6±0.7	1.5±0.5	2.5±2.0	1.8±0.8	0.5	0.3	0.6

In the present study, we compared the effects of ten-fold VitD supply 1225 IU/100 g vs normal supply 125 IU/100 g in mice. Such doses are considered non-toxic for laboratory rodents [32]. We found that supplemented groups showed an increase in plasma concentration of 25-OH D, which demonstrated the effectiveness of the VitD dietary supplementation as reported by Fleet et al. [33].

We observed that HF diet associated to ovariectomised state induced weight gain in all mice. These findings are already reported in C57BL/6 mice [19, 33] and in albino Wistar rats [34].

In our experimental conditions, the practice of moderate-intensity exercise limited the body weight gain apart from any change in food intake whatever the mice group. The limitation of weight gain involved the reduction of total AT, and in particular the visceral AT. These data suggest as previously described that imposed training increases the lipolysis of AT and fatty acids uptake and oxidation to meet the energy requirement compared to SPA alone [35]. Our data are in agreement with those of Deldicque et al. who reported that 60 min of running on treadmill at 12 m/min of speed during 6 weeks reduced the weight gain of 8-old female C57BL/6 fed with high fat diet [36], and with Gaspar et al. who found that exercised obese mice had thermogenesis higher than sedentary obese mice, resulting from stimulation of expression of Uncoupling Protein 1, a protein involved

in the thermogenesis of the brown AT [37]. It is noteworthy that in our study, the imposed exercise corresponded to 16–27% of SPA according to the group of mice considered. This exercise was performed at a speed corresponding to 40% of the average MS of mice, which confirms its moderate level of intensity.

We reported a beneficial effect of VitD supplementation limiting the weight gain. If it is well established that VitD is involved in energy metabolism, the results of experimental studies are controversial. Our results are in agreement with Marcotorchino et al. [15] who showed in 6-old male C57BL/6 that exogenous VitD supply (1500 IU/100 g) limited the weight gain induced by an obesogenic diet, in particular by reducing the expansion of different deposits of AT. Thus, the reduction is explained by an increase in energy expenditure of VitD-supplemented animals linked to the overexpression of genes involved in lipid oxidation and mitochondrial metabolism (peroxisome proliferator-activated receptor α , PPAR γ coactivator-1 α or β , Carnitine palmitoyltransferase I α or β) in different tissues such as liver, brown AT and muscles [15]. Same results were reported by Muhammed et al. in ovariectomised 13 old rats submitted to HF diet supplemented with 1000 IU/100 g of VitD [34]. On the other hand, a VitD supplementation with 1000 IU/100 g for 12 weeks did not influence the weight gain under HF diet (45%) of 5-week-old male C57BL/6 mice [38].

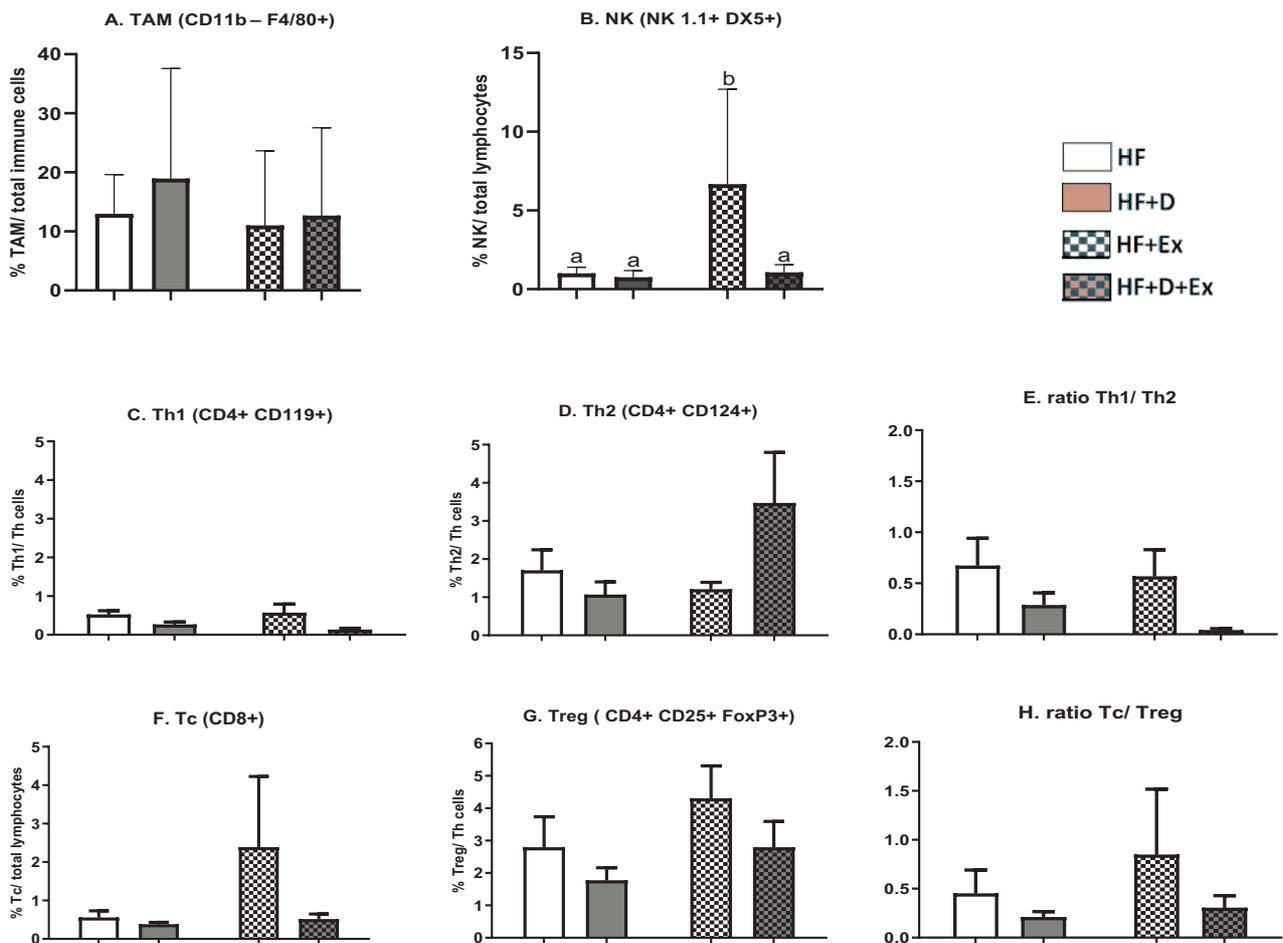


Fig. 6 Immune cell subtype proportions into the tumour. Tumour immune cell phenotype by flow cytometry were carried out by analysing the specific expression of surface markers detected using specific antibody panel. For all figures, data was analyzed by 2-ways ANOVA followed by Tukey post- hoc. Results are means \pm SEM ($n=4-6$ /groups). **A** Relative percentage of tumour-associated macrophages (TAMs: CD11b+ F4/80+cells). **B** Relative percentage of NK (NK1.1+ DX5+) cells. Ex increased NK proportion into the tumour $p=0.03$; vitD decreased NK proportion $p=0.03$ (Ex and vitD

effects: 2-ways ANOVA); a, b: $p=0.02$, HF+Ex vs other groups (Tukey post-test). **C** Relative percentage of Th1 (CD4+ CD119+) lymphocyte. VitD diminished LTh1 proportion into the tumour $p=0.03$ (vitD effect: 2-ways ANOVA); **D** relative percentage of Th2 (CD4+ CD124+) lymphocyte. **E** Ratio Th1/Th2. VitD lowers this ratio $p=0.05$ (vitD effect: 2-ways ANOVA). **F** Relative percentage of CD8+ lymphocytes Tc. **G** Relative percentage of Treg (CD4+ CD25+ FoxP3+). **H** Ratio Tc/Treg

In our experiment, we distinguished two aspects of physical activity, spontaneous by enriched environment and imposed exercise on treadmill. The imposed exercise associated with VitD supplementation strongly limited the weight gain throughout the protocol and fat mass gain without affecting muscle mass. In the group submitted to VitD-enriched diet and imposed exercise, in comparison with the three others, the increased resistance to the obesogenic diet can be explained either by cooperation between the two treatments and/or by the highest SPA found before the injection of EO771 tumour cells.

We showed before cell-injection a beneficial synergistic effect of VitD supply and imposed exercise promoting the SPA as a new and interesting finding. It could be explained

by a better muscle regeneration with VitD supplementation. Actually, Debruin et al. reported that VitD supplementation combined with exercise effectively restored force production and improved fatigue resistance even in muscles weakly activated [39]. After cell-injection, we no longer found this SPA difference which may be due to mice fatigue as a result of the surgery and tumour growth. In our EE conditions, SPA intensity was about 4–5 times greater than the imposed exercise. This point was addressed by Manzanares et al. explaining that mice, when given access to running wheels, can accomplish a total activity time of 3–7 h per day. Indeed, this type of activity is carried out in non-stressed conditions and similar to the natural running behaviour of mice [40].

Concerning the performance tests, no significant effect on MS values was observed whatever the group despite a change in time found between the start of the protocol and after 7 weeks of training. The absence of effect of exercise can be linked to the high level of SPA compared to imposed exercise and/or to the accommodation of mice on such test. The EE, in particular the wheel running can result in robust endurance-like adaptation [40] favouring SPA, and therefore, increasing MS. In this condition, the imposed exercise could be insufficient to have additional effect to that of SPA so MS is not different between groups.

The absence of imposed exercise effect on mouse's handgrip, in our study, disagreed with results of Kan et al. who described an effect of imposed exercise (swimming for 30 min) on the handgrip strength of male 16-month-old mice C57BL/6 J compared to control group [40]. However, the grip strength was greater in the group submitted to VitD supply and imposed exercise compared to other groups. Thus, according to Kan et al.'s study [41] showing that muscle strength is positively correlated with forelimb grip strength, we report beneficial synergistic effects of VitD and imposed exercise on the mice muscle strength.

In our experimental conditions, the total weight loss in the group submitted to VitD supplementation and imposed exercise mainly involved the adipose mass without affecting hindlimb muscle mass which were similar whatever the mice group considered. Indeed, such moderate-intensity exercise does little to alter the muscular mass and function when SPA is sustained. This regular physical activity can contribute to maintain the lean muscle mass and to limit the metabolic impact of mammary tumour development [8, 42].

The muscle mass was not affected by VitD supplementation alone as recently reported in Hayes et al.'s study in which a high intake of VitD (standard diet + 2000 IU/100 g for 4 weeks) did not alter the mass of extensor digitorum longus and soleus [43].

In our study, we have not detected any effect of VitD supplementation on EO771 tumour growth or on mouse survival. These findings are in disagreement with Swami et al.'s study in which a VitD-supplementation (530 IU/100 g) of 16-week-old, obese and ovariectomised C57BL/NCr mice for 6 weeks following the syngeneic injection of Mmtv-wnt1 mammary tumour cells, reduced the tumour growth and prolonged mouse survival by 67% compared to the control group [19]. Thus, in tumour microenvironment, the supply of VitD induced a defect in the expression of aromatase, oestrogen receptor and Cyclooxygenase 2, leading to a decrease in production in situ of oestrogen and Prostaglandin E2, a down-regulation of leptin receptor and an up-regulation of adiponectin receptor. In addition, VitD reduced the metabolic effects of obesity by limiting insulin resistance, reducing leptin action and conversely activating that of adiponectin [19]. Thus, VitD exerts multiple beneficial effects

specifically relevant for obesity breast cancer by acting via several local and systemic mechanisms. In a recent study, VitD supplementation (40 IU/day per mouse) after one week of EO771 tumour cells implantation increased tumour progression in 7-week-old female C57BL/6 mice subjected to high fat diet while limiting it under standard diet [44].

Although no effect of imposed exercise was detected on the progression of the tumours, the tumour's weights at sacrifice were greater in the trained groups without affecting the tumour's densities. This observation may be linked to an increase in tumour vascularisation associated with the inhibition of hypoxia and tumour growth mediated by a proapoptotic Fas-dependent pathway as previously described [9].

On the immune side, it has been reported that the diet-induced obesity promotes an inflammatory tumour environment with an increase in pro-inflammatory Th1 and Tc lymphocytes, and a decrease in anti-inflammatory Treg cells [45]. Inversely, it has been reported that mammary cancer triggers immunosuppression state in the tumour, whether under standard or HF diet, by promoting the recruitment of anti-inflammatory cells Th2, Treg and M2 macrophages, which support tumour development and stimulate angiogenesis [46, 47]. In our model, the total leucocytes, lymphocytes, myeloid and polynuclear cell infiltration proportions were not influenced by the VitD supplementation or by the imposed exercise while these two treatments modified the immune population's proportions in opposite ways. Indeed, VitD inhibited Th1 recruitment into the tumour and subsequently decreased Th1/Th2 ratio, which could promote an anti-inflammatory environment. Note that, we used specific membrane markers to phenotype Th1 (CD119) and Th2 (CD124). These markers are cytokine receptors, i.e. IFN γ R1-CD119, receptor of IFN gamma which is known to be expressed in Th1 [48] and IL-4R1-CD124, mostly responsible for Th2 cell expansion by mediating IL-4-dependent activation of the transcription factors in hematopoietic cells [49].

In addition, VitD prevented the recruitment of NK cells into the tumour. NK cells are innate lymphocytes that play a major role in cancer immunosurveillance and exert cytotoxic anti-tumour responses [50]. Such immunosuppressive role of VitD is reported in various experimental mammary cancer models in which VitD supplementation under high fat diet stimulated tumour growth with reduction in Tc cells [44], and induced the prevalence of Th2 and Treg cells [51]. In their model, authors reported also an immunosuppressive effect of vitD by reducing the proportion of NK cells in lymph nodes close to mammary glands [51]. In our study, the imposed exercise improved the tumour recruitment of NK, recognised to be the most exercise sensitive immune cells [52]. The increase of IL-6 secretion during exercise stimulates NK proliferation and

their distribution towards tumour site [11, 53]. Different studies have reported the stimulation of NK infiltration in mammary tumour by exercise, and of other anti-tumour immune cells as Tc and Th1 lymphocytes [53]. The absence of significant effect of exercise on such immune cells may be related to its moderate intensity. More training conditions with different exercise intensities warrant to be explored.

Conclusion

In our experimental conditions based on EE (wheel, nest and toys), VitD supplementation and imposed physical exercise had synergetic effects reducing the weight gain under high fat diet and improving the physical capacities of mice. However, the imposed physical exercise, although it improved the immune vigilance, did not reduce tumour growth conversely to what we expected and reported in the literature. This can be explained by the greater level of the spontaneous activity compared to the imposed exercise in our model. We emphasised that moderate imposed exercise could not have an additional anti-tumoural effect since its level is too weak comparing to spontaneous activity. VitD supplementation did not have a detectable effect on tumour growth, this may result from the balance between its direct apoptotic cytotoxic effect on tumour cells and its immunosuppressive protumoural effect. Taken together, VitD supplementation and physical exercise promote a tolerogenic immune environment without effect on mammary tumour growth.

This EO771 tumour-bearing C57BL/6 mouse model presents the great interest of developing an immunocompetent and orthotopic neoplasia very close to human breast cancer. It is promising to test the efficacy of preventive or therapeutic approaches including nutritional interventions and physical exercise in housing conditions mimicking the mouse's usual lifestyle with social interactions and spontaneous activities.

Author contributions JT, MCF, AR, MDA and MPV participated in the scientific discussions for the establishment of the experiments. SA, JT and MPV were the major contributors in writing the manuscript, analysing and interpreting the data. SA, AD, SR, NG-M, ALN, DLG, MCF and JT participated in the experimentations. SA and AD carried out the laboratory and statistical analysis supervised by JT, MCF and MPV, LMH and IM contributed to the realization of the imposed physical exercise protocol. All the authors approved the final version of the manuscript.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest None of the authors has any conflict of interest to report. The authors are responsible for the content and writing of the paper.

Competing interests The authors declare that they have no competing interests.

Availability of data and materials The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Ethics approval This study was approved by the Animal Experimental Committee (Comité Régional d'Éthique sur l'Expérimentation Animale, No. 01095.02, Clermont-Ferrand, France) and carried out in accordance with the ethical guidelines.

References

- McTiernan A (2003) Behavioral risk factors in breast cancer: can risk be modified? *Oncologist* 8(4):326–334. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.8-4-326>
- Atoum MF, Alzoughool F, Al-Hourani H (2020) Linkage between obesity leptin and breast cancer. *Basic Clin Res.* <https://doi.org/10.1177/117822341989845>
- Kraschnewski JL, Schmitz KH (2017) Exercise in the prevention and treatment of breast cancer: what clinicians need to tell their patients. *Curr Sports Med Rep* 16(4):263–267. <https://doi.org/10.1249/jsr.0000000000000388>
- Adraskela K, Veisaki E, Koutsilieris M, Philippou A (2017) Physical exercise positively influences breast cancer evolution. *Clin Breast Cancer* 17(6):408–417. <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2017.05.003>
- Pudkasam S, Tangalakis K, Chinlumprasert N, Apostolopoulos V, Stojanovska L (2017) Breast cancer and exercise: the role of adiposity and immune markers. *Maturitas* 105:16–22. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2017.04.022>
- Nithianantharajah J, Hannan AJ (2006) Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 7:697–709. <https://doi.org/10.1038/nrn1970>
- Nachat-Kappes R, Pinel A, Combe K, Lamas B, Farges M-C et al (2012) Effects of enriched environment on COX-2, leptin and eicosanoids in a mouse model of breast cancer. Coleman WB, editor. *PLoS ONE* 7(12):e51525. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051525>
- Le Guennec D, Hatte V, Farges M-C, Rougé S, Goepp M et al (2020) Modulation of inter-organ signalling in obese mice by spontaneous physical activity during mammary cancer development. *Sci Rep* 10(1):76–87. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65131-9>
- Betof AS, Christopher DL, Douglas W, Chelsea L, Scarbrough PM et al (2015) Modulation of murine breast tumour vascularity, hypoxia, and chemotherapeutic response by exercise. *JNCI J Natl Cancer Inst* 107(5):1–5. <https://doi.org/10.1093/jnci/djv040>
- Goh J, Tsai J, Bammler TK, Farin FM, Endicott E et al (2013) Exercise training in transgenic mice is associated with attenuation of early breast cancer growth in a dose-dependent manner. Lucia A, editor. *PLoS ONE* 8(11):e80123. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080123>

11. Wennerberg E, Lhuillier C, Rybstein MD, Dannenberg K, Rudqvist N-P et al (2020) Exercise reduces immune suppression and breast cancer progression in a preclinical model. *Oncotarget* 11(4):452–461. <https://www.oncotarget.com/fulltext/27464>
12. Holick MF (2011) VitD: a d-lightful solution for health. *J Investig Med* 59:872–880. <https://doi.org/10.2310/JIM.0b013e318214ea2d>
13. De La Puente-Yagüe M, Cuadrado-Cenzual MA, Ciudad-Cabañas MJ, Hernández-Cabria M, Collado-Yurrita L (2018) VitD: and its role in breast cancer. *Kaohsiung J Med Sci* 34(8):423–427. <https://doi.org/10.1016/j.kjms.2018.03.004>
14. Lopes N, Sousa B, Martins D, Gomes M, Vieira D (2012) Alterations in VitD signaling and metabolic pathways in breast cancer progression: a study of VDR, CYP27B1 and CYP24A1 expression in benign and malignant breast lesions. *BMC Cancer* 10(483):1–10. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-483>
15. Marcotorchino J, Tourniaire F, Astier J, Karkeni E, Canault M et al (2014) VitD protects against diet-induced obesity by enhancing fatty acid oxidation. *J Nutr Biochem* 25(10):1077–1083. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.05.010>
16. Hyppönen E, Boucher BJ (2018) Adiposity VitD requirements, and clinical implications for obesity-related metabolic abnormalities. *Nutr Rev* 76(9):678–692. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuy034>
17. Landrier J-F, Karkeni E, Marcotorchino J, Bonnet L, Tourniaire F (2016) VitD modulates adipose tissue biology: possible consequences for obesity? *Proc Nutr Soc* 75(1):38–46. <https://doi.org/10.1017/S0029665115004164>
18. Abbas MA (2017) Physiological functions of VitD in adipose tissue. *J Steroid Biochem Mol Biol* 165:369–381. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.08.004>
19. Swami S, Krishnan AV, Williams J, Aggarwal A, Albertelli MA et al (2016) VitD mitigates the adverse effects of obesity on breast cancer in mice. *Endocr Relat Cancer* 23(4):251–264. <https://doi.org/10.1530/ERC-15-0557>
20. Machado MRM, de Sousa A-F, De Luca VH, Schmitt EB, Nahas-Neto J et al (2019) Low pretreatment serum concentration of VitD at breast cancer diagnosis in postmenopausal women. *Menopause* 26(3):293–299. <https://doi.org/10.1097/GME.0000000000001203>
21. Neuhauser ML, Sorensen B, Hollis BW, Ambis A, Ulrich CM et al (2008) VitD insufficiency in a multiethnic cohort of breast cancer survivors. *Immunotherapy* 10(7):555–566. <https://doi.org/10.2217/imt-2017-0131>
22. Crew KD, Shane E, Cremers S, McMahon DJ, Irani D et al (2009) High prevalence of VitD deficiency despite supplementation in premenopausal women with breast cancer undergoing adjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol* 27(13):2151–2156. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.19.6162>
23. Napoli N, Vattikuti S, Cynthia M, Rastelli A, Rayani A et al (2010) High prevalence of low VitD and musculoskeletal complaints in women with breast cancer. *Breast J* 16(6):609–616. <https://doi.org/10.1111/j.1524-4741.2010.01012.x>
24. Vashi PG, Trukova K, Lammersfeld CA, Braun DP, Gupta D (2010) Impact of oral VitD supplementation on serum 25-hydroxyvitD levels in oncology. *Nutr J* 9:60–69. <https://www.nutritionj.com/content/9/1/60>
25. Aguirre M, Manzano N, Salas Y, Angel M, Díaz-Couselo FA, et al (2016) VitD deficiency in patients admitted to the general ward with breast, lung and colorectal cancer in Buenos Aires, Argentina. *Arch Osteoporos* 11:1–4. <https://doi.org/10.1007/s11657-015-0256-x>
26. Sofi NY, Jain M, Kapil U, Seenu V, Kamal VK et al (2018) Nutritional risk factors and status of serum 25(OH)D levels in patients with breast cancer: a case control study in India. *J Steroid Biochem Mol Biol* 175:200–204. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.11.003>
27. Welsh J (2004) VitD and breast cancer: insights from animal models. *Am J Clin Nutr* 80:1721S–S1724. <https://doi.org/10.1093/ajcn/80.6.1721S>
28. Cao Y, Du Y, Liu F, Feng Y, Cheng S et al (2018) VitD aggravates breast cancer by inducing immunosuppression in the tumour bearing mouse. *Immunotherapy* 10(7):555–566. <https://doi.org/10.2217/imt-2017-0131>
29. Ayachi M, Niel R, Momken M, Billat VL, Mille-Hamard L (2016) Validation of a ramp running protocol for determination of the true VO₂max in mice. *Front Physiol* 7(372):1–7. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00372>
30. Thompson HJ, RoÅ AM (1988) Effect of exercise on the induction of mammary carcinogenesis. *Cancer Res* 48(10):2720–2723
31. Barra NG, Fan IY, Gillen JB, Chew M, Marcinko K et al (2017) High intensity interval training increases natural killer cell number and function in obese breast cancer-challenged mice and obese women. *J Cancer Prev* 22(4):260–266. <https://doi.org/10.15430/JCP.2017.22.4.260>
32. Fleet JC, Gliniak C, Zhang Z, Xue Y, Smith KB et al (2008) Serum metabolite profiles and target tissue gene expression define the effect of cholecalciferol intake on calcium metabolism in rats and mice. *J Nutr* 138:1114–1120
33. Ludgero-Correia A, Aguila MB, Mandarin-de-Lacerda CA, Faria TS (2012) Effects of high-fat diet on plasma lipids, adiposity, and inflammatory markers in ovariectomized C57BL/6 mice. *Nutrition* 28(3):316–323. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2011.07.014>
34. Muhammad MH, Hussien NI, Elwia SK (2020) VitD replacement mitigates menopause-associated dyslipidaemia and atherogenic indices in ovariectomized rats; a biochemical study. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 128(03):144–151. <https://doi.org/10.1055/a-0934-5666>
35. Noland RC (2015) Exercise and regulation of lipid metabolism. *Prog Mol Biol Transl Sci* 135:39–74. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2015.06.017>
36. Deldicque L, Cani PD, Delzenne NM, Baar K, Francaux M (2013) Endurance training in mice increases the unfolded protein response induced by a high-fat diet. *J Physiol Biochem* 69(2):215–225. <https://doi.org/10.1007/s13105-012-0204-9>
37. Gaspar RC, Muñoz VR, Kuga GK, Nakandakari SCBR, Minuzzi LG et al (2019) Acute physical exercise increases leptin-induced hypothalamic extracellular signal-regulated kinase1/2 phosphorylation and thermogenesis of obese mice. *J Cell Biochem* 120(1):697–704. <https://doi.org/10.1002/jcb.27426>
38. Lee GY, Park CY, Cha KS, Lee SE, Pae M et al (2018) Differential effect of dietary VitD supplementation on natural killer cell activity in lean and obese mice. *J Nutr Biochem* 55:178–184. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.01.004>
39. Debruin DA, Timpani CA, Lalunio H, Rybalka E, Goodman CA et al (2020) Exercise may ameliorate the detrimental side effects of high VitD supplementation on muscle function in mice. *J Bone Miner Res* 35(6):1092–1106. <https://doi.org/10.1002/jbmr.3985>
40. Manzanares G, Brito-da-Silva G, Gandra PG (2019) Voluntary wheel running: patterns and physiological effects in mice. *Braz J Med Biol Res* 52(1):e7830. <https://doi.org/10.1590/1414-431x20187830>
41. Kan NW, Ho CS, Chiu YS, Huang WC, Chen PY et al (2016) Effects of resveratrol supplementation and exercise training on exercise performance in middle-aged mice. *Molecules* 21(5):661. <https://doi.org/10.3390/molecules21050661> ((1–12))
42. Malnouri SM, Chekachak S, Soudi S, Quinn LS, Ranjbar K (2017) Combined effect of aerobic interval training and selenium nanoparticles on expression of IL-15 and IL-10/TNF- α ratio in skeletal muscle of 4T1 breast cancer mice with cachexia. *Cytokine* 90:100–108. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2016.11.005>

43. Hayes A, Rybalka E, Debruin DA, Hanson ED, Scott D, Sanders K (2019) The effect of yearly-dose VitD supplementation on muscle function in mice. *Nutrients* 11(5):1097. <https://doi.org/10.3390/nu11051097>
44. Karkeni E, Morin SO, Bou Tayeh B, Goubard A, Josselin E et al (2019) VitD controls tumour growth and CD8+ T cell infiltration in breast cancer. *Front Immunol* 10:12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01307>
45. Morin SO, Poggi M, Alessi MC, Landrier JF, Nunes JA (2017) Modulation of T cell activation in obesity. *Antioxid Redox Signal* 26(10):489–500. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6746>
46. Wen SW, Sceneay J, Lima LG, Wong CSF, Becker M et al (2016) The biodistribution and immune suppressive effects of breast cancer-derived exosomes. *Cancer Res* 76(23):6816–6827. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0868>
47. Zhao G, Zhou S, Davie A, Su Q (2012) Effects of moderate and high intensity exercise on T1/T2 balance. *EIR* 18:98–114 (PMID: 22876723)
48. Pianta S, Bonassi Signoroni P, Muradore I, Rodrigues FM, Rossi D et al (2015) Amniotic membrane mesenchymal cells-derived factors skew T cell polarization toward Treg and downregulate Th1 and Th17 Cells Subsets. *Stem Cell Rev Rep* 11(3):394–407. <https://doi.org/10.1007/s12015-014-9558-4>
49. Noval Rivas M, Burton OT, Wise P, Charbonnier LM, Georgiev P et al (2015) Regulatory T cell reprogramming toward a Th2-cell-like lineage impairs oral tolerance and promotes food allergy. *Immunity* 42(3):512–523. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.02.004>
50. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S (2008) Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* 9(5):503–510. <https://doi.org/10.1038/ni1582>
51. Pawlik A, Anisiewicz A, Filip-Psurska B, Nowak M, Turlej E et al (2018) Calcitriol and its analogs establish the immunosuppressive microenvironment that drives metastasis in 4T1 mouse mammary gland cancer. *Int J Mol Sci* 19(7):2116. <https://doi.org/10.3390/ijms19072116> ((1–23))
52. Timmons BW, Cieslak T (2008) Human Natural Killer cell subsets and acute exercise: a brief review. *Exerc Immunol Rev* 14:8–23 (PMID: 19203081)
53. Wang B, Xu H, Hu X, Ma W, Zhang J et al (2020) Synergetic inhibition of daidzein and regular exercise on breast cancer in bearing-4T1 mice by regulating NK cells and apoptosis pathway. *Life Sci* 245:117387. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117387>

Affiliations

Sahar Aldekker¹ · Adrien Desiderio¹ · Marie-Chantal Farges¹ · Stéphanie Rougé¹ · Augustin Le Naour¹ · Delphine Le Guennec¹ · Nicolas Goncalves-Mendès¹ · Laurence Mille-Hamard² · Iman Momken^{2,3} · Adrien Rossary¹ · Mona Diab-Assaf⁴ · Marie-Paule Vasson¹ · Jérémie Talvas¹ 

¹ Human Nutrition Unit, ECREIN Team, UMR 1019 INRAE/UCA, CRNH-Auvergne, BP 10448, 63000 Clermont-Ferrand, France

² Integrative Biology of Exercise Adaptations Unit, Evry University, Paris Saclay University, 91000 Evry-Courcouronnes, France

³ Faculty of Pharmacy, Inserm, UMR-S 1180, Paris-Saclay University, 92290 Châtenay-Malabry, France

⁴ Molecular Tumorigenesis and Anticancer Pharmacology, EDST, Lebanese University, Hadath, Lebanon

DISCUSSION

Les données bibliographiques montrent des résultats contradictoires vis-à-vis du rôle immunomodulateur de la VitD et de son implication dans la survenue et la progression du cancer mammaire. Ainsi l'objectif global de mon sujet de thèse était d'étudier l'effet immunomodulateur de la VitD et son impact sur le développement tumoral mammaire par trois approches expérimentales précliniques. Dans un modèle *ex vivo*, nous avons évalué l'effet d'une supplémentation en VitD sur des PBMC isolées de donneurs sains. A partir de lignées murines d'adénocarcinome mammaire EO771 et de macrophage IC-21 nous avons caractérisé *in vitro* les effets antiprolifératif et immunomodulateur de la VitD. Nous avons complété ce travail par un modèle *in vivo* de développement tumoral chez la souris C57BL/6 associé à une intervention nutritionnelle (régime obésogène) et à un protocole d'activité physique imposée (course sur tapis) et spontanée (hébergement en environnement enrichi).

Les cellules immunocompétentes, PBMC et macrophages, sont-elles sensibles à la VitD?

Les deux approches *ex vivo* et *in vitro* montrent que les PBMC isolées de donneurs sains et les macrophages murins IC-21 expriment en basal le récepteur de la VitD (VDR) leur conférant ainsi la capacité de répondre aux effets génomiques et non génomiques de la VitD. De plus, nous confirmons que les PBMC peuvent métaboliser la 25D puisqu'elles expriment le gène *CYP27B1* codant pour la 1 α -hydroxylase, qui convertit la 25(OH)D (25D) en 1,25(OH) $_2$ D (1,25D) par hydroxylation du carbone en position 1 α , et le gène *CYP24A1* codant pour la 24-hydroxylase, qui inactive toutes les formes de VitD par hydroxylation du carbone en position 24. Les IC-21 expriment également ces deux enzymes aux niveaux génique et protéique.

Les PBMC, en présence de 25D à différentes doses simulant des situations de carence, de déficience physiologique ou supra-physiologique, ont été incubées avec ou sans immunostimulant choisi pour mimer un agent bactérien (lipopolysaccharide, LPS) ou viral (Poly I:C, PIC). Nous n'observons pas pour les PBMC de variation significative de l'expression des gènes *CYP24A1*, *CYP27B1* et *VDR*, même si *CYP24A1* semble être surexprimé en conditions non stimulée et stimulée par le LPS et, *CYP27B1* uniquement en condition stimulée par le LPS.

Pour les macrophages IC-21, nous avons comparé les effets de différentes doses de 25D et de 1,25D sur les expressions génique et protéique du Vdr, de Cyp27b1 et Cyp24a1. L'expression génique du *Vdr* est réprimée par la dose supra-physiologique de 1,25D. Nous émettons l'hypothèse qu'une telle répression peut être associée au rétrocontrôle négatif de la 1,25D sur sa propre voie de signalisation. Nos résultats sont en désaccord avec l'étude d'Uchida et al. qui montre une tendance à la surexpression génique du VDR dans les monocytes THP1 en présence de 1,25D ([Uchida et al. 2016](#)).

Nous observons que la 25D et la 1,25D induisent la surexpression de la protéine VDR comme précédemment décrit dans différentes lignées de macrophages pour la 1,25D ([Uchida et al. 2016](#); [Carbone et al. 2016](#); [Ma et al. 2017](#)). L'expression génique et protéique de Cyp27b1 n'est pas significativement modifiée quelque soit le traitement des cellules, ce qui conforte des travaux antérieurs sur les THP-1 et les macrophages murins ([Monkawa et al. 2000](#); [Overbergh et al. 2000](#)). Dans notre étude, seule l'expression génique de Cyp24a1 est induite par la 1,25D, en concordance avec des études précédentes ([Monkawa et al. 2000](#); [Amano et al. 2009](#); [Uchida et al. 2016](#)) et peut être expliquée par un rétrocontrôle négatif de la 1,25D sur sa propre synthèse. En revanche, la 25D stimule l'expression protéique du Cyp24a1 sans modifier son expression génique, comme déjà décrit pour les macrophages murins ([Merriman et al. 2018](#)). Dans nos conditions expérimentales, nous établissons donc une différence d'effets entre la 1,25D et la 25D sur les expressions génique et protéique du VDR et des acteurs du métabolisme de la VitD, ce qui pose la question du mode d'action de ces deux formes de VitD au niveau cellulaire, de leur modalité d'entrée dans les cellules, de leur mode d'action et des cinétiques d'expression des VDR, Cyp27b1 et Cyp24a1. Nous confirmons que les cellules immunocompétentes expriment la machinerie nécessaire pour répondre aux variations d'apport en VitD, ce qui conforte le rôle de la VitD dans la modulation des réponses immunitaires.

Les cellules d'adénocarcinome mammaire murin EO771 sont-elles sensibles à la VitD?

A notre connaissance, aucune étude ne s'est intéressée jusqu'alors à l'expression du VDR et des acteurs du métabolisme de la VitD dans les cellules EO771. Ainsi, nous sommes les premiers à établir que cette lignée d'adénocarcinome murin exprime à l'état basal les ARNm et les protéines du VDR, de Cyp27b1 et de Cyp24a1. Nous avons comparé l'effet des deux formes de la VitD, 1,25D et 25D, sur l'expression de ces trois acteurs de son métabolisme (VDR, Cyp27b1 et Cyp24a1).

Nous avons observé que la 25D n'a pas d'effet significatif sur les expressions génique et protéique du VDR. En revanche, la 1,25D réduit l'expression génique du VDR et stimule son expression protéique. Cette différence de réponses aux niveaux génique et protéique dans l'expression du VDR peut être due à des modifications post-transcriptionnelles. La stimulation de la synthèse protéique du VDR par la 1,25D est rapportée antérieurement dans plusieurs lignées tumorales mammaires murines ([Keith et al. 2014](#)) et humaines ([Trivedi et al. 2017](#)).

Nous avons établi que les expressions génique et protéique de Cyp27b1 ne sont pas influencées par la 1,25D. Ces résultats sont en accord avec des travaux antérieurs ([Kemmis et al. 2006](#)). Cependant, les expressions génique et protéique de Cyp27b1 sont induites par la 25D, ce qui est en désaccord avec une étude précédente montrant que le traitement par la 25D ne modifie pas la transcription de Cyp27b1 dans différentes lignées de tumeur mammaire murine et humaine ([Richards et al. 2015](#)). Dans nos conditions expérimentales, la 1,25D n'a pas modifié ni la transcription ni la traduction de

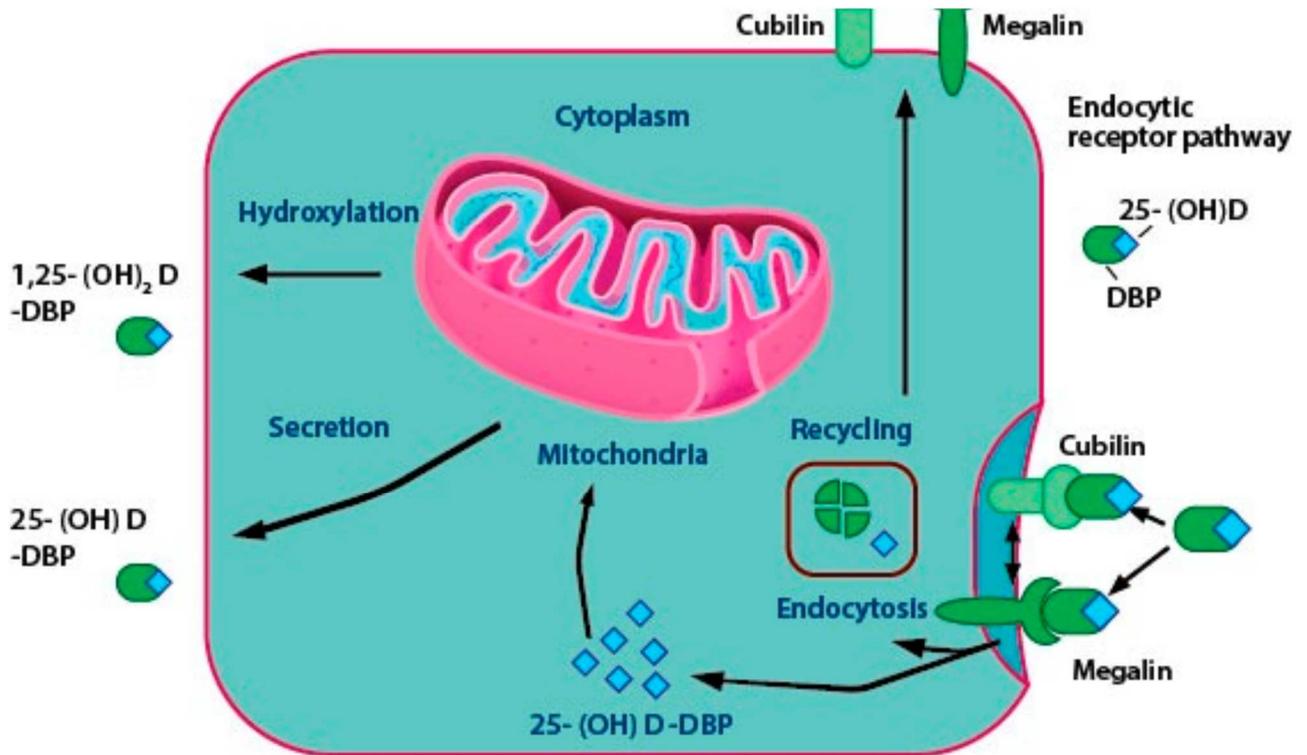


Figure 40. Rôles des protéines endocytiques dans la délivrance de la 25D et de la 1,25D dans la cellule cancéreuse

La majorité de la 25D circulante est liée à la DBP et pénètre dans la cellule par endocytose *via* la mégaline et la cubiline. La DBP est dégradée et la 25D est soit convertie en 1,25D dans les mitochondries par l'enzyme CYP27B1, soit sécrétée dans la circulation où elle se lie à la DBP. La cubiline et la mégaline regagnent ensuite la surface cellulaire et le cycle se répète (*Sirajudeen, Shah, and Al Menhali 2019*).

Cyp24a1, ce qui est en contradiction avec les études précédentes dans lesquelles l'expression de l'ARNm de Cyp24a1 est significativement induite par la 1,25D (40 et 80 ng/ml) dans les cellules tumorales mammaires (*Kemmis et al. 2006; Beaudin, Robilotto, and Welsh 2015; Richards, Weierstahl, and Kelts 2015*). Dans ces études ce sont des doses pharmacologiques de 1,25D qui sont testées, de l'ordre de 1000 fois la dose supra-physiologique que nous avons utilisée. Dans nos conditions expérimentales, la 25D stimule l'expression à la fois génique et protéique de Cyp24a1, en concordance avec d'autres études (*Richards, Weierstahl, and Kelts 2015*).

Les effets cellulaires différents de 25D et 1,25D sont probablement en partie reliés à leurs modes de transport et de captation par les cellules. La majorité de la VitD et de ses métabolites est transportée par une protéine spécifique, la DBP (Vitamin D binding protein) et par l'albumine. Le complexe 25D-DBP pénètre dans la cellule cancéreuse mammaire par simple diffusion ou par endocytose à l'aide de protéines membranaires telles que la cavéoline, la cubiline et la mégaline (Figure 40). La DBP est une protéine de liaison aux stéroïdes et agit comme une molécule porteuse de 25D. Elle a une affinité plus élevée pour 25D et 24,25 (OH)₂D que la VitD ou la 1,25D. Il a été mis en évidence que certaines cellules cancéreuses mammaires humaines n'expriment pas l'ensemble de ces protéines. C'est le cas des MCF-7 qui n'expriment pas la mégaline et qui sont ainsi incapables d'internaliser le complexe 25D ou 1,25D liées à la DBP présente dans le milieu de culture enrichi par le sérum fœtal (*Rowling et al. 2006*). La détermination de l'expression de ces protéines d'endocytose par les cellules EO771 nous aiderait à préciser l'interprétation de nos résultats.

Nous établissons, pour la première fois à notre connaissance que les cellules EO771 répondent à la VitD, de façon différente selon le métabolite testé (25D ou 1,25D) et qu'elles expriment la machinerie nécessaire pour pouvoir s'adapter aux variations de concentration de la 1,25D dans leur environnement.

Les deux métabolites de la VitD, 25D et 1,25D, ont-ils des effets antiprolifératifs?

Les données bibliographiques indiquent que la VitD régule la prolifération, la différenciation et l'apoptose cellulaires. Dans une étude précédente (*Ma et al. 2017*) la 1,25D inhibait la prolifération cellulaire des macrophages *via* la sous-expression de KLF5 (Kruppel-like factor 5) dont le rôle est d'induire l'expression des régulateurs du cycle cellulaire, cycline B1 et Cdk1/Cdc2, par son interaction avec la sous-unité p50 de NF-κB. Partant de ces données, nous avons souhaité évaluer l'effet antiprolifératif de la VitD sur les IC-21. Nous avons détecté aucun effet significatif que ce soit de la 1,25D ou de la 25D sur la prolifération de ces macrophages.

Nous avons également évalué *in vitro* l'effet de la VitD sur la prolifération des EO771 par deux approches complémentaires. Une approche en culture bidimensionnelle, dans laquelle les EO771 ont été traitées avec différentes doses de 1,25D ou de 25D. Nous avons ainsi mis en évidence un effet

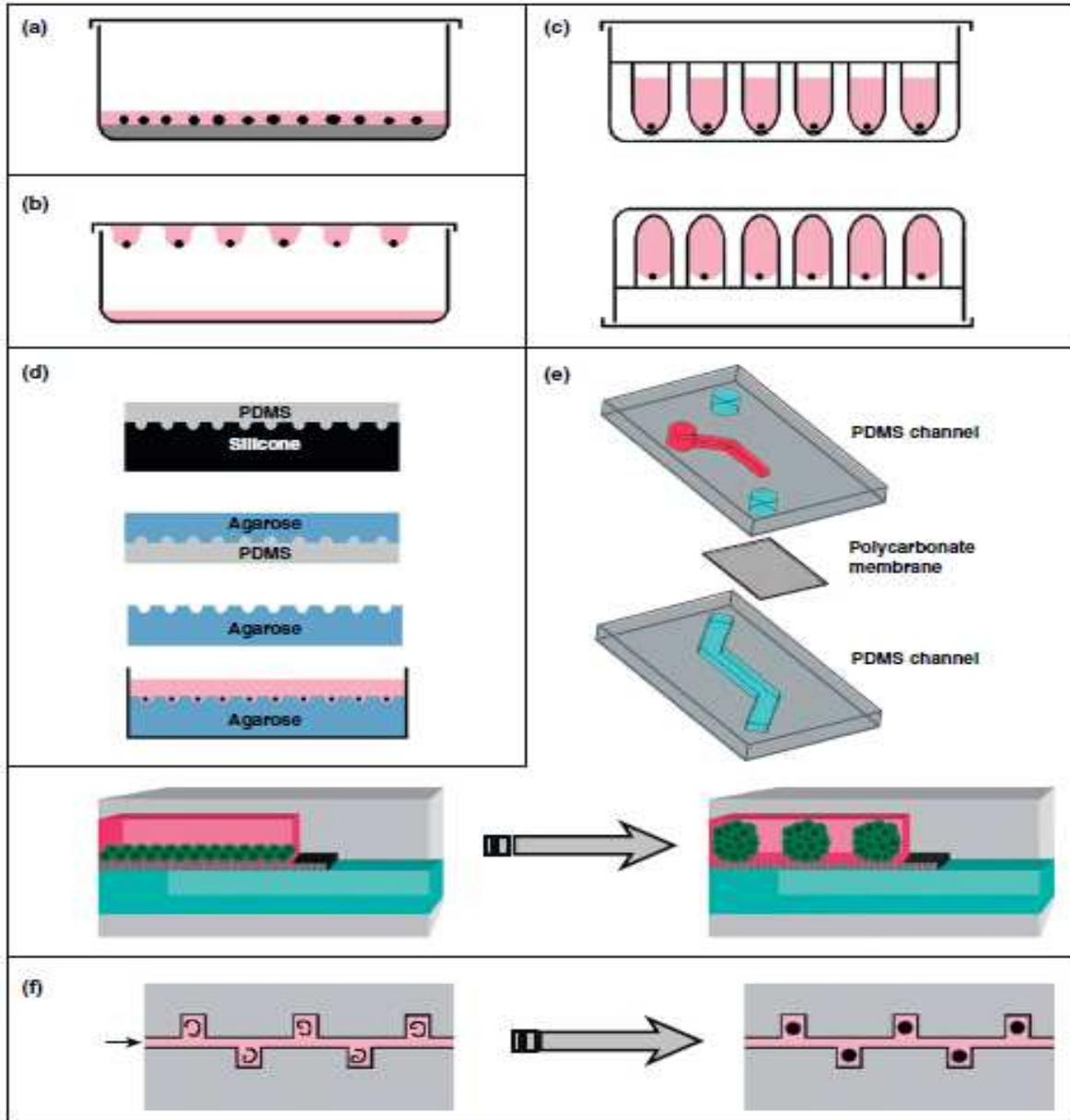


Figure 41. Méthodes de fabrication des sphéroïdes

(a) Technique de recouvrement liquide (Overlay technique) ; (b) Technique de hanging-drop ;

(c) Technique de hanging-drop en micropuits ; (d) Réseau de micropuits à partir de puits d'agarose ;

(e, f) Formation microfluidique de sphéroïdes (*Fennema et al. 2013*).

antiprolifératif de la 1,25D après 24h et 48h d'incubation par induction de l'apoptose à dose physiologique et induction de nécrose à la dose supra-physiologique. Cette technique de culture cellulaire en une monocouche 2D sur polystyrène permet un environnement bien contrôlé et homogène, ce qui facilite l'analyse microscopique et les changements de milieu, mais peu représentatif du microenvironnement naturel des cellules. Aussi, nous avons développé une approche en culture 3D pour mimer le microenvironnement tumoral où les cellules sont généralement entourées d'un ECM ou en contact physique direct avec des cellules identiques ou différentes. Parmi les différentes techniques de culture 3D disponibles ([Fennema et al. 2013](#)) nous avons choisi celle des sphéroïdes qui permettent de simuler une tumeur avasculaire avec un gradient physiologique d'hypoxie et associent des cellules prolifératives et nécrotiques en raison de leur organisation 3D. Il existe plusieurs techniques pour développer des sphéroïdes ([Figure 41](#)). Nous avons tout d'abord essayé la technique Hanging-drop qui consiste à former des sphéroïdes dans des gouttes de milieu sur support inversé. Mais, vu la difficulté de récupération des sphéroïdes dans cette technique, nous avons préféré utiliser l'« Overlay technique » qui consiste à cultiver les cellules tumorales sur une surface non-adhésive. Après 72h, des sphéroïdes sont ainsi formées puis incubées avec différentes doses de 1,25D ou de 25D. Par cette technique, nous observons que le traitement des sphéroïdes d'E0771 par la 25D n'a aucun effet sur la viabilité des cellules alors que la 1,25D réduit la viabilité cellulaire aussi bien en culture 3D que 2D.

Dans notre modèle expérimental *in vivo*, visant à caractériser l'impact de la VitD dans le développement du cancer mammaire en situation d'obésité post-ménopausique, des souris C57BL/6, ovariectomisées et soumises à un régime obésogène, recevaient une supplémentation en VitD (30/40 UI/j vs 3/4 UI/j), avant et après l'injection orthotopique de cellules d'adénocarcinome mammaire syngénique EO771. Ce traitement par la VitD n'a eu aucun effet significatif sur le développement des tumeurs mammaires par rapport au groupe contrôle ([Aldekker et al. 2020](#)). Nous pouvons ainsi considérer que cette observation *in vivo* corrobore les effets de la 25D observés *in vitro* en gardant bien à l'esprit les limites d'une telle translation de l'*in vitro* à l'*in vivo*.

Si l'effet de la VitD sur la viabilité de cellules cancéreuses mammaires a été largement étudié *in vitro* et *in vivo*, peu d'études ont traité de cet effet sur la lignée EO771 (Nunès 2019a; Anisiewicz et al. 2019). Dans leur étude, Anisiewicz et al. ont établi un effet pro-métastatique d'une supplémentation en VitD (500 UI/100 mg) associée à un gavage avec du calcitriol (1 µg/Kg/dose) dans le modèle de tumeur mammaire syngénique triple négatif 4T1 (BALB/C), alors qu'ils ont retrouvé aucun effet de ce traitement sur la croissance de la tumeur EO771 chez la souris C57BL/6 ([Anisiewicz et al. 2019](#)). L'étude réalisée par Karkeni et al. indique que la supplémentation en VitD (40 UI/j/souris) réduit la croissance des tumeurs mammaires EO771 des souris C57BL/6 nourries avec un régime standard

alors qu'à l'inverse, associée à un régime obésogène, la supplémentation en VitD accélère la croissance tumorale ([Karkeni et al. 2019](#)). Par ailleurs, Swami et al. ont montré, chez des souris C57BL/NCr obèses et ovariectomisées, qu'une supplémentation en VitD (530 UI/100g) pendant 6 semaines après l'injection syngénique de cellules tumorales mammaires Mmtv-wnt1, réduit la croissance tumorale ([Swami et al. 2016b](#)). Ils établissent que l'apport de VitD induit, dans le microenvironnement tumoral, une inhibition de l'expression de l'aromatase, du récepteur des œstrogènes et de la cyclooxygénase 2, conduisant à la diminution de la production *in situ* d'œstrogènes et de prostaglandine E2, à la sous-expression du récepteur de la leptine et la surexpression du récepteur de l'adiponectine. De plus, dans leur modèle, la VitD réduit les effets métaboliques de l'obésité en limitant l'insulinorésistance, en réduisant l'action de la leptine et en amplifiant celle de l'adiponectine ([Swami et al. 2016](#)). Ainsi, la VitD tend à limiter le développement du cancer mammaire par des effets cytotoxiques directs et et/ou par de multiples voies indirectes locales et/ou systémiques.

La VitD exerce-t-elle un effet immunomodulateur dans nos modèles ?

Concernant les macrophages IC-21, aucune modification de leur phénotype n'est observée en présence des différentes doses de 1,25D ou de 25D durant 48h bien que la VitD soit connue pour polariser les macrophages vers des variantes anti-inflammatoires M2 ([Wasnik et al. 2018](#)). En fait, nous avons montré *in vitro* que les IC-21 présentent à l'état basal un profil anti-inflammatoire M2. De plus, nous avons établi que la co-culture des IC-21 avec les cellules EO771 renforce après 72h le phénotype anti-inflammatoire des IC-21. Un tel effet immunosuppresseur induit par les cellules tumorales mammaires a déjà été établi pour différentes lignées humaines ([Sousa et al. 2015](#)). Le phénotype M2 est ainsi associé à une prolifération accrue des lignées cancéreuses mammaires ER + et triple négatives ([Sousa et al. 2015](#)).

Dans nos conditions expérimentales, l'effet cytotoxique de la 1,25D sur les cellules EO771 a été aboli en présence des IC-21. Cependant, malgré le renforcement du phénotype M2 par les EO771, la prolifération des EO771 n'a pas été accélérée par rapport au contrôle. Ces résultats suggèrent qu'il existe probablement un équilibre entre l'effet pro-apoptotique de la 1,25D et l'effet prolifératif induit par les macrophages. Nous pouvons formuler l'hypothèse que la 1,25D limite le signal prolifératif délivré par les macrophages. D'autres études sont nécessaires pour préciser le dialogue entre ces cellules et clarifier l'effet de la VitD sur ce dialogue.

Notre approche *in vivo* chez la souris montre que la supplémentation en VitD polarise les cellules immunitaires intra-tumorales vers une réponse anti-inflammatoire pro-tumorale. En effet, nous avons établi que la VitD inhibe le recrutement des lymphocytes Th1 dans la tumeur et diminue ainsi le rapport Th1/Th2, ce qui peut favoriser un environnement anti-inflammatoire. De plus, la VitD limite le recrutement des cellules NK dans la tumeur. Or ces cellules NK jouent un rôle majeur dans

l'immuno-vigilance et dans la réponse anti-tumorale cytotoxique (Vivier et al. 2008). Un tel rôle immunosuppresseur de la VitD est rapporté dans divers modèles expérimentaux de cancer mammaire dans lesquels la supplémentation en VitD associé à un régime obésogène stimule la croissance tumorale en réduisant l'infiltration tumorale des lymphocytes Tc (Karkeni et al. 2019) et induisant la prévalence des cellules Th2 et Treg dans les ganglions lymphatiques régionaux (Pawlik et al. 2018). Dans notre étude, à la différence des travaux précédemment cités, si nous confirmons l'effet immunomodulateur de la VitD, nous n'observons pas d'accélération de la croissance tumorale chez les souris supplémentées par rapport aux souris contrôles non supplémentées.

La VitD régule t'elle la sécrétion de la cathélicidine?

La VitD joue un rôle majeur dans la réponse immunitaire innée contre les agents pathogènes *via* la production d'une protéine antimicrobienne, la cathélicidine ou LL-37, formée par clivage du propeptide hCAP18, codé par le gène *CAMP*. Chez la souris, le gène homologue code pour le peptide AMP lié à la cathélicidine (Cathelicidin-related AMP, Cramp).

Dans notre étude *ex vivo* nous montrons que l'exposition des PBMC à la 25D entraîne une surexpression du gène *CAMP* et du peptide hCAP18. Cet effet est plus fort sur l'expression génique que sur l'expression peptidique suggérant une régulation post-transcriptionnelle. Ce type de régulation a précédemment été décrit dans la lignée cellulaire promyélocytaire murine dans laquelle la surexpression du miARN «miR-130a» diminue l'expression du peptide hCAP18 (Larsen, Borregaard, and Cowland 2014). Quand les PBMC sont incubées dans des conditions non stimulées la sécrétion de LL-37 reste inchangée quelle que soit la dose de 25D. Fait intéressant, nous avons observé une augmentation significative de la sécrétion de LL-37 en présence de 25D lorsque les PBMC sont stimulées par un agent mimétique bactérien, le lipopolysaccharide (LPS) agoniste TLR4, ou par un agent mimétique viral Poly:IC (PIC) agoniste TLR3. Les activateurs TLR sont connus pour interférer avec la signalisation VDR et pour moduler la libération de LL-37 (Liu et al. 2006). Liu et al ont rapporté que l'activation des TLR des monocytes/macrophages par des stimulateurs pathogènes augmente l'expression des gènes VDR et Cyp27B1, conduisant à l'induction d'une production accrue de la cathélicidine (Liu et al. 2006).

Plusieurs études antérieures ont montré que la VitD augmente l'expression de la cathélicidine LL-37 dans différents types cellulaires humains, y compris les kératinocytes, les cellules épithéliales et les monocytes/macrophages. Par contre, le gène murin Cramp ne comprend pas dans son promoteur l'élément de réponse à la VitD (VDRE) (Hii and Ferrante 2016). Ainsi, dans le modèle murin, la modulation de l'expression de la cathélicidine par la VitD ne peut découler d'un effet génomique direct *via* le VDR. Il a, de fait, été démontré qu'une action non génomique *via* l'activation de la voie de signalisation ERK1/ERK2 est impliquée dans l'induction de la cathélicidine (Hii and Ferrante

2016). A la suite de ces travaux, nous avons évalué l'effet de la 1,25D et de la 25D dans les cellules murines IC-21 et EO771. Nos résultats indiquent que la 1,25D n'influence pas l'expression génique et protéique de la cathélicidine chez EO771. Chez les IC-21, la 1,25D réprime l'expression génique de Cramp alors qu'elle stimule son expression protéique. La 25D ne modifie l'expression génique de Cramp dans les EO771 et les IC-21, mais augmente son expression protéique dans les deux lignées. L'ensemble de nos résultats indiquent que la VitD peut moduler l'expression de la cathélicidine par voie génomique et/ou non génomique selon le modèle étudié (humain ou murin) et induire des effets différents selon le métabolite testé (25D ou 1,25D).

Outre son pouvoir antimicrobien, certaines études ont décrit pour la cathélicidine des effets cytotoxiques, antiprolifératifs et pro-apoptotiques sur différentes lignées cancéreuses tandis que d'autres ont rapporté des effets promoteurs de la croissance et prométastatiques (Piktel *et al.* 2018). LL-37, surexprimée par les cellules cancéreuses mammaires humaines, est considéré comme un facteur de croissance des cellules épithéliales (Chen *et al.* 2018). Dans nos conditions expérimentales, nous avons observé aucun effet *in vitro* de différentes doses de cathélicidine sur la prolifération des EO771. Une limite à cette observation est que nous avons dû utiliser de la cathélicidine d'origine humaine puisque la cathélicidine murine n'est pas disponible. Notant que la cathélicidine humaine LL-37¹ est un peptide composé de 37 acides aminés, dont l'extrémité N-terminale termine par deux acides aminés leucine, alors que la cathélicidine murine² (Cramp, Cathelin-related antimicrobial peptide) est un peptide de 33 acides aminés dont l'extrémité N-terminale termine par glycine-leucine (Ramanathan *et al.* 2002).

¹ (LL-37) : LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES (37)

² (Cramp) : GLLRKGGEKIGEKLLKIGQKIKNFFQKLVPOPE (33)

Effet de l'obésité, de l'activité physique et de la supplémentation en VitD sur la prise de poids, les capacités physiques et le développement tumorale mammaire chez la souris C57BL/6.

Après avoir montré que la VitD réduit la viabilité des cellules EO771 *in vitro* en culture 2D et en sphéroïdes, nous avons souhaité confirmer ces résultats *in vivo* dans un modèle expérimental de cancer mammaire chez la souris C57BL/6 précédemment développé dans notre équipe. Les cellules EO771, de type luminal B (ER α -, ER \square +, Erbb2+) sont des cellules syngéniques isolées d'une tumeur spontanée développée chez des femelles C57BL/6, répondant aux traitements anti-oestrogéniques comme le tamoxifène. Le cancer mammaire luminal B, de type agressif et de mauvais pronostic, représente près de 40% des cancers du sein chez la femme (Le Naour *et al.* 2019).

L'obésité est associée à un risque accru de cancer du sein dans la phase post-ménopausique. Ce risque résulte d'une dysrégulation des sécrétions hormonales, d'un environnement inflammatoire chronique induit par les adipocytes et les cellules immunitaires recrutées dans le tissu adipeux (McTiernan

2003). Les études épidémiologiques indiquent une association entre le déficit en VitD et le risque de cancer mammaire, surtout en post-ménopause (Engel et al. 2010). De plus, chez les femmes post-ménopausées, l'activité physique régulière et modérée est associée à une réduction du risque de cancer mammaire de type luminal (Ennour-Idrissi, Maunsell, and Diorio 2015). Partant de ces données, nous avons envisagé d'évaluer *in vivo* l'effet d'une supplémentation en VitD associée ou non à de l'activité physique imposée sur la progression tumorale dans notre modèle murin de cancer mammaire en situation d'obésité.

Dans cet objectif, des souris C57BL/6 âgées ont été ovariectomisées, afin d'imiter la situation oestrogénoprive post-ménopausique, et nourries à l'aide d'un régime obésogène riche en graisses (high fat, HF), afin de favoriser le gain pondéral (Muhammad, Hussien, and Elwia 2020). Dans ces conditions, après quatre semaines de régime HF, les souris ont commencé à prendre du poids et atteint un maximum pondéral ($+20.7 \pm 8.6$ % du poids total) après sept semaines pour le groupe contrôle HF. Les souris ont été hébergées en environnement enrichi (EE) par groupe de 10 dans de grandes cages agrémentées d'accessoires (jouets, nids, roue) pour stimuler les interactions sociales et favoriser l'activité physique spontanée (APS) des animaux. Les roues sont équipées de compteurs permettant d'évaluer l'APS des souris par la distance quotidienne parcourue dans chaque cage. Dans des études précédentes (Nachat-Kappes et al. 2012; Le Guennec et al. 2020), notre équipe a évalué l'effet de cet hébergement en EE sur le développement des tumeurs mammaires EO771 chez les souris femelles C57BL/6. Nous avons ainsi établi l'efficacité de l'EE, de par les interactions sociales et l'activité physique qu'il favorise, à réduire le développement du cancer mammaire chez la souris.

Dans le protocole actuel, en plus de l'APS, les souris ont été soumises, à une activité physique imposée d'intensité modérée, de la course sur tapis roulant. Parmi les différentes modalités d'exercice d'endurance, la course sur tapis roulant est la plus largement utilisée dans les études expérimentales du fait qu'elle est peu stressante pour les animaux et facile à mettre en œuvre à la condition de disposer du matériel nécessaire (Turbitt et al. 2019). La vitesse de course imposée a été choisie à 40 % de la moyenne des vitesses maximales de course des souris, ce qui correspond à une activité physique d'intensité modérée. Dans notre protocole les souris ont ainsi été soumises à deux types d'activité physique, l'APS en EE et l'activité imposée sur tapis roulant, qui correspondait de 16 à 27 % de l'APS, selon le groupe d'animaux considéré.

Les souris supplémentées ont reçu une dose quotidienne de VitD de 30/40 UI/j/ souris, dix fois plus importante que la dose usuelle de 3/4 UI/ j pour la souris (groupe contrôle). Cette dose est considérée comme non toxique pour les rongeurs de laboratoire (Fleet et al. 2008). Au sacrifice, nous avons retrouvé des concentrations plasmatiques de 25D augmentés pour les groupes supplémentés par rapport aux groupes non supplémentés, attestant de l'efficacité de la supplémentation alimentaire en VitD des animaux.

Après huit semaines, les souris ont reçu une injection orthotopique de cellules syngéniques EO771 d'adénocarcinome mammaire dans la 4^{ème} paire de glande mammaire gauche. Ce modèle conduit au développement rapide (2-3 semaines) d'un cancer mammaire luminal chez des souris immuno-compétentes ce qui permet d'explorer les réponses immunitaires et leurs adaptations aux différents stimuli et celà, aussi bien au plan systémique qu'aux niveaux tumoral et tissulaire.

En ce qui concerne l'évolution pondérale des souris, la supplémentation en VitD et l'exercice imposé ont permis de limiter la prise de poids, en dehors de toute modification de l'apport alimentaire quel que soit le groupe de souris.

En effet, nos résultats montrent que la supplémentation en VitD a réduit le poids des souris avant l'injection des cellules tumorales. Bien qu'il est établi que la VitD est impliquée dans le métabolisme, les résultats des études expérimentales sont controversés.

Ces résultats sont en accord avec plusieurs études ([Marcotorchino et al. 2014](#); [Muhammad, Hussien, and Elwia 2020](#)) rapportant qu'un apport exogène de VitD limite la prise de poids induite par le régime HF. Ceci s'explique par une augmentation de la dépense énergétique des animaux supplémentés en VitD liée à la surexpression de gènes impliqués dans l'oxydation lipidique et le métabolisme mitochondrial (PPAR α , coactivateur PPAR γ -1 α ou β , carnitine palmitoyltransférase I α ou β) dans différents tissus tels que le foie, le tissu adipeux brun et les muscles ([Marcotorchino et al. 2014](#)). D'autres études ont établi, de façon contradictoire, qu'une supplémentation de 12 semaines en VitD (1000 UI/100g) associée à un régime HF n'a aucun sur la prise de poids de souris mâles C57BL/6 âgées de cinq semaines ([Lee 2018](#)).

Dans nos conditions expérimentales, la pratique d'un exercice d'intensité modérée, en plus de l'APS, a limité la prise de poids corporel tout au long du protocole et a conduit à la réduction de la masse grasse totale, et en particulier du tissu adipeux viscéral. Ces données suggèrent que l'entraînement imposé augmente la lipolyse du tissu adipeux et l'oxydation des acides gras pour répondre aux besoins énergétiques, à la différence de l'APS seule ([Noland 2015](#)). Nos observations sont en accord avec plusieurs études rapportant que la course sur tapis roulant réduit le gain de poids de souris nourries avec un régime HF du fait de l'augmentation de leur thermogénèse par rapport aux souris obèses sédentaires, résultant de la stimulation de l'expression de la protéine de découplage 1 (UCP1) impliquée dans la thermogénèse du tissu adipeux brun ([Deldicque et al. 2013](#); [Gaspar et al. 2019](#)).

La supplémentation en VitD associée à l'exercice imposé a limité fortement la prise de poids et le gain de masse grasse tout au long du protocole. Dans ce groupe de souris soumis au régime enrichi en VitD et à l'exercice imposé, la résistance plus marquée au régime HF peut s'expliquer par une potentialisation des effets de ces deux interventions et/ou par l'APS plus importante observée dans la phase pré-injection des cellules EO771. Cet effet synergique bénéfique de l'apport de VitD et de l'exercice imposé favorisant l'APS pourrait s'expliquer par une meilleure régénération musculaire ou

par une récupération post-exercice plus efficace ou encore, par une meilleure résistance à la fatigue, comme récemment décrit (*Debruin et al. 2020*). En phase post-injection, nous n'avons pas retrouvé de différence d'APS entre les groupes ce qui peut être lié à la fatigue des souris suite à la chirurgie et au développement tumoral. Il est important de souligner que, dans nos conditions d'EE, l'intensité de l'APS est environ 4 à 5 fois supérieure à celle de l'exercice imposé. Comme précisé par Manzanares et al, quand une souris a un accès libre à une roue, elle peut passer jusqu'à 3 à 7 heures par jour à s'entraîner. C'est en effet pour la souris une activité peu stressante et similaire à son comportement naturel (*Manzanares, Brito-da-Silva, and Gandra 2019*).

Le test de performance musculaire, réalisé en cours de protocole, le test de la Vitesse maximale (MS, Maximal speed) n'a pas montré de différence entre les groupes. L'absence d'effet de l'exercice imposé sur la performance MS peut être relié à la faible intensité de l'exercice par rapport à celle élevée de l'APS et/ou à l'adaptation de type endurance des animaux à ce test. De même, aucun effet de l'exercice imposé seul sur la force d'agrippement des souris est observé ce qui est en désaccord avec les résultats de Kan et al montrant un effet de l'exercice (nage pendant 30 min) sur la force d'agrippement de souris mâles C57BL/6J de 16 mois d'âge par rapport au groupe témoin (*Kan et al. 2016*). Selon ces auteurs, la force musculaire est positivement corrélée avec la force d'agrippement des membres antérieurs (*Kan et al. 2016*). Dans notre étude, le groupe de souris supplémentées en VitD et soumises à l'exercice imposé montrent une force de préhension plus élevée que celle des autres groupes. Nous rapportons ainsi des effets synergiques bénéfiques de la VitD et de l'exercice imposé sur la force musculaire des souris. De plus, la perte de poids observée dans ce groupe (VitD + exercice) a concerné principalement la masse adipeuse, sans modification de la masse musculaire des membres postérieurs, restée similaire à celle des autres groupes de souris. De fait, un tel exercice d'intensité modérée n'affecte guère la masse et la fonction musculaire lorsque l'APS est maintenue. Par contre, cette activité physique régulière peut contribuer à maintenir la masse maigre et à limiter l'impact métabolique du développement d'une tumeur mammaire (*Molanouri Shamsi et al. 2017; Le Guennec et al. 2020*). Dans notre étude, la masse musculaire n'a pas été impactée par la supplémentation en VitD seule, en accord avec les travaux de Hayes et al. indiquant qu'un apport élevé en VitD pendant 4 semaines n'a pas modifié la masse de l'*extensor digitorum longus* et du *soleus* (*Hayes et al. 2019*). Concernant le développement tumoral, nous avons observé aucun effet de la supplémentation en VitD et/ou de l'exercice imposé sur la croissance tumorale et sur la durée de vie des souris. Malgré cela, les poids des tumeurs au sacrifice étaient plus importants dans les groupes de souris entraînés. Cette observation peut être reliée à l'augmentation de la vascularisation associée à l'inhibition de l'hypoxie et de la croissance tumorale médiée par la voie pro-apoptotique Fas-dépendante comme précédemment décrit (*Betof et al. 2015*).

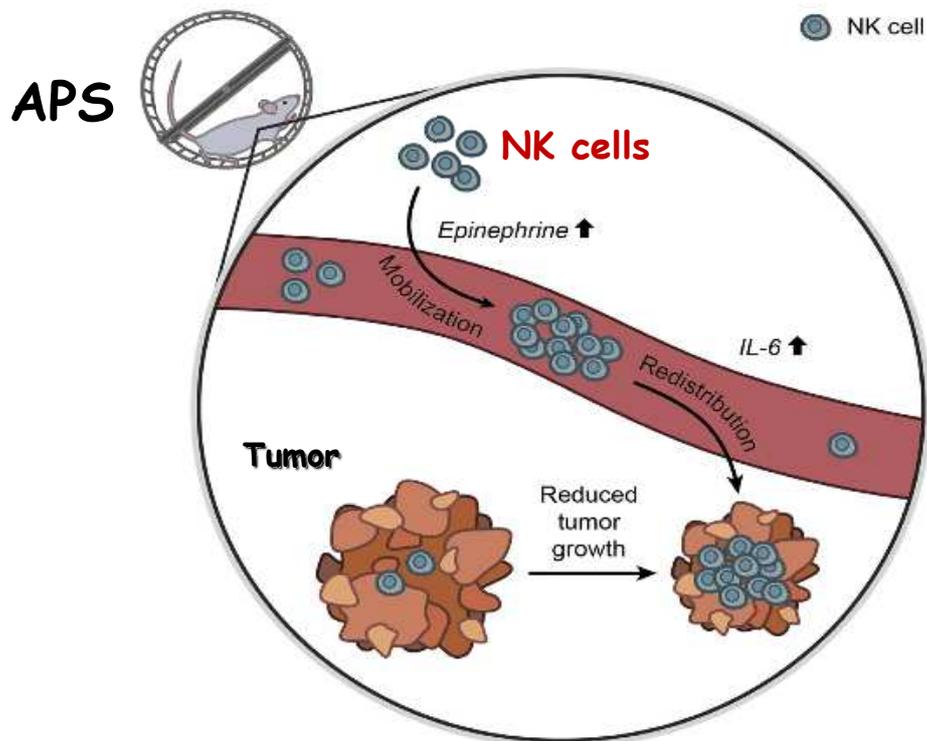


Figure 42. Mobilisation des cellules NK par l'exercice physique : impact sur le développement tumoral

L'exercice diminue l'incidence et la croissance des tumeurs de plus de 60% dans plusieurs modèles de tumeurs murines grâce à une régulation directe de la mobilisation et du trafic des cellules NK d'une manière dépendante de l'adrénaline (épinéphrine) et de l'IL-6 ([Pedersen et al. 2016](#)).

Nous avons identifié plusieurs études portant sur l'effet de l'exercice physique sur la carcinogénèse mammaire chez la souris. Parmi elles, seulement deux études ont soumis les animaux à un régime HF ([Thompson et al. 2010](#); [Barra et al. 2017](#)). Les différences notables entre les protocoles (tumeur chimiquement induite, souris jeune, non ovariectomisée) rendent très difficile l'analyse comparative des résultats compte-tenu de nos propres conditions expérimentales (tumeur syngénique, souris âgée, ovariectomisée) que nous avons souhaité les plus similaires possibles au contexte clinique.

Impact de l'obésité et de l'activité physique sur l'immunité tumorale

D'une part, l'obésité est liée à un statut pro-inflammatoire chronique. Chez les rongeurs, l'obésité induite par l'alimentation favorise un environnement tumoral inflammatoire avec augmentation des lymphocytes pro-inflammatoires Th1 et Tc et diminution des cellules Treg anti-inflammatoires ([Morin et al. 2017](#)). D'autre part, le cancer mammaire déclenche un état d'immunosuppression dans la tumeur, que ce soit sous régime standard ou HF, en favorisant le recrutement de cellules anti-inflammatoires tels que les macrophages Th2, Treg et M2, qui soutiennent le développement de la tumeur et stimulent l'angiogénèse ([Zhao et al. 2012](#); [Wen et al. 2016](#)).

Dans notre modèle, les proportions des cellules infiltrées, leucocytes, lymphocytes, myéloïdes et polynucléaires, sont similaires quel que soit le groupe considéré. L'absence d'effet significatif de l'exercice imposé sur le recrutement de ces cellules immunitaires peut être liée à son intensité modérée. Par phénotypage des sous-populations lymphocytaires nous avons observé que l'exercice imposé améliore le recrutement tumoral des NK, reconnues comme les cellules immunitaires les plus sensibles à l'exercice ([Timmons and Cieslak, 2008](#)). L'augmentation de la sécrétion d'adrénaline (épinéphrine) pendant l'exercice stimule la prolifération des NK alors que la sécrétion de l'IL-6 favorise leur distribution vers le site tumoral ([Wennerberg et al. 2017](#)). Différentes études ont rapporté l'augmentation par l'exercice de l'infiltration des NK dans la tumeur mammaire (Figure 42) ([Wang et al. 2020](#)) ainsi que d'autres cellules anti-tumorales comme les lymphocytes Tc et Th1 ([Bianco et al. 2017](#); [M. Molanouri Shamsi et al. 2017](#)).

Nous avons constaté des effets contradictoires de la supplémentation en VitD et de l'exercice sur le recrutement de cellules immunitaires dans la tumeur. En effet, la VitD a favorisé un microenvironnement plutôt anti-inflammatoire avec diminution du rapport Th1/Th2, alors que l'exercice a induit un statut plutôt pro-inflammatoire avec augmentation du recrutement des NK. L'étude du profil des cytokines et chimiokines s'avère nécessaire pour mieux définir le statut inflammatoire intra-tumoral. De plus la caractérisation de la cytotoxicité des lymphocytes NK et Tc et de la fonctionnalité des cellules Th est indispensable pour comprendre comment et par quelles voies les deux interventions (VitD /exercice) affectent la réponse immunitaire tumorale.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La vitamine D est reconnue pour son rôle immunomodulateur. Une meilleure compréhension de son impact dans la réponse immunitaire est essentielle pour envisager son intérêt préventif voire thérapeutique dans plusieurs pathologies incluant le cancer mammaire. Les données actuelles de la littérature concernant l'association entre la VitD et le développement du cancer mammaire sont contradictoires. L'objectif de cette thèse était de définir l'impact de la VitD sur les capacités de réponse des cellules immunocompétentes en lien avec la prolifération et la croissance de cellules tumorales mammaires.

Dans une approche *ex vivo*, nous avons mis en évidence l'expression du VDR et des enzymes du métabolisme de la VitD par les cellules humaines PBMC. Ces cellules immunocompétentes sont donc des cibles privilégiées pour la signalisation de la VitD, confirmant ainsi son rôle immunomodulateur. Dans notre modèle, l'expression du VDR et des enzymes n'apparaît pas dose-dépendante de la VitD. Il serait intéressant d'étendre le temps d'incubation des cellules afin de caractériser l'adaptation cinétique du métabolisme de la VitD.

Si la VitD seule augmente l'expression intracellulaire de cathélicidine (LL-37) par les PBMC circulantes, c'est uniquement en présence de stimuli bactérien ou viral qu'elle favorise la sécrétion extracellulaire de LL-37. Cette sécrétion finement régulée permet d'éviter le risque de destruction non spécifique du microbiote-hôte en cas d'excès de LL-37 dont la capacité bactéricide n'est pas spécifique. Des travaux complémentaires sont nécessaires pour clarifier le processus de clivage et d'externalisation de LL-37. La mise au point d'une méthode de dosage plus performante, spécifique et sensible, s'avère indispensable pour pouvoir développer la quantification de la cathélicidine et sa prescription en clinique.

Notre approche *in vitro* nous a permis de caractériser, pour la première fois à notre connaissance, que les cellules murines cancéreuses (EO771) et macrophagiques (IC-21) expriment à l'état basal le VDR et les enzymes du métabolisme de la VitD. Nous avons établi d'une part, que la 1,25D exerce un effet antiprolifératif sur les cellules EO771 en lien avec la surexpression protéique du VDR facilitant les effets génomiques et non génomiques de la VitD et d'autre part, que la 25D induit l'expression protéique du Cyp24a1 ce qui peut résulter en une inactivation des métabolites de la VitD, expliquant l'absence d'effet sur la prolifération des EO771. Pour les IC-21, nous avons décrit que la 25D et la 1,25D induisent l'expression protéique de VDR, sans affecter la polarisation M1/M2 de ces macrophages. Ces résultats demandent à être confortés par des cinétiques plus précises de l'impact de la VitD sur l'expression du VDR et des enzymes de son métabolisme, en présence ou non de sérum fœtal (pour éviter le piégeage de la VitD par la DBP sérique). De plus, une étude des effecteurs d'apoptose telles que les protéines de la famille Bcl-2 (bcl-x, bax, etc) et les caspases est nécessaire

pour caractériser la voie de mort activée dans les cellules EO771 dont le gène suppresseur de tumeur p53 est muté.

Le développement des modèles de co-culture et de sphéroïde (EO771/IC21) a permis d'établir que les cellules tumorales EO771 induisent un état immunosuppresseur en renforçant la polarisation M2 des macrophages ce qui contribue à soutenir leur prolifération et à les protéger de l'effet antiprolifératif de la VitD. La caractérisation des cytokines sécrétées dans les milieux de culture permettrait d'évaluer le statut inflammatoire et de caractériser le dialogue intercellulaire, en présence et en absence de la VitD.

De façon inattendue, le traitement des cellules murines IC-21 et EO771 avec la VitD a stimulé l'expression protéique de la cathélicidine dont le gène ne comprend pas l'élément de réponse à la VitD (VDRE). Ceci démontre que l'expression de la cathélicidine par la VitD passe par des voies non génomiques à déterminer dans des études ultérieures.

Pour une approche originale *in vivo* nous avons évalué l'impact de la supplémentation en VitD, associée ou non à une activité physique imposée modérée, sur le développement des tumeurs mammaires EO771 chez les souris C57BL/6 ovariectomisées, rendues obèses par un régime HF, et hébergées en environnement enrichi, qui favorise l'activité physique et les interactions sociales.

Nous avons observé que la VitD et l'activité physique imposée améliorent les capacités physiques des animaux et limitent, par des effets synergiques, le surpoids induit par l'ovariectomie et le régime HF. Dans notre modèle, l'exercice physique imposé, même s'il améliore la vigilance immunitaire, ne permet pas de réduire la croissance tumorale contrairement à ce qui est rapporté dans la littérature. Cela peut s'expliquer par le niveau modéré de l'activité imposée par rapport au niveau soutenu de l'activité physique spontanée des animaux en environnement enrichi. La supplémentation en VitD n'a pas d'effet sur la croissance tumorale, peut-être en raison d'un équilibre entre son effet apoptotique direct sur les cellules tumorales et son effet pro-tumoral immunosuppresseur. L'intervention combinée de la supplémentation en VitD et de l'exercice physique imposé favorisent un environnement immunitaire tolérogène, sans incidence sur la croissance tumorale mammaire.

Ce modèle de cancer murin, chez la souris C57BL/6 porteuse de tumeurs EO771, présente le grand intérêt de développer une néoplasie immunocompétente et orthotopique, très proche du cancer du sein humain. Il est prometteur pour tester l'efficacité d'approches préventive ou thérapeutique, y compris intervention nutritionnelle et exercice physique, dans des conditions d'hébergement proche du mode de vie habituel des souris avec interaction sociale et activité physique spontanée.

Un complément à ce travail sera d'analyser l'infiltration immunitaire au niveau du tissu mammaire tumoral par immunohistochimie. L'exploration de la réponse immunitaire sera complétée par le profil cytokinique et le phénotypage cellulaire au niveau des tissus d'intérêt (tumeur, muscle, tissu adipeux).

Les cibles moléculaires des effets non génomiques de la vitamine D sur les lignées murines seront caractérisées par les techniques omiques.

Ce travail original contribue à une meilleure compréhension des effets antiprolifératifs et immunomodulateurs de la VitD. Il montre que la supplémentation en VitD peut favoriser une réponse immunosuppressive au cours de la cancérogenèse mammaire. Il étaye les données sur l'intérêt de la supplémentation en VitD associée à l'activité physique dans la prévention du cancer du sein en situation d'obésité post-ménopausique.

REFERENCES

- Abbas Abul, Andrew Lichtman and Shiv Pillai. 2017. *Cellular and Molecular Immunology 9th Edition* (Elsevier Saunders). Chapitre 2: Cells and tissue of immune system.
- Abrams Geoffrey D., David Feldman, and Marc R. Safran. 2018. 'Effects of Vitamin D on Skeletal Muscle and Athletic Performance': *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons* 26 (8): 278–85. <https://doi.org/10.5435/JAAOS-D-16-00464>.
- Adraskela Kalliopi, Eleftheria Veisaki, Michael Koutsilieris, and Anastassios Philippou. 2017. 'Physical Exercise Positively Influences Breast Cancer Evolution'. *Clinical Breast Cancer* 17 (6): 408–17. <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2017.05.003>.
- Aguilar Ethan G, and William J Murphy. 2018. 'Obesity Induced T Cell Dysfunction and Implications for Cancer Immunotherapy'. *Current Opinion in Immunology* 51 (6): 181–86. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2018.03.012>.
- Aldekwer Sahar, Adrien Desiderio, Marie-Chantal Farges, Stéphanie Rougé, Augustin Le Naour, Delphine Le Guennec, Nicolas Goncalves-Mendès, et al. 2020. 'Vitamin D Supplementation Associated with Physical Exercise Promotes a Tolerogenic Immune Environment without Effect on Mammary Tumour Growth in C57BL/6 Mice'. *European Journal of Nutrition*. <https://doi.org/10.1007/s00394-020-02420-z>.
- Amano Yusuke, Yoshitake Cho, Manabu Matsunawa, Kazuo Komiyama, and Makoto Makishima. 2009. 'Increased Nuclear Expression and Transactivation of Vitamin D Receptor by the Cardiotonic Steroid Bufalin in Human Myeloid Leukemia Cells'. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 114 (3–5): 144–51. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2009.01.022>.
- Anisiewicz Artur, Beata Filip-Psurska, Agata Pawlik, Anna Nasulewicz-Goldeman, Tomasz Piasecki, Konrad Kowalski, Magdalena Maciejewska, et al. 2019. 'Calcitriol Analogues Decrease Lung Metastasis but Impair Bone Metabolism in Aged Ovariectomized Mice Bearing 4T1 Mammary Gland Tumours'. *Aging and Disease* 10 (5): 977. <https://doi.org/10.14336/AD.2018.0921>.
- Atoum Manar Fayiz, Foad Alzoughool, and Huda Al-Hourani. 2020. 'Linkage Between Obesity Leptin and Breast Cancer'. *Breast Cancer: Basic and Clinical Research* 14 (12): 1–12. <https://doi.org/10.1177/1178223419898458>.
- Bacurau Aline Villa Nova, Mônica Aparecida Belmonte, Francisco Navarro, Milton Rocha Moraes, Francisco Luciano Pontes, Jorge Luiz Pesquero, Ronaldo Carvalho Araújo, and Reury Frank Pereira Bacurau. 2007. 'Effect of a High-Intensity Exercise Training on the Metabolism and Function of Macrophages and Lymphocytes of Walker 256 Tumor-Bearing Rats'. *Experimental Biology and Medicine* 232 (10): 1289–99. <https://doi.org/10.3181/0704-RM-93>.
- Barb Diana, Kalliopi Pazaitou-Panayiotou, and Christos S Mantzoros. 2006. 'Adiponectin: A Link between Obesity and Cancer'. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 15 (8): 917–31. <https://doi.org/10.1517/13543784.15.8.917>.
- Barra Nicole G., Isabella Y. Fan, Jenna B. Gillen, Marianne Chew, Katarina Marcinko, Gregory R. Steinberg, Martin J. Gibala, and Ali A. Ashkar. 2017. 'High Intensity Interval Training Increases Natural Killer Cell Number and Function in Obese Breast Cancer-Challenged Mice and Obese Women'. *Journal of Cancer Prevention* 22 (4): 260–66. <https://doi.org/10.15430/JCP.2017.22.4.260>.
- Barriga Vanessa, Nyanbol Kuol, Kulmira Nurgali, and Vasso Apostolopoulos. 2019. 'The Complex Interaction between the Tumor Micro-Environment and Immune Checkpoints in Breast Cancer'. *Cancers* 11 (8): 1205. <https://doi.org/10.3390/cancers11081205>.
- Bates Joshua P., Roshanak Derakhshandeh, Laundette Jones, and Tonya J. Webb. 2018. 'Mechanisms of Immune Evasion in Breast Cancer'. *BMC Cancer* 18 (1): 556. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4441-3>.
- Bauer Scott R., Susan E. Hankinson, Elizabeth R. Bertone-Johnson, and Eric L. Ding. 2013. 'Plasma Vitamin D Levels, Menopause, and Risk of Breast Cancer: Dose-Response Meta-Analysis of Prospective Studies'. *Medicine* 92 (3): 123–31. <https://doi.org/10.1097/MD.0b013e3182943bc2>.
- Beaudin Sarah G., Samantha Robilotto, and JoEllen Welsh. 2015. 'Comparative Regulation of Gene Expression by 1,25-Dihydroxyvitamin D3 in Cells Derived from Normal Mammary Tissue and Breast Cancer'. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 148 (7): 96–102. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.09.014>.
- Benevides Luciana, Denise Morais da Fonseca, Paula Barbim Donate, Daniel Guimarães Tiezzi, Daniel D. De Carvalho, Jurandy M. de Andrade, Gislaïne A. Martins, and João S. Silva. 2015. 'IL17 Promotes

- Mammary Tumor Progression by Changing the Behavior of Tumor Cells and Eliciting Tumorigenic Neutrophils Recruitment*. *Cancer Research* 75 (18): 3788–99. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-0054>.
- Bertucci François and Anthony Gonçalves. 2017. 'Immunotherapy in Breast Cancer: The Emerging Role of PD-1 and PD-L1'. *Current Oncology Reports* 19(10): 64. <http://doi.org/10.1007/s11912-017-0627-0>.
- Betof Allison S., Christopher D. Lascola, Douglas Weitzel, Chelsea Landon, Peter M. Scarbrough, Gayathri R. Devi, Gregory Palmer, Lee W. Jones, and Mark W. Dewhirst. 2015. 'Modulation of Murine Breast Tumor Vascularity, Hypoxia, and Chemotherapeutic Response by Exercise'. *Journal of the National Cancer Institute* 107 (5): 1-5. <https://doi.org/10.1093/jnci/djv040>.
- Bhan Ishir, Carlos A. Camargo, Julia Wenger, Catherine Ricciardi, Jun Ye, Niels Borregaard, and Ravi Thadhani. 2011. 'Circulating Levels of 25-Hydroxyvitamin D and Human Cathelicidin in Healthy Adults'. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 127 (5): 1302-1304. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.12.1097>.
- Bianco Thiago M., Douglas R. Abdalla, Chamberttan S. Desidério, Sofie Thys, Cindy Simoens, John-Paul Bogers, Eddie F.C. Murta, and Márcia A. Michelin. 2017. 'The Influence of Physical Activity in the Anti-Tumor Immune Response in Experimental Breast Tumor'. *Immunology Letters* 190 (11): 148–58. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2017.08.007>.
- Bijian Krikor, Dainis Kaldre, Tian-Tian Wang, Jie Su, Manuella Bouttier, Annie Boucher, Moulay Alaoui-Jamali, John H. White, and James L. Gleason. 2018. 'Efficacy of Hybrid Vitamin D Receptor Agonist/Histone Deacetylase Inhibitors in Vitamin D-Resistant Triple-Negative 4T1 Breast Cancer'. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 177 (5): 135–39. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.08.010>.
- Bikle Daniel D. 2014. 'Vitamin D Metabolism, Mechanism of Action, and Clinical Applications'. *Chemistry & Biology* 21 (3): 319–29. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.12.016>.
- Binnewies Mikhail, Edward W. Roberts, Kelly Kersten, Vincent Chan, Douglas F. Fearon, Miriam Merad, Lisa M. Coussens, et al. 2018. 'Understanding the Tumor Immune Microenvironment for Effective Therapy'. *Nature Medicine* 24 (5): 541–50. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0014-x>.
- Bishop Emma, Aiten Ismailova, Sarah K. Dimeloe, Martin Hewison, and John H. White. 2020. 'Vitamin D and Immune Regulation: Antibacterial, Antiviral, Anti-inflammatory'. *JBMR Plus* 23 (00): 1-23. <https://doi.org/10.1002/jbm4.10405>.
- Bosworth Courtney R., Gregory Levin, Cassianne Robinson-Cohen, Andrew N. Hoofnagle, John Ruzinski, Bessie Young, Stephen M. Schwartz, Jonathan Himmelfarb, Bryan Kestenbaum, and Ian H. de Boer. 2012. 'The Serum 24,25-Dihydroxyvitamin D Concentration, a Marker of Vitamin D Catabolism, Is Reduced in Chronic Kidney Disease'. *Kidney International* 82 (6): 693–700. <https://doi.org/10.1038/ki.2012.193>.
- Bouillon Roger. 2011. 'Why Modest but Widespread Improvement of the Vitamin D Status Is the Best Strategy?' *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 25 (4): 693–702. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2011.06.008>.
- Bousquenaud Mélanie. 2018. 'Obesity Promotes the Expansion of Metastasis-Initiating Cells in Breast Cancer'. *Breast Cancer Research* 20 (104):1- 11. <https://doi.org/10.1186/s13058-018-1029-4>
- Bouvard Béatrice, Cédric Annveiller, Agnès Sallé, Olivier Beauchet, Daniel Chappard, Maurice Audran, and Erick Legrand. 2010. 'Les effets extra-osseux de la vitamine D : faits, questions et controverses'. *Revue du Rhumatisme* 77 (8): A18–25. <https://doi.org/10.1016/j.rhum.2010.09.003>.
- Brady Nicholas J., Pavlina Chuntova, and Kathryn L. Schwertfeger. 2016. 'Macrophages: Regulators of the Inflammatory Microenvironment during Mammary Gland Development and Breast Cancer'. *Mediators of Inflammation* 2016 (13): 1–13. <https://doi.org/10.1155/2016/4549676>.
- Brown Justin C., Kerri Winters-Stone, Augustine Lee, and Kathryn H. Schmitz. 2012. 'Cancer, Physical Activity, and Exercise'. *Comprehensive Physiology* 2 (4): 2775–2809. <https://doi.org/10.1002/cphy.c120005>.
- Buss Linda A, and Gabi U Dachs. 2018. 'The Role of Exercise and Hyperlipidaemia in Breast Cancer Progression', *Journal of Applied Physiology* 124 (16): 938–949,.
- Büyükavcu Ayşegül Y. Esra Albayrak, and Nazlı Göker. 2016. 'A Fuzzy Information-Based Approach for Breast Cancer Risk Factors Assessment'. *Applied Soft Computing* 38 (16): 437–52. <https://doi.org/10.1016/j.asoc.2015.09.026>.
- Cao Yu, Yunting Du, Fei Liu, Yonghui Feng, Shitong Cheng, Shu Guan, Yuying Wang, et al. 2018. 'Vitamin D Aggravates Breast Cancer by Inducing Immunosuppression in the Tumor Bearing Mouse'. *Immunotherapy* 10 (7): 555–66. <https://doi.org/10.2217/imt-2017-0131>.

- Carbone Federico, Nathalie Satta, Fabienne Burger, Aline Roth, Sébastien Lenglet, Sabrina Pagano, Pierre Lescuyer, et al. 2016. 'Vitamin D Receptor Is Expressed within Human Carotid Plaques and Correlates with Pro-Inflammatory M1 Macrophages'. *Vascular Pharmacology* 85 (9): 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2016.08.004>.
- Cederlund Andreas, Gudmundur H. Gudmundsson, and Birgitta Agerberth. 2011. 'Antimicrobial Peptides Important in Innate Immunity: Antimicrobial Peptides Important in Innate Immunity'. *FEBS Journal* 278 (20): 3942–51. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08302.x>.
- Chang Seon Hee, Yeonseok Chung, and Chen Dong. 2010. 'Vitamin D Suppresses Th17 Cytokine Production by Inducing C/EBP Homologous Protein (CHOP) Expression'. *Journal of Biological Chemistry* 285 (50): 38751–55. <https://doi.org/10.1074/jbc.C110.185777>.
- Charoenngam Nipith and Michael F. Holick. 2020. 'Immunologic Effects of Vitamin D on Human Health and Disease'. *Nutrients* 12 (7): 1-28. <https://doi.org/10.3390/nu12072097>.
- Chen Jiaxuan, Maryam Doroudi, Jeffery Cheung, Ashley L. Grozier, Zvi Schwartz, and Barbara D. Boyan. 2013. 'Plasma Membrane Pdia3 and VDR Interact to Elicit Rapid Responses to 1 α ,25(OH)2D3'. *Cellular Signalling* 25 (12): 2362–73. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.07.020>.
- Chen Xi, Xianqiong Zou, Guangying Qi, Ying Tang, Yong Guo, Jia Si, and Lihua Liang. 2018. 'Roles and Mechanisms of Human Cathelicidin LL-37 in Cancer'. *Cellular Physiology and Biochemistry* 47 (3): 1060–73. <https://doi.org/10.1159/000490183>.
- Chen Yang, Zhaojun Liu, Tingting Pan, Erzhen Chen, Enqiang Mao, Ying Chen, Ruoming Tan, et al. 2018. 'JMJD3 Is Involved in Neutrophil Membrane Proteinase 3 Overexpression during the Hyperinflammatory Response in Early Sepsis'. *International Immunopharmacology* 59 (7): 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.03.027>.
- Christakos Sylvia, Dare V. Ajibade, Puneet Dhawan, Adam J. Fechner, and Leila J. Mady. 2010. 'Vitamin D: Metabolism'. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 39 (2): 243–53. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2010.02.002>.
- Christakos Sylvia, Puneet Dhawan, Annemieke Verstuyf, Lieve Verlinden, and Geert Carmeliet. 2016. 'Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects'. *Physiological Reviews* 96 (1): 365–408. <https://doi.org/10.1152/physrev.00014.2015>.
- Chun Rene F., Nancy Q. Liu, T. Lee, Joan I. Schall, Michelle R. Denburg, Richard M. Rutstein, John S. Adams, Babette S. Zemel, Virginia A. Stallings, and Martin Hewison. 2015. 'Vitamin D Supplementation and Antibacterial Immune Responses in Adolescents and Young Adults with HIV/AIDS'. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 148 (8): 290–97. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.07.013>.
- Chun Rene F., Albert Shieh, Carter Gottlieb, Vahe Yacoubian, Jeffrey Wang, Martin Hewison, and John S. Adams. 2019. 'Vitamin D Binding Protein and the Biological Activity of Vitamin D'. *Frontiers in Endocrinology* 718 (10): 1-15. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00718>.
- Clements Virginia K., Tiha Long, Ramses Long, Chas Figley, Daniel M.C. Smith, and Suzanne Ostrand-Rosenberg. 2018. 'Frontline Science: High Fat Diet and Leptin Promote Tumor Progression by Inducing Myeloid-Derived Suppressor Cells'. *Journal of Leukocyte Biology* 103 (3): 395–407. <https://doi.org/10.1002/JLB.4HI0517-210R>.
- Crane-Godreau Mardi A., Kathleen J. Clem, Peter Payne, and Steven Fiering. 2020. 'Vitamin D Deficiency and Air Pollution Exacerbate COVID-19 Through Suppression of Antiviral Peptide LL37'. *Frontiers in Public Health* 232 (8): 1-5. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.00232>.
- Daniel Carolin, Nico A. Sartory, Nadine Zahn, Heinfried H. Radeke, and Jürgen M. Stein. 2008. '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'. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 324 (1): 23–33. <https://doi.org/10.1124/jpet.107.127209>.
- Debruin Danielle A, Cara A Timpani, Hannah Lalunio, Emma Rybalka, Craig A Goodman, and Alan Hayes. 2020. 'Exercise May Ameliorate the Detrimental Side Effects of High Vitamin D Supplementation on Muscle Function in Mice'. *Journal of Bone and Mineral Research*, jbmr.3985: 1-15. <https://doi.org/10.1002/jbmr.3985>.
- Deldicque Louise, Patrice D. Cani, Nathalie M. Delzenne, Keith Baar, and Marc Francaux. 2013. 'Endurance Training in Mice Increases the Unfolded Protein Response Induced by a High-Fat Diet'. *Journal of Physiology and Biochemistry* 69 (2): 215–25. <https://doi.org/10.1007/s13105-012-0204-9>.
- Dempsey P. W., S. A. Vaidya, and G. Cheng. 2003. 'The Art of War: Innate and Adaptive Immune Responses'. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* 60 (12): 2604–21. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3180-y>.

- DeNardo David G., Jairo B. Barreto, Pauline Andreu, Lesley Vasquez, David Tawfik, Nikita Kolhatkar, and Lisa M. Coussens. 2009. 'CD4+ T Cells Regulate Pulmonary Metastasis of Mammary Carcinomas by Enhancing Protumor Properties of Macrophages'. *Cancer Cell* 16 (2): 91–102. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.06.018>.
- Deniz Gunnur, Gaye Erten, Umut Can Küçüksezer, Dilara Kocacik, Christian Karagiannidis, Esin Aktas, Cezmi A. Akdis, and Mubeccel Akdis. 2008. 'Regulatory NK Cells Suppress Antigen-Specific T Cell Responses'. *The Journal of Immunology* 180 (2): 850–57. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.2.850>
- Dewan Md. Zahidunnabi, Hiroshi Terunuma, Masahiro Takada, Yuetsu Tanaka, Hiroyuki Abe, Tetsutaro Sata, Masakazu Toi, and Naoki Yamamoto. 2007. 'Role of Natural Killer Cells in Hormone-Independent Rapid Tumor Formation and Spontaneous Metastasis of Breast Cancer Cells in Vivo'. *Breast Cancer Research and Treatment* 104 (3): 267–75. <https://doi.org/10.1007/s10549-006-9416-4>.
- Dhawan Puneet, Robert Weider, and Sylvia Christakos. 2009. 'CCAAT Enhancer-Binding Protein α Is a Molecular Target of 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ in MCF-7 Breast Cancer Cells'. *Journal of Biological Chemistry* 284 (5): 3086–95. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803602200>.
- Dirks Niek, Mariëtte Ackermans, Paul Lips, Renate de Jongh, Marc Vervloet, Robert de Jonge, and Annemieke Heijboer. 2018. 'The When, What & How of Measuring Vitamin D Metabolism in Clinical Medicine'. *Nutrients* 10 (4): 1-16. <https://doi.org/10.3390/nu10040482>.
- Dixon Brian M., Tyler Barker, Toni McKinnon, John Cuomo, Balz Frei, Niels Borregaard, and Adrian F. Gombart. 2012. 'Positive Correlation between Circulating Cathelicidin Antimicrobial Peptide (HCAP18/LL-37) and 25-Hydroxyvitamin D Levels in Healthy Adults'. *BMC Research Notes* 575 (5): 1-5. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-575>.
- Doroudi Maryam, Zvi Schwartz, and Barbara D. Boyan. 2015. 'Membrane-Mediated Actions of 1,25-Dihydroxy Vitamin D₃: A Review of the Roles of Phospholipase A2 Activating Protein and Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II'. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 147 (5): 81–84. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.11.002>.
- Dwivedi Prem P., Xiu-Hui Gao, Joseph Cheng-Ta Tan, Andreas Evdokiou, Antonio Ferrante, Howard A. Morris, Brian K. May, and Charles S.T. Hii. 2010. 'A Role for the Phosphatidylinositol 3-Kinase – Protein Kinase C Zeta – Sp1 Pathway in the 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ Induction of the 25-Hydroxyvitamin D₃ 24-Hydroxylase Gene in Human Kidney Cells'. *Cellular Signalling* 22 (3): 543–52. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2009.11.009>.
- Edechi Chidalu, Nnamdi Ikeogu, Jude Uzonna, and Yvonne Myal. 2019. 'Regulation of Immunity in Breast Cancer'. *Cancers* 11 (8): 1080-87. <https://doi.org/10.3390/cancers11081080>.
- El-Abd E. A., A. S. Sultan, E. A. Shalaby, and F. Matakah. 2014. 'Animal Models of Breast Cancer'. *Omics Approaches in Breast Cancer* 297–314. https://doi.org/10.1007/978-81-322-0843-3_15.
- Elias Peter M., Mary L. Williams, Eung-Ho Choi, and Kenneth R. Feingold. 2014. 'Role of Cholesterol Sulfate in Epidermal Structure and Function: Lessons from X-Linked Ichthyosis'. *Biochimica et Biophysica Acta* 1841 (3): 353–61. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2013.11.009>.
- Engel P., G. Fagherazzi, A. Bouillon, T. Dupre, S. Mesrine, M.-C. Boutron-Ruault, and F. Clavel-Chapelon. 2010. 'Serum 25(OH) Vitamin D and Risk of Breast Cancer: A Nested Case-Control Study from the French E3N Cohort'. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 19 (9): 2341–50. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-10-0264>.
- Engin Atilla. 2017. 'Obesity-Associated Breast Cancer: Analysis of Risk Factors'. *Obesity and Lipotoxicity*, 960:571–606. https://doi.org/10.1007/978-3-319-48382-5_25.
- Ennour-Idrissi Kaoutar, Elizabeth Maunsell, and Caroline Diorio. 2015. 'Effect of Physical Activity on Sex Hormones in Women: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials'. *Breast Cancer Research* 17 (1): 139. <https://doi.org/10.1186/s13058-015-0647-3>.
- Ewens Andrew, Enrico Mihich, and M Jane Ehrke. 2005. 'Distant Metastasis from Subcutaneously Grown E0771 Medullary Breast Adenocarcinoma'. *Anticancer Research* 25 (6B): 3905-3916.
- Fantozz, Anna, and Gerhard Christofori. 2006. 'Mouse Models of Breast Cancer Metastasis'. *Breast Cancer Research* 8 (4): 212. <https://doi.org/10.1186/bcr1530>.
- Fleet James C., Christy Gliniak, Zhentao Zhang, Yingben Xue, Kathleen B. Smith, Rebecca McCreedy, and Sunday A. Adedokun. 2008. 'Serum Metabolite Profiles and Target Tissue Gene Expression Define the Effect of Cholecalciferol Intake on Calcium Metabolism in Rats and Mice'. *The Journal of Nutrition* 138 (6): 1114–20. <https://doi.org/10.1093/jn/138.6.1114>.
- Franchet Camille, Raphaëlle Duprez-Paumier, and Magali Lacroix-Triki. 2015. 'Cancer du sein luminal et apport des classifications intrinsèques moléculaires : comment identifier les tumeurs lumineuses A et B en 2015 ?' *Bulletin du Cancer* 102 (6): S34–46. [https://doi.org/10.1016/S0007-4551\(15\)31216-9](https://doi.org/10.1016/S0007-4551(15)31216-9).

- Fraser William D., Jonathan C. Y. Tang, John J. Dutton, and Inez Schoenmakers. 2020. 'Vitamin D Measurement, the Debates Continue, New Analytes Have Emerged, Developments Have Variable Outcomes'. *Calcified Tissue International* 106(1): 3–13. <http://doi.org/10.1007/s00223-019-00620-2>.
- Friedenreich Christine M., Charlotte Ryder, Burbidge, and Jessica McNeil. 2020. 'Physical Activity, Obesity and Sedentary Behavior in Cancer Etiology: Epidemiologic Evidence and Biologic Mechanisms'. *Molecular Oncology* 12772: 1878-0261. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12772>.
- Fuentes-Mattei Enrique, Guermarie Velazquez-Torres, Liem Phan, Fanmao Zhang, Ping-Chieh Chou, Ji-Hyun Shin, Hyun Ho Choi, et al. 2014. 'Effects of Obesity on Transcriptomic Changes and Cancer Hallmarks in Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer'. *Journal of the National Cancer Institute* 106 (7). <https://doi.org/10.1093/jnci/dju158>.
- Galaine Jeanne, Yann Godet, and Olivier Adotévi. 2016. 'Pour comprendre : l'activation lymphocytaire T'. *Bulletin du Cancer* 103 (5): S127–31. [https://doi.org/10.1016/S0007-4551\(16\)30369-1](https://doi.org/10.1016/S0007-4551(16)30369-1).
- García-Quiroz Janice, Rocío García-Becerra, Nancy Santos-Martínez, Euclides Avila, Fernando Larrea, and Lorenza Díaz. 2016. 'Calcitriol Stimulates Gene Expression of Cathelicidin Antimicrobial Peptide in Breast Cancer Cells with Different Phenotype'. *Journal of Biomedical Science* 23 (87): 1-7. <https://doi.org/10.1186/s12929-016-0298-4>.
- Gaspar Rafael Calais, Vitor Rosetto Muñoz, Gabriel Keine Kuga, Susana Castelo Branco Ramos Nakandakari, Luciele Guerra Minuzzi, José Diego Botezelli, Adelino S.R. da Silva, et al. 2019. 'Acute Physical Exercise Increases Leptin-induced Hypothalamic Extracellular Signal-regulated Kinase1/2 Phosphorylation and Thermogenesis of Obese Mice'. *Journal of Cellular Biochemistry* 120 (1): 697–704. <https://doi.org/10.1002/jcb.27426>.
- Gibson Justin T., Rachael M. Orlandella, William J. Turbitt, Michael Behring, Upender Manne, Robert E. Sorge, and Lyse A. Norian. 2020. 'Obesity-Associated Myeloid-Derived Suppressor Cells Promote Apoptosis of Tumor-Infiltrating CD8 T Cells and Immunotherapy Resistance in Breast Cancer'. *Frontiers in Immunology* 590794 (11): 1-13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.590794>.
- Gil Ángel, Julio Plaza-Díaz, and María Dolores Mesa. 2018. 'Vitamin D: Classic and Novel Actions'. *Annals of Nutrition and Metabolism* 72 (2): 87–95. <https://doi.org/10.1159/000486536>.
- Glossmann Hartmut H. 2010. 'Origin of 7-Dehydrocholesterol (Provitamin D) in the Skin'. *Journal of Investigative Dermatology* 130 (8): 2139–41. <https://doi.org/10.1038/jid.2010.118>.
- Gombart Adrian F., Niels Borregaard, and H. Phillip Koeffler. 2005. 'Human Cathelicidin Antimicrobial Peptide (CAMP) Gene Is a Direct Target of the Vitamin D Receptor and Is Strongly Up-regulated in Myeloid Cells by 1,25-dihydroxyvitamin D₃'. *The FASEB Journal* 19 (9): 1067–77. <https://doi.org/10.1096/fj.04-3284com>.
- Goncalves-Mendes Nicolas, Jérémie Talvas, Christian Dualé, Aline Guttmann, Violaine Corbin, Geoffroy Marceau, Vincent Sapin, et al. 2019. 'Impact of Vitamin D Supplementation on Influenza Vaccine Response and Immune Functions in Deficient Elderly Persons: A Randomized Placebo-Controlled Trial'. *Frontiers in Immunology* 10(65): 1-12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00065>.
- Grant William B., Henry Lahore, Sharon L. McDonnell, Carole A. Baggerly, Christine B. French, Jennifer L. Aliano, and Harjit P. Bhattoa. 2020. 'Evidence That Vitamin D Supplementation Could Reduce Risk of Influenza and COVID-19 Infections and Deaths'. *Nutrients* 12 (4): 1-19. <https://doi.org/10.3390/nu12040988>.
- Grebić Damir, Tamara Gulić, Alma Starčević, Manuela Alvirović, Gordana Blagojević Zagorac, Petra Valković Zujčić, and Danijela Veljković Vujaklija. 2020. 'The Role of Innate Immunity in the Pathogenesis of Breast Cancer'. *Breast Care* 16 (5): 1–5. <https://doi.org/10.1159/000507314>.
- Grundty Scott M., Bryan Brewer Jr., James I. Cleeman, Sidney C Smith Jr., Claude Lenfant, Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation*, 2004. 24 (2): e13-8. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000111245.75752.C6>
- Gu Jian-Wei, Emily Young, Sharla G. Patterson, Kristina L. Makey, Jeremy Wells, Min Huang, Kevan B. Tucker, and Lucio Miele. 2011. 'Postmenopausal Obesity Promotes Tumor Angiogenesis and Breast Cancer Progression in Mice'. *Cancer Biology & Therapy* 11 (10): 910–17. <https://doi.org/10.4161/cbt.11.10.15473>.
- Hagar Amit, Zemin Wang, Sachiko Koyama, Josua Aponte Serrano, Luma Melo, Stephanie Vargas, Richard Carpenter, and John Foley. 2019. 'Endurance Training Slows Breast Tumor Growth in Mice by

- Suppressing Treg Cells Recruitment to Tumors'. *BMC Cancer* 19 (536): 1-10. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5745-7>.
- Haussler Mark R., G. Kerr Whitfield, Ichiro Kaneko, Carol A. Haussler, David Hsieh, Jui-Cheng Hsieh, and Peter W. Jurutka. 2013. 'Molecular Mechanisms of Vitamin D Action'. *Calcified Tissue International* 92 (2): 77–98. <https://doi.org/10.1007/s00223-012-9619-0>.
- Hayes Alan, Emma Rybalka, Danielle A. Debruin, Erik D. Hanson, David Scott, and Kerrie Sanders. 2019. 'The Effect of Yearly-Dose Vitamin D Supplementation on Muscle Function in Mice'. *Nutrients* 11 (5): 1097. <https://doi.org/10.3390/nu11051097>.
- Herrmann Markus, Christopher-John L. Farrell, Irene Pusceddu, Neus Fabregat-Cabello, and Etienne Cavalier. 2017. 'Assessment of Vitamin D Status – a Changing Landscape'. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* 55 (1): 3–26. <https://doi.org/10.1515/cclm-2016-0264>.
- Hii Charles and Antonio Ferrante. 2016. 'The Non-Genomic Actions of Vitamin D'. *Nutrients* 135 (8): 1-14. <https://doi.org/10.3390/nu8030135>.
- Holen Ingunn, Valerie Speirs, Bethny Morrissey, and Karen Blyth. 2017. 'In Vivo Models in Breast Cancer Research: Progress, Challenges and Future Directions'. *Disease Models & Mechanisms* 10 (4): 359–71. <https://doi.org/10.1242/dmm.028274>.
- Holick Michael F. 2017. 'The Vitamin D Deficiency Pandemic: Approaches for Diagnosis, Treatment and Prevention'. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 18 (2): 153–65. <https://doi.org/10.1007/s11154-017-9424-1>.
- Høyer-Hansen M, L Bastholm, I S Mathiasen, F Elling, and M Jäättelä. 2005. 'Vitamin D Analog EB1089 Triggers Dramatic Lysosomal Changes and Beclin 1-Mediated Autophagic Cell Death'. *Cell Death & Differentiation* 12 (10): 1297–1309. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401651>.
- Jardé Thierry, Florence Caldefie-Chézet, Nicolas Goncalves-Mendes, F Mishellany, C Buechler, F Penault-Llorca, and Marie-Paule Vasson. 2009. 'Involvement of Adiponectin and Leptin in Breast Cancer: Clinical and in Vitro Studies'. *Endocrine-Related Cancer* 16 (4): 1197–1210. <https://doi.org/10.1677/ERC-09-0043>.
- Jardé Thierry, Stéphane Perrier, Marie-Paule Vasson, and Florence Caldefie-Chézet. 2011. 'Molecular Mechanisms of Leptin and Adiponectin in Breast Cancer'. *European Journal of Cancer* 47 (1): 33–43. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2010.09.005>.
- Jeon Sang-Min and Eun-Ae Shin. 2018. 'Exploring Vitamin D Metabolism and Function in Cancer'. *Experimental & Molecular Medicine* 50 (4): 20. <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0038-9>.
- Jin Lei, Krista K. Hill, Holly Filak, Jennifer Mogan, Heather Knowles, Bicheng Zhang, Anne-Laure Perraud, John C. Cambier, and Laurel L. Lenz. 2011. 'MPYS Is Required for IFN Response Factor 3 Activation and Type I IFN Production in the Response of Cultured Phagocytes to Bacterial Second Messengers Cyclic-Di-AMP and Cyclic-Di-GMP'. *The Journal of Immunology* 187 (5): 2595–2601. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100088>.
- Jing Weiqiang, Xing Guo, Ganyu Wang, Yuxuan Bi, Lihui Han, Qingfen Zhu, Chunhong Qiu, Masato Tanaka, and Yunxue Zhao. 2020. 'Breast Cancer Cells Promote CD169+ Macrophage-Associated Immunosuppression through JAK2-Mediated PD-L1 Upregulation on Macrophages'. *International Immunopharmacology* 78 (12): 106012. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.106012>.
- Jones Glenville, David E. Prosser, and Martin Kaufmann. 2014. 'Cytochrome P450-Mediated Metabolism of Vitamin D'. *Journal of Lipid Research* 55 (1): 13–31. <https://doi.org/10.1194/jlr.R031534>.
- Joshi S., L.-C. Pantalena, X. K. Liu, S. L. Gaffen, H. Liu, C. Rohowsky-Kochan, K. Ichiyama, et al. 2011. '1,25-Dihydroxyvitamin D3 Ameliorates Th17 Autoimmunity via Transcriptional Modulation of Interleukin-17A'. *Molecular and Cellular Biology* 31 (17): 3653–69. <https://doi.org/10.1128/MCB.05020-11>.
- Kado Tomonobu, Allah Nawaz, Akiko Takikawa, Isao Usui, and Kazuyuki Tobe. 2019. 'Linkage of CD8+ T Cell Exhaustion with High-Fat Diet-Induced Tumourigenesis'. *Scientific Reports* 9 (1): 12284. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48678-0>.
- Kan Nai-Wen, Chin-Shan Ho, Yen-Shuo Chiu, Wen-Ching Huang, Pei-Yu Chen, Yu-Tang Tung, and Chi-Chang Huang. 2016. 'Effects of Resveratrol Supplementation and Exercise Training on Exercise Performance in Middle-Aged Mice'. *Molecules* 21 (5): 661. <https://doi.org/10.3390/molecules21050661>.
- Kanda N., C. S. Hau, Y. Tada, S. Sato, and S. Watanabe. 2012. 'Decreased Serum LL-37 and Vitamin D3 Levels in Atopic Dermatitis: Relationship between IL-31 and Oncostatin M'. *Allergy* 67 (6): 804–12. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2012.02824.x>.
- Kang Seong Wook, Sang Hyun Kim, Naeun Lee, Won-Woo Lee, Kyung-A Hwang, Min Sun Shin, Seung-Hyun Lee, Wan-Uk Kim, and Insoo Kang. 2012. '1,25-Dihydroxyvitamin D₃ Promotes FOXP3 Expression

- via Binding to Vitamin D Response Elements in Its Conserved Noncoding Sequence Region'. *The Journal of Immunology* 188 (11): 5276–82. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101211>.
- Karkeni Esmā, Stéphanie O. Morin, Berna Bou Tayeh, Armelle Goubard, Emmanuelle Josselin, Rémy Castellano, Cyril Fauriat, Geoffrey Guittard, Daniel Olive and Jacques A. Nunès 1* (2019) VitD Controls Tumour Growth and CD8+ T Cell Infiltration in Breast Cancer. *Frontiers in Immunology* 10 (12): 1-12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01307>
- Keith Meggan E., Erika LaPorta, and JoEllen Welsh. 2014. 'Stable Expression of Human VDR in Murine VDR-Null Cells Recapitulates Vitamin D Mediated Anti-Cancer Signaling: Ectopic Vdr Mediates Anti-cancer Actions.' *Molecular Carcinogenesis* 53 (4): 286–99. <https://doi.org/10.1002/mc.21975>.
- Kemmis Carly M., Sally M. Salvador, Kelly M. Smith, and JoEllen Welsh. 2006. 'Human Mammary Epithelial Cells Express CYP27B1 and Are Growth Inhibited by 25-Hydroxyvitamin D-3, the Major Circulating Form of Vitamin D-3'. *The Journal of Nutrition* 136 (4): 887–92. <https://doi.org/10.1093/jn/136.4.887>.
- Khori Vahid, Sadegh Amani Shalamzari, Amin Isanejad, Ali Mohammad Alizadeh, Shaban Alizadeh, Saeed Khodayari, Hamid Khodayari, et al. 2015. 'Effects of Exercise Training Together with Tamoxifen in Reducing Mammary Tumor Burden in Mice: Possible Underlying Pathway of MiR-21'. *European Journal of Pharmacology* 765 (9): 179–87. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.08.031>.
- Kershaw E.E. and J.S. Flier, Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2004. 89(6): p. 2548-2556.
- Knochelmann Hannah M. 2018. 'When Worlds Collide: Th17 and Treg Cells in Cancer and Autoimmunity'. *Molecular Immunology*, 12 (15):458–469; <https://doi.org/10.1038/s41423-018-0004-4>.
- Kongsbak Martin, Marina Rode von Essen, Trine Bøegh Levring, Peter Schjerling, Anders Woetmann, Niels Ødum, Charlotte Menné Bonefeld, and Carsten Geisler. 2014. 'Vitamin D-Binding Protein Controls T Cell Responses to Vitamin D'. *BMC Immunology* 15 (1): 1-13. <https://doi.org/10.1186/s12865-014-0035-2>.
- Kreutz M., R. Andreesen, S. W. Krause, A. Szabo, E. Ritz, and H. Reichel. 1993. '1,25-Dihydroxyvitamin D3 Production and Vitamin D3 Receptor Expression Are Developmentally Regulated during Differentiation of Human Monocytes into Macrophages'. *Blood* 82 (4): 1300–1307.
- Krishnan Aruna V., Srilatha Swami, and David Feldman. 2012. 'The Potential Therapeutic Benefits of Vitamin D in the Treatment of Estrogen Receptor Positive Breast Cancer'. *Steroids* 77 (11): 1107–12. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2012.06.005>.
- Krusinska Beata, Lidia Wadolowska, Maciej Biernacki, Malgorzata Anna Slowinska, and Marek Drozdowski. 2019. 'Serum "Vitamin-Mineral" Profiles: Associations with Postmenopausal Breast Cancer Risk Including Dietary Patterns and Supplementation. A Case-Control Study'. *Nutrients* 11 (9): 2244. <https://doi.org/10.3390/nu11092244>.
- Kumar V. 2018. 'T Cells and Their Immunometabolism: A Novel Way to Understanding Sepsis Immunopathogenesis and Future Therapeutics'. *European Journal of Cell Biology* 97 (6): 379–92. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2018.05.001>.
- Laplagne Chloé, Marcin Domagala, Augustin Le Naour, Christophe Quemerais, Dimitri Hamel, Jean-Jacques Fournié, Bettina Couderc, Corinne Bousquet, Audrey Ferrand, and Mary Poupot. 2019. 'Latest Advances in Targeting the Tumor Microenvironment for Tumor Suppression'. *International Journal of Molecular Sciences* 20 (19): 4719. <https://doi.org/10.3390/ijms20194719>.
- Larsen Maria T., Mattias Häger, Andreas Glenthøj, Fazila Asmar, Stine N. Clemmensen, Helena Mora-Jensen, Niels Borregaard, and Jack B. Cowland. 2014. 'MiRNA-130a Regulates C/EBP-ε Expression during Granulopoiesis'. *Blood* 123 (7): 1079–89. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-08-523233>.
- Le Guennec Delphine, Victor Hatte, Marie-Chantal Farges, Stéphanie Rougé, Marie Goepp, Florence Caldefie-Chezet, Marie- Paule Vasson, and Adrien Rossary. 2020. 'Modulation of Inter-Organ Signalling in Obese Mice by Spontaneous Physical Activity during Mammary Cancer Development'. *Scientific Reports* 10 (1): 8794. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65131-9>.
- Le Naour Augustin, Yvonne Koffi, Mariane Diab, Delphine Le Guennec, Stéphanie Rougé, Sahar Aldekwir, Nicolas Goncalves-Mendes, et al. 2019. 'The EO771 Mammary Cancer Cell Line Displays a Luminal B Phenotype and It Is Sensitive to Anti-Estrogen Treatments'. *Cancer Cell Int.* 20 (328): 1-13 <https://doi.org/10.1101/715201>.
- Le Naour Augustin, Adrien Rossary, and Marie□Paule Vasson. 2020. 'EO771, Is It a Well□characterized Cell Line for Mouse Mammary Cancer Model? Limit and Uncertainty'. *Cancer Medicine* 9 (21): 8074–85. <https://doi.org/10.1002/cam4.3295>.

- Lee Ga Young. 2018. 'Differential Effect of Dietary Vitamin D Supplementation on Natural Killer Cell Activity in Lean and Obese Mice'. *Journal of Nutritional Biochemistry* 55 (7): 178-184.
- Lehmann Bodo. 2005. 'The Vitamin D3 Pathway in Human Skin and Its Role for Regulation of Biological Processes'. *Photochemistry and Photobiology* 81 (6): 1246-1 251. <https://doi.org/10.1562/2005-02-02-IR-430>.
- Li Guiming, Joanne Domenico, Yi Jia, Joseph J. Lucas, and Erwin W. Gelfand. 2009. 'NF-KappaB-Dependent Induction of Cathelicidin-Related Antimicrobial Peptide in Murine Mast Cells by Lipopolysaccharide'. *International Archives of Allergy and Immunology* 150 (2): 122-32. <https://doi.org/10.1159/000218115>.
- Liu Philip T., Steffen Stenger, Huiying Li, Linda Wenzel, Belinda H. Tan, Stephan R. Krutzik, Maria Teresa Ochoa, et al. 2006. 'Toll-like Receptor Triggering of a Vitamin D-Mediated Human Antimicrobial Response'. *Science* 311 (5768): 1770-73. <http://www.jstor.org/stable/3845724>.
- Liu Wen-Chih, Cai-Mei Zheng, Chien-Lin Lu, Yuh-Feng Lin, Jia-Fwu Shyu, Chia-Chao Wu, and Kuo-Cheng Lu. 2015. 'Vitamin D and Immune Function in Chronic Kidney Disease'. *Clinica Chimica Acta* 450 (9): 135-44. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.08.011>.
- Livak K. J. and T. D. Schmittgen. 2001. 'Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method'. *Methods* 25 (4): 402-8. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- Ma Dong, Ruo-nan Zhang, Ya Wen, Wei-na Yin, Disi Bai, Guo-ying Zheng, Jin-shui Li, Bin Zheng, and Jin-kun Wen. 2017. '1, 25(OH)2D3-Induced Interaction of Vitamin D Receptor with P50 Subunit of NF-KB Suppresses the Interaction between KLF5 and P50, Contributing to Inhibition of LPS-Induced Macrophage Proliferation'. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 482 (9): 366-374. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.11.069>
- Mahbouli Sinda, Jérémie Talvas, Audrey der Vartanian, Sophie Ortega, Stéphanie Rougé, Marie-Paule Vasson, and Adrien Rossary. 2018a. 'Activation of Antioxidant Defences of Human Mammary Epithelial Cells under Leptin Depend on Neoplastic State'. *BMC Cancer* 18 (1): 1264. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-5141-8>.
- Manel Nicolas. 2019. 'Editorial Overview: Pillars of Innate Immunity: Constantly Learning and Trying to Remember'. *Current Opinion in Immunology*, 4 (56): iii-vi. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2019.03.002>
- Manzanares G., G. Brito-da-Silva, and P.G. Gandra. 2019. 'Voluntary Wheel Running: Patterns and Physiological Effects in Mice'. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 52 (1): e7830. <https://doi.org/10.1590/1414-431x20187830>.
- Marcotorchino Julie, Franck Tourniaire, Julien Astier, Esmá Karkeni, Matthias Canault, Marie-Josèphe Amiot, David Bendahan, et al. 2014. 'Vitamin D Protects against Diet-Induced Obesity by Enhancing Fatty Acid Oxidation'. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 25 (10): 1077-83. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.05.010>.
- Matthews Donald, Erika LaPorta, Glendon M. Zinser, Carmen J. Narvaez, and JoEllen Welsh. 2010. 'Genomic Vitamin D Signaling in Breast Cancer: Insights from Animal Models and Human Cells'. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 121 (1-2): 362-67. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2010.03.061>.
- McTiernan Anne. 2003. 'Behavioral Risk Factors in Breast Cancer: Can Risk Be Modified?' *The Oncologist* 8 (4): 326-34. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.8-4-326>.
- McTiernan Anne, Charles Kooperberg, Emily White, Sara Wilcox, Ralph Coates, Lucile L. Adams-Campbell, Nancy Woods, and Judith Ockene. 2004. 'Recreational Physical Activity and the Risk of Breast Cancer in Postmenopausal Women: The Women's Health Initiative Cohort Study.' *Obstetrical & Gynecological Survey* 59 (3): 203-4. <https://doi.org/10.1097/01.OGX.0000115859.71446.89>.
- Merriman Kathryn E., Jessi L. Powell, Jose E.P. Santos, and Corwin D. Nelson. 2018. 'Intramammary 25-Hydroxyvitamin D3 Treatment Modulates Innate Immune Responses to Endotoxin-Induced Mastitis'. *Journal of Dairy Science* 101 (8): 7593-7607. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14143>.
- Miodovnik Mor, Ruth Koren, Esther Ziv, and Amiram Ravid. 2012. 'The Inflammatory Response of Keratinocytes and Its Modulation by Vitamin D: The Role of MAPK Signaling Pathways'. *Journal of Cellular Physiology* 227 (5): 2175-83. <https://doi.org/10.1002/jcp.22951>.
- Molanouri Shamsi Mahdiyeh, Soodabeh Chekachak, Sara Soudi, Quinn Kia Ranjbar, J. Chenari, M.H. Yazdi, and M. Mahdavi. 2017. 'Combined Effect of Aerobic Interval Training and Selenium Nanoparticles on Expression of IL-15 and IL-10/TNF- α Ratio in Skeletal Muscle of 4T1 Breast Cancer Mice with Cachexia'. *Cytokine* 90 (9): 100-108. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2016.11.005>.

- Molanouri Shamsi Mahdieh, Soodabeh Chekachak, Sara Soudi, Reza Gharakhanlou, LeBris S. Quinn, Kia Ranjbar, Sajjad Rezaei, et al. 2019. 'Effects of Exercise Training and Supplementation with Selenium Nanoparticle on T-Helper 1 and 2 and Cytokine Levels in Tumor Tissue of Mice Bearing the 4 T1 Mammary Carcinoma'. *Nutrition* 57 (7): 141–47. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2018.05.022>.
- Monkawa Toshiaki, Tadashi Yoshida, Matsuhiko Hayashi, and Takao Saruta. 2000. 'Identification of 25-Hydroxyvitamin D3 1 α -Hydroxylase Gene Expression in Macrophages'. *Kidney International* 58 (2): 559–68. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2000.00202.x>.
- Morin Stéphanie O., Marjorie Poggi, Marie-Christine Alessi, Jean-François Landrier, and Jacques A. Nunès. 2017. 'Modulation of T Cell Activation in Obesity'. *Antioxidants & Redox Signaling* 26 (10): 489–500. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6746>.
- Mousa Aya, Marie Misso, Helena Teede, Robert Scragg, and Barbora de Courten. 2016. 'Effect of Vitamin D Supplementation on Inflammation: Protocol for a Systematic Review'. *BMJ Open* 6 (4): e010804. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2015-010804>.
- Muhammad Marwa Hassan, Noha Ibrahim Hussien, and Sania K. Elwia. 2020. 'Vitamin D Replacement Mitigates Menopause-Associated Dyslipidaemia and Atherogenic Indices in Ovariectomized Rats; A Biochemical Study'. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* 128 (03): 144–51. <https://doi.org/10.1055/a-0934-5666>.
- Murphy E.A., J.M. Davis, T.L. Barrilleaux, J.L. McClellan, J.L. Steiner, M.D. Carmichael, M.M. Pena, J.R. Hebert, and J.E. Green. 2011. 'Benefits of Exercise Training on Breast Cancer Progression and Inflammation in C3(1)SV40Tag Mice'. *Cytokine* 55 (2): 274–79. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2011.04.007>.
- Nachat-Kappes Rachida, Alexandre Pinel, Kristell Combe, Bruno Lamas, Marie-Chantal Farges, Adrien Rossary, Nicolas Goncalves-Mendes, Florence Caldefie-Chezet, Marie-Paule Vasson, and Samar Basu. 2012a. 'Effects of Enriched Environment on COX-2, Leptin and Eicosanoids in a Mouse Model of Breast Cancer'. Edited by William B. Coleman. *PLoS ONE* 7 (12): e51525. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051525>.
- Naik Adviti, Arta Monir Monjazez, and Julie Decock. 2019. 'The Obesity Paradox in Cancer, Tumor Immunology, and Immunotherapy: Potential Therapeutic Implications in Triple Negative Breast Cancer'. *Frontiers in Immunology* 10 (1940): 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01940>.
- Naveiras Olaia, Valentina Nardi, Pamela L. Wenzel, Peter V. Hauschka, Frederic Fahey, and George Q. Daley. 2009. 'Bone-Marrow Adipocytes as Negative Regulators of the Haematopoietic Microenvironment'. *Nature* 460 (7252): 259–63. <https://doi.org/10.1038/nature08099>.
- Noland Robert C. 2015. 'Exercise and Regulation of Lipid Metabolism'. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 135:39–74. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2015.06.017>.
- Obeid Elias, Rita Nanda, Yang-Xin Fu, and Olufunmilayo I. Olopade. 2013. 'The Role of Tumor-Associated Macrophages in Breast Cancer Progression'. *International Journal of Oncology* 43 (1): 5–12. <https://doi.org/10.3892/ijo.2013.1938>.
- O'Riordan Jeffrey LH. 2006. 'Rickets in the 17th Century'. *Journal of Bone and Mineral Research* 21 (10): 1506–10. <https://doi.org/10.1359/jbmr.060703>.
- Ota Kuniaki, Svetlana Dambaeva, Michael Woo-Il Kim, Ae-Ra Han, Atsushi Fukui, Alice Gilman-Sachs, Kenneth Beaman, and Joanne Kwak-Kim. 2015. '1,25-Dihydroxy-Vitamin D3 Regulates NK-Cell Cytotoxicity, Cytokine Secretion, and Degranulation in Women with Recurrent Pregnancy Losses'. *European Journal of Immunology* 45 (11): 3188–99. <https://doi.org/10.1002/eji.201545541>.
- Overbergh L, B Decallonne, D Valckx, A Verstuyf, J Depovere, J Laureys, O Rutgeerts, R Saint-Arnaud, R Bouillon, and C Mathieu. 2000. 'Identification and Immune Regulation of 25-Hydroxyvitamin D-1- α -Hydroxylase in Murine Macrophages'. *Clinical and Experimental Immunology*, 8.
- Pandolfi Franco, Laura Franza, Claudia Mandolini, and Pio Conti. 2017. 'Immune Modulation by Vitamin D: Special Emphasis on Its Role in Prevention and Treatment of Cancer'. *Clinical Therapeutics* 39 (5): 884–93. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2017.03.012>.
- Park In Hae, Han Na Yang, Kyoung Joo Lee, Tae-Sik Kim, Eun Sook Lee, So-Youn Jung, Youngmee Kwon, and Sun-Young Kong. 2017. 'Tumor-Derived IL-18 Induces PD-1 Expression on Immunosuppressive NK Cells in Triple-Negative Breast Cancer'. *Oncotarget* 8 (20): 32722–30. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16281>.
- Pawlik Agata, Artur Anisiewicz, Beata Filip-Psurska, Marcin Nowak, Eliza Turlej, Justyna Trynda, Joanna Banach, Paweł Gretkierewicz, and Joanna Wietrzyk. 2018. 'Calcitriol and Its Analogs Establish the Immunosuppressive Microenvironment That Drives Metastasis in 4T1 Mouse Mammary Gland

- Cancer'. *International Journal of Molecular Sciences* 19 (7): 2116-38. <https://doi.org/10.3390/ijms19072116>.
- Pickholtz Itay, Shira Saadyan, Gilmor I. Keshet, Victor S. Wang, Rachel Cohen, Peter Bouwman, Jos Jonkers, Stephen W. Byers, Moshe Z. Papa, and Ronit I. Yarden. 2014. 'Cooperation between BRCA1 and Vitamin D Is Critical for Histone Acetylation of the P21waf1 Promoter and for Growth Inhibition of Breast Cancer Cells and Cancer Stem-like Cells.' *Oncotarget* 5 (23): 11827-46. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2582>.
- Pike J. Wesley, and Mark B. Meyer. 2014. 'Fundamentals of Vitamin D Hormone-Regulated Gene Expression'. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 144 (7): 5-11. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.11.004>.
- Piktel Ewelina, Izabela Prokop, Urszula Wnorowska, Grzegorz Król, Mateusz Cieśluk, Katarzyna Niemirowicz, Paul B. Savage, and Robert Bucki. 2018. 'Ceragenin CSA-13 as Free Molecules and Attached to Magnetic Nanoparticle Surfaces Induce Caspase-Dependent Apoptosis in Human Breast Cancer Cells via Disruption of Cell Oxidative Balance'. *Oncotarget* 9 (31): 21904-20. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25105>.
- Pinkas Jarosław, Iwona Bojar, Mariusz Gujski, Joanna Bartosińska, Alfred Owoc, and Dorota Raczkiewicz. 2017. 'Serum Lipid, Vitamin D Levels, and Obesity in Perimenopausal and Postmenopausal Women in Non-Manual Employment'. *Medical Science Monitor* 23 (7): 5018-26. <https://doi.org/10.12659/MSM.906895>.
- Pramanik Rocky, John R. Asplin, Christina Lindeman, Murray J. Favus, Shaochun Bai, and Fredric L. Coe. 2004. 'Lipopolysaccharide Negatively Modulates Vitamin D Action by Down-Regulating Expression of Vitamin D-Induced VDR in Human Monocytic THP-1 Cells'. *Cellular Immunology* 232 (1): 137-43. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2005.03.004>.
- Prié Dominique, and Gérard Friedlander. 2010. 'Reciprocal Control of 1,25-Dihydroxyvitamin D and FGF23 Formation Involving the FGF23/Klotho System'. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 5 (9): 1717-22. <https://doi.org/10.2215/CJN.02680310>.
- Quail Daniela F., and Andrew J. Dannenberg. 2019. 'The Obese Adipose Tissue Microenvironment in Cancer Development and Progression'. *Nature Reviews Endocrinology* 15 (3): 139-54. <https://doi.org/10.1038/s41574-018-0126-x>.
- Rachez Christophe, Matthew Gamble, Chao-Pei Betty Chang, G. Brandon Atkins, Mitchell A. Lazar, and Leonard P. Freedman. 2000. 'The DRIP Complex and SRC-1/P160 Coactivators Share Similar Nuclear Receptor Binding Determinants but Constitute Functionally Distinct Complexes'. *Molecular and Cellular Biology* 20 (8): 2718-26. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.8.2718-2726.2000>.
- Rafique Aisha, Lars Rejnmark, Lene Heickendorff, and Holger Jon Møller. 2019. '25(OH)D3 and 1.25(OH)2D3 Inhibits TNF- α Expression in Human Monocyte Derived Macrophages'. *PLoS ONE* 14 (4): 1-11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215383>.
- Rajakumar Kumaravel. 2003. 'Vitamin D, Cod-Liver Oil, Sunlight, and Rickets: A Historical Perspective'. *PEDIATRICS* 112 (2): e132-35. <https://doi.org/10.1542/peds.112.2.e132>.
- Ramanathan Balaji, Elizabeth G. Davis, Christopher R. Ross, and Frank Blecha. 2002. 'Cathelicidins: Microbicidal Activity, Mechanisms of Action, and Roles in Innate Immunity'. *Microbes and Infection* 4 (3): 361-72. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(02\)01549-6](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(02)01549-6).
- Raphael Itay. 2015. 'T Cell Subsets and Their Signature Cytokines in Autoimmune and Inflammatory Diseases', 74 (13): 5-17. DOI: 10.1016/j.cyto.2014.09.011
- Richards Sarah E, Kaytie A Weierstahl, and Jessica L Kelts. 2015. 'Vitamin D Effect on Growth and Vitamin D Metabolizing Enzymes in Triple-Negative Breast Cancer'. *Anticancer Research*, 35 (2): 805-810.
- Riera Romo Mario, Dayana Pérez-Martínez, and Camila Castillo Ferrer. 2016. 'Innate Immunity in Vertebrates: An Overview'. *Immunology* 148 (2): 125-39. <https://doi.org/10.1111/imm.12597>.
- Ros-Soto Jose, Chloe Anthias, Alejandro Madrigal, and John A. Snowden. 2019. 'Vitamin D: Is It Important in Haematopoietic Stem Cell Transplantation? A Review'. *Bone Marrow Transplantation* 54 (6): 810-20. <https://doi.org/10.1038/s41409-018-0377-0>.
- Rowling Matthew J., Carly M. Kemmis, David A. Taffany, and JoEllen Welsh. 2006. 'Megalin-Mediated Endocytosis of Vitamin D Binding Protein Correlates with 25-Hydroxycholecalciferol Actions in Human Mammary Cells'. *The Journal of Nutrition* 136 (11): 2754-59. <https://doi.org/10.1093/jn/136.11.2754>.
- Rowshanravan Behzad, Neil Halliday, and David M. Sansom. 2018. 'CTLA-4: A Moving Target in Immunotherapy'. *Blood* 131 (1): 58-67. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-06-741033>.

- Sadeghi Kambis, Barbara Wessner, Ute Laggner, Martin Ploder, Dietmar Tamandl, Josef Friedl, Ullrich Zügel, et al. 2006. 'Vitamin D₃ Down-Regulates Monocyte TLR Expression and Triggers Hyporesponsiveness to Pathogen-Associated Molecular Patterns'. *European Journal of Immunology* 36 (2): 361–70. <https://doi.org/10.1002/eji.200425995>.
- Sáez María del Carmen, Carmen Barriga, Juan Jos#x00E9; García, Ana Beatriz Rodríguez, and Eduardo Ortega. 2007. 'Exercise-Induced Stress Enhances Mammary Tumor Growth in Rats: Beneficial Effect of the Hormone Melatonin'. *Molecular and Cellular Biochemistry* 294 (1–2): 19–24. <https://doi.org/10.1007/s11010-005-9067-5>.
- Sancho-Garnier H el ene and Marc Colonna. 2019. ' pid miologie des cancers du sein'. *La Presse M dicale* 48 (10): 1076–84. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2019.09.022>.
- Sancho-Vaello Enea, David Gil-Carton, Patrice Fran ois, Eve-Julie Bonetti, Mohamed Kreir, Karunakar Reddy Pothula, Ulrich Kleinekath fer, and Kornelius Zeth. 2020. 'The Structure of the Antimicrobial Human Cathelicidin LL-37 Shows Oligomerization and Channel Formation in the Presence of Membrane Mimics'. *Scientific Reports* 10 (15):1-16. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74401-5>.
- Sarkar Surojit, Martin Hewison, George P. Studzinski, Yan Chun Li, and Vandana Kalia. 2016. 'Role of Vitamin D in Cytotoxic T Lymphocyte Immunity to Pathogens and Cancer'. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 53 (2): 132–45. <https://doi.org/10.3109/10408363.2015.1094443>.
- Sassi Francesca, Cristina Tamone, and Patrizia D'Amelio. 2018. 'Vitamin D: Nutrient, Hormone, and Immunomodulator'. *Nutrients* 10 (11): 1656. <https://doi.org/10.3390/nu10111656>.
- Schauber J rgen, Robert A. Dorschner, Alvin B. Coda, Amanda S. B chau, Philip T. Liu, David Kiken, Yolanda R. Helfrich, et al. 2007. 'Injury Enhances TLR2 Function and Antimicrobial Peptide Expression through a Vitamin D–Dependent Mechanism'. *Journal of Clinical Investigation* 117 (3): 803–11. <https://doi.org/10.1172/JCI30142>.
- Sch tz Florian, Stefan Stefanovic, Luisa Mayer, Alexandra von Au, Christoph Domschke, and Christof Sohn. 2017. 'PD-1/PD-L1 Pathway in Breast Cancer'. *Oncology Research and Treatment* 40 (5): 294–97. <https://doi.org/10.1159/000464353>.
- Scully Tiffany, Sue M. Firth, Carolyn D. Scott, Hasanthi C. de Silva, John E. Pintar, Tailoi Chan-Ling, Stephen M. Twigg, and Robert C. Baxter. 2016. 'Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3 Links Obesity and Breast Cancer Progression'. *Oncotarget* 7 (34): 55491–505. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10675>.
- Seth-Vollenweider Tanya, Sneha Joshi, Puneet Dhawan, Said Sif, and Sylvia Christakos. 2014. 'Novel Mechanism of Negative Regulation of 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-Induced 25-Hydroxyvitamin D₃ 24-Hydroxylase (Cyp24a1) Transcription:Epigenetic modification involving cross-talk between protein-arginine methyltransferase 5 and thr SWI/SNF complex'. *Journal of Biological Chemistry* 289 (49): 33958–70. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.583302>.
- Shalamzari Sadegh Amani, Hamid Agha-Alinejad, Shaban Alizadeh, Shirin Shahbazi, Zahra Kashani Khatib, AbdolReza Kazemi, Mohamad Amin Saei, and Neda Minayi. 2014. 'The Effect of Exercise Training on the Level of Tissue IL-6 and Vascular Endothelial Growth Factor in Breast Cancer Bearing Mice'. *Iran J Basic Med Sci* 17 (4): 6: 231-236. PMID: 24904714
- Shihab Israa, Bariaa A. Khalil, Noha Mousaad Elemam, Ibrahim Y. Hachim, Mahmood Yaseen Hachim, Rifat A. Hamoudi, and Azzam A. Maghazachi. 2020. 'Understanding the Role of Innate Immune Cells and Identifying Genes in Breast Cancer Microenvironment'. *Cancers* 12 (8): 2226. <https://doi.org/10.3390/cancers12082226>.
- Shirvani-Farsani Zeinab, Majid Pahlevan Kakhki, Bahar Naghavi Gargari, Roozita Doosti, Abdorreza Naser Moghadasi, Amir Reza Azimi, and Mehrdad Behmanesh. 2017. 'The Expression of VDR mRNA but Not NF-KB Surprisingly Decreased after Vitamin D Treatment in Multiple Sclerosis Patients'. *Neuroscience Letters* 653 (6): 258–63. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.05.050>.
- Simone Valeria and Franco Silvestris. 2016. 'Obesity and Breast Cancer: Molecular Interconnections and Potential Clinical Applications', 21 (14): 404-417. DOI: 10.1634/theoncologist.2015-0351
- Singh Tatyana and Brian D. Adams. 2017. 'The Regulatory Role of MiRNAs on VDR in Breast Cancer'. *Transcription* 8 (4): 232–41. <https://doi.org/10.1080/21541264.2017.1317695>.
- Siswanto Siswanto, Lilik Zuhriyah, Kusworini Handono, Loeki Enggar Fitri, and Sumarno Reto Prawiro. 2015. 'Mycobacterium Tuberculosis DNA Increases Vitamin D Receptor mRNA Expression and the Production of Nitric Oxide and Cathelicidin in Human Monocytes'. *The Malaysian Journal of Medical Sciences* 22 (3): 18–24. PMID: 26715892

- Slaney C. Y., J. Rautela, and B. S. Parker. 2013. 'The Emerging Role of Immunosurveillance in Dictating Metastatic Spread in Breast Cancer'. *Cancer Research* 73 (19): 5852–57. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-1642>.
- Sloka Scott, Claudia Silva, Jianxiong Wang, and V Yong. 2011. 'Predominance of Th2 Polarization by Vitamin D through a STAT6-Dependent Mechanism'. *Journal of Neuroinflammation* 8 (1): 56. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-56>.
- So Jae Young, Hong Jin Lee, Amanda K. Smolarek, Shiby Paul, Chung-Xiou Wang, Hubert Maehr, Milan Uskokovic, et al. 2011. 'A Novel Gemini Vitamin D Analog Represses the Expression of a Stem Cell Marker CD44 in Breast Cancer'. *Molecular Pharmacology* 79 (3): 360–67. <https://doi.org/10.1124/mol.110.068403>.
- Sobral-Leite Marcelo, Izhar Salomon, Mark Opdam, Dinja T. Kruger, Karin J. Beelen, Vincent van der Noort, Ronald L. P. van Vlierberghe, et al. 2019. 'Cancer-Immune Interactions in ER-Positive Breast Cancers: PI3K Pathway Alterations and Tumor-Infiltrating Lymphocytes'. *Breast Cancer Research* 21 (1): 90. <https://doi.org/10.1186/s13058-019-1176-2>.
- Sokolova T. M., A. N. Shuvalov, V. V. Poloskov, I. M. Shapoval, and M. P. Kostinov. 2014. 'Grippol, Vaxigrip and influvac vaccines--inductors of innate and adaptive immunity factor genes in human blood cells'. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii, I Immunobiologii*, no. 5 (7): 37–43.
- Sorensen Ole E., Per Follin, Anders H. Johnsen, Jero Calafat, G. Sandra Tjabringa, Pieter S. Hiemstra, Niels Borregaard 2001. 'Human Cathelicidin, HCAP-18, Is Processed to the Antimicrobial Peptide LL-37 by Extracellular Cleavage with Proteinase 3'. *Blood* 97 (12): 3951–59. <https://doi.org/10.1182/blood.V97.12.3951>.
- Sousa Sofia, Régis Brion, Minnamaija Lintunen, Pauliina Kronqvist, Jouko Sandholm, Jukka Mönkkönen, Pirkko-Liisa Kellokumpu-Lehtinen, et al. 2015. 'Human Breast Cancer Cells Educate Macrophages toward the M2 Activation Status'. *Breast Cancer Research* 17 (1): 101–14. <https://doi.org/10.1186/s13058-015-0621-0>.
- Stoffels K., L. Overbergh, R. Bouillon, and C. Mathieu. 2007. 'Immune Regulation of 1 α -Hydroxylase in Murine Peritoneal Macrophages: Unravelling the IFN γ Pathway'. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 103 (3–5): 567–71. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2006.12.091>.
- Stukes Taylor M., Judith R. Shary, Wei Wei, Myla D. Ebeling, Kaleena B. Dezsi, Frank S. Shary, Nina E. Forestieri, Bruce W. Hollis, and Carol L. Wagner. 2016. 'Circulating Cathelicidin Concentrations in a Cohort of Healthy Children: Influence of Age, Body Composition, Gender and Vitamin D Status'. *PloS One* 11 (5): e0152711. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152711>.
- Swami Srilatha, Aruna V Krishnan, Jasmine Williams, Abhishek Aggarwal, Megan A Albertelli, Ronald L Horst, Brian J Feldman, and David Feldman. 2016a. 'Vitamin D Mitigates the Adverse Effects of Obesity on Breast Cancer in Mice'. *Endocrine-Related Cancer* 23 (4): 251–64. <https://doi.org/10.1530/ERC-15-0557>.
- Swiatnicki Matthew R. and Eran R. Andreichuk. 2019. 'How to Choose a Mouse Model of Breast Cancer, a Genomic Perspective'. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 24 (3): 231–43. <https://doi.org/10.1007/s10911-019-09433-3>.
- Talvas Jérémie, Catherine Caris-Veyrat, Laurent Guy, Mathieu Rambeau, Bernard Lyan, Régine Minet-Quinard, Jean-Marc Adolphe Lobaccaro, et al. 2010. 'Differential Effects of Lycopene Consumed in Tomato Paste and Lycopene in the Form of a Purified Extract on Target Genes of Cancer Prostatic Cells'. *The American Journal of Clinical Nutrition* 91 (6): 1716–24. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.28666>.
- Taniuchi Ichiro. 2018. 'CD4 Helper and CD8 Cytotoxic T Cell Differentiation'. *Annual Review of Immunology* 36 (1): 579–601. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042617-053411>.
- Thompson H. J., P. Wolfe, A. McTiernan, W. Jiang, and Z. Zhu. 2010. 'Wheel Running-Induced Changes in Plasma Biomarkers and Carcinogenic Response in the 1-Methyl-1-Nitrosourea-Induced Rat Model for Breast Cancer'. *Cancer Prevention Research* 3 (11): 1484–92. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-10-0078>.
- Timmons Brian W and Thomas Cieslak. 2018. 'Human Natural Killer Cell Subsets and Acute Exercise: A Brief Review', 469 (16) 8-23. PMID: 19203081
- Trivedi Trupti, Yu Zheng, Pierrick G.J. Fournier, Sreemala Murthy, Sutha John, Suzanne Schillo, Colin R. Dunstan, et al. 2017. 'The Vitamin D Receptor Is Involved in the Regulation of Human Breast Cancer Cell Growth via a Ligand-Independent Function in Cytoplasm'. *Oncotarget* 8 (16): 26687-701. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15803>.

- Trochoutsou Aikaterini, Vaia Kloukina, Konstantinos Samitas, and Georgina Xanthou. 2015. 'Vitamin-D in the Immune System: Genomic and Non-Genomic Actions'. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 15 (11): 953–63. <https://doi.org/10.2174/1389557515666150519110830>.
- Tsiaras W and M Weinstock. 2011. 'Factors Influencing Vitamin D Status'. *Acta Dermato Venereologica* 91 (2): 115–24. <https://doi.org/10.2340/00015555-0980>.
- Turbitt William J., Yitong Xu, Donna M. Sosnoski, Shawntawnee D. Collins, Huicui Meng, Andrea M. Mastro, and Connie J. Rogers. 2019. 'Physical Activity Plus Energy Restriction Prevents 4T1.2 Mammary Tumor Progression, MDSC Accumulation, and an Immunosuppressive Tumor Microenvironment'. *Cancer Prevention Research* 12 (8): 493–506. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-17-0233>.
- Uchida Hikaru, Yuichiro Hasegawa, Hiromichi Takahashi, and Makoto Makishima. 2016. '1 α -Dihydroxyvitamin D₃ and Retinoic Acid Increase Nuclear Vitamin D Receptor Expression in Monocytic THP-1 Cells'. *Anticancer Research* 36 (12): 6297–6302. <https://doi.org/10.21873/anticancerres.11225>.
- Vandamme Dieter, Bart Landuyt, Walter Luyten, and Liliane Schoofs. 2012. 'A Comprehensive Summary of LL-37, the Factotum Human Cathelicidin Peptide'. *Cellular Immunology* 280 (1): 22–35. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2012.11.009>.
- Vanoirbeek E, G Eelen, L Verlinden, G Carmeliet, C Mathieu, R Bouillon, R O'Connor, G Xiao, and A Verstuyf. 2014. 'PDLIM2 Expression Is Driven by Vitamin D and Is Involved in the Pro-Adhesion, and Anti-Migration and -Invasion Activity of Vitamin D'. *Oncogene* 33 (15): 1904–11. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.123>.
- Vanweelden Kathryn, Louise Flanagan, Lise Binderup, Martin Tenniswood, and Joellen Welsh. 1998. 'Apoptotic Regression of MCF-7 Xenografts in Nude Mice Treated with the Vitamin D₃ Analog, EB1089'. *Endocrinology* 139 (4): 2102–10.
- Varn Frederick S., David W. Mullins, Hugo Arias-Pulido, Steven Fiering, and Chao Cheng. 2017. 'Adaptive Immunity Programmes in Breast Cancer'. *Immunology* 150 (1): 25–34. <https://doi.org/10.1111/imm.12664>.
- Verma Rewa, Jong Hyeok Jung, and Jae Young Kim. 2014. '1,25-Dihydroxyvitamin D₃ up-Regulates TLR10 While down-Regulating TLR2, 4, and 5 in Human Monocyte THP-1'. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 141 (7): 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.12.012>.
- Vivier Eric, Elena Tomasello, Myriam Baratin, Thierry Walzer, and Sophie Ugolini. 2008. 'Functions of Natural Killer Cells'. *Nature Immunology* 9 (5): 503–10. <https://doi.org/10.1038/ni1582>.
- Vranić Luka, Ivana Mikolašević, and Sandra Milić. 2019. 'Vitamin D Deficiency: Consequence or Cause of Obesity?' *Medicina* 55 (9): 541–9. <https://doi.org/10.3390/medicina55090541>.
- Walsh Jennifer S., Simon Bowles, and Amy L. Evans. 2017. 'Vitamin D in Obesity': *Current Opinion in Endocrinology & Diabetes and Obesity* 24 (6): 389–94. <https://doi.org/10.1097/MED.0000000000000371>.
- Wang Bin, Heshan Xu, Xiaoyin Hu, Wenyu Ma, Jian Zhang, Yuanfeng Li, Min Yu, Yaru Zhang, Xuegang Li, and Xiaoli Ye. 2020. 'Synergetic Inhibition of Daidzein and Regular Exercise on Breast Cancer in Bearing-4T1 Mice by Regulating NK Cells and Apoptosis Pathway'. *Life Sciences* 245 (15): 117387. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117387>.
- Wang Dan, Omar Israel Vélez de-la-Paz, Jun-Xia Zhai, and Dian-Wu Liu. 2013. 'Serum 25-Hydroxyvitamin D and Breast Cancer Risk: A Meta-Analysis of Prospective Studies'. *Tumor Biology* 34 (6): 3509–17. <https://doi.org/10.1007/s13277-013-0929-2>.
- Wang Jing, Danyang Li, Huaixing Cang, and Bo Guo. 2019. 'Crosstalk between Cancer and Immune Cells: Role of Tumor-associated Macrophages in the Tumor Microenvironment'. *Cancer Medicine* 8 (10): 4709–21. <https://doi.org/10.1002/cam4.2327>.
- Wang Tian-Tian, Frederick P. Nestel, Véronique Bourdeau, Yoshihiko Nagai, Qiuyu Wang, Jie Liao, Luz Tavera-Mendoza, et al. 2004. 'Cutting Edge: 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ Is a Direct Inducer of Antimicrobial Peptide Gene Expression'. *The Journal of Immunology* 173 (5): 2909–12. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.5.2909>.
- Wasnik, Samiksha, Charles H. Rundle, David J. Baylink, Mohammad Safaie Yazdi, Edmundo E. Carreon, Yi Xu, Xuezhong Qin, Kin-Hing William Lau, and Xiaolei Tang. 2018. '1,25-Dihydroxyvitamin D Suppresses M1 Macrophages and Promotes M2 Differentiation at Bone Injury Sites'. *JCI Insight* 3 (17): e98773. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.98773>.
- Wei Ran, and Sylvia Christakos. 2015. 'Mechanisms Underlying the Regulation of Innate and Adaptive Immunity by Vitamin D'. *Nutrients* 7 (10): 8251–60. <https://doi.org/10.3390/nu7105392>.

- Wen Shu Wen, Jaclyn Sceneay, Luize Goncalves Lima, Christina S.F. Wong, Melanie Becker, Sophie Krumeich, Richard J. Lobb, et al. 2016. 'The Biodistribution and Immune Suppressive Effects of Breast Cancer-Derived Exosomes'. *Cancer Research* 76 (23): 6816–27. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0868>.
- Wennerberg Erik, Claire Lhuillier, Marissa D. Rybstein, Kyle Dannenberg, Nils-Petter Rudqvist, Graeme J. Koelwyn, Lee W. Jones, and Sandra Demaria. 2020. 'Exercise Reduces Immune Suppression and Breast Cancer Progression in a Preclinical Model'. *Oncotarget* 11 (4): 452-461. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.27464>.
- Whyte Michael P., John G. Haddad, Desmond D. Walters, and Trevor C. B. Stamp. 1979. 'Vitamin D Bioavailability: Serum 25-Hydroxyvitamin D Levels in Man after Oral, Subcutaneous, Intramuscular, and Intravenous Vitamin D Administration*'. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 48 (6): 906–11. <https://doi.org/10.1210/jcem-48-6-906>.
- Woodall Matthew J, Silke Neumann, Katrin Campbell, Sharon T Pattison, and Sarah L Young. 2020. 'The Effects of Obesity on Anti-Cancer Immunity and Cancer Immunotherapy', 231 (14): 362–367. doi: 10.3390/cancers12051230
- Xu Yi, David J. Baylink, Chien-Shing Chen, Mark E. Reeves, Jeffrey Xiao, Curtis Lacy, Eric Lau, and Huynh Cao. 2020. 'The Importance of Vitamin d Metabolism as a Potential Prophylactic, Immunoregulatory and Neuroprotective Treatment for COVID-19'. *Journal of Translational Medicine* 18 (1): 322-36. <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02488-5>.
- Yang Hyunwon, Yun-Hee Youm, Bolormaa Vandannagsar, Jennifer Rood, K Ganesh Kumar, Andrew A Butler, and Vishwa Deep Dixit. 2009. 'Obesity Accelerates Thymic Aging' 114 (18): 10. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-03-213595>
- Yang Yuan, Howard H. Yang, Ying Hu, Peter H. Watson, Huaitian Liu, Thomas R. Geiger, Miriam R. Anver, et al. 2017. 'Immunocompetent Mouse Allograft Models for Development of Therapies to Target Breast Cancer Metastasis'. *Oncotarget* 8 (19): 30621–43. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15695>.
- Yin J.-w. and G. Wang. 2014. 'The Mediator Complex: A Master Coordinator of Transcription and Cell Lineage Development'. *Development* 141 (5): 977–87. <https://doi.org/10.1242/dev.098392>.
- Zhang Chunyan, Chanyu Yue, Andreas Herrmann, Jieun Song, Colt Egelston, Tianyi Wang, Zhifang Zhang, et al. 2020. 'STAT3 Activation-Induced Fatty Acid Oxidation in CD8+ T Effector Cells Is Critical for Obesity-Promoted Breast Tumor Growth'. *Cell Metabolism* 31 (1): 148-161.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.10.013>.
- Zhang Wei, Jun Wang, Rui Cao, Hong C. Lai, Zhiyuan Mi, Jiangtao Su, Jingyu Xiao, and Miaozi Gong. 2017. 'Vitamin D Assay in Human Serum Samples: A Review of Analysis Methods'. *International Journal of Current Research in Biosciences and Plant Biology* 4 (2): 1–6. <https://doi.org/10.20546/ijcrbp.2017.402.001>.
- Zhang Xin, Sharon Ing, Austin Fraser, Minzi Chen, Omar Khan, Jerald Zakem, William Davis, and Robert Quinet. 2013. 'Follicular Helper T Cells: New Insights Into Mechanisms of Autoimmune Diseases' 13 (1): 1181-83. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-14-0036
- Zhao, Bin, Ran Li, Fang Yang, Feiyan Yu, Na Xu, Fang Zhang, Xuejun Ge, and Jie Du. 2018. 'LPS-Induced Vitamin D Receptor Decrease in Oral Keratinocytes Is Associated With Oral Lichen Planus'. *Scientific Reports* 8 (1): 763. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19234-z>.
- Zhao Guanggao, Shi Zhou, Allan Davie, and Quansheng Su. 2012. 'Effects of Moderate and High Intensity Exercise on T1/T2 Balance', *Breast Cancer Research* 17(15): 100-119. doi: 10.1186/bcr3561.
- Zheng Xianjie and Sen Niu. 2018. 'Leptin-Induced Basal Akt Phosphorylation and Its Implication in Exercise-Mediated Improvement of Insulin Sensitivity'. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 496 (1): 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.12.161>.
- Zhou Z., C. Richard and H. A. Ménard. 2000. 'De Novo Synthesis of Proteinase 3 by Cytokine Primed Circulating Human Polymorphonuclear Neutrophils and Mononuclear Cells'. *The Journal of Rheumatology* 27 (10): 2406–11.
- Zinser Glendon M., Kevin McEleney, and JoEllen Welsh. 2003. 'Characterization of Mammary Tumor Cell Lines from Wild Type and Vitamin D3 Receptor Knockout Mice'. *Molecular and Cellular Endocrinology* 200 (1–2): 67–80. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(02\)00416-1](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(02)00416-1).

RESUMÉ

La vitamine D (VitD) est une hormone liposoluble qui, outre son implication dans le métabolisme osseux, joue un rôle important dans la modulation de la réponse immunitaire et la surveillance anti-tumorale. De fait, il existe de plus en plus de données reliant le déficit en VitD et des problèmes de santé comme l'auto-immunité ou la sensibilité accrue aux infections. Le cancer du sein, le plus fréquent chez la femme, est associé à plusieurs facteurs de risque parmi lesquels le surpoids, notamment après la ménopause, et l'insuffisance d'activité physique. Plusieurs études de cohorte ont établi une relation, encore controversée, entre le risque de cancer du sein et le déficit en VitD.

Dans ce contexte, l'objectif de la thèse était de définir l'impact de la VitD sur les capacités de réponse des cellules immunocompétentes en lien avec la prolifération de cellules tumorales mammaires dans des modèles expérimentaux *ex vivo*, *in vitro* et *in vivo*.

Ex vivo, nous avons mis en évidence l'expression à l'état basal du VDR et des enzymes du métabolisme de la VitD (*CYP27B1* et *CYP24A1*) dans les PBMC (cellules mononucléées du sang) de donneurs sains. L'expression de ces marqueurs est peu influencée par la 25-OH VitD (25D) ou par des agents mimétiques bactérien (LPS) ou viral (PIC). Tandis que l'expression intracellulaire de la cathélicidine, peptide antimicrobien, est induite par la 25D sans et avec stimulation par LPS ou PIC, sa production extracellulaire est induite par la 25D uniquement en présence de ces stimulants.

In vitro, nous avons établi que les cellules murines, macrophagiques IC-21 et cancéreuses mammaires EO771, expriment les ARNm et les protéines de VDR, Cyp27b1 et Cyp24a1. Ces expressions sont modulées de façon inverse par la 25D et la 1,25(OH)₂D (1,25D) dans les 2 lignées. La 1,25D a un effet antiprolifératif sur les EO771, à l'inverse de la 25D. La co-culture des EO771 et des IC-21 supprime l'effet antiprolifératif de la 1,25D et polarise les IC-21 en type M2 anti-inflammatoire. L'expression génique de la cathélicidine dans les EO771 et les IC-21 n'est pas influencée ni par la 1,25D ni par la 25D alors que son expression protéique est stimulée par la 25D.

In vivo, nous avons évalué l'impact d'une supplémentation en VitD (D) associée ou non à une activité physique imposée modérée (Ex) sur le développement des tumeurs mammaires EO771 chez les souris C57BL/6 ovariectomisées, sous régime obésogène (HF) et hébergées en environnement enrichi. Nous avons observé des effets synergiques entre la VitD et l'Ex dans l'amélioration des capacités physiques des animaux et la limitation du surpoids, mais aucun impact sur la croissance tumorale. Pris isolément, l'Ex a amélioré la vigilance immunitaire et la supplémentation en VitD a favorisé un environnement immunitaire tolérogène.

En conclusion, les modèles cellulaires étudiés répondent à la signalisation de la VitD. La VitD favorise l'immunité innée en stimulant *in vitro* la sécrétion de la cathélicidine humaine et murine. La 1,25D a des effets antiprolifératifs contre les cellules EO771 qui favorisent un environnement immunosuppresseur. La supplémentation en VitD *in vivo* n'a pas d'effet sur la croissance tumorale, peut-être en raison d'un équilibre entre son effet apoptotique direct sur les EO771 et son effet pro-tumoral immunosuppresseur. L'intervention combinée de la supplémentation en VitD et de l'exercice physique imposé favorisent un environnement immunitaire tolérogène, sans incidence sur la croissance tumorale mammaire.

Mots clés : Calcitriol – Immunité – Cancer mammaire – Obésité – Activité physique